



ISABEL CRISTINA MARQUES FENSTERSEIFER

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA SELETIVA DO PEPTÍDEO CATIÔNICO
PaDBS1R6 CONTRA BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS**

Brasília
2019

ISABEL CRISTINA MARQUES FENSTERSEIFER

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA SELETIVA DO PEPTÍDEO CATIÔNICO PaDBS1R6
CONTRA BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco

Brasília
2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MIS74a Marques Fensterseifer, Isabel Cristina
Atividade antibacteriana seletiva do peptídeo catiônico
PaDBS1R6 contra bactérias Gram-negativas / Isabel Cristina
Marques Fensterseifer; orientador Octávio Luiz Franco. --
Brasília, 2019.
106 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Patologia Molecular) --
Universidade de Brasília, 2019.

1. Peptídeo antimicrobiano. 2. bactéria Gram-negativa. 3.
Escherichia coli. 4. Pseudomonas aeruginosa. 5. Joker. I.
Luiz Franco, Octávio, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais – Romeo Fensterseifer e Josefa Maria Coelho Marques – por todo apoio e confiança, por terem estado ao meu lado durante esta jornada perguntando como andavam o artigo e a tese, por terem ouvido minhas ideias e me dado força. Sem eles definitivamente não teria chegado até aqui, eles são meus maiores exemplos.

Agradeço aos meus irmãos – James Fensterseifer e Guilherme Marques Fensterseifer – pelo apoio durante essa caminhada, por me ouvirem reclamar de muitas coisas nos almoços de domingo e por terem me dado força para chegar até aqui.

Agradeço ao meu namorado, Bruno Alves, por ter ouvido e me apoiado durante a realização do trabalho, estando sempre disposto a tentar solucionar problemas, mesmo que não seja sua área de atuação.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Octávio Luiz Franco, pelas oportunidades que me ofereceu, pela confiança depositada em mim durante todos esses anos, pela paciência e cuidadosa orientação que culminou nesta tese.

Um agradecimento especial aos meus amigos, Osmar Nascimento Silva e William Farias Porto, que percorreram todo esse caminho comigo, me dando todo o apoio como pesquisadores e suporte como amigos.

Agradeço aos amigos do laboratório – Állan Pires, Camila Maurmann, Fernanda Nomiya, Liana C. P. Vilas Boas, Rayssa Porcino, Rhayfa Berlanda, Stephan Dohms, Thuanny Borba – que se tornaram muito mais que isso depois de tantas reclamações, apoio mútuo e carinho, criando laços que permanecerão depois de terminado o doutorado.

Agradeço aos alunos de iniciação científica – Mauricio Vilela, Natan Carvalho e Isabela Navarro – que me ajudaram na realização dos experimentos e nas horas de desespero, quando algo não respondia como o esperado.

Agradeço o apoio incondicional e contínuo das minhas amigas mais próximas Adla Marques, Barbara Miranda (Kid), Bruna Macedo (Bru), Lidiane Falcão (Lidi), Mayra Martins (Mah), Patrícia Berezowski Machado (Paty) e Rafaela Zveiter (Rafa) por sempre me estimularem a prosseguir em cada passo.

Agradeço ainda a todas as outras pessoas que me apoiaram ou estiveram presentes durante essa caminhada até aqui, principalmente funcionários, técnicos e outros profissionais que tiveram participação em nossos experimentos.

*“But in the end
It doesn't even matter”*
(Linkin Park – In the end)

RESUMO

Referência: FENSTERSEIFER, Isabel Cristina Marques. **Atividade antibacteriana seletiva do peptídeo catiônico PaDBS1R6 contra bactérias Gram-negativas.** 2019. 106 f. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

Infecções causadas por bactérias Gram-negativas têm sido consideradas um dos maiores problemas de saúde em todo o mundo. Bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são consideradas prioridades para a busca de novos tratamentos segundo uma lista de prioridade publicada pela OMS. A OMS também relata a importância da busca de novas estratégias para o tratamento dessas doenças. Dessa forma, os peptídeos antimicrobianos podem ser uma alternativa para o tratamento dessas patologias. O desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos a partir de ferramentas computacionais tem sido uma alternativa para a criação de novas moléculas. Dentre esses métodos o algoritmo Joker foi usado para projetar o peptídeo PaDBS1R6. Em suma este estudo teve como objetivo avaliar as atividades antibacterianas de PaDBS1R6 *in vitro* e *in vivo*, juntamente com a caracterização da interação do peptídeo com as membranas alvo e a investigação da estrutura do peptídeo em contato com as vesículas miméticas. Nós demonstramos que este peptídeo exibiu atividade antimicrobiana seletiva contra bactérias Gram-negativas. Além disso, experimentos com vesículas lipídicas mostraram que o arranjo estrutural de PaDBS1R6 transita de um *random coil* para uma α -hélice na presença de lipídios negativamente carregados como caracterizado por dicroísmo circular (CD) e ressonância nuclear magnética (RNM). Assim, o peptídeo PaDBS1R6 revelou ser um candidato para o tratamento de infecções associadas a cuidados de saúde causadas por bactérias Gram-negativas e também pode ser usado como um modelo para novos agentes antimicrobianos.

Palavras chave: Peptídeo antimicrobiano, bactéria Gram-negativa, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, Joker

ABSTRACT

Reference: FENSTERSEIFER, Isabel Cristina Marques. **Selective antibacterial activity of the cationic peptide PaDBS1R6 against Gram-negative bacteria**. 2019. 106 f. Thesis (PhD) - University of Brasília, Brasília, 2019.

Infections caused by Gram-negative bacteria have been considered one of the major health problems worldwide. Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* are considered priorities for the search for new treatments according to a priority list published by WHO. The WHO also reports the importance of the search for new strategies for the treatment of these diseases. Thus, antimicrobial peptides may be an alternative for the treatment of these pathologies. The antimicrobial peptides computer guided design has been used in the last decades to yield novel molecules. Among those methods, the Joker algorithm was used to design the peptide PaDBS1R6. In summary, this study aims to evaluate the *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities of PaDBS1R6, along with the characterization of peptide interaction to target membranes and also the peptide structure investigation in contact with mimetic vesicles. Here we demonstrate that this peptide exhibited selective antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. In addition, experiments with lipid vesicles showed that PaDBS1R6 structural arrangement transits from random coil to α -helix in the presence of negatively charged lipids as characterized by circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR). Thus, the PaDBS1R6 peptide seems to be a candidate for Gram-negative bacteria healthcare-associated infections treatment and can also be used as a template for new antimicrobial agents.

Keywords: antimicrobial peptides, Gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, Joker

SUMÁRIO

1	Introdução	9
1.1	Infecções relacionadas a assistência à saúde causadas por bactérias	
	Gram-negativas	10
1.1.1	Infecções causadas por <i>Escherichia coli</i>	11
1.1.2	Infecções caudas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.1.3	Resistência bacteriana	13
1.2	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	14
1.2.1	Desenho e desenvolvimento do peptídeo utilizado no trabalho	21
2	Objetivos	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	ARITGO	9
3.1	Introduction	11
3.2	MATERIAL AND METHODS	13
3.2.1	Peptide synthesis	13
3.2.2	Formation of large unilamellar vesicles	13
3.2.3	Preparation of bacterial cells for confocal microscopy	13
3.2.4	Animals	14
3.2.5	Hemolytic assay	14
3.2.6	Antibacterial assays	14
3.2.7	In vitro selectivity index	15
3.2.8	Anti-biofilm screening assays	15
3.2.9	Confocal microscopy	15
3.2.10	Atomic force microscopy	16
3.2.11	Murine intraperitoneal infection model	16
3.2.12	Scarification skin infection mouse model	16
3.2.13	Dynamic light scattering and zeta-potential	16
3.2.14	Fluorescence spectroscopy assays	17
3.2.15	Circular dichroism	19
3.2.16	NMR spectroscopy and structure calculations	20
3.2.17	Solvation potential energy calculation	20
3.3	RESULTS	21

3.3.1 PaDBS1R6 targets Gram-negative bacteria	21
3.3.2 Antimicrobial activity against <i>P. aeruginosa</i> planktonic cells and pre-formed biofilms	21
3.3.3 Effect of PaDBS1R6 treatment on the viability and morphology of <i>E. coli</i> cells	22
3.3.4 Evaluation of PaDBS1R6 and lipid membrane electrostatic interactions	23
3.3.5 Evaluation of the mechanisms of PaDBS1R6 interaction with targeted biomembranes	24
3.3.6 PaDBS1R6 undergoes a coil-to-helix transition in the presence of hydrophobic media	25
3.3.7 NMR structure of PaDBS1R6 in DPC micelles	26
3.4 DISCUSSION	28
3.5 Conclusions	32
Acknowledgements	33
SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS	49
<u>SUPPLEMENTARY Tables and figures</u>	<u>50</u>
<u>4 Discussão</u>	<u>56</u>
<u>5 Conclusão</u>	<u>69</u>
<u>6 Outros artigos publicados durante o doutorado</u>	<u>70</u>
<u>Referências</u>	<u>78</u>

1 INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas a assistência à saúde (IrAS) têm sido definidas como sendo qualquer infecção adquirida após a admissão do paciente no serviço de saúde, pode se manifestar durante a internação ou após a alta, desde que possa ser relacionada com a internação ou com os procedimentos hospitalares [1]. As IrAS consistem em uma das grandes responsáveis pelos quadros de mortalidade e morbidade nos hospitais em todo o mundo. Elas acometem principalmente pacientes internados com baixa resposta imunológica, como os que estão nas unidades de terapia intensiva (UTI) [2]. As IrAS podem estar amplamente associadas a seleção de microrganismos multirresistentes a antimicrobianos, aumentando os custos globais de tratamento além de sobrecarregar os sistemas de saúde [3]. Por um lado, os organismos infecciosos vêm se tornando cada vez mais resistentes aos antibióticos do mercado, por outro, novos medicamentos não conseguem ser desenvolvidos a tempo de combatê-los. Adicionalmente, as infecções bacterianas causadas por bactérias Gram-negativas têm sido reportadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma crescente ameaça [4]. Dentre as bactérias presentes as Gram-negativas *Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenêmicos; *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a carbapenêmicos; e *Enterobacteriaceae*, resistente a carbapenêmicos, produtora de betalactamases de espectro estendido (ESBL); aparecem na lista de prioridade de patógenos para o desenvolvimento de novos tratamentos.

Dessa forma, o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas parece ser imprescindível. Entre as novas possibilidades estão os peptídeos antimicrobianos (PAMs), que têm se tornado alvo de pesquisa por diversos grupos, devido, principalmente, à sua habilidade em inibir o crescimento ou em matar uma variedade de microrganismos capazes de gerar infecções em animais e plantas [5–7]. Essas moléculas de caráter proteico têm sido isoladas e caracterizadas a partir de diversas fontes, como bactérias, plantas, fungos, invertebrados e vertebrados e são conhecidas por apresentarem tamanho reduzido (menos de 100 resíduos de aminoácidos) [5,8,9]. No entanto, a utilização de PAMs como agentes terapêuticos apresenta algumas limitações, como a estabilidade, a citotoxicidade e o tamanho [5,7]. O desenho racional de PAMs pode ser uma ferramenta para a busca de peptídeos

menores e eficientes, diminuindo assim o custo de síntese, possibilitando aumentar a atividade e reduzir a citotoxicidade [10,11].

Diversos trabalhos com PAMs, voltados para prospecção, desenho racional, elucidação de mecanismos de ação, combinação entre os mesmos e nanoformulação têm sido realizados em torno da questão da resistência antimicrobiana [5]. Esses trabalhos têm conferido notoriedade aos PAMs não somente em centros acadêmicos, mas também em indústrias farmacêuticas, levando a formação de produtos biotecnológicos já utilizados em alguns países [9].

1.1 INFECÇÕES RELACIONADAS A ASSISTÊNCIA À SAÚDE CAUSADAS POR BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

As IrAS representam um dos eventos adversos aos tratamentos de saúde mais frequentes, afetando pacientes internados, tendo como desfecho o aumento da morbidade e da mortalidade dos pacientes, além de aumento do tempo e custo das internações hospitalares [12]. Os principais patógenos associados as IrAS são bactérias, normalmente pertencentes a microbiota normal do indivíduo causando infecção devido a uma falha no sistema imunológico do paciente [13]. As práticas de controle de infecção e o desenvolvimento de novos antimicrobianos têm se concentrado principalmente em bactérias Gram-positivas. Porém, nos últimos anos, a incidência de infecções causadas por bactérias Gram-negativas aumentou consideravelmente em unidades de terapia intensiva. As infecções causadas por organismos Gram-negativos multirresistentes estão associadas a alta morbidade e mortalidade, com custos diretos e indiretos significativos decorrentes de internações prolongadas devido a falhas no tratamento com antibióticos [14].

A Organização Mundial da Saúde (OMS) é um dos muitos órgãos de saúde que têm trazido a importância do tratamento de bactérias Gram-negativas como prioridade [4], liberando, em 2017, uma lista com os principais patógenos aos quais pesquisadores e indústria deveriam focar para o desenvolvimento de novos tratamentos [4]. Dentre aqueles que apresentam prioridade encontram-se *P. aeruginosa* e a família das *Enterobacteriaceae*, onde encontram-se as espécies de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

Para critério de vigilância o *Center for Disease Control* (CDC) nos Estados Unidos classificou os sítios de IrAS em 13 tipos. Os sítios mais comuns de infecção foram: trato urinário, tecido mole em área cirúrgica, meningite e sistema respiratório [13]. Centenas de milhões de pacientes por ano, em todo mundo, são afetados por IrAS segundo a OMS, levando a uma mortalidade significativa e uma perda financeira para os sistemas de saúde mundiais. A cada 100 pacientes hospitalizados, 7 em países desenvolvidos e 10 em países em desenvolvimento irão adquirir pelo menos uma IrAS [15].

Um estudo realizado em Belém, demonstrou que na UTI de um hospital de ensino de referência em doenças infecciosas, os microrganismos mais frequentes identificados em paciente com sepse foram *Micobacterium tuberculosis* (22%) e Bacilos Gram-negativos totalizando 21% das ocorrências. Já cocus Gram-positivos apareceram em 12 % dos casos [16]. Um outro estudo realizado com hemoculturas coletados no Hospital Universitário de Santa Maria, coletou dados no período de 2012-2013, demonstrou que de 1080 amostras que apresentaram crescimento microbiano, 69,3% eram bactérias Gram-positivas, enquanto 22,9 % eram Gram-negativas [17]. Pesquisadores de Terezinha, Piauí, detectaram casos de IrAS no Hospital Universitário da Universidade Federal do Piauí (HU-UFPI), e demonstraram que, dos casos onde houve confirmação das bactérias presentes no sítio de infecção, os mais prevalentes foram: *K. pseudomoniae* 38 (10,1%), *E. coli* 21 (5,6%), *P. aeruginosa* 18 (4,8%), *Staphylococcus aureus* 14 (3,7%) [18].

1.1.1 Infecções causadas por *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, possui forma de bastonete e é classificada como membro da família *Enterobacteriaceae*. *E. coli* está entre os microrganismos mais estudados, por se tratar de um dos patógenos mais importantes em humanos [19]. É um habitante comensal presente no trato gastrointestinal de humanos e outros mamíferos. Essa bactéria é responsável por uma gama de infecções, sendo a causa mais comum de infecções da corrente sanguínea e infecções do trato urinário (ITU) dentre as bactérias Gram-negativas. As cepas patogênicas extra intestinais possuem fatores de virulência especializados, como

adesinas, toxinas, revestimentos de polissacarídeos e invasinas que não estão presentes nas cepas patogênicas comensais e intestinais [20,21].

E. coli vem sendo a espécie mais frequentemente isolada em laboratórios de análises microbiológicas clínicas. Baseado nos perfis de patogenicidade, como fatores de virulência, doença clínica e perfil filogenético, a *E. coli* causadora de doença intestinal foi dividida em seis patótipos: (1) *E. coli* enteropatogênica, (2) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), (3) *E. coli* enteroinvasora (que inclui *Shigella* sp.), (4) *E. coli* enteroagregativa, (5) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e (6) *E. coli* difusamente aderente. Além desses, dois outros patótipos também emergiram recentemente, a *E. coli* invasiva aderente (AIEC), associada frequentemente à doença inflamatória intestinal e a *E. coli* enteroagregativa produtora de toxina Shiga [22,23]. As *E. coli* extraintestinais foram separadas em grupos determinados por associação de doença, incluindo *E. coli* uropatogênica, *E. coli* associada a meningite neonatal e *E. coli* causadora de sepse [24].

As infecções de corrente sanguínea por *E. coli* aumentaram 9 % comparando os exercícios de 2014/15 e 2016/17, segundo um estudo publicado por Otter, J.A. e colaboradores. Esse trabalho demonstrou que 36 % dos casos de infecção da corrente sanguínea por *E. coli* começaram por uma infecção urinária, 15 % tinham fonte gastrointestinal e 11,4 % estavam associados a procedimento cirúrgico [25].

Em estudo liberado pela ANVISA, foi demonstrado que, em pacientes com infecção sanguínea, internados em UTI, *E. coli* é a oitava maior causa de notificação, sendo responsável pela contaminação de 4,2 % dos pacientes [26].

1.1.2 Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria ambiental Gram-negativa presente em praticamente todos os ambientes terrestres. É um patógeno humano oportunista capaz de causar uma ampla gama de infecções agudas e crônicas que ameaçam a vida, sendo um importante patógeno para pacientes imunocomprometidos. Essa bactéria é de grande importância médica, uma vez que é um dos principais patógenos nosocomiais que afetam pacientes hospitalizados, sendo intrinsecamente resistente a uma ampla gama de antibióticos [27,28].

A *P. aeruginosa* também vem sendo amplamente associada a IrAS, incluindo pneumonia associada à ventilação mecânica, infecção da corrente sanguínea associada à cateter central, infecção relacionada à cateter urinário e infecções cirúrgicas [27,29]. IrAS causadas por *P. aeruginosa* têm se mostrado uma questão de saúde mundial, nos EUA, estima-se que infecções causadas por essa bactéria contribuem para 51.000 novos casos de internação a cada ano [27,28]. *P. aeruginosa* é uma bactéria comumente associada aos serviços de saúde por ser capaz de sobreviver em superfícies bióticas e abióticas, como equipamentos médicos, e muitas vezes são resistentes ao método de desinfecção sendo transmitida de um paciente para outro [30].

Um estudo realizado no Distrito Federal – Brasil, utilizando dois hospitais da rede pública demonstrou que dos 155 pacientes internados na UTI, 35 % apresentaram IrAS, desses, 25,4 % foram acometidos pela presença de *P. aeruginosa*. Esses pacientes contaminados por *P. aeruginosa* tiveram o foco de infecção localizado nos pulmões. E esse estudo demonstrou que essa bactéria foi a principal causadora de infecção pulmonar, sendo seguida por *Acinetobacter baumannii* [2].

Outro estudo também realizado no Distrito Federal, utilizando como hospital de estudo o Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), demonstrou que de um total de 252 pacientes que sofreram queimaduras 19,4 % desenvolveram sepse durante a internação e tratamento. Nesse estudo, *P. aeruginosa* aparece como sendo a sexta bactéria mais frequente de contaminação, sendo responsável por 6,9 % dos casos e sepse nesses pacientes [16].

1.1.3 Resistência bacteriana

A utilização indiscriminada de antibióticos no tratamento ambulatorial ao longo dos últimos anos tem levado a um aumento drástico no número de bactérias resistentes a antibióticos (*multidrug resistente* - MDR). Isto se aplica a bactérias encontradas na pele e mucosas (bactérias Gram-positivas, por exemplo, MRSA), bem como bactérias encontradas no trato digestivo (bactérias Gram-negativas, por exemplo, produtoras de ESBL) [14,31]. O uso de antibióticos na indústria alimentícia e na criação de animais para consumo humano tem contribuído para o

desenvolvimento de patógenos multirresistentes para os quais não existe nenhum antibiótico eficaz [32,33].

É imprescindível entender de onde os patógenos resistentes surgiram para que medidas de controle de infecções possam ser implementadas evitando assim a disseminação. Alguns dados de epidemiologia usando fatores genéticos tem demonstrado onde há maior probabilidade de encontrar bactérias resistentes a medicamentos. Essas informações podem ser usadas para direcionar intervenções evitando a disseminação desses patógenos, algumas dessas medidas podem ser acesso a água limpa e redução da poluição do meio ambiente por antibióticos. Esses trabalhos também mostram que alguns genes como o da ESBL são endêmicos em todo o mundo. Os genes que originam a resistência a medicamentos são transmissíveis entre microrganismos, explicando o porquê da presença do mesmo gene em diversas cepas de microrganismos diferentes [34].

No mundo inteiro têm sido reportados casos de bactérias resistentes aos antibióticos de última geração. A resistência bacteriana consiste em um processo natural que foi observado desde a descoberta da penicilina, porém tem se tornado um problema na atualidade já que os microrganismos multirresistentes se espalham e o desenvolvimento de novas terapias não ocorre a tempo de combatê-los. Estima-se que aproximadamente 700 mil pessoas morram por ano de infecções por bactérias multirresistentes, esse valor é subestimado devido à dificuldade de vigilância e à falta de comunicação desse tipo de infecção. Comparando com outras patologias como câncer (8,2 milhões de casos), diabetes (1,5 milhões de casos) e acidentes de trânsito (1,2 milhões) os casos relatados de infecções não parecem se destacar, porém uma projeção para 2050 estima que aproximadamente 10 milhões de pessoas irão sofrer com algum tipo de infecção por patógeno multirresistente [35].

1.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

A resistência antimicrobiana aos antibióticos convencionais vem demonstrando que, sem uma ação rápida, a população passará por uma era similar a anterior ao descobrimento dos antibióticos, onde as estratégias terapêuticas utilizadas anteriormente não surtiram mais efeitos [36]. Dessa forma, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm sido estudados como novos candidatos a fármacos. Eles

tem se tornado alvo de pesquisas em todo o mundo, devido principalmente, à sua habilidade em inibir o crescimento ou matar uma variedade de microrganismos responsáveis por patologias em plantas e animais, incluindo o homem [6]. Essas moléculas proteicas têm sido isoladas de praticamente todos os organismos vivos conhecidos, apresentando uma notável variedade estrutural e funcional [9]. Os PAMs vêm sendo relatados como importantes componentes da atividade inata de vários organismos, sendo responsáveis pela proteção do hospedeiro contra infecções. Além disso, podem ser produzidos por bactérias com objetivo de eliminar outras bactérias crescendo em seu nicho ecológico [37]. Muitos PAMs apresentam amplo espectro de atividades, sendo ativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e outros microrganismos. Além disso, esses peptídeos podem modular a atividade do sistema imunológico apresentando tanto atividade antimicrobiana direta, ação sobre o microrganismo, como indireta, estimulando o sistema imunológico do hospedeiro [38].

Os diferentes PAMs possuem as mais diversas origens, além de um amplo espectro de atividade. Essas moléculas possuem em comum algumas características como 1) sequências menores que 50 resíduos de aminoácidos; 2) carga líquida positiva (geralmente entre +2 e +9) devido a presença de resíduos básicos de lisina, arginina e histidina; 3) característica anfipática; 4) baixa massa molecular (menos de 10 kDa); 5) grande variedade de dobramentos estruturais, incluindo α -hélices, folhas- β , hélices estendidas e *loops* [39].

Essas características conferem aos PAMs a capacidade de interagir com as mais diversas membranas lipídicas, as quais se tornam alvos eficientes no mecanismo de ação destes peptídeos. Dessa forma, essas moléculas apresentam um amplo espectro de atividade contra diversos alvos, como bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, parasitas, vírus, entre outros [39]. PAMs podem apresentar atividade sobre componentes intracelulares, em que seu mecanismo de ação constitui-se da sua ligação ao DNA, inibindo a replicação, a transcrição e a tradução, inibindo atividade enzimática e síntese de parede celular ou até mesmo estimulando os mecanismos de defesa do hospedeiro, aumentando ainda mais seu potencial antimicrobiano [9,39]. Os PAMs são moléculas complexas com estruturas secundárias e as vezes terciárias, em que pequenas modificações em suas sequências já podem causar alterações em sua disposição geométrica e nas propriedades físico-químicas.

Características básicas como sequência de aminoácidos e hidrofobicidade parecem ser importantes para o desenvolvimento de novos PAMs [40].

Os PAMs podem ser classificados de acordo com a estrutura, sequência ou mecanismo de ação. A classificação baseada na estrutura resulta em três subclasses: peptídeos em α -hélice, peptídeo em folha- β e *coil*.

Peptídeos que apresentam uma estrutura α -helicoidal podem ser frequentemente encontrados em secreções de rãs e insetos. Esses peptídeos normalmente não apresentam estrutura em ambiente aquoso, tornando-se estruturados na presença de detergentes, como dodecil sulfato de sódio (SDS), micelas e lipossomas [41]. Um peptídeo pertencente a essa família amplamente estudado é a LL-37, um membro das catalecidinas humanas. Esse peptídeo, além de apresentar atividade direta contra os microrganismos, desempenha um papel importante na resposta imunomodulatória e inflamatória [42]. Outro exemplo significativo pertencente a esse grupo são as magaininas α -helicoidais, que foram originalmente isoladas de sapos africanos e são ativas contra uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e -negativas, fungos e leveduras [43,44]. Outro peptídeo recentemente publicado foi o PaDBS1R1, um peptídeo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa ativo contra diferentes tipos de bactéria. Esse peptídeo não apresenta estrutura definida em água, porém quando em contato com micelas altera a conformação para α -hélice [45].

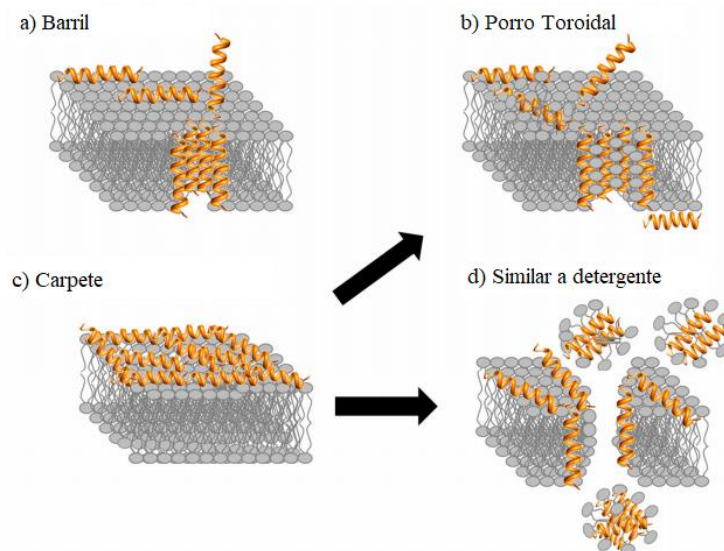
A segunda subclasse são os PAMs que apresentam predominantemente estrutura em folha β . Essa classe possui como uma das principais características a presença obrigatória de cisteínas formando pontes dissulfeto para estabilização da estrutura em folha β . Peptídeos dessa classe não sofrem grandes mudanças estruturais quando passam de um ambiente aquoso para membrana [46]. Um exemplo dessa classe são as defensinas, PAMs que possuem atividade antibacterianas, antifúngicas, antivirais, imunológicas e inflamatórias [42].

A última subclasse de PAMs possui estrutura em *coil*. A maioria dos PAMs nessa categoria são da família das catalecidinas e consistem em dois ou mais resíduos de prolina, conhecidos por quebrar elementos estruturais secundários [41].

A atividade destas moléculas pode estar diretamente relacionada à sequência de aminoácidos que define suas propriedades bioquímicas (como: carga, anfipaticidade e hidrofobicidade) e configuração tridimensional de seus átomos. Essas

características associadas definem os elementos cruciais para sua ação biológica [47–49]. Kumar e colaboradores (2018) ilustraram a diversidade de mecanismos de ação associados à interação entre o PAMs e a membrana microbiana (Figura T1). Os mecanismos de peptídeos com atividade antimicrobiana podem ser baseados em sua estrutura. Desta forma a grande diversidade de PAMs liberados durante um processo infeccioso pode agir sinergicamente, ou ainda um mesmo PAM pode apresentar vários mecanismos de ação, ampliando seu efeito antimicrobiano [41,50].

Figura T1: Esquemática dos quatro principais mecanismos de ação de PAMs em membranas bacterianas. *Adaptado de Kumar (2018).



Dentre os estudos com PAMs é amplamente aceito que a interação com as membranas é um fator importante para a atividade antimicrobiana direta dessas moléculas, tanto quando a membrana é o alvo como quando o alvo é intracelular e é preciso ser alcançado [9,50,51]. As forças eletrostáticas diferentes entre os PAMs catiônicos e a superfície bacteriana carregada negativamente são determinantes para a interação entre os peptídeos e a membrana microbiana [8,9,50]. As diferenças fundamentais entre membranas microbianas e as membranas de mamíferos protegem as células de mamíferos contra os PAMs e permitem a ação seletiva desses peptídeos [8]. A monocamada externa da bicamada lipídica nas membranas bacterianas é composta principalmente por lipídeos carregados negativamente, como fosfatidilglicerol e cardiolipina [52], já a monocamada externa das células de animais é composta por fosfolípidios zwitteriônicos, como fosfatidilcolina esfingomiélnina e

outros componentes neutros, como colesterol [8,9,53]. Dessa forma, as interações entre os PAMs e a membrana celular dos mamíferos ocorrem principalmente por meio de interações hidrofóbicas, que são relativamente fracas em comparação com as interações eletrostáticas ocorridas entre os PAMs e as membranas bacterianas. Outra diferença característica entre essas membranas é a presença de alto teor de colesterol nas membranas de mamíferos, sugere-se que esse teor de colesterol reduza a atividade de PAMs já que ele é responsável pela estabilidade da bicamada lipídica [9,53].

No modelo de barril, os PAMs estão inicialmente orientados paralelamente à membrana, mas eventualmente se inserem perpendicularmente na bicamada lipídica (Figura T1a). Isto promove interações entre os peptídeos nas laterais, de uma maneira semelhante à dos canais iônicos de proteína de membrana. Estrutura anfipática é essencial neste mecanismo de formação de poros, já que as regiões hidrofóbicas interagirão com os lipídios de membrana e os resíduos hidrofílicos irão formar o lúmen dos canais. Uma propriedade única associada a PAMs nesta categoria é um comprimento mínimo de ~ 22 resíduos (α helicoidais) ou ~ 8 resíduos (folha β) para abranger a bicamada lipídica [41,50].

No modelo de poro toroidal, os peptídeos também se inserem perpendicularmente na bicamada lipídica, porém a interação entre peptídeos não está presente, já que os peptídeos interagem com os fosfolipídios da membrana (Figura T1b). A característica que difere o modelo de barril do modelo de poro toroidal consiste no arranjo líquido da bicamada lipídica. No modelo de Barril, o arranjo hidrofóbico e hidrofílico dos lipídeos é mantido, enquanto no poro toroidal o arranjo hidrofóbico e hidrofílico da bicamada é interrompido [41,50].

Alguns PAMs podem agir sem formar poros na membrana, um modelo sugerido para esses casos é o modelo de tapete. Nesse caso, os PAMs adsorvem paralelamente na bicamada lipídica atingindo uma concentração limiar para cobrir a superfície da membrana formando um tapete de peptídeo (Figura T1c). Isso leva a interações desfavoráveis na membrana que têm como consequência a perda da integridade da membrana, produzindo um efeito do tipo detergente. A disrupção da membrana em micelas é conhecida como modelo do tipo detergente (Figura T1d) interrompido [41,50].

PAMs podem demonstrar, além da atividade antimicrobiana, uma atividade imunomodulatória, a qual se caracteriza pelo estímulo da resposta imune humoral do hospedeiro contra o patógeno, mediada pelo peptídeo [54]. A grande variedade de ações e a rápida ação bactericida dos PAMs são alguns dos motivos que os tornam candidatos promissores como agentes antimicrobianos. Até o momento, apenas alguns PAMs foram aprovados para o uso clínico. Existem diversos PAMs atualmente em desenvolvimento sendo testados em ensaios clínicos [55].

Nos últimos 30 anos, diversos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de PAMs com uso clinicamente relevante. Porém, nenhum antibiótico projetado a base de PAMs chegou às drogarias. Entretanto, vários PAMs e derivados de PAMs estão em estágio pré-clínico e clínico de desenvolvimento [56]. Um exemplo é o peptídeo PL-5, um PAMs α -helicoidal desenvolvido pela *Prote Light Pharmaceuticals* e é o primeiro PAM a receber autorização para entrar em estágio clínico na China, sendo utilizado para infecção de pele [57].

A forma convencional de desenvolvimento de fármacos consiste no teste direto de compostos naturais ou sintéticos em ensaios biológicos, teste diretamente em células ou em modelos animais. Os processos de purificação, caracterização e síntese desses compostos tornam o processo de desenvolvimento de fármacos trabalhoso, ineficiente e de alto custo. Além disso, muitos peptídeos isolados de fontes naturais precisam de melhorias antes da utilização desses agentes como fármacos. Nos últimos anos têm aumentado a quantidade e variedade de PAMs produzidos de forma sintética com objetivo de alcançar características físico-químicas desejáveis. Com objetivo de desenvolver moléculas mais eficazes, com menos efeitos não desejáveis e com maior facilidade de síntese, metodologias de desenho *in silico* tem sido cada vez mais utilizadas [10,58].

Algumas características estruturais e físico-químicas, como cationicidade, propensão a formação de hélice, a anfipaticidade e a hidrofobicidade podem estar intimamente relacionados entre si, de forma que modificações em um parâmetro, podem resultar em alteração em todos eles. A compreensão e o controle desses parâmetros pode ser a alternativa para o desenvolvimento de novos peptídeos com maior potência e maior especificidade. Vários métodos de predição de atividade antimicrobiana surgiram a partir de estudos de desenho racional de moléculas [11,49,59]

Alguns recursos foram descritos como importantes para o desenvolvimento de novos peptídeos antimicrobianos por desenho racional. Alguns desses recursos têm como foco as propriedades físico-químicas complexas e/ou a facilidade da alteração de sua estrutura através da alteração da sequência de aminoácidos [40]. Alguns recursos importantes serão descritos a seguir.

Os PAMs apresentam uma composição diversificada e suas sequências têm sido foco de investigação entre os pesquisadores. Alguns autores têm sugerido que a atividade antimicrobiana não é relacionada a aminoácidos específicos na sequência, mas sim a sua composição geral de aminoácidos, se são básicos, ácidos, alifáticos ou aromáticos, e as características físico-químicas associadas a sequência. Essas características são intrínsecas a aminoácidos específicos e mudanças sutis podem levar a alterações funcionais importantes da molécula, inclusive aumentando a toxicidade para as células hospedeiras [60]. O desenho baseado na sequência assegura a conservação de resíduos dentro de certas regiões do peptídeo, mesmo que os resíduos inseridos não apresentem o mesmo comprimento ou o mesmo efeito na estrutura global do peptídeo. As características mais comuns relevantes para o projeto de peptídeos antimicrobianos são a carga líquida, a hidrofobicidade e a capacidade de ajudar na formação da hélice de cada resíduo separadamente [40].

Algumas metodologias de desenho racional foram definidas, por mais que muitos modelos sejam híbridos, abarcando todas as metodologias, podemos classificá-las basicamente em quatro tipos: métodos físico-químicos, métodos baseados em uma sequência modelo, métodos evolutivos e métodos de novo [49,61]. (1) Os métodos físico-químicos normalmente utilizam peptídeos com conformação em α -hélice como base para o estudo. Peptídeos com essa estrutura apresentam uma ampla distribuição e um amplo espectro de ação, suas propriedades físico-químicas (carga total, hidrofobicidade, momento hidrofóbico) podem ser facilmente mensuradas. (2) Para os métodos baseados em uma sequência modelo, é importante frisar que a sequência escolhida não precisa ter atividade antimicrobiana para servir como modelo para o desenvolvimento de outra molécula. O objetivo principal é a redução do tamanho, o aumento da seletividade e a redução do efeito tóxico do PAM, podendo ser associada à metodologia anterior para a predição das características da nova molécula. (3) Para os métodos evolutivos, faz-se necessário um maior poder computacional que os métodos anteriores. Esses métodos utilizam algoritmos

genéticos que tratam um conjunto de peptídeos como uma população onde cada indivíduo pode ser uma resposta potencial. O algoritmo força a evolução do sistema baseado em uma função *fitness* (por exemplo, um *score* para atividade antimicrobiana). (4) Diferentemente dos métodos evolutivos, que utilizam uma sequência central para desenvolver análogos, os métodos de novo podem gerar uma grande variedade de sequências utilizando padrões ou frequência de aminoácidos e preferências de posicionamento. Semelhante ao método anterior, o método de novo precisa de um alto poder computacional [40,61,62].

1.2.1 Desenho e desenvolvimento do peptídeo utilizado no trabalho

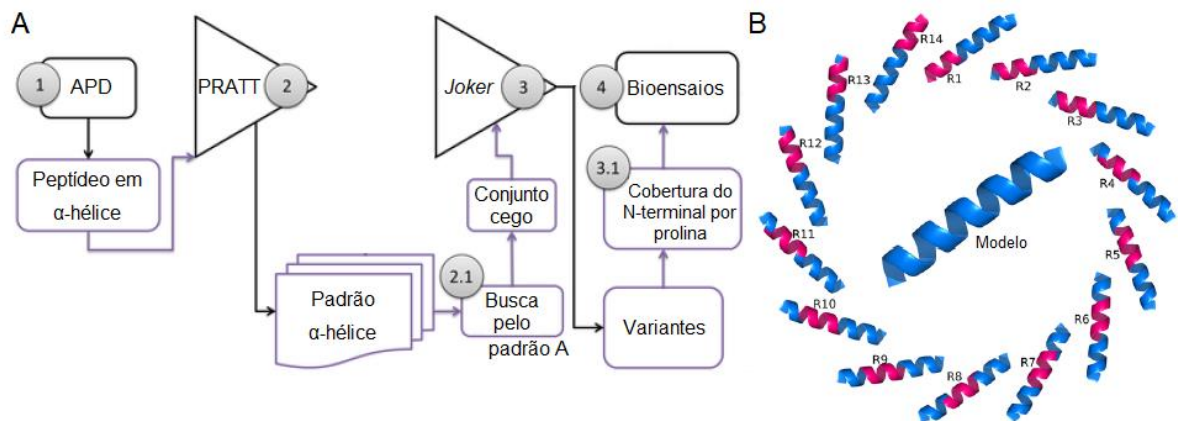
As técnicas de desenho racional geram milhares de moléculas que devem ser analisadas para seleção de possíveis candidatos a novos fármacos. O algoritmo Joker pode ser classificado como um método baseado em sequência modelo, já que ele utiliza uma sequência conhecida como base para o desenvolvimento de outras moléculas. O algoritmo Joker foi desenvolvido com o intuito de melhorar peptídeos antimicrobianos já existentes. Ele realiza modificações incrementais em sequências de peptídeos em uma janela deslizante, realizando a inserção de um padrão antimicrobiano em uma série de sequências alvo por substituintes diretas de aminoácidos [62].

Para o desenho dessas novas moléculas, o banco de dados *Antimicrobial Peptides Database* foi utilizado para seleção de um conjunto de sequências de α -hélice, resultando em 248 sequências (Figura T2a, passo 1). O Joker foi desenvolvido para trabalhar com programas de reconhecimento de padrões, por exemplo o Pratt, que foi utilizado para descobrir padrões que posteriormente podem ser modificados manualmente (Figura T2a, passo 2). Em seguida um conjunto cego de sequências foi descoberto utilizando as seguintes características para seleção: presença do motivo A (KK[ILV]xxx[ILVA]) (Figura T2a, passo 2.1) e apresentar 18 resíduos de aminoácidos. Esse conjunto é composto por sequências sem informações sobre sua atividade antimicrobiana, faziam parte desse conjunto: (1) um fragmento de tireoredoxina de *Taenia crassiceps*; (2) um fragmento da proteína transpostadora de mercúrio da *E. coli*; (3) a proteína ribossomal L39E de *Pyrobaculum aerophilum*; e três proteínas hipotéticas de (4) *Plasmodium chabaudi*, (5) *Mus musculus* e (6)

Plasmodium yoelii. Essas seqüências foram renomeadas como XxDBSn, onde Xx representam as primeiras letras do nome científico, DBS significa seqüência do banco de dados e n é o número da seqüência (TcDBS1, EcDBS1, PaDBS1, PcDBS1, MmDBS1 e PyDBS1). Por fim, os padrões α -helicoidais foram inseridos nas seqüências desses peptídeos, totalizando 54 variantes projetadas (nove para cada seqüência) (Figura T2a, passo 3). Para esta segunda avaliação, utilizou-se um resíduo de prolina para a cobertura N-terminal (Figura T2a, passo 3.1 e Figura T2b) [62].

Essas 54 seqüências foram sintetizadas e testadas contra uma cepa luminescente de *P. aeruginosai* (Figura T2a, passo 4) [62]. O peptídeo PaDBS1R6 (PMARNKKLLKLLRLKIAFK) foi um dos projetados usando o algoritmo Joker. Ele foi baseado em PaDBS1 sendo usado como peptídeo parental. O PaDBS1R6 foi selecionado entre outros candidatos desenhados devido à sua potente atividade antimicrobiana durante o processo de triagem.

Figura T2: Esquemática do funcionamento do algoritmo Joker. (A) apresenta o passo a passo do desenvolvimento dos novos peptídeos utilizando o algoritmo. (B) Estruturas de variantes hipotéticas projetadas pelo Joker, a janela onde o padrão foi inserido destacado em rosa. Adaptado de Porto (2018).



Este estudo teve como objetivo avaliar as atividades antibacterianas *in vitro* e *in vivo* de PaDBS1R6, caracterizando interações peptídicas com membranas alvo, e descrevendo ainda mais a estrutura peptídica na interação com vesículas. Aqui demonstramos que o peptídeo PaDBS1R6 exibiu atividade antimicrobiana seletiva

contra bactérias Gram-negativas, uma vez que não possuía atividade contra as diferentes cepas de bactérias Gram-positivas testadas. Além disso, experimentos com vesículas lipídicas mostraram que a interação da PaDBS1R6 com lipídios carregados negativamente induziu uma mudança na estrutura do peptídeo de uma espiral aleatória para uma α -hélice, caracterizada tanto pelo dicroísmo circular (CD) como pela ressonância magnética nuclear (RMN). Em vista desses resultados, sugerimos que o peptídeo pode ser um candidato para o tratamento de infecções associadas à assistência à saúde causada por bactérias Gram-negativas e pode ser usado como modelo para novos agentes antimicrobianos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o peptídeo antimicrobiano PaDBS1R6 em termos de espectro de atividade, estrutura tridimensional e interações com membranas alvo.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar a atividade antibacteriana do peptídeo PaDBS1R6 *in vitro* pelo método da microdiluição em caldo.

- Avaliar a atividade citotóxica contra hemácias.

- Avaliar a atividade antibacteriana do peptídeo PaDBS1R6 *in vivo* em um modelo de infecção de ferida contra *P. aeruginosa* e em modelo de infecção sistêmica contra *E. coli*.

- Avaliar a interação do peptídeo com modelos de membrana que mimetizam membrana de células bacterianas e de células de mamíferos.

- Avaliar a estrutura do peptídeo por Ressonância Magnética Nuclear em membrana de DPC.

1 **3 ARITGO**

2

3 **Selective antibacterial activity of the cationic peptide PaDBS1R6 against**
4 **Gram-negative bacteria**5 Isabel C. M. Fensterseifer 1,2,*, Mário R. Felício 3,*, Eliane S. F. Alves 4,
6 Marlon H. Cardoso 1,2,5, Marcelo D. T. Torres 6-8, Carolina O. Matos 4, Osmar N.
7 Silva 5, Timothy K. Lu 6,7, Maurício V. Freire 1, Natan C. Neves 1, Sônia Gonçalves
8 3, Luciano M. Lião 4, Nuno C. Santos 3, William F. Porto5, Cesar de la Fuente-Nunez#
9 6,7, Octavio L. Franco# 1,2,5

10

11 From the 1Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em
12 Ciências Genômicas e Biotecnologia Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF,
13 Brazil; 2Programa de pós-graduação em patologia Molecular, Universidade de Brasília,
14 Brasília, DF, Brazil; 3Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina,
15 Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal; 4Laboratório de RMN, Instituto de Química,
16 Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil; 5S-Inova Biotech, Pós-graduação
17 em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil; 6
18 Synthetic Biology Group, MIT Synthetic Biology Center; The Center for Microbiome
19 Informatics and Therapeutics; Research Laboratory of Electronics, Department of
20 Biological Engineering, and Department of Electrical Engineering and Computer
21 Science, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA; 7 Broad
22 Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA; 8 Centro de Ciências Naturais e
23 Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, SP, Brazil.

24 * These authors contributed equally to this work.

25

26 #To whom correspondence should be addressed: ocf franco@gmail.com, Centro
27 de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências
28 Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília SGAN, Quadra 916,
29 Módulo B, Av. W5 Norte, CEP 70.790-160 Brasília-DF, Brazil Fax: +55-61-3347-
30 4797; Phone Number: +55-61-3448-7220.31 cfuente@mit.edu

32

ABSTRACT

Infections caused by Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* foremost among them, constitute a major worldwide health problem. Bioinformatics methodologies are being used to rationally design new antimicrobial peptides, a potential alternative for treating these infections. One of the algorithms used to develop antimicrobial peptides is the Joker, which was used to design the peptide PaDBS1R6. This study evaluates the antibacterial activities of PaDBS1R6 *in vitro* and *in vivo*, characterizes the peptide interaction to target membranes, and investigates the PaDBS1R6 structure in contact with mimetic vesicles. Moreover we demonstrate that PaDBS1R6 exhibits selective antimicrobial activity against Gram-negative bacteria. Besides, in the presence of negatively charged lipids the structural arrangement of PaDBS1R6 transits from random coil to α -helix, as characterized by circular dichroism and NMR. In conclusion, PaDBS1R6 is a candidate for the treatment of nosocomial infections caused by Gram-negative bacteria as template for producing other antimicrobial agents.

Keywords: Antimicrobial peptide (AMP), PaDBS1R6, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, drug design, Joker algorithm.

53 3.1 INTRODUCTION

54 Bacterial infections have been a public health problem since the early days of
55 civilization [1]. These infections account for a significant portion of infectious diseases,
56 and their mortality and morbidity are currently of increasing concern worldwide [2].
57 The World Health Organization (WHO) has published a list of priority bacteria that are
58 highly resistant to conventional antibiotics; novel classes of antimicrobials are needed
59 to target these organisms. This list highlighted, as immediate threats, the ESKAPE
60 pathogens, which include carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*,
61 carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem-resistant and extended-
62 spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* [3–5]. Despite the
63 growing public health threat posed by antibiotic resistance, the number of new
64 antibiotics approved by the FDA has been decreasing annually [6], partly a reflection
65 of the waning interest by pharmaceutical companies to invest in anti-infective therapies,
66 and partly an indication of the multiple obstacles that arise during the process of
67 approving substances with this potential [7,8].

68 Antimicrobial peptides (AMPs) represent promising alternatives to classical
69 therapies to target infections [9]. In general, they have an amphipathic and cationic
70 structure, with a net positive charge between +3 and +9, and they range in size from 12
71 to 50 amino acid residues [1,10–12]. Other desirable properties when developing a drug
72 are broad-spectrum activity, so that several kinds of pathogenic bacteria are targeted,
73 and multifunctionality, so that antibiofilm, antiviral, antifungal or anticancer properties
74 are included in the drug's spectrum of activity [13–15].

75 In the process of drug development, the rational molecular design is one of the
76 first steps [9,11], and during this, hundreds or even thousands molecules have been
77 developed, and a few functional hits are often identified based on the original design
78 rules [16], to be tested in a more in-depth manner. We recently developed the Joker
79 algorithm for rational peptide design, a de novo method that is based on inserting rigid
80 patterns onto peptide sequences through the sliding window system, which generates a
81 new analogue for each window [17]. In the initial screening, 84 peptides with predicted
82 antimicrobial activity were generated and subsequently tested against a *Pseudomonas*
83 *aeruginosa* luminescent strain [17]. PaDBS1R6 (PMARNKLLKLLKRLKIAFK) was
84 one of the peptides designed using the Joker algorithm, based on the parent peptide
85 PaDBS1 [17], a ribosomal fragment from the archaeum *Pyrobaculum aerophilum*.

86 PaDBS1 was selected among other candidates because of its potent antimicrobial
87 activity during the screening process.

88 Here, we demonstrate that the peptide PaDBS1R6 exhibited selective
89 antimicrobial activity against Gram-negative bacteria, as it lacked activity against the
90 Gram-positive bacteria strains tested. Experiments with lipid vesicles showed that the
91 interaction of PaDBS1R6 with negatively charged lipids induced a change in the
92 structure of the peptide from random coil to α -helix, characterized both by circular
93 dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR). In view of these results, we
94 suggest that the peptide could be a candidate that could be developed to treat the
95 nosocomial infections caused by Gram-negative bacteria or to be used as a template for
96 designing new antimicrobial agents.

97

98 3.2 MATERIAL AND METHODS

99 3.2.1 Peptide synthesis

100 The peptide PaDBS1R6 was synthesized by Peptide 2.0 (USA) using the
101 fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (Fmoc) strategy in solid phase. The peptide was
102 purified by reverse-phase HPLC using an analytical C18 column (Phenomenex, USA).
103 Molecular mass and purity of the synthesized peptide were confirmed by MALDI-ToF
104 mass spectrometry [18] (Figure S1).

105

106 3.2.2 Formation of large unilamellar vesicles

107 LUVs with a diameter of ~100 nm were obtained by extrusion of multilamellar
108 vesicles (MLVs), as described elsewhere [19]. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-
109 phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
110 (POPE) and 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-sn-glycerol) (POPG) were
111 obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Cholesterol (Chol) and
112 cardiolipin (CL) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The LUVs studied
113 were zwitterionic (pure POPC and POPC:Chol (70:30)) or anionic (POPC:POPG
114 (70:30) and POPE:POPG:CL (65:30:05)), mimicking membrane systems relevant for
115 the study [20]. Stock solutions of different compositions in MLVs were kept at 4°C
116 overnight before measurements, and MLVs were extruded the day of the measurement.
117 HEPES buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) was used in all the
118 measurements, except when otherwise indicated.

119

120 3.2.3 Preparation of bacterial cells for confocal microscopy

121 *E. coli* ATCC 25922 was maintained as stock cultures at -80 °C and revived by
122 plating in Luria-Bertani (LB) agar (CONDA, Madrid, Spain) overnight at 37 °C. An
123 isolated bacterial colony was used to inoculate LB broth, and the culture was allowed
124 to grow overnight at 37 °C. 200 µL of culture were used to freshly inoculate 10 mL of
125 LB. The suspension was then allowed to grow at 37 °C for ~3 h, until it reached log-
126 phase, with a final bacterial concentration of $\sim 1 \times 10^8$ colony-forming units per mL
127 (CFU.mL⁻¹) (optical density at 600 nm, OD₆₀₀ ~ 0.257). Bacteria were then centrifuged
128 three times for 25 min at 4000 ×g and resuspended in buffer or broth with a final
129 determination of the cell concentration [21].

130

131 3.2.4 Animals

132 Female C57BL/6 mice (6 to 8 weeks-old) were provided by the Central
133 Bioterium of USP/Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, and female CD-1 mice (6 weeks-
134 old) were bought from Bharles River (Boston, MA). C57BL/6 mice were housed and
135 euthanized according to Silva et al. [22]. The procedures with C57BL/6 and the care
136 and handling of the animals were approved by the Ethics Committee of the Catholic
137 University of Brasilia (030/15). CD-1 mice were maintained in accordance with the
138 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals in an Association for Assessment
139 and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC) accredited
140 facility. All procedures were approved by MIT's Institutional Animal Care and Use
141 Committee (IACUC), protocol number 1016-064-19.

142

143 3.2.5 Hemolytic assay

144 The hemolytic activity of PaDBS1R6 was determined by using fresh C57BL/6
145 mouse red blood cells (mRBCs). Cells were separated from the plasma by
146 sedimentation and then washed three times with a 0.15 M NaCl and 0.01 M Tris-HCl,
147 pH 7.4 solution. After that, erythrocytes were resuspended in phosphate buffered-saline
148 (PBS), pH 7.4. With the aid of a polyethylene tube, several concentrations of the sample
149 were incubated with 50 μ L of mRBCs suspension for 1 h at 37 °C. The negative and
150 positive controls were PBS and Triton X-100, respectively. Tubes were then
151 centrifuged at 12,000 \times g for 15 s, 100 μ L of the supernatant was added to the multi-
152 well plate, and readings were carried out at 405 and 567 nm in an ELISA reader (Bio-
153 Tek Power Wave HT, USA) [23].

154

155 3.2.6 Antibacterial assays

156 Minimum inhibitory concentrations (MICs) of PaDBS1R6 against *Escherichia*
157 *coli* (ATCC 8739, ATCC 25922, KPC+ 001812446 and KPC+ 3789319), *Klebsiella*
158 *pneumoniae* (ATCC 13883 and KPC+ 3259271), *P. aeruginosa* (ATCC 27853, PAO1
159 and PA14), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and methicillin-resistant *S. aureus*
160 (clinical isolate 713623) were determined by the standardized dilution method,
161 according to NCSLA guidelines [24]. Initially, a single colony of each bacteria was
162 inoculated in Mueller Hinton broth (MH) (Himedia, India) or Basal Medium 2 (BM2)
163 and incubated for 18 h, at 37 °C and 200 rpm. Overnight cultures were transferred to
164 new MH and incubated at 37 °C until they reached exponential phase (OD₅₉₅ 0.7). Then,

165 cultures were adjusted to a final concentration of 1×10^6 CFU.mL⁻¹, using the equation
 166 previous described [25]. MICs were measured using PaDBS1R6 from 2 to 64 μ M per
 167 well. Bacteria in medium and chloramphenicol were used as negative and positive
 168 controls, respectively. Plates were incubated at 37 °C for 24 h. The MIC was defined
 169 as the lowest tested concentration that led to complete inhibition (100%) in comparison
 170 to the negative-control group [22].

171

172 3.2.7 *In vitro* selectivity index

173 The *in vitro* selectivity index (SI) is the ratio between the cytotoxic and
 174 antibacterial activity. The selectivity index of PaDBS1R6 was calculated using
 175 equation 1 [26]:

$$176 \quad SI = \frac{\text{Hemolysis}}{\sqrt[n]{\prod_{i=1}^n \text{Antibacterial}_i}} \quad \text{Equation (1)}$$

177 where n corresponds to the number of antimicrobial assays with different biological
 178 samples. For activity values higher than the maximum concentration tested, the
 179 concentration value added to the equation was assumed to be two-fold the maximum
 180 tested value (e.g., if the value was higher than 100, it was considered as 200) [26].

181

182 3.2.8 Anti-biofilm screening assays

183 Biofilms of *P. aeruginosa* strain PAO1 were grown in the absence or presence
 184 of PaDBS1R6 (16 μ M) according to Reffuveille et al. [27] Microscopy was performed
 185 using a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 700 Laser Scanning Confocal),
 186 and three-dimensional reconstructions were generated using the Imaris software
 187 package (Bitplane AG). Two independent replicates were performed for each group.

188

189 3.2.9 Confocal microscopy

190 A confocal laser point-scanning microscope Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss,
 191 Germany), with airyscan, equipped with HE GFP 450-490 nm and HE DsRed 538-562
 192 nm lasers, was used to obtain images of bacteria cells. Images were taken on μ -dish 35
 193 mm, low, ibiTreat (reference 80136, ibidi, Madison, WI, USA), with an EC Plan-
 194 NeoFluar 20 \times objective. Bacteria cells were analyzed using the same kit from biofilm
 195 assays. Images were acquired with Zen 2 software (dark edition, Carl Zeiss, Germany).

196

197 **3.2.10 Atomic force microscopy**

198 *E. coli* cells were prepared as described above. Bacteria were incubated at 25 °C
199 for 1 h, control and treated samples were incubated in the absence and presence of
200 peptide (7 µM), respectively. Procedure and conditions are described by Migliolo et al.
201 [28,29] Images were analyzed with the JPK image processing software v. 5.1.13.

202

203 **3.2.11 Murine intraperitoneal infection model**

204 C57BL6 mice received an intraperitoneal injection of 100 µL of *E. coli*
205 ATCC 8739 containing 1×10^8 CFU.mL⁻¹. One hour after the infection, mice (5 mice
206 per group) were treated intraperitoneally with PaDBS1R6 at concentrations of 5 or 10
207 mg.kg⁻¹, gentamicin (10 mg.kg⁻¹, positive control), or PBS (negative control) for four
208 days [22]. Mice were euthanized at day 4 post-infection; peritoneal fluid was collected
209 and bacterial CFUs were counted. Serial dilutions of the homogenates were plated in
210 triplicate on MH, and the results were expressed as CFU.mL⁻¹ [30].

211

212 **3.2.12 Scarification skin infection mouse model**

213 *P. aeruginosa* strain PA14 was grown and used to infect the skin scarification
214 made on the back of the CD-1 mice according to Pane et al. [31]. The concentration
215 used for single dosage of the peptide was 64 µM. Two independent experiments were
216 performed with 4 mice per group in each condition. Statistical significance was
217 assessed using a one-way ANOVA followed by Bonferroni's test: ***p < 0.001
218 compared to untreated group.

219

220 **3.2.13 Dynamic light scattering and zeta-potential**

221 Dynamic light scattering (DLS) experiments were carried out using a Malvern
222 Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK), with backscattering detection at 173°, equipped with
223 a He-Ne laser (632.8 nm), using disposable cuvettes at 25 °C, as described elsewhere
224 [32]. Normalized intensity autocorrelation functions were analyzed using the CONTIN
225 method [33], yielding a distribution of diffusion coefficients (D). The measured D was
226 used to calculate the hydrodynamic diameter (DH) through the Stokes-Einstein
227 relationship. A set of 15 measurements (with 10 runs each) for the liposomes were done
228 in the absence and presence of the different concentrations of the peptide. The zeta-
229 potential (ξ) of the liposomes was determined at 25 °C from the mean of
230 15 measurements (100 runs each), in the absence and presence of different peptide

231 concentrations, using disposable zeta cells DTS 1060 (Malvern, UK) with gold
 232 electrodes, after 15 min of equilibration time [34]. Values of viscosity and refractive
 233 index were set at 0.8872 cP and 1.330, respectively. The lipid concentration used was
 234 the same as that in the DLS assays in order to acquire high enough count rates [34,35].
 235 All results were processed using the Malvern DTS software, after three independent
 236 experiments.

237

238 3.2.14 Fluorescence spectroscopy assays

239 3.2.14.1 Labelling with di-8-ANEPPS

240 LUVs were prepared as described above, using the same lipid compositions.
 241 After extrusion, the lipid vesicles were diluted to 500 mM for labeling and incubated
 242 overnight at 25 °C with 10 µM of di-8-ANEPPS for maximum dye incorporation. This
 243 dye provides information about the differences induced by the peptide in the membrane
 244 dipole potential. Lipid at 200 mM and 1 µM of the dye was used for the measurements.
 245 To label *E. coli* cells, after cell washing, 105 CFU.mL⁻¹ of cells were incubated with
 246 100 µM of the dye and HEPES buffer with 0.05% (w/v) of Pluronic F-127, for 1 h at
 247 25 °C with gentle agitation and protection from the light. The suspensions were
 248 prepared at a final concentration of 104 CFU.mL⁻¹ of bacteria and 10 µM of the dye.
 249 Prior to the measurement, the solutions were incubated with peptide for 1 h (until
 250 15 µM). Excitation spectra and the ratio of intensities were obtained at the excitation
 251 wavelengths of 455 and 525 nm ($R=I_{455}/I_{525}$). Emission was set at 670 nm to avoid
 252 membrane fluidity-related artefacts [36–38]. Excitation and emission slits for these
 253 measurements were set to 5 and 10 nm, respectively. The variation of the ratio with the
 254 peptide concentrations was analyzed by a single binding site model using the
 255 equation 2:

$$256 \quad \frac{R}{R_0} = 1 + \frac{R_{min}/R_0 \cdot [Peptide]}{K_d + [Peptide]} \quad \text{Equation (2)}$$

257 where the R value is normalized by R₀, the value in the absence of peptide. R_{min} defines
 258 the asymptotic minimum value of R, and K_d is the dissociation constant [39].
 259 Experimental data fitting was performed by non-linear regression with GraphPad
 260 Prism 6. Error bars represent the standard deviation of three replicates.

261

262 3.2.14.2 Labeling with Laurdan

263 LUVs were labeled by adding Laurdan to a final probe concentration to reach a
 264 lipid ratio of 1:300 (3 mM of lipid concentration and 9.90 μM of probe). The mixture
 265 was incubated in the dark for 30 min at 25 $^{\circ}\text{C}$. To label the bacterial cells, after cell
 266 washing and the determination of the cell density, bacteria were incubated with 10 μM
 267 of the dye at a final concentration of 104 CFU.mL⁻¹. This mixture was also incubated
 268 in the dark for 30 min at 25 $^{\circ}\text{C}$. Laurdan emission spectra (between 400 and 600 nm)
 269 were measured after 1 h of incubation in the absence and presence of different
 270 concentrations of the peptide, with excitation at 350 nm, and bandwidths of 5 and 10
 271 nm for excitation and emission, respectively. To quantify the spectral changes, Laurdan
 272 generalized polarization (Gp) was calculated as follows in the equation 3 [40]:

$$273 \quad G_p = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad \text{Equation (3)}$$

274 where I₄₄₀ and I₄₉₀ are the emission intensities at 440 nm and 490 nm (corresponding
 275 to the gel and liquid crystalline lipid phases), respectively. Assays were done in three
 276 replicates, and error bars represent standard deviation.

277

278 3.2.14.3 Fluorescence anisotropy

279 LUVs were prepared as described above, using the same lipid compositions.
 280 LUVs mixtures of 3 mM were incubated with DPH and TMA-DPH to achieve a final
 281 probe concentration of 0.33 mol % (probe/lipid ratio, with 9.90 μM). After the addition
 282 of the fluorescence probes, all samples were protected from the light to avoid
 283 photobleaching and maintained at 25 $^{\circ}\text{C}$, for 30 min with gentle agitation. E. coli cells
 284 were labeled after determining the cell concentration and diluting them to 10⁴ CFU.mL⁻¹
 285 ¹ in HEPES buffer, with 10 μM of the dyes. The incubation was also for 30 min at
 286 25 $^{\circ}\text{C}$, with gentle agitation and protection from the light. The different peptide
 287 concentrations were also incubated for 1 h (until 15 μM). Steady-state fluorescence
 288 anisotropy, $\langle r \rangle$, was calculated as demonstrated in the equation 4:

$$289 \quad \langle r \rangle = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} - 2.G.I_{VH}} \quad \text{Equation (4)}$$

290 where I_{VV} and I_{VH} are the parallel and perpendicular polarized fluorescence
 291 intensities measured with the vertically polarized excitation light, and $G = I_{HV}/I_{HH}$ is
 292 a correction factor accounting for the polarization bias of the detection system. For

293 DPH, excitation and emission wavelengths were 350 and 432 nm, respectively, whereas
 294 for TMA-DPH, excitation was at 355 nm and emission was at 430 nm [41]. All the
 295 assays were done in three replicates, and error bars represent standard deviation.

296

297 3.2.15 Circular dichroism

298 CD measurements were carried out in a JASCO J-815 spectropolarimeter
 299 (Tokyo, Japan), using quartz cuvettes of 0.1 and 0.5 path length. Spectra were acquired
 300 between 190/200 and 260 nm, at 25 °C, with data pitch of 0.5 nm, wavelength sampling
 301 velocity of 50 and 200 nm.min⁻¹, and data integration time of 1s with at least 5
 302 accumulations. Measurements to determine the peptide secondary structure in different
 303 media and pH values were performed with a PaDBS1R6 concentration of 50 μM. Media
 304 included 20 mM of dodecylphosphocholine (DPC) micelles and 20 mM of Sodium
 305 Dodecyl Sulfate (SDS), at pH 4.0 (2 mM sodium acetate buffer), pH 7.0 (2 mM Tris-
 306 HCl buffer), and pH 10.0 (2 mM glycine-NaOH buffer). Deionized water was also used
 307 as control medium. Lipid vesicles were titrated in PBS (10 mM sodium phosphate, 150
 308 mM NaCl) pH 7.4, with different lipid concentrations up to 1.5 mM, with and without
 309 16 μM of PaDBS1R6. In addition to blank subtraction, experimental instrument-related
 310 baseline drift was corrected by subtracting from all spectra the average of the signal
 311 between 250 and 260 nm. Spectra were normalized to mean residue molar ellipticity
 312 (□, deg.cm².dmol⁻¹). All conditions were measured independently and in triplicate
 313 [42]. To integrate the structural information, the ellipticity signal at 222 nm was also
 314 plotted as a function of the lipid concentration. The effect of the various lipid
 315 compositions tested was then evaluated through the different parameters obtained,
 316 using the equation 5:

$$317 \quad \Delta\theta_{222 \text{ nm}} = \frac{\Delta\theta_{222 \text{ nm max}} \cdot [\text{Lipid}]}{K_D^{app} + [\text{Lipid}]} \quad \text{Equation (5)}$$

318 where the $\Delta\theta_{222 \text{ nm}}$ is the difference of the PaDBS1R6 signal in the presence
 319 and absence of lipid, $\Delta\theta_{222 \text{ nm max}}$ is the maximum ellipticity value obtained from the
 320 fitting and K_D^{app} is the half-maximal effect that represents the apparent dissociation
 321 constant [43]. The fitting of the experimental data using this equation was done by non-
 322 linear regression with GraphPad Prism 6. Error bars represent standard deviation of the
 323 three replicates.

324

325 **3.2.16 NMR spectroscopy and structure calculations**

326 For NMR experiments, the peptide was prepared by dissolving 2 mM in 0.6 mL
327 of aqueous solution of H₂O/D₂O (9:1) and 200 mM perdeuterated DPC-*d*₃₈, sodium
328 phosphate buffer 1 mM at pH 7.0. Hydrogen chemical shifts were expressed with
329 respect to sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate (DSS, 0.05 mM), as an
330 internal chemical shift standard for ¹H NMR spectroscopy. Two-dimensional NMR
331 homonuclear ¹H-¹H TOCSY and NOESY, Heteronuclear ¹H-¹³C HSQC, and ¹H-¹⁵N
332 HMQC experiments were obtained from natural abundance, on a Bruker Avance 600
333 spectrometer. TOCSY data points were obtained using a mixing time of 80 ms and
334 NOESY with 100, 150, 200 and 250 ms. All contour maps were processed by NMRPipe
335 [44] and analyzed using NMRViewJ [45]. Full sequential assignment was achieved
336 using the general strategy described by Wüthrich [46]. The structure calculations were
337 performed using the simulated annealing protocol in the XPLOR-NIH software [47].
338 NOEs were converted into semi-quantitative distance, derived from the NOE
339 intensities. The dihedral angle restraints (ϕ and ψ) of the protein backbone was
340 predicted by program TALOS+ [44]. Two hundred structures were calculated, and the
341 lowest 20 energy conformers were selected and submitted to a water refinement
342 protocol. The ensemble of the 10 lowest energies represented the solution structural
343 ensemble of PaDBS1R6. This final ensemble of accepted structures were accepted
344 based on the following criteria: no NOE violations greater than 0.3 Å, rmsd for bond
345 deviations from ideality less than 0.05 Å, and rmsd for back dihedral angle violations
346 less than 5°. The coordinates of the PaDBS1R6 have been deposited in Protein Data
347 Bank (PDB ID: 6CFA).

348

349 **3.2.17 Solvation potential energy calculation**

350 The solvation potential energy was measured for the 10 lowest energy NMR
351 structures. Each structure was separated into a single PDB file. The PDB files were
352 converted into “.pqr” files by the utility PDB2PQR using the AMBER force field [48].
353 The grid dimensions for Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) calculation were
354 also determined by PDB2PQR. Solvation potential energy was calculated by APBS
355 [49]. Surface visualization was performed using the APBS plugin for PyMOL.

356 3.3 RESULTS

357 3.3.1 PaDBS1R6 targets Gram-negative bacteria

358 In order to test the antimicrobial activity of PaDBS1R6, minimal inhibition
359 concentration assays (MIC) were performed against Gram-negative and -positive
360 antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant bacterial strains (Figures 1A and 2B,
361 Table S1). The peptide was active against all Gram-negative bacterial strains tested,
362 with MIC values ranging from 8 μM against *E. coli* and *P. aeruginosa* strains (Figures
363 1A and 2A) to 16 μM against carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (Table S1).
364 Moreover, the peptide showed activity (64 μM) against the Gram-positive bacteria
365 tested (susceptible *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* with MIC for the
366 peptide of 64 μM and >64 μM , respectively - Table S1). In an attempt to improve its
367 antibacterial activity, the peptide was combined (see supplementary methods) with the
368 antibiotics tetracycline or cefotaxime and tested against carbapenem-resistant *K.*
369 *pneumoniae*. No synergistic activity was detected against this species (Table S2).

370 We next sought to complement the *in vitro* and *in vivo* activity studies by
371 determining the therapeutic profile of PaDBS1R6. In this work, the selectivity index
372 was calculated for the peptide using equation 1. Hemolytic assays showed that
373 PaDBS1R6 did not compromise red blood cells at the tested concentrations (>87 μM).
374 Thus, considering the MICs against Gram-negative bacteria and the hemolysis
375 assessments, PaDBS1R6 showed a selectivity index of 17.85, demonstrating that for
376 the peptide to be toxic, a 17-fold higher dose of it would have to be present than that
377 required for antimicrobial activity.

378

379 3.3.2 Antimicrobial activity against *P. aeruginosa* planktonic cells and pre- 380 formed biofilms

381 In order to demonstrate the peptide activity toward *Pseudomonas* spp., several
382 assays were performed. Anti-*Pseudomonas* spp. activity was assessed *in vitro* against
383 *P. aeruginosa* PA14 and PAO1 (8 μM), and against *P. aeruginosa* ATCC 27853 (16 μM)
384 (Figure 1A). The antibiofilm activity of the peptide was also tested, showing that
385 PaDBS1R6 treatment reduced biofilm volume (Figure 1B). PaDBS1R6 *in vivo* efficacy
386 was evaluated using a scarification skin infection mouse model. Single dose treatment
387 with PaDBS1R6 (64 μM) decreased the bacterial load by $\sim 10^3$ CFU.mL⁻¹ ($p < 0.001$)
388 two days after treatment (Figure 1C). This promising activity, however, was not

389 observed after 4 days of infection, when untreated and PaDBS1R6-treated animals both
390 presented higher bacterial loads at the site of infection ($\sim 10^8$ CFU.mL⁻¹).

391

392 **3.3.3 Effect of PaDBS1R6 treatment on the viability and morphology of *E. coli*** 393 **cells**

394 *E. coli* planktonic cells viability after exposure was assessed using a live/dead
395 kit that labels viable cells green and membrane compromised bacterial cells red [50].
396 Images of the effects of PaDBS1R6 at concentrations of 7 and 15 μ M (MIC and 1-fold
397 MIC) were acquired after 1 h of incubation (Figure 2B). Microscopy confirmed the
398 results obtained, as peptide at the lower concentration damaged >50% of the *E. coli*
399 cells (Figure 2B). When the peptide concentration was increased, PaDBS1R6 treatment
400 led to nearly 80% compromised cells.

401 To further confirm the antimicrobial activity of PaDBS1R6 against *E. coli*, we
402 used AFM to evaluate possible morphological damage of bacterial membranes caused
403 by PaDBS1R6 (7 μ M). As expected, the untreated controls were viable with no
404 membrane deformity. On the contrary, bacterial samples treated with PaDBS1R6
405 showed increased membrane roughness and cytosol leakage in both apical regions
406 (Figure 2C).

407 Considering the efficiency displayed by PaDBS1R6 against *E. coli*, and to
408 further assess the potential of this agent as a novel drug, we tested its efficacy in an *in*
409 *vivo* intraperitoneal infection model. We defined a pattern of non-lethal infection that
410 has been previously described [30]. Mice were infected with *E. coli* ATCC 8739 via
411 intraperitoneal (i.p.) injection, and 1 h later were treated i.p. with 5 or 10 mg.kg⁻¹ of
412 peptide or 10 mg.kg⁻¹ of gentamicin (Figure 2D). Seventy-two hours post-infection,
413 peritoneal fluid was collected and bacterial CFU were counted. The number of viable
414 bacterial cells in the peptide-treated groups significantly decreased, from 10^{10} to
415 10^4 CFU.mL⁻¹. Although two different doses of the peptide were tested, there was no
416 significant difference between these groups, as they both reduced bacterial counts by 6
417 orders of magnitude, to 10^4 CFU.mL⁻¹. Additionally, no statistical differences were
418 observed between the gentamicin- and peptide-treated groups, which implies that
419 PaDBS1R6 has the same efficiency at eradicating bacteria in this mouse model as the
420 commercially available aminoglycoside antibiotic.

421

422 3.3.4 Evaluation of PaDBS1R6 and lipid membrane electrostatic interactions

423 Previous results (Figure 2C) indicated that PaDBS1R6 could induce membrane
424 damage. We used lipid vesicles to characterize the nature of peptide-membrane
425 interactions and confirm these results. Initially, CD spectra of PaDBS1R6 were
426 monitored at room temperature in the absence (Figures S2 and S3A) and presence of
427 four different lipid vesicle compositions (Figures S3B, S3C, S3D and S3E) [42].
428 Peptide was evaluated in three other media: water, SDS (20 mM, pH 4.0, 7.0, and 10.0)
429 (Figure S2), and PBS (pH 7.4) (Figure S3A). Vesicles were composed of POPC (Figure
430 S3B), POPC:POPG (70:30) (Figure S3C), POPC:Chol (70:30) (Figure S3D), and
431 POPE:POPG:CL (65:30:05) (Figure S3E). The different Large unilamellar vesicles
432 (LUVs) compositions used in this study were chosen considering the lipid composition
433 of different cell types that could interact with the peptide, including mammalian and
434 bacterial cells (Table 1). Considering the spectra obtained in the absence of lipid
435 vesicles, we observed the tendency of PaDBS1R6 to adopt a coiled conformation in
436 water (Figure S2) and PBS (Figure S3A). Equivalent results were obtained in the
437 presence of zwitterionic lipid vesicles (Figures S3B and S3C), implying that peptide-
438 membrane interactions did not promote any structural changes under these conditions.
439 As the lipid vesicle concentration increased, structural definition also increased in the
440 helical minima region. In the presence of negatively charged lipid vesicles (Figures
441 S3D and S3E), which also implies an increase in hydrophobicity, PaDBS1R6 tended to
442 adopt an α -helix structure, without full structuration.

443 In order to assess α -helical tendency, the ellipticity at 222 nm, a local minimum
444 for α -helices that excludes sample polydispersity, was followed for each lipid
445 concentration (Figure 3A). From these data, we calculated the dissociation constants
446 (see Materials and Methods), which provide information on peptide-membrane
447 interaction (Table 1). For PaDBS1R6 in solution, there was no structural transition,
448 indicated by the results obtained in the zwitterionic lipid vesicle experiments using
449 POPC and POPC:Chol (70:30). Considering the negatively charged membranes, with
450 the increase in lipid concentration, an increase in helix-coil transition was observed,
451 stabilizing near 0.3 mM, implying that an electrostatic attraction is responsible for
452 peptide-membrane interactions. These data also allowed the half maximum effects for
453 PaDBS1R6 structural change to be determined; these effects were 61.3 ± 6.0 and 48.3
454 ± 7.3 μM for POPC:POPG (70:30) and inner bacterial membrane-like vesicles
455 [POPE:POPG:CL (65:30:05)], respectively (Table 1).

456 Next, we used DLS in order to explore whether PaDBS1R6 promotes lipid
457 vesicle aggregation. During these experiments, the lipid concentration was kept
458 constant. Regarding the DLS data (Figure 3B), increasing PaDBS1R6 concentration
459 did not lead to the vesicles aggregates of POPC or POPC:Chol (70:30). These results
460 are in agreement with the CD data (Figure S3). For POPC:POPG (70:30), there was a
461 small increase in the hydrodynamic diameter (DH) at higher concentrations of
462 PaDBS1R6, but the highest aggregation profile was observed with POPE:POPG:CL
463 (65:30:05) vesicles. These results indicate that the peptide interacts preferably with
464 membranes that mimic the inner membrane of Gram-negative bacteria [20].

465 Zeta-potential studies were also performed to confirm the electrostatic
466 destabilization that occurs for the preferably targeted membranes. The data obtained by
467 calculating the partition coefficients (K_p) (Table 1) showed that increasing peptide
468 concentration resulted in membrane charge destabilization only in anionic lipid
469 vesicles, with the effect being more pronounced for inner membrane-like vesicles,
470 corroborating the results obtained in the DLS assays (Figure 3C). Partition coefficients
471 obtained for POPC:POPG (70:30) and POPC:POPG:CL (65:30:05) vesicles were $2.4 \times$
472 10^3 and 4.8×10^3 , respectively (Table 1).

473

474 **3.3.5 Evaluation of the mechanisms of PaDBS1R6 interaction with targeted** 475 **biomembranes**

476 Experiments aimed at studying the interactions between the peptide and targeted
477 membranes confirmed the contribution of electrostatic interactions, suggesting that
478 PaDBS1R6 preferably interacts with anionic lipid membranes. To identify the degree
479 of interaction, we used several membrane probes, each of which report changes in
480 different membrane properties following peptide interactions [51,52]. For these studies,
481 we also used zwitterionic lipid vesicles as comparative models. Studies using
482 planktonic *E. coli* (ATCC 25922) cells were performed to gain insights into the
483 potential *in vitro* target of PaDBS1R6. The first probe used, di-8-ANEPPS, which
484 assesses differences in the membrane dipolar potential [52]. Based on the results
485 obtained (Figure 4A), no interaction occurred with neutral lipid vesicles, confirming
486 once more the findings described above (Figure 3). The dipolar potential of anionic
487 liposomes changed to a similar degree in the presence of peptide (Figure 4A). From
488 these results, it was possible to use equation 2 to calculate the K_D for the peptide-
489 membrane interaction. For POPC:POPG (70:30) and POPE:POPG:CL (65:30:05), the

490 KD obtained was 9.89 ± 1.9 and 12.4 ± 2.4 μM , respectively, confirming that they have
491 similar degrees of peptide-membrane interaction. The most extensive modification
492 occurred in *E. coli* cells, with the first peptide concentration promoting a quick response
493 that stagnated afterwards. This fast membrane modification may imply that PaDBS1R6
494 has a high affinity for the outer membrane of *E. coli* cells because of the presence of
495 highly anionic components (e.g., lipopolysaccharides, LPS) [53,54].

496 Next, Laurdan was used to label lipid vesicles and *E. coli* cells in order to study
497 the differences in lipid packing and to better understand whether the peptide interacts
498 with membranes only by electrostatic means or whether it is internalized into the
499 membrane, where it promotes a spatial reorganization of the membrane's lipid content
500 [55]. This information was extrapolated from the emission spectra of the dye, by
501 calculating the generalized polarization parameter (Gp), which considers two
502 wavelengths corresponding to the different lipid membrane phases [40]. For
503 PaDBS1R6, either in vesicles or in *E. coli* cells, there was no significant effect, strongly
504 indicating that no lipid reorganization occurred during peptide treatment (Figure 4B).

505 To assess membrane fluidity, another important property that can be studied
506 after peptide interaction, the probes DPH and TMA-DPH were used, which report on
507 membrane fluidity changes on an inner part of the membrane or closer to the lipid-water
508 interface, respectively [41,56]. DPH inserts into the hydrophobic regions of the
509 membrane, whereas TMA-DPH inserts close to the transition region between
510 hydrophilic and hydrophobic media. For all lipid vesicles tested, there was no
511 observable effect for either probe, indicating that there was no obvious membrane
512 fluidity change (Figure 4C and 4D). In *E. coli* cells, no effect was observed for TMA-
513 DPH, but changes in fluidity were observed for DPH (a decrease of anisotropy values;
514 Figure 4C and 4D). These results indicate some loss of membrane rigidity after
515 PaDBS1R6 treatment, being consistent with the results obtained with lipid vesicles
516 (Figure 3), where it was observed an increased aggregation/higher partition of the
517 peptide for Gram-negative bacteria like vesicles (Figure 4A and 4C).

518

519 **3.3.6 PaDBS1R6 undergoes a coil-to-helix transition in the presence of** 520 **hydrophobic media**

521 The stability of the secondary structure of PaDBS1R6 was evaluated by CD,
522 under several conditions: water, buffer (Figure S3A), SDS micelles (Figure S2), and
523 DPC micelles (Figure 5A). Water and buffer were used to determine the native structure

524 that the peptide adopts in the absence of a target membrane. The CD spectrum of
525 PaDBS1R6 dissolved in water or in buffer is characteristic of a random coil structure,
526 as evidenced by a characteristic minimum at 195 nm. Literature describes this class of
527 peptides as membrane-dependent in terms of activity, implying that in a polar protic
528 medium environment, they tend to adopt random coil, having little defined secondary
529 structure [32,43].

530 SDS micelles, an anionic detergent, were used to mimic the environment of
531 bacterial membranes, and DPC micelles were used to mimic eukaryotic cell membranes
532 [57]. CD analysis of PaDBS1R6 at different pH showed negative bands at 222 and 208
533 nm and a positive band at 193 nm, results that are consistent with well-defined helical
534 segments. In the presence of SDS, the peptide maintained its structure (θ value at
535 208/222 nm is similar) in neutral and basic environments (pH 7.0 and 10.0; Figure S2).
536 At pH 4.0, the peptide was in its most highly structured state, as indicated by an absolute
537 increase in signal intensity at 208 and 222 nm. In the presence of DPC micelles (Figure
538 5A), the secondary structure of PaDBS1R6 was affected by the different pH levels
539 tested. Even so, at pH 10.0, it presents higher helical content. PaDBS1R6 exhibited
540 higher structuring at pH 10.0 and lower at pH 7.0. It is also important to mention that
541 negatively charged lipid vesicles, as natural electrostatic targets of PaDBS1R6, also
542 promote stabilization of the secondary structure of the peptide without being well-
543 defined (Figures S3B – E).

544 Results obtained in water and buffer were consistent with random coil
545 conformations, contrary to the α -helical structure observed in SDS or DPC micelle
546 environments (Figures S2, S3A and S5A). The helix content of the PaAMP1R6 peptide
547 was determined from the mean residue CD at $[\theta]_{222}$ ($\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). The helix
548 content for peptide in SDS and DPC are 31% and 28%, respectively, due the rapid inter
549 conversion of helical and random coil segments for same peptide chain, leading to a
550 single time-averaged resonance. Interestingly, in SDS micelles, PaDBS1R6 profile
551 exhibited a small difference helical pattern compared to DPC micelles. This highlights
552 the fact that the peptide conformation is more stable in the presence of anionic micelles
553 and shows the role of charge in inducing peptide folding.

554

555 3.3.7 NMR structure of PaDBS1R6 in DPC micelles

556 In NMR studies, both SDS and DPC micelles are suitable membrane models
557 because the micelles are small and have high dynamic behavior [58]. DPC micelles

558 have the advantage of a rapid reorientation in aqueous solution compared to the vesicle
559 system, so they are suitable for standard high-resolution NMR studies [46]. NMR
560 studies of the peptide in DPC-d₃₈ micelles were performed using standard sequential
561 assignment methods in combination with NOESY, TOCSY, HSQC and sf-HMQC
562 experiments [59]. Two-dimensional (2D) NOESY experiments, acquired with 250 ms
563 mixing time, were used to assign the backbone and side chain resonances of the peptide,
564 by identifying the fingerprint region with assignment of peaks (Figure S5). The
565 chemical shifts obtained from spectra were used as an indicator of the secondary
566 structure [60,61]. The chemical shift index plot (Figure S5A), calculated by
567 NMRViewJ, showed a propensity for an α -helix formation in the region Met2-Ala17.
568 An NOE connectivity pattern was also used to describe the secondary structure. The
569 presence of $d_{NN}(i, i+1)$, $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$ and $d_{\alpha N}(i, i+4)$ NOE connectivities
570 (Figure S5B) indicated an α -helix in the region of the amino acid residues between
571 Asn5 and Phe18. For structural calculation, 378 NOE correlations were used, as well
572 as 34 dihedral angle constraints derived from the TALOS analysis. The 10 lowest-
573 energy structures, refined in water, were used for the analysis. The final 3D structure
574 of the PaDBS1R6 peptide is presented in Figure 5B and C. The superposition of
575 backbone atoms from residues 2 to 17 gave a root mean square deviation (RMSD) of
576 0.82 ± 0.23 Å, while the superposition of all heavy atoms gave an RMSD of 1.52 ± 0.21
577 Å. The overall high quality of the structures was corroborated by a Ramachandran plot
578 regarding ϕ and ψ angles [62], with 98.8% of the residues being present in the most
579 favored region for α -helical structure (see Table 2 for more NMR structural statistics).
580 Hydrophobic residues, highlighted in blue, were also identified using the lowest energy
581 structure calculated, and include Pro1, Met2, Ala3, Leu8, Leu9, Leu12, Leu14, Ile16,
582 Ala17, and Phe18 (Figure 5C). The majority of hydrophobic residues were clustered on
583 one side of the peptide structure, which indicates that PaDBS1R6 has an amphipathic
584 character. TALOS+ predicted a helical structure between residues Ala3 and Ile16, but
585 visual analysis of the PyMOL data indicates that an α -helix is present from residues
586 Met2 to Ala17. The electrostatic potential on the surface of the peptide structure
587 revealed that PaDBS1R6 is highly cationic, due to its eight positively charged amino
588 acid residues (Figure 5D). These residues are distributed along the structure and
589 generated a solvation potential energy of 17.33 ± 1.47 mJ.mol⁻¹.
590

591 3.4 DISCUSSION

592 The World Health Organization's list of multidrug-resistant bacteria for which
593 novel antimicrobials are urgently needed [63] names the family of carbapenem-
594 resistant and ESBL-producing Enterobacteriaceae (e.g., *E. coli*) as high-priority targets.
595 An alternative to conventional therapies to treat drug-resistant infections is the use of
596 AMPs. These peptides present broad-spectrum activity [64–66], and their main target
597 has been identified as the bacterial membrane. The physicochemical properties of
598 AMPs contribute to their ability to target bacteria and provide insight into why these
599 agents can target not only bacteria but also fungi and cancer cells [3,11,13,15].

600 AMPs were originally isolated from natural sources. More recently, rational
601 design strategies supported by advances in artificial intelligence and bioinformatics
602 have generated AMPs with unprecedented sequences, exploring the sequence
603 combinatorial space [17,26]. These computational methods reduce the time and cost of
604 design and synthesis compared to the conventional methods of isolation and
605 characterization of natural AMPs. In addition, rationally designed peptides may exhibit
606 reduced cytotoxic activity, decreased size (which facilitates chemical synthesis), and
607 increased antimicrobial activity [9,26].

608 In the last years, several methods of predicting AMP have been proposed [67].
609 The ADAM [68] and CAMPR3 [69] methods are designed to identify any variety of
610 AMP. The methods of AntiBP [70] and AntiBP2 [71] concentrate on the prediction of
611 peptides with specific activity against bacteria. Differently from these methods of
612 prediction, the Joker algorithm is not intended to predict the antimicrobial activity of
613 peptide, but to develop new molecules. The Joker algorithm consists of a rational design
614 method that is based on the insertion of rigid patterns into a precursor sequence of a
615 peptide. Prior to the use of the Joker, some sequences were selected in the NCBI Protein
616 database according to some characteristics (presence of pattern or motif A
617 (KK [ILV] xxx [ILVA]) and 18 amino acid residues). This search in the peptide
618 database resulted in six sequences (EcDBS1, MmDBS1, PaDBS1, PcDBS1, PyDBS1
619 and TcDBS1), which were submitted to rational design using the Joker algorithm and
620 each generated nine variants. The peptide PaDBS1R6 was one of the peptides
621 developed by this method [17]. These peptides were first tested against bioluminescent
622 *P. aeruginosa*, PaDBS1R6 was the peptide selected for this work because it had a
623 promising activity against this bacterium, presenting one of the best MICs among the
624 molecules designed [17].

625 PaDBS1R6 presented a promising activity profile specifically against Gram-
626 negative bacteria, inhibiting their growth by at least 4-fold compared to the Gram-
627 positive strains tested. Other synthetically designed peptides have also shown activity
628 against Gram-negative bacteria, including the DP 2 – 11 peptides, which were tested
629 against *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* PAO1. Peptide DP 3 presented the best
630 MIC value against *E. coli* ATCC 25922 (8 mg.L⁻¹), with DP 5, DP 7, DP 8 and DP 11
631 presenting the best MICs against *P. aeruginosa* (16 mg.L⁻¹) [72]. In another study, the
632 peptide 35409 exhibited MIC values against *E. coli* ML35 and *P. aeruginosa*
633 ATCC 15442 of 22 µM and 44 µM, respectively [26,73]. These basic activity screening
634 tests are considered essential to initially assess AMP efficiency [28,29,74].

635 According to the FDA, the selectivity index indicates whether a molecule is
636 sufficiently safe to be commercialized. The selectivity index of PaDBS1R6 was 17.85,
637 a high value indicative of a good drug candidate [26,75]. As the peptide did not show
638 hemolytic activity and had a selectivity index that demonstrates its safety, we used two
639 animal models to evaluate its biological activity. A skin infection model showed that
640 the peptide at 64 µM reduced the number of viable *P. aeruginosa* PA14 bacteria in the
641 treated animals after two days of infection (Figure 1C). Previously, the same model was
642 used to demonstrate the efficiency *in vivo* of the AMP guavanin 2 [26]. However, the
643 peptide concentration was not sufficient to eliminate the bacterial load and not able to
644 prevent the development of the disease later, since after 4 days of treatment the infection
645 is again developing (Figure 1C).

646 Considering that AMPs can be used for topical treatment of bacterial infections,
647 but also in systemic infections (i.e., sepsis), another *in vivo* model was tested using
648 *E. coli* ATCC 8739 [30]. The results indicated that PaDBS1R6 was equally efficient at
649 reducing bacterial loads in the site of infection as gentamicin, which was used as
650 positive control. Our previous studies have also evaluated the activity of other peptides
651 against *E. coli* using the same animal model [30,76]. Clavanin MO, a peptide modified
652 from clavanin A, showed a reduction of bacterial load to less than 10 CFU.mL⁻¹ [76].

653 As PaDBS1R6 was effective in reducing bacterial viability both *in vitro* and *in*
654 *vivo*, peptide-membrane interactions and peptide structure were investigated in order to
655 determine the structure/function relationship in PaDBS1R6. Although AMPs interact
656 first with their targets through electrostatic interactions, their actual antibacterial
657 mechanisms are not understood in full detail [77,78]. Biophysical techniques are useful
658 tools to track physicochemical properties that are essential for AMP mechanism of

659 action [51]. Initially, using lipid vesicles, we established the preference of PaDBS1R6
660 for bacterial-like membranes constituted of POPE:POPG:CL (65:30:05), which mimic
661 the inner membrane of Gram-negative bacteria [20,79] (Figure 3 and Table 1). By CD
662 and zeta-potential studies (Figure 3A and 3C, respectively), we calculated the affinity
663 and partition constants, and confirmed the preference of the peptide for negatively
664 charged lipid vesicles that contain CL. CL, a lipid that is present in the apical and septal
665 regions of bacteria, is essential for various cellular processes [79,80]. The relevance of
666 this membrane lipid for activity has been previously suggested for some AMP: BP100,
667 cecropin A, and pepR [21,81]. In fact, the authors of these previous works observed
668 that these peptides interact with CL, promoting the disruption of the bacterial
669 membrane, the subsequent release of the cytosolic content, and finally cell death
670 [21,81]. Our AFM data of *E. coli* treated with PaDBS1R6 (Figure 2C) showed that
671 cytosolic content was released near both apical regions. Moreover, studying the
672 hydrodynamic diameter of lipid vesicles using DLS, we observed an aggregation profile
673 in vesicles containing CL (Figure 3B). In conclusion, in addition to the electrostatic
674 interactions between PaDBS1R6 and negatively charged phospholipids, the presence
675 of CL appears to also be a determinant for AMP antibacterial activity [82,83].

676 Next, we contribute in the understanding of mechanisms by which PaDBS1R6
677 acts at the membrane level by studying peptide-membrane interaction properties in lipid
678 vesicles and *E. coli* living cells [38,51]. These studies revealed that this AMP modifies
679 membrane dipolar potential and membrane fluidity in *E. coli* living cells, specifically
680 within their inner membrane (Figure 4A and 4C). Once more, these results highlight
681 the dependence of PaDBS1R6 activity on a certain proportion of CL in the membrane.
682 In fact, this activity is observed only when there is 5% CL in the vesicles, and
683 presumably in the bacterial cell membranes as well. Gram-negative bacteria have other
684 components in their membranes, though, that could participate in peptide activity (for
685 the initial interactions and/or for membrane permeabilization), such as porins,
686 lipoproteins, or teichoic acids [54,84,85]. Moreover, even when CL is present within
687 lipid vesicles, it is not concentrated in any specific region of the liposome, contrary to
688 what it is found in bacterial cells [56,79,80].

689 Based on our results, PaDBS1R6 may cross the outer membrane of bacterial
690 cells and promote inner membrane destabilization, which ultimately leads to membrane
691 disruption and cell death. Therefore, while CL (or other membrane components) may
692 be contributing to PaDBS1R6 action, nevertheless, it is important to also consider the

693 properties of the peptide itself that may be essential for its antimicrobial activity.
694 Positive global charge and high hydrophobic content are prototypical characteristics of
695 this class of peptides, but their structure before and after interaction with membranes
696 or bacterial cells can determine their affinity for membranes [3,42,86]. Initial screening
697 of PaDBS1R6 structure stability confirmed the tendency of the peptide to adopt an
698 α -helical conformation in highly hydrophobic media (Figure S2 and Figure 5A) but a
699 random coil structure in aqueous media (Figures S2 and S3A). In fact, as discussed
700 above, lipid vesicles promote peptide arrangement into helical structures, with the
701 degree of helicity correlated to the affinity of the peptide for the membranes (i.e., more
702 helical structure was observed for lipid vesicles more closely mimicking bacterial
703 membranes, Figures 3A and 5A). Such interactions and behaviors have been previously
704 described for highly amphipathic AMPs, which typically have a well-defined structure
705 after interactions with membranes, with other physicochemical properties also playing
706 a key role in conformation flexibility and, therefore, peptide activity [87–89]. For
707 instance, BP100 and its analogues gain structure after interacting with liposomes,
708 specifically negatively charged ones [90]. The guavanin 2 structure, another synthetic
709 AMP, is also stabilized after interaction with membranes, and this stability is likely to
710 contribute to its biological function [26].

711 There are also examples of AMPs that lose their secondary structure upon
712 interactions with membranes without necessarily losing their biological activity.
713 Peptide rBPI21 exhibited a well-defined-structure in buffer, losing it after interaction
714 with membranes; however, in this case, structure destabilization allowed the insertion
715 of the peptide within targeted membranes, thus contributing to its function [91]. The
716 difference between PaDBS1R6 and rBPI21 can be explained by the particular amino
717 acid sequence: the insertion of the hydrophobic amino acids of PaDBS1R6 into the
718 bacterial membrane depends on a rearrangement of its conformation (Figure 5B - D).
719 In order to understand what happens to the structure of PaDBS1R6 when the peptide
720 interacts with membranes, NMR structural studies were performed in the presence of
721 DPC micelles (Figure 5B – D). PaDBS1R6 has an amphipathic structure and highly
722 cationic net charge, with the hydrophobic amino acid residues disposed on one side of
723 the α -helical structure. These results indicate that, once electrostatic interactions have
724 occurred, the careful rearrangement of the residues is what allows the peptide to insert
725 into the membrane.

726 3.5 CONCLUSIONS

727 In summary, our study indicates that in the presence of vesicles composed of
728 bacterial-like membranes, the conformation of PaDBS1R6 turns from random coil to
729 α -helix. Our investigations show that during the peptide-membrane interaction,
730 PaDBS1R6 is structured in an amphipathic α -helix, which binds at membrane interfaces
731 first by electrostatic interactions between the cationic peptide and the anionic head-
732 groups of lipids in the membrane and second by hydrophobic interactions between the
733 hydrophobic face of the peptide and membrane [92]. This folding from random coil in
734 solution to an ordered conformation proved to be strongly dependent on the nature of
735 the lipid bilayer. We have demonstrated the antibacterial selectivity of PaDBS1R6
736 against Gram-negative bacteria *in vitro* and *in vivo* in two different infection models
737 and we demonstrate the safety of this peptide for use in animals by calculating their
738 selectivity index. The findings of the present study suggest that PaDBS1R6 is a
739 selective antimicrobial peptide for Gram-negative bacteria, and as such, a candidate
740 template for the development of new antimicrobial agents.

741

742 ACKNOWLEDGEMENTS

743 This work was supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia –
744 Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (FCT-MCTES, Portugal) project
745 PTDC/BBB-BQB/3494/2014, Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff
746 Exchange (MSCA-RISE, European Union) project INPACT (call H2020-MSCA-
747 RISE-2014, grant agreement 644167), Ramon Areces Foundation (to CFN), DTRA
748 (HDTRA1-15-1-0050 to TKL), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
749 Paulo (FAPESP #2016/24413-0 to MDTT) and Fundação de Amparo à Pesquisa do
750 Distrito Federal (FAPDF). MRF acknowledges FCT-MCTES fellowship
751 SFRH/BD/100517/2014. ONS holds a postdoctoral scholarship from National Council
752 of Technological and Scientific Development (CNPq) and Fundação de Apoio ao
753 Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul
754 (FUNDECT) – Brazil [300583/2016-8]. Marlon Henrique Cardoso acknowledges
755 fellowship 141518/2015-4 (CNPq) and 88881.134423/2016-01 (CAPES).

756

757 Conflict of Interests Statement

758 TKL is a co-founder of Senti Biosciences, Synlogic, Engine Biosciences, Tango
759 Therapeutics, Corvium, BiomX, and Eligo Biosciences. TKL also holds financial
760 interests in nest.bio, AmpliPhi, and IndieBio.

761

762

References

- 763 [1] O.N. Silva, K.C.L. Mulder, A.E.A.D. Barbosa, A.J. Otero-Gonzalez, C.
764 Lopez-Abarrategui, T.M.B. Rezende, S.C. Dias, O.L. Franco, Exploring the
765 pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural
766 screenings to biotechnological applications., *Front. Microbiol.* 2 (2011) 232.
767 doi:10.3389/fmicb.2011.00232.
- 768 [2] J. Lueangsakulthai, N. Jangpromma, T. Temsiripong, J.E. McKendrick,
769 W. Khunkitti, S.E. Maddocks, S. Klaynongsruang, A novel antibacterial peptide
770 derived from *Crocodylus siamensis* haemoglobin hydrolysate induces membrane
771 permeabilization causing iron dysregulation, oxidative stress and bacterial death, *J.*
772 *Appl. Microbiol.* 123 (2017) 819–831. doi:10.1111/jam.13539.
- 773 [3] B. Gomes, M.T. Augusto, M.R. Felício, A. Hollmann, O.L. Franco, S.
774 Gonçalves, N.C. Santos, Designing improved active peptides for therapeutic
775 approaches against infectious diseases, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 415–429.
776 doi:10.1016/j.biotechadv.2018.01.004.
- 777 [4] M.J. Llewelyn, J.M. Fitzpatrick, E. Darwin, Sarahonkin-Crine, C.
778 Gorton, J. Paul, T.E.A. Peto, L. Yardley, S. Hopkins, A.S. Walker, The antibiotic
779 course has had its day, *BMJ.* 358 (2017). doi:10.1136/bmj.j3418.
- 780 [5] S. Vasoo, J.N. Barreto, P.K. Tosh, Emerging Issues in Gram-Negative
781 Bacterial Resistance: An Update for the Practicing Clinician, *Mayo Clin. Proc.* 90
782 (2015) 395–403. doi:10.1016/j.mayocp.2014.12.002.
- 783 [6] M. May, Drug development: Time for teamwork, *Nature.* 509 (2014)
784 S4–S5. doi:10.1038/509S4a.
- 785 [7] R. Tommasi, D.G. Brown, G.K. Walkup, J.I. Manchester, A.A. Miller,
786 ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015)
787 529–542. doi:10.1038/nrd4572.
- 788 [8] J. Rello, E. Bunsow, A. Perez, What if there were no new antibiotics? A
789 look at alternatives, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 9 (2016) 1547–1555.
790 doi:10.1080/17512433.2016.1241141.
- 791 [9] W.F. Porto, Á.S. Pires, O.L. Franco, Antimicrobial activity predictors
792 benchmarking analysis using shuffled and designed synthetic peptides, *J. Theor. Biol.*
793 426 (2017) 96–103. doi:10.1016/J.JTBI.2017.05.011.
- 794 [10] O.N. Silva, W.F. Porto, S.M. Ribeiro, I. Batista, O.L. Franco, Host-
795 defense peptides and their potential use as biomarkers in human diseases, *Drug Discov.*
796 *Today.* (2018). doi:10.1016/J.DRUDIS.2018.05.024.
- 797 [11] M.R. Felício, O.N. Silva, S. Gonçalves, N.C. Santos, O.L. Franco,
798 Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities, *Front. Chem.* 5 (2017) 5.
799 doi:10.3389/fchem.2017.00005.
- 800 [12] C. de la Fuente-Núñez, O.N. Silva, T.K. Lu, O.L. Franco, Antimicrobial
801 peptides: Role in human disease and potential as immunotherapies, *Pharmacol. Ther.*
802 178 (2017) 132–140. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2017.04.002.
- 803 [13] S. Gonçalves, P.M. Silva, M.R. Felício, L.N. de Medeiros, E.
804 Kurtenbach, N.C. Santos, Psd1 Effects on *Candida albicans* Planktonic Cells and
805 Biofilms, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7 (2017) 249. doi:10.3389/fcimb.2017.00249.
- 806 [14] M.E. Pachón-Ibáñez, Y. Smani, J. Pachón, J. Sánchez-Céspedes,
807 Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides,
808 *FEMS Microbiol. Rev.* 41 (2017) 323–342. doi:10.1093/femsre/fux012.
- 809 [15] A. De Brij, M. Riool, R.A. Cordfunke, N. Malanovic, L. De Boer, R.I.
810 Koning, E. Ravensbergen, M. Franken, T. Van Der Heijde, B.K. Boekema, P.H.S.
811 Kwakman, N. Kamp, A. El Ghalbzouri, K. Lohner, S.A.J. Zaat, J.W. Drijfhout, P.H.

- 812 Nibbering, The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and
813 biofilms, *Sci. Transl. Med.* 10 (2018). doi:10.1126/scitranslmed.aan4044.
- 814 [16] M. Soethoudt, M.W.H. Hoorens, W. Doelman, A. Martella, M. van der
815 Stelt, L.H. Heitman, Structure-kinetic relationship studies of cannabinoid CB2 receptor
816 agonists reveal substituent-specific lipophilic effects on residence time, *Biochem.*
817 *Pharmacol.* (2018). doi:10.1016/j.bcp.2018.03.018.
- 818 [17] W.F.W.F. Porto, I.C.M. Fensterseifer, S.M. Ribeiro, O.L. Franco, Joker:
819 An algorithm to insert patterns into sequences for designing antimicrobial peptides,
820 *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862 (2018).
821 doi:10.1016/J.BBAGEN.2018.06.011.
- 822 [18] I.Y. Hirata, M.H. Sedenho Cezari, C.R. Nakaie, P. Boschcov, A.S. Ito,
823 M.A. Juliano, L. Juliano, Internally quenched fluorogenic protease substrates: Solid-
824 phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-
825 aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs, *Lett. Pept. Sci.* 1 (1995)
826 299–308. doi:10.1007/BF00119771.
- 827 [19] L.D. Mayer, M.J. Hope, P.R. Cullis, Vesicles of variable sizes produced
828 by a rapid extrusion procedure, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 858 (1986) 161–
829 168. doi:10.1016/0005-2736(86)90302-0.
- 830 [20] D.E. Warschawski, A.A. Arnold, M. Beaugrand, A. Gravel, É.
831 Chartrand, I. Marcotte, Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of
832 transmembrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1808 (2011) 1957–
833 1974. doi:10.1016/J.BBAMEM.2011.03.016.
- 834 [21] C.S. Alves, M.N. Melo, H.G. Franquelim, R. Ferre, M. Planas, L. Feliu,
835 E. Bardají, W. Kowalczyk, D. Andreu, N.C. Santos, M.X. Fernandes, M.A.R.B.
836 Castanho, E. Bardaji, W. Kowalczyk, D. Andreu, N.C. Santos, M.X. Fernandes,
837 M.A.R.B. Castanho, Escherichia coli cell surface perturbation and disruption induced
838 by antimicrobial peptides BP100 and pepR., *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 27536–44.
839 doi:10.1074/jbc.M110.130955.
- 840 [22] O.N. Silva, I.C.M. Fensterseifer, E.A. Rodrigues, H.H.S. Holanda,
841 N.R.F. Novaes, J.P.A. Cunha, T.M.B. Rezende, K.G. Magalhães, S.E. Moreno, M.S.
842 Jerônimo, A.L. Bocca, O.L. Franco, Clavanin A improves outcome of complications
843 from different bacterial infections., *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (2015) 1620–6.
844 doi:10.1128/AAC.03732-14.
- 845 [23] G.S. Bignami, A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for
846 palytoxin, *Toxicon.* 31 (1993) 817–820.
847 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004101019390389Z>.
- 848 [24] I. Wiegand, K. Hilpert, R.E.W. Hancock, Agar and broth dilution
849 methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial
850 substances, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 163–175. doi:10.1038/nprot.2007.521.
- 851 [25] L. Steinstraesser, T. Hirsch, M. Schulte, M. Kueckelhaus, F. Jacobsen,
852 E.A. Mersch, I. Stricker, N. Afacan, H. Jenssen, R.E.W. Hancock, J. Kindrachuk,
853 Innate Defense Regulator Peptide 1018 in Wound Healing and Wound Infection, *PLoS*
854 *One.* 7 (2012) e39373. doi:10.1371/journal.pone.0039373.
- 855 [26] W.F. Porto, L. Irazazabal, E.S.F. Alves, S.M. Ribeiro, C.O. Matos, Á.S.
856 Pires, I.C.M. Fensterseifer, V.J. Miranda, E.F. Haney, V. Humblot, M.D.T. Torres,
857 R.E.W. Hancock, L.M. Liao, A. Ladram, T.K. Lu, C. de la Fuente-Nunez, O.L. Franco,
858 In silico optimization of a guava antimicrobial peptide enables combinatorial
859 exploration for peptide design, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1490. doi:10.1038/s41467-018-
860 03746-3.

- 861 [27] F. Reffuveille, C. de la Fuente-Núñez, S. Mansour, R.E.W. Hancock, A
862 broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial
863 biofilms., *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 5363–71.
864 doi:10.1128/AAC.03163-14.
- 865 [28] L. Migliolo, M.R. Felício, M.H. Cardoso, O.N. Silva, M.-A.E. Xavier,
866 D.O. Nolasco, A.S. de Oliveira, I. Roca-Subira, J. Vila Estape, L.D. Teixeira, S.M.
867 Freitas, A.J. Otero-Gonzalez, S. Gonçalves, N.C. Santos, O.L. Franco, Structural and
868 functional evaluation of the palindromic alanine-rich antimicrobial peptide Pa-MAP2,
869 *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858 (2016) 1488–1498.
870 doi:10.1016/j.bbamem.2016.04.003.
- 871 [29] M.H. Cardoso, S.M. Ribeiro, D.O. Nolasco, C. de la Fuente-Núñez,
872 M.R. Felício, S. Gonçalves, C.O. Matos, L.M. Liao, N.C. Santos, R.E.W. Hancock,
873 O.L. Franco, L. Migliolo, A polyalanine peptide derived from polar fish with anti-
874 infectious activities, *Sci. Rep.* 6 (2016) 21385. doi:10.1038/srep21385.
- 875 [30] L.D. Teixeira, O.N. Silva, L. Migliolo, I.C.M. Fensterseifer, O.L.
876 Franco, In vivo antimicrobial evaluation of an alanine-rich peptide derived from
877 *Pleuronectes americanus*, *Peptides.* 42 (2013). doi:10.1016/j.peptides.2013.02.001.
- 878 [31] K. Pane, V. Cafaro, A. Avitabile, M.D.T. Torres, A. Vollaro, E. De
879 Gregorio, M.R. Catania, A. Di Maro, A. Bosso, G. Gallo, A. Zanfardino, M.
880 Varcamonti, E. Pizzo, A. Di Donato, T.K. Lu, C. de la Fuente-Nunez, E. Notomista,
881 Identification of Novel Cryptic Multifunctional Antimicrobial Peptides from the
882 Human Stomach Enabled by a Computational–Experimental Platform, *ACS Synth.*
883 *Biol.* 7 (2018) 2105–2115. doi:10.1021/acssynbio.8b00084.
- 884 [32] M.M. Domingues, M.A.R.B. Castanho, N.C. Santos, rBPI21 Promotes
885 Lipopolysaccharide Aggregation and Exerts Its Antimicrobial Effects by (Hemi)fusion
886 of PG-Containing Membranes, *PLoS One.* 4 (2009) e8385.
887 doi:10.1371/journal.pone.0008385.
- 888 [33] S.W. Provencher, CONTIN: A general purpose constrained
889 regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations,
890 *Comput. Phys. Commun.* 27 (1982) 229–242. doi:10.1016/0010-4655(82)90174-6.
- 891 [34] J.M. Freire, M.M. Domingues, J. Matos, M.N. Melo, A.S. Veiga, N.C.
892 Santos, M.A.R.B. Castanho, Using zeta-potential measurements to quantify peptide
893 partition to lipid membranes., *Eur. Biophys. J.* 40 (2011) 481–7. doi:10.1007/s00249-
894 010-0661-4.
- 895 [35] P.M. Carvalho, M.R. Felício, N.C. Santos, S. Gonçalves, M.M.
896 Domingues, Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle
897 Characterization and Development, *Front. Chem.* 6 (2018) 237.
898 doi:10.3389/fchem.2018.00237.
- 899 [36] E. Gross, R.S. Bedlack, L.M. Loew, Dual-wavelength ratiometric
900 fluorescence measurement of the membrane dipole potential, *Biophys. J.* 67 (1994)
901 208–216. doi:10.1016/S0006-3495(94)80471-0.
- 902 [37] A. Hollmann, P.M. Matos, M.T. Augusto, M.A.R.B. Castanho, N.C.
903 Santos, Conjugation of Cholesterol to HIV-1 Fusion Inhibitor C34 Increases Peptide-
904 Membrane Interactions Potentiating Its Action, *PLoS One.* 8 (2013) e60302.
905 doi:10.1371/journal.pone.0060302.
- 906 [38] P.M. Matos, M.A.R.B. Castanho, N.C. Santos, HIV-1 Fusion Inhibitor
907 Peptides Enfuvirtide and T-1249 Interact with Erythrocyte and Lymphocyte
908 Membranes, *PLoS One.* 5 (2010) e9830. doi:10.1371/journal.pone.0009830.

- 909 [39] J. Cladera, P. O'Shea, Intramembrane Molecular Dipoles Affect the
910 Membrane Insertion and Folding of a Model Amphiphilic Peptide, *Biophys. J.* 74
911 (1998) 2434–2442. doi:10.1016/S0006-3495(98)77951-2.
- 912 [40] S. Gonçalves, J. Abade, A. Teixeira, N.C. Santos, Lipid composition is
913 a determinant for human defensin hnp1 selectivity, *Biopolymers.* 98 (2012) 313–321.
914 doi:10.1002/bip.22088.
- 915 [41] A. Hollmann, M.A.R.B. Castanho, B. Lee, N.C. Santos, Singlet oxygen
916 effects on lipid membranes: implications for the mechanism of action of broad-
917 spectrum viral fusion inhibitors, *Biochem. J.* 459 (2014) 161–170.
918 doi:10.1042/BJ20131058.
- 919 [42] A.F. Faustino, G.M. Guerra, R.G. Huber, A. Hollmann, M.M.
920 Domingues, G.M. Barbosa, F.J. Enguita, P.J. Bond, M.A.R.B. Castanho, A.T. Da
921 Poian, F.C.L. Almeida, N.C. Santos, I.C. Martins, Understanding Dengue Virus Capsid
922 Protein Disordered N-Terminus and pep14-23-Based Inhibition, *ACS Chem. Biol.* 10
923 (2015) 517–526. doi:10.1021/cb500640t.
- 924 [43] N.J. Greenfield, Determination of the folding of proteins as a function
925 of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism, *Nat. Protoc.* 1 (2007)
926 2733–2741. doi:10.1038/nprot.2006.229.
- 927 [44] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax,
928 NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J.*
929 *Biomol. NMR.* 6 (1995) 277–293. doi:10.1007/BF00197809.
- 930 [45] B.A. Johnson, R.A. Blevins, NMR View: A computer program for the
931 visualization and analysis of NMR data., *J. Biomol. NMR.* 4 (1994) 603–14.
932 doi:10.1007/BF00404272.
- 933 [46] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, New York, 1986.
- 934 [47] C. Schwieters, J. Kuszewski, G. Mariusclore, Using Xplor–NIH for
935 NMR molecular structure determination, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 48
936 (2006) 47–62. doi:10.1016/j.pnmrs.2005.10.001.
- 937 [48] T.J. Dolinsky, J.E. Nielsen, J.A. McCammon, N.A. Baker, PDB2PQR:
938 an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations.,
939 *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) W665-7. doi:10.1093/nar/gkh381.
- 940 [49] N.A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M.J. Holst, J.A. McCammon,
941 Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome., *Proc.*
942 *Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 10037–41. doi:10.1073/pnas.181342398.
- 943 [50] M.J. Frias, J. Melo-Cristino, M. Ramirez, The Autolysin LytA
944 Contributes to Efficient Bacteriophage Progeny Release in *Streptococcus pneumoniae*,
945 *J. Bacteriol.* 191 (2009) 5428–5440. doi:10.1128/JB.00477-09.
- 946 [51] P.M. Matos, H.G. Franquelim, M.A.R.B. Castanho, N.C. Santos,
947 Quantitative assessment of peptide-lipid interactions. Ubiquitous fluorescence
948 methodologies, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1798 (2010) 1999–2012.
949 doi:10.1016/j.bbamem.2010.07.012.
- 950 [52] P.M. Matos, S. Gonçalves, N.C. Santos, Interaction of peptides with
951 biomembranes assessed by potential-sensitive fluorescent probes, *J. Pept. Sci.* 14
952 (2008) 407–415. doi:10.1002/psc.1005.
- 953 [53] D. Shang, Q. Zhang, W. Dong, H. Liang, X. Bi, The effects of LPS on
954 the activity of Trp-containing antimicrobial peptides against Gram-negative bacteria
955 and endotoxin neutralization, *Acta Biomater.* 33 (2016) 153–165.
956 doi:10.1016/j.actbio.2016.01.019.

- 957 [54] A.H. Delcour, Outer membrane permeability and antibiotic resistance,
958 *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1794 (2009) 808–816.
959 doi:10.1016/J.BBAPAP.2008.11.005.
- 960 [55] A. Lisi, D. Pozzi, S. Grimaldi, Use of the Fluorescent Probe Laurdan to
961 Investigate Structural Organization of the Vesicular Stomatitis Virus (VSV)
962 Membrane, *Membr. Biochem.* 10 (1993) 203–212. doi:10.3109/09687689309150268.
- 963 [56] D. Voss, T.J. Montville, 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene as a reporter of
964 inner spore membrane fluidity in *Bacillus subtilis* and *Alicyclobacillus acidoterrestris*,
965 *J. Microbiol. Methods*. 96 (2014) 101–103. doi:10.1016/j.mimet.2013.11.009.
- 966 [57] K.S. Usachev, S. V. Efimov, O.A. Kolosova, A. V. Filippov, V. V.
967 Klochkov, High-resolution NMR structure of the antimicrobial peptide protegrin-2 in
968 the presence of DPC micelles, *J. Biomol. NMR*. 61 (2015) 227–234.
969 doi:10.1007/s10858-014-9885-4.
- 970 [58] B. Legrand, M. Laurencin, J. Sarkis, E. Duval, L. Mouret, J.F. Hubert,
971 M. Collen, V. Vié, C. Zatylny-Gaudin, J. Henry, M. Baudy-Floc'H, A. Bondon,
972 Structure and mechanism of action of a de novo antimicrobial detergent-like peptide,
973 *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* (2011). doi:10.1016/j.bbamem.2010.08.020.
- 974 [59] K. Wüthrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun, Sequential resonance
975 assignments as a basis for determination of spatial protein structures by high resolution
976 proton nuclear magnetic resonance, *J. Mol. Biol.* 155 (1982) 311–319.
977 doi:10.1016/0022-2836(82)90007-9.
- 978 [60] D.S. Wishart, B.D. Sykes, F.M. Richards, The Chemical Shift Index: A
979 Fast and Simple Method for the Assignment of Protein Secondary Structure through
980 NMR Spectroscopy, *Biochemistry*. (1992). doi:10.1021/bi00121a010.
- 981 [61] D.S. Wishart, B.D. Sykes, F.M. Richards, Relationship between nuclear
982 magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure, *J. Mol. Biol.*
983 (1991). doi:10.1016/0022-2836(91)90214-Q.
- 984 [62] G.N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan,
985 Stereochemistry of polypeptide chain configurations, *J. Mol. Biol.* (1963).
986 doi:10.1016/S0022-2836(63)80023-6.
- 987 [63] M. McKenna, Antibiotic resistance: The last resort, *Nature*. 499 (2013)
988 394–396. doi:10.1038/499394a.
- 989 [64] S.M. Ribeiro, M.R. Felício, E.V. Boas, S. Gonçalves, F.F. Costa, R.P.
990 Samy, N.C. Santos, O.L. Franco, New frontiers for anti-biofilm drug development,
991 *Pharmacol. Ther.* 160 (2016) 133–144. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2016.02.006.
- 992 [65] C. de la Fuente-Núñez, M.H. Cardoso, E. de Souza Cândido, O.L.
993 Franco, R.E.W. Hancock, Synthetic antibiofilm peptides, *Biochim. Biophys. Acta -*
994 *Biomembr.* 1858 (2016) 1061–1069. doi:10.1016/J.BBAMEM.2015.12.015.
- 995 [66] N.B. da Cunha, N.B. Cobacho, J.F.C. Viana, L.A. Lima, K.B.O.
996 Sampaio, S.S.M. Dohms, A.C.R. Ferreira, C. de la Fuente-Núñez, F.F. Costa, O.L.
997 Franco, S.C. Dias, The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular
998 therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts, *Drug*
999 *Discov. Today*. 22 (2017) 234–248. doi:10.1016/J.DRUDIS.2016.10.017.
- 1000 [67] M.N. Gabere, W.S. Noble, Empirical comparison of web-based
1001 antimicrobial peptide prediction tools., *Bioinformatics*. 33 (2017) 1921–1929.
1002 doi:10.1093/bioinformatics/btx081.
- 1003 [68] H.-T. Lee, C.-C. Lee, J.-R. Yang, J.Z.C. Lai, K.Y. Chang, A Large-Scale
1004 Structural Classification of Antimicrobial Peptides, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015) 1–6.
1005 doi:10.1155/2015/475062.

- 1006 [69] F.H. Waghu, R.S. Barai, P. Gurung, S. Idicula-Thomas, CAMP R3 : a
1007 database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides: Table 1.,
1008 Nucleic Acids Res. 44 (2016) D1094–D1097. doi:10.1093/nar/gkv1051.
- 1009 [70] S. Lata, B. Sharma, G. Raghava, Analysis and prediction of antibacterial
1010 peptides, BMC Bioinformatics. 8 (2007) 263. doi:10.1186/1471-2105-8-263.
- 1011 [71] S. Lata, N.K. Mishra, G.P. Raghava, AntiBP2: improved version of
1012 antibacterial peptide prediction, BMC Bioinformatics. 11 (2010) S19.
1013 doi:10.1186/1471-2105-11-S1-S19.
- 1014 [72] X. Wu, Z. Wang, X. Li, Y. Fan, G. He, Y. Wan, C. Yu, J. Tang, M. Li,
1015 X. Zhang, H. Zhang, R. Xiang, Y. Pan, Y. Liu, L. Lu, L. Yang, In vitro and in vivo
1016 activities of antimicrobial peptides developed using an amino acid-based activity
1017 prediction method., Antimicrob. Agents Chemother. 58 (2014) 5342–9.
1018 doi:10.1128/AAC.02823-14.
- 1019 [73] A. Barreto-Santamaría, H. Curtidor, G. Arévalo-Pinzón, C. Herrera, D.
1020 Suárez, W.H. Pérez, M.E. Patarroyo, A New Synthetic Peptide Having Two Target of
1021 Antibacterial Action in *E. coli* ML35, Front. Microbiol. 7 (2016) 2006.
1022 doi:10.3389/fmicb.2016.02006.
- 1023 [74] P.B. Noto, G. Abbadessa, M. Cassone, G.D. Mateo, A. Agelan, J.D.
1024 Wade, D. Szabo, B. Kocsis, K. Nagy, F. Rozgonyi, L. Otvos, Jr., Alternative stabilities
1025 of a proline-rich antibacterial peptide in vitro and in vivo., Protein Sci. 17 (2008) 1249–
1026 55. doi:10.1110/ps.034330.108.
- 1027 [75] P.Y. Muller, M.N. Milton, The determination and interpretation of the
1028 therapeutic index in drug development, Nature Publishing Group, 2012.
1029 doi:10.1038/nrd3801.
- 1030 [76] O.N. Silva, C. De La Fuente-Núñez, E.F. Haney, I.C.M. Fensterseifer,
1031 S.M. Ribeiro, W.F. Porto, P. Brown, C. Faria-Junior, T.M.B. Rezende, S.E. Moreno,
1032 T.K. Lu, R.E.W. Hancock, O.L. Franco, An anti-infective synthetic peptide with dual
1033 antimicrobial and immunomodulatory activities, Sci. Rep. 6 (2016) 35465.
1034 doi:10.1038/srep35465.
- 1035 [77] P.-K. Lai, Y.N. Kaznessis, Insights into Membrane Translocation of
1036 Protegrin Antimicrobial Peptides by Multistep Molecular Dynamics Simulations, ACS
1037 Omega. 3 (2018) 6056–6065. doi:10.1021/acsomega.8b00483.
- 1038 [78] J.P. Ulmschneider, Charged Antimicrobial Peptides Can Translocate
1039 across Membranes without Forming Channel-like Pores., Biophys. J. 113 (2017) 73–
1040 81. doi:10.1016/j.bpj.2017.04.056.
- 1041 [79] R.M.R.F. Epanand, R.M.R.F. Epanand, Lipid domains in bacterial
1042 membranes and the action of antimicrobial agents, Biochim. Biophys. Acta -
1043 Biomembr. 1788 (2009) 289–294. doi:10.1016/J.BBAMEM.2008.08.023.
- 1044 [80] L.D. Renner, D.B. Weibel, Cardiolipin microdomains localize to
1045 negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes, Proc. Natl. Acad. Sci. 108
1046 (2011) 6264–6269. doi:10.1073/pnas.1015757108.
- 1047 [81] R. Rashid, M. Veleba, K.A. Kline, Focal Targeting of the Bacterial
1048 Envelope by Antimicrobial Peptides, Front. Cell Dev. Biol. 4 (2016) 55.
1049 doi:10.3389/fcell.2016.00055.
- 1050 [82] E. Mileykovskaya, W. Dowhan, Cardiolipin-dependent formation of
1051 mitochondrial respiratory supercomplexes, Chem. Phys. Lipids. 179 (2014) 42–48.
1052 doi:10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2013.10.012.
- 1053 [83] E. Mileykovskaya, W. Dowhan, Visualization of phospholipid domains
1054 in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl

- 1055 acridine orange., *J. Bacteriol.* 182 (2000) 1172–5. doi:10.1128/JB.182.4.1172-
1056 1175.2000.
- 1057 [84] R. Koebnik, K.P. Locher, P. Van Gelder, Structure and function of
1058 bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell, *Mol. Microbiol.* 37 (2000)
1059 239–253. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x.
- 1060 [85] L. Zhang, P. Dhillon, H. Yan, S. Farmer, R.E. Hancock, Interactions of
1061 bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of
1062 *Pseudomonas aeruginosa.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (2000) 3317–21.
1063 doi:10.1128/AAC.44.12.3317-3321.2000.
- 1064 [86] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein
1065 secondary structure, *Nat. Protoc.* 1 (2007) 2876–2890. doi:10.1038/nprot.2006.202.
- 1066 [87] É. Forde, G. Shafiy, D. Fitzgerald-Hughes, A.A. Strömstedt, M.
1067 Devocelle, Action of antimicrobial peptides and their prodrugs on model and biological
1068 membranes, *J. Pept. Sci.* (2018) e3086. doi:10.1002/psc.3086.
- 1069 [88] M.-C. Gagnon, E. Strandberg, A. Grau-Campistany, P. Wadhvani, J.
1070 Reichert, J. Bürck, F. Rabanal, M. Auger, J.-F. Paquin, A.S. Ulrich, Influence of the
1071 Length and Charge on the Activity of α -Helical Amphipathic Antimicrobial Peptides,
1072 *Biochemistry.* 56 (2017) 1680–1695. doi:10.1021/acs.biochem.6b01071.
- 1073 [89] O.G. Travkova, H. Moehwald, G. Brezesinski, The interaction of
1074 antimicrobial peptides with membranes, *Adv. Colloid Interface Sci.* 247 (2017) 521–
1075 532. doi:10.1016/J.CIS.2017.06.001.
- 1076 [90] G.P.B. Carretero, G.K.V. Saraiva, A.C.G. Cauz, M.A. Rodrigues, S.
1077 Kiyota, K.A. Riske, A.A. dos Santos, M.F. Pinatto-Botelho, M.P. Bemquerer, F.J.
1078 Gueiros-Filho, H. Chaimovich, S. Schreier, I.M. Cuccovia, Synthesis, biophysical and
1079 functional studies of two BP100 analogues modified by a hydrophobic chain and a
1080 cyclic peptide, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1860 (2018) 1502–1516.
1081 doi:10.1016/J.BBAMEM.2018.05.003.
- 1082 [91] M.M. Domingues, S.C.D.N. Lopes, N.C. Santos, A. Quintas, M.A.R.B.
1083 Castanho, Fold-unfold transitions in the selectivity and mechanism of action of the N-
1084 terminal fragment of the bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI(21)),
1085 *Biophys. J.* 96 (2009) 987–96. doi:10.1016/j.bpj.2008.10.044.
- 1086 [92] M. Datrie, M. Schumann, T. Wieprecht, A. Winkler, M. Beyermann, E.
1087 Krause, K. Matsuzaki, O. Murase, M. Bienert, Peptide helicity and membrane surface
1088 charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid
1089 bilayers and biological membranes, *Biochemistry.* (1996). doi:10.1021/bi960835f.
- 1090 [93] Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu, A. Bax, TALOS+: a hybrid method
1091 for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts., *J. Biomol.*
1092 *NMR.* 44 (2009) 213–23. doi:10.1007/s10858-009-9333-z.
- 1093 [94] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, MOLMOL: A program for display
1094 and analysis of macromolecular structures, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 51–55.
1095 doi:10.1016/0263-7855(96)00009-4.
1096
1097

1098 **TABLES**

1099 Table 1. Parameters calculated for PaDBS1R6 based on the different characterization techniques, including circular dichroism, zeta-
 1100 potential and di-8-ANEPPS fluorescence spectroscopy, for each large unilamellar lipid vesicles system and *Escherichia coli* (ATCC 25922) cells.

Composition	Lipid vesicles Mimicking systems	CD (μM)		Partition (10^3)	Di-8-ANEPPS (μM)
		K_D^{app} \pm SD	$n \pm$ SD	$K_p \pm$ SD	$K_D \pm$ SD
Free	-	n.d. ^a	n.d. ^a	n.a. ^b	n.a. ^b
POPC	Control	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
POPC:Chol (70:30)	Mammalian cells	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^a
POPC:POPG (70:30)	Simple model of	$61.3 \pm$	$1.56 \pm$	2.4	9.9 ± 1.9
	Gram-negative bacteria	6.0	0.27		
POPE:POPG:CL (65:30:05)	Inner membrane of	$48.3 \pm$	$1.29 \pm$	4.8	12.4 ± 2.4
	Gram-negative bacteria	7.3	0.26		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	-	n.a. ^b	n.a. ^b	n.a. ^b	n.d. ^a

1101 n.d.^a – data did not fit to the equation; n.a.^b – not applicable; SD – standard deviation.

1102

1103 Table 2. NMR structural statistics for the 10 lowest-energy structures of PaDBS1R6.

Total NOE distance restraints	378
Intra-residue	218
Sequential	104
Medium range ($1 \leq i - j \leq 5$)	22
Long range ($ i - j > 5$)	0
Dihedral angle restraints ^a	34
Average restrictions per residue	19.9
RMSD (Å) for heavy atoms (residues 1-19) ^b	1.82 ± 0.27
RMSD (Å) backbone atoms (residues 1-19) ^b	1.05 ± 0.24
RMSD (Å) for heavy atoms (residues 2-17) ^b	1.52 ± 0.21
RMSD (Å) backbone atoms (residues 2-17) ^b	0.82 ± 0.23
Residues in favored regions on Ramachandran diagram ^c	98.8%
Residues in allowed regions on Ramachandran diagram ^c	1.2%

1104 ^a Predicted by TALOS+ [63]. ^b Calculated by MOLMOL [64]. ^c Calculated by Ramachandran1105 Plot Analysis (mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php).

1106

1107

FIGURES

1108

Figure 1. PaDBS1R6 activity against *P. aeruginosa*. (A) Minimum inhibitory1109 concentration of PaDBS1R6 against *P. aeruginosa* strains. (B) Flow cell analysis of *P.*1110 *aeruginosa* PAO1 biofilm formation in the absence and presence of 16 μM of PaDBS1R6. *P.*1111 *aeruginosa* biofilms were cultivated in minimal medium for 48 h in the presence of 16 μM of

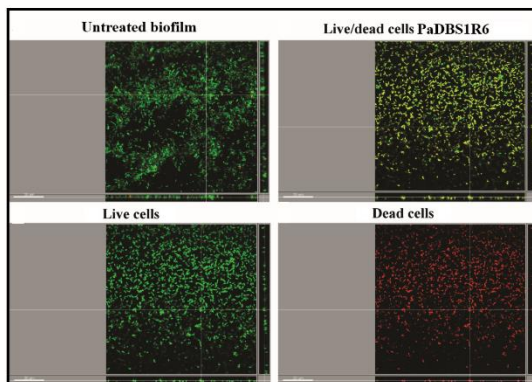
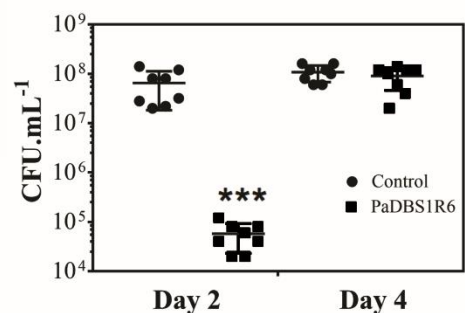
1112 peptide at 37°C in flow chambers. Biofilms were imaged by widefield fluorescence

1113 microscopy, using SYTO9 to stain live cells (green fluorescence) and propidium iodide (PI, red

1114 fluorescence), a normally cell-impermeable stain, to stain compromised cells. The scale bar

1115 represents 15 μm , and each panel shows xy, yz, and xz dimensions. (C) Recovery of bacterial1116 load of the wound from female CD-1 mice infected with *P. aeruginosa* PA14 after 2 and 4 days1117 of infection. The wound was inoculated with $\sim 5 \times 10^6$ CFU of bacteria and treated with1118 PaDBS1R6 (64 μM). Values represent the mean \pm SD and data were analyzed by one-way1119 ANOVA and Bonferroni test: *** $p < 0.001$ compared to untreated group.**A**

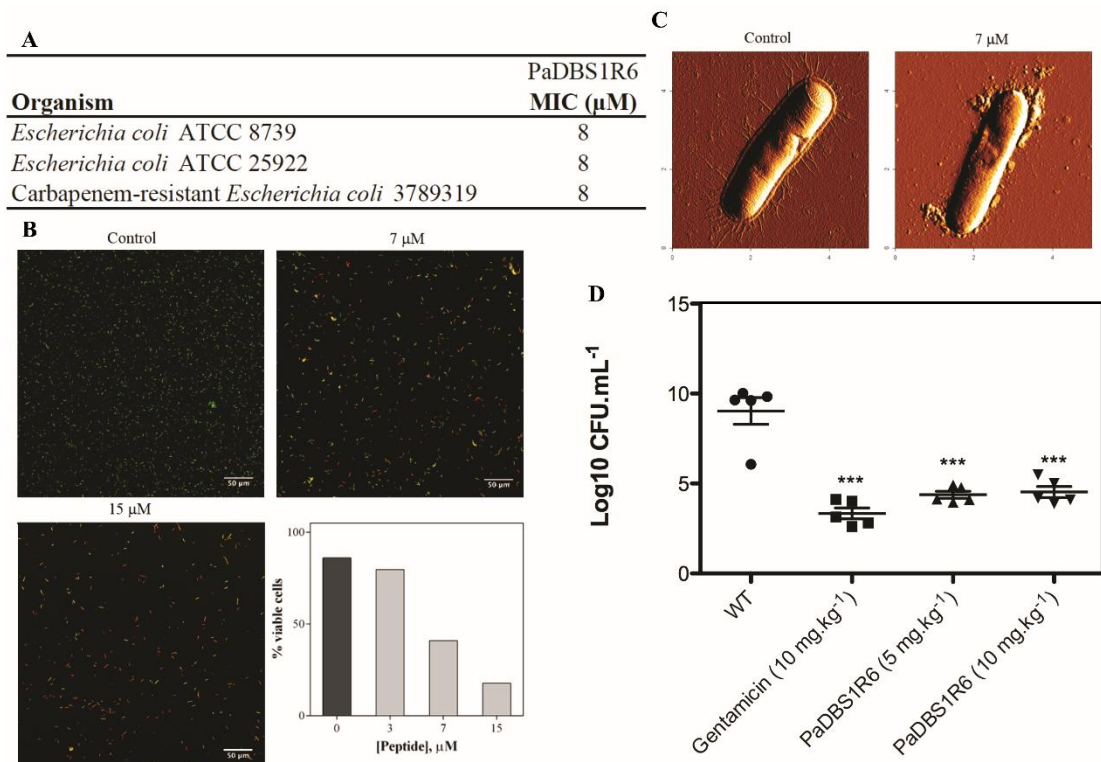
Organism	PaDBS1R6 MIC (μM)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	8

B**C**

1120

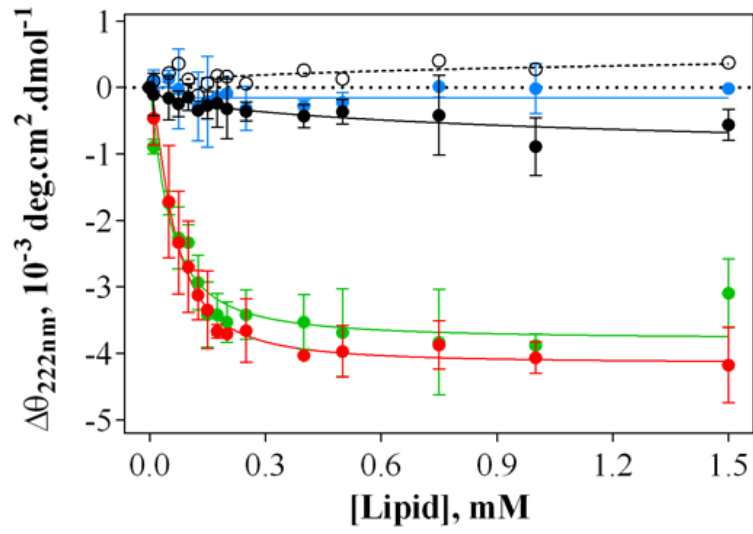
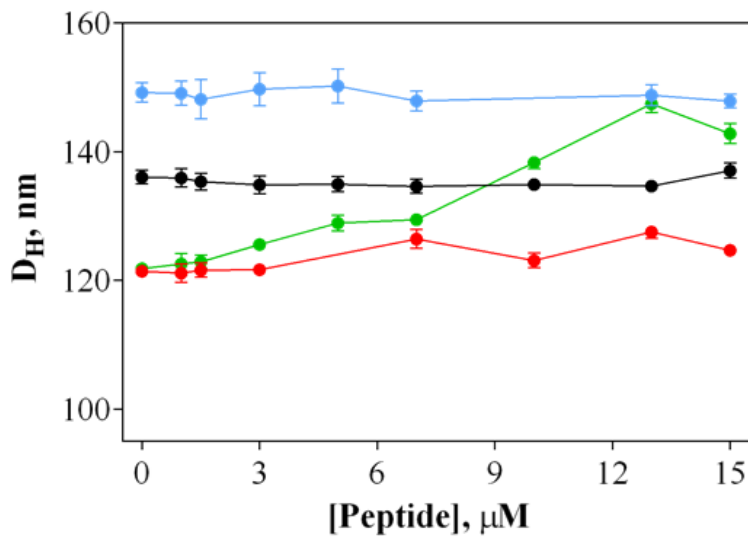
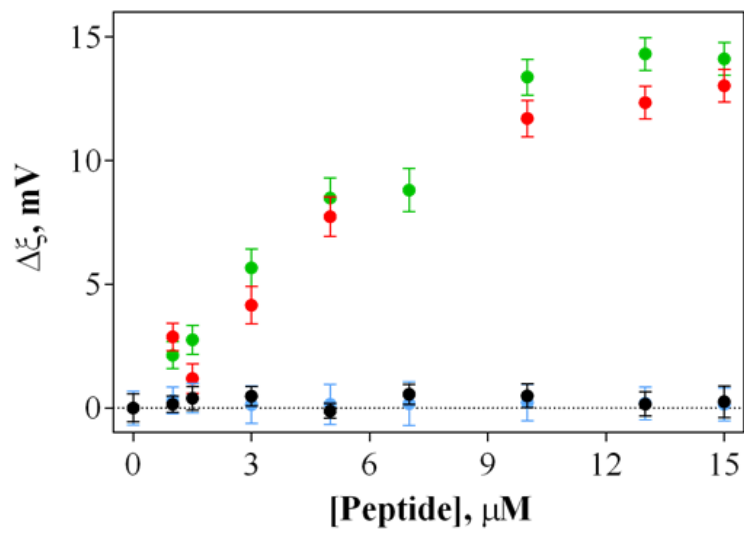
1121

1122 **Figure 2. PaDBS1R3 activity against *Escherichia coli*.** (A) Minimum inhibitory
 1123 concentration of PaDBS1R6 against *E. coli* strains. (B) Fluorescence confocal microscopy
 1124 images of *E. coli* cells in the absence (control) and presence of PaDBS1R6 (7 and 15 μM).
 1125 Images are representative of one assay, with SYTO9 and PI dyes being used for identification
 1126 of viable and membrane compromised cells, respectively. Percentage of viable cells calculated
 1127 from confocal fluorescence microscopy images, using FIJI (ImageJ), by comparing the number
 1128 of green stained cells relatively to the total number present. Values represented were calculated
 1129 for the images presented. (C) Atomic force microscopy images of *E. coli* cells in the absence
 1130 (control) and presence of PaDBS1R6 (7 μM), with 1 h of incubation. Total scanning area of 5
 1131 \times 5 μm^2 . (D) Female CD-1 mice infected with $\sim 1 \times 10^8$ CFU of *E. coli* ATCC 8739 and treated
 1132 *i.p.* with PaDBS1R6 (5 and 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), gentamicin (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) or PBS 1 h after infection.
 1133 The injections were repeated after 24 h for 3 days. Values represent the mean \pm SD and data
 1134 were analyzed by one-way ANOVA and Bonferroni test: *** $p < 0.001$ compared to untreated
 1135 group.

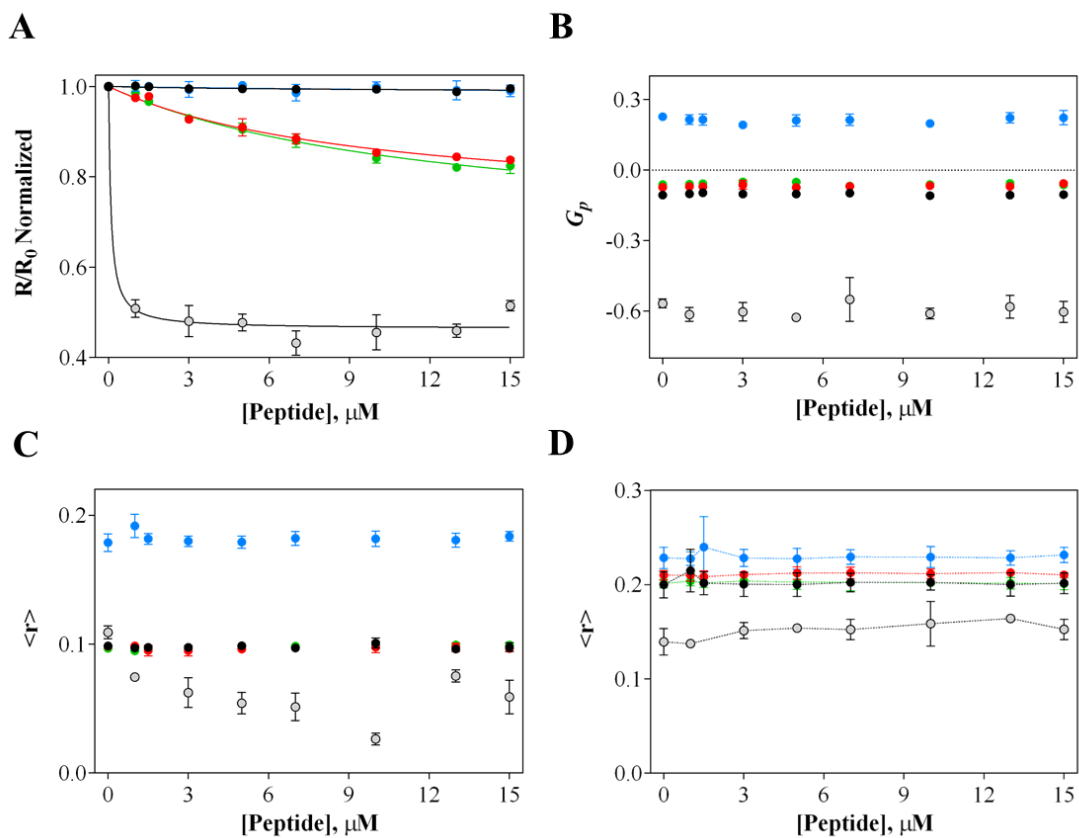


1136

1137 **Figure 3. PaDBS1R6 peptide-membrane interactions studied by CD, DLS and**
1138 **zeta-potential.** (A) Comparison of the CD θ signal at 222 nm (local minimum for α -helices)
1139 for different lipid vesicle concentrations. PaDBS1R6 with a constant concentration of 16 μM
1140 (empty circles). Solid lines represent the fitting using Equation 5. Calculated parameters are
1141 presented in Table 1. (B) DLS hydrodynamic diameter (D_H) data of the different lipid vesicles
1142 with peptide titration. Lipid concentration was kept constant at 200 μM . Solid lines represent
1143 the evolution of D_H values. (C) Zeta-potential data for the different lipid vesicles. Lipid
1144 concentration was kept constant at 200 μM upon peptide titration. Values were calculated
1145 through the difference between the zeta-potential obtained after peptide addition and the value
1146 in the absence of peptide (initial value). From this data, partition coefficients were also
1147 calculated, using the method described elsewhere [65]. Calculated values are represented in
1148 Table 1. Lipid vesicles used included POPC (black circles), POPC:Chol (70:30) (blue circles),
1149 POPC:POPG (70:30) (red circles) and POPE:POPG:CL (65:30:05) (green circles).

A**B****C**

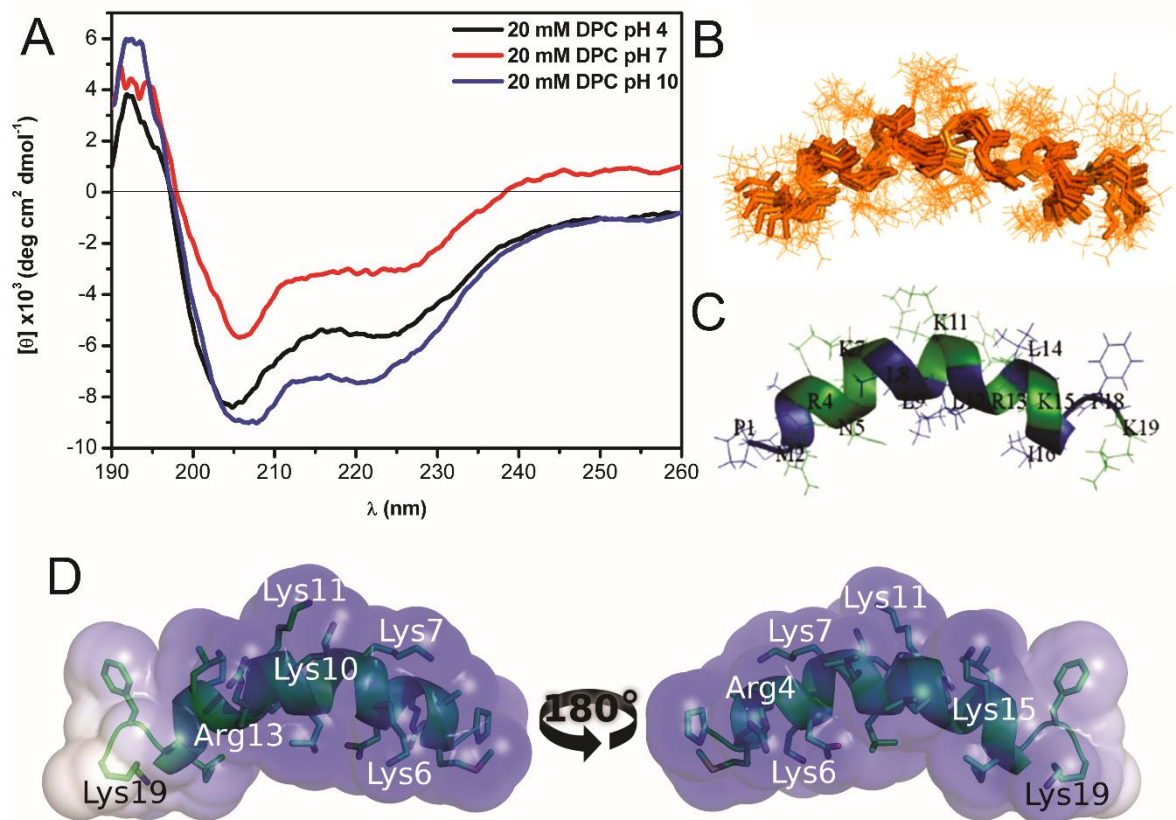
1151 **Figure 4. Membrane dipolar potential, lipid packing, and membrane fluidity**
 1152 **studied after peptide treatment in lipid vesicles and *E. coli* cells.** (A) Membrane dipolar
 1153 potential destabilization studied using di-8-ANEPPS probe. Solid lines represent the fitting
 1154 using Equation 2. Calculated parameters are presented in Table 1. (B) Generalized polarization
 1155 (G_p) values obtained for the different lipid vesicles and *E. coli* cells. These measurements give
 1156 information about the lipid packing behavior. Values were calculated from the emission spectra
 1157 of Laurdan using Equation 3. (C and D) Anisotropy values obtained with DPH and TMA-DPH,
 1158 respectively. These dyes give information about membrane fluidity and its changes. Values
 1159 were calculated trough Equation 4. Lipid vesicles used included POPC (black circles),
 1160 POPC:Chol (70:30) (blue circles), POPC:POPG (70:30) (red circles) and POPE:POPG:CL
 1161 (65:30:05) (green circles). *E. coli* cells data are represented by grey circles.



1162

1163

1164 **Figure 5. CD spectra and NMR structures for PaDBS1R6.** (A) Circular dichroism
 1165 spectra of 50 μM PaDBS1R6 in the presence of 20 mM DPC micelles at different pH values
 1166 (pH 4.0 – black, pH 7.0 – red and pH 10.0 – blue). (B) Backbone superposition of ten structures
 1167 with low energy. In (C), hydrophobic and hydrophilic residues are highlighted in blue and
 1168 green, respectively. (D) Electrostatic surface of PaDBS1R6 in DPC-d38 micelles media.
 1169 Surface potentials were set to ± 5 and -1 kT e^{-1} (133.56 mV). Blue indicates positively charged
 1170 and white nonpolar ones.



1171

1172

1173 **SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS**

1174

1175 **Combinatorial checkerboard assay**

1176 In order to evaluate the synergistic effect of the PaDBS1R6 with tetracycline or
1177 cefotaxime, microdilution technique modified for the checkerboard test was performed
1178 according to the methodology described by Pillai and Moellering [20]. For the evaluation of
1179 the interaction between the different treatments, the fractional inhibitory concentration index
1180 (FICI) was calculated. With this method, synergism is defined as an FICI of ≤ 0.5 , no interaction
1181 will be defined when FICI from 0.5 to 4.0, and antagonism will be defined as an ICIF of above
1182 4.0 [21].

1183

1184

1185 SUPPLEMENTARY TABLES AND FIGURES

1186 **Supplementary Table 1.** Minimum inhibitory concentration of PaDBS1R6 against Gram-
 1187 negative and Gram-positive bacteria.

Organism	PaDBS1R6 MIC (μM)
Gram-negative bacteria	
Carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> 3259271	16
Gram-positive bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	64
Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> 713623	>64

1188

1189

1190

1191 **Supplementary Table 2.** Synergy among peptides expressed as the FIC index (FICI). The FICI
 1192 is calculated from the equation: $FICI = \frac{[A]}{MIC_A} + \frac{[B]}{MIC_B}$, where MIC_A and MIC_B are the MICs of
 1193 the peptide or the antibiotic alone, and [A] and [B] are the MICs in combination. The numbers
 1194 in parentheses are the MICs in combination, with the first number corresponding to the peptide
 1195 indicated in the column and the second one corresponds to the antibiotic indicated on the line.
 1196 $FICI \leq 0.5$ denotes synergism, $>0.5-4$ denotes indifference, and >4 denotes antagonism.

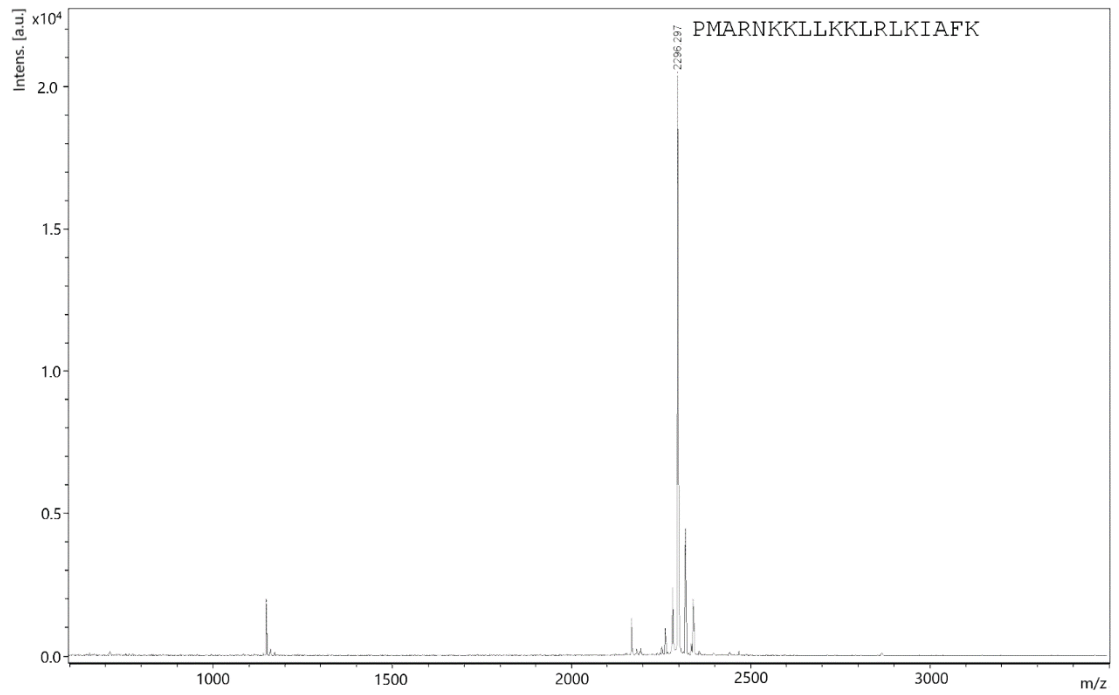
Combination	PaDBS1R6	
	FICI	Interpretation
Tetracycline	1 (8/64)	Indifference
Cefotaxime	0.75 (8/4) (4/8)	Indifference

1197

1198

1199

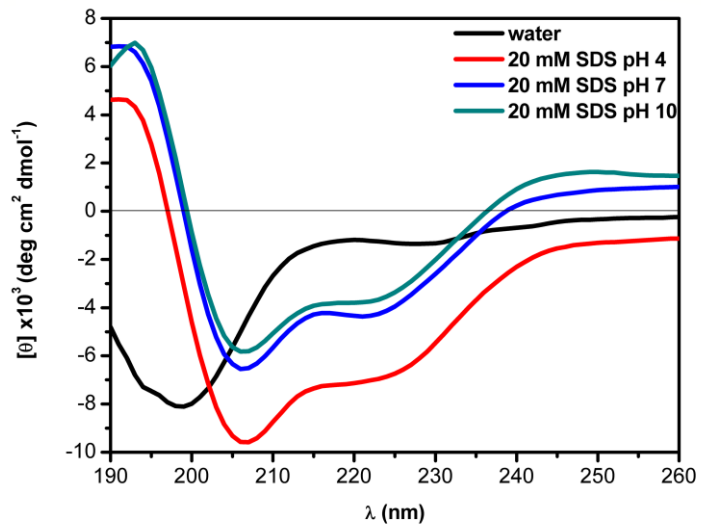
1200 **Supplementary Figure 1.** MALDI-TOF mass spectrum of peptide PaDBS1R6, obtained in
1201 positive ionization mode, using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as MALDI matrix.



1202

1203

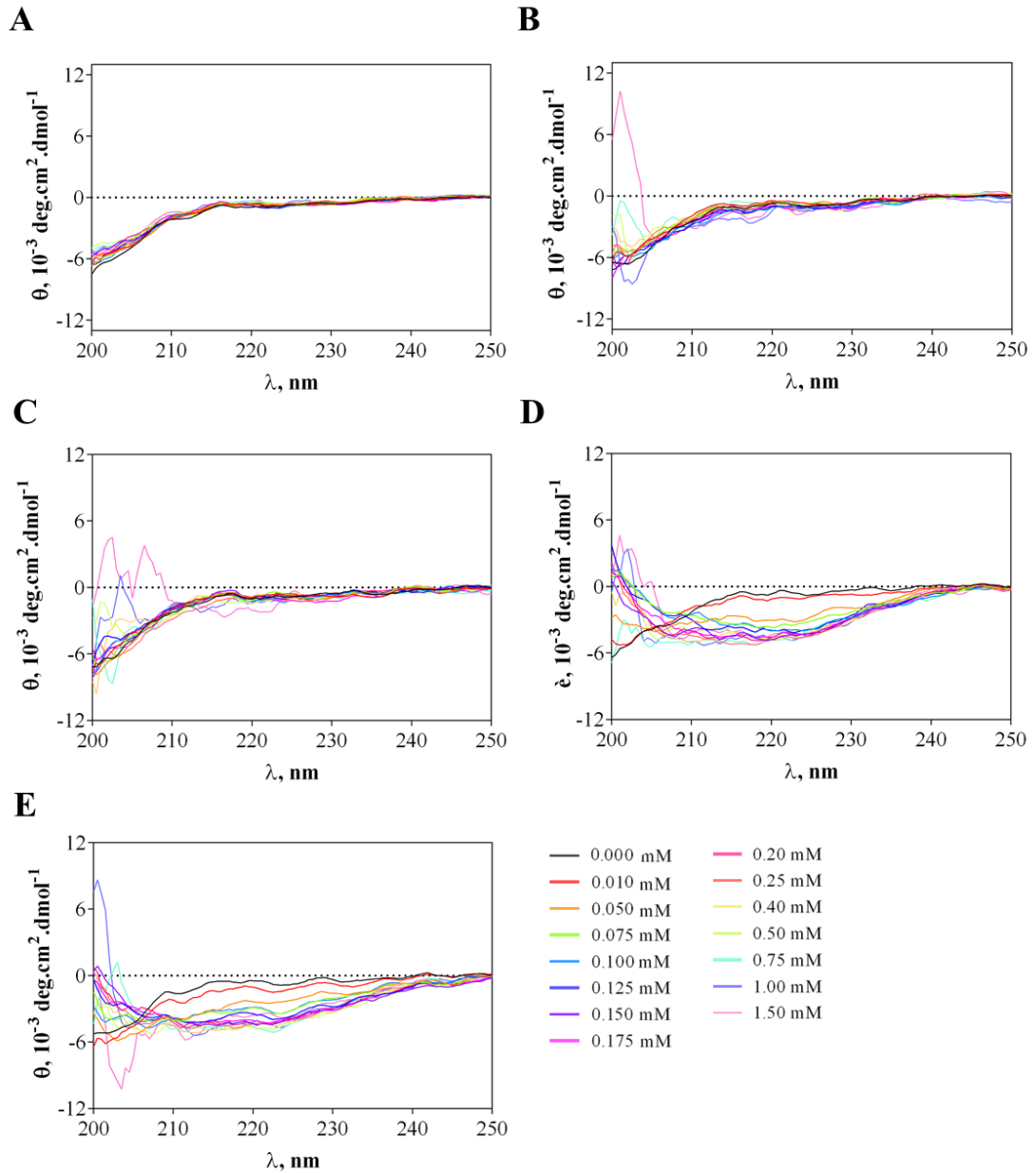
1204 **Supplementary Figure 2.** Circular dichroism spectra of PaDBS1R6 in different media and pH
1205 environments. Peptide concentration was kept constant at 50 μM .



1206

1207

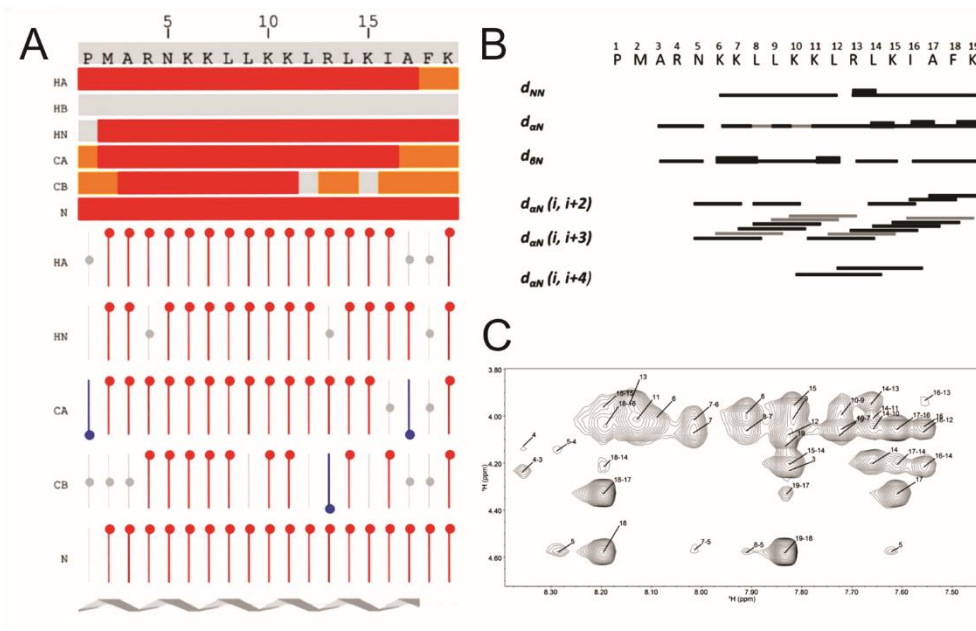
1208 **Supplementary Figure 3.** Circular dichroism spectra obtained for PaDBS1R6 (16 μM) in the
 1209 absence (A) and presence of different lipid vesicles (B – E). Lipid concentration varied from 0
 1210 to 1.5 mM, in order to study the membrane affinity. Lipid vesicles studied included POPC (B),
 1211 POPC:Chol (70:30) (C), POPC:POPG (70:30) (D) and POPE:POPG:CL (65:30:05) (E).



1212

1213

1214 **Supplementary Figure 5.** Chemical shift index (A) and NOE connectivity pattern (B) for
 1215 PaDBS1R6 in DPC-d₃₈ micelles. Line thickness is inversely proportional to the squared upper
 1216 distance bound. Ambiguous assignments due to peak overlap were drawn in grey boxes (C).
 1217 ¹H-¹H NOESY spectrum, fingerprint of region H_α-H_N, obtained with 2 mM of PaDBS1R6 in
 1218 200 mM of DPC-d₃₈ micelles at pH 7.0, in PBS. Thus implying that peptide-membrane
 1219 interactions did not occur and did not promote any structural changes under these conditions.



1220

4 DISCUSSÃO

As bactérias MDR são reconhecidas como um dos mais importantes problemas de saúde pública atuais, sendo consideradas uma das maiores ameaças à saúde humana em todo o mundo. A OMS tem relatado a urgência do desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento de microrganismos MDR, aparecem na lista de prioridades as bactérias Gram-negativas *Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenêmicos; *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a carbapenêmicos; e *Enterobacteriaceae*, resistente a carbapenêmicos, produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) [4,7].

As novas alternativas têm sido frequentemente baseadas no reconhecimento de conceitos antigos. Esses conceitos tem sugerido que os organismos procariontes produtores de mecanismos de defesa sofisticados (antibióticos) foram selecionados há bilhões de anos, ou seja, a resistência é possivelmente o principal resultado da adaptação bacteriana a eras de exposição a antibióticos [66]. Sendo assim, algumas implicações fundamentais neste cenário foram descritas, por exemplo, além do poder curativo dos antibióticos, seu uso naturalmente seleciona populações de bactérias resistentes pré-existentes na natureza. Além disso, não é apenas o uso de antibióticos “inapropriado” que seleciona a resistência. Em vez disso, a velocidade com que a resistência se espalha é impulsionada pela exposição microbiana a todos os antibióticos, seja ela apropriadamente prescrita ou não. Assim, mesmo que todo o uso inadequado de antibióticos fosse eliminado, as infecções resistentes a antibióticos ainda ocorreriam (embora com menor frequência) [67].

Pode-se especular que após bilhões de anos de evolução, os micróbios provavelmente selecionaram antibióticos contra todos os alvos bioquímicos que podem ser atacados - e, necessariamente, desenvolveram mecanismos de resistência para proteger todos esses alvos bioquímicos [67]. Em um estudo realizado em 2012 por Bhullar e colaboradores, foi possível observar que a resistência generalizada aos antibióticos, está também presente em bactérias encontradas em cavernas subterrâneas que haviam sido geologicamente isoladas da superfície do planeta por 4 milhões de anos. Ou seja, a resistência foi encontrada até mesmo para antibióticos sintéticos que não existiam na Terra até o século XX [68].

Diante deste cenário catastrófico os PAMs têm sido propostos como uma alternativa aos antibióticos tradicionais [69]. Nas últimas três décadas um grande

número de PAMs foram isolados, resultando em um grande número de estudos de atividade biológica e função estrutural. Têm sido consenso que uma estrutura em alfa-hélice anfipática parece ser um motivo necessário para a atividade antimicrobiana do peptídeo, em vez de uma sequência peptídica definida [70]. Tornou-se cada vez mais claro que, no contexto deste motivo anfipático catiônico, existem sequências de aminoácidos primários, testados pela evolução [71], que determinam a especificidade de alvos microbianos [72,73]. Partindo dessa premissa novos peptídeos e seus derivados têm sido gerados e aperfeiçoados continuamente a fim de obter um peptídeo que seja eficaz para o tratamento de infecções causadas por microrganismos MDR.

Os PAMs apresentam um amplo espectro de atividade, possuindo como alvo principal as membranas bacterianas [74–76] (Figura T1). Diversos peptídeos como PaDBS1R1 [45], EcDBS1R5 [77], BP100 [78], Guavanina 2 [10], cecropina A [43]c e pepR [65] tem mostrado a importância da membrana celular para suas atividades. Entretanto, o mecanismo de ação dos PAMs não se limita a interação com a membrana, alguns peptídeos apresentam como alvo estruturas intracelulares, como os peptídeos TC19, TC84 e BP2 [79], o modelo de como ocorre essa interação entre o peptídeos e membrana foram mostrados na introdução. Mesmo esses peptídeos que apresentam como alvo estruturas intracelulares, precisam de algum tipo de interação com a membrana celular para que alcancem seus alvos. Além de ação contra membrana de células bacterianas, diversos peptídeos tem sido estudados com objetivo de buscar moléculas ativas contra células tumorais [7]. Dessa forma, as características biofísicas dos PAMs contribuem para sua habilidade de agir contra diversos alvos justificando o porquê da seletividade de algumas moléculas [7,80–82].

Nos últimos anos, pesquisadores têm se esforçado para desenvolvimento de PAMs com uso clinicamente relevante, porém, nenhum novo antibiótico projetado a base de PAMs foi liberado para comercialização [56]. Entretanto, vários PAMs ou seus derivados podem ser encontrados em estágio pré-clínico e clínico de desenvolvimento [56]. Alguns exemplos são: (1) a LL-37 que se encontra em estágio clínico fase II de desenvolvimento; (2) o Novexatin, um derivado de defensina humana, que também se encontra em estágio clínico fase II; o PXL01 e hLF1-11 que são derivados de lactoferricina e também se encontram em estágio clínico fase II [9]. Para que a população tenha acesso a um novo medicamento é preciso que sejam feitos ensaios pré-clínicos e clínicos que comprovem a segurança e eficácia desse tratamento. Os

ensaios clínicos são realizados em humanos e servem para chegar a conclusões precisas sobre a segurança e benefícios desses novos candidatos a medicamentos. Entretanto, antes de um candidato chegar a ensaios clínicos é necessário que este seja aprovado em ensaios pré-clínicos. O ensaio pré-clínico envolve a avaliação de possíveis intervenções terapêuticas usando ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* utilizando animais. Os sistemas vivos são complexos apresentando dificuldade no estudo de mecanismos e interações específicas. Estudos *in vivo* oferecem uma visão sistêmica da utilização do produto [83]. Neste trabalho foram realizados ensaios pré-clínicos *in vitro* (teste contra bactérias, ensaios de biofísica e RNM) e *in vivo* (utilização de camundongos para determinar o efeito *in vivo* do peptídeo PaDBS1R6).

Inicialmente, os PAMs foram isolados a partir de fontes naturais, porém, na última década o desenho racional de peptídeos tem se mostrado uma estratégia para a geração de moléculas seletivas utilizando inteligência artificial e bioinformática [10,62]. Os métodos computacionais utilizados são capazes de reduzir tempo e custo para o desenho e síntese de novos compostos quando comparados aos métodos convencionais de isolamento e caracterização de PAMs naturais estimulando dessa forma o investimento para o desenvolvimento de novas moléculas, que podem chegar ao uso clínico. Outra vantagem vinculada ao desenho racional de peptídeos é a capacidade de melhoria na atividade citotóxica, redução do tamanho da molécula (facilitando e barateando a síntese química) e o aumento da atividade antimicrobiana [10,84].

O algoritmo Joker consiste em um método de desenho racional que se baseia na inserção de padrões rígidos em uma sequência precursora de um peptídeo. Previamente à utilização do Joker, algumas sequências foram selecionadas, no *Protein database* do NCBI, de acordo com algumas características (presença do padrão ou motivo A (KK[ILV]xxx[ILVA]) e 18 resíduos de aminoácidos). Essa busca no banco peptídeos resultou em seis sequências (EcDBS1, MmDBS1, PaDBS1, PcDBS1, PyDBS1 e TcDBS1), as quais foram submetidas ao desenho racional utilizando o algoritmo Joker e cada uma delas gerou nove variantes. O peptídeo PaDBS1R6 foi um dos peptídeo desenvolvidos por esse método [62]. Esses peptídeos foram inicialmente testados contra *P. aeruginosa* bioluminescente, PaDBS1R6 foi o peptídeo selecionado para este trabalho por ter tido uma atividade promissora contra essa bactéria, apresentando um dos melhores MICs das moléculas desenhadas [62].

O *screening* inicial da atividade biológica tem sido considerado essencial para começar a se ter acesso a eficiência do PAM [85–87].

O peptídeo PaDBS1R6 apresentou uma atividade promissora quando testado contra bactérias Gram-negativas, uma vez que inibiu o crescimento de *E. coli* e *P. aeruginosa* em pelo menos 4 vezes mais quando comparado com as cepas de bactérias Gram-positivas testadas, *S. aureus* e *S. aureus* MRSA. Esse peptídeo apresentou MIC de 16-8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra cepas de *P. aeruginosa*, de 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra cepas de *E. coli*, incluindo *E. coli* resistente a carbapenêmicos. Já quando testado contra *S. aureus*, apresentou MIC de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra ATCC 25923 e MIC <64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ quando testado contra *S. aureus* MRSA. Sugerindo dessa forma uma atividade seletiva dessa molécula para bactérias Gram-negativas. Uma das hipóteses para essa atividade seletiva contra bactérias Gram-negativas pode ser associada ao *screening* realizado contra *P. aeruginosa*. Como a seleção foi feita escolhendo o peptídeo que apresentou melhor atividade contra essa bactéria, podemos ter selecionado um peptídeo seletivo contra essa classe de bactérias.

Diversos trabalhos tem demonstrado que peptídeos sintéticos também apresentaram uma seletividade contra bactérias Gram-negativas, incluindo os peptídeos DP 2 - 11, os quais foram testados contra *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* PAO1. O peptídeo DP 3 por exemplo, apresentou o melhor MIC contra *E. coli* ATCC 25922 (8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), enquanto os peptídeos DP 5, DP 7, DP 8 e DP 11 apresentaram os melhores MICs contra *P. aeruginosa* (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) [88]. Outro estudo utilizando o peptídeo sintético 35409 demonstrou MIC de 22 μM *E. coli* ML35 contra e de 44 μM contra *P. aeruginosa* ATCC 15442 [89]. Além desses, outro peptídeo desenhado por esse mesmo algoritmo também apresentou uma atividade contra bactérias Gram-negativas, o peptídeo PaDBS1R1 foi desenhado pelo Joker, sintetizado e testado contra diversas cepas bacterianas, demonstrando que peptídeos criados por desenho racional representam uma real alternativa no tratamento de infecções [45].

Na tabela T1, abaixo, são apresentadas as sequências dos peptídeos: PaBDS1 (peptídeo parental); e PaDBS1R6. Nessa tabela, pode-se visualizar a diferença significativa entre os MICs dessas moléculas. PaBDS1 não apresentou atividade antimicrobiana enquanto PaDBS1R6 apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* e baixa atividade contra *S. aureus*. Se as sequências desses peptídeos forem comparadas entre si, algumas variações são possíveis de serem visualizadas

sugerindo motivos para as diferentes atividades antimicrobianas. No peptídeo PaDBS1R6 a PRO⁷ foi substituída por uma LYS⁷, a GLY⁹ foi substituída por uma LYS⁹, as ALA¹⁵ e ALA¹⁶ foram substituídas respectivamente por LYS¹⁵ e ILE¹⁶. O aumento do caráter polar desse peptídeo pode ser um dos fatores responsáveis pelo aumento da atividade do peptídeo quando comparado com o peptídeo parental.

Tabela T1 – tabela correlacionando o nome, a sequência e a atividade dos peptídeos PaDBS1, PaDBS1R1 e PaDBS1R6.

Peptídeo	Sequência	MIC		Referência
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	
PaDBS1	-MARNKPLGKKLRLAAAFK	>256 (µg.mL ⁻¹)	>256 (µg.mL ⁻¹)	[49]
PaDBS1R6	PMARNK KLL KLRL KI AFK	8 (µM)	64 (µM)	Este trabalho

Utilizando os dados de MIC, foi calculado o índice de seletividade dessa molécula. O índice de seletividade é análogo ao índice terapêutico segundo o *Food and Drug Administration* (FDA) o índice de seletividade indica quando uma molécula é segura o suficiente para ser comercializada [10]. O FDA é o órgão dos Estados Unidos da América, criado em 1982, que tem como função a aprovação e o controle de alimentos e medicamentos que serão comercializados no país, sendo um dos órgãos de fiscalização de medicamentos mais respeitáveis no mundo [90]. Quanto maior o valor do índice de seletividade, mais seguro é o produto. Para o peptídeo PaDBS1R6 esse índice foi calculado apresentando o valor de 17,85, esse valor indica que essa molécula é um candidato em potencial para desenvolvimento de um novo fármaco já que é preciso uma dose 17 vezes mais alta que a dose terapêutica para que o peptídeo apresente uma atividade tóxica [10,91]. Outros peptídeos também tiveram seus índices de seletividade calculados. O peptídeo PaDBS1R1, já previamente citado, apresentou um índice de seletividade de 6,1 [45], enquanto o peptídeo guavanina 2 apresentou um índice de seletividade de 23,93 [10]. Demonstrando assim que o peptídeo PaDBS1R6 se mostrou mais seguro para uso em animais quando comparado com o peptídeo PaDBS1R1.

Este dado juntamente com o fato de o peptídeo PaDBS1R6 não ter apresentado atividade hemolítica nas doses testadas demonstram a segurança na utilização da molécula, dessa forma, nós verificamos a atividade dessa molécula em dois modelos *in vivo* para análise da sua atividade biológica. O primeiro dos modelos utilizados nesse trabalho foi contra *P. aeruginosa*, um patógeno amplamente associado a IrAS [27,28]. Por ser uma bactéria normalmente associada a infecções

em feridas cirúrgicas o modelo selecionado para o teste contra ela foi o modelo de infecção cutânea. O segundo modelo utilizado foi o de infecção sistêmica contra *E. coli*. Essa bactéria foi selecionada para esse modelo por ser uma das grandes responsáveis por infecções sistêmicas nos serviços de saúde [20,21].

O modelo de infecção cutânea utilizando *P. aeruginosa* PA14 demonstrou que uma dose de 64 μM do peptídeo foi capaz de reduzir a carga bacteriana em aproximadamente 10^3 CFU.mL^{-1} nos animais tratados, após dois dias da infecção. Esse mesmo modelo foi utilizado previamente para demonstrar a atividade do peptídeo guavanina 2 [10] que apresentou uma redução de aproximadamente 10^3 CFU.mL^{-1} após 4 dias de infecção na menor dose testada ($6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Outro peptídeo que apresentou atividade quando testado em modelo similar a esse foi o EcDBS1R5, esse peptídeo sintético criado por desenho racional de peptídeo, utilizando o algoritmo Joker, e teve uma redução de aproximadamente 10^2 CFU.mL^{-1} após dois dias da infecção [77]. Esses dados demonstram que, assim como os peptídeos guavanina 2 ($\sim 10^3 \text{ CFU.mL}^{-1}$) e EcDBS1R5 ($\sim 10^2 \text{ CFU.mL}^{-1}$), o peptídeo PaDBS1R6 ($\sim 10^3 \text{ CFU.mL}^{-1}$) apresentou atividade antipseudomonas *in vivo*.

Além da possibilidade de uso tópico, utilizamos um modelo de infecção sistêmica, onde a cepa *E. coli* ATCC 8739 foi utilizada para determinar se esse peptídeo também seria efetivo nesse tipo de infecção. Dessa forma, demonstramos que o peptídeo PaDBS1R6 também apresentou uma eficiente redução da carga bacteriana nos animais tratados, reduzindo a carga para aproximadamente 10^4 CFU.mL^{-1} , apresentando resultados similares ao da gentamicina (controle positivo). Outros peptídeos já foram testados nesse modelo, como a Clavanina MO, um peptídeo desenvolvido através de modificações da Clavanina A, que mostrou uma redução da carga bacteriana para menos de 10 CFU.mL^{-1} nos animais contaminados por *E. coli* tratados durante 7 dias [92]. Diferenças entre os experimentos dificultam a comparação, o peptídeo Clavanina MO apresentou uma atividade mais significativa, porém o tratamento foi realizado durante 7 dias, enquanto o experimento realizado com PaDBS1R6 apresentou dose única de tratamento.

Depois de demonstrar as atividades de PaDBS1R6 *in vitro* e *in vivo*, estudos de interação peptídeo – membrana e estrutura do peptídeo foram realizados para tentar determinar a relação entre a sua estrutura e a função. Embora seja conhecido que os PAMs interajam primeiramente com seus alvos através da interação eletrostática com membranas (Figura T1), o mecanismo de ação dessas moléculas

não está totalmente elucidado [93,94]. Técnicas de biofísica são ferramentas úteis para rastrear propriedades físico-químicas essenciais para o mecanismo de ação de PAMs [95]. Dessa forma, para estudar as alterações biofísicas que o peptídeo pode induzir em diferentes tipos de membranas, estudos com vesículas lipídicas também foram realizados [43].

A utilização de modelos que mimetizam membranas biológicas podem fornecer informações importantes sobre as interações de peptídeos interagindo com a membrana [7]. Inicialmente, foram realizados experimentos utilizando vesículas lipídicas, nesse trabalho utilizamos vesículas zwitteriônicas (POPC e POPC:Chol 70:30) e vesículas que mimetizam membranas de bactérias (POPC:POPG 70:30 e POPE:POPG:CL 65:30:05). Percebeu-se, nesse experimento, a preferência de PaDBS1R6 por vesículas constituídas por POPE:POPG:CL (65:30:05), que mimetizam a membrana bacteriana de bactérias Gram-negativas [96,97]. Utilizando dicróismo circular e estudos de potencial zeta, foi possível calcular a constante de afinidade e de partição, confirmando a preferência dessa molécula por vesículas lipídicas de carga negativa contendo cardiolipina (CL). CL é um lipídeo essencial para diversos processos celulares [97,98]. Alguns trabalhos têm demonstrado a relevância desse lipídeo para a atividade de PAMs, dentre eles podemos destacar os peptídeos BP100, cecropina A e pepR [99,100]. Os autores desses trabalhos demonstram que esses peptídeos interagem com CL promovendo o rompimento da membrana bacteriana, liberando assim o conteúdo intracelular e levando a morte celular [99,100].

Para verificar como o peptídeo age em células vivas, uma microscopia de força atômica foi realizada com células de *E. coli* tratadas com PaDBS1R6. Nesse experimento foi possível visualizar a formação de vesículas e do conteúdo intracelular sendo liberados próximos as regiões apicais. Além disso, estudando o diâmetro hidrodinâmico de vesículas lipídicas por DLS, observamos um perfil de agregação em vesículas contendo CL. Dessa forma, além das interações eletrostáticas entre PaDBS1R6 e fosfolipídios carregados negativamente, a presença de CL parece ser também um determinante para a atividade antibacteriana desse PAM [101,102]. Os peptídeos Ctn e Ctn[15-34] também apresentaram ação sobre a membrana causando rompimento na membrana de células de *E. coli* quando estudados por microscopia de força atômica [103]. Esse extravasamento de conteúdo citoplasmático, observado após o tratamento com os peptídeos, parece estar de acordo com um mecanismo

lítico de ação. Esses peptídeos (Ctn e Ctn[15- 34]) também apresentam uma atividade associada a interação com CL [103].

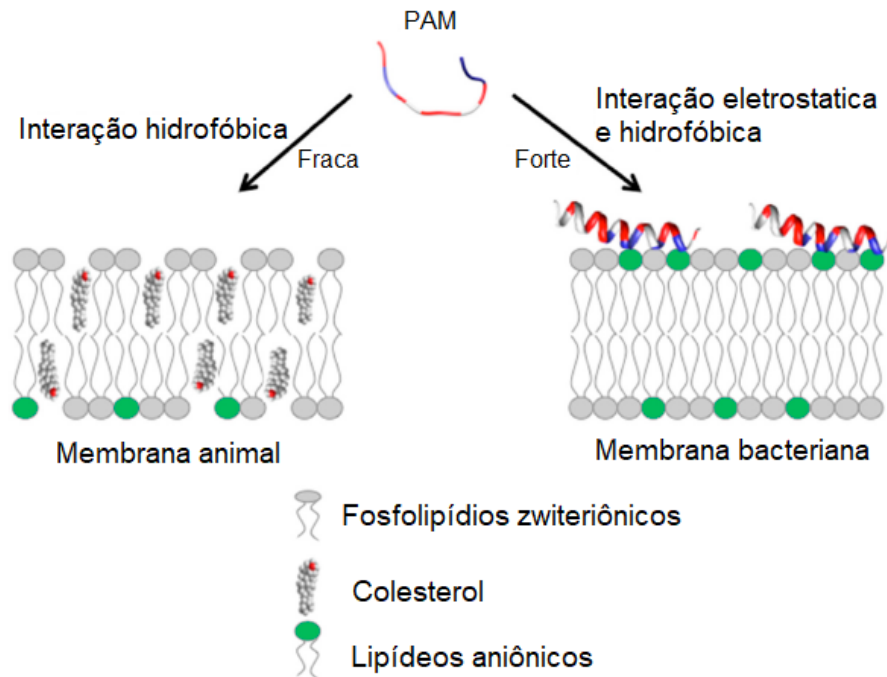
Para tentar entender os mecanismos pelos quais PaDBS1R6 atua na membrana foram estudadas as propriedades de interação peptídeo-membrana nas vesículas lipídicas e nas células vivas de *E. coli* [95,104]. Esses experimentos revelaram que esse PAM modifica o potencial dipolar e a fluidez da membrana em células vivas de *E. coli*, especialmente dentro da membrana interna. Mais uma vez, esses resultados juntamente com a ausência de mudanças significativas nas vesículas sem CL, destacam a necessidade de uma proporção de CL para a melhor atividade do peptídeo. De fato, essa correlação é observada com uma quantidade de 5% de CL nas vesículas e, provavelmente, nas membranas bacterianas.

As células bacterianas Gram-negativas podem ser compostas por 5 – 30 % de CL variando de acordo com a cepa bacteriana e com o estado de crescimento dessa bactéria [97,105] além de possuírem na membrana moléculas de POPG e POPE, enquanto células Gram-positivas apresentam uma variação significativa na composição de suas membranas. As bactérias Gram-positivas possuem outros componentes em suas membranas, que poderiam participar da atividade antimicrobiana de peptídeos, como porinas, lipoproteínas ou ácidos teicóicos [106–108], esse excesso de componentes celulares pode interferir na atividade de PaDBS1R6, sugerindo um motivo para que o peptídeo seja ativo contra Gram-negativa e não tão ativo contra Gram-positivas. PAMs ativos contra bactérias Gram-positivas, normalmente, tem sua atividade por algum tipo de interação com peptidoglicano. Entretanto peptídeos ativos contra Gram-negativas tem suas atividades relacionadas a interação com a membrana celular. Como bactérias Gram-positivas tem uma parede celular antes da membrana plasmática, muitos desses peptídeos não conseguem alcançar a membrana dessas células com tanta eficiência quando comparada a interação com a membrana de Gram-negativas [109,110]. Como dito anteriormente, as membranas bacterianas de células Gram-positivas contêm uma grande quantidade de lipídeos carregados negativamente (PG e CL), mas também apresentam um derivado carregado positivamente de PG, Lisil-PG, onde um resíduo de lisina é ligado ao PG. Ao contrário das membranas de Gram-positivas, as de Gram-negativas são altamente enriquecidas em PE, possuindo uma quantidade significativa de lipídeos carregados negativamente [107,111]. Tem sido sugerido que existem domínios ricos em CL nas membranas de células Gram-negativas e peptídeos

antimicrobianos catiônicos podem perturbar a permeabilidade da bicamada induzindo a separação de fases em membranas contendo PE e CL [111,112]. Um trabalho realizado com Colestina mostrou que essa molécula pode induzir a heterogeneidade lateral da membrana por agrupamento de lipídeos aniônicos na presença de alto conteúdo de PE, como na membrana de Gram-negativas, mas não é capaz de agir em baixo conteúdo de PE, como em Gram-positivas [111]. Além disso, quando a CL está presente nas vesículas lipídicas, ela não está concentrada em nenhuma região específica do lipossoma, ao contrário do que é encontrado nas células bacterianas [97,98,113].

A diferença entre a membrana bacteriana e a membrana de células eucarióticas, também é relevante, já que pode ser um dos motivos do peptídeo PaAMP1R6 apresentar atividade antibacteriana, mas não apresentar atividade hemolítica. A figura T3 foi desenvolvida por Kumar (2018) e representa a composição de membranas animais e bacterianas, pode-se visualizar que compostos aniônicos estão presentes tanto na parte interna quanto externa das membranas bactérias. A membrana externa da bicamada bacteriana é composta principalmente por lipídeos carregados negativamente como PG e CL, enquanto a membrana externa das células de eucariotos é composta por fosfolipídios zwitteriônicos, como PC e esfingomiéline e compostos neutros como colesterol. Dessa forma, PAM carregados positivamente podem apresentar fortes interações eletrostáticas com lipídeos de membranas bacterianas, carregados negativamente [41].

Figura T3. Interação de peptídeo antimicrobiano com membranas de células de animais (direita) e células bacterianas (esquerda). *Adaptado de Kumar (2018).



De acordo com os resultados mostrados, podemos inferir que o peptídeo PaDBS1R6 pode atravessar a membrana externa das células de bactérias Gram-negativas e promover a desestabilização da membrana interna, levando assim a ruptura da membrana e conseqüentemente a morte celular. Dessa forma, CL, e outros componentes da membrana, podem estar contribuindo para a ação do peptídeo, no entanto é importante considerar as propriedades do próprio peptídeo que podem ser essenciais para a atividade antibacteriana. A carga global positiva e o alto conteúdo hidrofóbico são características típicas dessa classe de moléculas, mas sua estrutura antes e após interação com membranas ou células bacterianas pode determinar sua afinidade por membranas [80,114,115].

A membrana celular é composta principalmente por fosfolípidios, que são compostos por um grupo hidrofílico, a cabeça do fosfolípido, e cadeias hidrofóbicas formando as caudas, essa característica permite a formação de lipossomas ou da bicamada de membrana em condições aquosas. Os PAM interagem com os fosfolípidios de membrana principalmente através de forças eletrostáticas ou hidrofóbicas responsáveis pela formação das estruturas secundárias em α -hélice ou folha- β [116]. O estudo inicial da estrutura de PaDBS1R6 confirmou a tendência do peptídeo de adotar uma conformação helicoidal em meio hidrofóbico, mas uma

estrutura em *random coil* em meios aquosos. Peptídeo em estrutura de α -hélice são comuns na natureza. Como citado acima, as vesículas lipídicas promovem o arranjo peptídico em estrutura helicoidal, com o grau de helicidade correlacionado à afinidade do peptídeo pelas membranas, por exemplo, mais estruturas helicoidais foram observadas para as vesículas lipídicas mais próximas das membranas bacterianas.

As interações e os comportamentos já foram previamente descritas para PAMs altamente anfipáticos, que possuem uma estrutura bem definida após interação com membranas, demonstrando também que outras propriedades físico-químicas também desempenham um papel fundamental na flexibilidade de conformação e, portanto, atividade antimicrobiana do peptídeo [117–119]. Esses peptídeos estão, geralmente, não estruturados (*random coil*) em um solvente aquoso, apenas na presença de membranas, eles se dobras em α -hélices anfipáticas. Quando o PAM entra em contato com a membrana carregada negativamente, ele se liga à sua superfície através da face polar da estrutura, formando a α -hélice [120,121]. Cardoso e colaboradores (2018), descreveram um peptídeo também desenvolvido pelo algoritmo Joker, EcAMP1R5. Nesse trabalho eles associaram a atividade do peptídeo à interação dos aminoácidos catiônicos (Lys3, Lys6, Lys14 e Arg10) com os lipídeos aniônicos da membrana bacteriana, sendo essa interação responsável pela transição da estrutura de *random coil* para α -hélice [77].

O peptídeo BP 100 e seus análogos ganham estrutura depois de interagir com lipossomas, especialmente os carregados negativamente [78]. A guavanina 2, outro peptídeo sintético, também é estabilizada após interação com as membranas, essa estabilidade provavelmente contribui para sua função biológica [10]. O peptídeo PaDBS1R1 também apresenta estrutura definida como α -hélice após interação com a membrana lipídica [45]. Os PAMs apresentam uma composição diversificada de aminoácidos em suas sequências peptídicas, essa organização de aminoácidos foi inicialmente foco de investigação de pesquisadores para descobrir como os PAMs funcionam [40]. Porém, tem sido verificado que a atividade antimicrobiana dessas moléculas não depende de sequências específicas de aminoácidos, mas sim de sua composição geral (básico, ácidos, alifáticos ou aromáticos) e das suas características físico-químicas [60,122].

As características físico-químicas são intrínsecas a aminoácidos específicos e alterações sutis podem levar a diferenças funcionais importantes, afetando a capacidade desses peptídeos de matar microrganismos ou alterando seu perfil de

toxicidade [40]. A carga líquida também era considerada o parâmetro primordial para explicar a atividade biológica dos PAM [123], porém, diversos trabalhos vem mostrando que a anfipaticidade é um requisito importante para a atividade biológica de PAM catiônicos que se estruturam em α -hélice [121,124]. Hollmann e colaboradores (2017), fizeram alterações na estrutura de um peptídeo modelo que possui estrutura em α -hélice, essas alterações focaram na mudança da anfipaticidade dessa molécula. Esses pesquisadores substituíram duas lisinas, uma por tirosina e outra por leucina [125,126]. Essas novas sequências apresentavam atividade muito diferentes em membranas. Um desses peptídeos exibia uma face hidrofóbica continua e uma face hidrofílica rompida, essas características impediram que o peptídeo apresentasse atividade antimicrobiana e induziu a atividade hemolítica [126]. Substituições de aminoácidos desse peptídeo, transformando-o em antipático, essas mudanças geraram um aumento da atividade antimicrobiana e reduziram consideravelmente a atividade hemolítica [125,126]. Dessa forma, esses experimentos demonstraram que o peptídeo PaDBS1R6 sai de uma conformação aleatória (*random coil*) para conformação de α -hélice quando em contato com lipídeos carregados negativamente, sendo essa mudança fundamental para a atividade antimicrobiana do peptídeo.

Outros trabalhos também relatam exemplos de PAMs que perdem sua estrutura secundária após interação com membranas, sem necessariamente perder sua atividade biológica. O peptídeo rBPI21 exibiu uma estrutura secundária bem definida em folha- β e α -hélices quando em tampão, perdendo-a após interação com membranas, porém, nesse caso, a desestabilização da estrutura permitiu a inserção do peptídeo dentro das membranas alvo, contribuindo assim para sua função [127]. A diferença na sequência entre PaDBS1R6 e rBPI21 é responsável pela alteração na atividade dessas moléculas, já que a interação dos aminoácidos polares de PaDBS1R6 com a membrana bacteriana depende de um rearranjo de sua conformação, formando a α -hélice, enquanto rBPI21 não apresenta essa alteração na estrutura.

A maioria dos nossos conhecimentos do modo de ação dos PAMs vem do estudo biofísico em membranas modelos. Nos últimos anos, algumas técnicas tipicamente aplicadas a membranas modelos passaram a ser aplicadas em bactérias, como potencial zeta e abordagens fluorescentes [121]. Em 2010, um artigo publicado utilizando os peptídeos BP100 e pepR mostrou a correlação entre a susceptibilidade

antimicrobiana e a neutralização da carga superficial bacteriana utilizando potencial zeta em *E. coli*. Outras informações sobre o mecanismo de ação contra *E. coli* desses peptídeos foram possíveis utilizando imagens por microscopia de força atômica [99]. Em 2015, Malgieri e colaboradores publicaram um trabalho utilizando um análogo da temporina 1b, explorando a interação dessa molécula com células Gram-negativas. Para isso eles utilizaram dicroísmo circular para obter informações sobre a estrutura secundária que esse peptídeo apresentava quando em contato com as células bacterianas, demonstrando que essa técnica é adequada para estudo da interação peptídeo com células de *E. coli*. Nesse trabalho, RNM também foi utilizada para estudos estruturais da interação desse peptídeo com membrana [128].

Técnicas de RNM no estado sólido são frequentemente usadas para caracterizar interações entre peptídeo e membrana [129]. No presente trabalho, para entender o que acontece com a estrutura de PaDBS1R6 quando o peptídeo interage com as membranas, estudos estruturais de RMN foram realizados na presença de micelas de DPC, demonstrando que PaDBS1R6 tem uma estrutura anfipática, com carga líquida altamente catiônica, com os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos dispostos em um lado da estrutura α -helicoidal. Esses resultados indicam que, uma vez ocorridas interações eletrostáticas, o rearranjo cuidadoso dos resíduos é o que permite que o peptídeo se insira na membrana. Outros peptídeos também tiveram sua estrutura desvendada por RNM, além da demonstração do seu possível mecanismo de ação. Por exemplo, os peptídeos maculatina 1.1 e caerina 1.1, peptídeos isolados da secreção de rãs australianas. Os dois peptídeos formam α -hélices longas o suficiente para atravessar a bicamada lipídica. Enquanto maculatina 1.1 apresentou atividade contra *S. aureus*, caerina 1.1 apresentou atividade contra *E. coli*. Os dois peptídeos tiveram sua interação com as membranas de respectivas bactérias analisadas por RNM [116].

5 CONCLUSÃO

Em resumo, os resultados apresentados indicam que, na presença de vesículas compostas de membrana semelhante a bactérias, a conformação do peptídeo muda de *random coil* para α -hélice. Nosso trabalho mostra que durante a interação peptídeo-membrana, PaDBS1R6 é estruturado em uma α -hélice anfipática, que se liga primeiramente às interfaces da membrana por interações eletrostáticas entre o peptídeo catiônico e os grupos aniônicos de lipídios na membrana e segundo por interações hidrofóbicas entre a face hidrofóbica do peptídeo e da membrana [130]. Essa mudança de conformação provou ser fortemente dependente da natureza da bicamada lipídica, já que o peptídeo sofreu alteração da sua estrutura apenas quando em contato com membranas aniônicas. Além disso, nós demonstramos a seletividade dessa molécula contra bactérias Gram-negativas *in vitro* e *in vivo* em dois modelos de infecção diferentes. Notavelmente, os estudos não clínicos aqui realizados mostraram que o PaDBS1R6 é seguro e bem tolerado para aplicação tópica na concentração clínica pretendida. Os achados apresentados nesta tese sugerem que o PaDBS1R6, um peptídeo criado por desenho racional de peptídeos, utilizando o algoritmo Joker, é um PAM seletivo para bactérias Gram-negativas. Esses dados demonstraram uma eficácia pré-clínica e perfil de segurança promissores, motivando a pesquisa para que esse peptídeo seja um candidato a fármacos para o tratamento local de condições infecciosas.

Porém, estudos com essas moléculas ainda são necessários para tentar compreender o mecanismo de ação preciso. Outros dados de farmacocinética e farmacodinâmica também podem ser estudados para melhor compreender a forma de ação e utilização desse tipo de molécula. Além disso, esse peptídeo serviu para demonstrar que a utilização de métodos de desenho racional de peptídeos é benéfica por diminuir o custo da purificação de moléculas naturais, além de pré-selecionar os candidatos mais prováveis a apresentar atividade antimicrobiana. Dessa forma, o desenho de novos compostos é importante para que novos medicamentos que visem o tratamento de bactérias multirresistentes possam ser produzidos.

6 OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

Durante o doutorado realizei o aperfeiçoamento de diversos conhecimentos. Um deles foi a padronização de metodologias *in vivo*, principalmente infecção cutânea e infecção sistêmica em camundongos. Esse conhecimento foi bastante útil para diversas colaborações. Além disso, aprendi a metodologia de *checkerboard* para determinação de interação entre moléculas. Utilizamos essa metodologia para verificar se há interação entre antibióticos, entre antibióticos e peptídeos ou entre peptídeos. Outra grande contribuição que aperfeiçoei durante o doutorado foi a co-orientação de alunos de iniciação científica. Durante o doutorado co-orientei 6 alunos de iniciação científica que me auxiliaram no desenvolvimento dos trabalhos além de realizarem seus próprios projetos depois de treinados. Outra metodologia que utilizei muito durante o doutorado foi a concentração inibitória mínima (MIC) e devido a prática e praticidade da metodologia consegui realizar essa metodologia com diversas amostras e bactérias ao mesmo tempo. Todos esses conhecimentos e metodologias foram úteis para colaborações e participações nos artigos listados abaixo. No artigo de Irazazabal e colaboradores (2019), minha colaboração se deu em torno do apoio a realização dos MICs, nesse artigo, o peptídeo PaDBS1R1, desenhado pelo algoritmo Joker apresentou os melhores MICs entre os peptídeos com os quais já trabalhei, variando de 1,5 μM contra bactérias Gram-negativas ATCC e 3 μM contra bactérias Gram-positivas, seu MIC mais alto foi contra *Enterococcus faecalis* (50 μM) (IRAZAZABAL *et al.*, 2016). Já no artigo de Porto e colaboradores (2018), minha colaboração também girou em torno da realização dos MICs do peptídeo Guavanina 2 (PORTO, WILLIAM F. *et al.*, 2018). Esse peptídeo apresentou seus melhores MICs contra as bactérias *E. coli* ATCC 25922 (6,25 μM) e *A. baumannii* ATCC 19606 (6,25 μM) e seus MICs mais altos contra as bactérias *S. aureus* ATCC 25923 (100 μM) e *E. faecalis* ATCC 29212 (>100 μM). No artigo de Porto e colaboradores (2018), onde o algoritmo Joker foi descrito, a realização dos MICs contra *E. coli* ATCC 25922 dos peptídeos EcDBS1R4 (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), EcDBS1R8 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), PaDBS1R5 (8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), PaDBS1R6 (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) PcDBS1R1 (64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e PyDBS1R8 (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e contra *S. aureus* (dos peptídeos EcDBS1R4 (>256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), EcDBS1R8 (>256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), PaDBS1R5 (64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), PaDBS1R6 (128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), PcDBS1R1 (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e PyDBS1R8 (64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)) foi feita por mim, sendo essa minha colaboração para o trabalho (PORTO, WILLIAM F. W.F. *et al.*, 2018). Silva e colaboradores (2017),

demonstraram a atividade de um peptídeo chamado Polybia-MPII, da classe dos mastoparanos. Nesse artigo, minha colaboração se deu pela realização do MIC desse peptídeo contra *S. aureus* (EC 90 de 2,9) e do ensaio de atividade *in vivo* em modelo de ferida cutânea, em que o peptídeo conseguiu reduzir a carga bacteriana ($\sim 10^2$ CFU.mL⁻¹) após 6 dias de uso tópico (5 mg.kg⁻¹) (SILVA, JULIANA C. *et al.*, 2017). No artigo de Uppu e colaboradores (2017), minha participação se deu pelo teste de checkboard realizado entre o peptídeo Qn- prAP e a tetraciclina *in vitro* e *in vivo*. O modelo *in vivo* utilizado foi o de ferida utilizando *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmico e a tetraciclina. Nesse modelo, a associação do polímero com o antibiótico foi capaz de reduzir a carga bacteriana com a mesma eficiência do controle positivo composto por colestina (UPPU *et al.*, 2017). No trabalho de Oliveira e colaboradores (2017), a citritina, um composto isolado e purificado, a partir do fungo *Penicillium citrinum*, e caracterizado no artigo teve sua atividade antimicrobiana realizada no trabalho, juntamente com a atividade sinérgica com antibióticos de relevância clínica (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Nesse artigo, o ensaio *in vivo* foi realizado utilizando o modelo de infecção sistêmica utilizando *S. aureus* resistente a meticilina (9,8 mg.kg⁻¹ de cefoxitina com 0,2 mg.kg⁻¹ de citrinina) e *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (23,5 mg.kg⁻¹ de citrinina com 1,5 mg.kg⁻¹ de vancomicina). Silva e colaboradores (2016) apresentou um trabalho realizando a caracterização de um peptídeo previamente descoberto, a clavanina A (SILVA, O.N.; ALVES; *et al.*, 2016). Nesse artigo, minha colaboração se deu pela realização dos MICs do peptídeo contra *S. aureus* resistente a meticilina (>64 µg.mL⁻¹) e contra *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos (>64 µg.mL⁻¹). No mesmo ano, Silva e colaboradores (2016) realizaram modificações estruturais na clavanina A, criando a clavanina MO e publicaram o artigo com as características dessa nova molécula (SILVA, O.N.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; *et al.*, 2016). Nesse artigo, o peptídeo apresentou seu melhor MIC contra *Bacillus subtilis* ATCC6633 (1,5 µM) e *E. faecalis* ATCC12953 (1,5 µM), sendo esses resultados 4 vezes mais baixos quando comparados com os resultados do peptídeo modelo (clavanina A). Seu MIC mais alto foi contra *S. aureus* ATCC29213 (24 µM), e ainda conseguiu ser 2 vezes menor que o MIC do peptídeo modelo. Além disso, a caracterização das propriedades imunomodulatórias dessa molécula também foi caracterizada *in vitro*, esses resultados demonstraram que o peptídeo apresentou uma característica anti-inflamatória, por aumentar a produção de IL-10 e reduzir a produção de TNF-α. Nesse artigo a atividade *in vivo* desse peptídeo também foi

testada em modelo de infecção sistêmica e o peptídeo apresentou uma taxa de sobrevivência 20 % maior que o peptídeo modelo.

Durante a iniciação científica eu participei da purificação e caracterização de alguns peptídeos da classe dos ciclotídeos, Um dos peptídeos extraídos a partir dessa planta foi a parigidin-br3 que foi caracterizada por Pinto e colaboradores (2016) (PINTO *et al.*, 2016). Além do auxílio, durante a iniciação científica, na padronização da metodologia que possibilitou a extração desse peptídeo, nesse artigo eu contribuí nos ensaios de atividade antitumoral usando cultura de células, nesse caso, as células utilizadas foram CACO2 (IC50 de 2,5 μM) e MCF-7 (IC50 de 2,5 μM).

Durante o doutorado também participei na publicação do artigo com os dados do meu mestrado (FENSTERSEIFER *et al.*, 2015). Nesse artigo, os ciclotídeos cycloviolacina 2 e kalata B2 foram testados contra *S. aureus in vitro* (cycloviolacina O2 – 25 μM ; kalata B2 50 μM); e *in vivo*, em modelo de infecção cutânea, onde animais tratados com 3 mg kg⁻¹ de cycloviolacin 2 ou kalata B2 apresentaram uma redução da carga bacteriana em $\sim 10^2$. Outro artigo com dados de experimentos realizados durante o mestrado saiu no ano de 2015. Esse artigo foi realizado em colaboração com pesquisadores da Austrália, e teve como objetivo caracterizar 10 peptídeos. Suas atividades *in vivo* foram testadas utilizando o modelo de infecção cutânea. Todos os peptídeos apresentaram alguma atividade, porém o melhor deles foi pYR (3 mg.kg⁻¹) que foi capaz de reduzir a carga bacteriana de forma similar ao controle positivo (MALIK *et al.*, 2015). Silva e colaboradores (2015), demonstraram a atividade do peptídeo clavanina A, minha colaboração para essa publicação foi o auxílio na realização dos ensaios *in vivo*. Nesse artigo, o peptídeo foi testado tanto em modelo de infecção cutânea contra *S. aureus*, onde apresentou uma atividade similar à do controle positivo quando na maior concentração, como em modelo de infecção sistêmica contra *S. aureus* e *E. coli* que apresentou contra as duas bactérias um aumento de sobrevivência quando comparado com o controle negativo (SILVA, OSMAR N *et al.*, 2015). Mandal e colaboradores publicaram em 2014 um artigo onde inibidores de β -lactamase foram desenhados, sintetizados e testados. Esse artigo demonstrou que esses peptídeos foram capazes de melhorar a atividade de antibióticos quando testados *in vivo* contra bactérias resistentes (MANDAL *et al.*, 2014)..



2019:

BBA - Biomembranes 1861 (2019) 178–190

Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Biomembranes

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem

Fast and potent bactericidal membrane lytic activity of PaDBS1R1, a novel cationic antimicrobial peptide



Luz N. Irazazabal^{a,b}, William F. Porto^{b,h,i}, Isabel C.M. Fensterseifer^{a,b}, Eliane S.F. Alves^{c,d}, Carolina O. Matos^c, Antônio C.S. Menezes^d, Mário R. Felício^e, Sônia Gonçalves^e, Nuno C. Santos^e, Suzana M. Ribeiro^{h,j}, Vincent Humblot^f, Luciano M. Liao^c, Ali Ladram^g, Octavio L. Franco^{b,h,*}

^a Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil

^b Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil

^c Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74690-900, Brazil

^d Universidade Estadual de Goiás, Unuocet, Anápolis, GO 75132-903, Brazil

^e Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Av. Professor Egas Moniz, 1649-028 Lisboa, Portugal

^f Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface, IRS, F-75252 Paris, France

^g Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Saclay, IBPS, BIOOPE, F-75252 Paris, France

^h S-Inova Biotech, Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil

ⁱ Porto Reports, Brasília, DF, Brazil

^j Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

2018:



ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-018-03746-3

OPEN

In silico optimization of a guava antimicrobial peptide enables combinatorial exploration for peptide design

William F. Porto^{1,2,3}, Luz Irazazabal^{1,4}, Eliane S.F. Alves⁴, Suzana M. Ribeiro², Carolina O. Matos⁵, Allan S. Pires¹, Isabel C.M. Fensterseifer^{1,4}, Vivian J. Miranda¹, Evan F. Haney⁶, Vincent Humblot⁷, Marcelo D.T. Torres^{8,9,10}, Robert E.W. Hancock⁶, Luciano M. Liao⁵, Ali Ladram¹¹, Timothy K. Lu^{8,9}, Cesar de la Fuente-Nunez^{8,9} & Octavio L. Franco^{1,2,4}

BBA - General Subjects xxx (2018) xxx-xxx

Contents lists available at ScienceDirect

BBA - General Subjects

journal homepage: www.elsevier.com




Joker: An algorithm to insert patterns into sequences for designing antimicrobial peptides antimicrobial peptides

William F. Porto^{a, b, c, *}, Isabel C.M. Fensterseifer^{c, d}, Suzana M. Ribeiro^a, Octavio L. Franco^{a, c, d, *}

^a S-Inova Biotech, Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil

^b Porto Reports, Brasília, DF, Brazil

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

^d Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

2017:



- 1 Evaluation of the antimicrobial activity of the mastoparan
 2 Polybia-MPII isolated from venom of the social wasp *Pseudopolybia*
 3 *vespiceps testacea* (Vespidae, Hymenoptera)
 4 Juliana C. Silva ^a, Lázaro M. Neto ^b, Rogério C. Neves ^b, Jaqueline C. Gonçalves ^a,
 5 Monalisa M. Trentini ^b, Ricardo Mucury-Filho ^c, Karina S. Smidt ^c, Isabel C. Fensterseifer ^{d,e},
 6 Osmar N. Silva ^{d,f}, Lilian D. Lima ^g, Patricia B. Clissa ^g, Nathália Vilela ^c,
 7 Fernanda Guilhelmelli ^c, Luciano P. Silva ^{a,h}, Marisa Rangel ^{a,g}, André Kipnis ^b,
 8 Ildinete Silva-Pereira ^c, Octavio L. Franco ^{d,e,f,i}, Ana P. Junqueira-Kipnis ^b,
 9 Anamelia L. Bocca ^c, Márcia R. Mortari ^{a,*}
 10
 11 ^a Department of Physiological Sciences, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil
 12 ^b Department of Microbiology, Immunology, Parasitology and Pathology, Institute of Tropical Diseases and Public Health, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil
 13 ^c Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Brazil
 14 ^d Center for Proteomics and Biochemical Analyses, Genomic Science and Biotechnology Graduate Program, Catholic University of Brasília, Brasília, Brazil
 15 ^e Molecular Pathology Graduate Program, University of Brasília, Brasília, Brazil
 16 ^f Department of Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil
 17 ^g Laboratory of Immunopathology, Butantan Institute, São Paulo, SP, Brazil
 18 ^h Laboratory of Mass Spectrometry, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, Brazil
 19 ⁱ S-Inova Biotech, Graduate Biotechnology Program, Dom Bosco Catholic University, Campo Grande, Brazil
 ~



RESEARCH ARTICLE

Membrane-active macromolecules kill antibiotic-tolerant bacteria and potentiate antibiotics towards Gram-negative bacteria

Divakara S. S. M. Uppu^{1*}, Mohini M. Konai¹, Paramita Sarkar¹, Sandip Samaddar¹, Isabel C. M. Fensterseifer^{2,3}, Celso Farias-Junior⁴, Paramanandam Krishnamoorthy⁵, Bibek R. Shome⁶, Octávio L. Franco^{2,3,6}, Jayanta Halda^{1*}

1 Chemical Biology & Medicinal Chemistry Laboratory, New Chemistry Unit, Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research (JNCASR), Bangalore, Karnataka, India, **2** Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia UC, Brasília, Brazil, **3** Molecular Pathology Post-Graduate Program, University of Brasília, Brasília, Brazil, **4** Lacen, Laboratório Central, Brasília, DF, Brazil, **5** ICAR-National Institute of Veterinary Epidemiology and Disease Informatics (NIVEDI), Bengaluru, Karnataka, India, **6** S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Brazil

* Current address: Infectious Diseases Interdisciplinary Research Group (ID-IRG), Singapore-MIT Alliance for Research and Technology (SMART), Singapore
 * jayanta@incasr.ac.in



MICROBIOLOGY

RESEARCH ARTICLE

Oliveira et al., *Microbiology* 2017;163:1525–1531
 DOI 10.1099/mic.0.000547



Purified citritin in combination with vancomycin inhibits VRE *in vitro* and *in vivo*

Kléber de Sousa Oliveira,¹ Paulo Roberto Martins Queiroz,² Isabel Cristina Marques Fensterseifer,^{1,3} Ludovico Migliolo,^{1,4} Aline Lima Oliveira⁵ and Octávio Luiz Franco^{1,4,*}

2016:

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities

Received: 29 June 2016
Accepted: 30 September 2016
Published: 02 November 2016

O. N. Silva^{1,2,*}, C. de la Fuente-Núñez^{3,4,5,6,7,8,*}, E. F. Haney^{9,*}, I. C. M. Fensterseifer^{10,11}, S. M. Ribeiro², W. F. Porto¹¹, P. Brown¹², C. Faria-Junior¹⁴, T. M. B. Rezende^{10,14,15}, S. E. Moreno², T. K. Lu^{3,4,5,6,7,8}, R. E. W. Hancock⁹ & O. L. Franco^{1,2,10,11}

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Structural Studies of a Lipid-Binding Peptide from Tunicate Hemocytes with Anti-Biofilm Activity

Received: 19 June 2015
Accepted: 13 May 2016
Published: 13 June 2016

Osmar N. Silva^{1,2}, Eliane S. F. Alves³, César de la Fuente-Núñez⁴, Suzana M. Ribeiro², Santi M. Mandal⁵, Diana Gaspar⁶, Ana S. Veiga⁶, Miguel A. R. B. Castanho⁶, Cesar A. S. Andrade⁷, Jessica M. Nascimento⁷, Isabel C. M. Fensterseifer², William F. Porto², Jose R. Correa⁸, Robert. E. W. Hancock⁴, Suresh Korpole⁵, Aline L. Oliveira^{3,9}, Luciano M. Liao³ & Octavio L. Franco^{1,2,10}

JOURNAL OF
NATURAL
PRODUCTS

Article
pubs.acs.org/jnp

Characterization of a Bioactive Acyclotide from *Palicourea rigida*

Michelle F. S. Pinto,^{†,‡} Osmar N. Silva,[§] Juliane C. Viana,^{†,⊥} William F. Porto,[†] Ludovico Migliolo,[§] Nicolau B. da Cunha,[†] Nelson Gomes, Jr.,^{†,¶} Isabel C. M. Fensterseifer,^{†,¶} Michelle L. Colgrave,^{||} David J. Craik,[#] Simoni C. Dias,[†] and Octavio L. Franco^{‡,¶,§}

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

[‡]Faculdade Anhanguera de Ciências e Tecnologia de Brasília, Brasília-DF, Brazil


[§]S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande-MS, Brazil

[⊥]Universidade CEUMA, Laboratório de Biotecnologia, São Luís-MA, Brazil

^{||}CSIRO Agriculture and Food, 306 Carmody Road, St Lucia, Queensland 4067, Australia

[#]Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, Brisbane, Queensland 4072, Australia

[¶]Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade De Brasília, Brasília-DF, Brazil

 Supporting Information

2015:

Peptides 63 (2015) 38–42



Contents lists available at ScienceDirect

Peptides

journal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Effects of cyclotides against cutaneous infections caused by *Staphylococcus aureus*



Isabel C.M. Fensterseifer^{a,b}, Osmar N. Silva^{a,c}, Uru Malik^d, Anjaneya S. Ravipati^d,
Natasha R.F. Novaes^a, Paulo R.R. Miranda^a, Elaine A. Rodrigues^a, Susana E. Moreno^a,
David J. Craik^d, Octavio L. Franco^{a,b,c,e,*}

^a Centro de Análises, Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, 70790-160 Brazil

^b Molecular Pathology Post-graduate Program, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil

^c Department of Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, MG, Brazil

^d Institute for Molecular Bioscience, the University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia

^e S-Inova, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Caampo Grande, MS, Brazil



In Vivo Efficacy of Anuran Trypsin Inhibitory Peptides against Staphylococcal Skin Infection and the Impact of Peptide Cyclization

U. Malik,^a O. N. Silva,^b I. C. M. Fensterseifer,^b L. Y. Chan,^a R. J. Clark,^{a,c} O. L. Franco,^{b,e} N. L. Daly,^{a,d} D. J. Craik^a

Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, Brisbane, Australia^a; Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil^b; School of Biomedical Sciences, The University of Queensland, Brisbane, Australia^c; Australian Institute of Tropical Health and Medicine, Centre for Biodescovery and Molecular Development of Therapeutics, James Cook University, Cairns, Australia^d; S-Inova, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil^e



Clavanin A Improves Outcome of Complications from Different Bacterial Infections

Osmar N. Silva,^a Isabel C. M. Fensterseifer,^{b,c} Elaine A. Rodrigues,^c Hortência H. S. Holanda,^c Natasha R. F. Novaes,^c
Junia P. A. Cunha,^c Taia M. B. Rezende,^{c,d} Kelly G. Magalhães,^e Susana E. Moreno,^c Márcio S. Jerônimo,^f Anamélia L. Bocca,^f
Octavio L. Franco^{a,b,c,g}

Department of Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil^a; Molecular Pathology Post-Graduate Program, University of Brasilia, Brasilia, Distrito Federal, Brazil^b; Centro de Análises, Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil^c; Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil^d; Laboratory of Immunology and Inflammation, Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasília, Distrito Federal, Brazil^e; Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia, Brasília, Distrito Federal, Brazil^f; S-Inova, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Matto Grosso do Sul, Brazil^g

DOW

2014:**SCIENTIFIC
REPORTS****OPEN**SUBJECT AREAS:
PEPTIDE DELIVERY
PEPTIDESReceived
9 April 2014Accepted
22 July 2014Published
11 August 2014

Controlling resistant bacteria with a novel class of β -lactamase inhibitor peptides: from rational design to *in vivo* analyses

Santi M. Mandal^{1*}, Ludovico Migliolo^{2,3*}, Osmar N. Silva^{2*}, Isabel C. M. Fensterseifer²,
Celio Faria-Junior⁴, Simoni C. Dias², Amit Basak¹, Tapas K. Hazra⁵ & Octávio L. Franco^{2,3}

¹Central Research Facility, Department of Chemistry, Indian Institute of Technology Kharagpur, Kharagpur 721302, WB, India, ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Centro de Análises, Proteômicas e Bioquímicas, Universidade Católica de Brasília, Brazil, ³Pos-Graduacao em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil, ⁴Lacen, Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal, Brasília, DF, Brazil, ⁵Department of Internal Medicine, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555, USA.

REFERÊNCIAS

- [1] É.M. Watanabe, V.F. Almeida, A.F. Ottunes, E.M. Dessunti, F.M. Pieri, E.A.P. Martins, G. Kerbaui, Impacto das infecções relacionadas à assistência à saúde em pacientes acometidos por trauma, *Semin. Ciências Biológicas e Da Saúde*. 36 (2015) 89–98. doi:10.5433/1679-0367.2014v35n2p89.
- [2] M. Cardoso, T. Sinésio, M. Cristina Da, S. Magro, T.A. Carneiro, K.G. Nunes Da Silva, FATORES DE RISCO ÀS INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA*, 2 (2018) 53826. doi:10.5380/ce.v23i2.53826.
- [3] S. Santajit, N. Indrawattana, Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens, *Biomed Res. Int.* 2016 (2016) 1–8. doi:10.1155/2016/2475067.
- [4] WHO, WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed, News Release. (2017). <http://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed August 17, 2018).
- [5] O.N. Silva, K.C.L. Mulder, A.E.A.D. Barbosa, A.J. Otero-Gonzalez, C. Lopez-Abarrategui, T.M.B. Rezende, S.C. Dias, O.L. Franco, Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications., *Front. Microbiol.* 2 (2011) 232. doi:10.3389/fmicb.2011.00232.
- [6] C. de la Fuente-Núñez, O.N. Silva, T.K. Lu, O.L. Franco, Antimicrobial peptides: Role in human disease and potential as immunotherapies, *Pharmacol. Ther.* 178 (2017) 132–140. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2017.04.002.
- [7] M.R. Felício, O.N. Silva, S. Gonçalves, N.C. Santos, O.L. Franco, Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities, *Front. Chem.* 5 (2017) 5. doi:10.3389/fchem.2017.00005.
- [8] N.Y. Yount, M.R. Yeaman, Multidimensional signatures in antimicrobial peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 7363–8. doi:10.1073/pnas.0401567101.
- [9] M. Mahlapuu, J. Håkansson, L. Ringstad, C. Björn, Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6 (2016). doi:10.3389/fcimb.2016.00194.
- [10] W.F. Porto, L. Irazazabal, E.S.F. Alves, S.M. Ribeiro, C.O. Matos, Á.S. Pires, I.C.M. Fensterseifer, V.J. Miranda, E.F. Haney, V. Humblot, M.D.T. Torres, R.E.W. Hancock, L.M. Liao, A. Ladram, T.K. Lu, C. de la Fuente-Nunez, O.L. Franco, In silico optimization of a guava antimicrobial peptide enables combinatorial exploration for peptide design, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1490. doi:10.1038/s41467-018-03746-3.
- [11] W.F. Porto, O.N. Silva, O.L. Franco, Prediction and Rational Design of Antimicrobial Peptides, in: *Protein Struct.*, InTech, 2012. doi:10.5772/38023.
- [12] H. Sax, L. Clack, S. Touveneau, F. da L. Jantarada, D. Pittet, W. Zingg, Implementation of infection control best practice in intensive care units throughout Europe: a mixed-method evaluation study, *Implement. Sci.* 8 (2013) 24. doi:10.1186/1748-5908-8-24.
- [13] H.A. Khan, A. Ahmad, R. Mehboob, Nosocomial infections and their control strategies, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5 (2015) 509–514. doi:10.1016/J.APJTB.2015.05.001.

- [14] S.H. MacVane, Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit, *J. Intensive Care Med.* 32 (2017) 25–37. doi:10.1177/0885066615619895.
- [15] A.N. de V.S. ANVISA, PROGRAMA NACIONAL DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (2016-2020), Brasília, 2016. <http://ameci.org.br/wp-content/uploads/2018/04/PNPCIRAS-2016-2020.pdf> (accessed December 13, 2018).
- [16] L.L. dos S. Barros, C. do S.F. Maia, M.C. Monteiro, L.L. dos S. Barros, C. do S.F. Maia, M.C. Monteiro, Fatores de risco associados ao agravamento de sepse em pacientes em Unidade de Terapia Intensiva, *Cad. Saúde Coletiva.* 24 (2016) 388–396. doi:10.1590/1414-462x201600040091.
- [17] R.F. Rampelotto, Avaliação de hemoculturas positivas de pacientes atendidos no hospital universitário de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 2015. [https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/6004/RAMPELOTTO%2C ROBERTA FILIPINI.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/6004/RAMPELOTTO%2C%20ROBERTA%20FILIPINI.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (accessed December 13, 2018).
- [18] S.G.D.S.C. Soares, M.D.M. Mascarenhas, L.N.B. Moura, A.F.P. Machado, Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em um hospital de ensino do Nordeste do Brasil / Caracterización de las infecciones..., *Rev. Enferm. Da UFPI.* 6 (2017) 37. doi:10.26694/reufpi.v6i2.5933.
- [19] O. Tenaillon, J.E. Barrick, N. Ribick, D.E. Deatherage, J.L. Blanchard, A. Dasgupta, G.C. Wu, S. Wielgoss, S. Cruveiller, C. Médigue, D. Schneider, R.E. Lenski, Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment., *Nature.* 536 (2016) 165–70. doi:10.1038/nature18959.
- [20] M.R. Sannes, M.A. Kuskowski, K. Owens, A. Gajewski, J.R. Johnson, Virulence Factor Profiles and Phylogenetic Background of *Escherichia coli* Isolates from Veterans with Bacteremia and Uninfected Control Subjects, *J. Infect. Dis.* 190 (2004) 2121–2128. doi:10.1086/425984.
- [21] J. Vila, E. Sáez-López, J.R. Johnson, U. Römling, U. Dobrindt, R. Cantón, C.G. Giske, T. Naas, A. Carattoli, M. Martínez-Medina, J. Bosch, P. Retamar, J. Rodríguez-Baño, F. Baquero, S.M. Soto, *Escherichia coli*: an old friend with new tidings, *FEMS Microbiol. Rev.* 40 (2016) 437–463. doi:10.1093/femsre/fuw005.
- [22] A. Agus, S. Massier, A. Darfeuille-Michaud, E. Billard, N. Barnich, Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies., *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 567929. doi:10.1155/2014/567929.
- [23] M.P. Conte, C. Longhi, M. Marazzato, A.L. Conte, M. Aleandri, M.S. Lepanto, C. Zagaglia, M. Nicoletti, M. Aloï, V. Totino, A.T. Palamara, S. Schippa, Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features., *BMC Res. Notes.* 7 (2014) 748. doi:10.1186/1756-0500-7-748.
- [24] A. Clements, J.C. Young, N. Constantinou, G. Frankel, Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*., *Gut Microbes.* 3 (2012) 71–87. doi:10.4161/gmic.19182.
- [25] J.A. Otter, T.J. Galletly, F. Davies, J. Hitchcock, M.J. Gilchrist, E. Dyakova, S. Mookerjee, A.H. Holmes, E.T. Brannigan, Planning to halve Gram-negative bloodstream infection: getting to grips with healthcare-associated *Escherichia coli* bloodstream infection sources, *J. Hosp. Infect.* (2018). doi:10.1016/J.JHIN.2018.07.033.
- [26] A.N. de V.S. ANVISA, Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços

de Saúde n o 16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016., 2017.

- [27] M.F. Moradali, S. Ghods, B.H.A. Rehm, *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7 (2017) 39. doi:10.3389/fcimb.2017.00039.
- [28] V.D. Rosenthal, H.M. Al-Abdely, A.A. El-Kholy, S.A.A. AlKhawaja, H. Leblebicioglu, Y. Mehta, V. Rai, N.V. Hung, S.S. Kanj, M.F. Salama, E. Salgado-Yopez, N. Elahi, R. Morfin Otero, A. Apisarnthanarak, B.M. De Carvalho, B.E. Ider, D. Fisher, M.C.S.G. Buenafior, M.M. Petrov, A.M. Quesada-Mora, F. Zand, V. Gurskis, T. Anguseva, A. Ikram, D. Aguilar de Moros, W. Duszynska, N. Mejia, F.G. Horhat, V. Belskiy, V. Mijoljevic, G. Di Silvestre, K. Furova, G.Y. Ramos-Ortiz, M.O. Gamar Elanbya, H.I. Satari, U. Gupta, T. Dendane, L. Raka, H. Guanche-Garcell, B. Hu, D. Padgett, K. Jayatilleke, N. Ben Jaballah, E. Apostolopoulou, W.E. Prudencio Leon, A. Sepulveda-Chavez, H.M. Telechea, A. Trotter, C. Alvarez-Moreno, L. Kushner-Davalos, J.E. Desse, D.M. Maurizi, A.M. Montanini, G.J. Chaparro, J.P. Stagnaro, A. Romani, A.C. Bianchi, G. Álvarez, A. Palaoro, M. Bernan, R. Cabrera-Montesino, C. Domínguez, C.G. Rodríguez, C.G. Silva, E. Bogdanowicz, F.O. Riera, G. Benchetrit, I. Perez, J. Vimercati, L.S. Marcos, L. Ramasco, M. Caridi, M.C. Oyola, M.C. Rodríguez, M.L. Spadaro, M.S. Olivieri, P. Saul, P.D. Juarez, R.H. Pérez, P. Botta, D.Q. Quintana, A.M. Ríos, J.P. Stagnaro, V. Chediack, W. Chilon, A.I. Alsayegh, F.H. Yaseen, L.F. Hani, S.F. Sowar, T.A. Magray, E.A. Medeiros, A. Alves De Oliveira, A. Romario-Mendes, C. Fernandes-Valente, C. Santos, D. Escudeiro, D. Azevedo-Ferreira Lima, D. Azevedo-Pereira, E.M. Onzi-Siliprandi, F. Serpa-Maia, F. Aguiar-Leitao, G. Assuncao-Ponte, J. Dos Anjos-Lima, J. Olszewski, K. Harten Pinto Coelho, L.F. Alves De Lima, M. Mendonca, M.L. Maciel-Canuto Amaral, M.T. Tenorio, S. Gerah, M. Andrade-Oliveira-Reis, M. Moreira, M. Ximenes-Rocha Batista, R.S. Campos-Uchoa, R. Rocha-Vasconcelos Carneiro, R. Amaral De Moraes, S.C. Do Nascimento, T. Moreira-Matos, T.M. Lima-De Barros Araujo, T. De Jesus Pinheiro-Bandeira, V.L. Machado-Silva, W.M. Santos Monteiro, E. Hristozova, E.D. Kostadinov, K. Angelova, V.A. Velinova, V.J. Dicheva, X. Guo, G. Ye, R. Li, L. Song, K. Liu, T. Liu, G. Song, C. Wang, X. Yang, H. Yu, Y. Yang, A. Martínez, A.R. Vargas-García, A. Lagares-Guzmán, A.P. González, C. Linares, C. Ávila-Acosta, D. Santofimio, D. Yepes-Gomez, D.A. Marin-Tobar, D.P. Mazo-Elorza, E.G. Chapeta-Parada, G. Camacho-Moreno, G.E. Roncancio-Vill, I.A. Valderrama-Marquez, J.E. Ruiz-Gallardo, J.O. Ospina-Martínez, J. Osorio, J.I. Marín-Urbe, J.C. López, S. Gualtero, J.R. Rojas, K. Gomez-Nieto, L.Y.M. Rincon, L. Meneses-Ovallos, L.M. Canas-Giraldo, L.D. Burgos-Florez, M. Amaral-Almeida Costa, M. Rodriguez, N. Barahona-Guzmán, O. Mancera-Paez, P.A. Rios-Arana, R. Ortega, S.L. Romero-Torres, S.M. Pulido-Leon, S. Valderrama, V.M. Moreno-Mejia, W. Raigoza-Martinez, W. Villamil-Gomez, Y.A. Pardo-Lopez, A. Argüello-Ruiz, A. Solano-Chinchilla, G.A. Muñoz-Gutierrez, I. Calvo-Hernández, L. Maroto-Vargas, M.A. Zuniga, M. Valverde-Hernandez, O. Chavarria-Ugalde, B. Herrera, C. Díaz, M.M. Bovera, C. Cevallos, C. Pelaez, E. Jara, V. Delgado, E.E. Coello-Gordon, F. Picoita, F.M. Guerrero-Toapant, F. Valencia, G. Santacruz, H. Gonzalez, L.N. Pazmino, M.F. Garcia, M. Arboleda, M. Lascano, N. Alquinga, V. Ramírez, R.H.A. Yousef, A.E.M. Moustafa, A. Ahmed, A.M. Elansary, A.M. Ali, A. Hasanin, A.A. Messih, A. Ramadan, B.A. El Awady, D.M. Hassan, D. Abd El Aziz, H. Hamza, H.M.

Agha, I.A. Ghazi, J. ElKholy, M.A. Fattah, M. Elanany, M. Mansour, M.M.A. Haleim, R. Fouda, R.H. El-Sherif, S. Bekeit, V. Bayani, Y.S. Elkholy, Y.M. Abdelhamid, Z. Salah, D.M. Rivera, A. Chawla, A.N. Manked, A. Azim, A. Mubarak, A. Thakur, A.V. Dharan, A. Patil, A. Sasidharan, A.K. Bilolikar, A. Anirban Karmakar, A.M. Mathew, A. Kulkarni, A. Agarwal, A. Sriram, A. Dwivedy, A. Dasgupta, A. Bhakta, A.R. Suganya, A. Poojary, A.K. Mani, A. Sakle, B.K. Abraham, B. Padmini, B. Ramachandran, B. Ray, B.K. Pati, B.N. Chaudhury, B.M. Mishra, S. Biswas, M.B. Saibala, B.Q. Jawadwala, C. Rodrigues, C. Modi, C. Patel, D.K. Khanna, D. Devaprasad, D. Divekar, D.G. Aggarwal, J.V. Divatia, D. Zala, E. Pathrose, F. Abubakar, F. Chacko, G.S. Gehlot, G. Khanna, H.K. Sale, I. Roy, J. Shelgaonkar, J. Sorabjee, J. Eappen, J. Mathew, J. Pal, K. Varma, K.L. Joshi, K. Sandhu, R. Kelkar, L. Ranganathan, L. Pushparaj, M. Lavate, M. Latha, M. Suryawanshi, M. Bhattacharyya, M. Kavathekar, M.K. Agarwal, M. Patel, M. Shah, M.N. Sivakumar, M. Kharbanda, M. Bej, M. Potdar, M. Chakravarthy, M. Karpagam, S.N. Myatra, N. Gita, N.P. Rao, N. Sen, N. Ramakrishnan, N. Jaggi, N. Saini, N.K. Pawar, N. Modi, N. Pandya, N. Mohanty, P. Thakkar, P. Joshi, P.K. Sahoo, P.K. Nair, P.S. Kumar, P. Patil, P. Mukherjee, P. Mathur, P. Shah, R. Sukanya, R. Arjun, R. Chawla, R. Gopalakrishnan, R. Venkataraman, S. Raut, R. Krupanandan, R. Tejam, R. Misra, R. Debroy, S. Saranya, S. Narayanan, S. Mishra, S. Saseedharan, S. Sengupta, S.K. Patnaik, S. Sinha, S. Blessymole, S. Rohra, S. Rajagopal, S. Mukherjee, S. Sengupta, S. John, S. Bhattacharya, Sijo, S. Bhattacharyya, S. Singh, T. Sohanlal, S. Vadi, S.S. Dalal, S.K. Todi, S. Kumar, S. Kansal, S. Misra, S. Bhattacharyya, S. Nirkhivale, S.K. Purkayastha, S. Mukherjee, S. Singh, S. Sahu, S. Sharma, S. Kumar, S. Basu, S. Shetty, S. Shah, T. Singhal, T. Francis, T. Anand, V. Venkateshwar, V. Thomas, V. Kothari, Velupandi, V. Kantroo, G. Sitohang, R. Kadarsih, A. Sanaei, B. Maghsudi, G. Sabetian, M. Masjedi, M. Alebouyeh, S.J. Sherafat, Y.K. Mohamed, A. Al Khamis, A.S. Alsaadi, A.A. Al-Jarie, A.H. Mutwalli, A.S.K. Rillorta, A. Thomas, A. Kelany, A. Manao, D.M. Alamri, E.B. Santiago, E.P. Cruzpero, F.A. Sawan, F.A. Al Qasmah, H. Alabdaly, H.A. Al-Dossary, H. Ahmed, H. Roshdi, H.Y. Al-Alkami, H. Hanafi, H.E. Ammari, H.M. Al Hani, I.A.M.A. Asiri, J.A. Mendoza, J. Philipose, J.O. Selga, Kehkashan, K.M. Ghalilah, L.S. Redito, L. Josph, M. Al-Alawi, M.M. Al-Gethamy, M. Madco, M.G. Manuel, M. Girvan, M. Aldalaton, M. De Guzman, M. Alkhamaly, M. Masfar, M.A.A. Karrar, M.M. Al Azmi, M.L. Quisai, M.M. Torres, N. Al-Abdullah, N.A. Tawfic, N. Elsayed, N.S. Abdulkhalik, N.A. Bugis, N.C. Ariola, N. Gad, N. Alghosn, N. Tashkandi, N. Al Zharani, P.A. De Vera, R. Krishnan, R.H. Al Shehri, R.N.A. Jaha, R. Thomas, R.L. Cresencia, R. Penuliar, R.V. Lozada, S. Al Qahtani, S. Twfik, S.H. Al Faraj, S. El-Sherbiny, S.J.B. Alih, S. Briones, S.Z. Bukhari, T.S.A. Alotaibi, U. Gopal, U. Nair, W.A. Abdulatif, W.M. Hussain, W.M. Demotica, G. Spahija, N. Baftiu, A. Gashi, A.A. Omar, A.M. Mohamed, F.M. Rebello, H.H. Almousa, N.M. Abdo, S.M. George, S. Khamis, S. Thomas, A. Ahmad Zaatari, A. Anwar Al Souheil, H. Ayash, I. Zeid, J. Tannous, N.K. Zahreddine, R. Ahmadiéh, T. Mahfouz, T. Kardas, V. Tanzi, Z. Kanafani, Z. Hammoud, A. Dagys, D. Grinkeviciute, R. Kevalas, T. Kondratas, M. Petrovska, K. Popovska, Z. Mitrev, Z.B. Miteva, K. Jankovska, S.T. Guroska, C.S. Gan, A.A. Othman, A.M. Yusof, A.S.Z. Abidin, F.A. Aziz, F.K. Weng, H. Zainol, K.B.A. Bakar, L.C.S. Lum, M. Mansor, M.K. Zaman, M.F.H. Jamaluddin, M.S. Hasan, R.A. Rahman, R.H.M. Zaini, R. Zhazali, S.S. La Sri Ponnampala, S.L. Chuah, W.F.W.M. Shukeri, W.N.W. Hassan, W.N.W. Yusoff, W.R.W. Mat, M.A. Cureno-

Diaz, G. Aguirre-Avalos, A. Flores-Alvarado, A. Cerero-Gudino, A. Zamores-Pedroza, B. Cano-Munoz, B.E. Hernandez-Chena, C.C. Carreon-Martinez, H. Coronado-Magana, F. Corona-Jimenez, E. Rodriguez-Noriega, E. Alcalá-Martinez, E. Gonzalez-Diaz, F.M. Guerra-Infante, G. Arteaga-Troncoso, G. Martinez-Falcon, G. Leon-Garnica, H.A. Delgado-Aguirre, H.R. Perez-Gomez, I.E. Sosa-Gonzalez, J.A. Galindo-Olmeda, J.J. Ayala-Gaytan, J. Rodriguez-Pacheco, L. Zamorano-Flores, J.A. Lopez-Pulgarin, M.G. Miranda-Novales, M. Ramirez, M. Lopez-Hurtado, M. Lozano, M.E. Gomez, M.E. Sanchez-Castuera, M. Kasten-Monges, M. Gonzalez-Martinez, M. Sanchez-Vargas, M.C. Culebro-Burguet, M.A. Altuzar-Figueroa, J.C. Mijangos-Mendez, O.G. Ramires, O.S. Espinosa, R. De Leon-Escobedo, R. Salas-Flores, R. Ruiz-Rendon, S. Petersen-Morfin, S.A. Aguirre-Diaz, S. Esparza-Ahumada, S. Vega-Gonzalez, V. Gaona-Flores, V.A. Monroy-Colin, Z. Cruz-Rivera, A. Bat-Erdene, B. Narankhuu, B. Choijamts, B. Tuvdennyam, B. Batkhuu, K.H. Chuluunchimeg, D. Enkhtsetseg, G. Batjargal, G. Bayasgalan, M. Dorj, N. Mendsaikhan, O. Baatar, P. Suvderdene, S. Baigalmaa, T. Khajidmaa, T. Begzjav, Tsuyanga, Z. Ariyasuren, A.A. Zeggwagh, K. Berechid, K. Abidi, N. Madani, R. Abouqal, A. Koirala, R. Giri, S. Sainju, S.P. Acharya, A. Ahmed, A. Raza, A. Parveen, F. Sultan, M. Khan, N. Paul, N. Daud, S. Yusuf, S. Nizamuddin, E. Garcia-Mayorca, E.G. Castaño, J.L. Moreno-Castillo, J.M. Ballinas-Aquino, L. Lara, M. Vargas, M.I. Rojas-Bonilla, S.J. Ramos, T. Mapp, V. De Iturrado, C.E. La Hoz Vergara, C.F. Linares-Calderon, D. Moreno, E. Ramirez, F.M. Ramirez Wong, G.M. Montenegro-Orrego, H.R. Sandoval-Castillo, J. Pichilingue-Chagray, J. Mueras-Quevedo, K.F. Aibar-Yaranga, L.I. Castillo-Bravo, L.M. Santivanez-Monge, M.J. Mayorga-Espichan, M.L.G. Rosario-Tueros, M.V. Changano-Rodriguez, N.E. Salazar-Ramirez, V.A. Marquez-Mondalgo, A.L.N. Tajanlangit, A.S. Tamayo, C.M.J.P. Llamas, E. Labro, A.P. Dy, J.D. Fortin, L.D. Bergosa, L.G. Salvio, V. Bermudez, M.C. Sg-Buenafior, M.F. Trajano, M.T. Mendoza, O.P. Javellana, R.R. Maglente, Y. Arreza-Galapia, J.A. Navoa-Ng, A. Kubler, B. Barteczko-Grajek, B. Dragan, M. Zurawska, M. Mikaszewska-Sokolewicz, M. Zielinska, G.Y. Ramos-Ortiz, A. Florin-Rogobete, C.D. Vlad, D. Muntean, D. Sandesc, M. Papurica, M. Licker, O.H. Bedreag, R. Popescu, S.D. Grecu, V. Dumitrascu, A. Molkov, D. Galishevskiy, M. Furman, A. Simic, D. Lekic, G. Ristic, J. Eremija, J. Kojovic, L. Nikolic, M. Bjelovic, A. Lesnakova, S. Hlinkova, M.O. Gamar-Elanbya, N. Supa, P. Prasan, R. Pimathai, S. Wanitanukool, S. Somabutr, N. Ben-Jaballah, A. Borgi, A. Bouziri, A. Dilek, A. Oncul, A. Kaya, A.P. Demiroz, A. Gunduz, A. Ozgultekin, A. Inan, A.N. Yalcin, A. Ramazanoglu, A. Engin, A. Willke, B.C. Meco, C. Aygun, C. Bulut, C. Uzun, C. Becerik, C.A. Hatipoglu, C.Y. Guclu, D. Ozdemir, D. Yildizdas, D. Ugurcan, E. Azak, E. Guclu, E.M. Yilmaz, F. Sebnem-Erdinc, F. Sirmatel, F. Ulger, F. Sari, F. Kizilates, G. Usluer, G. Ceylan, G. Ersoz, G. Kaya, G.T. Ertem, G. Senol, H. Agin, H. Cabadak, H. Yilmaz, H. Sungurtekin, H. Zengin, H. Turgut, I. Ozgunes, I. Devrim, I. Erdem, I.G.E. Işcanlı, M.M. Bakir, M.F. Geyik, M. Oral, M. Meric, M. Cengiz, M. Ozcelik, M. Altindis, M. Sunbul, N. Elaldi, N. Kuyucu, N. Unal, N. Oztoprak, N. Yasar, N. Erben, N. Bayram, O. Dursun, O. Karabay, O. Coskun, O.O. Horoz, O. Turhan, O.S. Sandal, R. Tekin, S. Esen, S.Y. Erdogan, S. Unal, S. Karacorlu, S. Sen, S. Sen, S. Sacar, V. Yarar, Y. Oruc, Y. Sahip, Z. Kaya, A. Philip, A. Elhoufi, H. Alrahma, E. Sacher, F. Perez, G.D. Empaire, H. Vidal, L. Montes-Bravo, M.E. Guzman Siritt, N. Orozco, N. Navarrete, Y. Ruiz, Z.D.-G. De Anez, D.T. Van Trang, D.Q. Minh, D.X. Co, D.P.P. Anh, L.T.A. Thu, L.T.D. Tuyet, L.T.T. Nguyet, N. uy Chau,

- N.G. Binh, N.P. Tien, N.Q. Anh, P.T. Hang, T.T.M. Hanh, T.T.T. Hang, T.A. Thu, V.T.H. Thoa, International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module, *Am. J. Infect. Control.* 44 (2016) 1495–1504. doi:10.1016/j.ajic.2016.08.007.
- [29] J.A. Trubiano, A.A. Padiglione, Nosocomial infections in the intensive care unit, *Anaesth. Intensive Care Med.* 16 (2015) 598–602. doi:10.1016/j.mpaic.2015.09.010.
- [30] V. Russotto, A. Cortegiani, S.M. Raineri, A. Giarratano, Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit., *J. Intensive Care.* 3 (2015) 54. doi:10.1186/s40560-015-0120-5.
- [31] G. De Angelis, G. Restuccia, S. Venturiello, R. Cauda, S. Malhotra-Kumar, H. Goossens, J. Schrenzel, E. Tacconelli, Nosocomial acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) Enterobacteriaceae in hospitalised patients: a prospective multicenter study., *BMC Infect. Dis.* 12 (2012) 74. doi:10.1186/1471-2334-12-74.
- [32] C.H.-F. Lau, K. van Engelen, S. Gordon, J. Renaud, E. Topp, Novel Antibiotic Resistance Determinants from Agricultural Soil Exposed to Antibiotics Widely Used in Human Medicine and Animal Farming, *Appl. Environ. Microbiol.* 83 (2017) e00989-17. doi:10.1128/AEM.00989-17.
- [33] J.P. Graham, J.N.S. Eisenberg, G. Trueba, L. Zhang, T.J. Johnson, Small-Scale Food Animal Production and Antimicrobial Resistance: Mountain, Molehill, or Something in-between?, *Environ. Health Perspect.* 125 (2017) 104501. doi:10.1289/EHP2116.
- [34] L.J. V. Piddock, Understanding drug resistance will improve the treatment of bacterial infections, *Nat. Rev. Microbiol.* 15 (2017) 639–640. doi:10.1038/nrmicro.2017.121.
- [35] J. O'NEILL, Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations, *Rev. Antimicrob. Resist.* (2016). doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [36] L. Czaplewski, R. Bax, M. Clokie, M. Dawson, H. Fairhead, V.A. Fischetti, S. Foster, B.F. Gilmore, R.E.W. Hancock, D. Harper, I.R. Henderson, K. Hilpert, B. V Jones, A. Kadioglu, D. Knowles, S. Ólafsdóttir, D. Payne, S. Projan, S. Shaunak, J. Silverman, C.M. Thomas, T.J. Trust, P. Warn, J.H. Rex, Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review., *Lancet. Infect. Dis.* 16 (2016) 239–51. doi:10.1016/S1473-3099(15)00466-1.
- [37] M. Hassan, M. Kjos, I.F. Nes, D.B. Diep, F. Lotfipour, Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance, *J. Appl. Microbiol.* 113 (2012) 723–736. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x.
- [38] B. Mishra, S. Reiling, D. Zarena, G. Wang, Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies, *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2017). doi:10.1016/j.cbpa.2017.03.014.
- [39] J. Kindrachuk, A. Nijnik, R.E.W. Hancock, Host Defense Peptides: Bridging Antimicrobial and Immunomodulatory Activities, *Compr. Nat. Prod. II.* (2010) 175–216. doi:10.1016/B978-008045382-8.00112-X.
- [40] M.D.T. Torres, S. Sothiselvam, T.K. Lu, C. de la Fuente-Nunez, Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications, *J. Mol. Biol.* (2019). doi:10.1016/J.JMB.2018.12.015.
- [41] P. Kumar, J. Kizhakkedathu, S. Straus, P. Kumar, J.N. Kizhakkedathu, S.K.

- Straus, Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo, *Biomolecules*. 8 (2018) 4. doi:10.3390/biom8010004.
- [42] R.E.W. Hancock, E.F. Haney, E.E. Gill, The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity, *Nat. Rev. Immunol.* 16 (2016) 321–334. doi:10.1038/nri.2016.29.
- [43] A. Marquette, B. Bechinger, A. Marquette, B. Bechinger, Biophysical Investigations Elucidating the Mechanisms of Action of Antimicrobial Peptides and Their Synergism, *Biomolecules*. 8 (2018) 18. doi:10.3390/biom8020018.
- [44] A. Zairi, F. Tangy, K. Bouassida, K. Hani, Dermaseptins and Magainins: Antimicrobial Peptides from Frogs' Skin—New Sources for a Promising Spermicides Microbicides—A Mini Review, *J. Biomed. Biotechnol.* 2009 (2009) 1–8. doi:10.1155/2009/452567.
- [45] L.N. Irazazabal, W.F. Porto, I.C.M. Fensterseifer, E.S.F. Alves, C.O. Matos, A.C.S. Menezes, M.R. Felício, S. Gonçalves, N.C. Santos, S.M. Ribeiro, V. Humblot, L.M. Lião, A. Ladram, O.L. Franco, Fast and potent bactericidal membrane lytic activity of PaDBS1R1, a novel cationic antimicrobial peptide, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1861 (2019) 178–190. doi:10.1016/J.BBAMEM.2018.08.001.
- [46] T.-H. Lee, K.N. Hall, M.-I. Aguilar, Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action: A Focus on the Role of Membrane Structure., *Curr. Top. Med. Chem.* 16 (2016) 25–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26139112> (accessed December 30, 2018).
- [47] T. Ganz, Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 710–720. doi:10.1038/nri1180.
- [48] K.A. Brogden, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 238–250. doi:10.1038/nrmicro1098.
- [49] W.F. Porto, I.C.M. Fensterseifer, S.M. Ribeiro, O.L. Franco, Joker: An algorithm to insert patterns into sequences for designing antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862 (2018). doi:10.1016/j.bbagen.2018.06.011.
- [50] L.T. Nguyen, E.F. Haney, H.J. Vogel, The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action, *Trends Biotechnol.* 29 (2011) 464–472. doi:10.1016/J.TIBTECH.2011.05.001.
- [51] M. Malmsten, Interactions of Antimicrobial Peptides with Bacterial Membranes and Membrane Components, *Curr. Top. Med. Chem.* 16 (2015) 16–24. doi:10.2174/1568026615666150703121518.
- [52] L. Zhang, A. Rozek, R.E.W. Hancock, Interaction of Cationic Antimicrobial Peptides with Model Membranes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 35714–35722. doi:10.1074/jbc.M104925200.
- [53] T. Ebenhan, O. Gheysens, H.G. Kruger, J.R. Zeevaart, M.M. Sathekge, Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging., *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 867381. doi:10.1155/2014/867381.
- [54] E. Sun, C.R. Belanger, E.F. Haney, R.E.W. Hancock, Host defense (antimicrobial) peptides, *Pept. Appl. Biomed. Biotechnol. Bioeng.* (2018) 253–285. doi:10.1016/B978-0-08-100736-5.00010-7.
- [55] P. Kosikowska, A. Lesner, Antimicrobial peptides (AMPs) as drug candidates: a patent review (2003–2015), *Expert Opin. Ther. Pat.* (2016). doi:10.1080/13543776.2016.1176149.
- [56] M. AB Naafs, The Antimicrobial Peptides: Ready for Clinical Trials?, *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 7 (2018) 001–005. doi:10.26717/BJSTR.2018.07.001536.

- [57] Q. Feng, Y. Huang, M. Chen, G. Li, Y. Chen, Functional synergy of α -helical antimicrobial peptides and traditional antibiotics against Gram-negative and Gram-positive bacteria in vitro and in vivo, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34 (2015) 197–204. doi:10.1007/s10096-014-2219-3.
- [58] L.N. Irazazabal, W.F. Porto, S.M. Ribeiro, S. Casale, V. Humblot, A. Ladram, O.L. Franco, Selective amino acid substitution reduces cytotoxicity of the antimicrobial peptide mastoparan, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858 (2016) 2699–2708. doi:10.1016/J.BBAMEM.2016.07.001.
- [59] M. Soethoudt, M.W.H. Hoorens, W. Doelman, A. Martella, M. van der Stelt, L.H. Heitman, Structure-kinetic relationship studies of cannabinoid CB 2 receptor agonists reveal substituent-specific lipophilic effects on residence time, *Biochem. Pharmacol.* (2018). doi:10.1016/j.bcp.2018.03.018.
- [60] B. Findlay, G.G. Zhanel, F. Schweizer, Cationic Amphiphiles, a New Generation of Antimicrobials Inspired by the Natural Antimicrobial Peptide Scaffold, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (2010) 4049–4058. doi:10.1128/AAC.00530-10.
- [61] W.F. Porto, Á.S. Pires, O.L. Franco, CS-AMPPred: An Updated SVM Model for Antimicrobial Activity Prediction in Cysteine-Stabilized Peptides, *PLoS One.* 7 (2012) e51444. doi:10.1371/journal.pone.0051444.
- [62] W.F.W.F. Porto, I.C.M. Fensterseifer, S.M. Ribeiro, O.L. Franco, Joker: An algorithm to insert patterns into sequences for designing antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862 (2018). doi:10.1016/J.BBAGEN.2018.06.011.
- [63] Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu, A. Bax, TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts., *J. Biomol. NMR.* 44 (2009) 213–23. doi:10.1007/s10858-009-9333-z.
- [64] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 51–55. doi:10.1016/0263-7855(96)00009-4.
- [65] J.M. Freire, M.M. Domingues, J. Matos, M.N. Melo, A.S. Veiga, N.C. Santos, M.A.R.B. Castanho, Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes., *Eur. Biophys. J.* 40 (2011) 481–7. doi:10.1007/s00249-010-0661-4.
- [66] J. Clardy, M.A. Fischbach, C.R. Currie, The natural history of antibiotics., *Curr. Biol.* 19 (2009) R437-41. doi:10.1016/j.cub.2009.04.001.
- [67] B. Spellberg, J.G. Bartlett, D.N. Gilbert, The future of antibiotics and resistance., *N. Engl. J. Med.* 368 (2013) 299–302. doi:10.1056/NEJMp1215093.
- [68] K. Bhullar, N. Waglechner, A. Pawlowski, K. Koteva, E.D. Banks, M.D. Johnston, H.A. Barton, G.D. Wright, Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome, *PLoS One.* 7 (2012) e34953. doi:10.1371/journal.pone.0034953.
- [69] B. Bechinger, S.-U. Gorr, Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance, *J. Dent. Res.* 96 (2017) 254–260. doi:10.1177/0022034516679973.
- [70] G. Wang, X. Li, Z. Wang, APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) D933–D937. doi:10.1093/nar/gkn823.
- [71] P. Nicolas, D. Vanhoye, M. Amiche, Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides, *Peptides.* 24 (2003) 1669–1680. doi:10.1016/J.PEPTIDES.2003.08.017.
- [72] E.F. Haney, L.T. Nguyen, D.J. Schibli, H.J. Vogel, Design of a novel tryptophan-rich membrane-active antimicrobial peptide from the membrane-proximal region

- of the HIV glycoprotein, gp41., *Beilstein J. Org. Chem.* 8 (2012) 1172–84. doi:10.3762/bjoc.8.130.
- [73] S.-T. Yang, S.Y. Shin, K.-S. Hahm, J. Il Kim, Design of perfectly symmetric Trp-rich peptides with potent and broad-spectrum antimicrobial activities, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 27 (2006) 325–330. doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2005.11.014.
- [74] S.M. Ribeiro, M.R. Felício, E.V. Boas, S. Gonçalves, F.F. Costa, R.P. Samy, N.C. Santos, O.L. Franco, New frontiers for anti-biofilm drug development, *Pharmacol. Ther.* 160 (2016) 133–144. doi:10.1016/J.PHARMTHERA.2016.02.006.
- [75] C. de la Fuente-Núñez, M.H. Cardoso, E. de Souza Cândido, O.L. Franco, R.E.W. Hancock, Synthetic antibiofilm peptides, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858 (2016) 1061–1069. doi:10.1016/J.BBAMEM.2015.12.015.
- [76] N.B. da Cunha, N.B. Cobacho, J.F.C. Viana, L.A. Lima, K.B.O. Sampaio, S.S.M. Dohms, A.C.R. Ferreira, C. de la Fuente-Núñez, F.F. Costa, O.L. Franco, S.C. Dias, The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts, *Drug Discov. Today.* 22 (2017) 234–248. doi:10.1016/J.DRUDIS.2016.10.017.
- [77] M.H. Cardoso, E.S. Cândido, L.Y. Chan, M. Der Torossian Torres, K.G.N. Oshiro, S.B. Rezende, W.F. Porto, T.K. Lu, C. de la Fuente-Nunez, D.J. Craik, O.L. Franco, A Computationally Designed Peptide Derived from *Escherichia coli* as a Potential Drug Template for Antibacterial and Antibiofilm Therapies, *ACS Infect. Dis.* 4 (2018) 1727–1736. doi:10.1021/acsinfecdis.8b00219.
- [78] G.P.B. Carretero, G.K.V. Saraiva, A.C.G. Cauz, M.A. Rodrigues, S. Kiyota, K.A. Riske, A.A. dos Santos, M.F. Pinatto-Botelho, M.P. Bemquerer, F.J. Gueiros-Filho, H. Chaimovich, S. Schreier, I.M. Cuccovia, Synthesis, biophysical and functional studies of two BP100 analogues modified by a hydrophobic chain and a cyclic peptide, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1860 (2018) 1502–1516. doi:10.1016/J.BBAMEM.2018.05.003.
- [79] S. Omardien, J.W. Drijfhout, F.M. Vaz, M. Wenzel, L.W. Hamoen, S.A.J. Zaat, S. Brul, Bactericidal activity of amphipathic cationic antimicrobial peptides involves altering the membrane fluidity when interacting with the phospholipid bilayer, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1860 (2018) 2404–2415. doi:10.1016/J.BBAMEM.2018.06.004.
- [80] B. Gomes, M.T. Augusto, M.R. Felício, A. Hollmann, O.L. Franco, S. Gonçalves, N.C. Santos, Designing improved active peptides for therapeutic approaches against infectious diseases, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 415–429. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.01.004.
- [81] S. Gonçalves, P.M. Silva, M.R. Felício, L.N. de Medeiros, E. Kurtenbach, N.C. Santos, Psd1 Effects on *Candida albicans* Planktonic Cells and Biofilms, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7 (2017) 249. doi:10.3389/fcimb.2017.00249.
- [82] A. De Breij, M. Riool, R.A. Cordfunke, N. Malanovic, L. De Boer, R.I. Koning, E. Ravensbergen, M. Franken, T. Van Der Heijde, B.K. Boekema, P.H.S. Kwakman, N. Kamp, A. El Ghalbzouri, K. Lohner, S.A.J. Zaat, J.W. Drijfhout, P.H. Nibbering, The antimicrobial peptide SAAP-148 combats drug-resistant bacteria and biofilms, *Sci. Transl. Med.* 10 (2018). doi:10.1126/scitranslmed.aan4044.
- [83] A.N. de V.S. ANVISA, GUIA PARA A CONDUÇÃO DE ESTUDOS NÃO CLÍNICOS DE TOXICOLOGIA E SEGURANÇA FARMACOLÓGICA NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS, 2013.

- www.anvisa.gov.br (accessed January 6, 2019).
- [84] W.F. Porto, Á.S. Pires, O.L. Franco, Antimicrobial activity predictors benchmarking analysis using shuffled and designed synthetic peptides, *J. Theor. Biol.* 426 (2017) 96–103. doi:10.1016/J.JTBI.2017.05.011.
- [85] L. Migliolo, M.R. Felício, M.H. Cardoso, O.N. Silva, M.-A.E. Xavier, D.O. Nolasco, A.S. de Oliveira, I. Roca-Subira, J. Vila Estape, L.D. Teixeira, S.M. Freitas, A.J. Otero-Gonzalez, S. Gonçalves, N.C. Santos, O.L. Franco, Structural and functional evaluation of the palindromic alanine-rich antimicrobial peptide Pa-MAP2, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858 (2016) 1488–1498. doi:10.1016/j.bbamem.2016.04.003.
- [86] M.H. Cardoso, S.M. Ribeiro, D.O. Nolasco, C. de la Fuente-Núñez, M.R. Felício, S. Gonçalves, C.O. Matos, L.M. Liao, N.C. Santos, R.E.W. Hancock, O.L. Franco, L. Migliolo, A polyalanine peptide derived from polar fish with anti-infectious activities, *Sci. Rep.* 6 (2016) 21385. doi:10.1038/srep21385.
- [87] P.B. Noto, G. Abbadessa, M. Cassone, G.D. Mateo, A. Agelan, J.D. Wade, D. Szabo, B. Kocsis, K. Nagy, F. Rozgonyi, L. Otvos, Jr., Alternative stabilities of a proline-rich antibacterial peptide in vitro and in vivo., *Protein Sci.* 17 (2008) 1249–55. doi:10.1110/ps.034330.108.
- [88] X. Wu, Z. Wang, X. Li, Y. Fan, G. He, Y. Wan, C. Yu, J. Tang, M. Li, X. Zhang, H. Zhang, R. Xiang, Y. Pan, Y. Liu, L. Lu, L. Yang, In vitro and in vivo activities of antimicrobial peptides developed using an amino acid-based activity prediction method., *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 5342–9. doi:10.1128/AAC.02823-14.
- [89] A. Barreto-Santamaría, H. Curtidor, G. Arévalo-Pinzón, C. Herrera, D. Suárez, W.H. Pérez, M.E. Patarroyo, A New Synthetic Peptide Having Two Target of Antibacterial Action in *E. coli* ML35, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 2006. doi:10.3389/fmicb.2016.02006.
- [90] F. and D.A. FDA, U.S. Food and Drug, (2018). <https://www.fda.gov/AboutFDA/WhatWeDo/default.htm> (accessed January 10, 2019).
- [91] P.Y. Muller, M.N. Milton, The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development, Nature Publishing Group, 2012. doi:10.1038/nrd3801.
- [92] O.N. Silva, C. De La Fuente-Núñez, E.F. Haney, I.C.M. Fensterseifer, S.M. Ribeiro, W.F. Porto, P. Brown, C. Faria-Junior, T.M.B. Rezende, S.E. Moreno, T.K. Lu, R.E.W. Hancock, O.L. Franco, An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities, *Sci. Rep.* 6 (2016) 35465. doi:10.1038/srep35465.
- [93] P.-K. Lai, Y.N. Kaznessis, Insights into Membrane Translocation of Protegrin Antimicrobial Peptides by Multistep Molecular Dynamics Simulations, *ACS Omega.* 3 (2018) 6056–6065. doi:10.1021/acsomega.8b00483.
- [94] J.P. Ulmschneider, Charged Antimicrobial Peptides Can Translocate across Membranes without Forming Channel-like Pores., *Biophys. J.* 113 (2017) 73–81. doi:10.1016/j.bpj.2017.04.056.
- [95] P.M. Matos, H.G. Franquelim, M.A.R.B. Castanho, N.C. Santos, Quantitative assessment of peptide-lipid interactions. Ubiquitous fluorescence methodologies, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1798 (2010) 1999–2012. doi:10.1016/j.bbamem.2010.07.012.
- [96] D.E. Warschawski, A.A. Arnold, M. Beaugrand, A. Gravel, É. Chartrand, I. Marcotte, Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of

- transmembrane proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1808 (2011) 1957–1974. doi:10.1016/J.BBAMEM.2011.03.016.
- [97] R.M.R.F. Epand, R.M.R.F. Epand, Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1788 (2009) 289–294. doi:10.1016/J.BBAMEM.2008.08.023.
- [98] L.D. Renner, D.B. Weibel, Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 6264–6269. doi:10.1073/pnas.1015757108.
- [99] C.S. Alves, M.N. Melo, H.G. Franquelim, R. Ferre, M. Planas, L. Feliu, E. Bardají, W. Kowalczyk, D. Andreu, N.C. Santos, M.X. Fernandes, M.A.R.B. Castanho, E. Bardaji, W. Kowalczyk, D. Andreu, N.C. Santos, M.X. Fernandes, M.A.R.B. Castanho, *Escherichia coli* cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides BP100 and pepR., *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 27536–44. doi:10.1074/jbc.M110.130955.
- [100] R. Rashid, M. Veleba, K.A. Kline, Focal Targeting of the Bacterial Envelope by Antimicrobial Peptides, *Front. Cell Dev. Biol.* 4 (2016) 55. doi:10.3389/fcell.2016.00055.
- [101] E. Mileykovskaya, W. Dowhan, Cardiolipin-dependent formation of mitochondrial respiratory supercomplexes, *Chem. Phys. Lipids.* 179 (2014) 42–48. doi:10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2013.10.012.
- [102] E. Mileykovskaya, W. Dowhan, Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange., *J. Bacteriol.* 182 (2000) 1172–5. doi:10.1128/JB.182.4.1172-1175.2000.
- [103] C. Pérez-Peinado, S.A. Dias, M.M. Domingues, A.H. Benfield, J.M. Freire, G. Rádis-Baptista, D. Gaspar, M.A.R.B. Castanho, D.J. Craik, S.T. Henriques, A.S. Veiga, D. Andreu, Mechanisms of bacterial membrane permeabilization by crotalicidin (Ctn) and its fragment Ctn(15-34), antimicrobial peptides from rattlesnake venom., *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 1536–1549. doi:10.1074/jbc.RA117.000125.
- [104] P.M. Matos, M.A.R.B. Castanho, N.C. Santos, HIV-1 Fusion Inhibitor Peptides Enfuvirtide and T-1249 Interact with Erythrocyte and Lymphocyte Membranes, *PLoS One.* 5 (2010) e9830. doi:10.1371/journal.pone.0009830.
- [105] J. Swain, M. El Houry, J. Kempf, F. Briée, P. Van Der Smissen, J.-L. Décout, M.-P. Mingeot-Leclercq, Effect of cardiolipin on the antimicrobial activity of a new amphiphilic aminoglycoside derivative on *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One.* 13 (2018) e0201752. doi:10.1371/journal.pone.0201752.
- [106] A.H. Delcour, Outer membrane permeability and antibiotic resistance, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1794 (2009) 808–816. doi:10.1016/J.BBAPAP.2008.11.005.
- [107] R. Koebnik, K.P. Locher, P. Van Gelder, Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell, *Mol. Microbiol.* 37 (2000) 239–253. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x.
- [108] L. Zhang, P. Dhillon, H. Yan, S. Farmer, R.E. Hancock, Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*., *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (2000) 3317–21. doi:10.1128/AAC.44.12.3317-3321.2000.
- [109] N. Malanovic, K. Lohner, Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria., *Pharmaceuticals (Basel).* 9 (2016). doi:10.3390/ph9030059.
- [110] T.M. Postma, R.M.J. Liskamp, Triple-targeting Gram-negative selective

- antimicrobial peptides capable of disrupting the cell membrane and lipid A biosynthesis, *RSC Adv.* 6 (2016) 65418–65421. doi:10.1039/C6RA11550K.
- [111] F.G. Dupuy, I. Pagano, K. Andenoro, M.F. Peralta, Y. Elhady, F. Heinrich, S. Tristram-Nagle, Selective Interaction of Colistin with Lipid Model Membranes., *Biophys. J.* 114 (2018) 919–928. doi:10.1016/j.bpj.2017.12.027.
- [112] R.M. Epand, S. Rotem, A. Mor, B. Berno, R.F. Epand, Bacterial Membranes as Predictors of Antimicrobial Potency, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 14346–14352. doi:10.1021/ja8062327.
- [113] D. Voss, T.J. Montville, 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene as a reporter of inner spore membrane fluidity in *Bacillus subtilis* and *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *J. Microbiol. Methods.* 96 (2014) 101–103. doi:10.1016/j.mimet.2013.11.009.
- [114] A.F. Faustino, G.M. Guerra, R.G. Huber, A. Hollmann, M.M. Domingues, G.M. Barbosa, F.J. Enguita, P.J. Bond, M.A.R.B. Castanho, A.T. Da Poian, F.C.L. Almeida, N.C. Santos, I.C. Martins, Understanding Dengue Virus Capsid Protein Disordered N-Terminus and pep14-23-Based Inhibition, *ACS Chem. Biol.* 10 (2015) 517–526. doi:10.1021/cb500640t.
- [115] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat. Protoc.* 1 (2007) 2876–2890. doi:10.1038/nprot.2006.202.
- [116] S. Zhu, M.-A. Sani, F. Separovic, Interaction of cationic antimicrobial peptides from Australian frogs with lipid membranes, *Pept. Sci.* 110 (2018) e24061. doi:10.1002/pep2.24061.
- [117] É. Forde, G. Shafiy, D. Fitzgerald-Hughes, A.A. Strömstedt, M. Devocelle, Action of antimicrobial peptides and their prodrugs on model and biological membranes, *J. Pept. Sci.* (2018) e3086. doi:10.1002/psc.3086.
- [118] M.-C. Gagnon, E. Strandberg, A. Grau-Campistany, P. Wadhwani, J. Reichert, J. Bürck, F. Rabanal, M. Auger, J.-F. Paquin, A.S. Ulrich, Influence of the Length and Charge on the Activity of α -Helical Amphipathic Antimicrobial Peptides, *Biochemistry.* 56 (2017) 1680–1695. doi:10.1021/acs.biochem.6b01071.
- [119] O.G. Travkova, H. Moehwald, G. Brezesinski, The interaction of antimicrobial peptides with membranes, *Adv. Colloid Interface Sci.* 247 (2017) 521–532. doi:10.1016/J.CIS.2017.06.001.
- [120] D. Sengupta, H. Leontiadou, A.E. Mark, S.-J. Marrink, Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1778 (2008) 2308–2317. doi:10.1016/j.bbamem.2008.06.007.
- [121] A. Hollmann, M. Martinez, P. Maturana, L.C. Semorile, P.C. Maffia, Antimicrobial Peptides: Interaction With Model and Biological Membranes and Synergism With Chemical Antibiotics, *Front. Chem.* 6 (2018) 204. doi:10.3389/fchem.2018.00204.
- [122] † Brendan P. Mowery, † Sarah E. Lee, † Denis A. Kissounko, § Raquel F. Epand, § Richard M. Epand, ‡ Bernard Weisblum, *, † and Shannon S. Stahl, † Samuel H. Gellman*, Mimicry of Antimicrobial Host-Defense Peptides by Random Copolymers, (2007). doi:10.1021/JA077288D.
- [123] Z. Jiang, A.I. Vasil, J.D. Hale, R.E.W. Hancock, M.L. Vasil, R.S. Hodges, Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic α -helical cationic antimicrobial peptides, *Biopolymers.* 90 (2008) 369–383. doi:10.1002/bip.20911.
- [124] D. Takahashi, S.K. Shukla, O. Prakash, G. Zhang, Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity, *Biochimie.* 92 (2010) 1236–1241. doi:10.1016/j.biochi.2010.02.023.
- [125] A. Hollmann, M. Martínez, M.E. Noguera, M.T. Augusto, A. Disalvo, N.C. Santos,

- L. Semorile, P.C. Maffía, Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide–membrane interactions of three related antimicrobial peptides, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 141 (2016) 528–536. doi:10.1016/J.COLSURFB.2016.02.003.
- [126] P. Maturana, M. Martinez, M.E. Noguera, N.C. Santos, E.A. Disalvo, L. Semorile, P.C. Maffia, A. Hollmann, Lipid selectivity in novel antimicrobial peptides: Implication on antimicrobial and hemolytic activity, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 153 (2017) 152–159. doi:10.1016/J.COLSURFB.2017.02.003.
- [127] M.M. Domingues, S.C.D.N. Lopes, N.C. Santos, A. Quintas, M.A.R.B. Castanho, Fold-unfold transitions in the selectivity and mechanism of action of the N-terminal fragment of the bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI(21))., *Biophys. J.* 96 (2009) 987–96. doi:10.1016/j.bpj.2008.10.044.
- [128] G. Malgieri, C. Avitabile, M. Palmieri, L.D. D’Andrea, C. Isernia, A. Romanelli, R. Fattorusso, Structural Basis of a Temporin 1b Analogue Antimicrobial Activity against Gram Negative Bacteria Determined by CD and NMR Techniques in Cellular Environment, *ACS Chem. Biol.* 10 (2015) 965–969. doi:10.1021/cb501057d.
- [129] S.L. Grage, M.-A. Sani, O. Cheneval, S.T. Henriques, C. Schalck, R. Heinzmann, J.S. Mylne, P.K. Mykhailiuk, S. Afonin, I. V Komarov, F. Separovic, D.J. Craik, A.S. Ulrich, Orientation and Location of the Cyclotide Kalata B1 in Lipid Bilayers Revealed by Solid-State NMR., *Biophys. J.* 112 (2017) 630–642. doi:10.1016/j.bpj.2016.12.040.
- [130] M. Datrie, M. Schumann, T. Wieprecht, A. Winkler, M. Beyermann, E. Krause, K. Matsuzaki, O. Murase, M. Bienert, Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes, *Biochemistry*. (1996). doi:10.1021/bi960835f.