RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/11/2021.

UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Potencial antimicrobiano do peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K conjugado com o peptídeo Hy-a1 ou com peptídeos de penetração celular

MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA BRASIL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
2021

MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA BRASIL

“Potencial antimicrobiano do peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K conjugado com o peptídeo Hy-a1 ou com peptídeos de penetração celular”

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Eduardo Maffud Cilli

ARARAQUARA- SP
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

B823p

Brasil, Maria Carolina Oliveira de Arruda
Potencial antimicrobiano do peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K conjugado com o peptídeo Hy-a1 ou com peptídeos de penetração celular / Maria Carolina Oliveira de Arruda Brasil. – Araraquara : [s.n.], 2021
69 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Eduardo Maffud Cilli

1. Farmacorresistência bacteriana. 2. Antibióticos peptídicos. 3. Dímeros. 4. Mecanismo de ação (Bioquímica). 5. Agentes antibacterianos. I. Título.

Bibliotecária Responsável: Ana Carolina Gonçalves Bet - CRB8/8315

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Potencial antimicrobiano do peptídeo desCys11/Lys12/Lys13-(p-BthTX-I)2K conjugado com o peptídeo Hy-a1 ou com peptídeos de penetração celular"

AUTORA: MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA BRASIL

ORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI (Participaçao Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ESTEBAN NICOLÁS LORENZÓN (Participaçao Virtual)
Unidade Acadêmica Ciências da Saúde / Universidade Federal de Goiás - UFG - Jataí

Prof. Dr. GUILHERME RAMOS OLIVEIRA E FREITAS (Participaçao Virtual)
Instituto de Genética e Bioquímica / Universidade Federal de Uberlândia - UFU - Patos de Minas

Araraquara, 28 de junho de 2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, família, amigos e aos meus colegas de trabalho...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado força nos momentos difíceis, discernimento nos momentos de confusão e por ter guiado todos os meus passos até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli por ter me dado a chance de integrar ao seu grupo de pesquisa desde o meu estágio na faculdade. Pelo incentivo de não desistir e fazer o mestrado, pelas broncas necessárias que só me fizeram crescer como pessoa e pesquisadora, e por todo ensinamento passado.

Aos meus pais Maria Lúcia e Floriano por e terem dado força para seguir com o meu sonho de ser uma pesquisadora a vocês eu dedico todo este trabalho.

Ao meu coorientador o Prof. Dr. Norival Alves Santos-Filho por todo o suporte prestado e ensinamentos passados.

Aos meus irmãos Floriano e Pedro que sempre me deram força e alívio nos momentos de turbulência.

A todos os meus colegas de Laboratório Mariana, Paulo, Júlia, Jaff, Leticia, Sarah, Natália Costa, Natália Vitória, Marina, Augusto e Luani, por compartilharem o seu companheirismo, fazendo com que o trabalho fosse mais fácil e divertido.

Aos meus amigos Caio, Luiza, Letícia, Eduarda, Jéssica, Milayde por sua amizade e por todo o apoio.

Aos professores Dra. Cristiane Duque da Faculdade de Odontologia da Unesp Araçatuba, Dr. João Martins Pizauro Junior da Unesp campus Jaboticabal e Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo por disponibilizarem seus laboratórios para a realização dos testes biológicos.

A Unesp e ao Instituto de Química por fornecerem toda a estrutura necessária e pelo aprendizado.

A CAPES pela bolsa concedida, processo n° 88887.358023/2019-00.

“A educação é o nosso passaporte para o futuro, pois, o amanhã pertence as pessoas que se preparam hoje (Malcon X)”.

RESUMO

A resistência de microrganismos aos antibióticos é uma preocupação que vem crescendo à nível mundial, diversas cepas bacterianas com resistência a certas classes de quimioterápicos têm sido encontradas. A procura de alternativas para o tratamento de bactérias resistentes tem estimulado o estudo de novas classes de moléculas, como os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Os peptídeos Hy-a1 e desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K são exemplos de PAMs trabalhados por nosso grupo. O Hy-a1 possui o seu mecanismo de ação que consiste na permeabilização da membrana mediante a formação de poros; enquanto o peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K (p-Bt) apresenta um mecanismo diferente, não agindo diretamente na membrana. Com o objetivo de potencializar os efeitos antimicrobianos destes peptídeos, essas sequências foram conjugadas e sintetizadas utilizando-se a metodologia da síntese de peptídeos em fase sólida, na presença ou não de espaçadores. Os peptídeos obtidos não apresentaram atividade antimicrobiana potencializada em relação aos peptídeos originais, com exceção do p-Bt[PEG]Hy-a1, peptídeo conjugado com um espaçador PEG, que contra a cepa *A. jandaei* IA1 mostrou CIM de 15,63 µg/mL. O peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K também foi conjugado com os peptídeos de penetração celular (PPC) AIP-6 (PPC$_1$), PFV (PPC$_2$) e HIV-TAT (47-57) (PPC$_3$), descritos na literatura como bons carreadores em membranas celulares. Os resultados obtidos mostraram que a conjugação potencializou a atividade contra bactérias Gram-positivas, com destaque para o peptídeo p-Bt-PPC$_1$ que apresentou CIM de 8 µM. Esse aumento na atividade antibacteriana provavelmente é propiciado pela facilidade da entrada do peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K no interior da bactéria e sua ligação ao alvo. Estudos adicionais são necessários para entender o mecanismo de ação do peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K, uma promissora molécula no combate às bactérias multirresistentes.

Palavras-chave: Resistência bacteriana; Peptídeos antimicrobianos; desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K; Peptídeos de penetração celular.

ABSTRACT

The resistance of microorganisms to antibiotics is a growing concern worldwide, and several bacterial strains with resistance to certain classes of drugs have been found. The search for alternatives for the treatment of resistant bacteria has stimulated the study of new classes of molecules, such as antimicrobial peptides (AMPs). The peptides Hy-a1 and desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K are examples of PAMs worked on by our group. Hy-a1 has its mechanism of action that consists in the permeabilization of the membrane through pore formation; while the desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K (p-Bt) peptide presents a different mechanism, not acting directly on the membrane. In order to potentiate the antimicrobial effects of these peptides, these sequences were conjugated and synthesized using the methodology of solid phase peptide synthesis, in the presence or absence of spacers. The peptides obtained did not show enhanced antimicrobial activity compared to the original peptides, with the exception of p-Bt[PEG]Hy-a1, peptide conjugated with a PEG spacer, which against A. jandaei IA1 strain showed MIC of 15.63 µg/mL. The desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K peptide was also conjugated with the cell-penetrating peptides (PPC) AIP-6 (PPC$_1$), PFV (PPC$_2$) and HIV-TAT (47-57) (PPC$_3$), described in the literature as good carriers in cell membranes. The results obtained showed that the conjugation potentiated the activity against Gram-positive bacteria, especially for the p-Bt-PPC$_1$ peptide, which showed an MIC of 8 µM. This increase in antibacterial activity is probably propitiated by the ease of entry of the desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K peptide into bacteria and its binding to the target. Further studies are needed to understand the mechanism of action of the desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K peptide, a promising molecule in the fight against multidrug-resistant bacteria.

Key-words: Bacterial resistance; Antimicrobial peptides; desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K; Cell penetrating peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos.....19
Figura 2 - Mecanismo de ação dos peptídeos de penetração celular. 22
Figura 3 - Formação da ligação peptídica. 25
Figura 4 - Desenho representando o protocolo geral da síntese peptídica utilizada nesse trabalho.....26
Figura 5 - Estratégia de síntese utilizada nesse trabalho: a) com Hilina-a1; b) com PPC.....27
Figura 6 - Espectro de massas do peptídeo Cys-Bt-Hy-a1 34
Figura 7 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt-Hy-a1.....35
Figura 8 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt[PEG]Hy-a1 35
Figura 9 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto Cys-Bt-Hy-a1. 36
Figura 10 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt-Hy-a1 36
Figura 11 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt[PEG]Hy-a1. 37
Figura 12 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro Cys-Bt-Hy-a1. 38
Figura 13 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt-Hy-a1 38
Figura 14 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt[PEG]Hy-a1.....39
Figura 15 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt-PPC_1 40
Figura 16 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt-PPC_2.....41
Figura 17 - Espectro de massas do peptídeo p-Bt-PPC_3.....41
Figura 18 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt-PPC_1. 42
Figura 19 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt-PPC_2. 43
Figura 20 - Perfil cromatográfico do peptídeo bruto p-Bt-PPC_3. 43
Figura 21 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt-PPC_1 44
Figura 22 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt-PPC_2. 44
Figura 23 - Perfil cromatográfico do peptídeo puro p-Bt-PPC_3. 45
Figura 24 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt.....47
Figura 25 - Espectros de CD do peptídeo Hy-a1.....47
Figura 26 - Espectros de CD do peptídeo Cys-Bt-Hy-a1.....48
Figura 27 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt-Hy-a1. 48
Figura 28 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt[PEG]-Hy-a1.....49
Figura 29 - Espectros de CD do peptídeo PPC_1.....50
Figura 30 - Espectros de CD do peptídeo PPC_3.....50

Figura 31 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt-PPC$_1$. 51
Figura 32 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt-PPC$_2$. 51
Figura 33 - Espectros de CD do peptídeo p-Bt-PPC$_3$. 52
Figura 34 - Atividade hemolítica em eritrócitos humanos dos peptídeos Hy-a1, Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]Hy-a1. 59
Figura 35 - Atividade hemolítica em eritrócitos de peixes dos peptídeos Hy-a1, Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]Hy-a1. 59
Figura 36 - Atividade hemolítica dos peptídeos PPC$_2$ e p-Bt-PPC$_2$. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados das cepas oriundas da piscicultura. 30
Tabela 2 - Sequências e códigos dos bioconjugados peptídicos produzidos no projeto. 33
Tabela 3 - Rendimento da etapa sintética dos peptídeos conjugados com a Hy-a1. 34
Tabela 4 - Rendimento da clivagem dos peptídeos conjugados com o peptídeo Hy-a1. 34
Tabela 5 - Condições de purificação dos peptídeos Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]Hy-a1. 37
Tabela 6 - Rendimentos das sínteses dos peptídeos p-Bt-PPC_1, p-Bt-PPC_2 e p-Bt-PPC_3. 40
Tabela 7 - Rendimento da etapa de clivagem dos peptídeos p-Bt-PPC_1, p-Bt-PPC_2 e p-Bt-PPC_3. 40
Tabela 8 - Condições e resultados obtidos da purificação dos peptídeos p-Bt-PPC_1, p-Bt-PPC_2 e p-Bt-PPC_3. 42
Tabela 9 - Atividade antibacteriana dos peptídeos Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1, p-Bt[PEG]Hy-a1. 53
Tabela 10 - Atividade dos peptídeos Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1 e p-Bt[PEG]Hy-a1 em bactérias relacionadas à piscicultura. 55
Tabela 11 - Atividade antimicrobiana dos peptídeos p-Bt-PPC_1, p-Bt-PPC_2 e p-Bt-PPC_3 57
Tabela 12 - HC50 dos peptídeos Cys-Bt-Hy-a1, p-Bt-Hy-a1 e p-Bt-Hy-a1 em eritrócitos humanos e de peixes 58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
1.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA 12
1.1.1 Bactérias patogênicas de humanos. 14
1.1.2 Infecções bacterianas na psicultura. 15
1.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS 16
1.3 PEPTÍDEOS DE PENETRAÇÃO CELULAR 20
2 OBJETIVOS 24
2.1 OBJETIVO GERAL 24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24
3 MATERIAL E MÉTODOS 25
3.1 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA 25
3.2 CLIVAGEM DOS PEPTÍDEOS 27
3.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS 28
3.4 DICROÍSMO CIRCULAR 28
3.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA 28
3.5.1 Atividade antimicrobiana 29
3.5.2 Atividade hemolítica 30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 32
4.1 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA 32
4.2 DICROÍSMO CIRCULAR 45
4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA 52
4.3.1 Atividade antimicrobiana 52
4.3.1.1 Atividade antimicrobiana dos conjugados Cys- e p-Bt/Hy-a1 52
4.3.1.2 Atividade antimicrobiana do peptídeo conjugado p-Bt com PPCs 54
4.3.2 Atividade hemolítica 57
4.3.2.1 Atividade hemolítica dos peptídeos conjugados com Hy-a1 57
4.3.2.2 Atividade hemolítica dos peptídeos conjugados com PPCs 60
5 CONCLUSÃO 61
REFERÊNCIAS 62

1 INTRODUÇÃO

1.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Desde a sua descoberta, os antibióticos vêm tendo um papel essencial na prevenção de bacteremias como nos casos de transplantes, tratamento pós-cirúrgicos, pacientes com insuficiência renal em diálise e infecções microbianas (MANEGE; LIYANAGE, 2019; GONZÁLEZ-BELLO, 2017). Dados obtidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstraram que em cada grupo de 1.000 habitantes no ano de 2016; 22,75 habitantes faziam uso de antibióticos diariamente no Brasil, contabilizando 2.225 toneladas (WHO, 2018). Além de serem amplamente utilizados em humanos, os antibióticos também são empregados na prevenção e tratamento de doenças microbianas em animais (MANEGE; LIYANAGE, 2019). Estima-se que, a quantidade de antibióticos empregadas no mundo seja entre 100.000 a 200.000 toneladas ao ano (ZHU et al., 2018).

O uso de antibióticos de forma descontrolada nas indústrias de esterco e aquicultura, para a prevenção de doenças e promoção do crescimento dos animais; conjuntamente com o aumento das prescrições médicas para este tipo de medicamento, tem propiciado o surgimento de patógenos resistentes a múltiplas drogas. Isso causa infecções de difícil tratamento pelos antimicrobianos convencionais e disponíveis comercialmente, gerando uma grande ameaça à saúde humana e animal (AWASTHI et al., 2019; BEN et al., 2018; FRIERI et al., 2017). O número de patógenos bacterianos resistentes aos antimicrobianos atingiu níveis alarmantes, sendo encontrados em diversos países, independente do estágio de desenvolvimento, o que resulta em tratamentos mais complexos e procedimentos médicos mais invasivos (D’ ANDREA et al., 2019; WHO, 2019). As doenças causadas por essas cepas resistentes causam globalmente mais de 700.000 mortes por ano, sendo 230.000 por tuberculose multirresistente. Estima-se que este número possa aumentar para 10 milhões de mortes ao ano até 2050 (O’NEILL, 2014; WHO, 2019).

A resistência aos antimicrobianos é a capacidade de o microrganismo ser viável e sobreviver sob a influência dos mesmos. Os antimicrobianos podem ser naturais, sintéticos e semissintéticos. As utilizações destas moléculas podem causar alterações em nível fisiológico e metabólico, modificações na síntese da parede celular, inibição

da síntese de proteínas, inibição de vias metabólicas e interferência na tradução e replicação do DNA bacteriano (ABUSHAHEEN et al., 2020).

Existem três formas principais pelas quais os microrganismos adquirem resistência aos antimicrobianos: intrínseca, adaptativa e adquirida. As duas últimas são descritas como formas extrínsecas de obtenção de resistência (ARZANLOU et al., 2017; TINTINO et al., 2015). A resistência intrínseca ou natural, se refere a capacidade de limitar a ação dos antimicrobianos devido às propriedades inerentes das bactérias (ARZANLOU et al., 2017; CHRISTAKI et al., 2020).

A resistência adaptativa ocorre quando o organismo possui uma capacidade de se adaptar e sobreviver as condições de estresse do ambiente, como pH, condições nutricionais e níveis subinibitórios de antibióticos. Isso ocorre por meio da alteração de seus transcriptomas em resposta aos estímulos ambientais (ARZANLOU et al., 2017; CHRISTAKI et al., 2020). Diferente da resistência intrínseca e da resistência adquirida, a resistência adaptativa é transitória. É ela que permite que os microrganismos criem um mecanismo de defesa mais rápido aos antibióticos, porém ao não ter mais a influência do agente indutor, a bactéria retorna ao seu metabolismo natural (CHRISTAKI et al., 2020).

A resistência adquirida ocorre quando um organismo que é naturalmente suscetível aos antibióticos se torna resistente por conta da aquisição de genes ou por mutações por meio de fontes exógenas (transferência horizontal de genes) (ARZANLOU et al., 2017; CHRISTAKI et al., 2020). A transferência horizontal de genes ocorre por meio de três mecanismos principais: 1) transformação, que é recombinação de material genético, como a incorporação de fragmentos de DNA livres de um microrganismo morto ao cromossomo; 2) transdução, a qual consiste na transferência de material genético através de um bacteriófago; 3) conjugação, que consiste no contato célula a célula através de píli sexual, usando elementos genéticos móveis como os plasmídeos e os transposons, para transpassar genes. Porém o método mais eficiente para a acumulação de genes de resistência é representado pelos “integrons”, que são sistemas de recombinação sítios-específicos que podem recrutar quadros de leituras abertos na forma de cassete de genes móveis (CHRISTAKI et al., 2020; MUNITA; ARIAS, 2016). As mutações propiciadas por essas alterações podem afetar os mecanismos de ação de antimicrobianos por meio da mudança do seu alvo molecular, diminuindo a afinidade pela droga; ativando a bomba

de efluxo que elimina da célula a molécula ativa; ou mudando as vias metabólicas essenciais por meio de modulação de redes regulatórias (MUNITA; ARIAS, 2016).

1.1.1 Bactérias patogênicas de humanos.

Staphylococcus epidermidis é uma bactéria Gram-positiva coagulase negativa, que é encontrada na microbiota nasal e cutânea. Esta é considerada um patógeno oportunista, pois está relacionada com infecções nosocominais associadas a dispositivos médicos, como cateteres, válvulas cardíacas, implantes prostéticos e enxertos vasculares, principalmente em pacientes jovens e adultos imunocomprometidos (QI et al., 2018; BOTTAGISIO et al., 2020; SÁNCHEZ et al., 2020).

O patógeno Gram-positivo *Staphylococcus aureus* é frequentemente relacionado às infecções que afetam humanos e animais, como as cutâneas, endocardite, artrite séptica, pneumonia e sepse, entre outras; agindo ao nível hospitalar e comunitário. Devido as prescrições inadequadas de antibióticos é possível encontrar cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA), daptomicina (DRSA), β-lactâmicos e meticilina (MRSA) seus derivados (GONÇALVES et al., 2019; WU et al., 2019).

A bactéria oportunista Gram-positiva e anaeróbia facultativa *Enterococcus faecalis* é normalmente encontrada no trato gastrointestinal e urinário de animais e humanos. Essa bactéria é frequentemente transmitida por contaminação fecal, sendo causadora de septicemia, endocardite, infecções do trato urinário, peritonite e meningite por infecção na corrente sanguínea e feridas (NAHA et al., 2020; WEN et al, 2020). Atualmente são encontradas cepas de *E. faecalis* que apresentam resistência adquirida e intrínseca à diversos antibióticos comumente utilizados, como os macrolídeos e aminoglicosídeos, incluindo cepas resistentes a linezolida (LZD) e à vancomicina (VAN) (WEN et al. 2020).

O microrganismo Gram-negativo *Escherichia coli* é normalmente encontrado no trato digestivo de animais e humanos, no entanto algumas cepas podem causar infecções no trato gastrointestinal, urinário (ITU) e do sítio cirúrgico, síndrome hemolítica-urêmica (SHU), pneumonia e sepse (DAGA et al., 2019; SAROWSKA et al., 2019).

1.1.2 Infecções bacterianas na psicultura.

Embora o uso de antimicrobianos no tratamento contra microrganismos que afetam o ambiente aquático seja eficaz, a utilização destes compostos acaba gerando grande quantidade de resíduos, o que acarreta risco de desenvolvimento de resistência microbiana, afetando não apenas os organismos aquáticos, mas também aves e mamíferos (FERNANDES et al., 2019). Desta forma, a contribuição da aquicultura na resistência aos antimicrobianos deve ser controlada (LOZANO-MUÑOZ et al., 2021).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies de peixe comerciais mais importantes do mundo anualmente são produzidas 4,5 milhões de toneladas, com uma receita de 7,5 bilhões de dólares. Porém, as perdas econômicas geradas por cepas bacterianas na produção mundial desse peixe estão na ordem de 40 milhões de dólares anuais, o que representa uma grande ameaça a indústria da piscicultura (ETO et al., 2020).

Aeromonas hydrophilia (Ah) é uma das bactérias que afetam a piscicultura. Pertencente à família *Aeromonodaceae,* ela é Gram-negativa, anaeróbia facultativa, possui forma de bastonete, não formadora de esporo e com flagelos polares e cápsula móvel. Na tilápia do Nilo, a infecção causada pela Ah caracteriza-se por lesões hemorrágicas nas nadadeiras e úlceras na pele, e a sua disseminação nos tecidos causa, inflamação, necrose e falência de múltiplos órgãos (FERNANDES et al., 2019).

A Ewardsielose é uma doença causada pela bactéria Gram-negativa *Edwardsiella tarda*, a qual possui forma de bastonete. Ela afeta várias espécies de peixes economicamente importantes, promovendo grandes perdas econômicas. Os principais sintomas que caracterizam a infecção por este tipo de bactéria são a inflamação sistêmica, septicemia e, nos quadros graves, a morte (PHUMKHACHORN; RATTANACHAIKUNSOPON, 2018.).

Citrobacter freundii é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa e pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Sua patogenicidade tem sido associada a surtos de doenças em peixes cultivados, resultando em grandes perdas para a aquicultura devido a mortalidade e a baixa produtividade (JUNIOR et al., 2018; JIANG et al., 2020). Ela está associada as doenças encontradas na tilápia do Nilo (*O. niloticus*); no bagre (*Pseudoplatystoma reticulatum*); e na tilápia moçambicana (*Oreochromis mossambicus*) (JUNIOR et al., 2018).

Na indústria da aquicultura o *Streptococcus agalactiae* é considerado um patógeno importante, que também causa graves perdas econômicas globais (DONG et al., 2020). *S. agalactiae* é uma bactéria Gram-positiva comumente encontrada em peixes de água doce e salgada, sendo infecciosa em peixes, anfíbios, mamíferos, répteis, pássaros e humanos. Ela pode causar sepse, pneumonia e meningite em humanos, animais terrestres e peixes (WANG et al., 2018; DONG et al., 2020).

Lactococcus garvieae é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, de cocos ovoide, não móvel e causadora de meningoencefalite e septicemia fatal em animais, peixes e humanos (BWALYA et al., 2020; SHAHI; MALLIK, 2020). Os sinais clínicos em peixes incluem natação errática, anorexia, exoftalmia, conjuntivite, peritonite, melanose, congestão dos vasos sanguíneos e hemorragia interna (SHAHI; MALLIK, 2020).

1.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

Os peptídeos vêm se tornando nas últimas três décadas candidatos para aplicações na área médica (GRECO et al., 2020; MAHLAPUU, et al., 2016), na aquicultura, na agricultura e na indústria alimentícia, entre outras (SEYFI et al.,2020).

Com a crescente resistência dos microrganismos aos antibióticos tradicionais, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm sido avaliados como alternativa de tratamento para as infecções bacterianas (GRECO et al., 2020). Atualmente mais de 3.000 PAMs se encontram identificados no antimicrobial peptides database (ADP), e mais de 10.000 artigos foram publicados em 2019 sobre os PAMs, sendo que 36 sequências se encontram em fase pré-clínica ou clínica de estudo. Destas, sete têm aprovação para aplicação clínica pelo Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, sendo estes oritavancina, colistina, vancomicina, gramicidina D, dalbavancina, telavancina e daptomicina (KRISHNAN et al., 2020; LI et al., 2020; WANG, 2020).

Os PAMs podem ser encontrados em diversos organismos como insetos, plantas, peixes, bactérias e mamíferos, pois são componentes importantes da imunidade natural. Estes podem ser utilizados como antibacterianos, antivirais, antiparasitários e antifúngicos, fazendo com que se tornem compostos especialmente interessantes para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (MAHLAPUU, et al., 2016; SEYFI et al., 2020). Diferente dos antibióticos tradicionais, boa parte dos PAMs rompe a membrana celular tornando a célula inviável. Esse modo de ação torna

difícil o desenvolvimento de resistência, já que são necessárias diversas mutações para que ocorra a alteração dos componentes da membrana celular (LEI et al., 2019). Os PAMs são oligopeptídeos contendo entre 10 a 50 resíduos de aminoácidos, catiônicos (com duas ou mais cargas positivas), anfipáticos (quase 50% de seus aminoácidos são hidrofóbicos), e na grande maioria das vezes possuem estrutura helicoidal (CRUSCA et al., 2010; LEÓN-CALVIJO et al., 2015; MISHRA et al.,2018). Além dos PAMs que possuem estrutura em α-hélice, de acordo com suas características estruturais os PAMs podem ser classificados em outros 3 grupos: 1) ricos em cisteínas e folhas β estabilizadas por duas ou quatro ligações de dissulfeto; 2) PAMs contendo “loops” formados por uma única ligação de dissulfeto e; 3) PAMs com estruturas estendidas ricas em arginina, histidina, glicina, prolina e/ou triptofano (HANCOCK; SAHL, 2006; SANTOS-FILHO et al., 2017).

Os peptídeos α-helicoidais em solução se encontram estendidos ou não estruturados, mas ao terem contato com os fosfolipídeos anfipáticos da membrana se tornam helicoidais. Já os peptídeos com estrutura em folha β são normalmente muito mais ordenados em soluções aquosas e ambientes de membrana (TRAKOVA et al., 2017).

O principal mecanismo de ação dos PAMs é a permeabilização seguida pelo rompimento da membrana (CIUMAC et al., 2019). Para a interação do peptídeo com a célula temos como primeira etapa, o contato com a membrana aniônica por meio da interação eletrostática dos resíduos catiônicos dos peptídeos, com subsequente interação hidrofóbica entre as cadeias acila dos lipídeos e os resíduos apolares da sequência peptídica (LEI et al., 2021). Os mecanismos de ação na membrana são complexos, já que a sua atividade e seletividade celular dependem dos parâmetros físico-químicos dos peptídeos e também das membranas alvo (KUPPUSAMY et al., 2019). Além da ação na membrana, estes peptídeos podem atuar em alvos moleculares específicos, promovendo perturbação nas vias metabólicas e agindo nos componentes citoplasmáticos essenciais dos microrganismos, como o DNA e RNA, proteínas e enzimas (CIUMAC et al., 2019).

Vários modelos foram propostos para explicar a forma que os PAMs estruturados em α-hélice anfipática rompem as membranas, sendo alguns descritos abaixo. No modelo conhecido como barril, após a interação inicial com a superfície da membrana e estruturação, a face hidrofóbica do peptídeo interage com a cadeia hidrofóbica dos fosfolipídios e a sua superfície hidrofílica fica orientada para dentro do

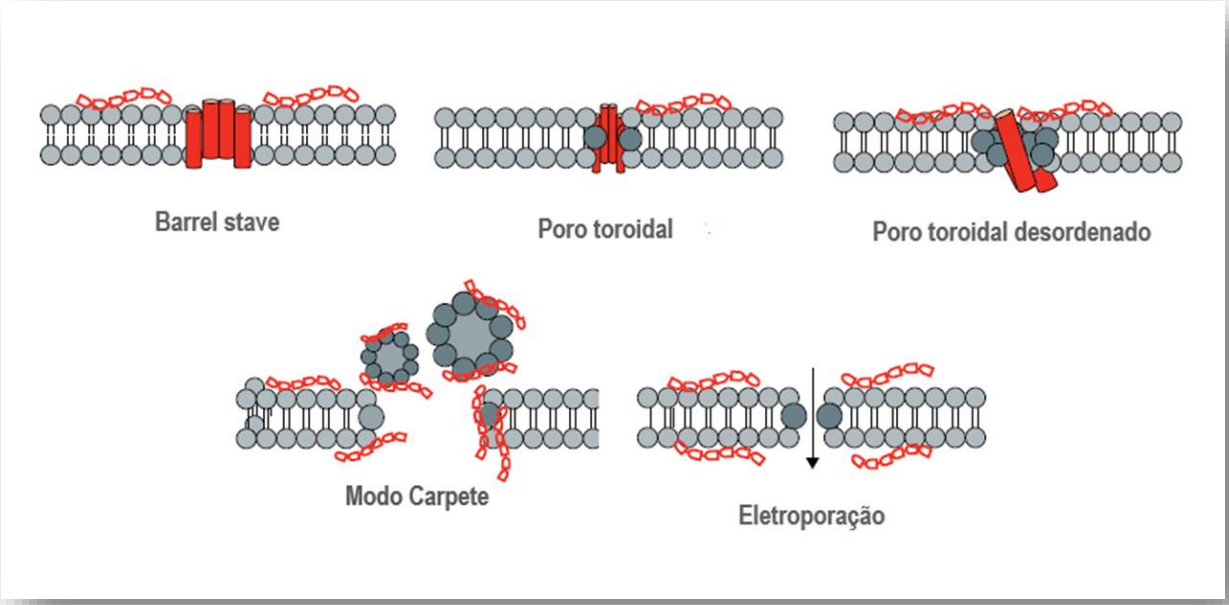
barril, formando poros (LORENZON, et al., 2019). No modelo toroidal, as moléculas dos peptídeos são adsorvidas e associadas à superfície da camada lipídica, e após mudança conformacional e forte interação com os lipídeos, poros formados de peptídeos e lipídeos são constituídos, contento em seu interior a face polar dos peptídeos e as cabeças polares dos lipídeos (KUPPUSAMY et al., 2019; CIUMAC et al., 2019). Um outro tipo de poro toroidal encontrado é o poro toroidal desordenado, o qual consiste em um poro semelhante ao anterior, mas não muito bem ordenado e com alta entropia (LORENZON, et al., 2019). O modelo de eletroporação propõe a formação de orifícios instáveis na membrana alterando a carga da mesma, o que muda o potencial da membrana e leva a lise celular (SEYFI et al., 2020). Outro mecanismo bem aceito é o modelo “tipo carpete” ou “tipo detergente”, onde os peptídeos se acumulam na superfície da bicamada lipídica, e quando se atinge uma “concentração limiar” ocorre a formação de agregados micelares, que exercem uma ação detergente e um processo de solubilização da membrana (figura 1) (LORENZON, et al., 2019; KUPPUSAMY et al, 2019; CIUMAC et al, 2019). De uma forma geral, cinco passos podem ser descritos na interação dos PAMs: 1) contato primário com as células alvos por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas; 2) ajuste estrutural na membrana alvo; 3) acúmulo até um nível estequiométrico ativo; 4) perturbação da membrana alvo por despolarização ou permeabilização, ou ainda por meio de qualquer outro mecanismo de ação, que pode ser transitório ou estável; e 5) acesso aos alvos finais e/ou a morte celular (MORAVEJ, 2018).

Além destes mecanismos, os PAMs também possuem ação contra biofilmes bacterianos (GALDIERO et al., 2019). Vários mecanismos são relatados dentre eles cinco são datados como principais: (1) degradação do polissacarídeo e da matriz do biofilme; (2) regulação negativa de genes responsáveis pelo transporte de proteínas de ligação e de genes responsáveis por biofilmes; (3) ruptura ou degradação do potencial de membrana de células incorporadas aos biofilmes principais; (4) inibição do sistema alarme para evitar a resposta bacteriana estringente; (5) interrupção dos sistemas de sinalização de células bacterianas (YASIR; WILLCOX; DUTTA, 2018).

Por mais que os PAMs apresentem diversos mecanismos de ação nos patógenos, incluindo a membrana celular, já são encontrados mecanismos de resistência (BECHINGER; GORR, 2017; CARDOSO et al., 2021). Esses envolvem a alteração de seu alvo (se específico) ou principalmente a hidrólise dos peptídeos e/ou remoção de seu local de ação. Estes mecanismos envolvem a secreção de proteases,

exportação dos peptídeos por bombas de efluxo, alteração da membrana citoplasmática e modificação de superfície, entre outros (CARDOSO et al., 2021). Entre as modificações nas membranas das células bacterianas temos como exemplo a acilação do grupo amino na cabeça do fosfatidil glicerol (CARDOSO et al., 2021). Um melhor entendimento destes mecanismos de resistência é fundamental para o desenvolvimento de novos PAMs com atividades terapêuticas (BECHINGER; GORR, 2017). Mesmo com a sua ação contra biofilmes eles também dificultam a ação dos PAMs, pois muitos não são capazes de adentrar nesta matriz, uma vez que os polissacarídeos capsulares e os exopolissacarídeos podem impedir a permeabilização por esta estrutura.

Figura 1 - Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos



Adaptado de: MAGANA et al., 2020

Inúmeros PAMs vem mostrando resultados promissores como antimicrobianos. Um deles é o peptídeo dimérico ligado por ponte de dissulfeto (p-BthTX-I)$_2$ (sequência [KKYRYHLKPFCKK]$_2$) isolado da toxina BthTX-I, da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*, que apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SANTOS-FILHO et al., 2015). O seu mecanismo de ação ainda não é bem definido, no entanto, esse peptídeo aparentemente não age diretamente na

membrana bacteriana, não possuindo capacidade de permeabilizar vesículas, e atua diferentemente nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SANTOS-FILHO et al., 2021). Adicionalmente, o nosso grupo mostrou que a retirada das duas lisinas situadas na região C-terminal desse peptídeo não promove perda de sua atividade antimicrobiana, sendo esse peptídeo foi obtido da degradação enzimática do peptídeo inicial (p-BthTX-I)$_2$ (SANTOS-FILHO et al., 2017). Outro experimento mostrou que o peptídeo dimerizado com um resíduo de lisina na extremidade C-terminal, em lugar dos resíduos de cisteína, peptídeo (desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K), apresenta atividade similar ou aumentada em relação ao dímero inicial (SANTOS-FILHO et al., 2018), sendo esse escolhido para ser avaliado nesse projeto.

Outro peptídeo utilizado nesse trabalho foi o Hilina a1 (Hy-a1) isolado de um sapo arborícola encontrado no Brasil chamado *Hypsiboas albopunctatus*, cuja sequência é IFGAILPLALGALKNLIK-NH_2. Essa molécula apresenta atividade contra bactérias e fungos. O seu modo de ação foi atribuído a formação de poros na membrana do microrganismo, causando assim a destruição do mesmo (CASTRO et al., 2009; CRUSCA et al., 2010). Desta forma, temos dois peptídeos com mecanismo de ação diferentes, e a conjugação entre eles poderia proporcionar a obtenção de moléculas mais ativas.

1.3 PEPTÍDEOS DE PENETRAÇÃO CELULAR

A lipofilicidade da biomembrana celular é um obstáculo no processo de penetração de fármacos que agem no interior da célula, sendo que muitas drogas não conseguem atingir completamente o seu alvo. Para contornar esse problema, muitos métodos vêm sendo desenvolvidos, como a perturbação da membrana, a utilização de nanocarreadores e utilização de peptídeos de penetração celular (PPCs), entre outros (GUI et al., 2020).

Os PPCs são uma família de peptídeos naturais ou sinteticamente obtidos e que são capazes de atravessar a membrana biológica por meio de processos dependentes ou independentes de energia (NEUNDORF, 2019; BÖHMOVÁ et al., 2018). Comparados com outras técnicas de translocação, os PPCs adentram as células de forma não invasiva e sem destruir a integridade das membranas, sendo considerados seguros e eficientes (RUSESKA; ZIMMER, 2020). A eficiência dos PPCs varia de acordo com sua estrutura, do tipo da célula alvo, da temperatura, da

concentração e tempo de exposição (BÖHMOVÁ et al., 2020). Os PPCs possuem uma sequência relativamente pequena, de 5 a 30 resíduos de aminoácidos, e sua conformação e estrutura química são altamente variáveis (BÖHMOVÁ et al., 2018; NEUNDORF, 2019; WATKINS et al., 2019). A aplicação desses peptídeos envolve o carreamento para o interior da célula de diversos tipos de moléculas, como outros peptídeos, proteínas, DNA, RNA, lipossomas, nanopartículas ou pequenas drogas orgânicas (NEUNDORF, 2019).

A taxonomia unificada destes peptídeos não existe, mesmo que vários critérios diferentes foram propostos com base na origem, sequência, função ou mecanismo de ação dos PPCs (GUIDOTTI et al., 2017; DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018). No entanto, eles podem ser categorizados em três subclasses: catiônicos, hidrofóbicos e anfipáticos (DASALE et al., 2020).

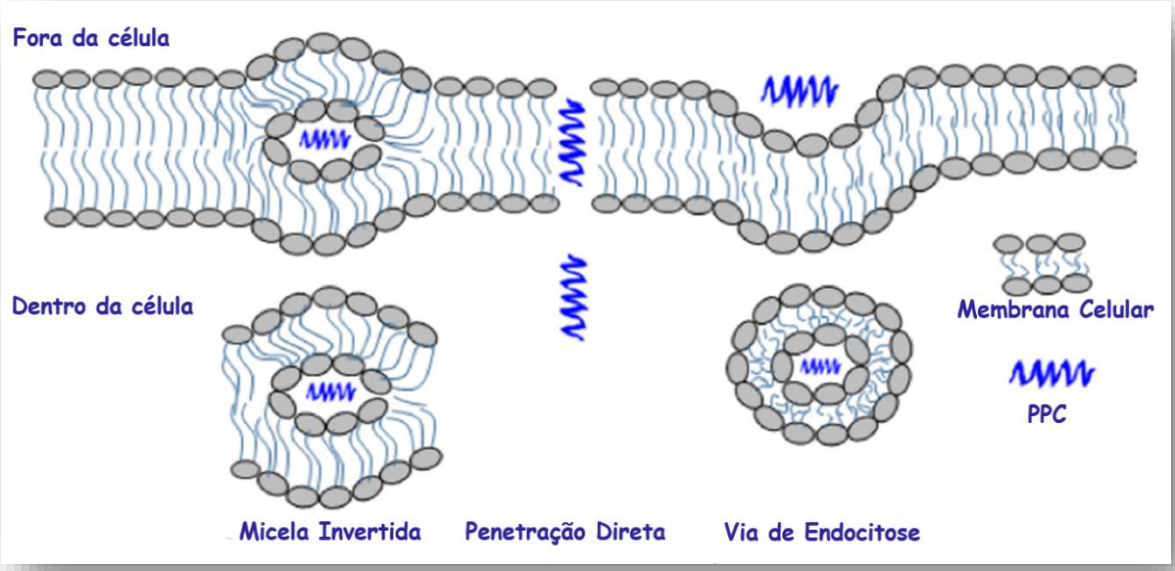
Os PPCs de classe catiônica consistem em peptídeos que contém grande quantidade de cargas positivas em pH fisiológico, possuindo em sua sequência múltiplos resíduos de lisinas e argininas (BÖHMOVÁ et al, 2018; DASALE et al., 2020; GUIDOTTI et al., 2017). A classe anfipática possui em sua sequência regiões polares (hidrofílicas) e apolares (hidrofóbicas) (BÖHMOVÁ et al., 2018; DASALE et al., 2020). Já os PPCs de classe hidrofóbica possuem aminoácidos hidrofóbicos em grande quantidade, como a leucina, alanina, isoleucina, triptofano, metionina e fenilalanina (BÖHMOVÁ et al., 2018). A alta hidrofobicidade de sua sequência possui alta afinidade com a parte hidrofóbica das membranas celulares, permitindo a interação e o carreamento (GUIDOTTI et al., 2017).

Com base em sua origem os PPCs podem ser divididos em sintéticos, derivados de proteínas e quiméricos. O PPC da família da poliarginina possui a arginina como um único componente estrutural sendo assim, um representante dos peptídeos sintéticos. Como exemplo de PPCs derivados de proteínas naturais, encontramos a penetratina e o HIV-TAT (47-57). OS PPCs quiméricos são compostos por dois ou mais motivos de peptídeos diferentes, tendo como um exemplo o “transportan” que é um peptídeo quimérico derivado da galanina e do mastoparan (DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018).

Embora cada PPC possua mecanismos diferentes de internalização, a literatura descreve três como principais, sendo estes, a endocitose, a penetração direta e a translocação por meio da formação de uma estrutura transitória (micela invertida) (figura 2) (DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018). No processo de endocitose, os

PPCs são transportados para dentro da membrana em mecanismo dependente de energia. Nesse processo a membrana se dobra para dentro, afim de transportar componentes externos para o interior da célula (DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018). Já na penetração direta, o processo acontece independente de energia, podendo ocorrer mesmo em temperaturas baixas e na presença de inibidores endocitóticos. Os mecanismos aceitos nesse caso, são os mesmos dos peptídeos antimicrobianos que agem na membrana, mas os poros formados são transitórios (DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018; GUIDOTTI et al, 2017).

Figura 2 - Mecanismo de ação dos peptídeos de penetração celular.



Adaptada de: DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018

Na translocação por meio da formação de uma estrutura transitória, ocorre o modelo de micela invertida, onde a interação do PPC com a membrana pode causar ruptura da bicamada lipídica, após a formação da estrutura invertida. Neste processo várias etapas ocorrem, entre elas, a captura dos PPCs do ambiente hidrofílico para o núcleo da micela, a interação da micela invertida com os componentes da membrana, a desestabilização das micelas e, por último, a liberação dos PPCs no citoplasma (DERAKHSHANKHAH; JAFARI, 2018).

O PPC hidrofóbico “PFV” de sequência PFVYLI é um peptídeo derivado do peptídeo C105Y de sequência CSIPPEVKFNKPFVYLI que corresponde aos resíduos 359-374 da α1-antripsina (RHEE; DAVIES, 2005). O PFV já foi utilizado para carrear siRNA, peptídeos pró-apoptóticos e sondas fluorescentes em diversas linhas celulares diferentes (CAI et al., 2013). O peptídeo catiônico HIV-TAT (47 a 57) de sequência YGRKKRRQRR é um peptídeo derivado da proteína de ligação e transativação do RNA (TAT) do vírus causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV-1). Ele é capaz de mediar a entrada de muitas macromoléculas biológicas exógenas nas células através de sua membrana (ZOU et al., 2017; GUI et al., 2020). Outro peptídeo com capacidade de penetração celular é o anti-inflamatório 6 (AIP-6) que é catiônico de sequência KRLRWR. Além de sua capacidade intrínseca de penetração celular o peptídeo já demonstrou em estudos *in vitro* e *in vivo* efeitos anti-inflamatórios significativos (WANG et al., 2011).

O desenvolvimento de novas moléculas visando o sistema de distribuição de drogas pode ser uma abordagem a ser utilizada para permitir a administração de PAMs, mantendo a sua atividade contra alvos específicos, aumentando o seu tempo de meia-vida e diminuindo efeitos tóxicos (SANTOS-FILHO et al., 2021). Por isso conjugamos o peptídeo desCys^{11}/Lys^{12}/Lys^{13}(p-BthTX-I)$_2$K, que aparentemente é específico a um alvo intracelular, com os PPCs citados acima para auxiliar a entrada do peptídeo na célula e otimizar a sua atividade.

5 CONCLUSÃO

A síntese peptídeo em fase sólida possibilitou a obtenção dos peptídeos utilizados com um bom rendimento.

Os peptídeos resultantes da conjugação da Hy-a1 com o peptídeo p-Bt mostraram menor atividade antimicrobiana, sendo que essa diminuição pode estar relacionada a mudança estrutural do peptídeo obtido, permitindo a interação com outros componentes da parede bacteriana e dificultando a interação com seu alvo. Porém mais estudos precisam ser feitos para a confirmação destes dados.

O peptídeo p-Bt[PEG]Hy-a1 apresentou uma boa atividade contra a cepa bacteriana de *A. jandaei* IA1, sendo o peptídeo da conjugação p-Bt/Hy-a1 (p-Bt-Hy-a1) o que obteve maior e mais diversificada atividade contra as bactérias.

Os peptídeos derivados da conjugação do p-Bt com os PPCs demonstraram resultados promissores contra bactérias Gram-positivas, como a *S. aureus*, sem perder atividade contra as bactérias Gram-negativas. Destaque para o peptídeo p-Bt-PPC_1, que mostrou o menor MIC.

A hemólise dos peptídeos conjugados Hy-a1 com o peptídeo p-Bt foi alta, resultado que pode ser explicado pela toxicidade apresentada pela Hy-a1, já que p-Bt não apresenta essa atividade.

A conjugação com os PPCs não apresentou atividade hemolítica, com exceção do peptídeo p-Bt-PPC_2, que pode ser explicada pelo aumento da hidrofobicidade do peptídeo p-Bt ao ser conjugado com o PPC_2.

Os resultados obtidos até o momento mostram que a conjugação p-Bt com PPCs torna o peptídeo ativo contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, indicando um caminho para o desenvolvimento de moléculas mais ativas contra vários tipos de bactérias.

Somado a isto, os dados aqui demonstrados podem contribuir para o entendimento do modo de ação dos peptídeos aqui estudados, e mostra que a conjugação de peptídeos não é um processo simples, sendo que mais estudos são necessários para um melhor entendimento do efeito da conjugação na atividade antibacteriana.

REFERÊNCIAS

ABUSHAHEEN, M. A.; FATANI, A. J.; ALOSAIMI, M.; MANSY, W.; GEORGE, M.; ACHARYA, S.; RATHOD, S.; DIVAKAR, D. D.; JHUGROO, C.; VELLAPPALLY, S.; KHAN, A. A.; SHAIK, J.; JHUGROO, P. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, p. 100971, 2020.

ALMAAYTAH, A.; QAOUD, M. T.; ABUALHAIJAA, A.; AL-BALAS, Q.; ALZOUBI, K. H. Hybridization and antibiotic synergism as a tool for reducing the cytotoxicity of antimicrobial peptides. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 835, 2018.

ARZANLOU, M.; CHAI, W. C.; VENTER, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. **Essays in biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 49-59, 2017.

ASSANE, I. M.; SANTOS-FILHO, N. A.; de SOUSA, E. L.; de ARRUDA BRASIL, M. C.O.; CILLI, E. M.; PILARSKI, F. Cytotoxicity and antimicrobial activity of synthetic peptides alone or in combination with conventional antimicrobials against fish pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 2021.

AWASTHI, M. K., HONGYU, T. L, VERMA, S., DUAN, Y., AWASTHI, S. K, WANG, Q., REN, X., ZHAO, J., ZHANG, Z. The behavior of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community during poultry manure composting. **Bioresource technology**, v. 280, p. 70-78, 2019.

BECHINGER, B.; GORR, S. U. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. **Journal of dental research**, v. 96, n. 3, p. 254-260, 2017.

BEN, Y., FU, C., HU, M., LIU, L., WONG, M. H., ZHENG, C. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. **Environmental research**, 2018.

BÖHMOVÁ, E., MACHOVÁ, D., PECHAR, M., POLA, R., VENCLÍKOVÁ, K., JANOUŠKOVÁ, O., ETRYCH, T. Cell-Penetrating Peptides: a Useful Tool for the Delivery of Various Cargoes Into Cells. **Physiological research**, v. 67, p. S267-S279, 2018.

BÖHMOVÁ, E.; POLA, R.; PECHAR, M. PARNICA, J.; MACHOVÁ, D.; JANOUŠKOVÁ, O.; ETRYCH, T. Polymer Cancerostatics Containing Cell-Penetrating Peptides: Internalization Efficacy Depends on Peptide Type and Spacer Length. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 59, 2020.

BOTTAGISIO, M.; BARBACINI, P.; BIDOSSI, A.; TORRETTA, E.; LANCEY-PULCINI, E.; GELFI, C.; JAMES, G. A.; LOVATI, A. B.; CAPITANIO, D. Phenotypic Modulation of Biofilm Formation in a Staphylococcus epidermidis Orthopedic Clinical Isolate Grown Under Different Mechanical Stimuli: Contribution From a Combined Proteomic Study. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 2194, 2020.

BWALYA, P.; HANG'OMBE, B. M.; GAMIL, A. A.; MUNANG'ANDU, Ø. E.; MUTOLOKIL, S. A whole-cell *Lactococcus garvieae* autovaccine protects Nile tilapia against infection. **Plos one**, v. 15, n. 3, p. e0230739, 2020.

CAI, D.; GAO, W.; HE, B.; DAI, W.; ZHANG, H.; WANG, X.; WANG, J.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. Hydrophobic penetrating peptide PFVYLI-modified stealth liposomes for doxorubicin delivery in breast cancer therapy. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2283-2294, 2014.

CARDOSO, P.; GLOSSOP, H.; MEIKLE, T. G.; ABURTO-MEDINA, A.; CONN, C. E.; SAROJINI, V.; VALERY, C. Molecular engineering of antimicrobial peptides: microbial targets, peptide motifs and translation opportunities. **Biophysical Reviews**, p. 1-35, 2021.

CASTRO, M. S., FERREIRA, T. C. G., CILLI, E. M. CRUSCA JR, E., MEDES-GIANNINI, M. J. S., SEBBEN, A., RICART, C. A., SOUSA, M. V., FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog Hypsiboas albopunctatus (“spotted treefrog”). **Peptides**, 2009, 30.2: 291-296.

CASALLANOVO, F.; OLIVEIRA F. J. F.; SOUZA F. C.; ROS, U.; PENTÓN, D.; TEJUCA, M.; MARTÍNEZ, D.; PAZOS, F.; PERTINHEZ, T. A.; SPISNI, A.; CILLI, E. M.; LANJO, M. E.; ALVAREZ, C.; SCHREJER, S. Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. **Biopolymers,** v. 84, n. 2, p. 169-80, 2006.

CIUMAC, D., GONG, H., HU, X., LU, J. R. Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. **Journal of colloid and interface science**, v. 537, p. 163-185, 2019.

CHEN, H.; BATTALAPALLI, D.; DRAZ, M. S.; ZHANG, P.; RUAN, Z. The Application of Cell-Penetrating-Peptides in Antibacterial Agents. **Current Medicinal Chemistry**, 2021.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of molecular evolution**, v. 88, n. 1, p. 26-40, 2020.

CRUSCA JR, E., REZENDE, A. A., MARCHETTO, R., MENDES-GIANNINI, M. J. S, FONTES, W., CASTRO, M. S., CILLI, E. M. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a1. **Peptide Science**, 2011, 96.1: 41-48.

DAGA, A. P.; KOGA, V. L.; SONCINI, J. G. M.; MATOS, C. M.; PERUGINI, M. R. E.; PELISSON, M.; KOBAYASHI, R. K. T.; VESPERO, E. C. Escherichia coli bloodstream infections in patients at a university hospital: virulence factors and clinical characteristics. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 191, 2019.

D’ANDREA, M. M.; FRAZIANO, M.; THALLER, M. C.; ROSSILINI, G. M. The Urgent Need for Novel Antimicrobial Agents and Strategies to Fight Antibiotic Resistance. 2019.

DESALE, K.; KUCHE, K.; JAIN, S. Cell-penetrating peptides (CPPs): an overview of applications for improving the potential of nanotherapeutics. **Biomaterials Science**, 2021.

DERAKHSHANKHAH, H.; JAFARI, S. Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1090-1096, 2018.

DONG, J.; ZHANGA, L.; XUA, N., ZHOUA, S.; SONGC, Y.; YANGA, Q.; LIUA, Y.; YANGA, Y.; AIA, X. Rutin reduces the pathogenicity of Streptococcus agalactiae to tilapia by inhibiting the activity of sortase A. **Aquaculture**, v. 530, p. 735743, 2021.

ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; MORAES, A. C.; ALECRIM, J. V. C., SOUZA, P. G.; CARVALHO, F. C. A.; CHARLIE-SILVA, I.; BELO, M. A. A.; PIZAURO, J. M. Meningitis Caused by Streptococcus agalactiae in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus): Infection and Inflammatory Response. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2166, 2020.

FERNANDES, D. C.; ETOB, S. F.; FUNNICELLIB, M. I. G.; FERNANDES, C. C.; CHARLIR-SILVAC, I.; BELOC, M. A. A.; PIZAURO, J. M. Immunoglobulin Y in the diagnosis of Aeromonas hydrophila infection in Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Aquaculture, v. 500, p. 576-585, 2019.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of infection and public health**, v. 10, n. 4, p. 369-378, 2017.

GALDIEIRO, E.; LOMBARDI, L.; FALANGA, A.; LIBRALATO, G.; GUIDA, M.; CAROTENUTO, R. Biofilms: Novel strategies based on antimicrobial peptides. **Pharmaceutics,** v. 11, n. 7, p. 322, 2019.

GONÇALVES, E.; CARVALHAL, R; MESQUITA, R.; AZEVEDO, J., COELHO, M. J.; MAGALHÃES, R., FERRAZ, M. P.; MANSO, M. C.; GAVINHA, S.; PINA, C.; CARDOSO, I. L. Detection of Staphylococcus aureus (MRSA/MSSA) in surfaces of dental medicine equipment. **Saudi journal of biological sciences**, v. 27, n. 4, p. 1003-1008, 2020.

GONZÁLEZ-BELLO, C. Antibiotic adjuvants–A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 27, n. 18, p. 4221-4228, 2017.

GRECO, I.; MALCHANOVA, N.; HOLMEDAL, E.; JENSSEN, H.; HUMMEL, B. D.; WATTS, J. L.; HÅKANSSON, J.; HANSEN, P. R.; SVENSON, J. Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.

GUI, L.; ZHANG, X. H.; QIAO, Z. Y.; WANG, H. Cell-Penetrating Peptides and Polymers for Improved Drug Delivery. **ChemNanoMat**, v. 6, n. 8, p. 1138-1148, 2020.

GUIDOTTI, G.; BRAMBILLA, L.; ROSSI, D. Cell-penetrating peptides: from basic research to clinics. **Trends in pharmacological sciences**, v. 38, n. 4, p. 406-424, 2017.

GUIMARÃES, C. F. R. C. Síntese de peptídeos: cinética de dimerização via formação de ligação de dissulfeto, obtenção e estudos biofísicos de glicotriazol-peptídeos. 2017. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de Minas Gerais.

HANCOCK, R.E.; SAHL, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new antiinfective therapeutic strategies. **Nat. Biotechno**l. 2006, 24, 1551–1557.

HANSEN, P. R.; ODDO, A. Fmoc solid-phase peptide synthesis. In: **Peptide Antibodies**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 33-50.

JIANG, X.; YANG, K.; YUAN, B.; HAN, M; ZHU, Y.; ROBERTS, K. D.; PATIL, N. A., LI, J.; GONG, B.; HANCOCK, R. E. W., VELKOV, T., SCHREIBER, F.; WANG, L. LI, J. Molecular dynamics simulations informed by membrane lipidomics reveal the structure–interaction relationship of polymyxins with the lipid A-based outer membrane of Acinetobacter baumannii. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3534-3543, 2020.

JUNIOR, G. B.; SANTOS, A. C.; SOUZA, C. F.; BALDISSERAB, M. D.; MOREIRAC, K. L. S.; VEIGAC, M. L.; ROCHAC, M. I. U. M.; VARGASD, A. P. C.; CUNHA, M. A.; BALDISSEROTTO, B. Citrobacter freundii infection in silver catfish (Rhamdia quelen): hematological and histological alterations. **Microbial pathogenesis**, v. 125, p. 276-280, 2018.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D., COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595, 1970.

KIMURA, M.; KOSUGE, K.; KUROSAKI, N.; TAGAWA, N.; KATO, I.;UCHIDA, Y. Potent Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Designed from Salusin-β and HIV-1 Tat (49-57). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, p. c20-00209, 2020.

KRISHNAN, M.; CHOI, J.; JANG, A.; KIM, Y. A Novel Peptide Antibiotic, Pro10-1D, Designed from Insect Defensin Shows Antibacterial and Anti-Inflammatory Activities in Sepsis Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6216, 2020.

KUPPUSAMY, R.; WILLCOX, M.; BLACK, D. StC; KUMAR, N. Short Cationic Peptidomimetic Antimicrobials. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 44, 2019.

LEE, H., LIM, S. I., SHIN, S. H., LIM, Y., KOH, J. W., YANG, S. Conjugation of Cell-Penetrating Peptides to Antimicrobial Peptides Enhances Antibacterial Activity. **ACS omega**, v. 4, n. 13, p. 15694-15701, 2019.

LEÓN-CALVIJO, M. A.; LEAL-CASTRO, A. L.; ALMANZAR-REINA, G. A.; ROSASPÉREZ, J. E.; GARCÍA-CASTAÑEDA, J. E; RIVERA-MONROY, Z. Antibacterial activity of synthetic peptides derived from lactoferricin against Escherichia coli ATCC 25922 and Enterococcus faecalis ATCC 29212. **BioMed research international**, 2015, 2015.

LEI, J.; SUN, L.; HUANG, S.; ZHU, C.; LI, P.; MACKEY, V.; COY, D. H.; HE, Q. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. **American journal of translational research**, v. 11, n. 7, p. 3919, 2019.

LORENZON, E. N.; PICCOLI, J. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; CILLI, E. M. Dimerization of antimicrobial peptides: A promising strategy to enhance antimicrobial peptide activity. **Protein and peptide letters**, v. 26, n. 2, p. 98-107, 2019.

LI, S.; WANG, Y.; XUE, Z.; JIA, Y.; LI, R.; HE, C.; CHEN, H. The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

LOZANO-MUÑOZ, I.; WACYK, J.; KRETSCHMER, C.; V'ASQUEZ-MARTÍNEZ, Y.; MARTIN, M. C. S. Antimicrobial resistance in Chilean marine-farmed salmon: Improving food safety through One Health. **One Health**, p. 100219, 2021.

MAGANA, M.; PUSHPANATHAN, M.; SANTOS, A. L.; LEANSE, L.; FERNANDEZ, M.; IOANNIDIS, A.; GIULIANOTTI, M. A.; APIDIANAKIS, Y.; BRADFUTE, S.; FERGUSON, A. L.; CHERKASOV, A.; SELEEM, M. N.; PINILLA, C.; FUENTE-NUNEZ, C.; LAZARIDIS, T.; DAI, T.; HOUGHTEN, R. A.; HANCOCK, R. E. W.; TEGOS, G. P. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, 2020.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTADN BJÖRN, C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 194, 2016.

MAI, X.; HUANG, J.; TAN, J.; HUANG, Y.; CHEN, Y. Effects and mechanisms of the secondary structure on the antimicrobial activity and specificity of antimicrobial peptides. **Journal of Peptide Science**, v. 21, n. 7, p. 561-568, 2015.

MANAGE, P. M.; LIYANAGE, G. Y. Antibiotics induced antibacterial resistance. In: Pharmaceuticals and Personal Care Products: Waste Management and Treatment Technology. **Butterworth-Heinemann**, 2019. p. 429-448.

MANZINI, M. C. Efeito da carga dos lipídios na interação do BP100 em modelos de membrana. 2012. **Tese de Doutorado.** Universidade de São Paulo.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MISHRA, A. K.; CHOI, J.; MOON, E.; BAEK, K. H. Tryptophan-rich and proline-Rich antimicrobial peptides. **Molecules**, 2018, 23.4: 815.

MORAVEJ, H.; MORAVEJ, Z.; YAZDANPARAST, M.; HEIAT, M.; MIRHOSSEINI, A.; MOGHADDAM, M. M.; MIRNEJAD, R. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p. 747-767, 2018.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**, p. 481-511, 2016.

MURAKAMI, L. M. Z.; RULLE, R. Uso da técnica de dicroísmo circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas. 2016. **Memorando Técnico.** Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais.

NAHA, A.; MIRYALA, S. K.; DEBROY, R.; RAMAIAH, S.; ANBARASU, A. Elucidating the multi-drug resistance mechanism of Enterococcus faecalis V583: a gene interaction network analysis. **Gene**, v. 748, p. 144704, 2020.

NEUNDORF, I. Antimicrobial and Cell-Penetrating Peptides: How to Understand Two Distinct Functions Despite Similar Physicochemical Properties. In: **Antimicrobial Peptides**. Springer, Singapore, 2019. p. 93-109.

ONUMA, Y.; SAKATAKAE, M.; UKENA, T.; ROUX, J.; CHANTEAU, S.; RASOLOFONIRINA, N.; RATSIMALOTO, M. NAOKI, H.; YASUMOTO, T. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 55-65, 1999.

O'NEILL, J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Rev. Antimicrob. Resist**, 2014, 20: 1-16.

PHUMKHACHORN, P.; RATTANACHAIKUNSOPON, P. A lytic podophage specific to fish pathogenic Edwardsiella tarda. Pak. **J. Biotechnol**, v. 15, n. 1, p. 117-121, 2018.

QI, X.; JIN, Y; DUAN, J.; HAO, Z.; WANG, S.; GUO, Y.; LV, J.; HU, L.; WANG, L.; YU, F. SesI may be associated with the invasiveness of Staphylococcus epidermidis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2574, 2018.
RHEE, M.; DAVIS, P. Mechanism of uptake of C105Y, a novel cell-penetrating peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 2, p. 1233-1240, 2006.

RUSESKA, I.; ZIMMER, A. Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 11, n. 1, p. 101-123, 2020.

SÁNCHEZ, A.; BENITO, N.; RIVERA, A.; GARCÍA, L.; MIRÓ, E.; MURC, I.; GONZÁLEZ Y.; GUTIÉRREZ, C.; HORCAIADA, J. P.; ESPINAL, P.; NAVARRO, F. Pathogenesis of Staphylococcus epidermidis in prosthetic joint infections: can identification of virulence genes differentiate between infecting and commensal strains?. **Journal of Hospital Infection**, v. 105, n. 3, p. 561-568, 2020.

SANTOS-FILHO, N. A.; LORENZON, E. N.; RAMOS, M. A. S.; SANTOS C. T.; PICCOLI, J. P; BAUAB, T. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; CILLI, E. M. Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I. **Toxicon**, v. 103, p. 160-168, 2015.

SANTOS-FILHO, N. A.; FERNANDES, R. S.; SGARDIOLI, B. F.; RAMOS, M. A. S.; PICCOLI, J. P.; CAMARGO, I. L. B. C.; BAUAB, T. M.; CILLI, E. M. Antibacterial Activity of the Non-Cytotoxic Peptide (p-BthTX-I) 2 and Its Serum Degradation Product against Multidrug-Resistant Bacteria. **Molecules**, 2017, 22.11: 1898.

SANTOS-FILHO, N. A.; CAMARGO, I. L. B. C.; RIGETTO, G. M.; LEAL, T. C., CILLI, E. M. **PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS DIMÉRICOS des-Cys^{11}/Lys^{12}Lys^{13}-(pBthTXI) K [Trp 3, 5], des-Cys^{11}/Lys^{12}Lys^{13}-(pBthTXI) K E [Trp 3, 5, 10], des-Cys^{11}/Lys^{12}Lys^{13}-(pBthTXI) K E SEUS USOS COMO ANTIMICROBIANO.** Depositante: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Procurador: Renan Padron Almeida. BR1020180719149. Depósito: 24 out. 2018

SANTOS-FILHO, N. A.; de FREITAS, L. M; SANTOS, C. T; PICCOLI, J. P; FONTANA, C. R.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; CILLI, E. M. Understanding the mechanism of action of peptide (p-BthTX-I) 2 derived from C-terminal region of phospholipase A2 (PLA2)-like bothropstoxin-I on Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Toxicon**, 2021.

SAROWSKA, J.; FUTOMA-KOLOCH, B.; JAMA-KMIECIK, A.; FREJ-MADRZAK, M.; KSIAZCZYK, M.; BUGLA-PLOSKONSKA, G.; CHOROSZY-KROL, I. Virulence factors,

prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from different sources: recent reports. **Gut pathogens**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2019.

SEYFI, R.; KAHAKI, F. A.; EBRAHIMI, T.; MONTAZERHEB, S.; EYVAZI, S.; BABAEIPOUR, V.; TARHRIZ, V. Antimicrobial peptides (AMPs): roles, functions and mechanism of action. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 1451-1463, 2020.

SHAHI, N.; MALLIK, S. K. Emerging bacterial fish pathogen Lactococcus garvieae RTCLI04, isolated from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Genomic features and comparative genomics. **Microbial Pathogenesis**, v. 147, p. 104368, 2020.

TRAVKOVA, O. G.; MOEHWALD, H.; BREZESINSKI, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Advances in colloid and interface science**, v. 247, p. 521-532, 2017.

WATKINS, C. L.; BRENNAN, P.; FEGAN, C.; TAKAYAMA, K.; NAKASE, I.; FUTAKI, S.; JONES, A. T. Cellular uptake, distribution and cytotoxicity of the hydrophobic cell penetrating peptide sequence PFVYLI linked to the proapoptotic domain peptide PAD. **Journal of Controlled Release**, v. 140, n. 3, p. 237-244, 2009.

WANG, G. The antimicrobial peptide database provides a platform for decoding the design principles of naturally occurring antimicrobial peptides. **Protein Science**, v. 29, n. 1, p. 8-18, 2020.

WANG, Q.; WANGA, X.; WANGD, X.; FENGE, R.; LUOA, Q.; HUANGA, J. Generation of a novel Streptococcus agalactiae ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in tilapia. Fish & shellfish immunology, v. 81, p. 49-56, 2018.

WANG, T.; ZOU, C.; WEN, N.; LIU, X.; MENG, Z.; FENG, S.; ZHENG, Z., MENG, Q., WANG, C. The effect of structural modification of antimicrobial peptides on their antimicrobial activity, hemolytic activity, and plasma stability. **Journal of Peptide Science**, p. e3306, 2021.

WANG, Y. F., XU; X., FAN, X.; ZHANG, C.; WEI, Q.; WANG, X.; GUO, W.; XING, W.; YU, J.; YAN, J. L.; LIANG, H. P. A cell-penetrating peptide suppresses inflammation by inhibiting NF-κB signaling. **Molecular Therapy**, v. 19, n. 10, p. 1849-1857, 2011.

WEI, Y.; THYPARAMBIL, A. A.; LATOUR, R. A. Protein helical structure determination using CD spectroscopy for solutions with strong background absorbance from 190 to 230 nm. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 12, p. 2331-2337, 2014.

WEN, Z.; SHANG, Y.; XU, G.; PU; Z.; LIN, Z.; BAI, B.; CHEN, Z., ZHENG, J.; DENG, Q.; YU, Z. Mechanism of eravacycline resistance in clinical Enterococcus faecalis isolates from China. Frontiers in Microbiology, v. 11, p. 916, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental aspects of manufacturing for the prevention of antimicrobial resistance. **WHO Drug Information**, v. 33, n. 4, p. 709-712, 2019.

WU, S. C.; LIU, F.; ZHU, K.; SHEN, J. Z. Natural products that target virulence factors in antibiotic-resistant Staphylococcus aureus. Journal of agricultural and food chemistry, v. 67, n. 48, p. 13195-13211, 2019.

YASIR, M.; WILLCOX, M. D. P.; DUTTA, D. Action of antimicrobial peptides against bacterial biofilms. **Materials**, v. 11, n. 12, p. 2468, 2018.

ZOU, L.; PENG, Q.; WANG, P.; ZHOU, B. Progress in research and application of HIV-1 TAT-derived cell-penetrating peptide. **The Journal of membrane biology**, v. 250, n. 2, p. 115-122, 2017.