

ADEPAMICINA: UM PROMISSOR AGENTE ANTIMICROBIANO DERIVADO DE UM INIBIDOR DE PEPTIDASE DE *Adenantha pavonina*.

Luís H. de O. Almeida¹, Caio F. R. de Oliveira², Mayara de S. Rodrigues¹, Simone M. Neto¹, Camila P. Martins¹, Edson L. dos Santos², Edson C. Júnior³, Maria L. R. Macedo¹

1. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

2. Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

3. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

Resumo

Os peptídeos antimicrobianos (PAM) são uma classe de substâncias de amplo espectro de ação contra microorganismos, podendo ser naturais ou sintéticas. Neste trabalho objetivamos a construção de um novo PAM baseada na sequência de aminoácidos de um inibidor de peptidase vegetal isolado de sementes de *Adenantha pavonina* (ApTI). O PAM foi projetado utilizando ferramentas de bioinformática e denominado Adepamicina. Foram realizados ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro*, que comprovaram a eficácia e buscaram o método de ação do peptídeo. Os resultados obtidos com Adepamicina foram satisfatórios; tendo sua atividade antimicrobiana comprovada contra *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. O mecanismo de ação da Adepamicina foi estudado utilizando a cepa de *E. coli*, que apresentou uma melhor CIM (0,9 µM), e constatou-se que a Adepamicina causa distúrbios da membrana, levando à liberação do material intracelular.

Autorização legal: SISGEN A297FAA

Palavras-chave: bioinformática; bactéria; peptídeo.

Apoio financeiro: CAPES, CNPq, FUNDECT

Introdução

O aumento significativo do aparecimento de microorganismos resistentes aos antimicrobianos tornou-se um desafio para a saúde global (Davies, 2010). A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017) publicou uma lista com as 12 "superbactérias" consideradas as mais perigosas devido à gravidade das infecções identificadas em vários órgãos do corpo humano, como a cutânea, pulmão e estômago. Outro motivo de preocupação é o número de óbitos devido a infecções bacterianas que não são tratadas efetivamente. Estudos mostram que até o ano 2050 mais de 10 milhões de pessoas morrerão por falta de tratamento, causando mais mortes do que outras doenças, como câncer (O'Neill, 2016).

Em busca de uma alternativa aos antimicrobianos comuns, diversas pesquisas têm sido realizadas para o desenvolvimento de novas moléculas (Guimarães *et al.*, 2010). No desenvolvimento de novos fármacos com potencial antimicrobiano, os PAMs têm sido destacados (Czaplewski *et al.*, 2016)

Os PAM's são oligopeptídeos (6 a 100 resíduos de aminoácidos) que possuem atividade antimicrobiana de amplo espectro (Bahar *et al.*, 2013). A maioria dos PAMs contém uma carga líquida de +2 a +11, (Yeaman & Yount, 2003). Os PAMs contêm uma porção (≥ 30%) de resíduos hidrofóbicos e outra porção de resíduos hidrofílicos, adquirindo assim o caráter anfipático (Zasloff, 2002). Os PAMs são encontrados em todos os organismos vivos e possuem uma enorme variedade estrutural e funcional. Além da atividade antimicrobiana, os PAMs possuem propriedades imunomoduladoras, o que os torna compostos promissores no desenvolvimento de novas terapias (Fjell *et al.*, 2012).

Como auxílio na descoberta de novos PAM a bioinformática tornou-se uma ferramenta indispensável, pois há uma drástica redução nos gastos e tempo (Maccari *et al.*, 2015).

Nesse sentido, um PAM baseado na sequência de aminoácidos do inibidor de peptidase de *Adenantha pavonina* foi projetado utilizando bioinformática avançada, correlacionando diversas características físico-químicas, com objetivo de obter uma molécula potente frente microorganismos causadores de doenças.

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001.

Metodologia

A partir de uma proteína denominada ApTI, foram obtidos peptídeos com dezoito resíduos de aminoácidos através da clivagem *in silico* pelo software CAMPr3 (Waghu *et al.*, 2016). Posteriormente, as sequências com as melhores predições para peptídeos antimicrobianos foram analisadas no APD3 database, o qual fornece dados físico-químicos (Wang *et al.*, 2016). A roda helicoidal, gerada pelo software Helical foi utilizada para verificar o caráter anfipático das moléculas e, assim, fazer as devidas modificações estruturais, seja alteração de posição ou substituição de resíduos de aminoácidos. Após isso, o peptídeo com melhor predição a PAM, denominado Adepamicina, foi escolhido e realizado os estudos quanto a sua atividade e estrutura. A modelagem *Ab initio* foi feita utilizando o software I-TASSER (Zhang, 2008) e sua validação feita

através do Diagrama de Ramachandran.

Adepamicina foi sintetizado através de um protocolo de síntese química em fase sólida F-moc, purificados (> 95%) e liofilizados pela empresa GENONE. A concentração de Adepamicina foi determinada baseado no coeficiente de extinção dos resíduos de aminoácidos aromáticos. Para comprovação da atividade biológica, foi feito o teste da atividade antimicrobiana *in vitro*, obtendo a CIM, seguindo o protocolo M2-A8 (CLSI, 2012).

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada com sangue de carneiro desfibrilado, tendo controle positivo uma solução Triton X-100 0,01%, na qual foi obtida uma curva da atividade hemolítica (Uggerhøj, 2015). A citotoxicidade foi avaliada de acordo com Mosman (1983), usando células de fibroblasto humano oriundo de tecido de pulmão (MRC-5), as quais foram cultivadas e incubadas com Adepamicina em diferentes concentrações, e então calculada a viabilidade celular através da absorbância. A morte de células bacterianas por tratamento com Adepamicina foi avaliada no ensaio de tempo-dependente conforme descrito por Mitić-Ćulafić *et al* (2005). A alteração na permeabilidade da membrana foi detectada pelo ensaio do cristal violeta (Vaara; Vaara, 1981), e a liberação de ácidos nucleicos foi mensurada pela leitura de OD_{260 nm} (Zhou *et al.*, 2008).

As análises com relação a conformação e capacidade de permeabilização de Adepamicina foram realizadas através de Dicroísmo Circular (CD), que foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Inc., Japão), utilizando uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico, como descrito por Greenfield (2006). Os espectros foram coletados em uma faixa de comprimento de onda de 190-280 nm, com 0,2 nm *step resolution* a 100 nm/s, a 30°C, e uma média foi obtida a partir de 6 varreduras, para cada espectro. A capacidade de permeabilização do peptídeo foi avaliada mediante a liberação de carboxifluoresceína (CF) das vesículas. Esta por sua vez, foi determinada por meio do aumento da intensidade de fluorescência em 520 nm (comprimento de onda de excitação = 490 nm).

Resultados e Discussão

O peptídeo analisado foi derivado da fragmentação *in silico* do ApTI, uma proteína composta por 176 aminoácidos. Da clivagem desta proteína obteve-se um total de 159 peptídeos, dos quais quatro (04) foram escolhidos para análise da potencial atividade antimicrobiana, e foi escolhido para estudo e modificações estruturais, afim de potencializar a atividade predita, aquele que apresentou os melhores parâmetros, como índice de Boman, carga líquida total, hidrofobicidade, anfipaticidade e peso molecular.

A sequência do peptídeo obtido foi protegida pelo processo de depósito de patente sob Número de Processo BR 10 2018 071234 9.

As modificações na sequência original resultaram no peptídeo denominado Adepamicina, com conformação α -hélice, apresentou caráter anfipático contendo 44% de hidrofobicidade, +6 de carga e índice de Boman 2,25 Kcal.mol⁻¹, características desejáveis para um PAM eficiente. Além disso possui homologia com outros PAM, como o peptídeo FSLFFPYAALKWLRKLLKK, compartilhando apenas 35% de semelhança (Lu *et al.*, 2014). encontrado em *Ciona intestinalis* e ativo frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. mutans* e *M. tetragenus*.

Para estudos sobre a estrutura do peptídeo foi feita a modelagem *Ab initio* pelo software I-TASSER, no qual verificou-se que Adepamicina adquiriu conformação α -hélice. A validação do modelo gerado avaliou a qualidade do empacotamento global do peptídeo, os possíveis erros estruturais em regiões localizadas e os parâmetros estereoquímicos. Para se fazer validação utilizou-se o software PROCHECK, o qual gerou o Diagrama de Ramachandran qual foi observado que Adepamicina possui 81,2% dos resíduos de aminoácidos nas regiões permitidas mais favoráveis

Nos ensaios biológicos *in vitro* realizados verificou-se que Adepamicina mostrou atividade microbicida frente a *E. coli* (0,9 μ M - 2 μ g.mL⁻¹), *K. oxytoca* (3,6 μ M), *K. pneumoniae* (1,4 μ M), *P. aeruginosa* (2,8 μ M) e *S. aureus* (1,8 μ M). Um antibiótico, como a ampicilina, medicamento disponível usado em terapias de infecções bacterianas, podendo ser usado frente a *E. coli*, possui um CIM de 5,72 μ M - 2 μ g.mL⁻¹ (Catherine *et al.*, 1989), idêntica a CIM, em concentração comum, do peptídeo Adepamicina, Porém quando suas concentrações são vistas em quantidade molar, observa-se que Ampicilina possui CIM seis vezes maior que Adepamicina

Para os ensaios de atividade hemolítica a concentração máxima do peptídeo Adepamicina foi de 335 μ M, onde foram feitas diluições seriadas. Na concentração inicial, Adepamicina induziu pouco mais de 50% de hemólise, enquanto que na CIM frente *E. coli* causou menos de 5% de hemólise.

O ensaio de viabilidade celular mostrou que no tempo de 24h o peptídeo Adepamicina comprometeu a viabilidade celular apenas nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M, que são concentrações maiores que a CIM, porém a célula sobrepujou o efeito citotóxico do peptídeo e nos tempos 48h e 72h não mostrou mais o caráter citotóxico.

Com o intuito de investigar o mecanismo de ação do peptídeo Adepamicina frente às células bacterianas, foram feitos alguns ensaios com a cepa bacteriana na qual o peptídeo apresentou menor CIM. Frente a cepa de *E. coli*, verificou-se que o peptídeo tem ação bacteriostático na CIM (0,9 μ M), não havendo aumento no número de unidades formadoras de colônias (UFC). Porém quando aumentado quatro vezes essa concentração, ou seja, 3,6 μ M, verifica-se que o peptídeo tem ação bactericida, pois há erradicação total no número de UFC's.

No ensaio de captação do cristal violeta observa-se que houve um aumento de duas vezes (2x) na captação quando *E. coli* foi tratada com Adepamicina. Já no ensaio de liberação de ácidos nucleicos, percebe-se tanto extravasamento de ácido ribonucleico (4,4ng. μ L⁻¹ de RNA) quanto de ácido desoxirribonucleico

(4,1ng.µL⁻¹ de DNA), quando *E. coli* foi tratada com Adepamicina.

Foram também realizadas análises de Dicroísmo Circular (CD) do peptídeo Adepamicina, onde partir dos espectros obtidos pode ser possível determinar a porcentagem de cada estrutura secundária na molécula, porém não é possível determinar quais resíduos de aminoácidos estão envolvidos na formação das estruturas secundárias (Greenfield, 2006). O resultado obtido em solução aquosa (tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,2) mostrou que Adepamicina exibiu uma curva típica de estrutura desordenada. Quando na presença de TFE, solvente indutor de estrutura, o espectro demonstra o aparecimento de uma banda positiva em cerca de 190 nm e duas negativas em 208 e 222 nm, característica de uma α-hélice, adquirindo dessa forma estrutura definida. Com o propósito de buscar informações mais precisas a respeito do modo de interação dos peptídeos com membranas, estudos adicionais de CD foram realizados sob quatro condições diferentes. Para isso foram utilizados sistema de bicamadas lipídicas (vesículas) compostas de POPC, POPG, POPC/Chol e POPS. Os resultados permitiram mostrar que Adepamicina foi capaz de adotar uma estrutura bem definida apenas na presença vesículas compostas por POPS. Embora o peptídeo tenha demonstrado que é capaz de interagir com POPS, a sua dinâmica de interação indica que o peptídeo poderia estar sob um processo de agregação ou mesmo sob estado oligomérico.

Para analisar a capacidade lítica do peptídeo em função da composição lipídica, foi realizado o ensaio de permeabilização utilizando vesículas de diferentes composições carregadas com carboxifluoresceína (CF). Os resultados obtidos demonstraram que o peptídeo é capaz de promover a liberação da CF ao longo do tempo de incubação. Nos ensaios utilizando POPG, POPC e POPS (carga negativa), ficou evidente que o peptídeo possui elevada atividade lítica.

Conclusões

Adepamicina, um peptídeo antimicrobiano projetado através de ferramentas computacionais, apresentou uma potente atividade antibacteriana frente bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, portanto, pode se tornar um agente bacteriano promissor no futuro, um problema de saúde pública mundial, por ser não citotóxico e possuir alta afinidade pelas células bacterianas. O mecanismo de ação da Adepamicina contra a *Escherichia coli* envolve uma interação inicial do peptídeo com a membrana bacteriana por atração eletrostática seguida de perturbações na membrana que desencadeiam a sua lise, atuando diretamente no crescimento da bactéria.

Referências bibliográficas

BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals (Basel)**. v. 28, 2013.

CATHERINE A. *et al.* In Vitro Evaluation of the Determinants of Bactericidal Activity of Ampicillin Dosing Regimens against *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 33, 1989.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. M-07 A-09. 9ª ed, 2012.

CZAPLEWSKI, L. *et al.* Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. **Lancet Infect. Dis.**, v.16, 2016.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.74, 2010.

FJELL, C. D. *et al.* Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 11, 2012.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **NATURE PROTOCOLS**. v, 1, 2006.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents **Quim. Nova**, v. 33, 2010.

LU, Y.; ZHUANG, Y.; LIU, J. Mining antimicrobial peptides from small open reading frames in *Ciona intestinalis*. **J Pept Sci.** v. 20, 2014.

MACCARI, G.; DI LUCA, M.; NIFOSÌ, R.; In silico design of antimicrobial peptides. **Methods Mol Biol.** v. 1268, 2015.

MITIĆ-ĆULAFIĆ, D. *et al.* Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). **Arch Biol Sci.**, v. 57, 2005

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, 1983.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis**. Genebra, Suíça, 2017.

THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. Chaired by Jim O'Neill. May 2016.

UGGERHØJ, L.E. *et al.* Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides: do's and don'ts. **Chem Bio Chem.**, v. 16, 2015

VAARA, M.; VAARA, T. Outer membrane permeability barrier disruption by polymyxin in polymyxin-susceptible and-resistant *Salmonella typhimurium*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 19, 1981.

WAGHU, F. H.*et al.*. CAMPR3: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 44, 2016.

WANG, G., LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, 2016.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, 2003.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**. v. 9, 2008.

ZHOU, K.*et al.* Mode of action pentocin 31-1: An antilisteria bacteriocina produced by *Lactobacillus pentosus* from Chinese traditional ham. **Food Control**, v. 19, 2008.