

2.08.99 - Bioquímica.

SÍNTESE DE UM NOVO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO COM ATIVIDADE EM BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS*

Amanda Carolina B. da Silva^{1*}, Daniella Gorete L. de Oliveira², Helder F. dos Santos³, Edson Lucas dos Santos³, Maria Lígia Rodrigues Macedo⁴

1. Doutorando em Biotecnologia da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS),

2. Pesquisadora Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS)

3. Doutorando Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

4. Professora Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Departamento Ciências Farmacêuticas Alimentos e Nutrição/Orientador

Resumo

Os peptídeos com atividade microbiana são importante alternativa para o tratamento de infecções. Neste contexto foi realizado o desenho e a síntese de peptídeos análogos da sequência de aminoácidos da proteína Profilina do inseto *Spodoptera*, a partir do banco de dados *National Center for Biotechnology Information*. Os parâmetros físicos e químicos da sequência do peptídeo foi gerado com auxílio dos softwares *Antimicrobial Peptide Database*, *Collection of Anti-Microbial Peptides*, *Protein Data Bank*. A sequência foi projetada contendo 18 aminoácidos e uma conformação α -hélice, com carga elétrica positiva. O peptídeo foi avaliado quanto a atividade antimicrobiana através do teste antimicrobiano em microdiluição em caldo (CLSI, 2018) em bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* na concentração inibitória mínima entre 5-1,2 μ M.

Palavras-chave: Profilina; Ferramentas computacionais; Inseto.

Apoio financeiro: Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso (FUNDECT); CNPQ, CAPES e FINEP.

Introdução

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) estão presentes em diversas células de mamíferos, como os monócitos e macrófagos auxiliando dando suporte ao sistema imunológico nos mamíferos. Essas células fagocitárias atuam em processos infecciosos e liberam peptídeos antimicrobianos em concentrações que são suficientes para combater as células bacterianas. E em outros organismos, como os insetos, os PAMs podem ser secretados na hemolinfa, corpo gorduroso, glândulas de veneno e até mesmo no trato reprodutivo. Nos insetos os peptídeos antimicrobianos são uma das principais linhas de defesa, devido a falta de um sistema imune adaptativo.

Alguns desenhos de PAMs não dependem da atividade antimicrobiana da proteína modelo. A profilina foi selecionada neste trabalho para síntese do peptídeo. É uma proteína que foi identificada em diversos organismos, incluindo os insetos e que auxilia no desenvolvimento de órgãos, regeneração de tecidos e defesa no sistema imune. É uma proteína pequena de 15 kDa e possui diversas funções ainda desconhecidas.

A purificação de PAMs naturais apresentam baixo rendimento. Por isso, a síntese desses peptídeos com potencial terapêutico, satisfaz a viabilidade de produção para obter uma maior quantidade. As ferramentas computacionais otimizam os PAMs naturais e direcionam o perfil das características desejáveis como; carga elétrica positiva, conformação α -hélice e reduz o número de aminoácidos na sequência. A partir de uma sequência de aminoácidos da proteína Profilina do inseto *Spodoptera*, obtida em banco de dados *National Center for Biotechnology Information* foi realizado a síntese. A atividade antimicrobiana dos peptídeos sintéticos foi testada *in vitro* contra diferentes cepas bacterianas.

Este trabalho teve por objetivo sintetizar um novo peptídeo a partir da substituição de resíduos da sequência de uma proteína Profilina de inseto identificada em *Spodoptera frugiperda*, que não apresenta atividade antimicrobiana com o intuito de obter peptídeo antimicrobiano ativo contra microrganismos patogênicos em humanos e determinar as características estruturais e biológicas.

Metodologia

A partir da sequência completa da proteína Profilina gerou intencionalmente através do auxílio de ferramentas computacionais o peptídeo sintético contendo 18 aminoácidos. A proteína Profilina foi identificada no estudo de caracterização Proteômica do inseto *Spodoptera frugiperda*, um modelo do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas. (LPPFB). A sequência foi obtida no banco de dados *National Center for Biotechnology Information-NCBI*. A sequência do peptídeo foi selecionada no banco de dados *Collection of Anti-Microbial Peptides* (CAMPr3), e analisada no software *Antimicrobial Peptide Database* APD3. Mediante

a substituição de aminoácidos na sequência contendo 18 aminoácidos selecionada no CAMPr3 obtido de Profilina, foi desenhado intencionalmente o peptídeo catiônico e conceber a uma conformação α -hélice. A predição estrutural tridimensional do peptídeo foi obtida através do software *Protein Structure and Function Prediction* I-TASSER. A validação da sequência peptídica foi realizada por meio do software Procheck.

A atividade antimicrobiana do peptídeo sintético foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2018) através do crescimento direto. As colônias bacterianas Gram-positivas do gênero *Staphylococcus* isoladas em ágar Mueller Hinton foram adicionadas em solução de NaCl 0,9% estéril até atingir turvação igual a 0,5 escala de MacFarland. Posteriormente foi feita a leitura da absorbância a 625nm. A suspensão bacteriana foi diluída na solução contendo o peptídeo nas concentrações (20 μ M, 10 μ M, 5 μ M; 2,5 μ M, 1,25 μ M, 0,06 μ M) na quantidade de 5×10^6 UFC/mL e foram solubilizadas em caldo Mueller Hinton. Os testes foram realizados em triplicata. A microplaca foi incubada a 37° C sob agitação durante 18 horas. Foram realizadas leituras a cada 30 minutos por 18 horas na absorbância a 595nm.

O ensaio de mecanismo de ação do peptídeo sintético em *Staphylococcus haemolyticus* foi realizado através da avaliação de liberação de ácidos nucleicos utilizando 5 mL de cultura de *S. haemolyticus* incubada overnight por 18 horas em caldo BHI e teve sua densidade celular ajustada com tampão fosfato PBS (pH 7,4) para uma densidade óptica de 620 nm. A suspensão foi centrifugada a 400 x g por 14 minutos, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado 2 vezes e ressuspenso em tampão fosfato PBS (pH 7,4). O volume de 180 μ L da suspensão bacteriana foi adicionado a 20 μ L da solução do peptídeo na concentração de 1,25 μ M (CIM). Suspensão bacteriana sem tratamento foi usada como controle. Após incubação a 37°C por 60 minutos, foi realizada centrifugação a 13400 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi coletado e realizado a leitura na absorbância de 260 nm.

A citotoxicidade do peptídeo foi avaliada utilizando a linhagem celular de fibroblastos humanos (MRC-5). As células (6×10^3 células/poço) foram cultivadas em microplacas de 96 poços e expostas a várias concentrações do peptídeo (35- 0,54 μ M) por 24 h. Após o período de incubação, as células foram lavadas com tampão fosfato PBS, adicionou-se 100 μ L de solução de MTT (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) na concentração de 1 mg/mL⁻¹ diluído em meio de cultura. Após 4 horas de incubação, os cristais formados foram ressuspenso com 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) e lidos a 630 nm.

Resultados e Discussão

O peptídeo sintético derivado de Profilina possui uma estrutura secundária α -hélice, e a validação dos ângulos ψ (phi) e ψ (psi) de cada resíduo do peptídeo foi realizado após a modelagem da predição estrutural no software Procheck. O gráfico de Ramachandram os resíduos de aminoácidos do peptídeo foram 100% localizados em regiões favoráveis.

A atividade antimicrobiana avaliada do peptídeo foi testada em cepas bacterianas Gram-positivas patogênicas em humanos, na concentração inibitória mínima no intervalo de 20-0,6 μ M. O peptídeo demonstrou uma potente atividade contra bactérias das espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* nas concentrações entre 5-1,25 μ M. Também foi realizado o mecanismo de ação através da liberação de ácidos nucleicos de *S. haemolyticus*, no qual o peptídeo apresentou atividade inibitória na concentração de 1,25 μ M. O peptídeo provocou um aumento na absorbância a 260nm no conteúdo celular de *S. haemolyticus*. Isso corresponde a perda de material intracelular de *S. haemolyticus* devido ao dano no envoltório celular. A avaliação de citotoxicidade do peptídeo apresentou apenas uma redução de 30% na viabilidade celular em fibroblastos humanos na concentração de 35 μ M após 24 horas de incubação.

Baseado nesses resultados, o peptídeo pode ser um candidato no tratamento terapêutico para estas espécies de bactérias do gênero *Staphylococcus*. Algumas espécies de *Staphylococcus* podem causar infecções simples e/ou grave de importância hospitalar e já apresentam resistência a antibióticos convencionais. Por exemplo, algumas cepas de *Staphylococcus aureus* mostrou resistência a metilicina e a vancomicina, e cepas de *Staphylococcus epidermidis* apresentou resistência tanto para metilicina quanto a aminoglicosídeos e em menor grau a tetraciclina, cloranfenicol e clindamicina (Gardete e Tomasz, 2014). Assim como *Staphylococcus haemolyticus* que o peptídeo apresentou melhor resultado de inibição, também mostrou resistência a antibióticos, como os glicopeptídeos. Sendo esta a segunda bactéria coagulase-negativa mais encontrada em casos clínicos, principalmente em casos de infecção no sangue (Czetaj *et al.*, 2015).

Alguns peptídeos antimicrobianos podem causar a ruptura da membrana de microrganismos. O peptídeo pode estar associado à interação com a membrana da bactéria *S. haemolyticus*, pois o peptídeo promoveu o extravasamento do conteúdo intracelular (Wimley, 2011). Essa interação peptídeo-membrana é importante para para atividade antimicrobiana do peptídeo sintético. A conformação α -hélice do peptídeo pode ser um dos fatores que atinge a célula alvo (Sato, Feix, 2016).

Muitos PAMs são tóxicos para células de mamíferos, por serem permeabilizados para matriz lipídica das membranas (Matsuzaki, 2009; Ebenham *et al.*, 2014). O peptídeo apresentou baixa toxicidade em células humanas na concentração de 35 μ M em comparação com a concentração inibitória mínima em célula bacteriana *S. haemolyticus* 1,25 μ M. Isso mostra que o peptídeo possui potencial terapêutico, podendo ser utilizado em

sinergismo com outros antibióticos.

Conclusões

No presente estudo o peptídeo sintético apresentou potente atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus*. Através do ensaio realizado de mecanismo de ação por meio da liberação de ácidos nucleicos mostrou que o peptídeo sintético pode agir no conteúdo intracelular de *S. haemolyticus*. E possui baixa citotoxicidade em células de mamíferos. Os dados dos ensaios antimicrobianos mostraram que uso de ferramentas computacionais podem auxiliar na síntese de peptídeos com aplicabilidade farmacológica.

Referências bibliográficas

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. M-07 A6 ed.11, 2018.

CZEKAJ, T; CISZEWSKI, M; SZEWCZYK, E. M. *Staphylococcus haemolyticus*-an emerging threat in the twilight of the antibiotics age. **Microbiology**, v. 161, p. 2061-2068, 2015

EBENHAN, T; GHEYSSENS, O; KRUGER, H. G; ZEEVAART, J. R; SATHEKGE, M. M. Antimicrobial peptides: Their role as infection-selective tracers for molecular imaging. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, 2014.

GARDETE, S; TOMASZ, A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.**, v. 124, n. 7, p. 2836-2840, 2014.

MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 1788, n. 8, p. 1687-1692, 2009.

WIMLEY, W. C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. **ACS Chem. Biol.**, v. 5, n. 10, p. 905-917, 2011.

SATO, H; FEIX, J. B. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 1758, n. 9, p. 1245-1256, 2016