



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Raquel Marcela Quigua Orozco

**AVALIAÇÃO DO MASTOPARANO-L E SEUS DERIVADOS FRENTE A
CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ASSOCIADAS A MASTITE BOVINA**

DISSERTAÇÃO
JUIZ DE FORA – MG

2019

RAQUEL MARCELA QUIGUA OROZCO

**AVALIAÇÃO DO MASTOPARANO-L E SEUS DERIVADOS FRENTE A
CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ASSOCIADAS A MASTITE BOVINA**

“Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia”

Orientador: Octávio Luiz Franco

Coorientador: Marlon Henrique e Silva Cardoso

Juiz de Fora – MG

2019

RAQUEL MARCELA QUIGUA OROZCO

**AVALIAÇÃO DO MASTOPARANO-L E SEUS DERIVADOS FRENTE A CEPAS DE
Staphylococcus aureus ASSOCIADAS A MASTITE BOVINA**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Octávio Luiz Franco
Doutor em Biologia Molecular - UnB
Universidade Católica Dom Bosco

Marlon Henrique e Silva Cardoso
Doutor em Patologia Molecular – UnB
Universidade Católica Dom Bosco

Marcelo de Oliveira Santos
Doutor em Ciências Biológicas – UnB
Universidade Federal de Juiz de Fora

Simone Maria Neto
Doutora em Ciências Genômicas e Biotecnologia – UCB
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

A minha mãe, meu irmão e RHVM, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me sustentado, a ele agradeço “simplesmente” por tudo;

Ao meu orientador, Professor Dr. Octávio Luiz Franco, pela oportunidade e confiança em mim depositada, ainda sem ter me conhecido. Agradeço a ele por ter me dado a grande oportunidade de pertencer em sua equipe de trabalho, pelos ensinamentos, compreensão e apoio;

Ao meu coorientador, Dr. Marlon Henrique e Silva Cardoso, pelo “resgate”. Agradeço a oportunidade, paciência, apoio, constante motivação, compreensão e ensinamentos. Obrigada pela amizade e ainda por ter me dado um novo nome: “Marcelina”. A você também agradeço por ter me ajudado a acreditar em mim;

À Roger Valle Molinares, por motivar-me cada dia, por seu suporte emocional constante, por crer em mim e me ajudar a crer em minha capacidade intelectual. Agradeço infinitamente por seu apoio, companhia (mesmo que a distância) e afeto durante todos estes anos;

Ao professor Jorge William Arboleda, por me ajudar a chegar até aqui. A você professor, muito obrigada pela oportunidade que me deu;

À minha família pelo suporte emocional, orações e incentivo;

À minha mãe, meu irmão e meu pai, por me dar ânimo a cada dia, por me fazer sentir amada e acompanhada. Agradeço a eles por seu constante apoio emocional e financeiro;

Às minhas amigas em Juiz de Fora, por sua amizade, apoio e acolhida;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora que contribuíram na minha formação. Às secretárias deste programa, Graça e Fernanda, pela constante paciência e ajuda;

Às minhas colegas e amigas de mestrado, Janaína Barros e Thuanny Borda, pelo companheirismo, horas de estudo, momentos de diversão compartilhados e palavras de “motivação”: “tudo vai dar certo”;

À minha amiga Angélica Galván por sua paciência, bons desejos e amizade incondicional;

À minha amiga Leonor Pinto, por seus valiosos conselhos, companhia e ensinamentos;

À minha amiga Janny Gómez, por suas palavras de encorajamento, sua amizade e dedicação às nossas conversas;

Às minhas amigas Aline, Ingrid, Karen, Esther e Elizângela por terem me aturado, acolhido e ajudado tanto. Muito obrigada pelo auxílio na bancada, as caronas, os momentos de descontração e “chororô”, muito obrigada por tudo;

À técnica de laboratório Dayane dos Santos, pelo auxílio com todo o trabalho durante a experimentação;

A todos os integrantes do grupo do S-Inova Biotech pela ajuda, em especial à mestranda Regina Meneses e à Dra. Danieli Buccini pelo suporte na bancada;

Aos membros da minha banca de qualificação, Dra. Elizabete de Souza Cândido e Dr. Marcelo de Oliveira Santos, pelos conselhos e aportes, os quais, com certeza, permitiram o aprimoramento deste trabalho;

Aos membros da minha banca de defesa, Dra. Simone Maria Neto e Dr. Marcelo de Oliveira Santos, por aceitarem o convite. Obrigada por disporem de seu tempo para a avaliação e discussão deste trabalho;

À CAPES, INCT, UFJF, UCDB, por todo o suporte financeiro.

“Siempre hay inquietud y miedo antes de las transformaciones más profundas”

Origen. Dan Brown

“A confiança em si mesmo é o primeiro segredo do sucesso”

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

A mastite bovina (MB) consiste em uma doença caracterizada pela inflamação da glândula mamária causada por bactérias patogênicas, resultando em grandes perdas econômicas nos sistemas de produção de laticínios. Dentre as espécies bacterianas associadas a MB, *S. aureus* representa um dos agentes etiológicos bacterianos mais comumente encontrados nos sítios de infecção. Os antibióticos convencionais continuam a ser a principal ferramenta de tratamento e controle da mastite bovina. No entanto, a evolução da resistência bacteriana, bem como a possível presença de resíduos destes medicamentos e de microrganismos patogênicos no leite torna necessário o desenvolvimento de estratégias alternativas de tratamento. Neste sentido, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) representam candidatos terapêuticos promissores para o tratamento de doenças como a MB. No presente estudo o peptídeo isolado da peçonha de vespa, mastoparano-L, e três de seus derivados obtidos previamente por meio de estratégias do desenho racional, foram caracterizados funcional e estruturalmente. Assim, foi avaliada a eficiência do peptídeo mastoparano-L, bem como de três de seus derivados, denominados mastoparano-MO, mastoparano-R1 e [I⁵, R⁸] MP, contra cepas de *S. aureus* isoladas de bovinos acometidos com mastite. Inicialmente, foi observado que as modificações realizadas à sequência do peptídeo parental, mastoparano-L, para a obtenção dos derivados, levaram a alteração das propriedades físico-químicas como a carga, hidrofobicidade e momento hidrofóbico destes peptídeos. Em relação à comparação estrutural, todos os derivados exibem estruturas tridimensionais teóricas em α -hélice. Contudo, os derivados mastoparano-R1 e [I⁵, R⁸] MP apresentam maiores porcentagens de α -hélice (64,3% para mastoparano-L e 78,6% para mastoparano-R1 e [I⁵, R⁸] MP), sendo o mastoparano-MO, o derivado com a menor porcentagem de α -hélice (57,9%). Em adição, os resultados da avaliação estrutural dos peptídeos indicam que os modelos tridimensionais gerados para os análogos são estereoquimicamente possíveis e confiáveis. Assim, os resultados dos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) mostraram que o derivado mastoparano-MO exibiu um leve aumento da atividade antibacteriana (16 μ M), quando comparado como o peptídeo parental (32 μ M). Contrariamente, o derivado mastoparano-R1 não foi capaz de inibir o crescimento das cepas testadas. Por fim, as melhores atividades foram reportadas para o peptídeo [I⁵, R⁸] MP, exibindo CIM dentre 4-16 μ M e CBM dentre 8-16 μ M. Deste modo, avaliou-se a atividade bactericida deste derivado ([I⁵, R⁸] MP), ao longo de 90 min, frente à cepa *S. aureus* Aurora. Assim, foi determinado que o peptídeo [I⁵, R⁸] MP, a uma concentração de 8 μ M, reduz totalmente a carga bacteriana inicial (4 log₁₀) de *S. aureus* Aurora após 70 min de incubação. Nos ensaios hemolíticos foi observado que, a uma concentração de 100 μ M, o peptídeo parental (mastoparano-L) e o derivado mastoparano-MO resultaram nas maiores porcentagens de hemólise (62% e 50%, respectivamente); enquanto que os derivados mastoparano-R1 e [I⁵, R⁸] MP resultaram em menos de 20% de hemólise de eritrócitos bovinos. Deste modo, o potencial terapêutico do derivado [I⁵, R⁸] MP observado no presente estudo torna possível a aplicação deste peptídeo para estudos futuros, visando o tratamento da MB.

Palavras-chave: Mastoparanos. Desenho racional. Mastite bovina. Resistência bacteriana.

ABSTRACT

Bovine mastitis (BM) consists in a disease characterized by mammary gland inflammation caused by pathogenic bacteria, resulting in substantial economic losses in the dairy production systems. Among the bacterial species associated with bovine mastitis, *S. aureus* represents one of the most common bacterial etiological agents found at infection sites. Conventional antibiotics remain the main tool for BM treatment and control. Nevertheless, the bacterial resistance evolution, as well as the possible presence of such drugs residues and pathogenic microorganisms in milk leads to the need of developing alternative treatment strategies. In this sense, antimicrobial peptides (AMPs) represent promising therapeutic candidates for the treatment of diseases like BM. In the present study, the peptide isolated from wasp venom, mastoparan-L, and three of its derivatives previously obtained through rational design strategies, were functionally and structurally characterized. Thus, it was evaluated the mastoparan-L peptide efficiency, as well as its three derivatives, denominated mastoparan-MO, mastoparan-R1 and [I⁵, R⁸] MP, against *S. aureus* strains isolated from bovine with mastitis. Initially, it was observed that the mastoparan-L parental peptide sequence modifications, to obtain the derivatives, led to physicochemical properties alterations such as charge, hydrophobicity and hydrophobic moment of these peptides. Regarding structural comparison, all derivatives exhibit theoretical three-dimensional α -helix structures. Moreover, mastoparan-R1 and [I⁵, R⁸] MP derivatives have higher percentages of α -helix (64.3% for mastoparan-L and 78.6% for mastoparan-R1 and [I⁵, R⁸] MP), being the mastoparan-MO, the derivative with the lowest percentage of α -helix (57.9%). In addition, the structural peptide evaluation results indicate that the structural models generated for the analogs are stereochemically possible and reliable. Thus, the results of the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) showed that the mastoparan-MO exhibited a slight increase in its antibacterial activity (16 μ M) when compared to parental peptide (32 μ M). Otherwise, the mastoparan-R1 derivative was incapable of inhibiting the tested strains growth. Finally, the highest activities were reported for the [I⁵, R⁸] MP peptide, exhibiting MICs between 4-16 μ M and MBCs between 8-16 μ M. Thus, the bactericidal activity of this derivative ([I⁵, R⁸] MP) against *S. aureus* Aurora was evaluated during 90 min. Therefore, it was determined that the peptide [I⁵, R⁸] MP, at a concentration of 8 μ M, totally reduced the initial bacterial load (4 log₁₀) of *S. aureus* Aurora after 70 min of incubation. In hemolytic assays it was observed that at a concentration of 100 μ M, the parental peptide (mastoparan-L) and the mastoparan-MO derivative resulted in the highest percentages of hemolysis (62% and 50%, respectively); whereas mastoparan-R1 and [I⁵, R⁸] MP derivatives caused less than 20% hemolysis of bovine erythrocytes. In this way, the therapeutic potential of the [I⁵, R⁸] MP derivative observed in the present study makes possible the application of this peptide in future studies, aiming BM treatment.

Keywords: Mastoparans. Rational design. Bovine mastitis. Bacterial resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais tipos de estruturas tridimensionais adotadas por PAMs. **(a)** Conformação em α -hélice do peptídeo isolado de células epiteliais da rã *Xenopus laevis*, magainina-2 (PDB: 2MAG); **(b)** conformação em folha β do peptídeo gomesina (PDB: 1KFP) isolado de hemócitos da aranha *Acanthoscurria gomesiana*; **(c)** estrutura estendida da indolicidina (PDB: 1G89) isolada de neutrófilos bovinos (*Bos taurus*); **(d)** estrutura mista da β -defensina PSD1 (PDB: 1JKZ) isolada de sementes da planta *Pisum sativum*; **(e)** conformação cíclica do peptídeo cicloviolacina O2 (PDB: 2KNM) derivado da planta *Viola odorata*. As ligações dissulfeto estão destacadas em amarelo. As estruturas foram visualizadas utilizando o programa PyMOL v1.8 (Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC).....20

Figura 2. Modelos propostos para os mecanismos de permeabilização de membrana dos PAMs. Posteriormente a adesão inicial à membrana os PAMs podem permeabilizar a bicamada lipídica por meio de vários mecanismos. Os PAMs podem criar poros mediante a formação de feixes na membrana no modelo de barril, poros constituídos por peptídeos e lipídeos no modelo de poro toroidal ou poros sem a formação de uma estrutura regular na bicamada lipídica no modelo de poro toroidal. A desestabilização produzida pela ligação dos PAMs à superfície da membrana no modelo carpete, pode ser seguida da disrupção da bicamada lipídica por meio da formação de estruturas micelares no modelo detergente. PAMs podem ainda alterar a espessura das membranas, suscitar o agrupamento de lipídeos, a formação de intermediários não-bicamada, unir-se a ânions e provocar sua saída através da membrana, dissipar ou aumentar o potencial de membrana e, por fim, melhorar a sua inserção nas bicamadas lipídicas pela presença de lipídeos oxidados. Figura adaptada de Nguyen et al. (2011).22

Figura 3. Estrutura tridimensional do peptídeo mastoparano-L resolvida por ressonância magnética nuclear (PDB: 1D7N) (HORI et al., 2001). Disposição dos aminoácidos dentro da cadeia principal: resíduos apolares estão representados em laranja; resíduos polares não carregados em branco e resíduos polares carregados positivamente em azul.....32

Figura 4. Representação em diagrama de hélice das sequências de aminoácidos de **(a)** mastoparano-L, **(b)** mastoparano-R1, **(c)** mastoparano-MO e **(d)** [I⁵, R⁸] MP. Os resíduos carregados positivamente estão representados em azul, polares não carregados em rosa e não polares em amarelo, cinza e verde. O vetor de momento hidrofóbico está representado por setas a partir do centro dos diagramas, enquanto que

o valor estimado do momento hidrofóbico resultante é proporcional ao tamanho das setas.....44

Figura 5. Modelos tridimensionais teóricos de menor energia livre e potenciais eletrostáticos de superfície para **(a)** mastoparano-L, **(b)** mastoparano-R1, **(c)** mastoparano-MO e **(d)** [I⁵, R⁸] MP. O potencial eletrostático foi calculado pelo *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (APBS), com escala do potencial variando de -5kT/e (vermelho) a +5kT/e (azul).47

Figura 6. Cinética do tempo de morte (*time-kill*) do peptídeo [I⁵, R⁸] MP frente a *S aureus* Aurora a uma concentração de 8 µM (círculos brancos). O crescimento da cepa bacteriana na ausência do peptídeo foi utilizado como controle (quadrados pretos). O peptídeo foi adicionado no tempo 0, sendo monitorado a cada 10 min até os 90 min de incubação.....49

Figura 7. Atividade hemolítica do peptídeo mastoparano-L e seus derivados frente a hemácias bovinas. Na figura estão apresentadas as porcentagens de hemólise dos peptídeos testados a 100 µM. Triton X-100 (2%) foi utilizado como controle positivo de hemólise.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas para mastoparano-L e seus derivados, incluindo suas cargas líquidas (z), a porcentagem de hidrofobicidade ($\langle H \rangle$) e o momento hidrofóbico ($\langle \mu H \rangle$). Os resíduos de aminoácidos modificados nas sequências análogas ao peptídeo parental, mastoparano-L, estão destacados em vermelho.....43

Tabela 2. Validação da qualidade do dobramento, estereoquímica das estruturas tridimensionais teóricas e percentual de hélice dos modelos de menor energia livre para os peptídeos mastoparano-R1, mastoparano-MO e [I⁵, R⁸] MP.....45

Tabela 3. Atividades bacteriostáticas e bactericidas dos peptídeos mastoparano-L, mastoparano-R1, mastoparano-MO e [I⁵, R⁸] MP contra cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina.49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT – Ácidos teicóico

CBM – Concentração bactericida mínima

CCS – Contagem de células somáticas

CIM – Concentração inibitória mínima

FAO – do inglês “*Food and Agriculture Organization of the United Nations*” – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

Fmoc – 9-fluorenilmetoxicarbonila

IIM – Infecção intramamária

LC/MS – do inglês “*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*” – Espectrometria de Massa por Cromatografia Líquida

LPS – Lipopolissacarídeo

MB – Mastite bovina

MC – Mastite clínica

MHA – do inglês “*Muller Hinton Agar*” – Agar Muller Hinton

MHB – do inglês “*Muller Hinton Broth*” – Caldo Muller Hinton

MSC – Mastite subclínica

PAMs – Peptídeos antimicrobianos

PDB – do inglês “*Protein Data Bank*” – Banco de dados de proteínas

PLL – Poli-L-lisina

RMN – Ressonância magnética nuclear

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. MASTITE BOVINA	15
1.3. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)	19
1.4. MECANISMO DE AÇÃO DOS PAMs.....	21
1.5. DESENHO RACIONAL DE PAMs.....	25
1.6. MASTOPARANOS	29
1.7. MASTOPARANO-L E DERIVADOS.....	30
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. OBJETIVO GERAL	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS PEPTÍDEOS	38
4.2. COMPARAÇÃO ESTRUTURAL DOS PEPTÍDEOS	38
4.3. CEPAS BACTERIANAS.....	39
4.4. DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	39
4.5. ENSAIOS DE CINÉTICA DO TEMPO DE MORTE.....	40
4.6. ENSAIOS HEMOLÍTICOS.....	41
5. RESULTADOS	42
5.1. AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS PEPTÍDEOS.....	42
5.2. COMPARAÇÃO ESTRUTURAL DOS PEPTÍDEOS	44
5.3. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANAS E AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DO TEMPO MORTE (<i>TIME-KILL</i>).....	47
5.4. ENSAIOS HEMOLÍTICOS.....	49
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÕES.....	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. MASTITE BOVINA

A mastite bovina (MB) consiste na doença de maior prevalência no gado leiteiro em todo o mundo (BRESER et al., 2018; ROMERO et al., 2018). Esta enfermidade, descrita como uma condição inflamatória da glândula mamária, pode ser causada por traumatismo (mecânico ou térmico) ou, geralmente, por colonização bacteriana no canal da teta (AITKEN et al., 2011; ASLI et al., 2017; BARLOW, 2011). A MB consiste em uma infecção altamente incidente em bovinos lactantes. Ademais, a MB pode ser uma patologia complexa, haja vista que pode ser influenciada por múltiplos fatores, como diferentes microrganismos, formas da doença (clínica ou subclínica), origem e forma de transmissão (contagiosa ou ambiental) (THOMPSON-CRISPI et al., 2014; DE VLIEGHER et al., 2012). Esses fatores estão ainda aliados a características próprias de cada animal, como a resposta imune, estado nutricional, idade, raça, exposição a estresse ambiental, estresse oxidativo, entre outros (AITKEN et al., 2011; BOGNI et al., 2011).

A MB pode ser classificada com base na manifestação ou ausência de sintomas, incluindo a mastite clínica (MC) e subclínica (MSC), respectivamente. A MC se caracteriza por resposta inflamatória e alterações visíveis no leite, como flocos, coágulos e aparência aquosa. Ademais, dependendo da severidade da infecção, os animais podem apresentar inchaço, dor e vermelhidão do úbere (infecção leve ou moderada) ou sinais sistêmicos como febre, anorexia e choque (infecção grave). Em contrapartida, embora exista infecção intramamária (IIM) na MSC, não são observados sinais de inflamação ou outros sintomas clínicos e, portanto, a presença de MSC nos rebanhos tem sido subestimada e pode estar associada a grandes perdas econômicas (AITKEN et al., 2011; ASLI et al., 2017; HUGHES E WATSON, 2018; LEITNER et al., 2018; ROMERO et al., 2018; THOMPSON-CRISPI et al., 2014). Contudo, ambas as formas da doença estão caracterizadas pelo aumento na contagem de células somáticas (CSS) no leite, um biomarcador inflamatório usado como método de

diagnóstico, bem como para medir a qualidade e mudanças na composição do leite. O acréscimo da CSS causa o detrimento da qualidade do leite, impedindo a sua comercialização gerando, assim, perdas econômicas para a indústria leiteira (ÅVALL-JÄÄSKELÄINEN et al., 2018; BOGNI et al., 2011).

A mastite bovina pode ser considerada a doença que mais impacta, economicamente, a indústria de laticínios (BRESER et al., 2018). Isto se deve, em grande parte, aos prejuízos gerados pela redução da produção e qualidade do leite, aumento dos custos de prevenção e de tratamento dos animais acometidos, além da diminuição da vida útil das vacas, levando ao abate precoce. Somado a isso, as perdas geradas pelo descarte de leite devido a possível presença de resíduos de antibióticos utilizados no tratamento dos animais afetados, como também de microrganismos, representa uma fonte potencial de toxinas alimentares e risco de zoonose (BRADLEY, 2002; GOMES et al., 2016; GOMES E HENRIQUES, 2015; MUSHTAQ et al., 2018).

Segundo Mushtaq et al. (2018) as perdas econômicas mundiais causadas pela mastite bovina ultrapassam USD \$35 bilhões anuais. Ademais, segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), mais de 6 bilhões de pessoas no mundo consomem leite e produtos lácteos (www.fao.org/dairy-production-products/products/en/), sendo que 83% da produção mundial de leite vem do gado bovino (www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/en/). Assim, é imperativo o controle e tratamento de doenças como a MB, não só pelas perdas econômicas geradas nos sistemas de produção de laticínios, mas também pelo impacto produzido no bem-estar animal e na população mundial.

Estudos têm focado na identificação dos microrganismos envolvidos na MB, permitindo uma melhor avaliação da epidemiologia e patogenicidade da mastite (HUGHES E WATSON, 2018). Neste contexto, mais de 130 espécies de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, algas e micoplasmas, têm sido associados a MB (BRADLEY, 2002). Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas vem sendo identificadas como os principais patógenos relacionados a doença (BOUCHARD et al.,

2015), sendo classificadas como contagiosas ou ambientais de acordo com seu reservatório primário e modo de transmissão (BOGNI et al., 2011; GOMES et al., 2016).

No caso das bactérias contagiosas, os quartos, como são denominadas cada uma das quatro glândulas mamárias que constituem o úbere bovino, constituem o reservatório principal (FANG et al. 2016; HUGHES E WATSON, 2018). Estas bactérias são transmitidas de quartos infectados a outros quartos do úbere no mesmo animal, e incluem espécies bacterianas do gênero *Streptococcus* e organismos como *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma* spp. (ESENER et al., 2018; FOX E GAY, 1993). Além disso a contaminação pode ocorrer de animal para animal durante o processo de ordenha através das mãos dos ordenhadores ou pelos utensílios de ordenha contaminados (FANG et al., 2016; KANDEEL et al., 2018). Por outro lado, bactérias categorizadas como ambientais, cujo reservatório primário é o habitat do gado leiteiro, são transmitidas aos animais a partir do material de cama orgânico, pastagens, áreas úmidas ou molhadas em estábulos e corredores cobertos de fezes. Assim, coliformes como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., bem como organismos do gênero *Streptococcus* (*S. uberis* e *S. dysgalactiae*) pertencem ao grupo de patógenos ambientais (ESENER et al., 2018; GOMES et al., 2016; SMITH E HOGAN, 1993). De forma geral, patógenos contagiosos são comumente associados a casos subclínicos de mastite (MSC), enquanto que os ambientais são particularmente relacionados a casos de MC (SONG et al., 2016; THOMPSON-CRISPI et al., 2014).

1.2. *Staphylococcus aureus* NA MASTITE BOVINA

S. aureus consiste em um microrganismo comensal e patógeno oportunista de diversos organismos, incluindo o gado leiteiro. Esta bactéria tem sido considerada um dos principais agentes etiológicos da MB (clínica e subclínica) e, possivelmente, um dos microrganismos causadores de MB mais estudado, haja vista que *S. aureus* é um dos patógenos associados a MB de mais difícil controle (BARBOZA-CORONA et al., 2009; CASTRO et al., 2018; Gomes et al., 2016; TARTAGLIA et al., 2018; ZADOKS et

al., 2011). Usualmente, *S. aureus* causa IIM subclínicas, persistentes e refratárias ao tratamento com antibióticos (ASLI et al., 2017; SONG et al., 2016). A capacidade de internalização, sobrevivência e propagação dentro de vários tipos celulares do hospedeiro como neutrófilos, macrófagos, células epiteliais mamárias e linfócitos do sangue periférico, é uma das estratégias pela qual *S. aureus* evade a resposta do sistema imunitário e a ação dos antibióticos. A sobrevivência intracelular dessa bactéria geralmente causa IIM crônicas e recorrentes, além de permitir a disseminação da infecção (AITKEN et al., 2011; FRAUNHOLZ E SINHA 2012; GÜNTHER et al., 2017; HOQUE et al., 2018; KAMARUZZAMAN et al., 2017; TARTAGLIA et al., 2018).

Como mencionado previamente, a presença de microrganismos patogênicos no leite representa uma problemática importante na saúde pública devido a seu potencial zoonótico e risco de intoxicação alimentar. *S. aureus* é considerado uma causa comum de doenças agudas transmitidas por alimentos (WHO, 2015). Isto se dá devido as enterotoxinas estafilocócicas (EES) altamente termoestáveis produzidas por *S. aureus*, e que representam uma frequente causa de intoxicação alimentar estafilocócica em todo o mundo (CASTRO et al., 2018; GRUNERT et al., 2018; JOHLER et al., 2015). Neste sentido, o leite contaminado pode atuar como uma via de transmissão de patógenos (DUARTE et al., 2018), como *S. aureus* enterotoxigênico. Isto está geralmente associado ao consumo de produtos lácteos crus ou cujo tratamento térmico tem sido realizado a temperaturas menores às da pasteurização, principalmente em países em desenvolvimento (BRADLEY, 2002; SHAHEEN et al., 2016).

A ocorrência de *S. aureus* entre bovinos e humanos tem sido largamente relatada (BUSCHE et al., 2018). Estudos têm demonstrado, por exemplo, que cepas adaptadas a bovinos, como *S. aureus* CC398, ST130 e ST151 podem infectar a população humana. Isto é um fato preocupante, visto que o possível surgimento da fácil disseminação destas cepas entre bovinos e humanos supõem um importante risco de zoonose e disseminação de resistência bacteriana (BUSCHE et al., 2018; ZADOKS et al., 2011).

1.3. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAMs)

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) podem ser moléculas efetoras do sistema imune inato de diversos organismos (CHEN et al., 2019; JENSSEN et al., 2006; LÁZÁR et al., 2018). Estas moléculas desempenham um importante papel como primeira linha de defesa contra patógenos, sendo expressos de forma constitutiva ou induzida por diferentes tipos de células em resposta a estímulos infecciosos e/ou inflamatórios (JENSSEN et al., 2006; SALA et al., 2018; VELDHUIZEN et al., 2014). Em bactérias, os PAMs surgiram como um meio para combater os competidores microbianos (KUMAR et al., 2018; YOUNT et al., 2019).

Os PAMs são moléculas de cadeia curta (<50 resíduos de aminoácidos) geralmente catiônicas e anfipáticas, as quais podem ser lineares (Figura 1a, b, c) ou cíclicas (Figura 1e). A natureza catiônica dos PAMs pode ser atribuída à presença de resíduos de lisina, arginina e, com menor frequência, resíduos de histidina (pH dependente). Por sua parte, a anfipaticidade dos PAMs está geralmente associada com a segregação (em faces opostas da molécula) de aminoácidos básicos e hidrofóbicos ao longo da estrutura tridimensional (NGUYEN et al., 2011; ZHANG E GALLO, 2016). Com relação a isto, estudos têm revelado que a natureza catiônica e anfipática dos PAMs pode estar diretamente relacionada com sua função antibacteriana (GOTTSCALK et al., 2015; JENSSEN et al., 2006).

A variada gama de estruturas secundárias adotadas por PAMs, as quais são frequentemente induzidas por contato com membranas celulares, têm sido comumente categorizadas em três classes principais: α -hélice, folha β e estruturas estendidas (Figura 1) (KUMAR et al., 2018; NGUYEN et al., 2011). No entanto, a estrutura secundária de alguns peptídeos diverge das categorias acima mencionadas, podendo mostrar estruturas altamente dinâmicas ou mistas (por exemplo, misturas de α -hélice e folha β) (JENSSEN et al., 2006; SUN et al., 2018).

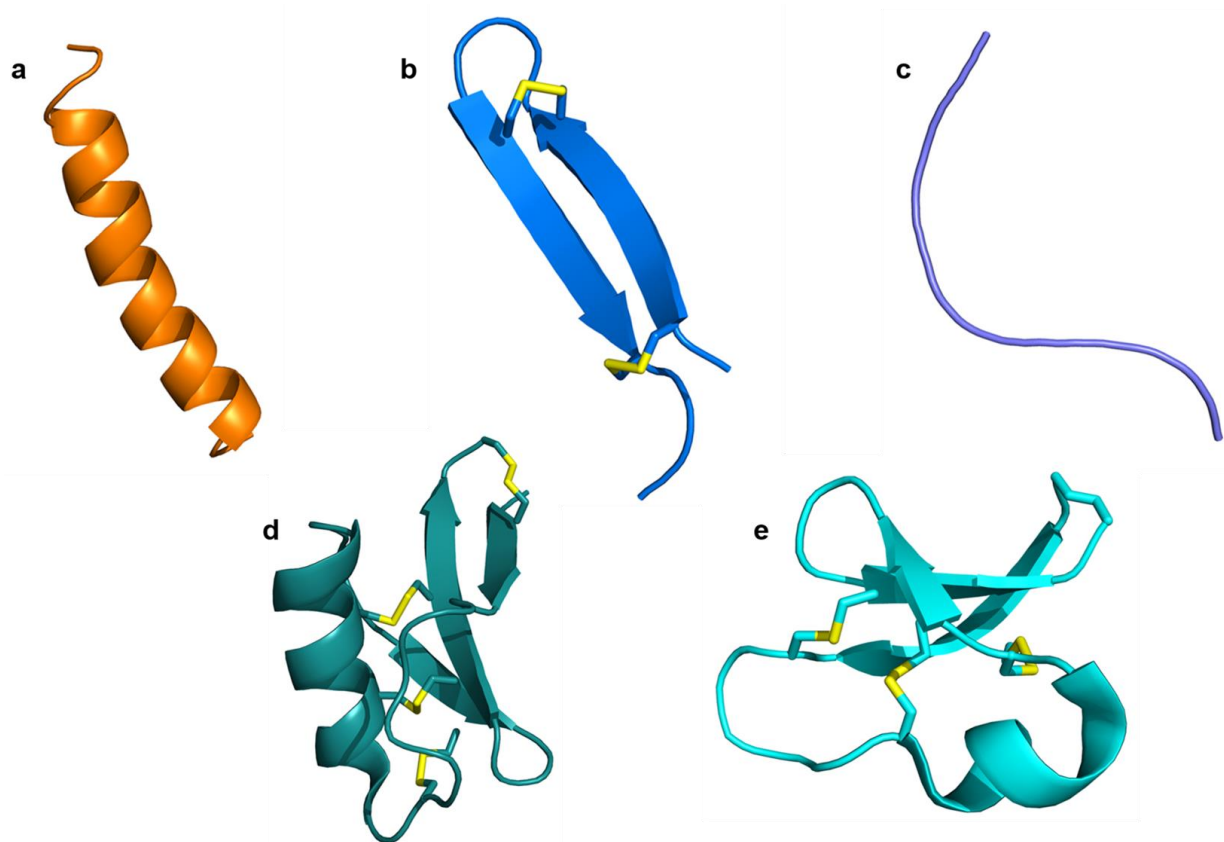


Figura 1. Principais tipos de estruturas tridimensionais adotadas por PAMs. **(a)** Conformação em α -hélice do peptídeo isolado de células epiteliais da rã *Xenopus laevis*, magainina-2 (PDB: 2MAG); **(b)** conformação em folha β do peptídeo gomesina (PDB: 1KFP) isolado de hemócitos da aranha *Acanthoscurria gomesiana*; **(c)** estrutura estendida da indolicidina (PDB: 1G89) isolada de neutrófilos bovinos (*Bos taurus*); **(d)** estrutura mista da β -defensina PSD1 (PDB: 1JKZ) isolada de sementes da planta *Pisum sativum*; **(e)** conformação cíclica do peptídeo cicloviolacina O2 (PDB: 2KNM) derivado da planta *Viola odorata*. As ligações dissulfeto estão destacadas em amarelo. As estruturas foram visualizadas utilizando o programa PyMOL v1.8 (*Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC*).

Com frequência os PAMs mostram um amplo espectro de atividades. Estas moléculas podem ser efetivas na eliminação de bactérias, fungos e vírus, sendo ainda esse espectro estendido contra células tumorais e de parasitas (SALA et al., 2018; YAN E HANCOCK, 2001). Além disso, propriedades imunomodulatórias também vêm sendo relatadas para PAMs produzidos por organismos eucariontes (HANCOCK E SAHL, 2006; LIU et al., 2018; SALA et al., 2018). Em adição, as diversas características físico-químicas e múltiplos mecanismos de ação, incluindo permeabilização da membrana,

inibição da síntese de DNA e fosfolipídios, tornam estas moléculas alternativas antibacterianas promissoras, sendo capazes de atuar em vias biossintéticas diferentes daquelas relatadas para antibióticos convencionais (GOTTSCHALK et al., 2015; SALA et al., 2018).

1.4. MECANISMOS DE AÇÃO DOS PAMs

Como descrito anteriormente, os PAMs exibem diversos mecanismos de ação, podendo atuar em múltiplos alvos bacterianos. Dessa forma, estudos mostram que, independentemente do modo de ação (em nível de membrana ou intracelular), a interação dos PAMs com a superfície bacteriana é o passo inicial para execução da atividade desses peptídeos (CHAN et al., 2006; JENSSEN et al., 2006), uma vez que, mesmo os peptídeos com alvos intracelulares precisam de um meio de translocação (NGUYEN et al., 2011). A atração eletrostática produzida entre as cargas positivas dos PAMs e as cargas negativas das superfícies bacterianas (principalmente ácidos teicóicos (AT) em Gram-positivas e lipopolissacarídeos (LPS) em Gram-negativas), somado as interações hidrofóbicas entre PAMs e as cadeias apolares dos fosfolipídios bacterianos, permitem o ancoramento e inserção dos PAMs nas membranas bacterianas. Estas interações podem também permitir a alteração da organização dos fosfolipídeos de membrana (KUMAR et al., 2018). Com relação a isto, diversos modelos têm sido propostos para explicar as diferentes conformações que os PAMs podem adotar para exercer sua ação sobre membranas biológicas (JENSSEN et al., 2006; KUMAR et al., 2018; SUN et al., 2018). Assim, é preciso que estas moléculas (PAMs) atinjam uma concentração ideal, geralmente considerada como a concentração de PAMs próxima à saturação da membrana, para exercer sua ação (MELO et al., 2009). Não entanto, é importante ressaltar que dita “concentração ideal” pode variar com o peptídeo em si e sua concentração inibitória mínima, bem como com a composição lipídica da célula alvo (BRODGEN et al., 2005; MELO et al., 2009). Os mecanismos através dos quais os PAMs alteram a integridade das membranas plasmáticas estão ilustrados na Figura 2.

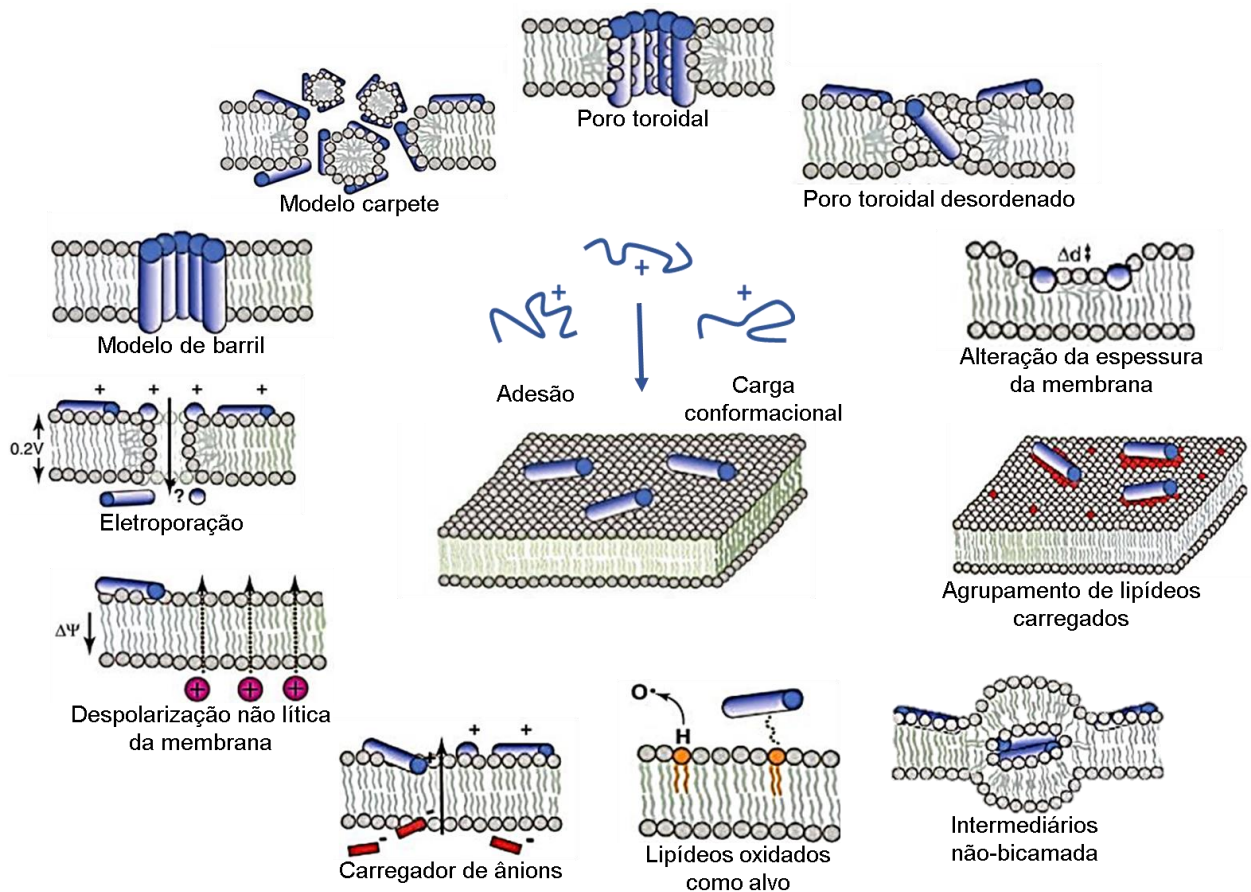


Figura 2. Modelos propostos para os mecanismos de permeabilização de membrana dos PAMs. Posteriormente a adesão inicial à membrana os PAMs podem permeabilizar a bicamada lipídica por meio de vários mecanismos. Os PAMs podem criar poros mediante a formação de feixes na membrana no modelo de barril, poros constituídos por peptídeos e lipídeos no modelo de poro toroidal ou poros sem a formação de uma estrutura regular na bicamada lipídica no modelo de poro toroidal. A destabilização produzida pela ligação dos PAMs à superfície da membrana no modelo carpete, pode ser seguida da ruptura da bicamada lipídica por meio da formação de estruturas micelares no modelo detergente. PAMs podem ainda alterar a espessura das membranas, suscitar o agrupamento de lipídeos, a formação de intermediários não-bicamada, unir-se a ânions e provocar sua saída através da membrana, dissipar ou aumentar o potencial de membrana e, por fim, melhorar a sua inserção nas bicamadas lipídicas pela presença de lipídeos oxidados. Figura adaptada de Nguyen et al. (2011).

Os modelos de barril e poro toroidal são definidos como modelos análogos, haja vista que em ambos os modelos os PAMs se inserem de forma perpendicular na bicamada lipídica com suas regiões hidrofóbicas interagindo com as caudas apolares dos fosfolipídeos da membrana e porções hidrofílicas constituindo o lúmen do poro (SUN et al., 2018). No entanto, algumas diferenças entre os modelos barril e poro toroidal vem sendo destacadas. A formação dos poros no modelo de barril ocorre

através da agregação de PAMs, os quais se inserem na bicamada lipídica. Aqui, a face hidrofóbica dos PAMs interage com o núcleo fosfolipídico da membrana, enquanto a face hidrofílica permanece disposta ao lúmen do poro (BAUMANN E MUELLER, 1974; BROGDEN, 2005; SUN et al., 2018). Por outro lado, no modelo de poro toroidal, a inserção dos PAMs induz a curvatura contínua dos fosfolipídeos da membrana ao redor do poro. Dessa forma, o lúmen do poro estará revestido por grupos de cabeça lipídicos e monômeros de PAMs associados (KUMAR et al., 2018; LUDTKE et al., 1996; MELO et al., 2009). Ademais, é sabido que estes mecanismos levam à despolarização da membrana plasmática, fluxo livre de íons e moléculas pequenas (KUMAR et al., 2018). No modelo de poro toroidal desordenado, em contraste com o de poro toroidal, os PAMs não adotam uma estrutura regular na bicamada lipídica, mantendo uma orientação difusa através do poro. Neste modelo, os peptídeos estão dispostos, em sua maioria, nas extremidades do poro (estabilizando-o), com um menor número de PAMs no lúmen (LEONTIADOU et al., 2006; NGUYEN et al., 2011). Já no modelo carpete os PAMs se orientam paralelamente à superfície da membrana, provocando a sua desestabilização. Acredita-se que a altas concentrações os PAMs se reorientem, causando a permeabilização da membrana através da formação de estruturas micelares (então denominado modelo detergente), resultando em vazamento do conteúdo citoplasmático, seguido de morte celular (BROGDEN, 2005; POUNY et al., 1992; SUN et al., 2018).

Em adição aos modelos previamente descritos e mais comumente relatados na literatura, diversos estudos têm descrito outros modelos através dos quais os PAMs também podem suscitar a permeabilização das membranas microbianas. Em geral, a espessura das membranas lipídicas pode ser alterada pela presença de PAMs (LONHER, 2009) ou pelo agrupamento de lipídeos aniônicos provocado por estas moléculas, o que resultaria em vazamento do conteúdo citoplasmático e/ou despolarização da membrana (EPAND E EPAND, 2011). PAMs podem ainda induzir a formação de intermediários não-bicamada, unir-se a ânions e provocar sua saída através da membrana. Ademais, os PAMs podem dissipar o potencial da bicamada lipídica sem maior dano ou, pelo contrário, causar o aumento do potencial de

membrana (quando os peptídeos atingem um limiar de concentração sobre a face externa), suscitando a permeabilidade transitória, permitindo assim, o passo de várias moléculas (NGUYEN et al., 2011).

Nas últimas décadas, tem sido demonstrado que os PAMs, além de causar a disrupção da integridade de membranas biológicas, também possuem a capacidade de se translocar através da bicamada lipídica. Dessa forma, há um aumento da concentração peptídica no espaço periplasmático e intracelular, o que pode desencadear a morte celular por meio da inibição de processos celulares essenciais (MISHRA et al., 2018; SHAH et al., 2016; SUN et al., 2018). Assim, os PAMs podem inibir a síntese da parede celular bacteriana, por exemplo, por meio de união a lipídeo II, um precursor da síntese do peptidoglicano que se encontra associado à membrana citoplasmática (BROGDEN, 2005; DE LEEUW et al., 2012; SASS et al., 2010). Por outro lado, várias observações sugerem que os PAMs inibem a síntese de DNA, RNA e proteínas (BOMAN et al., 1993; JENSSEN et al., 2006; PATRZYKAT et al., 2002). Deste modo, ao ingressar às células, os PAMs podem se unir a moléculas aniônicas, como DNA e RNA, bloqueando as funções celulares e resultando na morte celular (KO et al., 2019; PARK et al., 1998; YAN et al., 2013). Outros PAMs inibem a síntese de proteínas associadas a distintos processos metabólicos da célula (SHAH et al., 2016). PAMs podem bloquear a incorporação de aminoácidos, sugerindo a interrupção de processos como a transcrição e replicação do DNA (BOMAN et al., 1993). Somado a isto, também vem sendo demonstrado a inibição da síntese de proteínas através da união de PAMs as subunidades dos ribossomos (BULKLEY et al., 2014; SCOCCHI et al., 2016). Além disso, a inibição da atividade enzimática interfere diretamente nos processos celulares, interferindo na homeostase celular (JENSSEN et al., 2006). Alguns PAMs podem se unir a proteínas como a DnaK, afetando o correto dobramento das proteínas (JENSSEN et al., 2006; KRAGOL et al., 2001); PAMs podem também atuar como inibidores da RNA polimerase bacteriana por ligação ao canal de entrada dos substratos de ribonucleotídeos, interrompendo assim, a síntese do RNA (BRAFFMAN et al., 2019).

Nos últimos anos, os PAMs têm sido utilizados como ponto de partida para a criação de bibliotecas de peptídeos, mediante modificações das sequências de peptídeos naturais utilizados como moldes, visando o aprimoramento das funções biológicas e redução do tamanho e, conseqüentemente, a diminuição dos custos de produção (DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al., 2016).

1.5. DESENHO RACIONAL DE PAMs

O desenvolvimento de PAMs como substâncias terapêuticas exige o cumprimento de determinadas características (FJELL et al., 2012). Deste modo, a aplicação de PAMs como agentes anti-infecciosos requer que estas moléculas apresentem, em adição a sua atividade antimicrobiana, baixa toxicidade na dose terapêutica (FJELL et al., 2012; SUN et al., 2018). Neste contexto, embora sejam relatadas uma diversa gama de atividades biológicas para os PAMs, muitos destes peptídeos exibem também atividade hemolítica e citotóxica frente a células saudáveis de mamíferos, bem como susceptibilidade a degradação proteolítica (CHEN et al., 2005; MANT et al., 2019; SALA et al., 2018; WANG et al., 2016). Como consequência, há o comprometimento do índice terapêutico e estabilidade destas moléculas (CARDOSO et al., 2018) o que, por sua vez, representa um obstáculo para seu uso na prática clínica tanto para humanos como animais (pecuária) (HUANG et al., 2010). Em vista disso, grande atenção tem sido depositada para o desenho racional de PAMs. Essas estratégias surgiram como uma alternativa para o desenvolvimento de PAMs com desempenho melhorado (FJELL et al., 2012; SUN et al., 2018). Assim, modificações, adições ou deleções de resíduos de aminoácidos nas sequências de PAMs desenhados têm sido realizadas visando melhorar as propriedades destas moléculas no que se refere a especificidade contra patógenos, toxicidade inespecífica, maior estabilidade ou modulação do espectro de ação (MARCOS et al., 2008).

As metodologias de desenho racional podem incluir métodos físico-químicos e métodos baseados em molde. Deste modo, embora o objetivo dos métodos baseados

em molde seja reduzir o tamanho, aumentar a seletividade e/ou diminuir a citotoxicidade de sequências peptídicas conhecidas, este enfoque pode fazer uso das informações geradas pelos métodos físico-químicos (carga, hidrofobicidade, momento hidrofóbico, propensão de α -hélice) (AHN et al., 2006; CARDOSO, 2019; IRAZAZABAL et al., 2016). Portanto, as estratégias de desenho racional de PAMs podem ser classificadas em duas grandes classes: incluindo desenhos baseados em *template* (que inclui métodos físico-químicos e métodos baseados em molde) e métodos *de novo*.

A atual disponibilidade de uma maior informação sobre a relação estrutura-função de diversos PAMs nas bases de dados públicas tem permitido o uso destes como *template* (desenho baseado em molde) para o desenvolvimento de PAMs otimizados (CARDOSO et al., 2018; PORTO et al., 2017; SUN et al., 2018). Assim, sequências de peptídeos com modelo estrutural previamente descrito são utilizados como base, por exemplo, a para a substituição de resíduos de aminoácidos (FJELL et al., 2012). Isto pode promover a alteração das características dos peptídeos que estão diretamente relacionadas com suas atividades antimicrobianas, como a carga, hidrofobicidade e arranjo estrutural anfipático (CARDOSO et al., 2016; PORTO et al., 2012). Assim, a modulação dessas características pode suscitar o aumento da atividade antimicrobiana e/ou diminuição da toxicidade do peptídeo (IRAZAZABAL et al., 2016; ROBINSON, 2011). Ademais, estratégias de desenho pela substituição de resíduos também têm permitido a identificação da importância de aminoácidos específicos e sua posição para uma determinada atividade do peptídeo molde/modificado (FJELL et al., 2012; HUANG et al., 2010; PAG et al., 2008). Além disso, a substituição de resíduos naturais por resíduos modificados, como D-aminoácidos, tem sido realizada objetivando uma menor susceptibilidade à degradação proteolítica em PAMs (CHEN et al., 2005; HUANG et al., 2010).

Dentro da ideia de modificação e adição de resíduos de aminoácidos em PAMs, podemos citar a modificação incremental de sequências peptídicas com resíduos hidrofóbicos. Deste modo, a adição de *end-tags* constituídas de resíduos apolares (triptofano, fenilalanina, lisina, isoleucina e prolina) às porções N- ou C-

terminal da sequência de alguns PAMs tem promovido o melhoramento do potencial antimicrobiano e atividade imunomodulatória destas moléculas (PASUPULETI et al., 2009; SCHMIDTCHEN et al., 2009; SILVA et al., 2016).

A fusão de fragmentos de PAMs consiste, também, em uma estratégia de desenho racional para a obtenção de quimeras (ou híbridos) que possuem características favoráveis de ambos os peptídeos parentais (FJELL et al., 2012; MARCOS et al., 2008; SUN et al., 2018). Por exemplo, Andreu et al. (1992) elaboraram peptídeos quiméricos de cecropina A e melitina com potencial antimicrobiano melhorado e maior espectro de ação em relação a cecropina A, sem apresentar ainda os efeitos citotóxicos da melitina. Estas quimeras também foram desenhadas visando a redução do tamanho das sequências parentais, com o propósito otimizar sua síntese química. Mais recentemente, Memariani et al. (2016) desenharam um peptídeo quimérico curto, denominado PV3, a partir de resíduos da região N-terminal do peptídeo pEM-2 derivado da peçonha da serpente *Bothrops asper* e resíduos da região C-terminal do peptídeo isolado de *Vespa tropica*, mastoparano-VT-1. Este peptídeo mostrou atividade antibacteriana frente a cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, sendo também ativo na redução da biomassa do biofilme desta bactéria.

Em contraste aos métodos baseados em *template*, os métodos *de novo* não utilizam moldes para criação de análogos peptídicos. Em muitos casos, a conformação tridimensional em hélice anfipática é o único ponto de partida para o desenho *de novo* de PAMs (JAVADPOUR et al., 1996). O desenho *de novo* permite gerar uma grande variedade de sequências peptídicas usando apenas frequências ou padrões de aminoácidos e preferências de posicionamento (PORTO et al., 2012). Estes padrões podem ser gerados, por exemplo, através do alinhamento de porções de diversas sequências peptídicas, como realizado por Tossi et al. (1997). No trabalho destes autores, foram levados em consideração parâmetros como o tamanho, cationicidade, propensão de α -hélice e conformação anfipática de sequências candidatas para o desenvolvimento de padrões, os quais poderiam ser aplicados para o desenho de PAMs. Neste mesmo sentido, o modelo linguístico desenvolvido por Loose et al. (2006)

representa uma estratégia adicional para o desenho de PAMs. No entanto, diferentemente do método desenvolvido por Tossi et al. (1997), no modelo linguístico os PAMs são modelados com base em uma linguagem formal que utiliza “regras gramaticais” (determinados padrões) e um vocabulário formado por aminoácidos representados por letras (por exemplo, lisina (K) e arginina (R)) (LOOSE et al., 2006).

Adicionalmente, o algoritmo *Joker* (PORTO et al., 2018), o qual foi desenvolvido com base no modelo linguístico (LOOSE et al., 2006), gera novas sequências de PAMs partir da inserção de um padrão rígido (em um sistema de janela de deslizamento) em sequências modelo por meio da substituição direta de aminoácidos. Em contraste ao modelo linguístico, o algoritmo *Joker* precisa de um menor número de sequências (centenas ou dezenas) para a identificação de PAMs, possui a capacidade de desenhar PAMs a partir de peptídeos inativos, bem como melhorar as características dos PAMs existentes. Somado a isto, o *Joker* precisa de um único padrão para o desenho de PAMs, sem similaridade com peptídeos já conhecidos (PORTO et al., 2018).

Em adição aos métodos de reconhecimento/busca de padrões acima descritos, o desenvolvimento de algoritmos para a predição da estrutura e função de peptídeos constitui uma estratégia adicional para o desenho computacional de PAMs. Dentre estes, podemos citar os algoritmos de aprendizado de máquinas (*machine learning*), os quais estão baseados em inteligência artificial e que são treinados com diferentes descritores, incluindo propriedades físico-químicas e estruturais (CARDOSO 2019; KOTSIANTIS 2007; PORTO et al., 2017). Por sua vez os algoritmos evolutivos (em particular, métodos de evolução e algoritmos genéticos) simulam processos evolutivos *in silico* para a obtenção de novos peptídeos (através de sucessivas gerações de mutações ou deleções) com a melhor resposta esperada (avaliada em função de *fitness*) (FJELL et al., 2012).

O conhecimento atual acerca das características físico-químicas e biológicas dos PAMs, somado à ampla gama de sequências conhecidas e preditas para estas

moléculas, representa uma grande e importante fonte de informação sobre PAMs. Neste contexto, as estratégias de desenho racional citadas acima representam importantes ferramentas para o desenvolvimento de peptídeos com perfis de atividade melhoradas favorecendo, assim, a aplicação destas moléculas no tratamento de doenças tanto em humanos como em animais (SUN et al., 2018).

1.6. MASTOPARANOS

As vespas, assim como outros insetos da ordem Hymenoptera como abelhas e formigas, produzem peçonhas que podem ser utilizados para a própria defesa, defesa das larvas e captura de presas (KONNO et al., 2016; LEE et al., 2016; NAKAJIMA, 1986; PIEK E SPANJER 1986). Estas substâncias exibem diversas atividades biológicas, podendo atuar como alérgenos, antimicrobianos, hemolíticos, neurotoxinas, neuromoduladores, neurotransmissores, dentre outros (BAEK E LEE, 2010; KONNO et al., 2001; LEE et al., 2016).

A peçonha das vespas tem sido considerado uma importante fonte de moléculas bioativas com potencial aplicação na clínica e agricultura (LEE et al., 2016; MORENO E GIRALT, 2015; XU et al., 2006). A composição química desta complexa mistura de substâncias têm sido bem estudada, sendo relatados como principais componentes algumas proteínas (enzimas e alérgenos), peptídeos, aminoácidos e aminas biogênicas (BAEK E LEE, 2010; KONNO et al., 2000; LEE et al., 2016; LIU et al., 2015; SOUZA et al., 2005). Dentre essa grande variedade de componentes da peçonha das vespas, os peptídeos são componentes predominantes, constituindo aproximadamente o 70% da peçonha (LIU et al., 2015). Assim, diversos peptídeos têm sido isolados da peçonha de diferentes espécies de vespas (HIRAI et al., 1979; KONNO et al., 2000, 2001; LEE et al., 2016; SOUZA et al. 2005). Dentre estes, os mastoparanos consistem o componente peptídico mais abundante na peçonha de vespas solitárias e sociais (LEE et al., 2016). Os mastoparanos são caracterizados ainda por causar degranulação de mastócitos (HIGASHIJIMA et al., 1988; KONNO et al., 2000) e

apresentar alta atividade hemolítica (KONNO et al., 2000). O primeiro isolamento, caracterização e síntese química de mastoparanos foi realizado por Hirai et al. (1979), a partir da peçonha da vespa *Vespula lewissii*. A partir desta descoberta, diversas pesquisas têm focado na busca de moléculas bioativas, principalmente peptídeos, presentes nas peçonhas destes organismos (KONNO et al., 2016; MORENO E GIRALT 2015). Dessa forma, um crescente número de atividades biológicas têm sido reportadas para peptídeos da classe dos mastoparanos, incluindo atividades antimicrobianas (KAWAKAMI et al., 2017; VILA-FARRES et al., 2011; YIBIN et al., 2005), anticancerígenas (HILCHIE et al., 2016; YAMADA et al., 2005), antibiofilme (MEMARIANI et al., 2018) e antiviral (SAMPLE et al., 2013).

Os mastoparanos são peptídeos catiônicos constituídos de 10 a 14 resíduos de aminoácidos. Estes peptídeos são ricos em resíduos básicos (geralmente lisina e arginina) e hidrofóbicos (incluindo leucina, alanina, isoleucina e valina) (CHEN et al., 2018; HIGASHIJIMA et al., 1988; KONNO et al., 2001; KONNO et al., 2016). Além disso, os mastoparanos apresentam a porção C-terminal amidada e adotam uma conformação tridimensional anfipática em α -hélice (ambiente dependente). Em relação a isto, a estrutura anfipática dos mastoparanos é conhecida como uma característica essencial para sua adsorção, inserção e translocação através das bicamadas lipídicas (CHEN et al., 2018; KONNO et al., 2016). Ademais, visto a baixa seletividade celular comumente relatada para membros da classe dos mastoparanos, esses peptídeos têm sido utilizados como modelo para o desenvolvimento de PAMs através de estratégias de desenho racional.

1.7. MASTOPARANO-L E DERIVADOS

O peptídeo mastoparano-L, também conhecido como mastoparano (MP) (ARGIOLAS E PISANO, 1983; DE AZEVEDO et al., 2015; HILCHIE et al., 2016; HORI et al., 2001; KAWAKAMI et al., 2017), foi o primeiro peptídeo da classe dos mastoparanos a ser isolado (HIRAI et al., 1979). Este peptídeo, o qual é constituído de

14 resíduos de aminoácidos (INLKALAALAKKIL-NH₂) (Figura 3) e derivado da peçonha da vespa *Vespula lewissii*, foi inicialmente caracterizado como um peptídeo que causa degranulação de mastócitos, estimulando a liberação de histamina destas células (HIRAI et al., 1979). Estudos iniciais das atividades biológicas do mastoparano-L mostraram que este peptídeo é um potente estimulador da exocitose de diversas células de mamíferos, promovendo a liberação de substâncias como histamina, serotonina, catecolaminas e prolactinas (HIGASHIJIMA et al., 1988). Ademais, é sabido que o peptídeo mastoparano-L é capaz de perturbar a sinalização transmembrana por meio de interação com a proteína G alocada na face citoplasmática da membrana (HIGASHIJIMA et al., 1988). Além disso, estudos mostram que este peptídeo pode estimular a atividade de fosfolipase A₂ (ARGIOLAS E PISANO, 1983) e induzir a transição da permeabilidade mitocondrial (PFEIFFER et al., 1995).

Com o passar dos anos, um maior número de atividades vem sendo descritas para o peptídeo mastoparano-L, incluindo atividades antitumoral, hemolítica e citotóxica (células saudáveis provenientes de mamíferos) (HILCHIE ET AL., 2016; MORENO E GIRALT 2015). Em adição, a atividade antibacteriana do peptídeo mastoparano-L tem sido demonstrada frente a cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas de relevância clínica (SILVA, 2015), incluindo *Acinetobacter baumannii* (VILA-FARRES et al., 2011), *E. coli*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus* (KAWAKAMI et al., 2017) e várias espécies do gênero *Chlamydia* (DONATI et al., 2017). Somado a isso, atividades antifúngicas também vêm sendo observadas frente a *Saccharomyces cerevisiae* (KAWAKAMI et al., 2017).

Como descrito anteriormente, o peptídeo mastoparano-L pode ser classificado como um peptídeo citolítico e, conseqüentemente, pode atuar em diferentes tipos celulares, como células tumorais e cancerígenas. De Azevedo et al. (2015), demonstraram que o mastoparano-L causa a morte de células de melanoma murino, *in vitro*, por meio da perda do potencial de membrana mitocondrial, geração de espécies reativas do oxigênio e degradação do DNA. Além disso, estes autores mostraram que o mastoparano-L reduz o crescimento *in vivo* de melanoma subcutâneo

em ratos, aumentando a sobrevivência dos animais. Do mesmo modo, segundo Hilchie et al.(2016), o peptídeo mastoparano-L possui atividade citotóxica contra células de leucemia, carcinoma de mama, mieloma, bem como, células cancerígenas resistentes a múltiplas drogas e de crescimento lento.

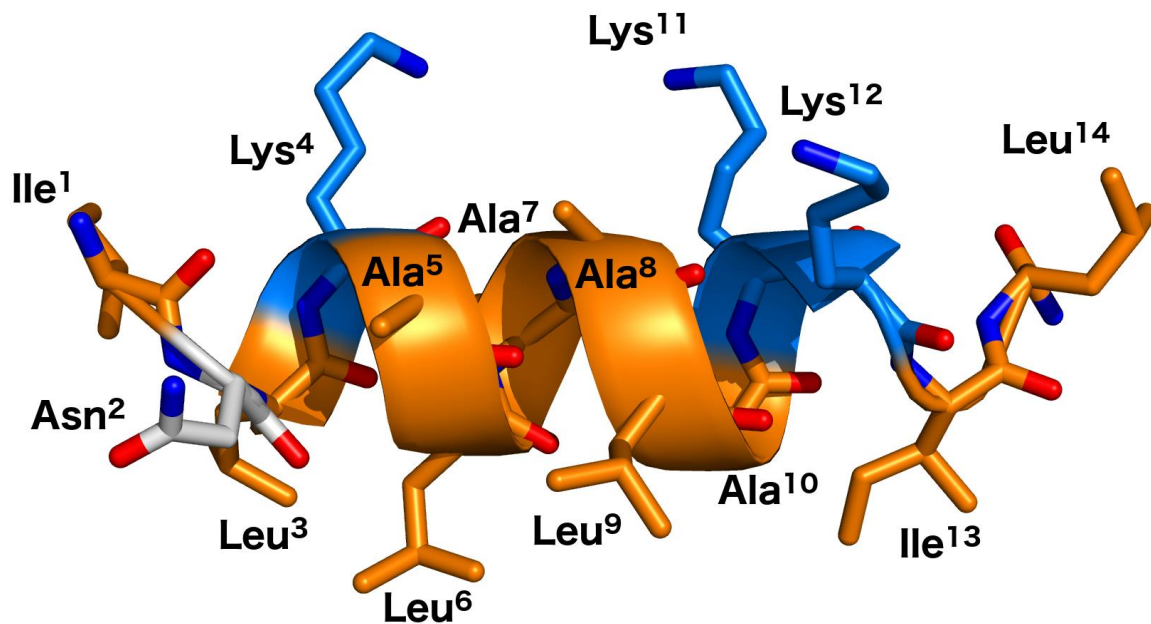


Figura 3. Estrutura tridimensional do peptídeo mastoparano-L resolvida por ressonância magnética nuclear (PDB: 1D7N) (HORI et al., 2001). Disposição dos aminoácidos dentro da cadeia principal: resíduos apolares estão representados em laranja; resíduos polares não carregados em branco e resíduos polares carregados positivamente em azul.

Entretanto, embora o mastoparano-L possua uma ampla gama de atividades biológicas, este peptídeo apresenta alta atividade hemolítica e citotóxica frente a células de saudáveis de mamíferos (ARGIOLAS E PISANO, 1983; KAWAKAMI et al., 2017; MORENO AND GIRALT, 2015; SILVA, 2015). Portanto, esta falta de especificidade celular para exercer suas funções inviabiliza certas aplicações médicas e biotecnológicas. Assim, o desenvolvimento de peptídeos análogos baseados na estrutura do mastoparano-L representa uma estratégia para a otimização das atividades biológicas deste peptídeo, assim como, a diminuição ou eliminação das atividades

hemolíticas e citotóxicas. Com este propósito, três derivados de mastoparano-L foram desenvolvidos e vem sendo investigados acerca de seu potencial farmacológico, sendo eles o mastoparano-MO (SILVA, 2015), [I⁵, R⁸] MP (IRAZAZABAL et al., 2016) e mastoparano-R1 (OSHIRO, 2018).

Uma das estratégias empregadas para contornar a problemática da citotoxicidade de PAMs foi a adição de aminoácidos à sequência do mastoparano-L. Assim, Silva (2015) utilizou a modificação incremental do mastoparano-L visando reduzir ou eliminar as atividades citotóxica e hemolítica deste peptídeo, além de manter ou melhorar a atividade antibacteriana do peptídeo parental. Neste trabalho foi realizada a busca computacional de regiões conservadas em PAMs com atividade antimicrobiana e imunomodulatória preditas. Deste modo, uma *end-tag* de cinco resíduos de aminoácidos apolares (FLPII) foi adicionada à porção N-terminal do peptídeo mastoparano-L. Este novo derivado foi denominado mastoparano-MO (FLPIIINLKALAALAKKIL-NH₂). Como resultado, o derivado mastoparano-MO mostrou atividade antimicrobiana melhorada, quando comparado com o mastoparano-L, frente a cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, susceptíveis e resistentes (SILVA, 2015).

Em adição a estratégia de modificação incremental aplicada ao mastoparano-MO, Irazazabal et al., (2016) utilizaram a estratégia de substituição de aminoácidos para desenvolver o peptídeo [I⁵, R⁸] MP. Deste modo, os resíduos de alanina alocados na posição 5 e 8 na sequência do peptídeo mastoparano-L foram substituídos por resíduos de isoleucina e arginina, respectivamente (INLKILARLAKKIL-NH₂). A substituição do aminoácido arginina na posição 8 foi realizada visando o aumento da carga líquida do peptídeo (de +3 em mastoparano-L para +4 em [I⁵, R⁸] MP), procurando também não alterar o ângulo determinado pela face carregada na estrutura helicoidal do peptídeo. Somando a isto, a arginina foi escolhida por ser um resíduo classificado como o segundo aminoácido com maior propensão de α -hélice, de acordo com a escala de Pace-Scholtz (PACE E SCHOLTZ, 1998). Ademais, visto que a arginina e isoleucina possuem valores opostos de hidrofobicidade na escala Kyte-

Doolittle (KYTE E DOOLITTLE. 1982), uma isoleucina foi adicionada na posição 8 para contrabalançar a hidrofobicidade do peptídeo [I⁵, R⁸] MP. Nesta investigação, o derivado [I⁵, R⁸] MP mostrou potente atividade antimicrobiana frente a cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* e *S. aureus*; além de fungos como *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. Ademais, o peptídeo [I⁵, R⁸] MP não mostrou atividade citotóxica perante a células embrionárias de rim e eritrócitos humanos.

Somados às técnicas de desenho racional por métodos incrementais ou de substituição pontual descritas acima, o derivado mastoparano-R1 (OSHIRO, 2018) foi desenhado por métodos computacionais. Para isso, foi utilizado o algoritmo *Joker* (PORTO et al., 2018) para inserir o padrão "K - [ILV] - [AL] - X - [RKD] - [ILV] - X - X - K - I" na sequência do mastoparano-L. Assim, foram realizadas cinco substituições nas posições 1, 2, 5, 9 e 10 na sequência do peptídeo mastoparano-L para a obtenção do derivado mastoparano-R1 (KILKRLAAKIKKIL-NH₂). Neste estudo, o derivado mastoparano-R1 não mostrou atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos nem citotoxicidade contra adipócitos de camundongo e células endoteliais de humanos. O mastoparano-R1 foi ainda ativo contra vários isolados clínicos bacterianos susceptíveis e resistentes a antibióticos, além de demonstrar um grande potencial de erradicar biofilmes bacterianos pré-formados.

O desenho de peptídeos sintéticos se torna cada vez mais atraente na medida que se dispõe de maior informação sobre a estrutura e função dos peptídeos naturais (SUN et al., 2018). Como mostrado, as modificações realizadas na sequência do peptídeo mastoparano-L têm permitido a otimização de certas características químicas e biológicas deste peptídeo, o que por sua vez tornaria possível a aplicabilidade dos PAMs no tratamento de doenças humanas e animais. Interessantemente, mesmo considerando a aplicabilidade de membros da classe dos mastoparanos, não há relatos da avaliação do seu potencial terapêutico no âmbito das infecções em animais. Dessa forma, este trabalho propõe a investigação comparada do potencial antibacteriano dos peptídeos mastoparano-L, mastoparano-MO, [I⁵, R⁸] MP e

mastoparano-R1 frente a cepas de *S. aureus* isoladas de bovinos com quadro de mastite bovina.

2. JUSTIFICATIVA

A rápida evolução da resistência aos antibióticos desenvolvida pelas bactérias representa um grande desafio, haja vista que esses medicamentos constituem a principal ferramenta para o tratamento e controle da mastite nos sistemas de produção de laticínios. Neste cenário, a problemática da resistência bacteriana se vê agravada pelo manejo inadequado de fármacos na produção pecuária o que, por sua vez, acaba por impactar também na saúde humana. Diante disso, tem sido imperativo o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de doenças animais, como a mastite bovina causada por *S. aureus*. Neste sentido, PAMs surgem como uma alternativa antibacteriana promissora aos antibióticos convencionais. Os PAMs constituem moléculas de <50 resíduos de aminoácidos, sintetizadas por diversos organismos vivos como parte de sua primeira linha de defesa. Estas moléculas têm sido utilizadas como molde para a construção de peptídeos sintéticos com o intuito de potencializar suas funções biológicas, além de reduzir seu tamanho e custo de produção. Os mastoparanos (peptídeos catiônicos isolados da peçonha de vespas) constituem uma classe de PAMs com amplo espectro de atividades biológicas e diversos mecanismos de ação destacando, assim, seu potencial biotecnológico e terapêutico. No entanto, a falta de especificidade celular destes peptídeos inviabiliza certas aplicações em modelos animais. Assim, através do desenho racional tem-se realizado modificações nos resíduos de aminoácidos dessas moléculas, visando diminuir ou eliminar os efeitos adversos e preservando ou melhorando sua atividade antibacteriana. Portanto, o propósito deste projeto consiste na comparação estrutural e funcional de mastoparano-L e três de seus derivados contra cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, investigando também suas propriedades hemolíticas frente a eritrócitos de bovinos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Comparar estruturalmente o peptídeo mastorapano-L e três de seus derivados, bem como avaliar sua eficiência contra cepas de *S. aureus* isoladas de bovinos com quadro de mastite

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar as propriedades físico-químicas dos peptídeos de estudo;
- Comparar estruturalmente os peptídeos de estudo por meio de modelagem molecular;
- Determinar os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de mastoparano-L e seus derivados frente a cepas de *S. aureus* isoladas de bovinos com quadro de mastite;
- Determinar a cinética do tempo de morte dos melhores peptídeos candidatos frente as cepas de *S. aureus*;
- Avaliar a atividade hemolítica dos peptídeos sobre hemácias bovinas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS PEPTÍDEOS

As propriedades físico-químicas teóricas dos derivados mastoparano-R1, mastoparano-MO e [I⁵, R⁸] MP, assim como de seu peptídeo parental, foram determinadas utilizando o servidor *HeliQuest* (<http://heliquest.impc.cnrs.fr>) (GAUTIER et al., 2008), a partir das sequências de aminoácidos dos peptídeos. Assim, foram determinadas as cargas das moléculas (z), a hidrofobicidade (<H>) e o momento hidrofóbico (< μ H>) (este último usando a escala de EISENBERG et al. (1982)). Os diagramas de hélice para o peptídeo parental e seus derivados foram também obtidos através deste servidor.

4.2. COMPARAÇÃO ESTRUTURAL DOS PEPTÍDEOS

Inicialmente, as coordenadas atômicas do peptídeo mastoparano-L (código de acesso no *Protein Data Bank* (PDB): 1D7N (HORI et al., 2001)) foram usadas como *template* para a modelagem molecular comparativa dos peptídeos mastoparano-R1, mastoparano-MO e [I⁵, R⁸] MP. O *software* MODELLER v. 9.18 (FISER E ŠALI 2003) foi utilizado para realizar o alinhamento individual entre mastoparano-R1/1D7N, mastoparano-MO/1D7N e [I⁵, R⁸] MP/1D7N, como também, para a construção dos modelos tridimensionais através do método de modelagem pela satisfação de restrições espaciais. Um total de 100 modelos tridimensionais teóricos foram gerados para cada peptídeo. Os melhores modelos teóricos para todos os derivados foram escolhidos com base em suas energias livre (*DOPE score*). A validação dos parâmetros estereoquímicos foi realizada utilizando o programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993) a partir da avaliação dos comprimentos de ligação, os ângulos planos, a planaridade dos anéis de cadeias laterais, a quiralidade, as conformações das cadeias

laterais, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos das torções da cadeia principal e das cadeias laterais, o impedimento estérico entre pares de átomos não ligados e a qualidade do mapa de Ramachandran. Ademais, foi utilizada a ferramenta ProSA-web (WIEDERSTEIN E SIPPL, 2007) para analisar a qualidade do dobramento dos modelos teóricos gerados de acordo com outras estruturas de mesmo tamanho, resolvidas por ressonância magnética nuclear e depositadas no PDB. Finalmente, as estruturas validadas foram visualizadas e analisadas no programa PyMOL v1.8 (*Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC*).

4.3. CEPAS BACTERIANAS

Para todos os ensaios biológicos realizados no presente estudo foram utilizadas três cepas de *S. aureus* (isolados 02/18, 353/17 e Aurora) obtidos de vacas Girolando com quadro de mastite, pertencentes a fazendas localizadas nos municípios de Rochedo (19°57'11.5"S 54°253'17.1"W), Campo Grande (20°28'09.2" S 54°37'08.7"W) e Jaraguari (20°08'22.3"S 54°24'01.0" W) do estado de Mato Grosso do Sul. As estirpes bacterianas foram cedidas pela Profa. Dra. Cassia Rejane Brito Leal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

4.4. DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Para os ensaios de concentração inibitória mínima as bactérias foram semeadas em placas de ágar Muller-Hinton (MHA) e incubadas a 37 °C durante 18-24 h. Posteriormente, três colônias isoladas de cada bactéria foram inoculadas em tubos com 5 mL de caldo Muller-Hinton (MHB; três réplicas biológicas) e incubadas a 37 °C sob agitação a 200 rpm, *overnight*. Após este período, diluições 1:100 das culturas *overnight* foram realizadas em MHB e crescidas até a metade da fase logarítmica, em

triplicata. Em seguida, foram realizados os testes de concentração inibitória mínima (CIM) utilizando o método de microdiluição em placa de 96 poços, de acordo com Wiegand et al., (2008). As bactérias foram expostas a concentrações entre 1 e 32 μM dos peptídeos avaliados, sendo que a concentração bacteriana final em cada poço foi de 5×10^5 unidades formadoras de colônias (UFC). mL^{-1} . Diluições seriadas (1-32 μM) do antibiótico cloranfenicol e culturas bacterianas em MHB foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. Todos os testes foram realizados com três réplicas biológicas e três réplicas técnicas. As placas foram incubadas a 37 °C durante 18 h e as leituras da densidade ótica (D.O.) foram realizadas a 600nm. A CIM foi determinada como a menor concentração dos peptídeos ou antibiótico que inibiu 100% do crescimento bacteriano. Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), foram transferidos 10 μL das culturas bacterianas de cada poço correspondente ao valor da CIM (e dos poços precedentes) a placas de MHA, que logo foram incubadas a 37 °C durante 18-24 h. A concentração mais baixa do peptídeo que não permitiu o crescimento das sub-culturas bacterianas foi determinada como o valor de CBM.

4.5. ENSAIOS DE CINÉTICA DO TEMPO DE MORTE

A cinética do tempo de morte (*time-kill*) foi realizada utilizando o melhor peptídeo candidato do presente estudo, o peptídeo [I⁵, R⁸] MP, frente à cepa *S. aureus* Aurora, seguindo a metodologia descrita por Irazazabal et al. (2016). As bactérias foram semeadas em MHA e incubadas a 37 °C durante 18-24 h. Em seguida, três colônias isoladas foram transferidas a tubos com 5 mL de MHB e incubadas a 37 °C sob agitação a 200 rpm, *overnight*. Posteriormente, as culturas *overnight* foram diluídas (1:100) em MHB e crescidas até a metade da fase logarítmica, em triplicata. A densidade bacteriana foi ajustada para 5×10^6 UFC. mL^{-1} . Após, as culturas bacterianas foram expostas à CBM (8 μM) determinada para o peptídeo [I⁵, R⁸] MP (contendo cada poço um volume final de 150 μL) frente à cepa *S. aureus* Aurora. Alíquotas de 100 μL foram removidas a cada 10 min durante 90 min, sendo então diluídas (1:100, três diluições subsequentes) em solução salina (0,9%) e semeadas (50 μL) em placas de

MHA. A contagem das colônias foi realizada manualmente após 18-24 h de incubação das placas de ágar a 37 °C. O crescimento bacteriano nas mesmas condições acima descritas, mas sem a presença do peptídeo, foi avaliado para ser utilizado como controle de viabilidade celular.

4.6. ENSAIOS HEMOLÍTICOS

Para os ensaios hemolíticos foi utilizado sangue de bovinos saudáveis, coletado em tubos *Kasvi*® com EDTA K3. Logo após, as amostras foram transferidas a tubos de polipropileno de 15 mL e centrifugadas a 1600 rpm por 2 minutos a 10 °C. O sobrenadante foi descartado e 150 µL das hemácias contidas no precipitado foram transferidas para outro tubo de polipropileno e o volume completado para 15 mL com solução salina (0,9%). As amostras foram centrifugadas como descrito anteriormente. Este passo foi repetido três vezes. A atividade hemolítica foi determinada mediante exposição das suspensões de hemácias bovinas em NaCl (0,9%), a distintas concentrações dos peptídeos (1,5-100µM) em microtubos de 1,5 mL. Os controles positivo e negativo foram preparados pela adição de Triton X-100 (2%) e NaCl às suspensões de eritrócitos, respectivamente. Todas as preparações foram realizadas em triplicata e incubadas temperatura ambiente por uma hora. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 3000 rpm por 2 minutos a 10 °C, sendo transferidos 100 µL do sobrenadante a placas de 96 poços a fim de controlar a liberação de hemoglobina através da mensuração da D.O. a 415 nm (CARDOSO et al., 2018). A porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com a equação (1):

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{\text{Tratamento} - \text{controle negativo}}{\text{controle positivo} - \text{controle negativo}} \times 100 \quad (1)$$

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos derivados de mastoparano-L utilizados no presente estudo foram obtidos mediante técnicas de desenho racional. O derivado mastoparano-MO foi obtido pela adição de uma *end-tag* de cinco resíduos de aminoácidos apolares (FLPII) à sequência do peptídeo parental, visando a diminuição da atividade citotóxica deste último, sem alterar sua atividade antimicrobiana ou com o objetivo do aprimoramento desta característica (SILVA, 2015). Por outro lado, mediante a inserção do padrão "K - [ILV] - [AL] - X - [RKD] - [ILV] - X - X - K - I" na sequência do mastoparano-L, através de uma estratégia de desenho computacional automatizado denominada algoritmo *Joker* (PORTO et al., 2018), foi obtido o peptídeo mastoparano-R1, através da substituição dos resíduos 1, 2, 5, 9 e 10 (K¹, I², R⁵, K⁹, I¹⁰). Por fim, o derivado [I⁵, R⁸] MP foi gerado pela substituição de resíduos de alanina alocados nas posições 5 e 8 da sequência peptídica do mastoparano-L, por resíduos de isoleucina e arginina, respectivamente (IRAZAZABAL et al., 2016).

As modificações realizadas a sequência de aminoácidos do peptídeo mastoparano-L (peptídeo parental) levaram a alterações nas propriedades físico-químicas dos peptídeos derivados (mastoparano-R1, mastoparano-MO e [I⁵, R⁸] MP). Assim, a adição de cinco resíduos apolares (FLPII) à sequência peptídica do mastoparano-L resultou em um aumento na porcentagem de hidrofobicidade (de 57,6% para 83,6%) e na diminuição do momento hidrofóbico (0,398 para 0,325) no derivado mastoparano-MO, o qual manteve a carga líquida de +3 do peptídeo parental (mastoparano-L). Por outro lado, o peptídeo mastoparano-R1, apresentou aumento da carga líquida para +6 e momento hidrofóbico igual a 0,775, assim como uma diminuição da hidrofobicidade (36,9%). Da mesma forma, as modificações realizadas para a obtenção do derivado [I⁵, R⁸] MP geraram leve aumento nos valores de todos os parâmetros físico-químicos avaliados (Tabela 1). Por fim, foram elaborados os diagramas de hélice para todos os peptídeos de estudo (Figura 4), nos quais pode-se

observar as substituições acima descritas, a composição e distribuição dos resíduos ao longo de uma estrutura helicoidal, bem como a anfipaticidade dessas moléculas.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas para mastoparano-L e seus derivados, incluindo suas cargas líquidas (z), a porcentagem de hidrofobicidade (<H>) e o momento hidrofóbico (<μH>). Os resíduos de aminoácidos modificados nas sequencias análogas ao peptídeo parental, mastoparano-L, estão destacados em vermelho.

	Sequência	(z)	<H> (%)	<μH>
mastoparano-L	-----INLKALAALAKKIL-NH ₂	+3	57,6	0,398
mastoparano-R1	-----KILKRLAAKIKKIL-NH ₂	+6	36,9	0,775
mastoparano-MO	FLPIIINLKALAALAKKIL-NH ₂	+3	83,6	0,325
[I ⁵ , R ⁸] MP	-----INLKILARLAKKIL-NH ₂	+4	58,9	0,471

(z): carga líquida; <H>: hidrofobicidade; <μH>: momento hidrofóbico.

Os derivados foram obtidos pela substituição ou adição de resíduos na sequência do peptídeo parental, mastoparano-L. Assim, o peptídeo mastoparano-R1 foi gerado pelo algoritmo *Joker*, através da substituição de resíduos nas posições 1, 2, 5, 9 e 10. O derivado mastoparano-MO foi obtido pela adição de uma *end-tag* à porção C-terminal do peptídeo parental. Por fim, o peptídeo [I⁵, R⁸] MP foi gerado a partir de substituições nas posições 5 e 8.

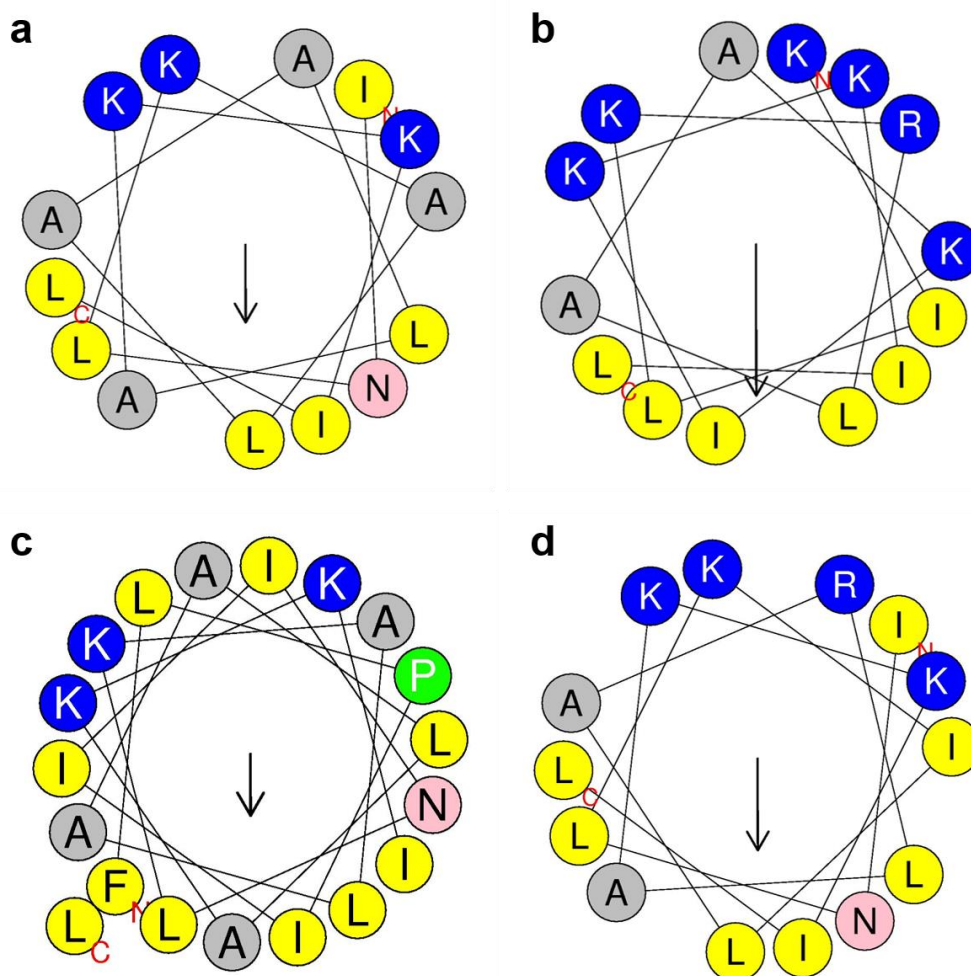


Figura 4. Representação em diagrama de hélice das sequências de aminoácidos de (a) mastoparano-L, (b) mastoparano-R1, (c) mastoparano-MO e (d) [I⁵, R⁸] MP. Os resíduos carregados positivamente estão representados em azul, polares não carregados em rosa e não polares em amarelo, cinza e verde. O vetor de momento hidrofóbico está representado por setas a partir do centro dos diagramas, enquanto que o valor estimado do momento hidrofóbico resultante é proporcional ao tamanho das setas.

5.2. COMPARAÇÃO ESTRUTURAL DOS PEPTÍDEOS

A caracterização das estruturas tridimensionais dos peptídeos de estudo foi realizada por meio do uso de ferramentas computacionais. Para isso, foram geradas as estruturas tridimensionais teóricas dos peptídeos derivados (mastoparano-R1, mastoparano-MO e [I⁵, R⁸] MP) através da modelagem comparativa destes usando como modelo a estrutura de ressonância magnética nuclear (RMN) disponível para

peptídeo parental, mastoparano-L (PDB: 1D7N). Assim, 100 modelos teóricos para cada peptídeo derivado foram gerados, sendo aqueles de menor energia livre (Figura 5) selecionados para a validação das estruturas geradas. Deste modo, a qualidade do dobramento dos modelos foi validada através da avaliação de suas coordenadas atômicas pelo programa ProSA-web (WIEDERSTEIN E SIPPL, 2007). Como resultado, os valores da pontuação da qualidade (*z-score*) calculados para os modelos teóricos dos peptídeos análogos (Tabela 2) encontram-se dentro da faixa de pontuações correspondentes aos *z-score* de peptídeos depositados no PDB que possuem número similar de resíduos de aminoácidos e cujas estruturas tridimensionais foram resolvidas por RMN.

Tabela 2. Validação da qualidade do dobramento, estereoquímica das estruturas tridimensionais teóricas e percentual de hélice dos modelos de menor energia livre para os peptídeos mastoparano-R1, mastoparano-MO e [I⁵, R⁸] MP.

	ProSA	G-Factor	Ramachandran (%)	% de Hélice
mastoparano-L	-	-	-	64,3
mastoparano-R1	-2,25	0,21	100	78,6
mastoparano-MO	-1,31	0,13	93,8	57,9
[I⁵, R⁸] MP	-2,18	0,17	100	78,6

As pontuações de *z-score* (qualidade do dobramento estrutural) em todos modelos teóricos estão de acordo com a de outros peptídeos, de mesmo tamanho cujas estruturas tridimensionais foram resolvidas por RMN e depositadas no *Protein Data Bank*. Valores de *G-factor* superiores a -0,5 indicam estruturas de com estereoquímica adequada e confiáveis. A porcentagem de resíduos alocados nas regiões mais favoráveis no mapa de Ramachandran estão demonstradas. O peptídeo mastoparano-L não foi incluído nas validações do dobramento e estereoquímica uma vez este peptídeo já tem sua estrutura tridimensional resolvida, a qual foi utilizada como modelo para a modelagem dos derivados.

Além disso, os parâmetros estereoquímicos dos modelos teóricos foram avaliados pelo servidor PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993), mostrando que a média dos ângulos diedros somados as forças covalentes da cadeia principal para todos os peptídeos derivados de estudo (Tabela 2) estão dentro dos valores esperados (acima de -0,5) para modelos confiáveis. Ademais, os mapas de Ramachandran mostraram que >90% dos resíduos de aminoácidos situam-se dentro das regiões mais favoráveis do mapa. Os modelos teóricos de menor energia livre gerados estão

representados na Figura 5, assim como as análises do potencial eletrostático de superfície destes, evidenciando seu caráter anfipático. Os modelos teóricos de menor energia livre exibem estruturação em α -hélice de forma similar a estrutura do peptídeo parental, mastoparano-L. Não obstante, as substituições de resíduos realizadas na sequência do mastoparano-L levaram ao aumento da porcentagem de α -hélice nos derivados mastoparano-R1 e [I⁵, R⁸] MP (de 64,3% em mastoparano-L para 78,6% em mastoparano-R1 e [I⁵, R⁸] MP), como mostrado na Tabela 1. As substituições de aminoácidos em mastoparano-R1 e [I⁵, R⁸] MP levaram a segregação dos resíduos carregados e apolares na estrutura helicoidal, aumentando a anfipaticidade destas, como ilustrado nos diagrama de hélice (Figura 4b, d) e nos cálculos de potencial eletrostático (Figura 5b, d) para ambos os peptídeos. Em contrapartida, os resíduos adicionados (*end-tag*) à sequência de mastoparano-L influenciaram diretamente na quebra da continuidade do segmento helicoidal na porção N-terminal do derivado mastoparano-MO (Figura 5c).

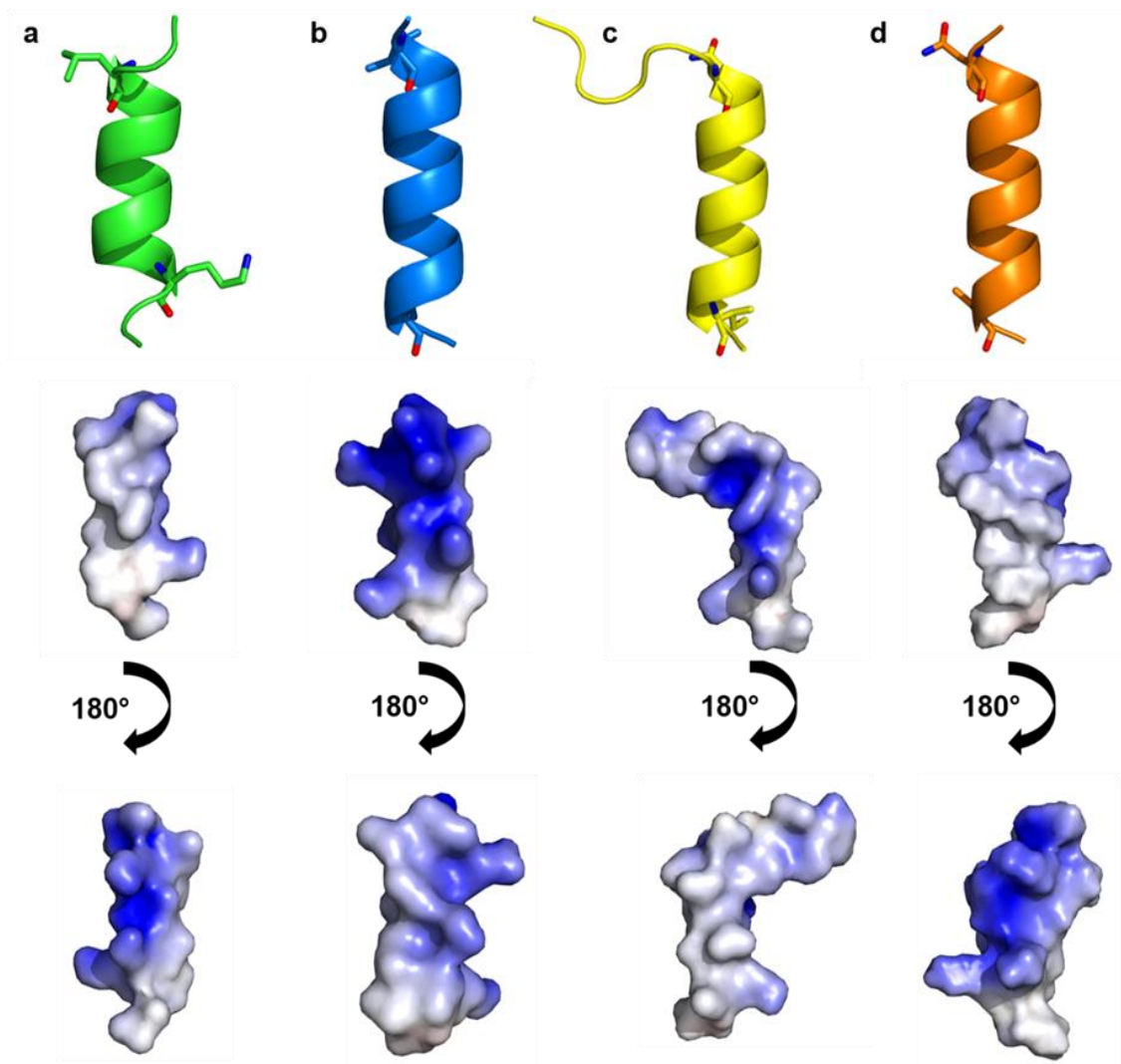


Figura 5. Modelos tridimensionais teóricos de menor energia livre e potenciais eletrostáticos de superfície para (a) mastoparano-L, (b) mastoparano-R1, (c) mastoparano-MO e (d) [5, R⁸] MP. O potencial eletrostático foi calculado pelo *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver* (APBS), com escala do potencial variando de $-5kT/e$ (vermelho) a $+5kT/e$ (azul).

5.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DO TEMPO MORTE (*TIME-KILL*)

Logo da avaliação das propriedades físico-químicas e comparação estrutural dos peptídeos de estudo, estes foram sintetizados pela empresa *Peptide 2.0 Incorporated* (USA), usando o método de fase sólida mediante a estratégia Fmoc (9-

fluorenilmetoxicarbonila), sendo logo suas massas confirmadas por espectrometria de massas de tipo MALDI-ToF (Anexo A), tornando-os aptos para experimentos posteriores. Assim, as CIMs e CBMs do peptídeo mastoparano-L e seus derivados foram determinadas contra três cepas de *S. aureus* isoladas de bovinos acometidos com mastite. Os resultados dos testes de susceptibilidade bacteriana (Tabela 3) mostraram que o peptídeo mastoparano-L não foi ativo contra as cepas 02/18 e 353/17 a 32 μM . No entanto, o crescimento da estirpe Aurora foi inibido com uma concentração de 32 μM deste mesmo peptídeo. As CBMs do mastoparano-L não foram determinadas frente as cepas 02/18 e 353/17 (CMB >32 μM). Entretanto, apresentou CBM igual a 32 μM contra a cepa Aurora. Por sua parte, o peptídeo mastoparano-R1 não foi capaz de inibir o crescimento ou inviabilizar as cepas de *S. aureus* avaliadas na maior concentração testada (32 μM). Por outro lado, o peptídeo mastoparano-MO mostrou uma atividade melhorada ao inibir o crescimento de todas as cepas a 16 μM , além de apresentar ação bactericida nesta mesma concentração para as estirpes 02/18 e Aurora. Ademais, a CBM de mastoparano-MO contra a cepa 353/17 foi de 32 μM . Por fim, foi observado que o peptídeo [I⁵, R⁸] MP exibiu o maior potencial antibacteriano com CIMs de 4, 8 e 16 μM para as estirpes Aurora, 353/17 e 02/18, respectivamente. Ademais, [I⁵, R⁸] MP possui uma ação bactericida com CBM entre 8 e 16 μM frente as cepas testadas.

Com respeito à avaliação da cinética do tempo de morte, o curso do tempo da atividade bactericida (*time-kill*) do peptídeo [I⁵, R⁸] MP frente a *S. aureus* Aurora está representado na Figura 6. A curva do tempo de morte mostra que o peptídeo [I⁵, R⁸] MP, a uma concentração de 8 μM , reduz a totalmente carga bacteriana inicial ($4 \log_{10}$) após 70 minutos de incubação.

Tabela 3. Atividades bacteriostáticas e bactericidas dos peptídeos mastoparano-L, mastoparano-R1, mastoparano-MO e [I⁵, R⁸] MP contras cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina.

Bactérias	mastoparano-L (μM)		mastoparano-R1 (μM)		mastoparano-MO (μM)		[I ⁵ , R ⁸] MP (μM)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i> 02/18	>32	>32	>32	>32	16	16	16	16
<i>S. aureus</i> 353/17	>32	>32	>32	>32	16	32	8	16
<i>S. aureus</i> Aurora	32	32	>32	>32	16	16	4	8

CIM: Concentração inibitória mínima. CBM: Concentração bactericida mínima

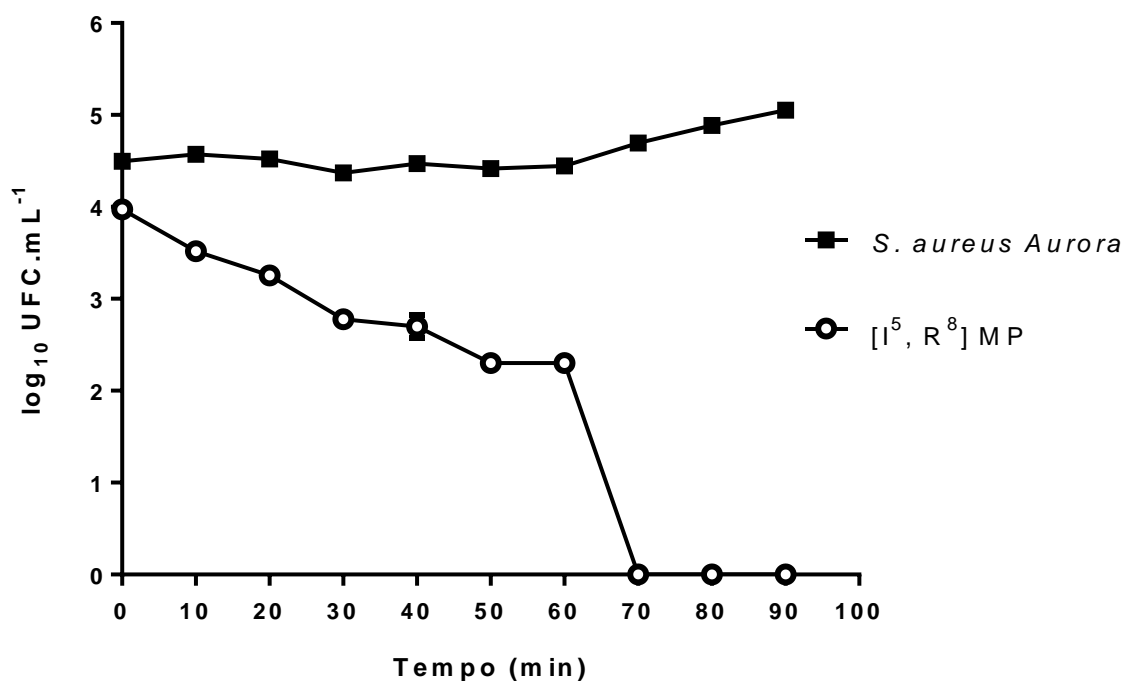


Figura 6. Cinética do tempo de morte (*time-kill*) do peptídeo [I⁵, R⁸] MP frente a *S. aureus* Aurora a uma concentração de 8 μM (círculos brancos). O crescimento da cepa bacteriana na ausência do peptídeo foi utilizado como controle (quadrados pretos). O peptídeo foi adicionado no tempo 0, sendo monitorado a cada 10 min até os 90 min de incubação.

5.4. ENSAIOS HEMOLÍTICOS

A atividade hemolítica dos peptídeos foi avaliada frente a eritrócitos bovinos. Como mostrado na Figura 7, o peptídeo parental (mastoparano-L) e o derivado mastoparano-MO mostram as maiores porcentagens de hemólise (62% e 50%,

respectivamente) quando testados a 100 μM . Em contrapartida, os derivados $[\text{I}^5, \text{R}^8]$ MP e mastoparano-R1 mostraram menos de 20% de atividade hemolítica nesta mesma concentração (100 μM). Ademais, quando avaliado em relação ao seu potencial hemolítico nos mesmos valores de CIM (4-16 μM), o peptídeo $[\text{I}^5, \text{R}^8]$ MP (melhor candidato antibacteriano deste estudo) demonstrou um percentual de hemólise de ~16,25%. Dessa forma o derivado $[\text{I}^5, \text{R}^8]$ MP além apresentar maior atividade bacteriana, possui uma atividade hemolítica reduzida quando comparado com o peptídeo parental (mastoparano-L) e o derivado mastoparano-MO.

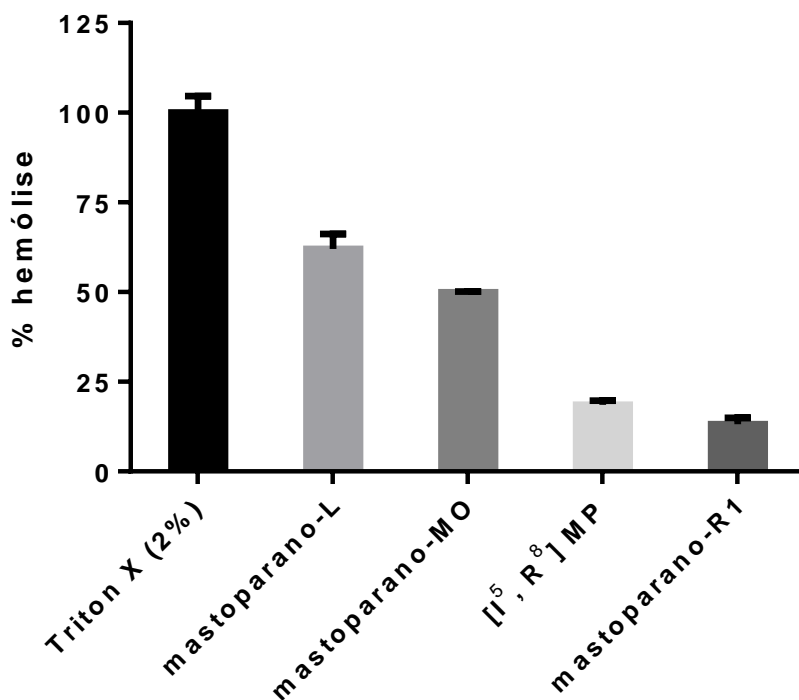


Figura 7. Atividade hemolítica do peptídeo mastoparano-L e seus derivados frente a hemácias bovinas. Na figura estão apresentadas as porcentagens de hemólise dos peptídeos testados a 100 μM . Triton X-100 (2%) foi utilizado como controle positivo de hemólise.

6. DISCUSSÃO

S. aureus tem sido largamente relatado como um dos principais agentes patogênicos responsáveis pela mastite em gado leiteiro (NASCIMENTO et al., 2005). Este microrganismo pode causar IIM crônicas persistentes e recorrentes, as quais tem um enorme impacto econômico nos sistemas de produção de laticínios, bem como no bem-estar animal e na saúde humana (AGHAMOHAMMADI et al., 2018; ASLI et al., 2017; BENEDICTUS et al., 2019). Os antibióticos convencionais continuam a ser a principal estratégia de controle e tratamento da MB (BOUCHARD et al., 2015). No entanto, a resposta refrataria ao tratamento com antibióticos em muitos casos de MB (OCHOA-ZARZOSA et al., 2008; SONG et al., 2016) e a rápida evolução da resistência bacteriana a estes medicamentos, bem como a possível presença de resíduos de antibióticos no leite, torna questionável seu uso no tratamento e controle desta doença (BÁEZ-MAGAÑA et al., 2018). Em vista disso, há uma urgente necessidade de abordagens alternativas para o tratamento de doenças animais como a MB. Neste contexto, os PAMs são candidatos terapêuticos promissores para o tratamento desta doença animal, uma vez que um amplo espectro de atividades tem sido relatado para estas moléculas. No entanto, a toxicidade frente a células de mamíferos de alguns PAMs tem impedido suas aplicações terapêuticas. Portanto, diversas estratégias de desenho racional têm sido voltadas ao desenho de PAMs com seletividade celular e atividades antimicrobianas otimizadas.

No desenho racional de PAMs, os determinantes físico-químicos (carga, hidrofobicidade, momento hidrofóbico) da atividade destas moléculas devem ser levados em consideração em conjunto, uma vez que há uma relação interdependente entres estes (SHAGAGHI et al., 2018). No presente estudo, foram avaliadas e comparadas as propriedades físico-químicas de três derivados do peptídeo isolado da peçonha de vespa, mastoparano-L. Como mostrado anteriormente, as modificações realizadas à sequência do peptídeo mastoparano-L alteraram os parâmetros físico-químicos dos derivados, tais como carga, hidrofobicidade e momento hidrofóbico.

Consequentemente, houve a alteração das atividades antibacterianas e hemolíticas destes peptídeos. Assim, a adição de cinco resíduos de aminoácidos apolares à sequência do peptídeo parental, levou ao aumento da hidrofobicidade do peptídeo mastoparano-MO, como também à redução do momento hidrofóbico. Isto permitiu melhorar a atividade do derivado frente às cepas de *S. aureus* testadas. Contudo, foi observada somente uma leve diminuição da atividade hemolítica.

Em geral, é aceito que existe uma correlação entre alta hidrofobicidade e aumento da atividade hemolítica de PAMs (BLONDELLE AND HOUGHTEN, 1992; CHEN ET AL., 2005, 2007). Neste contexto, Chen et al. (2007), por meio da geração de derivados a partir de um PAM de 26 resíduos com estrutura α -helicoidal anfipática, analisaram o efeito da hidrofobicidade na atividade antibacteriana e hemolítica dos peptídeos. Estes autores demonstraram que existe um limiar de hidrofobicidade no qual é possível obter uma atividade antimicrobiana ótima. Porém, o aumento ou diminuição da hidrofobicidade além desse limiar, inibe a atividade antimicrobiana; enquanto que o aumento drástico da hidrofobicidade estará correlacionado com maiores porcentagens de hemólise (CHEN et al., 2007). Assim, a alta porcentagem de hemólise apresentada pelo derivado mastoparano-MO frente a eritrócitos bovinos no presente estudo, poderia ser o resultado da sua alta hidrofobicidade quando comparado ao peptídeo parental e aos derivados mastoparano-R1 e [I⁵, R⁸] MP (Tabela 1). Segundo Chen et al. (2007), o aumento da hidrofobicidade pode promover a auto-associação dos peptídeos (formação de dímeros) em meio aquoso. Deste modo, quando em dímeros, os PAMs não conseguiriam atravessar a parede celular bacteriana e atingir a membrana citoplasmática para causar a morte celular (CHEN et al., 2007). Em contraste, a alta hidrofobicidade das membranas dos eritrócitos suscitarium a dissociação dos dímeros possibilitando, assim, a entrada dos PAMs na bicamada lipídica dos eritrócitos. Como consequência é esperado uma ação hemolítica. Assim, a formação ou dissociação de dímeros (como mencionado acima) poderia explicar o leve aumento do potencial antibacteriano e alta hemólise do mastoparano-MO. Em concordância com o estudo de Chen et al. (2007) (acima citado), Kiyota et al. (1996), através do estudo conformacional de cinco peptídeos α -helicoidais com diferente proporção de resíduos hidrofóbicos e

hidrofílicos, demonstraram que o aumento da hidrofobicidade na face não polar dos PAMs aumenta a afinidade destas moléculas por lipídeos e por eles mesmos, levando a auto-associação. Adicionalmente, foram testadas as atividades hemolíticas destes peptídeos. Deste modo, foi demonstrado que o peptídeo que exibia uma maior hidrofobicidade apresentou maior atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos (KIYOTA et al., 1996).

De fato, a influência da hidrofobicidade nas atividades hemolíticas de alguns peptídeos da família dos mastoparanos foi estudada por Lin et al. (2011). Estes autores mostraram que os peptídeos com maior hidrofobicidade exibiam maior atividade hemolítica, como é o caso do peptídeo mastoparano-MO no presente estudo. Lin et al. (2011) ressaltaram que pequenas substituições realizadas a sequência de um peptídeo podem alterar o arranjo estrutural deste e, com isso, suas atividades antimicrobianas e hemolíticas. Por exemplo, o peptídeo mastoparano AF, o qual possui um resíduo de fenilalanina na porção hidrofóbica (do mesmo modo que o peptídeos mastoparano-MO no presente estudo), quando comparado com o peptídeo mastorapano-D (que possui um resíduo de fenilalanina na porção hidrofílica), exibiu maior atividade hemolítica. Com base nisso, os autores sugeriram que a posição do resíduo e da cadeia lateral aromática deste poderiam afetar a atividade hemolítica do peptídeo, uma vez que os anéis aromáticos nos peptídeos são fundamentais para a interação hidrófoba com as membranas. Lin et al. (2011) concluíram que tanto a hidrofobicidade como a posição dos resíduos na sequência peptídica poderiam desempenhar um importante papel na modulação da atividade hemolítica dos peptídeos da família dos mastoparanos (LIN et al., 2011).

Por outro lado, em um estudo realizado por Schmidtchen et al. (2009) a adição de *end-tags* de resíduos hidrofóbicos (*end-tags* de 2 a 5 resíduos), levou ao aumento da atividade antibacteriana de dois derivados do peptídeo cininogênio. Foi ainda demonstrado que o potencial antibacteriano melhorava proporcionalmente ao tamanho da *end-tag*. No entanto, do mesmo modo, a permeabilização dos eritrócitos aumentou com o comprimento das *end-tags* (SCHMIDTCHEN et al., 2009). Em adição,

estudos tem demonstrado que o aumento da hidrofobicidade dos PAMs se relaciona com diminuição da seletividade de células com carga negativa superficial (como as das bactérias) (DATHE et al., 1997).

Como mencionado previamente, o peptídeo mastoparano-R1 foi obtido através da substituição de resíduos na sequência do peptídeo parental (mastoparano-L) através do algoritmo *Joker*. Como resultado, foi observado o aumento da carga e momento hidrofóbico deste derivado, assim como a diminuição da sua hidrofobicidade. Tais modificações levaram à supressão da atividade antibacteriana deste derivado, como também a diminuição da atividade hemolítica. Neste contexto, os resultados da pesquisa realizada por Chen et al. (2007) (descritos acima) demonstraram que uma baixa hidrofobicidade esteve relacionada com a diminuição ou supressão da atividade antimicrobiana (CHEN et al., 2007; DATHE et al., 1997). Do mesmo modo, Dathe et al. (1997), mostram que a diminuição da hidrofobicidade de um derivado do peptídeo KLA1, levou a diminuição da afinidade do derivado por cepas de *S. aureus*, bem como de eritrócitos. Em relação a carga dos PAMs, Dathe et al. (2001), por meio da modulação do número de cargas positivas de derivados de magainina IIa, demonstraram que o aumento da carga dos PAMs (maior que +5; sendo +6 no caso do mastoparano-R1) inibiu seu potencial antibacteriano. Isto foi associado com uma redução da eficiência de permeabilização dos PAMs, uma vez que a forte interação eletrostática entre as cargas positivas dos peptídeos e as cargas negativas dos grupos hidrofílicos dos fosfolípidos de membrana imobilizaria os PAMs impossibilitando, assim, a inserção e alteração da membrana para suscitar a morte celular (DATHE et al., 2001). Em adição, a diminuição da atividade hemolítica em mastoparano-R1 pode ser explicada também por interações eletrostáticas. Segundo Dathe et al. (2001), é possível que os peptídeos interajam eletrostaticamente com moléculas de ácido siálico presentes na face externa da membrana dos eritrócitos, as quais poderiam distanciar os PAMs da bicamada lipídica evitando, assim, a hemólise dos eritrócitos.

O arranjo estrutural α -helicoidal anfipático, o qual segrega os resíduos básicos e hidrofóbicos em faces opostas da molécula peptídica (polar e não polar,

respectivamente) é geralmente aceito como requisito para a atividade dos PAMs (GIANGASPERO et al., 2001; ZHANG et al., 2016). Assim como para a hidrofobicidade, estudos têm demonstrado que a modulação da anfipaticidade está diretamente relacionada com o potencial antimicrobiano dessas moléculas. No entanto, embora anfipaticidade seja uma característica importante para a atividade dos PAMs, estudos mostram que a anfipaticidade perfeita não necessariamente será um requisito para a atividade e especificidade melhoradas. (TAKAHASHI et al., 2010). De fato, um estudo realizado por Wieprecht et al. (1997) com derivados de magainina 2, demonstraram que análogos com alta anfipaticidade (alto momento hidrofóbico), mas sem sofrer a alteração de outras propriedades físico-químicas, mostraram aumento concomitante das atividades antibacteriana e hemolítica, sendo isto explicado pelo aumento das interações hidrofóbicas e afinidade da membrana (WIEPRECHT et al., 1997). Neste sentido, no entanto, embora o derivado mastoparano-R1 apresente uma alta anfipaticidade, o fato dele não exibir um aumento da atividade antibacteriana e hemolítica pode ser explicado pela alta cationicidade deste peptídeo (propriedade modificada no presente estudo). Assim, como mencionado acima, este fator poderia levar a uma forte atração eletrostática com os lipídeos de membrana evitando, dessa forma, sua inserção na membrana e conseguinte permeabilização (DATHE et al., 2001). Em adição, este peptídeo (mastoparano-R1) possui uma baixa hidrofobicidade o que também tem sido relacionado a diminuição da atividade antibacteriana e hemolítica (CHEN et al., 2007). Por exemplo, GIANGASPERO et al. (2001) mostraram que a baixa hidrofobicidade de derivados peptídicos anula a atividade tanto frente a bactérias como eritrócitos, mesmo que os outros parâmetros físico-químicos apresentassem valores moderadamente altos.

Contrariamente, estudos têm mostrado que a quebra da anfipaticidade de estruturas peptídicas α -helicoidais pode levar à redução da atividade hemolítica e ao aumento do potencial antibacteriano (ZHANG et al., 2016). Neste sentido, a interrupção da anfipaticidade na molécula do peptídeo [I⁵, R⁸] MP (Figura 4d), pela inserção de uma isoleucina na face polar carregada positivamente deste derivado leva a um valor do momento hidrofóbico menor quando comparado, por exemplo, com o peptídeo

mastoparano-R1 (derivado com maior anfipaticidade). Assim, em concordância com Zhang et al. (2016) pode-se concluir que a quebra da anfipaticidade na sequência do derivado [I⁵, R⁸] MP tem permitido tanto o aprimoramento do potencial antibacteriano frente a cepas de *S. aureus* isoladas de vacas acometidas com mastite, bem como a diminuição da atividade hemolítica frente a eritrócitos bovinos, quando comparado com o peptídeo parental. Deste modo, observa-se que é necessário um equilíbrio adequado entre todas as propriedades físico-químicas e estruturais dos PAMs para atingir a otimização do potencial antimicrobiano e uma baixa toxicidade para as células hospedeiras (TAKAHASHI et al., 2010).

Os resultados dos ensaios de CIM e CBM do presente estudo mostraram que o peptídeo [I⁵, R⁸] MP exibe forte atividade antibacteriana (quando comparado com o peptídeo parental mastoparano-L) frente às três cepas de *S. aureus* testadas (Tabela 3), com CIMs na faixa de 4-16 µM. De fato, as atividades antimicrobianas do derivado [I⁵, R⁸] MP já foram testadas em isolados clínicos humanos em um estudo recente. Irazazabal et al. (2016) testaram o derivado [I⁵, R⁸] MP frente a várias cepas bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas, como também frente a alguns fungos. Os autores observaram que o peptídeo foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 a 25 µM (uma concentração de CIM ~6x maior quando comparada ao peptídeo [I⁵, R⁸] MP no presente estudo (4 µM)). Em adição, Irazazabal et al. (2016), avaliaram o efeito antibacteriano do peptídeo ao longo do tempo (*time-kill*). As curvas do tempo de morte mostraram que o derivado [I⁵, R⁸] MP exibe atividade bactericida a 50 µM (duas vezes a CIM = 25 µM) perante *S. aureus* ATCC 25923 após 45 minutos de incubação. Em comparação, a cinética do tempo de morte exibida pelo [I⁵, R⁸] MP no presente estudo frente à cepa *S. aureus* Aurora mostrou que este derivado, a 8 µM, é capaz de reduzir totalmente a carga bacteriana inicial após 70 minutos de incubação. Esta diferença nos tempos de ação do peptídeo [I⁵, R⁸] MP sobre *S. aureus* proveniente de humanos (IRAZAZABAL et al. 2016) e bovinos (presente estudo) pode ser explicada, em parte, pela diferença da concentração de peptídeo utilizado em ambos os estudos. Irazazabal et al. (2016) utilizaram uma concentração 6,25 vezes maior que a concentração usada no presente estudo (8 µM), o que pode refletir no menor tempo de

cinética de morte (45 minutos) observado naquele estudo. Somado a isso, embora o mesmo peptídeo ([I⁵, R⁸] MP) tenha sido testado em ambos os estudos frente a cepas de *S. aureus*, é importante ressaltar as mudanças no padrão de ação do peptídeo frente a *S. aureus* isoladas de humanos e animais.

Deste modo, tem sido demonstrado que o derivado [I⁵, R⁸] MP possui atividade antibacteriana melhorada (quando comparado com o peptídeo parental, mastoparano-L) frente a cepas de *S. aureus* tanto em humanos (IRAZAZABAL et al., 2016) quanto em bovinos (dados do presente estudo). Apresentando também, baixo potencial hemolítico frente a eritrócitos de ambas as espécies (humanos e bovinos) e rápida eficácia bactericida. Assim, estes resultados ressaltam o potencial terapêutico do peptídeo [I⁵, R⁸] MP para o tratamento de doenças em humanos e animais.

7. CONCLUSÕES

As modificações realizadas à sequência do peptídeo parental mastoparano-L levaram à alteração das propriedades físico-químicas e arranjo estrutural dos derivados mastoparano-R1, mastoparano-MO e [I⁵, R⁸] MP resultando, assim, em diferenças nas atividades biológicas destes derivados. A substituição de resíduos de aminoácidos nas posições 1, 2, 5, 9 e 10 (K¹; I²; R⁵; K⁹; I¹⁰) realizada pelo algoritmo *Joker* para a obtenção do derivado mastoparano-R1 (derivado com hidrofobicidade reduzida, carga e momento hidrofóbico aumentados) permitiram diminuir a atividade hemolítica deste derivado, enquanto aboliram a atividade antibacteriana do peptídeo. Por outro lado, a adição de uma *end-tag* de resíduos apolares (FLPII) à região N-terminal do derivado mastoparano-MO (aumentando a hidrofobicidade, mantendo a carga e diminuindo o momento hidrofóbico) suscitaram o melhoramento das suas atividades antibacterianas, mas não do potencial hemolítico. Por fim, o leve aumento da hidrofobicidade (57,6% para mastoparano-L e 58,9% para [I⁵, R⁸] MP), carga (+3 para mastoparano-L e +4 para [I⁵, R⁸] MP) e momento hidrofóbico (0,398 para mastoparano-L e 0,471 para [I⁵, R⁸] MP)

suscitado pela troca de dos resíduos de alanina (por resíduos de isoleucina e arginina nas posições 5 e 8 respectivamente) do peptídeo [I⁵, R⁸] MP permitiram melhorar tanto a atividade antibacteriana quanto a hemolítica. Assim, os resultados deste estudo mostram o potencial do derivado [I⁵, R⁸] MP na eliminação de bactérias associadas a mastite bovina, bem como a importância e aplicabilidade das estratégias de desenho racional na geração de PAMs com atividades biológicas otimizadas. Por fim, o potencial terapêutico do peptídeo [I⁵, R⁸] MP aqui elucidado *in vitro*, demonstra o potencial desse PAM para estudos posteriores de forma a confirmar seu potencial em modelos animais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aghamohammadi, M.; Haine, D.; Kelton, D. F.; Barkema, H. W.; Hogeveen, H.; Keefe, G. P.; Dufour, S. Herd-Level Mastitis-Associated Costs on Canadian Dairy Farms. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 5, p. 1–12, 2018.
- Ahn, H. S.; Cho, W.; Kang, S. H.; Ko, S. S.; Park, M. S.; Cho, H.; Lee, K. H. Design and Synthesis of Novel Antimicrobial Peptides On The Basis Of A Helical Domain Of Tenecin 1, An Insect Defensin Protein, And Structure-Activity Relationship Study. *Peptides*, v. 27, n. 4, p. 640–648. 2006.
- Aitken, S. L.; Corl, C. M.; Sordillo, L. M. Immunopathology of Mastitis: Insights Into Disease Recognition and Resolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 16, p. 291–304. 2011.
- Alves, C. S.; Melo, M. N.; Franquelim, H. G.; Ferre, R.; Planas, M.; Feliu, L.; Castanho, M. A. R. B. *Escherichia coli* Cell Surface Perturbation and Disruption Induced by Antimicrobial Peptides BP100 and pepR. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 36, p. 27536–27544. 2010.
- Andreu, D.; Ubach, J.; Boman, A.; Wathlin, B.; Wade, D.; Merrifield, R. B.; Boman, H. G. Shortened Cecropin A-melittin Hybrids Significant Size Reduction Retains Potent Antibiotic Activity. *FEBS Letters*, v. 296, n. 2, p. 190–194. 1992.
- Argiolas, A.; Pisano, J. J. Facilitation of Phospholipase A2 Activity by Mastoparans, a New Class of Mast Cell Degranulating Peptides from Wasp Venom. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 258, p. 13697–13702. 1983.
- Asli, A.; Brouillette, E.; Céline, S.; Ghinet, M. G.; Brzezinski, R.; Lacasse, P.; Jacques,

M.; Malouin, F. Antibiofilm and Antibacterial Effects of Specific Chitosan Molecules on *Staphylococcus aureus* Isolates Associated with Bovine Mastitis. PLoS ONE, v. 15, p. 1–23. 2017.

Åvall-jääskeläinen, S.; Taponen, S.; Kant, R.; Paulin, L.; Blom, J.; Palva, A.; Koort, J. Comparative Genome Analysis of 24 Bovine-Associated *Staphylococcus* Isolates with Special Focus on the Putative Virulence Genes. PeerJ, v. 6, p. 1–31. 2017.

Baek, J. H.; Lee, S. H. Isolation and Molecular Cloning of Venom Peptides from *Orancistrocerus drewseni* (Hymenoptera : Eumenidae). Toxicon, v. 55, p. 711–718. 2010.

Báez-magaña, M.; Díaz-murillo, V.; López-meza, J. E.; Ochoa-zarzosa, A. International Immunopharmacology Immunomodulatory Effects of Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* on Bovine Mammary Epithelial Cells. International Immunopharmacology, v. 57, p. 47–54. 2018.

Barboza-Corona, E.; Fuente-Salcido, N. De; Alva-Murillo, N.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J. E. Activity of Bacteriocins Synthesized by *Bacillus thuringiensis* Against *Staphylococcus aureus* Isolates Associated to Bovine Mastitis. Veterinary Microbiology, v. 138, p. 179–183. 2009.

Barlow, J. Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: A Multispecies Review with a Focus on Antibiotic Treatment of Mastitis in Dairy Cattle. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v. 16, p. 383–407. 2011.

Baumann, G.; Mueller, P. A Molecular Model of Membrane Excitability. Journal of Supramolecular Structure, v. 2, p. 538–557. 1974.

Benedictus, L.; Ravesloot, L.; Poppe, K.; Daemen, I.; Boerhout, E.; Strijp, J. Van.; Broere, F.; Rutten, V.; Koets, A.; Eisenberg, S. Immunization of Young Heifers with Staphylococcal Immune Evasion Proteins Before Natural Exposure to *Staphylococcus aureus* Induces a Humoral Immune Response in Serum and Milk. BMC Veterinary Research, v. 15, n. 15, p. 1–13. 2019.

Blondelle, S. E.; Houghten, R. A. Design of Model Amphipathic Peptides Having Potent Antimicrobial Activities. Biochemistry, v. 31, n. 50, 12688–12694. 1992.

Bogni, C.; Odierno, L.; Raspanti, C.; Giraud, J.; Larriestra, A.; Reinoso, E.; Lasagno, M.; Ferrari, M.; Ducrós, E.; Frigeriou, C.; Betterau, S.; Pellegrino, M.; Frola, I.; Dieser, S.; Vissio, C. War Against Mastitis: Current Concepts on Controlling Bovine Mastitis Pathogens. In: Méndez-Vilas, A. (Org.). Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. Formatex, 2011. p. 483–494.

Boman, H. G.; Agerberth, B.; Boman, A. Mechanisms of Action on *Escherichia coli* of Cecropin P1 and PR-39, Two Antibacterial Peptides from Pig Intestine. Infection and

Immunity, v. 61, n. 7, p. 2978–2984. 1993.

Bouchard, D. S.; Seridan, B.; Saraoui, T.; Rault, L.; Germon, P.; Gonzalez-Moreno, C.; Nader-Macias, F. M.; Baud, D.; François, P.; Chaut, V.; Chain, F.; Langella, P.; Nicoli, J.; Lori, Y. L.; Even, S. Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Mammary Microbiota : Potential Allies Against Bovine Mastitis. PLoS ONE, v. 10, n.12, p 1–18. 2015.

Bradley, A. J. Bovine Mastitis : An Evolving Disease. The Veterinary Journal, v. 164, n. 2, p. 116–128. 2002.

Braffman, N. R.; Piscotta, F. J.; Hauver, J.; Campbell, E. A.; Link, A. J.; Darst, S. A. Structural Mechanism of Transcription Inhibition by Lasso Peptides Microcin J25 and Capistruin. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 116, n. 4, p. 1273–1278. 2019.

Breser, M. L.; Felipe, V.; Bohl, L. P.; Orellano, M. S.; Isaac, P.; Conesa, A.; Rivero, V. E.; Correa, S. G.; Bianco, I. D.; Porporatto, C. Chitosan and Cloxacillin Combination Improve Antibiotic Efficacy Against Different Lifestyle of Isolates from Chronic Bovine Mastitis. Scientific Reports, v. 8, p. 1–13. 2018.

Brogden, K. A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? Nature Reviews, v. 3, p. 238–250. 2005.

Bulkley, D.; Brandi, L.; Polikanov, Y. S.; Fabbretti, A.; O'Connor, M.; Gualerzi, C. O.; Steitz, T. A. The Antibiotics Dityromycin and GE82832 Bind Protein S12 and Block EF-G-Catalyzed Translocation. Cell Reports, v. 6, p. 357–365. 2014.

Busche, T.; Hillion, M.; Van Loi, V.; Berg, D.; Walther, B.; Semmler, T.; Strommenger, B.; Witte, W.; Cuny, C.; Mellmann, A.; Holmes, M. A.; Kalinowski, J.; Adrian, L.; Bernhardt, J.; Antelmann, H. Comparative Secretome Analyses of Human and Zoonotic *Staphylococcus aureus* Isolates CC8, CC22, and CC398. Molecular & Cellular Proteomics, v. 17, p. 2412–2433. 2018.

Cardoso, M. H.; Cândido, E. S.; Chan, L. Y.; Torres, M. D. T.; Oshiro, K. G. N.; Rezende, S. B.; Porto, W. F.; Lu, T. K.; De la Fuente-Nunez, C.; Craik, D. J.; Franco, O. L. A Computationally Designed Peptide Derived from *Escherichia coli* as a Potential Drug Template for Antibacterial and Antibiofilm Therapies. ACS Infectious Diseases, v. 4, n. 12, p. 1727–1736. 2018.

Cardoso, M. H. ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE DOIS PEPTÍDEOS HELICOIDAIS: PA-MAP 1.9 E ECDBS1R5. 2019. 199 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília.

Cardoso, M. H.; Ribeiro, S. M.; Nolasco, D. O.; De La Fuente-Núñez, C.; Felício, M. R.; Gonçalves, S.; Matos, C. O.; Liao, L. M.; Santos, N. C.; Hancock, R. E. W.; Franco, O. L.; Migliolo, L. A polyalanine Peptide Derived from Polar Fish with Anti-Infectious Activities. Scientific Reports, v. 6, p. 1–14. 2016.

- Castro, A.; Silva, J.; Teixeira, P. *Staphylococcus aureus* a Food Pathogen: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. In Foodborne Diseases. Elsevier Inc. 2018, cap 8, p. 213-238.
- Chan, D. I.; Prenner, E. J.; Vogel, H. J. Tryptophan- and Arginine-Rich Antimicrobial Peptides: Structures and Mechanisms of Action. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1758, p. 1184–1202. 2006.
- Chan, L. Y.; Craik, D. J.; Daly, N. L. Dual-Targeting Anti-Angiogenic Cyclic Peptides as Potential Drug Leads for Cancer Therapy. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1–13. 2016.
- Chen, C.; Starr, C. G.; Troendle, E. P.; Wiedman, G.; Wimley, W. C.; Ulmschneider, J. P.; Ulmschneider, M. B. Simulation-Guided Rational De Novo Design of a Small Pore-Forming Antimicrobial Peptide. *Journal of American Chemistry Society*, v. 141, n. 12, p. 4839–4848. 2019.
- Chen, X.; Zhang, L.; Wu, Y.; Wang, L.; Ma, C.; Xi, X.; Olaf, R. P.; Emonds, B.; Shaw, C.; Chen, T.; Zhou, M. Evaluation of the Bioactivity of a Mastoparan Peptide from Wasp Venom and of its Analogues Designed Through Targeted Engineering. *International Journal of Biological Sciences*, v. 14, p. 599–607. 2018.
- Chen, Y.; Guarnieri, M. T.; Vasil, A. I.; Vasil, M. L.; Mant, C. T.; Hodges, R. S. Role of Peptide Hydrophobicity in the Mechanism of Action of α -Helical Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 4, p. 1398–1406. 2007.
- Chen, Y.; Mant, C. T.; Farmer, S. W.; Hancock, R. E. W.; Vasil, M. L.; Hodges, R. S. Rational Design of α -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index. *The Journal Of Biological Chemistry*, v. 280, n. 13, p. 12316–12329. 2005.
- Dathe, M.; Nikolenko, H.; Meyer, J.; Beyermann, M.; Bienert, M.. Optimization of the Antimicrobial Activity of Magainin Peptides by Modification of Charge. *FEBS Letters*, v. 501, p. 146–150. 2001.
- Dathe, M.; Wieprecht, T.; Nikolenko, H.; Handel, L.; Maloy, W. L.; Macdonald, D. L.; Beyermann, M.; Bienert, M. Hydrophobicity, Hydrophobic Moment and Angle Subtended by Charged Residues Modulate Antibacterial and Haemolytic Activity of Amphipathic Helical Peptides. *FEBS Letters*, v. 403, n. 2, p. 208–212. 1997.
- De Azevedo, R. A.; Figueiredo, C. R.; Ferreira, A. K.; Matsuo, A. L.; Massaoka, M. H.; Girola, N.; Auada, A. V. V.; Farias, C. F.; Pasqualoto, F. M.; Rodrigues, C. P.; Barduto, J. A.; Levy, D.; Bydlowski, S. P.; Sá-Junior, P. L.; Travassos, L. R.; Lebrun, I. Peptides Mastoparan Induces Apoptosis in B16F10-Nex2 Melanoma Cells Via the Intrinsic Mitochondrial Pathway and Displays Antitumor Activity *In Vivo*. *Peptides*, v. 68, p. 113–119. 2015.

De la Fuente-núñez, C.; Cardoso, M. H.; Cândido, E. D. S.; Franco, O. L.; Hancock, R. E. W. Synthetic Antibiofilm Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1858, p. 1061–1069. 2016.

De Leeuw, E.; Li, C.; Zeng, P.; Li, C.; Buin, M. D.; Lu, W.-Y.; Breukink, E.; Lu, W. Functional Interaction of Human Neutrophil Peptide-1 with the Cell Wall Precursor Lipid II. *FEBS Letters*, n. 584, n. 8, p. 1543–1548. 2010.

De Vliegheer, S.; Fox, L. K.; Piepers, S.; Mcdougall, S.; Barkema, H. W.. Mastitis in Dairy Heifers: Nature of the Disease, Potential Impact, Prevention, and Control. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 3, p 1025–1040. 2012.

Domingues, M. M.; Silva, P. M.; Franquelim, H. G.; Carvalho, F. A.; Castanho, M. A. R. B.; Santos, N. C. Antimicrobial Protein rBPI 21-Induced Surface Changes on Gram-negative and Gram-positive Bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, v. 10, n. 3, p. 543–551. 2014.

Donati, M.; Cenacchi, G.; Biondi, R.; Papa, V.; Borel, N.; Vecchio, E.; Magnino, S.; Pasquinelli, G.; Levi, A.; Franco, O. L. Activity of Synthetic Peptides Against *Chlamydia*. *Peptide Science*, v. 108 n. 6, p. 1–6. 2017.

Duarte, V. da S.; Dias, R. S.; Kropinski, A. M.; Campanaro, S.; Treu, L.; Siqueira, C.; Vieira, M. S.; Paes, I. S.; Santana, G. R.; Martins, F.; Crispim, J. S.; Xavier, A. S.; Ferro, C. G.; Vidigal, P. M. P.; Da Silva, S. C.; De Paula, S. O. Genomic Analysis and Immune Response in a Murine Mastitis Model of vB_EcoM-UFV13, a Potential Biocontrol Agent for Use in Dairy Cows. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1–12. 2018.

Eisenberg, D.; Weiss, R. M.; Terwilliger, T. C. The Helical Hydrophobic Moment: a Measure of the Amphiphilicity of α -Helix. *Nature*, v. 299, n. 5881, p 371–374. 1982.

Epand, R. M.; Epand, R. F. Bacterial membrane lipids in the action of antimicrobial agents. *Peptide Science*, v. 17, p. 298–305. 2011.

Esener, N.; Green, M. J.; Emes, R. D.; Jowett, B.; Davies, P. L.; Bradley, A. J.; Dottorini, T. Discrimination of Contagious and Environmental Strains of *Streptococcus uberis* in Dairy Herds by Means of Mass Spectrometry and Machine-Learning. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1–12. 2018.

Fang, L.; Hou, Y.; An, J.; Li, B.; Song, M.; Wang, X.; Sørensen, P.; Dong, Y.; Liu, C.; Wang, Y.; Zhu, H.; Zhang, S.; Yu, Y. Genome-Wide Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Innate Immune and Defense Responses of Bovine Mammary Gland to *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 6, p. 1–17. 2016.

Fiser, A.; Šali, A. Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein

Structure Models. *Methods in Enzymology*, v. 374, p. 461–491. 2003.

Fjell, C. D.; Hiss, J. A.; Hancock, R. E. W.; Schneider, G. Designing Antimicrobial Peptides: Form Follows Function. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 11, n. 1, p. 37–51. 2012.

Fox, L. K.; Gay, J. M. Contagious Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 9, n. 3, p. 475–487. 1993.

Fraunholz, M.; Sinha, B. Intracellular *Staphylococcus aureus*: Live-in and Let Die. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, p. 1–10. 2012.

Gautier, R.; Douguet, D.; Antony, B.; Drin, G. HELIQUEST: A web server to Screen Sequences with Specific α -Helical Properties. *Bioinformatics*, v. 24, n. 18, p. 2101–2102. 2008.

Giangaspero, A.; Sandri, L.; Tossi, A. Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides. A Systematic Study of the Effects of Structural and Physical Properties on Biological Activity. *European Journal of Biochemistry*, v. 268, p. 5589–5600. 2001.

Gomes, F.; Henriques, M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. *Current Microbiology*, v. 72, n. 4, p. 377–382. 2015.

Gomes, F.; Saavedra, M. J.; Henriques, M.; Bovine Mastitis Disease/Pathogenicity: Evidence of the Potential Role of Microbial Biofilms. *Pathogens and Disease*, v. 74, n. 3, p. 1–19. 2016.

Gottschalk, S.; Gottlieb, C. T.; Vestergaard, M.; Hansen, P. R.; Gram, L.; Ingmer, H.; Thomsen, L. E. Amphibian Antimicrobial Peptide Fallaxin Analogue FL9 Affects Virulence Gene Expression and DNA Replication in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 64, p. 1504–1513. 2015.

Grunert, T.; Stessl, B.; Wolf, F.; Sordelli, D. O.; Buzzola, F. R.; Ehling-schulz, M. Distinct Phenotypic Traits of *Staphylococcus aureus* are Associated with Persistent, Contagious Bovine Intramammary Infections. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1–10. 2018.

Günther, J.; Petzl, W.; Bauer, I.; Ponsuksili, S.; Zerbe, H.; Schuberth, H. J.; Brunner, R. M.; Seyfert, H.-M. Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* Mastitis: *S. aureus* Triggers Unbalanced Immune-Dampening and Host Cell Invasion Immediately After Udder Infection. *Scientific Reports*, v. 7, n. 4811, p. 1–14. 2017.

Hancock, R. E. W.; Sahl, H.-G. Antimicrobial and Host-Defense Peptides as New Anti-Infective Therapeutic Strategies. *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 1551–1557. 2006.

Higashijima, T.; Uzup, S.; Nakajima, T.; Rosa, E. M. Mastoparan, a Peptide Toxin from Wasp Venom, Mimics Receptors by Activating GTP-binding Regulatory Proteins (G

Proteins). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 14, p. 6491–6494. 1988.

Hilchie, A. L.; Sharon, A. J.; Haney, E. F.; Hoskin, D. W.; Bally, M. B.; Franco, O. L.; Corcoran, J. A.; Hancock, R. E. W. Mastoparan is a Membranolytic Anti-Cancer Peptide that Works Synergistically with Gemcitabine in a Mouse Model of Mammary Carcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1858, p. 3195–3204. 2016.

Hirai, Y.; Yasuhara, T.; Yoshida, H.; Nakajima, T. A New Cell Degranulating Peptide “Mastoparan” in the Venom of *Vespula lewisii*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 27, n. 8, p. 1942–1944. 1979.

Hoque, M. N.; Das, Z. C.; Rahman, A. N. M. A.; Haider, M. G.; Islam, M. A. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains in Bovine Mastitis Milk in Bangladesh. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, v. 6, p. 53–60. 2018.

Hori, Y.; Demura, M.; Iwadate, M.; Ulrich, A. S.; Niidome, T.; Aoyagi, H.; Asakura, T. Interaction of Mastoparan with Membranes Studied by ¹H-NMR Spectroscopy in Detergent Micelles and by Solid-State ²H-NMR and ¹⁵N-NMR Spectroscopy in Oriented Lipid Bilayers. *European Journal of Biochemistry*, v. 268, p. 302–309. 2001.

Huang, Y.; Huang, J.; Chen, Y. Alpha-helical Cationic Antimicrobial Peptides: Relationships of Structure and Function. *Protein & Cell*, v. 1, n.2, p. 143–152. 2010.

Hughes, K.; Watson, C. J. The Mammary Microenvironment in Mastitis in Humans, Dairy Ruminants, Rabbits and Rodents: A One Health Focus Embryonic day. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*, v. 23, p. 27–41. 2018.

Irazazabal, L. N.; Porto, W. F.; Ribeiro, S. M.; Casale, S.; Humblot, V.; Ladram, A.; Franco, O. L. Selective Amino Acid Substitution Reduces Cytotoxicity of the Antimicrobial Peptide Mastoparan. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1858, n. 11, p. 2699–2708. 2016.

Javadpour, M. M.; Juban, M. M.; Lo, W. J.; Bishop, S. M.; Alberty, J. B.; Cowell, S. M.; Becker, C. L. Mclaughlin, M. L. *De Novo* Antimicrobial Peptides with Low Mammalian Cell Toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, p. 3107–3113. 1996.

Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 3, p. 491–511. 2006.

Johler, S.; Weder, D.; Bridy, C.; Huguenin, M.; Robert, L.; Hummerjohann, J.; Stephan, R. Outbreak of Staphylococcal Food Poisoning Among Children and Staff at a Swiss Boarding School Due to Soft Cheese Made from Raw Milk. *J. Dairy Sci*, v. 98, n. 5, p. 2944–2948. 2015.

Kamaruzzaman, N. F.; Chong, S. Q. Y.; Edmondson-brown, K. M.; Ntow-Boahene, W.; Bardiau, M.; Good, L. Bactericidal and Anti-biofilm Effects of Polyhexamethylene

Biguanide in Models of Intracellular and Biofilm of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1–10. 2017.

Kandeel, S. A.; Morin, D. E.; Calloway, C. D.; Constable, P. D. Association of California Mastitis Test Scores with Intramammary Infection Status in Lactating Dairy Cows Admitted to a Veterinary Teaching Hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 32, p. 497–505. 2018.

Kawakami, H.; Goto, S. G.; Murata, K.; Matsuda, H.; Shigeri, Y.; Imura, T.; Inagaki, H.; Shinada, T. Isolation of Biologically Active Peptides from the Venom of Japanese Carpenter Bee, *Xylocopa appendiculata*. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 23, p. 1–11. 2017.

Kiyota, T.; Lee, S.; Sugihara, G. Design and Synthesis of Amphiphilic α -Helical Model Peptides with Systematically Varied Hydrophobic-Hydrophilic Balance and Their Interaction with Lipid- and Bio-Membranes. *Biochemistry*, v. 35, n. 40, p. 13196–13204. 1996.

Ko, S. J.; Hang, N. H.; Kim, M. K.; Park, J.; Park, E.; Park, G. H.; Kang, T. W.; Na, D. E.; Park, J. B.; Yi, Y. E.; Jeon, S. H.; Park, Y. Microbial Pathogenesis Antibacterial and Anti-Biofilm Activity, and Mechanism of Action of Pleurocidin Against Drug Resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, v. 127, p. 70–78. 2019.

Konno, K.; Hisada, M.; Fontana, R.; Lorenzi, C. C. B.; Naoki, H.; Itagaki, Y.; Miwa, A.; Kawai, N.; Nakata, Y.; Yasuhara, T.; Neto, J. R.; De Azevedo, W. F.; Palma, M.; Nakajima, T. Anoplin, a Novel Antimicrobial Peptide from the Venom of the Solitary Wasp *Anoplius samariensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1550, p. 70–80. 2001.

Konno, K.; Hisada, M.; Naoki, H.; Itagaki, Y.; Morimoto, Y.; Nakata, Y. Structure and Biological Activities of Eumenine Mastoparan-AF (EMP-AF), a New Mast Cell Degranulating Peptide in the Venom of the Solitary Wasp (*Anterhynchium avomarginatum* micado). *Toxicon*, v. 38, p. 1505–1515. 2000.

Konno, K.; Kazuma, K.; Nihei, K. Peptide Toxins in Solitary Wasp Venoms. *Toxins*, v. 8, p. 1–11. 2016.

Kotsiantis, S. B. Supervised Machine Learning: A Review of Classification Techniques. *Informatica*, v. 31, p. 249–268. 2007.

Kragol, G.; Lovas, S.; Varadi, G.; Condie, B. A.; Hoffmann, R.; Otvos, L. The Antibacterial Peptide Pyrrococricin Inhibits the ATPase Actions of DnaK and Prevents Chaperone-Assisted Protein Folding. *Biochemistry*, v. 40, n. 10, p. 3016–3026. 2001.

Kumar, P.; Kizhakkedathu, J. N.; Straus, S. K. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility *In Vivo*. *Biomolecules*, v. 8, n. 4, p. 1–24. 2018.

Kyte, J.; Doolittle, R. F. A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a

Protein. *Journal of Molecular Biology*, v. 157, n. 1, p. 105–132. 1982.

Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. PROCHECK: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, v. 26, p. 283–291. 1993.

Lázár, V.; Martins, A.; Spohn, R.; Daruka, L.; Grézal, G.; Fekete, G.; Számel, M.; Jangir, P. K.; Kintses, B.; Csörgo, B.; Nyerges, Á.; Györkei, Á. Kincses, A.; Dér, A.; Walter, F. R.; Deli, M. A.; Urbán, E.; Hegedus, Z.; Olajos, G.; Méhi, O.; Bálint, B.; Nagy, I.; Martineks, T. A.; Papp, B.; Pál, C. Antibiotic-Resistant Bacteria Show Widespread Collateral Sensitivity to Antimicrobial Peptides. *Nature Microbiology*, v. 3, p. 718–731. 2018.

Lee, S. H.; Baek, J. H.; Yoon, K. A. Proteins in Solitary vs Social Hunting Wasps. *Toxins*, v. 8, n. 32, p. 1–29. 2016.

Leitner, G.; Zilberman, D.; Papiro, E.; Shefy, S. Assessment of Acoustic Pulse Therapy (APT), a Non-Antibiotic Treatment for Dairy Cows with Clinical and Subclinical Mastitis. *PLoS ONE*, v. 13, n. 7, p. 1–13. 2018.

Leontiadou, H.; Mark, A. E.; Marrink, S. J. Antimicrobial Peptides in Action. *Journal of American Chemical Society*, v. 128, n. 37, p. 12156–12161. 2006.

Lin, C. H.; Tzen, J. T. C.; Shyu, C. L.; Yang, M. J.; Tu, W. C. Structural and biological characterization of mastoparans in the venom of *Vespa* species in Taiwan. *Peptides*, v. 32, p. 2027–2036. 2011.

Liu, S.; Bao, J.; Lao, X.; Zheng, H. Novel 3D Structure Based Model for Activity Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1–12. 2018.

Liu, Z.; Chen, S.; Zhou, Y.; Xie, C.; Zhu, B.; Zhu, H.; Liu, S.; Wang, W.; Chen, H.; Ji, Y. Deciphering the Venomic Transcriptome of Killer-Wasp *Vespa velutina*. *Scientific Reports*, v. 5, n. 9454, 1–9. 2015.

Lohner, K. New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *General Physiology and Biophysics*, v. 28, p. 105–116. 2009.

Loose, C.; Jensen, K.; Rigoutsos, I.; Stephanopoulos, G. A linguistic Model for the Rational Design of Antimicrobial Peptides. *Nature*, v. 443, p. 867–869. 2006.

Ludtke, S. J.; He, K.; Heller, W. T.; Harroun, T. A.; Yang, L.; Huang, H. W. Membrane Pores Induced by Magainin. *Biochemistry*, v. 35, n. 43, p. 13723–13728. 1996.

Mant, C. T.; Jiang, Z.; Gera, L.; Davis, T.; Nelson, K.; Bevers, S.; Hodges, R. S. *De novo* Designed Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides Incorporating Dab and Dap Residues on the Polar Face to Treat the Gram-negative Pathogen, *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, n. 7, p. 3354–3366. 2019.

Marcos, J. F.; Muñoz, A.; Pérez-Payá, E.; Misra, S.; López-García, B. Identification and Rational Design of Novel Antimicrobial Peptides for Plant Protection. *Annual Review of Phytopathology*, v. 46, p. 273–301. 2008.

Melo, M. N.; Ferre, R.; Castanho, M. A. R. B. Antimicrobial Peptides: Linking Partition, Activity and High Membrane-Bound Concentrations. *Nature Microbiology*, v. 7, p. 245–250. 2009.

Memariani, H.; Memariani, M.; Pourmand, M. R. Microbial Pathogenesis Venom-Derived Peptide Mastoparan-1 Eradicates Planktonic and Biofilm- Embedded Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Microbial Pathogenesis*, v. 119, p. 72–80. 2018.

Memariani, H.; Shahbazzadeh, D.; Sabatier, J.; Memariani, M.; Karbalaieimahdi, A.; Bagheri, K. P. Mechanism of Action and *In Vitro* Activity of Short Hybrid Antimicrobial Peptide PV3 Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 479, n. 1, p. 103–108. 2016.

Mishra, A. K.; Choi, J.; Moon, E.; Baek, K. H. Tryptophan-Rich and Proline-Rich Antimicrobial Peptides. *Molecules*, v. 23, p. 1–23. 2018.

Moreno, M.; Giralt, E. Three Valuable Peptides from Bee and Wasp Venoms for Therapeutic and Biotechnological Use: Melittin, Apamin and Mastoparan. *Toxins*, v. 7, p. 1126–1150. 2015.

Mushtaq, S.; Shah, A. M.; Shah, A.; Lone, S. A.; Hussain, A.; Parvaiz, Q.; Ali, N. Microbial Pathogenesis Bovine mastitis: An Appraisal of its Alternative Herbal Cure. *Microbial Pathogenesis*, v. 114, p. 357–361. 2018.

Nakajima, T. Pharmacological Biochemistry of Vespidae Venoms. In: Tom, P. (Org.). *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*. Academic Press Inc. 1986. Cap. 6, p. 309-327.

Nascimento, J. S.; Fagundes, P. C.; Brito, M. A. V. P.; Dos Santos, K. R. N.; Bastos, M. C. F. Production of Bacteriocins by Coagulase-Negative Staphylococci Involved in Bovine Mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 106, p. 61–71. 2005.

Nguyen, L. T.; Haney, E. F.; Vogel, H. J. The Expanding Scope of Antimicrobial Peptide Structures and their Modes of Action. *Trends in Biotechnology*, v. 29, n. 9, p. 464–472. 2011.

Ochoa-zarzosa, A.; Loeza-Ángeles, H.; Sagrero-Cisneros, E.; Villagómez-Gómez, E.; Lara-Zárata, L.; López-Meza, J. E. Antibacterial Activity of Thionin Thi2.1 from *Arabidopsis thaliana* Expressed by Bovine Endothelial Cells Against *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 127, p. 425–430. 2008.

Oshiro, K. G. N. ANÁLISE COMPARATIVA DE DOIS PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS BIOINSPIRADOS EM MASTOPARANO-L. 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande.

Pace, C. N.; Scholtz, J. M. A Helix Propensity Scale Based on Experimental Studies of Peptides and Proteins. *Biophysical Journal*, v. 75, n.1, p. 422–427. 1998.

Pag, U.; Oedenkoven, M.; Sass, V.; Shai, Y.; Shamova, O.; Antcheva, N.; Tossi, A.; Sahl, H. Analysis of *In Vitro* Activities and Modes of Action of Synthetic Antimicrobial Peptides Derived from an α -Helical 'Sequence Template'. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p. 341–352. 2008.

Park, C. B.; Kim, H. S.; Kim, S. C. Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, v. 244, n.1, p. 253–257. 1998.

Pasupuleti, M.; Schmidtchen, A.; Chalupka, A.; Ringstad, L.; Malmsten, M. End-Tagging of Ultra-Short Antimicrobial Peptides by W/F Stretches to Facilitate Bacterial Killing. *PLoS ONE*, v. 4, n. 4, p.1–9. 2009.

Patrzykat, A.; Friedrich, C. L.; Zhang, L.; Mendoza, V.; Hancock, R. E. W. Sublethal Concentrations of Pleurocidin-Derived Antimicrobial Peptides Inhibit Macromolecular Synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 3, p. 605–614. 2002.

Pfeiffer, D. R.; Gudz, T. I.; Novgorodov, S. A.; Erdahl, W. L. The Peptide Mastoparan Is a Potent Facilitator of the Mitochondrial Permeability Transition. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 4923–4932. 1995.

Piek, T. O. M.; Spanjer, W. Chemistry and Pharmacology of Solitary Wasp Venoms. In:____. (Org.). *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects*. Academic Press Inc. 1986. Cap. 5, p. 161-307.

Porto, W F.; Pires, A. S.; Franco, O. L. Computational Tools for Exploring Sequence Databases as a Resource for Antimicrobial Peptides. *Biotechnology Advances*,v. 35, n. 3, p. 337–349. 2017.

Porto, William F.; Fensterseifer, I. C. M.; Ribeiro, S. M.; Franco, O. L. Joker: An Algorithm to Insert Patterns Into Sequences for Designing Antimicrobial Peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1862, p. 2043–2052. 2018.

Porto, William F.; Silva, O. N.; Franco, O. L. Prediction and Rational Design of Antimicrobial Peptides. In: *Protein Structure*. IntechOpen. 2012. p. 377-396.

Pouny, Y.; Rapaport, D.; Mor, A.; Nicolas, P.; Shai, Y. Interaction of Antimicrobial Dermaseptin and Its Fluorescently Labeled Analogues with Phospholipid Membranes.

Biochemistry, v. 31, n. 49, p. 12416–12423. 1992.

Robinson, J. A. Protein Epitope Mimetics as Anti-Infectives. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 15, n. 3, p. 379–386. 2011.

Romero, J.; Benavides, E.; Meza, C. Assessing Financial Impacts of Subclinical Mastitis on Colombian Dairy Farms Description of Study Region. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 5, p. 1–11. 2018.

Sala, A.; Cabassi, C. S.; Santospirito, D.; Polverini, E.; Flisi, S.; Cavirani, S.; Taddei, S. Novel *Naja atra* cardiotoxin 1 (CTX-1) Derived Antimicrobial Peptides with Broad Spectrum Activity. *PLoS ONE*, v. 13, n.1, p. 1–22. 2018.

Sample, C. J.; Hudak, K. E.; Barefoot, B. E.; Koci, M. D.; Wanyonyi, M. S.; Abraham, S.; Staats, H. F.; Ramsburg, E. A. A Mastoparan-Derived Peptide Has Broad-Spectrum Antiviral Activity Against Enveloped Viruses. *Peptides*, v. 48, p. 96–105. 2013.

Sass, V.; Schneider, T.; Wilmes, M.; Körner, C.; Tossi, A.; Novikova, N.; Shamova, O.; Sahl, H. G. Human B-Defensin 3 Inhibits Cell Wall Biosynthesis in Staphylococci. *Infection and Immunity*, v. 78, n. 6, p. 2793–2800. 2010.

Schmidtchen, A.; Pasupuleti, M.; Mörgelin, M.; Davoudi, M.; Alenfall, J.; Chalupka, A.; Malmsten, M. Boosting Antimicrobial Peptides by Hydrophobic Oligopeptide End Tags. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 26, p. 17584–17594. 2009.

Scocchi, M.; Mardirossian, M.; Runti, G.; Benincasa, M. Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 76–88. 2016.

Shagaghi, N.; Palombo, E. A.; Clayton, A. H. A.; Bhave, M. Antimicrobial Peptides: Biochemical Determinants of Activity and Biophysical Techniques of Elucidating their Functionality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 62, p. 1–13. 2018.

Shah, P.; Hsiao, F. S.; Ho, Y.; Chen, C. The Proteome Targets of Intracellular Targeting Antimicrobial Peptides. *Proteomics*, v. 16, p. 1225–1237. 2016.

Shaheen, M.; Tantary, H. A.; Nabi, S. U. A Treatise on Bovine Mastitis: Disease and Disease Economics, Etiological Basis, Risk Factors, Impact on Human Health, Therapeutic Management, Prevention and Control Strategy. *Advances in Dairy Research*, v. 4, n. 1, p. 1–10. 2016.

Silva, O. N.; De la Fuente-núñez, C.; Haney, E. F.; Fensterseifer, I. C. M.; Ribeiro, S. M.; Porto, W. F.; Faria-Junior, C.; Rezende, T. M. B.; Moreno, S. E.; Lu, T. K.; Hancock, R. E. W.; Franco, O. L. An Anti-Infective Synthetic Peptide with Dual Antimicrobial and Immunomodulatory Activities. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1–11. 2016.

Silva, O. N. MODIFICAÇÃO INCREMENTAL DE PEPTÍDEOS: Novas Perspectivas para o Tratamento de Infecções e Erradicação de Biofilmes Bacterianos. 2015. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

Smith, K. L.; Hogan, J. S. Environmental Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 9, n. 3, p. 489–498. 1993.

Song, M.; He, Y.; Zhou, H.; Zhang, Y.; Li, X.; Yu, Y. Combined Analysis of DNA Methylome and Transcriptome Reveal Novel Candidate Genes with Susceptibility to Bovine *Staphylococcus aureus* Subclinical Mastitis. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1–15. 2016.

Souza, B. M.; Mendes, M. A.; Santos, L. D.; Marques, M. R.; César, L. M. M.; Almeida, R. N. A.; Pagnocca, F. C.; Konno, K.; Palma, M. S. Structural and Functional Characterization of Two Novel Peptide Toxins Isolated from the Venom of the Social Wasp *Polybia paulista*. *Peptides*, v. 26, p. 2157–2164. 2005.

Sun, E.; Belanger, C. R.; Haney, E. F.; Hancock, R. E. W. Host Defense (Antimicrobial) Peptides. In: Koutsopoulos, S. (Org.). *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier Ltd, 2018. Cap 10, p. 253-285.

Takahashi, D.; Shukla, S. K.; Prakash, O.; Zhang, G. Structural Determinants of Host Defense Peptides for Antimicrobial Activity and Target Cell Selectivity. *Biochimie*, v. 92, p. 1236–1241. 2010.

Tartaglia, N. R.; Breyne, K.; Meyer, E.; Cauty, C.; Jardin, J.; Chrétien, D.; Dupont, A.; Demeyere, K.; Berkova, N.; Azevedo, V.; Guedón, E.; Le Loir, Y. *Staphylococcus aureus* Extracellular Vesicles Elicit an Immunostimulatory Response *In Vivo* on the Murine Mammary Gland. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, p. 1–17. 2018.

Thompson-Crispi, K.; Atalla, H.; Miglior, F.; Mallard, B. A. Bovine Mastitis: *Frontiers in Immunogenetics*. *Frontiers in Immunology*, v. 5, p. 1–10. 2014.

Tossi, A.; Tarantino, C.; Romeo, D. Design of Synthetic Antimicrobial Peptides Based on Sequence Analogy and Amphipathicity. *European Journal of Biochemistry*, v. 250, n. 2, p. 549–558. 1997.

Veldhuizen, E. J. A.; Schneider, V. A. F.; Agustiandari, H.; Dijk, A. V.; Bokhoven, J. L. M. T.; Bikker, F. J.; Haagsman, H. P. Antimicrobial and Immunomodulatory Activities of PR-39 Derived Peptides. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, p. 1–7. 2014.

Vila-Farres, X.; Garcia de la Maria, C.; López-Rojas, R.; Pachón, J.; Giralt, E.; Vila, J. *In Vitro* Activity of Several Antimicrobial Peptides Against Colistin-Susceptible and Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, p. 383–387. 2011.

Wang, Y.; Yang, Y.; Chen, Y.; Zhao, H. Computer-Aided Design, Structural Dynamics Analysis, and *In Vitro* Susceptibility Test of Antibacterial Peptides Incorporating Unnatural Amino Acids Against Microbial Infections. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, v. 134, p. 215–223. 2016.

World Health Organization. WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases. 2015.

Wiederstein, M.; Sippl, M. J. ProSA-web: Interactive Web Service for The Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. *Nucleic Acids Research*, v. 35, p. 407–410. 2007.

Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. W. Agar and Broth Dilution Methods to Determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antimicrobial Substances. *Nature Protocols*, v. 3, n. 2, p. 163–175. 2008.

Wieprecht, T.; Dathe, M.; Krause, E.; Beyermann, M.; Maloy, W. L.; Macdonald, D. L.; Bienert, M. Modulation of Membrane Activity of Amphipathic, Antibacterial Peptides by Slight Modifications of the Hydrophobic Moment. *FEBS Letters*, v. 417, p. 135–140. 1997.

Xu, X.; Yang, H.; Yu, H.; Li, J.; Lai, R. The Mastoparanogen from Wasp. *Peptides*, v. 27, p. 3053–3057. 2006.

Yamada, Y.; Shinohara, Y.; Kakudo, T.; Chaki, S.; Futaki, S.; Kamiya, H.; Harashima, H. Mitochondrial Delivery of Mastoparan with Transferrin Liposomes Equipped with a pH-Sensitive Fusogenic Peptide for Selective Cancer Therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 303, p. 1–7. 2005.

Yan, H.; Hancock, R. E. W. Synergistic Interactions Between Mammalian Antimicrobial Defense Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 5, p. 1558–1560. 2001.

Yan, J.; Wang, K.; Dang, W.; Chen, R.; Xie, J.; Zhang, B.; Song, J.; Wang, R. . Two Hits Are Better than One: Membrane-Active and DNA Binding-Related Double-Action Mechanism of NK-18, a Novel Antimicrobial Peptide Derived from Mammalian NK-Lysin, v. 57, n. 1, p. 220–228. 2013.

Yibin, G.; Jiang, Z.; Hong, Z.; Gengfa, L.; Liangxi, W.; Guo, W.; Yongling, L. A Synthesized Cationic Tetradecapeptide from Hornet Venom Kills Bacteria and Neutralizes Lipopolysaccharide *In Vivo* and *In Vitro*. *Biochemical Pharmacology*, v. 70, p. 209–219. 2005.

Yount, N. Y.; Weaver, D. C.; Lee, E. Y.; Lee, M. W.; Wang, H.; Chan, L. C.; Wong, G. C. L.; Yeaman, M. R. Unifying Structural Signature of Eukaryotic α -Helical Host Defense Peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 116, n. 14, p. 6944–6953. 2019.

Zadoks, R. N.; Middleton, J. R.; McDougall, S.; Katholm, J.; Schukken, Y. H. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. *Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia*, v. 16, p. 357–372. 2001.

Zhang, L.; Gallo, R. L. Antimicrobial Peptides. *Current Biology*, v. 26, p. R14–R19. 2016.

Zhang, S. K.; Song, J. W.; Gong, F.; Li, S. B.; Chang, H. Y.; Xie, H. M; Gao, H. W.; Tan, Y. X.; Ji, S. P.; Gao, H. W.; Tan, Y. X. Design of an α -Helical Antimicrobial Peptide with Improved Cell- Selective and Potent Anti-Biofilm Activity. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1–13. 2016.

ANEXO A – Análise por espectrometria de massas (MALDI-ToF) dos peptídeos de estudo apresentando íons m/z de 1479,9 Da para mastoparano-L, 2063,2 Da para mastoparano-MO, 1636,1 Da para mastoparano-R1 e 1606,3 Da para $[^5, R^8]$ MP.

