

**PEPTÍDEOS CATIÔNICOS: ESTRUTURA, MECANISMO DE AÇÃO E
ESPECTRO ANTIMICROBIANO.**

Lucas Assoni ¹, Michelle Sampaio Darrieux Bertoncini^{1,2}.

¹ Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo, Brasil

² Docente da Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP.

Autor correspondente: Michelle Sampaio Darrieux Bertoncini

Laboratório de Farmacologia e Microbiologia

Endereço: Avenida São Francisco de Assis, 218

Bragança Paulista, São Paulo, Brasil

CEP: 12916-900

E-mail: michelle.bertoncini@usf.edu.br

RESUMO

O aumento da quantidade de microrganismos resistentes a agentes antimicrobianos convencionais e a ausência de descoberta de novos antimicrobianos é uma preocupação crescente na comunidade científica, onde, possivelmente, as práticas clínicas utilizadas atualmente não serão eficazes no tratamento de infecções, que podem ser causadas por patógenos de diversos tipos, em um futuro próximo. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) demonstram uma opção em potencial para o tratamento destas infecções, diretamente, por meio da sua capacidade de causar morte celular, ou indiretamente, que ocorre por meio da sua interação com o sistema imune. São encontrados na maioria das formas de vida, compondo parte do sistema imune inato contra patógenos invasores e podem atuar de diversas maneiras, contra um amplo espectro de microrganismos encontrados no ambiente como fungos, vírus e bactérias, as quais são o enfoque desta revisão.

Palavras chave: Peptídeos Catiônicos Antimicrobianos, Parede Celular, Resistência Microbiana a Medicamentos, Imunidade Inata.

ABSTRACT

The increasing number of microorganisms resistant to conventional antimicrobial agents and the lack of discovery of new antimicrobials is a growing concern in the scientific community, where, possibly, the currently used clinical practices will not be effective in the treatment of infections, which can be caused by pathogens of various types, in a near future. Antimicrobial peptides (AMPs) demonstrate a potential option for the treatment of these infections, directly, through their ability to cause cell death, or indirectly, that occur through their interaction with the immune system. They are found in most life forms, forming part of the innate immune system against invading pathogens and may act in a variety of ways against a broad spectrum of non-environmentally-found microorganisms such as fungi, viruses and bacteria, which are the focus of this review.

Keywords: Antimicrobial Cationic Peptides, Cell Wall, Microbial Drug Resistance, Innate Immunity.

1. INTRODUÇÃO

Peptídeos com atividade antimicrobiana (AMPs) são encontrados em todas as formas de vida (Zaslöff; 2002) e fazem parte da defesa inata dos organismos. Seu tamanho pode variar de entre 10 a 150 aminoácidos, com uma carga elétrica dentro de um intervalo de -3 até +20, o que é essencial para a ligação com a célula-alvo. A maioria dos AMPs são catiônicos e anfipáticos. Apesar de possuírem algumas diferenças na composição de aminoácidos (com a predominância de aminoácidos específicos, como prolina ou triptofano) ou em sua estrutura (como presença ou não de α -hélice ou pontes dissulfeto) apresentam elevada homologia. Segundo o banco de dados de AMPs (Wang, Li e Wang; 2016) existem 2817 peptídeos com potencial antimicrobiano; estes peptídeos englobam um amplo espectro de ação contra diferentes patógenos (bactérias, vírus, fungos, protozoários), e também atuam como inseticidas, espermicidas até mesmo no tratamento de feridas e tumores. Outros ainda possuem ação antioxidante, apoptótica ou atuam como inibidores de proteases. Destes, há a descrição de 116 AMPs humanos (Wang; 2014), isolados de tecidos e superfícies epiteliais como pele, olhos, cavidade oral e auricular, intestino e sistemas nervoso e urinário. Os AMPs possuem diferentes focos de ação como paredes celulares internas e externas ou penetrando a célula-alvo (com a finalidade de se ligar em estruturas intrínsecas para seu funcionamento); podem ainda atuar nas células de defesa, promovendo ação imunomodulatória.

2. CLASSIFICAÇÃO

AMPs podem ser classificados em: i) catelicidinas (LL-37, Indolicidina), ii) defensinas (α -defensinas, β -defensinas e θ -defensinas) e iii) peptídeos derivados da Lactoferrina (Lactoferricina – LFcín e Lactoferrampina – LFampín).

2.1 Catelicidinas

Em humanos, somente uma catelicidina, denominada LL-37, está presente. Esta molécula deriva da clivagem da porção C-terminal e substituição de três aminoácidos de seu precursor, hCAP18, uma pré-proteína de 18 kDa. Codificado pelo gene *camp* (encontrado nos éxons 1-4 do cromossomo 3p21), o precursor de LL-37 foi inicialmente isolado a partir de neutrófilos (Larrick et al.; 1995, Agerberth et al.; 1995, Cowland et al.; 1995, Gudmundsson et al.; 1996), mas também pode ser encontrado em outras células como mielócitos e metamielócitos (Sorensen et al.; 1997), células epiteliais – como queratinócitos, nas glândulas sudoríparas, saliva, testículos e em mastócitos, (Di Nardo et al.; 2003, Frohm et al.; 1996, Cowland et al.; 1995).

Após a passagem por neutrófilos, as catelicidinas são transformadas em peptídeos ativos (Braff et al.; 2005), que apresentam atividade contra bactérias, fungos, vírus e células cancerígenas, além de uma possível atividade quimiotática para células de defesa como neutrófilos, monócitos e linfócitos T (De et al. 2000). Reparação de tecidos e cura de feridas também fazem parte das funções da LL-37 após estímulo inflamatório, lesão ou infecção, onde os queratinócitos ativados dão o início ao aumento da expressão de peptídeos, além da já citada LL-37, defensinas como hBD-2 e hBD-3 (“human β -defensin”) (Dorschner et al.; 2001). LL-37 também está presente no muco que reveste as vias aéreas, originando-se dos neutrófilos que chegam ao local após estímulo, além

de induzir apoptose em células epiteliais e estimular angiogênese a partir do aumento da proliferação de células epiteliais (Koczulla et al.; 2003).

LL-37 é anfifílica ou anfipática, ou seja, uma molécula catiônica que possui uma cadeia de hidrocarbonetos não ramificados, com um polo hidrofílico (polar) e outro hidrofóbico/lipofílico (apolar). Em pH fisiológico, possui carga elétrica positiva de +6 . A porção N-terminal é hidrofóbica, e também possui uma estrutura em α -hélice. A atividade de LL-37, como qualquer peptídeo, é dependente do pH e da composição iônica do meio em que está inserido, uma vez que estes fatores são capazes de alterar sua estrutura, afetando sua atividade. Em pH <5, LL-37 começa a perder sua conformidade estrutural original e em pH 2, esta é completamente desordenada. Entretanto, a estrutura em α -hélice é conservada mesmo em pH alcalino (13). A conservação da α -hélice é essencial para a atividade do peptídeo contra patógenos (Johansson et al.; 1998). LL-37 possui a capacidade de permeabilizar membranas de microrganismos invasores, de maneira rápida e com um variado espectro de ação, incluindo bactérias gram positivas, gram negativas, fungos e vírus (Gennaro e Zanetti; 2000). O método de interação com a camada lipídica depende do tipo de membrana apresentada pela célula, seja ela única (atuação eletrostática), dupla (formação de interdigitações) ou qualquer outra conformação que possa ser encontrada (Sevcsik et al. 1998). Também podem ser capazes de gerar poros na superfície de bicamadas lipídicas. Estes poros assemelham-se com o modelo toroidal de rompimento de membranas (Wildman et al. 2003).

Outro membro da classe das catelicidinas é a Indolicidina. Foi primeiramente isolada a partir de neutrófilos bovinos e contém 13 resíduos de aminoácidos, onde a estrutura principal (ILPWKWPWWPWR-Am), passa por um processo denominado amidação, com a perda do grupamento -OH da porção terminal carboxila (-COOH), que é

substituído por um grupamento amina (-NH). Indolicidina possui uma alta porcentagem molar de resíduos de triptofano (cinco aminoácidos ou 39%), prolina (três aminoácidos ou 23%), e uma porção C-terminal, responsável pelo potencial antimicrobiano. A região C-terminal é variável enquanto a porção N-terminal é idêntica aos seus precursores. Ao contrário de outros peptídeos, não possui uma α -hélice e estrutura β , estando disposta linearmente. (Selsted et al.; 1992, Zanetti et al.; 1995). Possui atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Selsted et al.; 1992), fungos (Ahmad et al. 1995, (Subbalakshmi et al. 1996), protozoários (Aley et al. 1994), e anti-HIV (Robinson et al. 1998). Acredita-se que a atuação seja por meio do rompimento de membranas, apesar do mecanismo de ação ainda não estar completamente elucidado. A Indolicina pode desestabilizar a membrana externa e citoplasmática, mas sem levar à lise celular. Outros peptídeos, que também tem como alvo as paredes celulares de células microbianas, tem como mecanismo de ação a formação de poros, o que não ocorre com a Indolicidina (Falla et al. 1996, Végh et al.; 2011). Indolicidina também possui a capacidade de se ligar e envolver a dupla hélice do DNA, impedindo replicação e transcrição, indicando um potencial antibacteriano a ser estudado (Ghosh et al.; 2014); entretanto, Indolicidina apresenta toxicidade contra eritrócitos (Ahmad et al.; 1995) e linfócitos T (Schluesener et al. 1993; Ebbensgaard et al.; 2015, Jindal et al. 2015), que pode ser reduzida, sem perder a atividade antimicrobiana, por meio de diferentes métodos como a substituição dos resíduos de lisina por prolina (Zhu et al. 2006), troca da posição do resíduo de triptofano, presente na porção hidrofóbica da hélice anfipática (Rekdal et al.; 2012) ou por meio de ciclagem (Matsuzaki et al. 2009). Novos compostos derivados, com a propriedade antimicrobiana mantida ou melhorada, e com redução da citotoxicidade, foram criados buscando alternativas para as possíveis limitações da Indolicidina (Subbalakshmi et al.; 1996, Falla and Hancock 1997, Tsai et al. 2009).

2.2 Defensinas

Defensinas são peptídeos catiônicos, anfipáticos e relativamente pequenos (29-42 resíduos de aminoácidos) e como outros peptídeos, também fazem parte da defesa inata do organismo. Podem ser classificados, usando como parâmetro estrutura e a conformidade das ligações dissulfeto, em α -, β -, e θ -defensinas.

α -defensinas: em humanos, há a expressão de seis α -defensinas, das quais quatro são encontrados em granulócitos, especificamente neutrófilos (HNP, “human neutrophil peptide”, 1-4) (Ganz et al. 1985) mas também podem ser expressas em outras células de defesa como monócitos/macrófagos, células “neutral killer” (NK), alguns tipos de linfócitos T e B e em células dendríticas imaturas (revisado por Selsted e Oullette; 2005, Pagzier et al.; 2007) e o restante em células de Paneth (HD5 e HD6, “human defensins”, 5 e 6) e em células do trato geniturinário (revisão por Wilson et al.; 2013). Junto ao grupo das β -defensinas, compõem cerca de 5% das proteínas encontradas nos neutrófilos humanos (Kagan et al.; 1994). São peptídeos pequenos (3-4 kDa) e HNP-1 é o mais predominante entre os grânulos azurofílicos de neutrófilos, os quais se fundem ao fagossomos liberando os peptídeos na membrana do microrganismo (Ganz et al.; 1993, Lehrer et al.; 1993).

- HNP-1

Um dos membros da família das α -defensinas é HNP-1. A sequência possui 30 aminoácidos, com estrutura semelhante a outras defensinas derivadas de neutrófilos (HNP 2 e 3) e em pH 7 possui carga positiva (Selsted et al.; 1985). Possui um amplo espectro de ação contra diversos microrganismos como fungos, bactérias, vírus e possui função imunomodulatória, quimiotática e estimula ativação de mastócitos (revisado por

Pazgier et al.; 2007, Wilson et al.; 2013). Estruturalmente, possui conformação em folha- β , organizada por meio de três pontes dissulfeto, as quais possuem papel essencial na manutenção da atividade antimicrobiana do peptídeo. Esta conformação estrutural possui a capacidade de manter a estabilidade in vivo, evitando que ocorra a degradação proteolítica.

O principal método de ação de defensinas é a lise celular por meio de permeabilização de membranas (Lehrer et al. 1993). Há a formação de poros, levando ao extravasamento de metabólitos. A formação dos poros pode ser explicada pela associação de cargas opostas onde o peptídeo é catiônico e as membranas são carregadas negativamente. Especificamente, as regiões ricas em grupos arginina do peptídeo induzem a formação dos canais, após a ligação com os fosfolipídios de membrana (Lehrer et al.; 1993, Dong et al. 2016).

Microrganismos podem utilizar de proteólises como mecanismo de resistência, com o objetivo de impedir a ação de peptídeos catiônicos, mesmo considerando o potencial anfipático em sua interação com membranas de patógenos. Entretanto, a manutenção da viabilidade do AMP dependerá de sua conformação estrutural (Lehrer e Lu; 2012).

HNP-1 também pode se ligar em peptiglicanos precursores da síntese da membrana celular, impedindo a sua atuação. O bloqueio da síntese afeta tanto a formação estrutural da membrana, quanto sua funcionalidade (de Leeuw et al.; 2010)

β -defensinas: Inicialmente isoladas do epitélio traqueal bovino (Diamond et al.; 1991), atualmente são encontradas até 31 β -defensinas em humanos (Jones e Bevins; 1993, Porter et al.; 1997). Estão presentes em diversos tecidos como peles e mucosa em contato com o ambiente, sendo também produzidas nos monócitos, macrófagos, em

algumas células dendríticas e no trato reprodutivo masculino (Pazgier et al.; 2006, Yamaguchi et al.; 2002).

θ -defensinas: não são encontradas em humanos, mas em outros mamíferos, como macacos da família Cercopithecidae e orangotangos (Nguyen et al.; 2003). Apesar de humanos expressarem o mRNA codificante das θ -defensinas, mutações inserindo stop-codons prematuramente nos genes impedem a tradução e a produção do precursor dos peptídeos (Nguyen et al.; 2003, Cole et al.; 2002, Tang et al.; 1999).

3. LACTOFERRINA

3.1 Estrutura e ligação com Fe^{3+}

Lactoferrina Humana (hLF) ou Lactotransferrina é uma glicoproteína bilobal (80 kDa), monomérica e conservada em uma cadeia polipeptídica única, encontrada no soro do leite (Baker; 1994, Querinjean et al.; 1971, Legrand et al.; 2008). hLF é constituída por dois lobos homólogos (37%), com cerca de 40 kDa cada; a porção N-terminal contém os resíduos 1-338 e a C-terminal engloba os resíduos 339-703. Cada lobo possui dois domínios (N1/N2 e C1/C2, respectivamente), uma região responsável pela ligação com o ferro, localizada na fenda entre os domínios de cada lobo e um sítio de glicosilação (aminoácidos 137-490). Os dois lobos são conectados por uma região móvel que possui regiões com estrutura de α -hélice (aminoácidos 333-343 na hLF), possibilitando flexibilidade à molécula (Shanbacher et al.; 1992, van der Strate et al.; 2001). Apesar da similaridade entre as estruturas lobais, sequências específicas determinam algumas funcionalidades diferentes. O lobo N-terminal é responsável pela função antimicrobiana enquanto a porção C-terminal é ligada ao potencial terapêutico em doenças como gastropatias causadas por anti-inflamatórios não esteroidais (Mir et al. 2009), diabetes

(Mir et al. 2010), regeneração de feridas na córnea (bLF) (Ashby et al. 2011) e ação antiviral, inibindo a ação de vírus Influenza (bLF) (Ammendolia et al. 2012).

Transferrinas também podem ser encontradas em outras espécies como bovinos (bLF) (Haridas et al.; 1994, Moore et al.; 1997), búfalos (Karthikeyan et al.; 1999, Karthikeyan et al.; 2000), equinos [Sharma et al.; 1999(a), Sharma et al.; 1999(b)], camelos (Khan et al.; 2001), galináceos (Kurokawa et al.; 1995), coelhos (Bailey et al.; 1988), patos (Rawas et al.; 1996), entre outros (Conesa et al.; 2008), com alguma similaridade estrutural, porém o uso clínico em humanos pode não ser apropriado (Sanchez et al.; 1992).

Lactoferrina possui homologia com outras proteínas da família das transferrinas, como a transferrina humana sérica (sTF, “human serum lactotransferrin”) (59%) e a ovotransferrina (49%), encontrada na albumina de ovos de galinhas. Também compartilham os mesmo sítios de ligação com metais (2 Tyr, 1 His, 1 Asp e um íon CO32-) (Metz-Boutigue et al.; 1984, Baker; 1994). hLF também possui a capacidade de se ligar com outros metais de transição (Cr^{3+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Cu^{2+} , Al^{3+} e Ga^{3+}) e outros cátions como lantanídeos e actinídeos no lugar de Fe^{3+} porém a conformação fechada pode ser encontrada somente em LFs ligadas a metais. Apesar da hLF se ligar com metais com afinidade menor em relação ao Fe^{3+} , a estrutura se mantém intacta, evidenciando a estabilidade na capacidade de transporte de íons (Kumar et al.; 2000, Smith et al.; 1992, Smith et al.; 1994).

Enquanto sTF possui capacidade quelante apenas em pH fisiológico (Baker; 1994, Aisen e Leibman; 1972), hLF mantém sua capacidade de ligação ao Fe^{3+} mesmo em pH ácido (3.5). Em comparação, sTF perde esta habilidade em pH 5.5 (Mazurier e Spik; 1980), demonstrando maior versatilidade e melhor potencial bacteriostático e

antioxidante da hLF quando comparada com a capacidade de retenção do ferro já ligado à proteína sTF (Baker e Baker; 2012). Quando Fe^{3+} não está ligado a transferrinas, ele se encontra altamente insolúvel e facilmente hidrolisável (redução em Fe^{2+}).

hLF é secretada pela maioria das células epiteliais, em diversas das secreções exócrinas, na sua forma livre de ferro (Apo-hLF, apo- human lactoferrin) e se liga com íons de ferro férrico (Fe^{3+}) até sua forma saturada (holo-hLF). Apo-hLF e holo-hLF possuem conformações “abertas” e “fechadas”, respectivamente (Gifford et al.; 2012). Somente cerca de 30% da hLF encontrada no plasma é saturada em ferro, enquanto as formas mais encontradas são Fe_2hLF (hLF diférrica) em 27% e FeNhLF (N monomérico) em 23% (Williams e Moreton; 1980).

Apesar de não haver um consenso a respeito da liberação do ferro pela hLF in vivo, este mecanismo aparenta funcionar por meio de degradação/desnaturação da LF ou modificações na estrutura do receptor (Baker e Baker; 2012). Em pH neutro, TFR (transferrin receptor), um receptor específico (Eckenroth et al.; 2011) e essencial no transporte do Fe^{3+} , faz o carregamento até o meio intracelular (Trowbridge e Omary; 1981, Aisen e Sarkar; 1983).

A endocitose ocorre após a ligação de duas moléculas de Fe_2hLF no receptor de membrana TFR, as quais serão internalizadas por meio de uma vesícula revestida por clatrina, formando endossomas. Estas vesículas contendo os complexos Fe_2hLF -TFR são acidificadas, por meio de uma bomba de H^+ , alterando o pH intravesicular para cerca de 5.5, o que desfaz a ligação da hLF com Fe^{3+} , levando a liberação de Fe^{2+} no meio intracelular. O complexo hLF-TFR se mantém estável, ou seja, a ligação, com afinidade nanomolar (nM), possui alto nível de afinidade (Aisen et al.; 2001), mesmo após a diminuição do pH. Os complexos são externalizados por meio de exocitose, para

que possam ser reutilizados em novos ciclos (Richardson e Ponka, 1997, Frazer e Anderson; 2013).

Após a quebra da ligação com Fe_2hLF e ação de enzimas redutoras, realizando a oxidação do ferro férrico liberado, em ferro ferroso (Fe^{2+}) no meio vesicular, há a ação de um transportador seletivo para Fe^{2+} denominado por meio de Dmt (“*divalent metal transporter 1*”), um transportador de membrana apical, o qual é seletivo para Fe^{2+} (Fleming et al.; 1997, Fleming et al.; 1998, Gunshin et al.; 1997, Wang e Pantopoulos; 2011), o qual leva o Fe^{2+} para o meio intracelular, para sua utilização nos processo metabólicos (Frazer e Anderson; 2013, Recalcati et al.; 2017).

A via de regulação primária em casos de esgotamento de ferro é o aumento da absorção (Fe^{3+} ou Fe^{2+}) da dieta ou transferrinas, especialmente por meio de Dmt, ferroportina e suas oxidoreduases, levando o ferro obtido na dieta para os tecidos periféricos. Apesar de não haver um consenso a respeito da liberação do ferro pela LF in vivo, aparentemente ocorre somente por meio de degradação/desnaturação da LF ou modificações na estrutura do receptor (Baker e Baker; 2012).

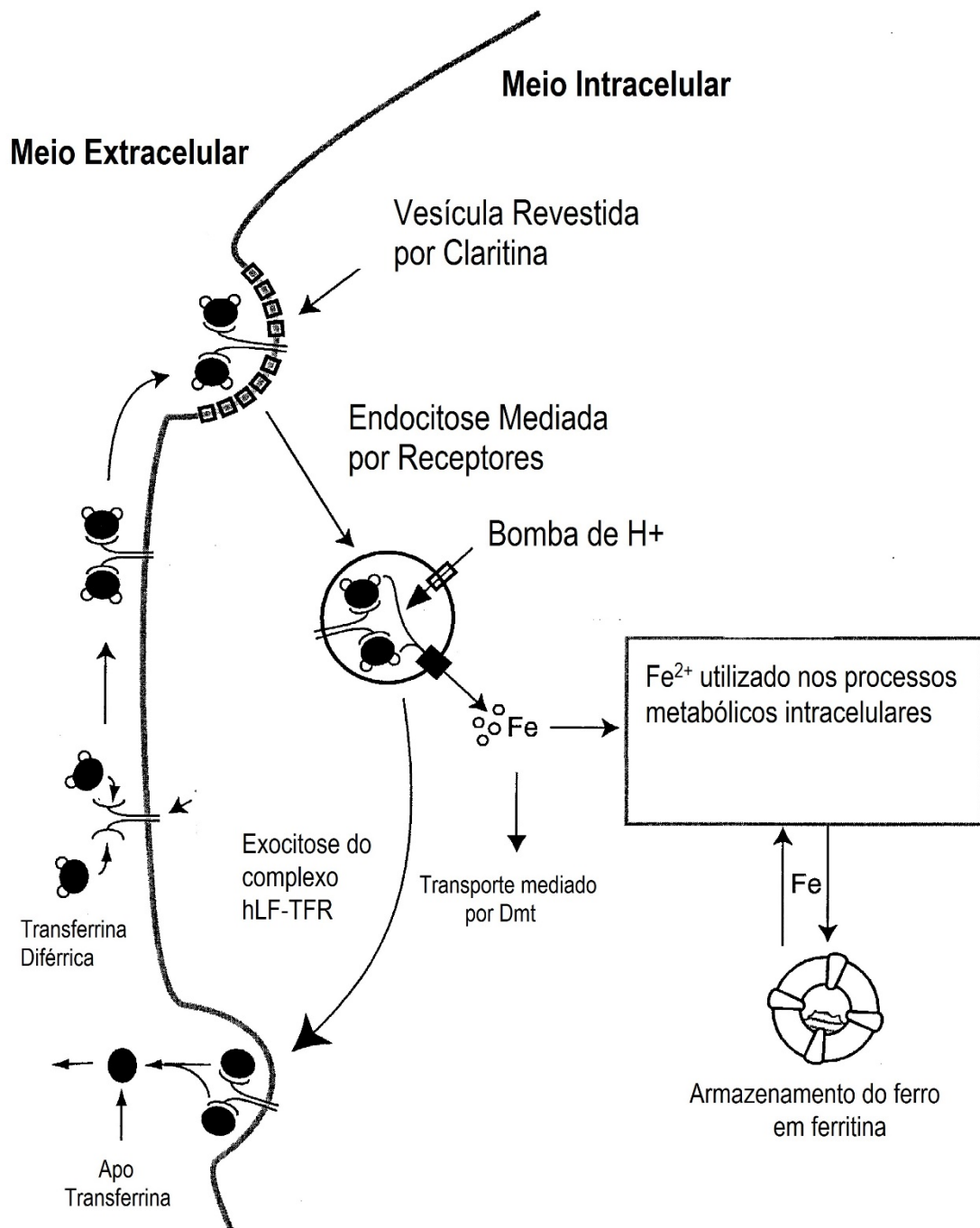


Figura 1 – Adaptado de Richardson e Ponka; 1997: Esquematização da absorção de Fe^{2+} por meio de endocitose mediada por TFR. Complexo hLF-TFR é internalizado em um endossoma e liberado após a diminuição do pH, por meio de uma bomba de H^+ -ATPase. Após a internalização da vesícula e liberação do Fe^{2+} no meio intracelular, o complexo se mantém ligado e é externalizado por meio de exocitose. O Fe^{2+} internalizado pode ser utilizado no metabolismo intracelular ou armazenado em forma de ferritina.

3.2 Clivagem em peptídeos e ação antimicrobiana

Acreditava-se que o potencial antimicrobiano da LF ocorria por meio da quelação do ferro, diminuindo a concentração extracelular disponível para o microrganismo. Apesar da proteína íntegra não possuir atividade antimicrobiana efetiva, os peptídeos derivados da clivagem enzimática, por meio da pepsina estomacal, da Lactoferrina possuem amplo espectro de ação (Bellamy et al.; 1992), provavelmente devido as alterações estruturais que permitem melhor atividade na ligação com membranas bacterianas. Apesar da simplicidade, alguns resíduos e estruturas são essenciais para as atividades específicas destes peptídeos. Um destes peptídeos é a Lactoferricina (LFcin), que é derivada da clivagem da bLF (LFcinB) ou hLF (LFcinH), contendo as regiões 17-41, na LFcinB, ou 1-47 na porção N-terminal da LFcinH, intactas (Metz-Boutigue et al.; 1984, Bellamy et al.; 1992) e, possivelmente, pode ser encontrada naturalmente no trato gastrointestinal (Kuwata et al.; 1998a, Kuwata et al.; 1998b). LFcinH e LFcinB são carregadas positivamente mas possuem grandes divergências em relação as sequências, o que é relacionado a baixa homologia das formas íntegras de hLF e bLF, com apenas 69% de similaridade entre as sequências (Baker et al.; 2000) e também divergem em sua conformação tridimensional.

LFcinH mantém a estrutura da hLF completa e a α -hélice é conservada, mantendo sua capacidade anfipática, apropriada para penetração e uma possível capacidade de translocação do peptídeo por uma membrana lipídica, indicada pela dissolução em um solvente similar as condições de membrana (Hunter et al.; 2005). A retenção da α -hélice na LFcinH pode ser explicada por seu maior tamanho em relação à LFcinB, permitindo uma maior estabilidade da hélice, que se perde na LFcinB, pela maior quantidade de pontes de H (Hunter et al.; 2005, Gifford et al.; 2005). Ou seja, enquanto a LFcinB altera sua conformação para uma estrutura de folha- β em soluções que imitam condições de membrana, LFcinH forma uma estrutura helical, caracterizando uma

capacidade de interação com a célula-alvo menor (revisão por Fernandes e Carter; 2017). Peptídeos derivados da LFCin, com sequências mais curtas, também possuem atividade contra diversos microrganismos (revisão por Gifford et al.; 2005, Vogel; 2012, Bruni et al.; 2016, Ng et al.; 2015, Fernandes e Carter; 2017).

Outro membro da família dos peptídeos é a Lactoferrampina (LFampin), contendo os resíduos 268-284, é encontrada no domínio N1 da porção N-terminal da bLF. Os primeiros 11 aminoácidos da Lactoferrampina Bovina (LFampinB) formam uma estrutura de α -hélice e assim como a LFCinB, é anfipática, em meios similares as micelas das membranas (van der Kraan et al.; 2004, Haney et al; 2007). Entretanto, a Lactoferrampina Humana (LFampinH) derivada da mesma região da hLF, é inativa (Haney et al.; 2009). Há outras variações da LFampinB, com diferentes quantidades de resíduos e com atividades diferentes, como por exemplo LFampin 265-284, contendo 3 resíduos adicionais (Asp-Leu-Ile), com menor atividade, porém, com maior espectro de atuação (van der Kraan et al.; 2006).

3.3 Mecanismo de Ação da Lactoferrina, Lactoferricina e Lactoferrampina

Logo após sua caracterização, era suposto que hLF atuava por meio de sua capacidade de quelar íons metálicos, especialmente Fe^{3+} , os quais são essenciais para a manutenção da atividade celular. Entretanto, após estudos detalhando as suas diferentes regiões, houve a descoberta da atividade dos diferentes lobos (N e C-terminal), que permitem o amplo espectro de atuação da hLF (Yen et al.; 2011). Devido à presença de aminoácidos carregados positivamente no lobo N-terminal, hLF possui predisposição a se ligar com estruturas carregadas negativamente, como ocorre em membranas celulares bacterianas, onde os lipopolissacarídeos (LPS), em bactérias gram-negativas, e ácidos teicoicos e

lipoteicoicos, encontrados em bactérias gram-positivas, são alvos de interação da hLF, por possuírem cargas negativas (Ling e Schryvers; 2006, Yen et al.; 2011). hLF também demonstrou capacidade proteolítica, demonstrada pela diminuição da ação de fatores de virulência de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), devido a degradação de adesinas de superfície (Ochoa et al.; 2006).

As ferricinas liberadas após a clivagem da hLF tem mecanismos de ação similares, geralmente por meio da interação com componentes de membrana, levando ao rompimento e subsequente morte celular. A LFcin é capaz de afetar estruturalmente membranas bacterianas, devido a interação com LPS, removendo-o da estrutura de membranas citoplasmáticas, causando inibição da biossíntese molecular e como resultado ocorre a morte celular (Sinha et al.; 2013). Este modelo de interação celular tem sido vastamente estudado com LFcinB, onde há a despolarização da membrana mas sem lise celular ou vazamento de lipossomas (Ulvatne et al.; 2001). A despolarização de membranas gera o desequilíbrio eletroquímico intracelular, onde há impacto direto no metabolismo do microrganismo (Gifford et al.; 2005).

O mecanismo de ação da LFampinB se baseia na permeabilização da membrana, que ocorre em um mecanismo similar a um detergente, ou seja, causa a diminuição da tensão superficial da membrana celular bacteriana, efeito o qual faz com a bicamada lipídica se desestabilize formando vesículas. A célula mantém a sua forma devido à presença da parede celular a qual “segura” os componentes (Kraan et al.; 2005).

4. AMPS E IMUNOMODULAÇÃO

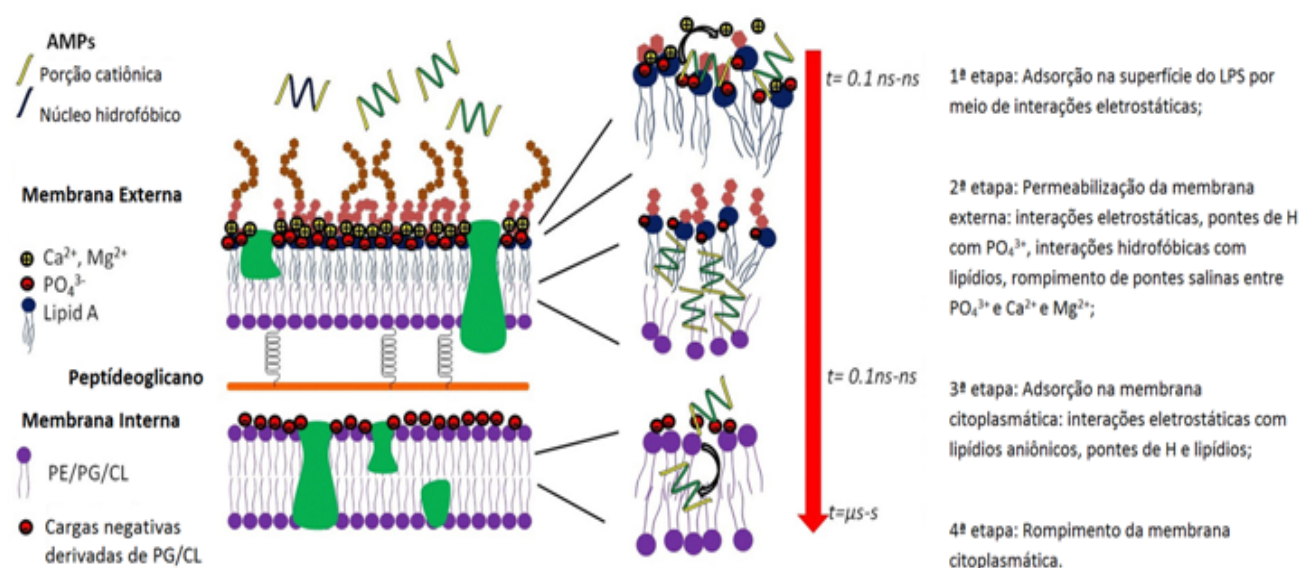
Substâncias, biológicas ou sintéticas, que são capazes de modular a intensidade da resposta imune de um organismo, são denominadas imunomodulatórias (Ahmad et al.;

2010). AMPs possuem capacidade imunomodulatória contra uma grande variedade de invasores, atuando maneiras diferentes. LL-37 é capaz de induzir a migração de células fagocíticas, como monócitos e neutrófilos, linfócitos e queratinócitos, em lesões teciduais, participando diretamente na capacidade regenerativa tecidual e na proteção contra microrganismos. Também estimula a diferenciação de células dendríticas (Davidson et al.; 2004, Yang et al. 2000, Carretero et al.; 2008). Também participa na liberação de citocinas e quimiocinas por meio de diversas vias de sinalização, como por exemplo, a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Pistollic et al.; 2009). HNP-1 induz a atração de diversas células que compõe o sistema imune como monócitos, células dendríticas, linfócitos T CD4+ e CD8+ (Martin et al.; 2015).

Lactoferrina por sua vez interage com monócitos e neutrófilos, estimulando a migração para o local da infecção, pode ativar células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas e células fagocíticas e pode aumentar a intensidade da resposta imune gerada por meio de linfócitos T (de La Rosa et al.; 2008). LF também atua em linfócitos B, os quais devido a seu potencial apresentador de antígenos, gera o aumento do nível de anticorpos na resposta imune humoral adaptativa (Siqueiros-cendón et al.; 2014). LF modula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, por meio da via NF- κ B (Haversen et al.; 2002)

Os peptídeos derivados da lactoferrina também possuem atividade imunomodulatória. bLFCin e hLFCin podem induzir um aumento na liberação de interleucina-8 (IL-8) derivada de neutrófilos (Shinoda et al.; 1996).

5. ANEXOS



• Figura 2: Esquematização do mecanismo de ação de AMPs em bactérias gram-negativas. A interação com as estruturas da parede celular bacteriana ocorre em etapas, de maneira rápida e em sentido externo-interno. As interações eletrostáticas são essenciais durante este processo, onde os peptídeos carregados positivamente se ligam ao LPS ou em sua cauda lipídica, os quais são carregados negativamente, ou seja, um ânion encontrado na superfície do microrganismo. Conforme o avanço da ação do peptídeo, as alterações estruturais não são somente superficiais, mas já se encontram no periplasma, podendo levar a subsequente morte celular por meio de diversos mecanismos, entre eles a lise de membrana citoplasmática. (Adaptado de Li et al.; 2017).

6. LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMP: péptidos antimicrobianos (antimicrobial peptides); LPS: Lipopolissacarídeos;

ns: nanosegundos

7. DISCUSSÃO

O trabalho buscou analisar a literatura referente a peptídeos, em bancos de dados específicos para artigos acadêmicos como NCBI (PubMed) (ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) e SciELO (<http://www.scielo.org/php/index.php>).

A busca por novas opções de tratamento de infecções contra agentes infecciosos resistentes as diversas drogas disponíveis no mercado, encontra nos peptídeos catiônicos uma opção de grande potencial. Devido a sua eficiência contra estes tipos de infecções e o amplo espectro de atuação (ver tabela 1), além da premissa de menor chance de aparecimento de resistência, partindo do princípio de que mesmo após milhões de anos, estes agentes antimicrobianos ainda sejam efetivos. A provável hipótese baseia-se na estrutura celular microbiana, onde são poucas as espécies que possuem mecanismos de defesa contra esta classe de agentes microbianos. Como o alvo de atuação dos peptídeos é a membrana celular, alterações estruturais poderiam ser inviáveis para a manutenção da vida do microrganismo.

Até o momento, o resultado do uso de AMPs em testes *in vivo* foi insatisfatório, devido a fatores como citotoxicidade, hemólise, e possível proteólise dos AMPs nos modelos utilizados (Yount e Yeaman.; 2012, Vaara; 2009). Alterações estruturais na sequência peptídica podem aumentar a estabilidade de peptídeos compostos somente por aminoácidos naturais, evitando degradação e diminuindo a toxicidade, entretanto, a inserção de novos aminoácidos na sequência pode causar diminuição de sua efetividade antimicrobiana, apesar de não ser significativa em testes preliminares (Berthold et al., 2013, Carmona et al., 2013). Alguns peptídeos já são incorporados a produtos farmacêuticos como pomadas tópicas, contraceptivos (Tanphaichitr et al.; 2016) entre outros (ver tabela 2), mas o uso ainda é predominante tópico ou endovenoso, devido a

possível falta de estabilidade da molécula no organismo, para duração de um efeito de meia-vida.

Alternativas, como o desenvolvimento de substâncias miméticas de AMPs, podem dar uma resposta as questões envolvendo a possibilidade do uso clínico, pois possuem maior estabilidade e melhor farmacocinética quando comparado aos AMPs naturais ou derivados.

- Tabela 1

AMPs em ensaios clínicos ou em desenvolvimento:

AMPs	Atuação	Fase de Estudo	Desenvolvedor
Pexiganan (MSI-78): Análogo da magainina	Pomada para úlceras e infecções em membros inferiores de diabéticos.	III	Dipexium Pharma /MacroChem/Genaera
Iseganan (IB-367): Derivado da protegrina 1.	Colutório contra mucosites causadas por quimioterapia e pneumonia em pacientes com respiração mecânica.	III	Ardea Biosciences/national Cancer Institute e IntraBiotics Pharmaceuticals
PAC-113 (P-113): Derivado sintético de histatina 3 e histatina 5.	Gel oral contra candidíase	Não informado	Pacgen Biopharmaceuticals
Omiganan (MBI 226, MX-226, CSL-001): Análogo da indolicidina.	Creme tópico contra infecções cutâneas, neoplasia vulvar intraepitelial, acne vulgaris, dermatite atópica	III	Mallinckrodt/Cutanea Life Sciences, Inc. e Cutanea Life Sciences, Inc
OP-145: Derivado de LL-37.	Tratamento contra infecção crônica do ouvido médio.	II	OctoPlus
LF1-11: Derivado da lactoferrina.	Prevenção de bacteremia e infecções fúngicas.	I/II	AM Pharma.
Brilacidin, (PMX-30063): Mimético de defensinas	Infecções cutâneas e enxaguante bucal contra mucosites causadas por quimioterapia ou radioterapia.	II/III	Cellceutix.
Surotomycin (MK-4261)	Aplicação IV contra infecções causadas por <i>Clostridium difficile</i>	III	University of British Columbia, Cubist Pharmaceuticals Inc., Merck & Co. Inc.
Telavancin® (TD-6424)	Aplicação IV contra osteomielite ou infecções bacterianas diversas	III	Clinigen Group plc, Inoviva Inc., , Pendopharm, Theravance Biopharma Inc., University of Illinois
hLF 1-11	Aplicação IV em pacientes imunodeficientes após transfusão de células tronco hematopoiéticas após infecções causadas por fungos e bactérias	I/II	Am-Pharma

LL-37	Úlceras venosas de difícil cicatrização em membros inferiores	I/II	Não Disponível
-------	---	------	----------------

Adaptado de Malik et al.; 2016, Felício et al. 2017 e e Mahlapuu et al. 2016.

8. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

- Peptídeos catiônicos possuem um amplo espectro de ação, com diversos mecanismos para gerar morte a célula invasora;
- Possuem atividade contra cepas com multirresistencia aos antimicrobianos atualmente empregados no tratamento clínicos de infecções;
- Apesar de potentes agentes antimicrobianos, são potencialmente citotóxicos, instáveis em condições fisiológicas e hemolisantes. Entretanto, a manipulação estrutural pode ser uma alternativa;
- Já começam a serem aplicados em estudos clínicos, em especial em soluções tópicas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGERBERTH B, GUNNE H, ODEBERG J, KOGNER P, BOMAN HG, GUDMUNDSSON GH. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92, 195-199. 1995
2. AHMAD I, OWAIS M, SHAHID M, AQIL F. Combating Fungal Infections. **In: Problems and remedy**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 397–422. 2010
3. AHMAD I, PERKINS WR, LUPAN DM, SELSTED ME, and JANOFF AS. Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with in vivo antifungal activity. **Biochim. Biophys. Acta**. 1237:109-114. 1995
4. AISEN P, ENNS C, WESSLING-RESNICK M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. **Int J Biochem Cell Biol** 33:940–959. 2001
5. AISEN P, LEIBMAN A. Lactoferrin and transferrin: a comparative study. **Biochim. Biophys. Acta**, 257(2): 314–323. 1972
6. AISEN P, SARKAR B. Interactions of transferrin with cells. **Biological Aspects of Metals and Metal-Related Diseases** (Raven, New York), pp 67–80. 1983
7. ALEY, SB., ZIMMERMAN, M., HETSKO, M., SELSTED, ME., and GILLIN, F. D. Killing of *Giardia lamblia* by Cryptdins and Cationic Neutrophil Peptides. **Infect. Immun.** 62, 5397–5403. 1994
8. AMMENDOLIA MG, AGAMENNONE M, PIETRANTONI A, LANNUTTI F, SICILIANO RA, DE GIULIO B, AMICI C, SUPERTI F. “Bovine lactoferrin-derived

peptides as novel broad-spectrum inhibitors of influenza virus,” **Pathogens and Global Health**, 106, 1, 12–19, 2012

9. ANDERSON BF, BAKER HM, NORRIS GE, RUMBALL SV, BAKER EN. Apolactoferrin structure demonstrates ligand-induced conformational change in transferrins. **Nature** (London), 344, 784±787. 1990

10. ASHBY B, GARRETT Q, WILLCOX M. “Bovine lactoferrin structures promoting corneal epithelial wound healing in vitro,” **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, 52, 5, 2719–2726, 2011.

11. BAILEY S, EVANS RW, GARRATT RC, GORINSKY B, HASNAIN S, HORSBURGH C, JHOTI H, LINDLEY PF, MYDIN A, SAR RA R. WATSON JL. Molecular structure of serum transferrin at 3.3-Å resolution. **Biochemistry**, 27, 5804±5812. 1988

12. BAKER EN, BAKER HM. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. **Cell Mol Life Sci**;62:2531–9. 2005

13. BAKER EN. Structure and reactivity of transferrins. Adv. **Inorg. Chem.** 41: 389–463. 1994

14. BAKER HM, ANDERSON BF, KIDD RD, SHEWRY SC, BAKER EN. Lactoferrin three-dimensional structure: a framework for interpreting function. In: Lactoferrin: Structure, Function and Applications, 3–15. **Elsevier Science**, New York. 2000

15. BAKER HM, BAKER EN. A structural perspective on lactoferrin function. **Biochem. Cell Biol.** 90: 320–328. 2012

16. BELLAMY W, TAKASE M, YAMAUCHI K, WAKABAYASHI H, KAWASE K, TOMITA M. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. **Biochim. Biophys. Acta**, 1121(1–2): 130–136. 1992
17. BERTHOLD N, CZIHAL P, FRITSCH S, SAUER U, SCHIFFER G, KNAPPE D, ALBER G, HOFFMANN R. Novel apidaecin 1b analogs with superior serum stabilities for treatment of infections by gram-negative pathogens. **Antimicrob Agents Chemother.** ;57(1):402-9. 2013
18. BOWAN HG: Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annu Rev Immunol**, 13:61–92. 1995
19. BRAFF MH, BARDAN A, NIZET V, GALLO RL. Cutaneous Defense Mechanisms by Antimicrobial Peptides. **J Invest Dermatol** 125:9 –13, 2005
20. BRUNI N, CAPUCCHIO MT, BIASIBETTI E, PESSIONE E, CIRINCIONE S, GIRAUDO L, CORONA A, DOSIO F. Antimicrobial Activity of Lactoferrin-Related Peptides and Applications in Human and Veterinary Medicine. **Molecules**: 21, 752;. 2016
21. CARMONA G, RODRIGUEZ A, JUAREZ D, CORZO G, VILLEGAS E. Improved protease stability of the antimicrobial peptide Pin2 substituted with D-amino acids. **Protein J**. Aug;32(6):456-66. 2013
22. CARRETERO M, ESCÁMEZ MJ, GARCÍA M, DUARTE B, HOLGUÍN A, RETAMOSA L, JORCANO JL, RÍO MD, LARCHER F. In vitro and in vivo wound healing-promoting activities of human cathelicidin LL-37. **J Invest Dermatol.** ;128(1):223-36. 2008

23. COLE AM, HONG T, BOO LM, NGUYEN T, ZHAO C, BRISTOL G, ZACK JA, WARING AJ, YANG OO, LEHRER RI. Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99, 1813–1818. 2002.
24. CONESA C, SANCHEZL, ROTA C, PEREZ MD, CALVO M, FARNAUD S, EVANS RW. 2008. Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** 150:131–139
25. COWLAND JB, JOHNSEN AH, BORREGAARD N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. **FEBS Letters** 368. 173-176. 1995
26. DAVIDSON DJ, CURRIE AJ, REID GS, BOWDISH DM, MACDONALD KL, MA RC, HANCOCK RE, SPEERT DP. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. **J Immunol.** 15;172(2):1146-56. 2004
27. de la ROSA G, YANG D, TEWARY P, VARADHACHARY A, OPPENHEIM JJ. Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. **J Immunol.** May 15;180(10):6868-76. 2008
28. de LEEUW E, LI C, ZENG P, LI C, DIEPEVEEN-DE BUIN M, LU WY, BREUKINK E, LU W. Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II. **FEBS Lett.** 16;584(8):1543-8. 2010
29. DE Y, Q CHEN A P SCHMIDT, GM. ANDERSON, JM WANG J. WOOTERS, J J. OPPENHEIM, AND O. CHERTOV. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor

to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. **J. Exp. Med.** 192:1069. 2000

30. DE YANG, CHEN Q, SCHMIDT AP, ANDERSON GM, WANG JM, WOOTERS J, OPPENHEIM JJ, CHERTOV O. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells.. **J Exp Med.** 2;192(7):1069-74.2000

31. DEWAN JC, MIKAMI B, HIROSE M, SACCHETTINI JC. Structural evidence for a pH-sensitive dilysine trigger in the hen ovotransferrin N-lobe: implications for transferrin iron release. **Biochemistry.** 32:11963–11968. 1993

32. DI NARDO A, VITIELLO A, GALLO RL: Cutting edge: Mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. **J Immunol** 170:2274–2278, 2003

33. DIAMOND G, ZASLOFF M, ECKH, BRASSEUR M, MALOY WL, BEVINS CL. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: Peptide isolation and cloning of a cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88, 3952–3956. 1991.

34. DIAMOND G. and BEVINS C.L. Endotoxin upregulates expression of an antimicrobial peptide gene in mammalian airway epithelial cells. **Chest** 105, 51S–52S. 1994.

35. DONG H, LY Y, ZHAO D, BARROW P, ZHOU X. Defensins: The Case for Their Use against Mycobacterial Infections. **J Immunol Res.** 2016; 2016:7515687. Epub 20. 2016

36. DORSCHNER RA, PESTONJAMASP VK, TAMAKUWALA S, OHTAKE T, RUDISILL J, NIZET V, AGERBERTH B, GUDMUNDSSON GH, GALLO RL. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin antimicrobial peptides active against group A Streptococcus. **J Invest Dermatol**; 117: 91-7. 2001
37. EBBENSGAARD A, MORDHORST H, OVERGAARD MT, NIELSEN CG, AARESTRUP FM, HANSEN EB Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides against a Range of Pathogenic Bacteria. **PLoS ONE** 10(12): e0144611. 2015
38. ECKENROTH BE, STEERE AN, CHASTEEN ND, EVERSE SJ, MASON AB. How the binding of human transferrin primes the transferrin receptor potentiating iron release at endosomal pH. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 108(32): 13089–13094. 2011
39. FALLA TJ, HANCOCK REW. Improved activity of a synthetic indolicidin analog. **Antimicrob Agents Chemother** 41:771–775. 1997
40. FALLA TJ, KARUNARATNE DN, HANCOCK REW. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. **J. Biol. Chem.**, 271, 19298–19303. 1996
41. FELÍCIO MR, SILVA ON, GONÇALVES S, SANTOS NC, FRANCO OL. Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. **Front. Chem.** 5:5. 2017.
42. FERNANDES KE, CARTER DA. The Antifungal Activity of Lactoferrin and Its Derived Peptides: Mechanisms of Action and Synergy with Drugs against Fungal Pathogens. **Front. Microbiol.** 8:2. 2017
43. FLEMING MD, ROMANO MA, SU MA, GARRICK LM, GARRICK MD, ANDREWS NC. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. **Proc Natl Acad Sci U S A**;95:1148–53. 1998

44. FLEMING MD, TRENOR CC 3rd, SU MA, FOERNZLER D, BEIER DR, DIETRICH WF, ANDREWS NC. Microcytic anemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. **Nat Genet**;16:383–386. 1997
45. FRAZER DM, ANDERSON GJ. The regulation of iron transport. **Biofactors**. - ;40(2):206-14. 2014
46. FROHM M, AGERBERTH B, AHANGARI G, STAHL-BACKDHAL M, LIDEN S, WIGZELL H, GUDMUNDSSON GH: The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. **J Biol Chem**, 272:15258–15263. 1997
47. GANZ T, LIU L, VALORE EV, OREN A. Posttranslational processing and targeting of transgenic human defensin in murine granulocyte, macrophage, fibroblast, and pituitary adenoma cell lines. **Blood**; 82:641–650. 1993
48. GANZ T, SELSTED ME, SZKLAREK D, HARWIG SS, DAHER K, BAINTON DF, LEHRER RI. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. **J Clin Invest**. 76:1427–35. 1985
49. GARCÍA JR, KRAUSE A, SCHULZ S, RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ FJ, KLUVER E, ADERMANN K, FORSSMANN U, FRIMPONG-BOATENG A, BALS R, FORSSMANN WG. Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific saltsensitive spectrum of antimicrobial activity. **FASEB J**. 15, 1819–1821. 2001.
50. GENNARO R, ZANETTI M. Structural Features and Biological Activities of the Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptides. **Biopoly** 55: 31–49. 2000
51. GHOSH A. KAR RK, JANA J, SAHA A, JANA B, KRISHNAMOORTHY J, KUMAR D, GHOSH S, CHATTERJEE S, BHUNIA A. Indolicidin Targets Duplex

DNA: Structural and Mechanistic Insight through a Combination of Spectroscopy and Microscopy. **ChemMedChem** 9, 2052 – 2058. 2014

52. GIFFORD JL, HUNTER HN, VOGEL HJ. Lactoferricin: a lactoferrin derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumour, and immunological properties. **Cell. Mol. Life Sci.** 62, 2588–2598. 2005

53. GIFFORD JL, ISHIDA H, VOGEL HJ. Structural characterization of the interaction of human lactoferrin with calmodulin. **PloS One** 7: e51026, 2012

54. GUDMUNDSSON GH, AGERBERTH B, ODEBERG J, BERGMAN T, OLSSON B, SALCEDO R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. **Eur. J. Biochem.** 238, 325-332. 1996

55. GUNSHIN H, MACKENZIE B, BERGER UV, GUNSHIN Y, ROMERO MF, BORON WF, NUSSBERGER S, GOLLAN JL, HEDIGER MA.. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature**;388:482–488. 1997

56. HANEY EF, LAU F, VOGEL HJ. Solution structures and model membrane interactions of lactoferrampin, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. **Biochim. Biophys. Acta**, 1768(10): 2355–2364. 2007.

57. HANEY EF, NAZMI K, LAU F, BOLSCHER JG, VOGEL HJ. 2009. Novel lactoferrampin antimicrobial peptides derived from human lactoferrin. **Biochimie**, 91(1): 141–154. 2009.

58. HARIDAS M, ANDERSON BF, BAKER HM, NORRIS GE, BAKER EN. "X-ray structural analysis of bovine lactoferrin at 2.5 Å resolution," ° **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 357, 235–238, 1994
59. HÅVERSEN L, OHLSSON BG, HAHN-ZORIC M, HANSON LA, MATTSBY-BALTZER I. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF-kappa B. **Cell Immunol.** Dec;220(2):83-95. 2002
60. HUNTER HN, DEMCOE AR, JENSSEN H, GUTTERBERG TJ, Vogel HJ. Human lactoferricin is partially folded in aqueous solution and is better stabilized in membrane mimetic solvent. **Antimicrob. Agents Chemother** 49: 3387–3895. 2005
61. HWANG PM, ZHOU N, SHAN X, ARROWSMITH CH, VOGEL HJ. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. **Biochemistry** 37: 4288–4298. 1998
62. JEFFREY PD, BEWLEYMC, MACGILLIVRAY RT, MASON AB, WOOWORTH RC, BAKER EN. Ligand-induced conformational change in transferrins: crystal structure of the open form of the N-terminal half-molecule of human transferrin. **Biochemistry.** 37:13978–13986. 1998
63. JINDAL HM, LE CF, MOHD YUSOF MY, VELAYUTHAN RD, LEE VS, ZAIN SM, MOHD DI, SEKARAM SD. Antimicrobial Activity of Novel Synthetic Peptides Derived from Indolicidin and Ranalexin against *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS ONE** 10(6): e0128532. 2015
64. JOHANSSON J, GUDMUNDSSON GH, ROTTENBERG ME, BERNDT KD, AGERBERTH B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. **J Biol Chem.** 273(6):3718–24. 1998

65. JONES DE, BEVINS CL, “Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel,” **FEBS Letters**, 315: 2, 187–192, 1993.
66. KAGAN BL, GANZ T, LEHRER RI. Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. **Toxicology**. 87:131–49. 1994
67. KARTHIKEYAN S, PARAMASIVAM M, YADAV S, A. SRINIVASAN A, SINGH TP. “Structure of buffalo lactoferrin at 2.5 Å resolution ° using crystals grown at 303 K shows different orientations of the N and C lobes,” **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, 55: 11, 1805–1813, 1999.
68. KARTHIKEYAN S, YADAV S, PARAMASIVAM M, SRINIVASAN A, SINGH TP. “Structure of buffalo lactoferrin at 3.3 Å° resolution at 277 K,” **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, 56:6,. 684–689, 2000
69. KHAN JA, KUMAR P, PARAMASIVAM M, YADAV RS, SAHANI MS, SHARMA S, SRINIVASAN A, SINGH TP. “Camel lactoferrin, a transferrin-cum-lactoferrin: crystal structure of camel apolactoferrin at 2.6 Å resolution and structural basis of its dual ° role,” **Journal of Molecular Biology**, 309, 3, 751–761, 2001.
70. KOCZULLA R, von DEGENFIELD G, KUPATT C, KROTZ F, ZAHLE S, GLOE T, ISSBRUCKER K, UNTERBERGER P, ZAIU M, LEBHERZ C, KARL A, RAAKE P, PFOSSER A, BOEKSTEGERS P, WELSCH U, HIEMSTRA PS., VOGELMEIER C, GALLO RL, CLAUS M, BALS R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. **J Clin Invest**; 111: 1665-72. 2003

71. KUMAR S, SHARMA AK, SINGH TP. Metal substitution in lactoferrins: the crystal structure of manganese lactoferrin at 3.4Å resolution. **Ind. J. Phys.** 74: 143–146. 2000
72. KUROKAWA H, MIKAMI B HIROSE M. Crystal structure of diferric hen ovotransferrin at 2.4 Å resolution. **J. Mol. Biol.** 254, 196±207. 1995
73. KUWATA H, YIP TT, TOMITA M, HUTCHENS TW. Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. **Biochim. Biophys. Acta**, 1429(1): 129–141. 1998a
74. KUWATA H, YIP TT, YIP CL, TOMITA M, HUTCHENS TW. Direct detection and quantitative determination of bovine lactoferricin and lactoferrin fragments in human gastric contents by affinity mass spectrometry. **Adv. Exp. Med. Biol.** 443: 23–32. 1998b
75. LARRICK JW, HIRATA M, BALINT RF, LEE J, ZHONG J, WRIGHT SC. Human CAP18: a Novel Antimicrobial Lipopolysaccharide-Binding Protein. **Infection and Immunity**, ., p. 1291–1297. 1995
76. LEGRAND D, PIERCE A, ELASS E, CARPENTIER M, MARILLER C, MAZURIER J. Lactoferrin structure and functions. **Adv Exp Med Biol**;606:163–94. 2008
77. LEHRER RI, LICHTENSTEIN AK, GANZ T. Defensins: Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. **Annu Rev Immunol** 11:105–128. 1993
78. LEHRER RI, LU W. α-Defensins in human innate immunity. **Immunol Rev** 245(1): 84–112. 2012

79. LI J, KOH J-J, LIU S, LAKSHMINARAYANAN R, VERMA CS, BEUERMAN RW. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. **Front. Neurosci.** 11:73. 2017
80. LING JM, SCHRYVERS AB. Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria. **Biochem Cell Biol.** ; 84(3):275-81. 2006
81. MALIK E, DENNISON SR, HARRIS F, PHEONIX DA. pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. **Pharmaceuticals (Basel).** 1;9(4). 2016
82. MARTIN L, van MEEGERN A, DOEMMING S, SCHUERHOLZ T. Antimicrobial peptides in human sepsis. **Front. Immunol.** 6:404. 2015
83. MATSUZAKI K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta—Biomembranes.** Elsevier B.V.; p. 1687–92. 2009
84. MAZURIER J e SPIK G.. Comparative study of the ironbinding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. **Biochim. Biophys. Acta**, 629(2): 399–408. 1980
85. METZ-BOUTIGUE MH, JOLLES J, MAZURIER J, SCHOENTGEN F, LEGRAND D, SPIK G, MONTREUIL J, JOLLÈS P. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. **Eur. J. Biochem.** 145(3): 659–676. 1984
86. MIR R, KUMAR RP, SINGH N, VIKRAM GP, SINHA M, BHUSAN A, KAUR P, SRINIVASAN A, SHARMA S, SINGH TP. “Specific interactions of Cterminal half (C-lobe) of lactoferrin protein with edible sugars: binding and structural

studies with implications on diabetes,” **International Journal of Biological Macromolecules**, 47, 1, 50–59, 2010.

87. MIR R, SINGH N, VIKRAM G. SINHA M, BHUSAN A, KAUR P, SRINIVASAN A, SHARMA S, SINGH TP. “The structural basis for the prevention of nonsteroidal antiinflammatory drug-induced gastrointestinal tract damage by the C-lobe of bovine colostrum lactoferrin,” **Biophysical Journal**, 97, 12, 3178–3186, 2009.

88. MOORE SA, ANDERSON BF, GROOM CR, HARIDAS M, BAKER EN. “Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution,” **Journal of Molecular Biology**, 274, 2, 222–236, 1997.

89. Ng TB, RANDY CFC, CHEUNG RC, WONGJH, WANGY, Ip DT, WAN DC, XIA J. Antiviral activities of whey proteins. **Appl Microbiol Biotechnol.** ; 99 (17): 6997-7008. 2015

90. NGUYEN TX, COLE AM & LEHRER RI. Evolution of primate θ -defensins: a serpentine path to a sweet tooth. **Peptides** 24, 1647–1654 2003.

91. OCHOA TJ, BROWN EL, GUION CE, CHENJZ, MCMAHON RJ, CLEARY TG. Effect of lactoferrin on Enterotoxigenic E. coli (EAEC). **Biochem Cell Biol.** ; 84(3):369-76. 2006

92. PAZGIER M, HOOVER DM, YANG D, LU W, LUBKOWSKI J. Human beta-defensins. **Cell Mol Life Sci.** 63:1294–313. 2006

93. PAZGIER M, LI X, LU W, LUBKOWSKI J. Human defensins: synthesis and structural properties. **Curr Pharm Des.**; 13:3096–118. 2007

94. PETERSON NA, ARCUS VL, ANDERSON BF, TWEEDIE JW, JAMESON GB, BAKER EN. Dilysine trigger in transferrins probed by mutagenesis of lactoferrin: crystal structures of the R210G, R210E, and R210L mutants of human lactoferrin. **Biochemistry**, 41(48): 14167–14175. 2002
95. PISTOLIC J, COSSEAU C, LI Y, YU JJ, FILEWOD NC, GELLATLY S, REHAUME LM, BOWDISH DM, HANCOCK RE. Host defence peptide LL-37 induces IL-6 expression in human bronchial epithelial cells by activation of the NF-kappaB signaling pathway. **J Innate Immun.**;1(3):254-67. 2009
96. PORTER EM, LIU L, OREN A, ANTON PA, GANZ T, “Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules,” **Infection and Immunity**, 65, 6, 2389–2395, 1997.
97. QUERINJEAN P, MASSON PL, HEREMANS JF.. Molecular Weight, Single-Chain Structure and Amino Acid Composition of Human Lactoferrin. **Eur. J. Biochem.** 20, 420-425. 1971
98. RAWAS A, MUIRHEAD H. WILLIAMS J. Structure of diferric duck ovotransferrin at 2.35 Å resolution. **Acta Cryst.** D52, 631±640. 1996
99. RECALCATI S, GAMMELLA E, BURATTI P, CAIRO G. Molecular regulation of cellular iron balance. **IUBMB Life**. 2017 May 7. [Epub ahead of print]
100. REKDAL Ø, HAUG BE, KALAAJI M, HUNTER HN, LINDIN I, ISRAELSSON I, SOLSTAD T, YANG N, BRANDL M, MANTZILAS D, VOGEL HJ. Relative spatial positions of tryptophan and cationic residues in helical membrane-active peptides determine their cytotoxicity. **J Biol Chem.**; 287(1):233–44. 2012

101. RICHARDSON A, DE ANTUENO R, DUNCAN R, HOSKIN DW. Intracellular delivery of bovine lactoferricin's antimicrobial core (RRWQWR) kills T-leukemia cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 388(4): 736–741. 2009
102. RICHARDSON DR, PONKA P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. **Biochim Biophys Acta.** 14;1331(1):1-40. 1997
103. ROBINSON, WE., Jr, McDOUGALL, B., TRAN, D. and SELSTED, ME. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, 63, 94–100. 1998
104. SANCHEZ L, CALVO M, BROCK HB. Biological role of lactoferrin. **Archives of Disease in Childhood**; 67: 657-661. 1992
105. SCHLUESENER HJ, RADERMACHER S, MELMS A, JUNG S. Leukocytic antimicrobial peptides kill autoimmune T cells. **J Neuroimmunol** 47:199–202. 1993
106. SELSTED ME, HARWIG SS, GANZ T, SCHILLING JW, LEHRER RI: Primary structures of three human neutrophil defensins. **J Clin Invest** 76: 1436-1439. 1985
107. SELSTED ME, NOVOTNY MJ, MORRIS WL, TANG Y-Q, SMITH W, CULLOR JS. Indolicidin, a Novel Bactericidal Tridecapeptide Amide from Neutrophils, **J. Biol. Chem.** 267. 4292-4295. 1992
108. SELSTED ME, OUELLETTE AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. **Nat Immunol.**; 6:551–7. 2005

109. SEVCSIK E, PABST G, RICHTER W, DANNER S, AMENITSCH H, LOHNER K. Interaction of LL-37 with model membrane systems of different complexity: influence of the lipidmatrix. **Biophys J.** ;94(12):4688-99. 2008
110. SHANBACHER FL, GOODMAN RE, TALHOUK RS. Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. **J Dairy Sci**;76:3812–31. 1992
111. SHARMA AK, PARAMASIVAM M, SRINIVASAN A, YADAV MP, SINGH TP. “Three-dimensional structure of mare diferric lactoferrin at 2.6Å resolution,” ° **Journal of Molecular Biology**, 289, 2, 303 –317, 1999 (a)
112. SHARMA AK, RAJASHANKAR KR, YADAV MP, and SINGH TP. “Structure of mare apolactoferrin: the N and C lobes are in the closed form,” **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, 55, 6, 1152–1157, 1999 (b)
113. SHINODA I, TAKASE M, FUKUWATARI Y, SHIMAMURA S, KÖLLER M, KÖNIG W. Effects of lactoferrin and lactoferricin on the release of interleukin 8 from human polymorphonuclear leukocytes. **Biosci Biotechnol Biochem.** ;60(3):521-3. 1996
114. SINHA M, KAUSHIK S, KAUR P, SHARMA S, SINGH TP.. Antimicrobial lactoferrin peptides: the hidden players in the protective function of a multifunctional protein. **Int J Pept.** 2013; 390230.
115. SIQUEIROS-CENDÓN T, ARÉVALO-GALLEGOS S, IGLESIAS-FIGUEROA BF, GARCÍA-MONTOYA IA, SALAZAR-MARTÍNEZ J, RASCÓN-CRUZ Q. Immunomodulatory effects of lactoferrin. **Acta Pharmacol Sin.** 2014 May;35(5):557-66

116. SMITH CA, AINSCOUGH EW, BAKER HM, BRODIE AM, BAKER EN. Specific binding of cerium by human lactoferrin stimulates the oxidation of Ce³⁺ to Ce⁴⁺. **J. Am. Chem. Soc.** 116(17): 7889–7890. 1994
117. SMITH CA, ANDERSON BF, BAKER HM, BAKER EN. Metal substitution in the transferrins: the crystal structure of human copper-lactoferrin at 2.1Å resolution. **Biochemistry**, 31(18): 4527–4533. 1992
118. SORENSEN O, ARNLJOTS K, COWLAND JB, BAINTON DF, BORREGAARD N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. **Blood** 90(7): 2796–803. 1997
119. STROM MB, HAUG BE, REKDAL O, SKAR ML, STENSEN W, SVENDSEN JS. Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity. **Biochem. Cell Biol.** 80(1): 65–74. 2002
120. SUBBALAKSHMI C, KRISHNAKUMARI V, NAGARAJ R, SITARAM N. Requirements for antibacterial and hemolytic activities in the bovine neutrophil derived 13-residue peptide indolicidin. **FEBS Letters** 395: 48-52. FEBS 17602. 1996
121. TANG YQ, YUAN J, OSAPAY G, OSAPAY K, TRAN D, MILLER CJ et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. **Science** 286: 498–502. 1999
122. TANPHAICHITR N, SKARAEW N, ALONZI R, KIATTIBURUT W, KONGMANAS K, ZHI R, LI W, BAKER M, WANG G, HICKLING D. Potential Use of Antimicrobial Peptides as Vaginal Spermicides/Microbicides. **Pharmaceuticals (Basel)**. 11;9(1). pii: E13. 2016

123. TROWBRIDGE IS, OMARY MB. Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. **Proc Natl Acad Sci USA** 78:3039–3043. 1981
124. TSAI CW, HSU NY, WANG CH, LU CY, CHANG Y, TSAI HHG, RUAAN RC. Coupling molecular dynamics simulations with experiments for the rational design of indolicidin-analogous antimicrobial peptides. **J Mol Biol** 392:837–854. 2009
125. ULVATNE H, HAUKLAND HH, OLSVIK O, VORLAND LH. Lactoferricin B causes depolarization of the cytoplasmic membrane of Escherichia coli ATCC 25922 and fusion of negatively charged liposomes. **FEBS Lett.** 9;492(1-2):62-5. 2001
126. van der KRAAN MI, van MARLE J, NAZMI K, GROENINK J, van 't HOF W, VEERMAN EC, BOLSCHER JG, NIEUW AMERONGER AV. Ultrastructural effects of antimicrobial peptides from bovine lactoferrin on the membranes of Candida albicans and Escherichia coli. **Peptides** 26 1537–1542. 2005
127. VAN DER KRAAN MIA, GROENINK J, NAZMI K, VEERMAN ECI, BOLSCHER JGM, AMERONGER AVN. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. **Peptides**, 25(2): 177–183. 2004
128. VAN DER KRAAN MIA, VAN DER MADE C, NAZMI K, VAN'T HOF W, GROENINK J, VEERMAN EC, BOLSCHER JG, NIUW AMERONGER AV., “Distinct bactericidal activities of bovine lactoferrin peptides LFampin 268-284 and LFampin 265-284: Asp-Leu-Ile makes a difference,” **Biochemistry and Cell Biology**, 84, 3, 358–362. 2006.
129. van der STRATE BWA, BELIJAARS L, MOLEMA G, HARMSSEN MC, MEIJER DK. Antiviral activities of lactoferrin. **Antiviral Res**;52:225–39. 2001

130. VÉGH AG, KRISZTINA N, BÁLINT Z, KERÉNYI A, RÁKHELI G, VÁRÓ G and SZEGLETES Z. Effect of Antimicrobial Peptide-Amide: Indolicidin on Biological Membranes. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2011
131. VOGEL HJ. Lactoferrin, a bird's eye view. **Biochem. Cell Biol.** 90: 233–244. 2012
132. WANG J, PANTOPOULOS K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochem. J.**; 434:365–381. 2011
133. WANG, G. Human Antimicrobial peptides and proteins **Pharmaceuticals**, 7, 545-594; 2014
134. WANG, G., LI, X. and WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research** 44. 2016.
135. WARD PP, PAZ E, CONNEELY OM. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. **Cell. Mol. Life Sci.** 62(22): 2540–2548. 2005
136. WILDMAN KAH, LEE DK, RAMAMOORTHY, A. Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. **Biochemistry**, 42, 6545–6558. 2003
137. WILLIAMS J, MORETON K. The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin in human serum. **Biochem J** 185:483–488. 1980
138. WILSON SS, WIENS ME, SMITH JG. Antiviral Mechanisms of Human Defensins. **J Mol Biol.** 13; 425(24): 2013
139. YAMAGUCHI Y, NAGASE T, MAKITA R, FUKUHARA S, TOMITA T, TOMINAGA T, KURIHARA H, OUCHI Y. Identification of multiple novel

- epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. **J Immunol**; 169:2516–23. 2002
140. YEN CC, SHEN CJ, HSU WH, CHANG YH, LIN HT, CHEN HL, CHEN CM. Lactoferrin: an iron-binding antimicrobial protein against Escherichia coli infection. **Biometals**. 24:585–594. 2011
141. YOUNT NY, YEAMAN MR. Emerging themes and therapeutic prospects for anti-infective peptides. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 52, 337–360. 2012
142. ZANETTI M, GENNARO R, ROMEO D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. **FEBS Letters** 374. 1-5. 1995
143. ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature** 415 (6870): 389–95. 2002.
144. ZHAO C; WANG I; LEHRER RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. **FEBS Lett.** 1996, 396, 319–322.
145. ZHOU N, TIELEMAN DP, VOGEL HJ. Molecular dynamics simulations of bovine lactoferricin: turning a helix into a sheet. **Biometals** 17: 217–223. 2004
146. ZHU WL, LAN H, PARK Y, YANG S-T, KIM J II, PARK I-S, YOU HJ, LEE JS, PARK YS, KIM Y, HAHM KS, SHIN SY. Effects of Pro—> peptoid residue substitution on cell selectivity and mechanism of antibacterial action of tritrypticin-amide antimicrobial peptide. **Biochemistry**. 45(43): 13007–17. 2006