



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



RICARDO SALAS ROLDAN FILHO

**HEVEÍNAS DA SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*): PROSPECÇÃO *IN SILICO*,
ANÁLISE ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL SOB ESTRESSES
BIÓTICO E ABIÓTICO**

Recife

2022

RICARDO SALAS ROLDAN FILHO

**HEVEÍNAS DA SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*): PROSPECÇÃO *IN SILICO*,
ANÁLISE ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL SOB ESTRESSES
BIÓTICO E ABIÓTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Benko Iseppon
Coorientadoras: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Dra. Lívia Maria Batista Vilela

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Roldan Filho, Ricardo Salas

Heveínas da seringueira (*Hevea brasiliensis*) : prospecção *in silico*, análise estrutural e expressão diferencial sob estresses biótico e abiótico / Ricardo Salas Roldan Filho. - 2022.

91 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon.

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Coorientadora: Dra. Dra. Livia Maria Batista Vilela.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Lectinas. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. Bioinformática. I. Benko-iseppon, Ana Maria (orientadora). II. Paiva, Patrícia Maria Guedes (coorientadora). III. Vilela, Livia Maria Batista (coorientadora). IV. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-100-2022

RICARDO SALAS ROLDAN FILHO

**HEVEÍNAS DA SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis*): PROSPECÇÃO *IN SILICO*,
ANÁLISE ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL SOB ESTRESSES
BIÓTICO E ABIÓTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 22/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Benko Iseppon (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Sergio Crovella (Examinador Externo)

Universidade do Qatar

Dedico este trabalho a Deus e minha família, que foram minhas fontes de força, alegria e esperança.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiro a Deus pela sabedoria, por me guiar e guardar desde o início de minha vida, mas especialmente durante esse difícil período de mestrado durante a pandemia. Também O agradeço por me apresentar pessoas incríveis e especiais que me passaram aprendizados não somente na academia, mas também para a vida. Serei eternamente grato ao Senhor pela minha vida e minhas conquistas!

Ainda em primeiro, agradeço à minha mãe, Graça Macau, pelo seu grande amor por mim, em querer sempre ajudar de alguma forma e por aturar esse “cabeça dura” durante a pandemia. Te amo muito mãe! Saiba que também penso no melhor para a senhora! Ao meu pai, Ricardo Salas, pelo seu amor, pelas conversas e aos conselhos de vida. Saiba que te amo muito! À minha querida irmã, Carmencita Macau, pelo carinho e amizade. Te amo maninha! À minha namorada e melhor amiga, Aimée Albuquerque, pelas palavras animadoras, conselhos sobre como viver e lidar com situações, pela enorme paciência comigo e minhas obrigações, bem como principalmente buscar formas de deixar meus dias mais leves. Agradeço por me fazer enxergar o melhor da vida. Saiba que te amo muito! A todos vocês gratidão!

Agradeço à minha orientadora, Dr^a Ana Maria Benko Iseppon, pela oportunidade de aprendizado e trabalho na área de bioinformática, um campo que ampliou minha visão para muitas possibilidades e aplicações de trabalho. Sou muito grato por confiar em mim, compartilhar seus conhecimentos e me incluir em seus projetos. Saiba que estarei à disposição para o que precisar. O meu muitíssimo obrigado e um grande abraço para a senhora!

À Dr^a Lívia Vilela, por me coorientar, pela grande paciência em me treinar, por compartilhar suas experiências na área e principalmente pela amizade que foi construída desde 2019. Também agradeço muito por tranquilizar todo o meu nervosismo durante o mestrado (sei que foram muitos haha) e pelo incentivo de sempre me lembrar do meu potencial. Aqui também aproveito para agradecer ao Dr. Carlos André, com quem desde a época do estágio na Itália sempre pude contar. Muito obrigado por compartilhar seu conhecimento na área de bioinformática, disposição em ajudar, pela amizade e conselhos (em especial sobre aproveitar os momentos da vida). Um grande abraço ao casal cientista!

À Drª Patrícia Paiva, que conheci desde o início da graduação e para mim a considero como a “rainha das lectinas”. Agradeço por também aceitar o convite de coorientar meu trabalho, pelo apoio, troca de conhecimento e por esclarecer questões sobre essas moléculas. Que a nossa parceria possa gerar ótimos trabalhos no futuro. Um grande abraço para a senhora!

Ao Dr. Antonio Felix (IPA) e Dr. Alexandre Reis pela parceria e disposição em fornecer materiais para os experimentos.

Obrigado a todos membros do LGBV, pelo acolhimento e parceria. Muito obrigado a Drª Ana Christina, Jaysa Araujo, Dr. João Pacífico, Dr. José Ribamar (Neto), Madson, Dr. Rodrigo César, Drª Valesca Pandolfi e Vanessa Cristina que estiveram à disposição para ajudar no que fosse necessário com o trabalho. Um agradecimento especial ao Ayug, Jéssica, Ruana, Vinícius (Vini) e Wilson (Will) por tornarem o ambiente e as atividades mais agradáveis.

Aos meus queridos amigos Amanda, Ana (Banana), Augusto, Bráulio, Éber, Gabriel Araújo, Gabriel Leite, Lucas, Menezes, Renato, Shalom, Stella, Tio Robson, Vanessa, Vinícius e Yasmin pelas ótimas conversas, troca de “memes”, reflexões sobre a vida e futuro, pelos Boardgames, mas principalmente por tornarem a vida mais leve.

Aos meus menores (cachorros), Mochi, Pumba e Tatá, que estiveram literalmente ao meu lado todo o tempo nos trabalhos home office. Me trouxeram momentos de felicidade ao cuidar de vocês.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da UFPE pela aceitação e disposição em esclarecer questões burocráticas. Aos professores das disciplinas que participei pelo conhecimento e por despertar diversas ideias.

À FACEPE pelo financiamento que contribuiu na execução deste trabalho, assim como no meu crescimento durante o mestrado.

Às agências de fomento CAPES e CNPQ que forneceram recursos para compra de materiais utilizados no trabalho, incluindo os peptídeos sintetizados.

A todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho.

Muitíssimo obrigado!

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos são classificados de acordo com a conservação do padrão dos resíduos de cisteína, hidrofobicidade e motivos conservados na estrutura primária, secundária e terciária. Dentre eles, a classe *hevein-like* constitui pequenas lectinas com domínio heveína responsável pela ligação à quitina. Tendo em vista o aumento do número de cepas resistentes aos antibióticos convencionais, o presente estudo buscou prospectar peptídeos do tipo heveína a partir da espécie *Hevea brasiliensis*, inferindo sobre sua estrutura e potencial antimicrobiano. Para isso, foram utilizadas sequências sondas do tipo *hevein-like*, disponíveis em banco de dados, como *templates* para sua mineração *in silico* no genoma de *H. brasiliensis*. As sequências de aminoácidos dos peptídeos *hevein-like* de *H. brasiliensis* (HbHevs) foram caracterizadas, seus modelos teóricos tridimensionais foram gerados por modelagem comparativa, com estabilidade avaliada pela simulação em dinâmica molecular. Em paralelo, foram realizados desenhos racionais de peptídeos de até 20 aminoácidos baseados nas HbHevs. Os modelos teóricos dos peptídeos desenhados foram gerados por modelagem *ab initio*, sendo a seguir submetidas à simulação molecular. Nesse estudo, foram encontrados 11 HbHevs anfífilos de hidrofobicidade entre 28 a 40% (GRAVY -0,96 a -0,23), massa molecular de 3,54 a 4,7 kDa, ponto isoelétrico 4,0 a 7,5 e predominância de carga líquida aniônica. Foi observada uma conservação nas posições dos resíduos de aminoácidos responsáveis pelo sítio de ligação à quitina, como a Ser-19/Ser-12 e Tyr-30/Tyr-23. No entanto, em HbHev11 houveram mutações que alteraram a configuração do sítio de ligação. Os HbHevs 8-11, quando comparados aos demais peptídeos, ausentaram sete aminoácidos na região do primeiro *loop* estrutural. As simulações em dinâmica molecular indicaram estabilidade dos modelos estruturais pelo desvio da raiz quadrática média, além da análise do raio de giro presumir que os HbHevs são compactos e rígidos. Com base nos preditores *in silico*, os peptídeos desenhados apresentaram atividade antimicrobiana e baixa probabilidade de serem tóxicos. Os peptídeos selecionados apresentaram estabilidade na dinâmica molecular, algumas formando estrutura *Beta-hairpin*. Entre os peptídeos sintetizados e testados *in vitro*, o HbHev_PB8 se mostrou ativo contra *Acinetobacter baumannii* (ATCC 13883). Dessa forma, o presente trabalho encontrou peptídeos *hevein-like* em *H. brasiliensis*, incluindo configurações canônicas e outras distintas que promovem uma diversidade no arsenal químico natural. As HbHevs

identificadas poderão servir de base para desenvolvimento de peptídeos bioinspirados de interesse à saúde humana.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos; Bioinformática; Estrutura tridimensional; Simulação em dinâmica molecular.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides are classified according to pattern conservation of cysteine residues, hydrophobicity, and conserved motifs in primary, secondary, and tertiary structure. Among them, the hevein-like class comprise small lectins with the hevein domain responsible for chitin binding. Considering the increase in the number of strains resistant to conventional antibiotics, the present study sought to prospect hevein-like peptides from the species *Hevea brasiliensis*, inferring their structure and antimicrobial potential. For this, probe sequences of hevein-like, available in the database, were used as templates to mine in genome of *H. brasiliensis*. The amino acid sequences of the hevein-like peptides of *H. brasiliensis* (HbHevs) were characterized, their theoretical three-dimensional models were generated by comparative modeling, including the evaluation of structural stability by molecular dynamics simulation. In parallel, rational design of peptides of up to 20 amino acids based on HbHevs were performed. Theoretical models of the designed peptides were generated by ab initio modeling and then submitted to molecular simulation. In this study, 11 amphiphilic HbHevs were found with hydrophobicity between 28 and 40% (GRAVY -0.96 to -0.23), molecular mass of 3.5 to 4.7 kDa, isoelectric point 4.0 to 7.5 and predominance of anionic net charge. Moreover, it was observed conservation in the positions of amino acid residues responsible for the chitin binding site, such as Ser-19/Ser-12 and Tyr-30/Tyr-23. However, HbHev11 had mutations that altered the binding site configuration. HbHevs 8-11, when compared to the other peptides, lacked seven amino acids in the region of the first structural loop. Molecular dynamics simulations indicated stability of structural models by root-mean-square deviation, in addition, HbHevs were assumed to be compact and rigid by radius gyration analysis. Based on in silico predictors, the designed peptides had antimicrobial activity and low probability of toxicity. The selected peptides showed stability in molecular dynamics, some forming a Beta-hairpin structure. Among the peptides synthesized and tested in vitro, HbHev_PB8 was active against *Acinetobacter baumannii* (ATCC 13883). Thus, the present work found hevein-like peptides in *H. brasiliensis*, including canonical and other distinct configurations which provide a diversity in natural chemical arsenal. The identified HbHevs could serve as basis for the development of bioinspired peptides of interest to human health.

Keywords: Antimicrobial peptides; Bioinformatics; Three-dimensional structure; Molecular dynamics simulation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------------|---|
| ABA | -Ácido abscísico |
| ACE2 | - <i>Angiotensin-converting enzyme 2</i> (enzima conversora de angiotensina 2) |
| AMP | - <i>Antimicrobial peptides</i> (peptídeos antimicrobianos) |
| APD | - <i>Antimicrobial peptides database</i> (banco de dados de peptídeos antimicrobianos) |
| CMI | -Concentração mínima inibitória |
| CMF | -Concentração mínima fungicida |
| DABD | -Domínio ação biológica distinta |
| DRC | -Domínio de reconhecimento de carboidratos |
| EUL | -Aglutinina relacionada à <i>Euonymus europaeus</i> |
| GlcNAc | -N-acetilglicosamina |
| GNA | -Aglutinina relacionada à <i>Galanthus nivalis</i> |
| GRPs | - <i>Peptides glycine-rich</i> (peptídeos ricos em glicina) |
| HbHev | -Peptídeo <i>hevein-like</i> de <i>Hevea brasiliensis</i> |
| HD5 | - <i>Human defensin 5</i> (defensina humana 5) |
| IC₅₀ | -Concentração para reduzir a viabilidade celular em 50% |
| LLQs | -Lectinas ligantes à quitina |
| LTPs | - <i>Lipid transfer proteins</i> (proteínas transportadoras de lipídeos) |
| MAPKs | - <i>Mitogen-activated protein kinases</i> (proteína-quinases ativadas por mitógenos) |
| MvRL | -Lectina do rizoma de <i>Microgramma vacciniifolia</i> |
| PAMPs | - <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> (padrão molecular associado aos patógenos) |
| PBMCs | - <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (células mononucleadas do sangue periférico) |
| PgTeL | -Lectina da sarcotesta de <i>Punica granatum</i> |
| PR | -Proteínas relacionadas à patogênese |
| PRRs | - <i>Pattern-recognition receptors</i> (receptores de reconhecimento padrão) |
| RIP | -Proteínas inativadoras de ribossomos |
| RMSD | - <i>Root-mean-square deviation</i> (desvio da raiz quadrática média) |
| RMSF | - <i>Root-mean-square fluctuation</i> (flutuação da raiz quadrática média) |
| ROS | - <i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio) |
| SteLL | -Lectina da folha de <i>Schinus terebinthifolius</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 1.1 | OBJETIVOS..... | 15 |
| 1.1.1 | Geral..... | 15 |
| 1.1.2 | Específicos..... | 15 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 16 |
| 2.1 | INFECÇÕES E BUSCA POR NOVAS ALTERNATIVAS..... | 16 |
| 2.2 | PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) VEGETAIS..... | 17 |
| 2.3 | LECTINAS..... | 19 |
| 2.3.1 | Características e ocorrência..... | 19 |
| 2.3.2 | Classificação de lectinas em vegetais..... | 22 |
| 2.3.3 | Potencial medicinal e biotecnológico..... | 23 |
| 2.3.4 | A merolectina de <i>Hevea brasiliensis</i>..... | 24 |
| 2.4 | PEPTÍDEOS <i>HEVEIN-LIKE</i> | 27 |
| 2.4.1 | Arquitetura e características químicas..... | 27 |
| 2.4.2 | Ocorrência e função..... | 31 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| 3.1 | ARTIGO 1 - Diversidade de peptídeos <i>hevein-like</i> em seringueira (<i>Hevea brasiliensis</i>): Detecção <i>in silico</i> e caracterização estrutural.... | 36 |
| 3.2 | ARTIGO 2 - Peptídeo bioinspirado com atividade antimicrobiana: sequências modificadas de <i>hevein-like</i> de <i>Hevea brasiliensis</i> | 68 |
| 4 | CONCLUSÕES..... | 82 |
| 5 | SÚMULA CURRICULAR..... | 84 |
| | REFERÊNCIAS..... | 85 |

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos foi notado crescente número de casos de doenças causadas por agentes infecciosos. Órgãos como Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, *Center for Disease Control and Prevention*) e a Organização Mundial de Saúde emitem periodicamente alertas, como o último relatório da CDC onde foram listadas cepas patogênicas com diferentes níveis de ameaça, incluindo espécies de *Candida* spp. e bactérias multirresistentes categorizadas como sérias e urgentes (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (U.S.), 2019). O advento da pandemia do coronavírus (SARS-CoV-2) no início de 2020, a ausência de antivirais eficazes comprovados cientificamente e a existência de casos de co-infecções ou infecções secundárias em pacientes hospitalizados pela COVID-19 tornaram ainda maior o uso de antibióticos em terapias, agravando ainda mais a problemática dos microrganismos resistentes (RUSSELL et al., 2021; TEMPERONI; CAIAZZO; BARCHIESI, 2021). Para resolver essa grave questão de saúde são estimuladas pesquisas que visam descobrir e desenvolver moléculas bioativas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (U.S.), 2019; WHO, 2016).

Uma pista importante na busca por fontes de agentes antimicrobianos foi, por exemplo, a prática milenar de utilizar plantas na medicina popular, incluindo o tratamento de infecções. O avanço tecnológico permitiu a identificação desses compostos bioativos e, inclusive, desenvolver moléculas bioinspiradas (AKERELE, 1993; ASCHRAFI et al., 2021; SANTOS-SILVA et al., 2020; SINHA e SHUKLA, 2019). Tendo em vista que plantas são uma fonte relevante de agentes antimicrobianos, regiões onde há uma rica diversidade florística também abrigam uma grande variedade de compostos ativos com amplo potencial medicinal e biotecnológico (BENKO-ISEPPON e CROVELLA, 2010).

No Brasil, país com território de mais de 8.500 milhões de Km², existe uma rica diversidade florística que compõe os seis distintos domínios fitogeográficos. A heterogeneidade de ambientes e condições climáticas no país permitiram a colonização de espécies vegetais com características únicas, como a produção de compostos químicos importantes para a sua sobrevivência e que são explorados pelo ser humano devido às suas propriedades terapêuticas e importância econômica (BENKO-ISEPPON e CROVELLA, 2010). Entre as espécies ocorrentes na Amazônia com importância econômica destaca-se a *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.Juss.)

Müll.Arg., conhecida como “seringueira” e membro da família Euphorbiaceae. Essa planta de porte arbóreo tem sido utilizada como espécie de recobrimento em áreas de restauração (BENINI et al., 2016; CAMPOS FILHO, 2016) e na produção da borracha natural a partir do látex (BOTTIER, 2020; RAMOS et al., 2019b). No entanto, estudos sobre a constituição do látex identificaram compostos relevantes para saúde humana, que incluem quitinases, peptidases, lipases e peptídeos antimicrobianos (AMPs) ligantes à quitina, incluindo a classe das heveínas (ARCHER, 1960; BOTTIER, 2020; RAMOS et al., 2019b; VAN PARIJS et al., 1991).

Os AMPs de origem vegetal são conhecidos em geral pelas suas sequências com carga superficial predominantemente catiônica, tamanho de 10 a 100 aminoácidos e anfifilicidade, permitindo a interação com membranas de patógenos (SANTOS-SILVA et al., 2020; TAM et al., 2015). São encontrados em todos os tecidos, sendo expressos constitutivamente ou pela indução de estresses abióticos ou bióticos (por ex., ataque por herbívoros e fitopatógenos) (SANTOS-SILVA et al., 2020). Entre as classes de AMPs destacam-se as pequenas lectinas ligantes à quitina, conhecidas como peptídeos *hevein-like* em razão da presença do domínio heveína (SANTOS-SILVA et al., 2020). Os peptídeos *hevein-like* são reconhecidos pela sua ação antifúngica, mas pesquisas levantaram potencial aplicação contra bactérias e vírus, especialmente pela presença de regiões catiônicas na sua estrutura e por se ligarem aos resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNAc) de glicoproteínas virais (GAMES et al., 2016; GORDTS et al., 2015; HOFFMANN et al., 2021; SANTOS-SILVA et al., 2020).

A prospecção desses compostos pode ser realizada através de análises *in silico* em bancos dados *ômicos* (genoma, transcriptoma e/ou proteoma), compreendendo um método preliminar às extrações e purificações. Através de ferramentas computacionais, são identificadas sequências de aminoácidos, assim como predições de massa molecular, potencialidade antimicrobiana, porcentagem hidrofóbica, carga líquida, potencial eletroestático e estrutura tridimensional (SANTOS-SILVA et al., 2020).

Tendo em vista o potencial biotecnológico dos peptídeos *hevein-like* em aplicações farmacológicas e na agricultura, o presente trabalho teve como propósito realizar a prospecção *in silico* desses compostos em *H. brasiliensis*, caracterizar suas estruturas primárias e tridimensionais, assim como avaliar o potencial antimicrobiano de peptídeos curtos bioinspirados no domínio heveína.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Prospectar peptídeos do tipo heveína a partir da espécie *Hevea brasiliensis*, inferindo sobre sua estrutura e ação antimicrobiana.

1.1.2 Específicos

- Buscar sequências de peptídeos do tipo heveína em banco de dados de genômica e proteômica de *H. brasiliensis* via mineração *in silico*;
- Identificar, caracterizar domínios e motivos conservados das sequências candidatas através de ferramentas *in silico*;
- Gerar e avaliar modelos tridimensionais teóricos das heveínas candidatas e avaliar a estabilidade dos modelos;
- Desenhar racionalmente pelo menos um peptídeo baseado nas sequências *hevein-like* para posterior síntese química;
- Verificar a estrutura tridimensional e estabilidade do peptídeo modificado;
- Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* do(s) peptídeo(s) sintético(s), testando-o(s) contra patógenos humanos selecionados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 INFECÇÕES E BUSCA POR NOVAS ALTERNATIVAS

Por muito tempo patógenos microscópicos têm sido um problema para a saúde pública, inclusive nas últimas décadas onde foi observado um crescente número de casos de cepas resistentes aos fármacos convencionais (RONČEVIĆ; PUIZINA; TOSSI, 2019). Em resposta, a Organização Mundial de Saúde e o CDC divulgaram uma lista de microrganismos e seus respectivos níveis de ameaça para a saúde pública, estimulando pesquisas e engenharia de novos fármacos, como a prospecção de compostos bioativos naturais e suas drogas bioinspiradas (ASCHRAFI et al., 2021; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (U.S.), 2019; SANTOS-SILVA et al., 2020).

A busca e desenvolvimento de drogas antimicrobianas pode ser baseada nos alvos moleculares dos patógenos. Recentemente, um estudo de Hoffmann et al., (2021) indicou um complexo de glicosilação da proteína *spike* da SARS-Cov-2, incluindo cadeias que terminam com GlcNAc nas subunidades RBD, S1/S2 e HR2, responsáveis pela mediação da fusão do vírus para a célula hospedeira, o que possibilitaria a aplicação de polipeptídeos específicos contra o vírus. Polipeptídeos que apresentam afinidade a monômeros ou polímeros de GlcNAc também são moléculas promissoras contra patógenos fúngicos, ao se associar a parede de quitina e inibir o crescimento celular (WONG et al., 2017). Moléculas com tais propriedades podem aliviar os casos de cepas fúngicas resistentes, como a *Candida auris* que tem sido identificada em pacientes hospitalizados com COVID-19 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (U.S.), 2021; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2020). As membranas celulares de bactérias, por exemplo, podem ser alvos de compostos catiônicos anfifílicos que conseguem romper o envoltório e causar extravasamento de metabólitos importantes (KESSEL; BEN-TAL, 2010; TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000).

Vários estudos têm descoberto compostos naturais com potencial antimicrobiano, incluindo peptídeos e proteínas de origem vegetal. A prospecção desses compostos é realizada através de métodos químicos (e.g. extração e purificação) e computacionais (PAIVA et al., 2010; SANTOS-SILVA et al., 2020). O método *in silico* pode ser executado como uma etapa preliminar, obtendo sequências

depositadas em banco de dados e, então, são realizadas caracterizações e predições de suas estruturas, fornecendo informações importantes para pesquisas seguintes voltadas à extração e purificação dessas moléculas (AMADOR et al., 2021; SANTOS-SILVA et al., 2020).

2.2 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (AMPs) VEGETAIS

As plantas estão expostas continuamente à estresses ambientais por fatores bióticos e abióticos que compreendem, por exemplo, ataque de patógenos e herbívoros, exposição aos raios UV, salinidade do solo e baixa umidade. Visto que os vegetais não possuem habilidade de se deslocar para ambientes menos estressantes, sua sobrevivência consistiu em adaptações morfoanatômicas e seleção de complexas combinações de fitoquímicos (BENKO-ISEPPON & CROVELLA, 2010; CAESAR & CECH, 2019). Entre os vários grupos de moléculas relacionados à defesa, podem ser destacados os peptídeos antimicrobianos (*antimicrobial peptides*, AMPs) e as lectinas.

Os AMPs vegetais são encontrados em qualquer órgão e tecido (sendo mais frequente nas sementes), participando no sistema imune inato e em processos fisiológicos (MANDAL et al., 2009; SANTOS-SILVA et al., 2020; STOTZ; WALLER; WANG, 2013; TANG et al., 2018). São constituídos, de maneira geral, por pequenas moléculas (entre 10 a 100 aminoácidos) de caráter básico, em razão da abundância dos resíduos de arginina, lisina e histidina, resultando em uma carga predominantemente positiva. Apresentam estrutura anfifílica e pontes dissulfeto que contribuem para uma estrutura compacta e resistente à degradação térmica, química e proteolítica (CAMPOS et al., 2018; LIU & ZHANG, 2011; NELSON & COX, 2014; SANTOS-SILVA et al., 2020; TAM et al., 2015).

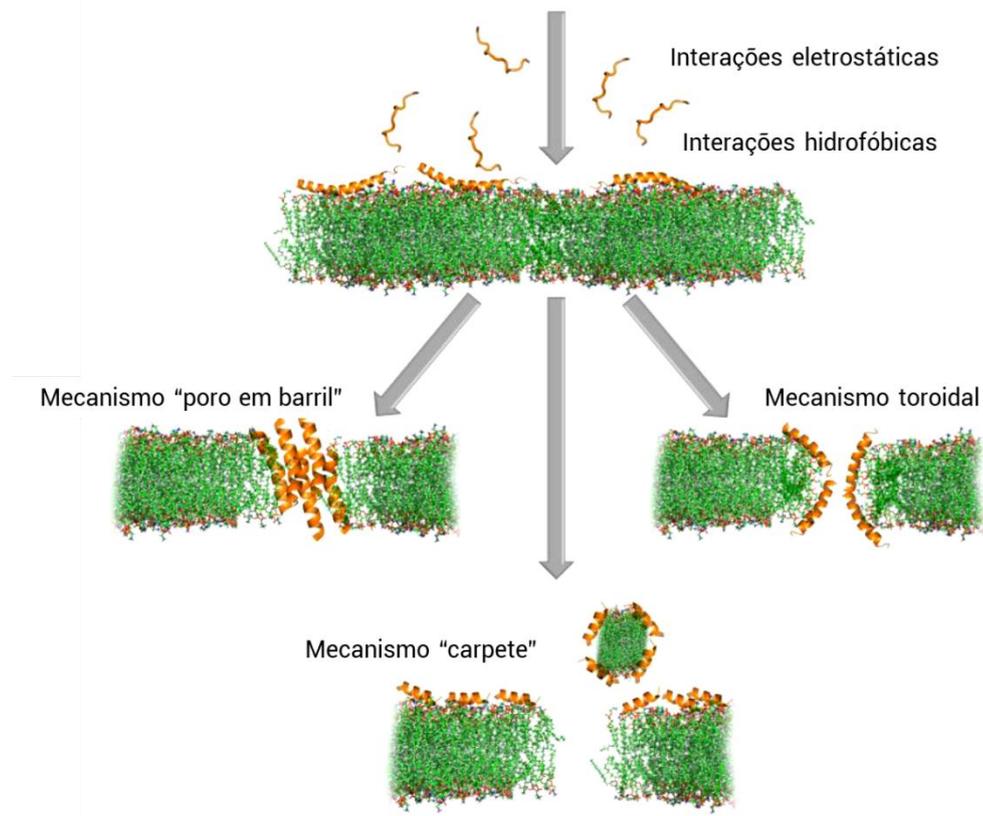
A expressão de AMPs ocorre de forma constitutiva ou em resposta aos estresses, como salinidade, lesões, ataque por herbívoros e patógenos (CAMPOS et al., 2018; STOTZ et al., 2013; TAM et al., 2015). Nesse último caso, a expressão ocorre através do reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMPs), como fragmentos de parede celular, flagelos bacterianos e elementos da superfície celular de fungos, pelos receptores de reconhecimento padrão (*pattern-recognition receptors*, PRRs) transmembranares (CAMPOS et al., 2018; STOTZ et al., 2013). A detecção de PAMPs pelos PRRs levam à uma complexa cadeia de sinais hormonais (e.g ácido jasmônico,

etileno e ácido salicílico) e cascata de proteíno-quinases ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*, MAPKs), os quais promovem a regulação positiva de genes de AMPs (CAMPOS et al., 2018; HERBEL et al., 2017; STOTZ et al., 2013).

Até o momento foram registrados 361 AMPs vegetais no banco de dados de peptídeos antimicrobianos (*Antimicrobial Peptides Database*, APD - <https://aps.unmc.edu/> ; atualizado em 08 de janeiro de 2022). Essas moléculas estão agrupadas de acordo com a similaridade de sequências de aminoácidos, número de resíduos de cisteína, padrão de pontes dissulfeto, peso molecular e estrutura secundária e terciária. As principais famílias de AMPs vegetais são: tioninas, defensinas, proteínas transportadoras de lipídeos (*lipid transfer proteins*, LTPs), peptídeos semelhantes à heveína (peptídeos *hevein-like*), esnaquinas, ciclotídeos, harpininas, peptídeos ricos em glicina (*glycine-rich peptides*, GRPs) e quinotinas (CAMPOS et al., 2018; NAWROT et al., 2014; SANTOS-SILVA et al., 2020; TAM et al., 2015; TANG et al., 2018).

A ação dos AMPs envolve as suas atrações eletrostática, hidrofóbica e afinidade aos elementos da parede/membrana celular, como aos carboidratos (e.g. peptídeos *hevein-like* x parede celular de quitina dos fungos) e fosfolipídeos da membrana celular de patógenos com cabeça hidrofóbica carregada negativamente (ZHANG; GALLO, 2016). Em bactérias, por exemplo, AMPs catiônicos podem interagir com grupos carboxila dos aminoácidos que constituem o peptidoglicano, assim com lipopolissacarídeos (Gram-negativas) e ácidos teicóicos (Gram-positivas) (LI et al., 2017; RONČEVIĆ; PUIZINA; TOSSI, 2019; TORTORA et al., 2005). A permeabilidade dos peptídeos nas membranas, segundo Rončević, Puizina e Tossi (2019), segue uma “paisagem mecanística” que varia com as condições experimentais e variáveis como concentração do peptídeo, pH, temperatura, composição da bicamada lipídica e força iônica. Esses fatores também tornam complexos os mecanismos de lise membranar, mas muitos estudos tentam gerar modelos de forma a simplificar a compreensão, destacando os mecanismos “poro em barril”, poro toroidal e formação de “carpete” (**Figura 1**).

Figura 1 - Ilustração dos principais mecanismos propostos de AMPs em permeabilizar e lisar a membrana celular de patógenos. Após os peptídeos adsorverem a membrana, fatores como eletroestática e anfifilicidade podem levar à formação de poros membranares nos modelos de “poro em barril”, toroidal ou formação de “carpete”.



Fonte: modificado de RONČEVIĆ, PUIZINA e TOSSI (2019).

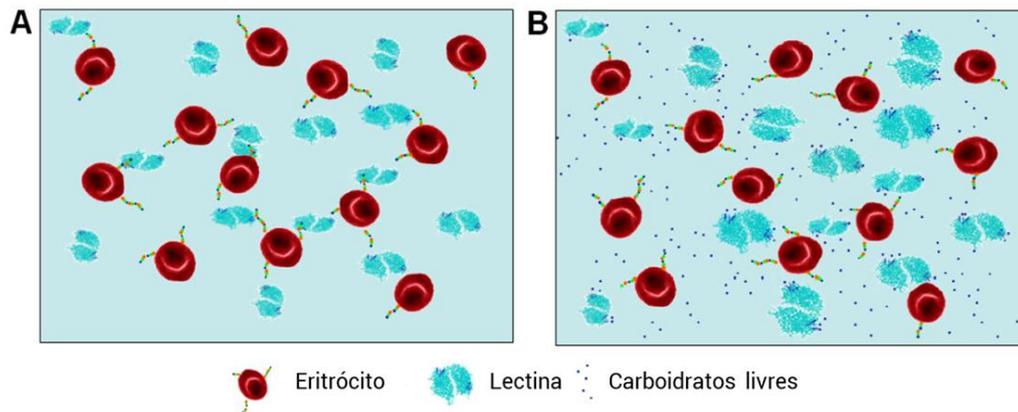
2.3 LECTINAS

2.3.1 Características e ocorrência

As lectinas compreendem um grande grupo de proteínas que apresentam pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) não catalítico, que se liga de maneira específica e reversível aos carboidratos (mono, oligo ou polissacarídeos) na forma de sacarídeos livres, glicoproteínas ou glicolipídios (MARTÍNEZ-ALARCÓN et al., 2018; PAIVA et al., 2010; PEUMANS et al., 2001; PROCÓPIO et al., 2017). Tais características fizeram com que fossem conhecidas inicialmente como “aglutininas” ou “fitohemaglutininas”, pela propriedade de muitas promoverem a aglutinação de eritrócitos. A hemaglutinação é a formação de uma

“rede” de eritrócitos pela ligação entre lectinas e carboidratos aderidos à superfície dessas células, sendo observadas em ensaios com placas de microtitulação (**Figura 2A**) (DAMME et al., 1998; PAIVA et al., 2010).

Figura 2 - Esquema da rede de eritrócitos formada pela ligação da lectina aos seus carboidratos superficiais (A) e inibição hemaglutinante após adicionar carboidratos que a lectina possui maior afinidade (B).



Fonte: modificado de PAIVA et al. (2010).

Algumas dessas proteínas se ligam preferencialmente a determinados tipos de carboidratos. Essa especificidade está relacionada ao arranjo espacial dos aminoácidos que constituem o DRC, à formação de pontes de hidrogênio e interações de van der Waals que estabelecem a ligação com carboidratos (MARTÍNEZ-ALARCÓN et al., 2018; PAIVA et al., 2010; PROCÓPIO et al., 2017). A identificação dessa especificidade pode ser determinada pelo ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, onde açúcares ou glicoconjugados são adicionados junto às lectinas e eritrócitos. Aqueles que promoverem maior inibição da atividade são considerados os ligantes específicos da lectina (**Figura 2B**) (PAIVA et al., 2010; VAN DAMME et al., 1998; PROCÓPIO et al., 2017).

As lectinas são encontradas nos vírus, bactérias, protistas, fungos, plantas e animais (MARTÍNEZ-ALARCÓN et al., 2018; SANTOS et al., 2013). Essas proteínas apresentam uma ampla variedade de funções relacionadas aos organismos ou às partículas infecciosas (vírus) (MARTÍNEZ-ALARCÓN et al., 2018). Em vírus e bactérias, proteínas com multidomínios semelhantes às lectinas são importantes na aderência à superfície dos receptores glicosilados das células do hospedeiro. Por

exemplo, cepas de vírus da Influenza-A, -B e -C (gripes humana, aviária e suína) e coronavírus (e.g. SARS-Cov, SARS-Cov-2 e MERS-Cov) apresentam proteínas com afinidade aos ácidos siálicos (e.g. Neu5Ac α 2-6Gal- e -3Gal- e 9-O-acetil-Sia α -) e/ou aos polissacarídeos heparan sulfatos, ambos carboidratos presentes nos receptores das células do trato respiratório, gastrointestinal e nervosas (CLAUSEN et al., 2020; NIZET et al., 2015; OU et al., 2020; ROBSON, 2020). Diferentes cepas de *Escherichia coli* sintetizam adesinas específicas, como fimbrias tipo-1 ligantes à manose, -P específica à galabiose, F-17 ligante à GlcNAc (NIZET et al., 2015). Como resposta a invasão desses seres microscópicos, os animais produzem proteínas de defesa, incluindo lectinas. Por exemplo, as células de Paneth secretam a defensina humana 5 (HD5) que apresenta afinidade aos resíduos glicídicos da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) de enterócitos e da proteína *spike* da SARS-Cov-2, resultando no bloqueio da entrada viral nas células intestinais (WANG et al., 2020).

Em plantas, são encontradas em abundância em sementes ou em órgãos de estocagem, como rizomas, tubérculos e bulbos (RÜDINGER e GABIUS, 2001; VANDENBORRE et al., 2011). Essas proteínas são liberadas para o espaço intercelular ou armazenadas junto à outras proteínas (denominados “corpos proteicos”) em vacúolos de estoque (RÜDINGER e GABIUS, 2001). A estocagem de lectinas maduras tóxicas em corpos proteicos (e.g. ricina de *Ricinus communis*) impede a autotoxicidade, sendo nociva apenas para artrópodes e vertebrados herbívoros (RÜDINGER e GABIUS, 2001). Algumas lectinas vegetais, como das famílias Fabaceae e Anacardiaceae, são consideradas não alimentares em razão da resistência à degradação por enzimas digestivas, alta afinidade à superfície epitelial do trato gastrointestinal e aglutinação de eritrócitos (tipo A, B, AB e O), resultando em respostas alergênicas e outras complicações (ZUBCEVIC et al., 2016). Além da função anti-herbivoria, as lectinas vegetais são sintetizadas para simbiose com *Rhizobium* e micorrizas, proteção contra patógenos, participação de processos de crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular (DE HOFF et al., 2009; KHURTSIDZE et al., 2017; RÜDINGER e GABIUS, 2001; VANDENBORRE et al., 2011).

2.3.2 Classificação de lectinas em vegetais

A classificação das lectinas vegetais é baseada na quantidade de DRCs e na sua afinidade. A primeira divisão foi proposta por Van Damme, onde essas proteínas foram distintas em quatro classes: merolectinas, hololectinas, superlectinas e quimerolectinas (LIU et al., 2010; PEUMANS et al., 2001; REYES-MONTAÑO e VEGA-CASTRO, 2018; VAN DAMME et al., 1998). As merolectinas são as proteínas que apresentam um único DRC e, dessa forma, não aglutinam células (e.g. heveína do látex da *Hevea brasiliensis*). As hololectinas (a maioria das lectinas vegetais) constituem dois ou mais DRC idênticos ou homólogos e se ligam a um mesmo tipo de carboidrato ou de estrutura semelhante. As superlectinas (e.g. TxLC-I, do bulbo de *Tulipa* sp), diferente da classe anterior, apresentam pelo menos dois DRC distintos ou semelhantes, porém, reconhecem sacarídeos com estruturas diferentes. As quimerolectinas (e.g ricina e quitinases de classe I) são proteínas fusionadas com pelo menos um DRC e outro domínio que confere ação biológica distinta (LIU et al., 2010; PEUMANS et al., 2001; REYES-MONTAÑO e VEGA-CASTRO, 2018; VAN DAMME et al., 1998).

De acordo com o carboidrato específico, as lectinas podem ser classificadas em: lectinas ligadoras de manose/glicose, GlcNAc, galactose, N-acetilgalactosamina, fucose ou ácido siálico. No entanto, essa classificação não é utilizada para todas as lectinas, uma vez que podem se ligar apenas aos sacarídeos complexos, aos glicoconjugados ou apresentarem afinidade por uma variedade de carboidratos (MARTÍNEZ-ALARCÓN et al., 2018; PROCÓPIO et al., 2017).

As duas classificações citadas se distinguem pela organização dos DRCs e características bioquímicas/funcionais, mas não traçam relações evolutivas (DAMME et al., 1998). Graças ao sequenciamento de lectinas, análise estrutural e seus genes codificantes, foram revelados domínios que se distinguem evolutivamente entre principais famílias: aglutininas homólogas à *Agaricus bisporus* (I), à quitinases classe V (II), da família das *Euonymus europaeus* (EUL) (III), das *Galanthus nivalis* (GNA) (IV) e das *Nicotiana tabacum* (Nictaba) (V), amarantinas (VI), jacalinas (VII), peptídeos *hevein-like* (lectinas ligantes à quitina) (VIII), lectinas de leguminosas (IX), de monocotiledôneas ligantes à manose (X) e do floema de Curcumbitaceae (XI), proteínas inativadoras de ribossomos (RIP) do tipo 2 (XII), com domínio LysM (XIII) e da ricina-B (XIV) (MARTÍNEZ-ALARCÓN et al., 2018; PEUMANS et al., 2001; VAN

DAMME et al., 1998; VAN HOLLE e VAN DAMME, 2019).

2.3.3 Potencial medicinal e biotecnológico

Estão descritas na literatura uma ampla variedade de estudos a respeito das propriedades medicinais e aplicações biotecnológicas das lectinas. Entre as classes, pode ser destacada aquelas com afinidade à quitina, as quais foram observadas atividades antitumorais, antimicrobiana e imunomoduladora, além de apresentar potencial uso como marcador molecular.

Por exemplo, a lectina ligadora de manose/quitina do rizoma de *Microgramma vacciniifolia* (MvRL) demonstrou ação antitumoral contra células do carcinoma mucoepidermóide do pulmão (NCI-H292), onde a concentração para reduzir a viabilidade celular em 50% (IC₅₀) foi $25,23 \pm 1,72 \mu\text{g.mL}^{-1}$, valor que não exibiu toxicidade para células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Outra lectina ligante à quitina (LLQ) foi descoberta na sarcotesta da *Punica granatum* (PgTeL) por Silva e colaboradores (2018). Os autores verificaram sua propriedade antifúngica contra duas espécies de *Candida*, onde a concentração mínima inibitória (CMI) e fungicida (CMF) foram, respectivamente, 25 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. albicans*, e 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CMI e CMF) para *C. krusei*. Em seus ensaios, a lectina não demonstrou toxicidade em PBMCs até a concentração máxima testada de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Através da microscopia e corantes fluorescentes, foi observado que a PgTeL causou danos à parede celular e membrana celular, induzindo ao desequilíbrio osmótico, colapso energético e morte por lise celular. Também foi destacado sua atividade antibiofilme, onde 0,195 e 0,39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PgTeL foram suficientes em inibir a formação de biofilme por *C. albicans*.

Nas folhas de *Schinus terebinthifolius*, foi descoberta a lectina ligadora de quitina SteLL que revelou propriedades antimicrobiana, antitumoral e imunomoduladora. Gomes e colaboradores (2013) verificaram a ação da SteLL contra os microrganismos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, onde a CMI variou entre 0,45 a 28,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ramos e colaboradores (2019), baseados nos testes *in vitro*, notaram que a SteLL promove apoptose em células do sarcoma-180 de camundongos e determinaram o IC₅₀ igual a

8.3 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Nos ensaios antitumorais *in vivo*, foi observado a redução do peso do tumor em 73,6% e 57,6% nas doses 1 $\text{mg}.\text{Kg}^{-1}$ e 5 $\text{mg}.\text{Kg}^{-1}$, respectivamente. Estudos de Santos e colaboradores (2020) presumiram que o potencial anticarcinogênico deve-se à ação imunomoduladora. Seus resultados mostraram que a SteLL, na concentração de 12,5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, foi capaz de estimular esplenócitos a produzir citocinas IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-2. O mesmo estudo avaliou que a lectina não causou apoptose ou necrose das células saudáveis na concentração máxima testada de 50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, como também não promoveu estresse celular à 12,5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, uma vez que não houveram aumento nas concentrações de íons de cálcio, espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*) citoplasmática e mitocondrial ou do potencial transmembranar mitocondrial.

Aplicações biotecnológicas das lectinas incluem a associação com nanoestruturas, como pontos quânticos para sua utilização como sondas fluorescentes e encapsulamento em lipossomas para eficaz entrega aos alvos celulares. Por exemplo, a lectina da semente de *Cratylia mollis* (Cramoll) provou conseguir formar conjugação estável com pontos quânticos de telureto de cádmio (CdTe) e forneceu notável marcação de *Candida* spp por uma intensa emissão de luz, sendo assim promissora na investigação de infecções microbianas, monitorar a patogenicidade de microrganismos e auxiliar na elucidação de perfis de expressão de carboidratos de patógenos (CUNHA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020). A forma recombinante da Cramoll encapsulada em lipossomas exibiu potencial ação antitumoral, podendo estar associado a sua capacidade em aumentar a proliferação de leucócitos (CUNHA et al., 2016). Dessa maneira, fica claro o potencial medicinal e biotecnológico das lectinas, assim como a importância da prospecção de novas proteínas ligantes à quitina.

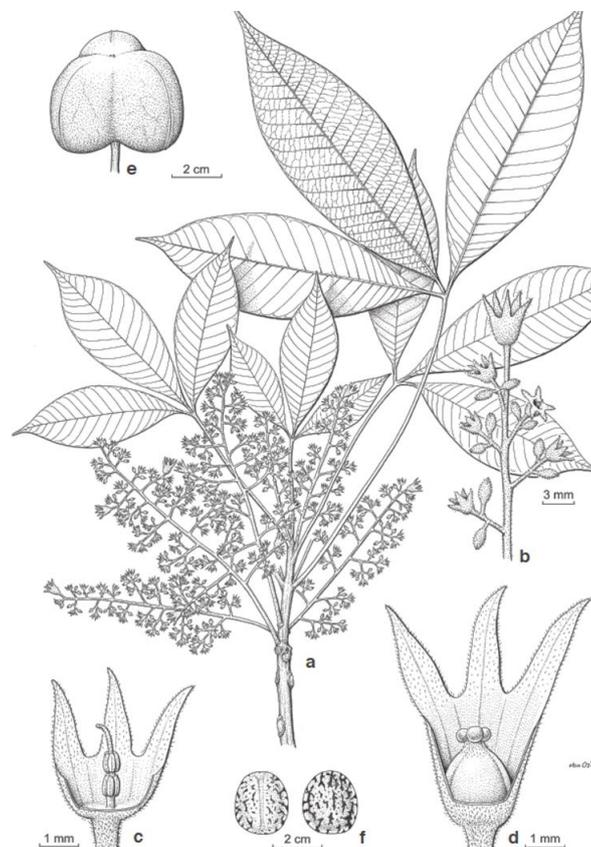
2.3.4 A merolectina de *Hevea brasiliensis*

A *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.Juss.) Müll.Arg., pertencente à família Euphorbiaceae, é uma espécie arbórea de porte médio a alto, conhecida popularmente como seringueira (**Figura 3**). É nativa do Brasil, porém, não endêmica, e ocupa o domínio fitogeográfico Amazônia, fazendo parte das florestas ciliares e de várzea na região norte, parte do nordeste e centro-oeste (SECCO & BIGIO, 2020). A espécie ficou conhecida no exterior como *rubber tree* (“árvore de borracha”) pela

exploração econômica do seu látex. Entretanto, além da importância da sua plantação para extração de látex e produção de borracha natural, ela também tem servido como espécie de recobrimento em áreas de restauração (BENINI et al., 2016; BOTTIER, 2020; CAMPOS FILHO, 2016; RAMOS et al., 2019b).

Estudos sobre a constituição química do látex de *H. brasiliensis* foram sendo realizados e em 1960 Archer identificou uma merolectina que foi nomeada como “heveína”. Com o trabalho de Van Parijs e colaboradores (1991) foi observado o seu potencial antifúngico contra os fitopatógenos *Botrytis cinérea* (IC₅₀ 500 µg/mL), *Fusarium culmorum* (600 µg/mL), *F. oxysporum* (1250 µg/mL), *Phycomyces blakesleeanus* (300 µg/mL), *Pyrenophora tritici-repentis* (350 µg/mL), *Pyricularia oryzae* (500 µg/mL), *Septoria nodorum* (500 µg/mL) e *Trichoderma hamatum* (30 µg/mL).

Figura 3 - *Hevea brasiliensis*: a) hábito; b) inflorescência com pequenas flores estaminadas e uma grande flor terminal pistilada; c) flor estaminada com cálice removido; d) flor pistilada com cálice removido; e) fruto; f) sementes em visão ventral e dorsal.

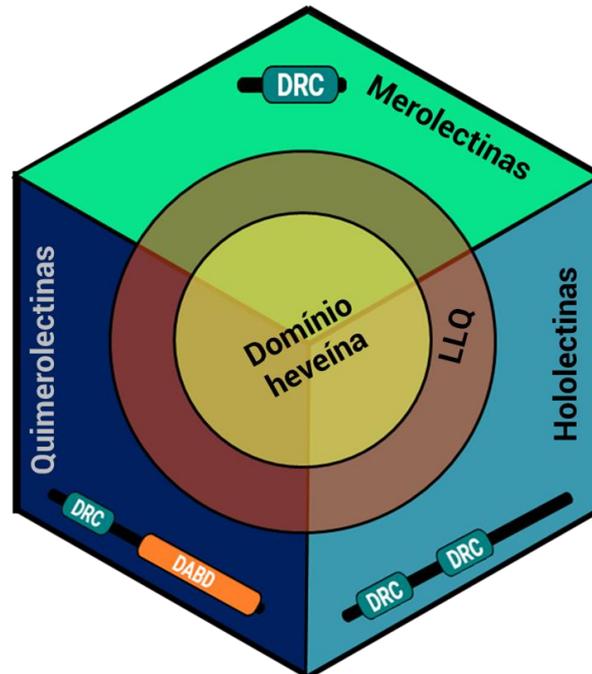


Fonte: VAN SAM e VAN WELZEN (2004).

Estudos sobre a produção da heveína em *H. brasiliensis* revelaram que é expressa constitutivamente, mas pode haver acúmulo de mRNA codificante após estresses. Broekaert e colaboradores (1990) notaram aumento da expressão de heveína nas folhas, caule e látex das mudas de 4 meses após lesionadas ou aplicação do ácido abscísico (ABA) e etefon (estimulante na produção do hormônio vegetal etileno). Xiao-Dong et al. (2002) observaram o mesmo padrão de indução nas plantas com 20 anos, mas a expressão da heveína no látex se mostrou maior do que nas folhas na presença de etileno e ABA. As respostas frente aos estresses externos e sua semelhança na sequência codificadora com outras proteínas que são induzidas por lesões, levou a heveína ser considerada como um dos elementos de defesa da *Hevea brasiliensis*.

Baseado no sistema de classificação de Van Damme, a heveína foi caracterizada como uma merolectina capaz de se ligar à quitina e inibir o crescimento fúngico (VAN PARIJS et al., 1991). Estudos posteriores descobriram LLQs com domínios semelhantes à heveína, mas com organização heterogênea, sendo encontrados como um único domínio (merolectinas), repetições em tandem (hololectinas), ou formando conjuntos heveína/quitinase e heveína/barwin (ambos quimerolectinas) (**Figura 4**) (ITAKURA et al., 2017; VAN HOLLE et al., 2017). Dessa forma, as LLQs incluem a classe de AMPs denominada de peptídeos *hevein-like*, tendo a heveína como espécie molecular “protótipo” (ITAKURA et al., 2017).

Figura 4 – Organização das lectinas com domínio heveína (em amarelo). O domínio é encontrado nas lectinas ligantes à quitina (LLQ, em vermelho), que por sua vez podem ser merolectinas (em ciano, com um único DRC), hololectinas (azul claro, com pelo menos dois DRC) ou quimerolectinas (azul escuro, com um DRC junto a outro domínio com ação bioquímica distinta, “DABD”).



Fonte: O autor (2022).

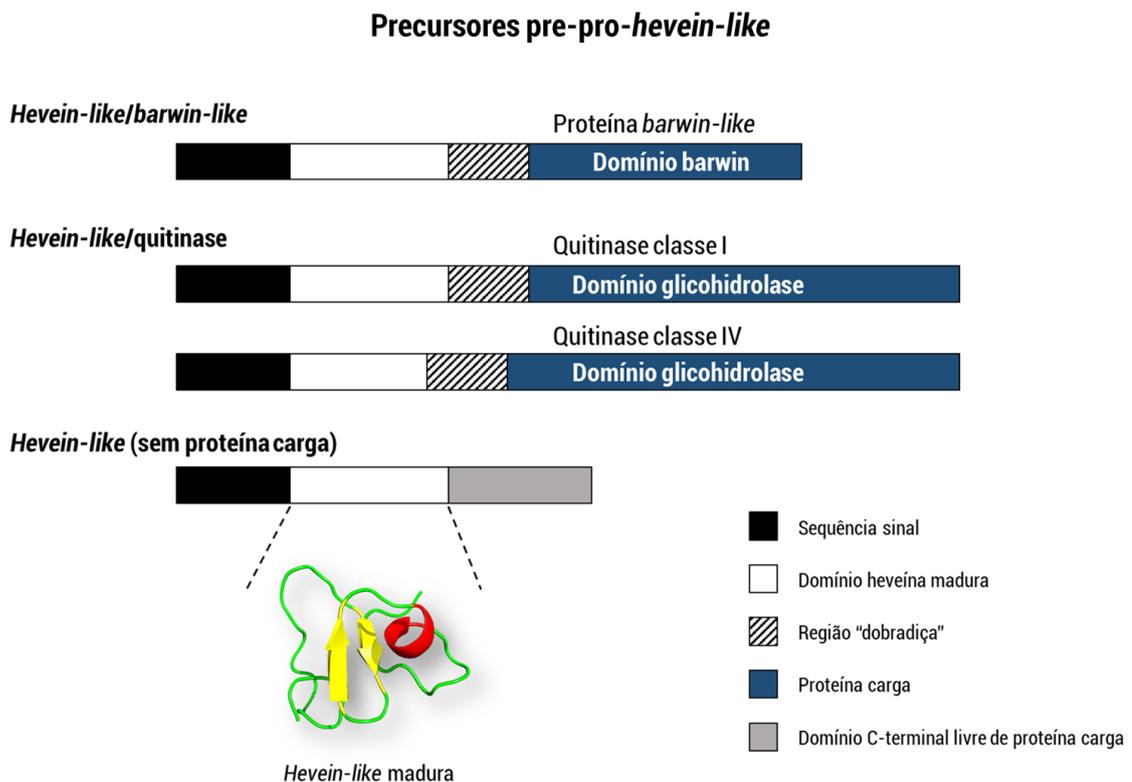
2.4 PEPTÍDEOS HEVEIN-LIKE

2.4.1 Arquitetura e características químicas

As proteínas precursoras pre-pro-hevein-like podem ser compostas por um peptídeo sinal N-terminal, domínio heveína e o domínio C-terminal, sendo este último correspondente ou não a uma proteína bioativa (endoquitinases ou barwin-like) (**Figura 5**) (SLAVOKHOTOVA et al., 2017a; WONG et al., 2017). O peptídeo sinal está envolvido na translocação do precursor para diferentes compartimentos celulares como o retículo endoplasmático, onde será clivado e o pro-peptídeo sofrerá modificações em sua estrutura, incluindo a proteólise do pro-domínio C-terminal (SLAVOKHOTOVA et al., 2017b; TAM et al., 2015). Todavia, foram registrados pro-proteínas funcionais onde o domínio heveína permaneceu conectado ao domínio C-terminal, ou seja, sem haver a clivagem pós-traducional. Por exemplo, o domínio

heveína associado à endoquitinase 6LNR em folha de Simarouba glauca favorece a ancoragem e coleta da quitina em uma orientação e geometria favorável à quitinólise pelo sítio ativo do domínio quitinase (BALU et al., 2020). Além de casos em endoquitinases, também foi registrada pro-heveínas com domínio Barwin associado em *H. brasiliensis* através de sua purificação, e sua forma recombinante (expressa em *E. coli*) apresentou propriedades aglutinantes, amiloidogênicas e antimicrobianas (BERTHELOT et al., 2016; BERTHELOT, PERUCH e LECOMTE, 2016).

Figura 5 - Esquema da arquitetura dos precursores de peptídeos *hevein-like*. Os precursores compreendem uma sequência sinal N-terminal, um domínio heveína que corresponderá a sua forma madura e um domínio C-terminal que carrega ou não uma sequência proteica bioativa (Barwin ou Quitinase).



Fonte: O autor (2022).

As endoquitinases, são constituídas pelo domínio glicohidrolase (GH), presentes em todos os reinos, sendo as famílias moleculares 18 e 19 encontradas nas plantas. Nos vegetais, essas quitinases também são conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese dos grupos 3 (PR3) ou 4 (PR4), e aquelas que são acompanhadas pelo domínio heveína na proteína precursora são agrupadas nas

classes I e IV, onde essa última apresenta algumas deleções no domínio ligante à quitina (DZHAVAKHIYA, OZERETSKOVSKAYA e ZINOVYEVA, 2007; PASSARINHO & VRIES, 2002). O mecanismo de ação das endoquitinases corresponde à degradação da parede celular de quitina de patógenos fúngicos e invertebrados herbívoros. No entanto, alguns estudos apontaram que a eficácia da atividade pode estar relacionada a presença do domínio heveína, por exemplo, em lectinas quiméricas onde os domínios de ligação e hidrólise à quitina permanecem ligados (BALU et al., 2020; KONNO et al., 2018; RAMOS et al., 2019b). Outro cenário inclui a propriedade de alguns peptídeos *hevein-like* desassociados do domínio C-terminal quitinolítico em se ligar e inibir proteases fúngicas. Prova disso está no trabalho de Slavokhotova et al. (2014) onde verificaram o sinergismo entre peptídeo *hevein-like* recombinante WAMP-1b e quitinases recombinantes de milho contra *Fusarium verticillioides*, destacando a capacidade do peptídeo em inibir a protease fungalisina (Fv-cpm).

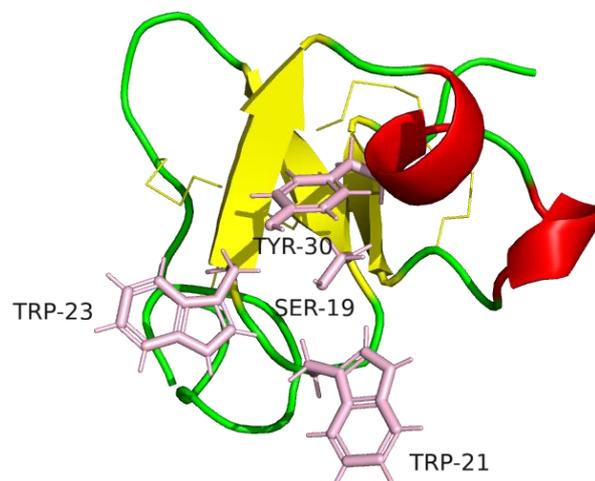
O domínio Barwin é encontrado em proteínas PR-4 e podem acompanhar um domínio heveína N-terminal. Ele foi identificado inicialmente na semente da cevada (“*barley*”) e a expressão dos genes codificantes estão associadas às infecções fúngicas e fermentos (genes *wins*) (MAIA et al., 2021; SVENSSON et al., 1992). As proteínas PR-4 são agrupadas nas classes I ou II, baseadas na presença ou ausência do domínio heveína, respectivamente (DAI et al., 2016; MAIA et al., 2021). Acredita-se que as proteínas com arquitetura heveína/Barwin se originaram do arranjo heveína/GH, no entanto, tal interpretação vem de uma inferência fenética e não filogenética (VAN HOLLE et al., 2017). Entre as propriedades das proteínas *barwin-like* estão a ligação à quitina, atividade quitinase, quitosanase e RNase (MAIA et al., 2021).

Os peptídeos maduros *hevein-like* são, em geral, catiônicos, oscilando entre 29 a 45 resíduos de aminoácidos, ricas em glicina e cisteína. Dos 6 a 10 resíduos de cisteína presentes em sua estrutura, são formados entre 3 a 5 pontes dissulfeto. A quantidade de resíduos de cisteína é um parâmetro de subdivisão, separando os peptídeos *hevein-like* em subgrupos 6-C, 8-C e 10-C (MUSIDLAK et al., 2020; SLAVOKHOTOVA et al., 2017b; TAM et al., 2015). Seis desses resíduos de cisteína situam-se em posições conservadas na estrutura molecular e formam o padrão $C^1X_4{}_5C^2X_4C^3C^4X_5C^5X_6C^6$, onde “C” representa o resíduo de cisteína e “X” qualquer outro resíduo de aminoácido. A formação de pontes dissulfeto seguem a formação C^1-C^4 ,

C²-C⁵ e C³-C⁶ (SLAVOKHOTOVA et al., 2017b). Os *hevein-like* podem formar estrutura secundária α -hélice – fita- β 1 – fita- β 2 – α -hélice – fita- β 3. As duas fitas- β antiparalelas centrais formam uma folha β , a qual está envolta pelas hélices estabilizadas pelas pontes dissulfeto (**Figura 6**) (SANTOS-SILVA et al., 2020; SLAVOKHOTOVA et al., 2017b; TAM et al., 2015).

O domínio heveína apresenta motivo conservado que reconhece o padrão de ligação $\beta(1\rightarrow4)$ entre os monômeros GlcNAc da quitina. O sítio de ligação é formado por X_i - X_{i+2} - X_{i+4} - X_{i+11} , sendo X_i o resíduo de serina, X_{i+2} e X_{i+4} são resíduos aromáticos, e X_{i+11} como resíduo de tirosina (**Figura 6**) (BERTHELOT et al., 2016; MUSIDLAK et al., 2020; PORTO et al., 2012; SLAVOKHOTOVA et al., 2017). Os resíduos de aminoácidos aromáticos da sequência estabilizam o empilhamento CH- π entre seus anéis e o da piranose, enquanto os resíduos de tirosina ou triptofano também contribuem na formação de pontes de hidrogênio (NISHIO et al., 2014; PORTO et al., 2012).

Figura 6 - Estrutura tridimensional de um exemplar de peptídeo *hevein-like* (heveína de *Hevea brasiliensis*; PDB: 1HEV), destacando: formação de fitas- β (amarelo) e α -hélices (vermelho); resíduos responsáveis pela ligação à quitina (rosa).

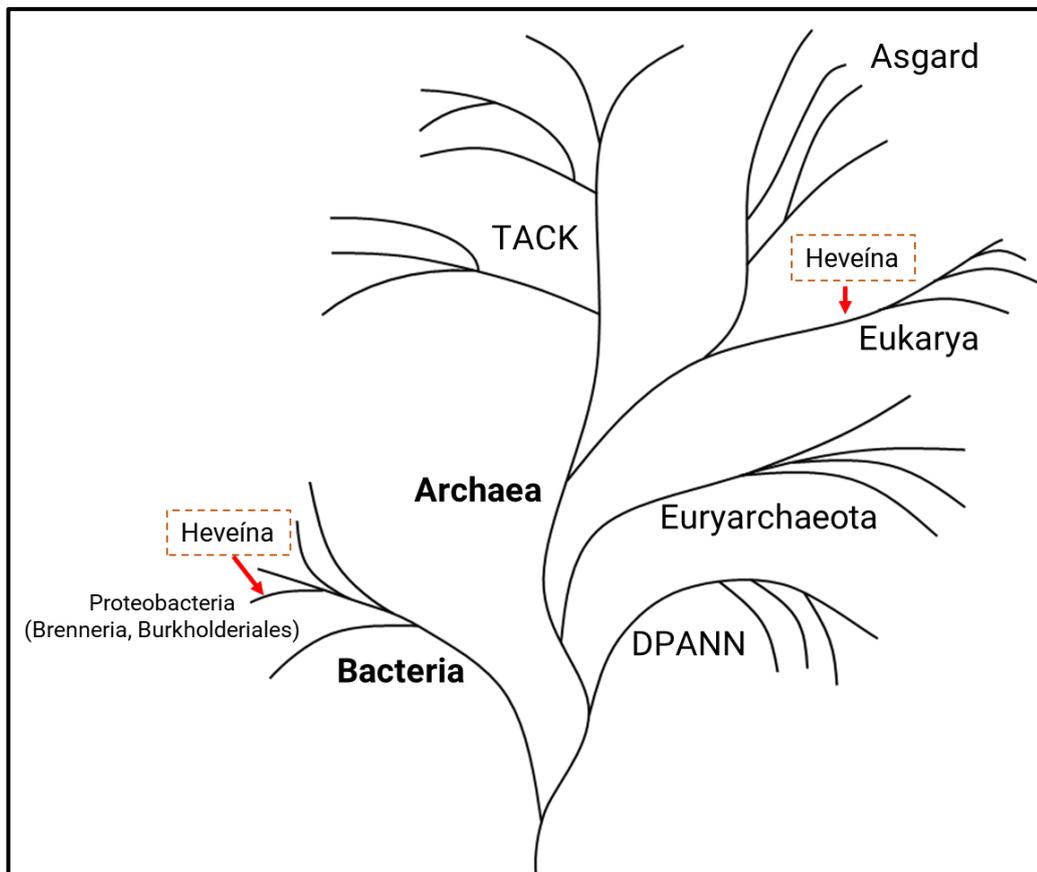


Fonte: O autor (2022).

2.4.2 Ocorrência e função

Lectinas com domínio heveína estão distribuídas em táxons distintos na árvore da vida (Figura 7), desde organismos unicelulares a seres mais complexos. Segundo a pesquisa de Van Holle e Van Damme (2019) envolvendo genoma e proteoma, as heveínas teriam sido uma inovação de eucariotos, em que o domínio surgiu a partir do último ancestral comum e evoluiu independentemente após as linhagens terem se dividido. No entanto, nessa mesma pesquisa foi observada a presença de heveínas em algumas bactérias dos clados Burkholderiales e *Brenneria*, sendo a maioria patógenos de plantas. Apesar do estudo não resolver a funcionalidade das heveínas para essas linhagens, foi observado o acompanhamento do domínio GH nas sequências, o que indicaria uma função comum entre as linhagens para ação antifúngica, no catabolismo de polímeros de GlcNAc presentes no meio ou como fatores de virulência (FREDERIKSEN et al., 2013; SANTOS-SILVA et al., 2020).

Figura 7 - Esquema da árvore da vida e indicação das linhagens onde foram encontradas polipeptídeos com domínio heveína.



Fonte: modificado de VAN HOLLE e VAN DAMME (2019).

Nos eucariotos, sequências codificantes de heveínas foram encontradas nos clados Fungi, Metazoa, Stramenopiles, Rhizaria, Alveolata, Amoebozoa e Archaeplastida (VAN HOLLE e VAN DAMME, 2019). Dentro desse último clado, em Viridiplantae, a organização da arquitetura das proteínas precursoras que contém ambos os domínios heveína e GH segue o padrão: GH/heveína nas Chlorophyta e heveína/GH em Embryophyta. Segundo Van Holle e Van Damme (2019), a combinação heveína/GH18 está presente somente nas Bryophyta, enquanto que heveína/GH19 é compartilhado entre as Embryophyta. Além disso, em todas essas linhagens há uma alta conservação dos resíduos de cisteína, glicina, serina e tirosina no domínio heveína, evidenciando serem determinantes para sua estruturação, enovelamento e afinidade com a quitina.

Entre os diversos táxons de Spermatophyta que apresentam peptídeos e proteínas com domínio heveína estão *Ginkgo biloba* (Gimnosperma) e as famílias de Angiospermas: Euphorbiaceae, Adoxaceae, Amaranthaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Celastraceae, Convolvulaceae, Eucommiaceae, Ginkgoaceae, Moraceae, Poaceae, Polygonaceae e Solanaceae (GAMES et al., 2016; MUSIDLAK et al., 2020; SANTOS et al., 2020; SLAVOKHOTOVA et al., 2017b; WONG et al., 2017). A descoberta da ação antifúngica da heveína de *H. brasiliensis* incentivou a prospecção e avaliação antimicrobiana de peptídeos *hevein-like* em outras espécies vegetais (**Tabela 1**). Os trabalhos recentes encontrados apresentam os peptídeos gB5 (em folhas de *G. biloba*), HEV-CANN (em folhas de *Capsicum annuum*), vH2 (sementes de *Vaccaria hispanica*), mO1 (folhas de *Moringa oleifera*) e cQ2 (sementes de *Chenopodium quinoa*) que apresentaram atividade contra os fitopatógenos fúngicos *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *A. brassiciola*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*, assim como potencial ação contra os bacterianos Gram-positivo *Clavibacter michiganensis* ssp. *Michiganensis* e Gram-negativo *Ralstonia solanacearum* (GAMES et al., 2016; KINI et al., 2017; LOO et al., 2021; WONG et al., 2016, 2017). O potencial dessas moléculas também se estende para a área medicinal, registrados em trabalhos como de Kanokwiroon e colaboradores (2008), onde observaram um peptídeo *hevein-like* isolado de *H. brasiliensis* com ação contra *Candida albicans* (IC₅₀ 23.8 a 95 µg/mL), *C. tropicalis* (~3 a 5.9 µg/mL), *C. krusei* (~<1.5 ou >190 µg/mL) e *C. glabrata* (>190 µg/mL).

Tabela 1 - Peptídeos *hevein-like* purificados (não recombinantes) e suas atividades antimicrobianas.

| Espécie | Peptídeo | Método <i>in vitro</i> | Microrganismos suscetíveis (IC ₅₀)* | Referência |
|---------------------------|-----------|--|--|--------------------------|
| <i>Ginkgo biloba</i> | gB5 | Disco-difusão e microdiluição em caldo | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Aspergillus niger</i> (6.8 µg/mL); • <i>Curvularia lunata</i> (10 µg/mL); • <i>Fusarium oxysporum</i> (69.2 µg/mL); • <i>Rhizoctonia solani</i> (20 µg/mL). | WONG et al., 2016 |
| <i>Vaccaria hispanica</i> | vH2 | Disco-difusão e microdiluição em caldo | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Alternaria alternata</i> (21.9 µg/mL); • <i>C. lunata</i> (16.1 µg/mL); • <i>F. oxysporum</i> (5.1 µg/mL); • <i>R. solani</i> (1.8 µg/mL). | WONG et al., 2017 |
| <i>Moringa oleifera</i> | mO1 | Disco-difusão e microdiluição em caldo | <ul style="list-style-type: none"> • <i>A. alternata</i> (25.5 µg/mL); • <i>A. brassiciola</i> (60.4 µg/mL). | KINI et al., 2017 |
| <i>Hevea brasiliensis</i> | Heveína | Microdiluição em caldo | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Botrytis cinérea</i> (500 µg/mL); • <i>F. culmorum</i> (600 µg/mL); • <i>F. oxysporum</i> (1250 µg/mL); • <i>Phycomyces blakesleeanus</i> (300 µg/mL); • <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> (350 µg/mL); • <i>Pyricularia oryzae</i> (500 µg/mL); • <i>Septoria nodorum</i> (500 µg/mL); • <i>Trichoderma hamatum</i> (30 µg/mL). | VAN PARIJS et al., 1991 |
| | Heveína** | Disco-difusão e microdiluição em caldo | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Candida albicans</i> (~23.8 – 95 µg/mL); • <i>C. tropicalis</i> (~3 – 5.9 µg/mL); • <i>C. krusei</i> (~ <1.5 ou >190 µg/mL); • <i>C. glabrata</i> (>190 µg/mL). | KANOKWIROON et al., 2008 |
| <i>Capsicum annuum</i> | HEV-CANN | Microdiluição em caldo | <ul style="list-style-type: none"> • ***<i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>michiganensis</i> (nm); • ***<i>Ralstonia solanacearum</i> (nm). | GAMES et al., 2016 |
| <i>Chenopodium quinoa</i> | cQ2 | Disco-difusão e microdiluição em caldo | <ul style="list-style-type: none"> • <i>F. oxysporum</i> (0.3 µM); • <i>R. solani</i> (3.0 µM); • <i>A. alternata</i> (9.5 µM); • <i>C. lunata</i> (5.7 µM). | LOO et al., 2021 |

* Concentração mínima para inibir 50% de determinado microrganismo;

** Nomeado como “heveína”, no entanto apenas os primeiros 11 aminoácidos do peptídeo isolado e sequenciado são 100% idênticos à heveína;

*** Suscetíveis à fração peptídica, mas autores atribuíram a atividade ao peptídeo isolado;

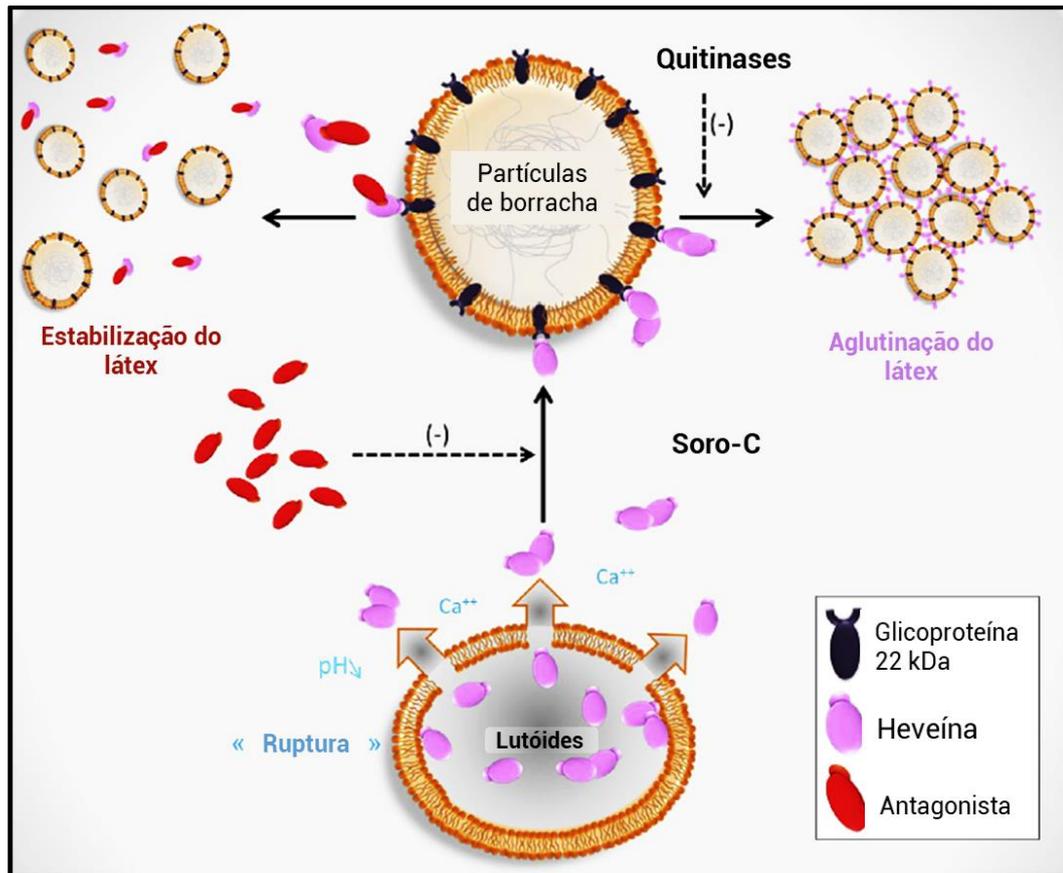
“nm” = não mencionado.

Fonte: O autor (2022).

Embora os peptídeos *hevein-like* tenham demonstrado função de defesa vegetal contra patógenos em razão das atividades antimicrobianas *in vitro*, sua importância pode se estender para o papel contra pragas revestidas de exoesqueleto de quitina (e.g. nematódeos e insetos) e cicatrização de seus tecidos (DAMME et al.,

1998; KONNO, 2011; PORTO et al., 2012; SANTOS-SILVA et al., 2020). Nesse último caso, esses peptídeos participam em conjunto com outros elementos presentes nos laticíferos – células especializadas alongadas produtoras de látex (RAMOS et al., 2019b). A regulação da cicatrização pode incluir enzimas líticas (quitinases e glucanases), íons (Ca^{+2} , Mg^{+2} e Cu^{+2}) e peptídeos *hevein-like*, sendo estocados em compartimentos ácidos osmossensíveis semelhantes aos vacúolos denominados como lutóides (BERTHELOT; PERUCH; LECOMTE, 2016). Estudos com a *Hevea brasiliensis* têm demonstrado que após uma lesão, a diferença entre a pressão do laticífero e da atmosfera promove o rompimento dos lutóides, e a partir disso o processo de cicatrização ocorre pela dimerização dos peptídeos *hevein-like* na presença de íons de Ca^{+2} , ligação deles com os resíduos GlcNAc da glicoproteína de 22 kDa receptora (encontradas na superfície de partículas de látex), agregação das partículas por pontes multivalentes e então coagulação do látex (**Figura 8**) (BERTHELOT; PERUCH, LECOMTE e 2016; BOTTIER, 2020; GIDROL et al., 1994; NELLESEN et al., 2011; SHI et al., 2019). Com base nesses estudos, plantas que apresentam secreção de látex após serem lesionadas podem incluir peptídeos ou proteínas com domínio heveína que participam de forma análoga no processo cicatrizante.

Figura 8 - Modelo de regulação da aglutinação do látex pela heveína em *Hevea brasiliensis*. Após ferimento, lutóides são rompidos liberando heveínas ou pro-heveínas que interagem com a porção GlcNAc das partículas de látex, especificamente nas glicoproteínas receptoras (22 kDa) encontradas em sua superfície. As heveínas podem formar dímeros na presença de íons Ca^{2+} , resultando na aglutinação do látex. A presença de antagonistas e quitinases podem contribuir com a estabilização da aglutinação, sendo essas últimas proteínas pela desglicosilação da glicoproteína receptora.



Fonte: modificado de BERTHELOT, PERUCH e LECOMTE (2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ARTIGO 1

Diversidade de peptídeos *hevein-like* em seringueira (*Hevea brasiliensis*): Detecção *in silico* e caracterização estrutural

Ricardo Salas Roldan-Filho¹, Livia Maria Batista Vilela¹, Carlos André dos Santos-Silva², Antônio Felix da Costa³, Alexandre Reis Machado⁴, Patrícia Maria Guedes Paiva⁵, Ana Maria Benko-Iseppon¹

¹*Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.*

²*IRCCS Materno Infantile Burlo Garofolo, Trieste, Itália.*

³*Instituto Agrônomo de Pernambuco, Recife, Brasil.*

⁴*Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.*

⁵*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.*

Resumo

A indução da expressão de peptídeos antimicrobianos (AMPs) figura entre as estratégias dos vegetais na defesa frente aos estresses bióticos, como o ataque de herbívoros e de patógenos. Entre as classes de AMPs, os peptídeos *hevein-like* se destacam pela sua afinidade à carboidratos GlcNAc, a exemplo da heveína (Hev b 6.02) de *Hevea brasiliensis* representando a molécula protótipo. Apesar da descoberta da Hev b 6.02, não foram descritos e avaliados outros peptídeos *hevein-like* na espécie (HbHevs) na literatura científica. O presente estudo prospectou HbHevs e caracterizou, *in silico*, suas estruturas. Foram detectados onze precursores onde os domínios heveína acompanharam um domínio C-terminal quitinase ou Barwin. As estruturas primárias dos domínios heveínas (ou HbHevs) foram preditos anfifílicos, catiônicos/aniônicos e com potencial atividade antimicrobiana. Os HbHevs apresentaram modelos estruturais teóricos similares à Hev b 6.02 (HbHev1), no

entanto HbHevs8-11 se diferenciam dos demais pela ausência dos aminoácidos 5 a 11. O núcleo ligante, formado pelas duas fitas- β antiparalelas centrais e a curta α -hélice adjacente, se mostrou semi-rígida na dinâmica molecular (exceção HbHev11, que se mostrou instável). O HbHev11 exibiu substituições C17S e Y23C que podem afetar a estabilidade e afinidade à GlcNAc. Dados sobre superfície eletrostática dos modelos apontam que os HbHevs podem apresentar núcleo ligante carregado negativamente, o que auxiliaria na ligação à GlcNAc de carga positiva. Por outro lado, as regiões de maior vibração atomística podem ser catiônicas, permitindo a atração eletrostática e deformação de membranas de patógenos. A caracterização dos HbHevs sugere potencial aplicação dessas moléculas como antibióticos e antivirais para futuras aplicações farmacológicas.

Palavras-chave: Bioinformática, peptídeos antimicrobianos, simulação em dinâmica molecular, estrutura tridimensional

Introdução

A *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.Juss.) Müll.Arg., pertencente à família Euphorbiaceae, ficou conhecida como seringueira-da-Amazônia (*rubber tree*) pela exploração econômica do seu látex. A espécie nativa brasileira (não endêmica) participa do domínio fitogeográfico da Amazônia, compreendendo a região norte, parte do nordeste e centro-oeste do país (SECCO & BIGIO, 2020). Seu plantio tem sido importante no campo ecológico – servindo como espécie de recobrimento em áreas de restauração (BENINI et al., 2016; CAMPOS FILHO, 2016) – e econômico, devido à produção da borracha natural a partir do látex (BOTTIER, 2020; RAMOS et al., 2019).

O látex é um fluido produzido por células especializadas denominadas laticíferos, que estão presentes em determinadas espécies vegetais. Entre as funções estão a cicatrização de lesões e defesa contra agentes biológicos (herbívoros e patógenos). Essas respostas fisiológicas ocorrem pela ação de moléculas presentes no látex, como peptidases, lipases, quitinases, proteínas ligantes a quitina, *polyisoprene* (principal constituinte da borracha), esteroides e outros metabólitos secundários (BOTTIER, 2020; RAMOS et al., 2019). O arsenal químico é produzido e estocado nos laticíferos para atuarem de forma sinérgica contra invasores (RAMOS

et al., 2019). Estudos têm mostrado que muitos desses fitoquímicos são importantes para a saúde e agricultura, como é o caso de peptídeos *hevein-like* por apresentarem afinidade à quitina e, assim, potencial ação contra patógenos humanos e vegetais (HOFFMANN et al., 2021; WONG et al., 2016, 2017).

A origem do nome “*hevein-like*” vem da lectina chamada heveína, descoberta no látex da *H. brasiliensis* que apresentou experimentalmente ação antifúngica pela sua interação com a parede celular de quitina (ARCHER, 1960; VAN PARIJS et al., 1991). A partir disso, outros peptídeos com domínio e características estruturais semelhantes à heveína foram sendo descobertos, e assim nomeados como “peptídeos *hevein-like*”, uma das classes de peptídeos antimicrobianos (AMPs). Esses compostos exibem um padrão de características que incluem comprimento de 29 a 45 aminoácidos, ricos em glicina e cisteínas (6C, 8C ou 10C) em posições conservadas (SLAVOKHOTOVA et al., 2017). A conformação estrutural é mantida por pontes dissulfeto com padrão C¹-C⁴, C²-C⁵ e C³-C⁶, e apresentam duas fitas-β antiparalelas centrais e uma curta α-hélice adjacente que formam o núcleo ligante à quitina (SANTOS-SILVA et al., 2020; SLAVOKHOTOVA et al., 2017). Nessa região são encontrados os resíduos de aminoácidos ligantes X_i-X_{i+2}-X_{i+4}-X_{i+11}, sendo X_i o resíduo de serina, enquanto X_{i+2} e X_{i+4} são resíduos aromáticos, e X_{i+11} de tirosina (PORTO et al., 2012). Apesar da sua afinidade aos polímeros de N-acetilglicosamina, as *hevein-like* podem controlar o crescimento de bactérias ou fungos sem parede de quitina pela participação conjunta da superfície anfifílica e catiônica das moléculas (GAMES et al., 2016).

AMPs naturais tem se destacado como potencial alternativa para enfrentar cepas resistentes e agentes patogênicos que não possuem medicação específica até o momento. Há estudos que indicam propriedades antivirais de peptídeos e proteínas com domínio heveína, como a UDA que apresentou atividade contra um amplo espectro de vírus (por ex., DENV tipo 2, HIV-1, H1N1, H3N2, HSV-2) (GORDTS et al., 2015). Além disso, estudo recente indicou que a proteína *Spike* da SARS-CoV-2 exibe um complexo de glicosilação, que inclui cadeias que terminam com monossacarídeos N-acetilglicosamina nas subunidades RBD, S1/S2 e HR2, responsáveis pela mediação da fusão do vírus para a célula hospedeira, o que possibilitaria a aplicação de lectinas específicas contra o vírus (HOFFMANN et al., 2021). Outra via de aplicação corresponde ao uso de peptídeos e proteínas ligantes à quitina contra vetores transmissores, como demonstrado no estudo de Alves et al. (2020), onde

observaram a capacidade das lectinas WSMoL, MuBL e MuHL em causar deformações na superfície dos ovos de *Aedes aegypti*, assim como em adentrar e alcançar o trato digestivo dos embriões.

Diante da importância dessas moléculas e de sua especificidade aos alvos moleculares de patógenos, a busca por peptídeos *hevein-like* tem sido realizada através de métodos químicos e computacionais. Esse último consiste em buscar polipeptídeos através das *ômicas*, fornecendo informações triviais para futuras extrações e purificações em laboratório. Com isso, o presente estudo teve como objetivo realizar a prospecção *in silico*, identificar a variedade de peptídeos *hevein-like* de *H. brasiliensis* (HbHevs), assim como os padrões de arquitetura de seus precursores e caracterizar a estrutura primária, secundária e terciária do domínio heveína.

Metodologia

Busca por sequências e caracterização

A busca por sequências *hevein-like peptides* seguiu o protocolo de Santos-Silva et al. (2020). A mineração em *H. brasiliensis* (NCBI: txid3981) foi baseada em sequências sondas de peptídeos *hevein-like* descritas e depositadas no PhytAMP (n=14), Pfam (165) e UniProt (84). Foram executadas três metodologias. A primeira foi por meio da busca por padrões específicos no domínio conservado pelo algoritmo HMMER3 (EDDY, 2009), o qual utiliza modelo probabilístico de Hidden Markov (HMM). A segunda foi a partir da ferramenta de alinhamento BLASTp. Por último, foi a busca por expressão regular (REGEX) na qual utilizaram-se padrões de cadeias de caracteres referente às posições de resíduo de aminoácidos (por ex., “C”, cisteínas). As sequências precursoras de HbHevs foram selecionadas pela presença do domínio conservado *Chitin_bind_1* através do servidor CD-Search (NCBI) (MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004). A predição da localização subcelular foi avaliada pelo servidor *Web Plant-mPloc*.

Após remover redundâncias, o domínio N-terminal ligante à quitina de cada precursor (correspondente aos peptídeos maduros HbHevs) foi isolado para caracterização *in silico*. Com o intuito de identificar conservação e mutações, foram realizados alinhamentos pela ferramenta MUSCLE no *software* Jalview v2.11.1.5.

Características como predições de ponto isoelétrico e massa molecular (ambos pelo servidor *Protein isoelectric point calculator* - IPC), índice de hidropaticidade média (ProtParam), porcentagem hidrofóbica e carga líquida (ambos pelo *Antimicrobial Peptides Database* - APD3) foram avaliadas. A predição de atividade antimicrobiana baseada na estrutura primária foi realizada nos servidores CAMPR3 e Antifp (Antifungal peptide Prediction) (AGRAWAL et al., 2018; THOMAS et al., 2010; WAGHU et al., 2016).

Análise fenética de peptídeos hevein-like

A fim de identificar características compartilhadas e semelhança entre proteínas de outras linhagens, as HbHevs foram utilizadas como *query* para coletar sequências similares de outras espécies em Viridiplantae (depositadas no NCBI) via BLASTp. Após a aquisição das sequências e remoção das redundâncias, foi realizado alinhamento múltiplo do domínio heveína entre as HbHevs e as demais proteínas pela ferramenta MUSCLE no *software* Jalview v2.11.1.5. Junto a isso, uma árvore fenética UPGMA foi construída no *software* MEGA 11.0.9 (TAMURA, STECHER e KUMAR, 2021), com reamostragem pelo método de *bootstrap* (replicado 1000 vezes), com distância p e imagem gerada com o *software* FigTree v1.4.4.

Modelagem comparativa

As características estruturais das HbHevs foram identificadas a partir da construção de modelos comparativos 3D. Para isso, as sequências de HbHevs foram alinhadas contra proteínas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) através da ferramenta BLASTp (NCBI), selecionando, então, como *templates* aquelas com maior identidade e cobertura. Utilizando *software* Modeller 10.0 (WEBB e SALI, 2016) foram gerados mil modelos teóricos para cada HBHev. Os melhores modelos foram escolhidos de acordo com a energia proteica otimizada discreta (*DOPE*), bem como pela qualidade estereoquímica e de dobramento pelo *Ramachandran plot* (PROCHECK) e Z-score (ProSa-web)/QMEANDisCo, respectivamente (LASKOWSKI et al., 1993; PORTO et al., 2012; SANTOS-SILVA et al., 2021; STUDER et al., 2020; WIEDERSTEIN e SIPPL, 2007).

Simulação em dinâmica molecular

A simulação dos melhores modelos teóricos foi realizada pelo pacote GROMACS 2019.4. Os modelos das HbHevs foram centralizados em uma caixa cúbica com dimensões 4 x 4 x 4 nm e solvatados em água SPC (*Simple Point Charge*) (BERENDSEN et al., 1981). Foram adicionados íons Na e Cl para uma concentração fisiológica de 0.15 M de NaCl, seguido de minimização de energia em até 50.000 passos pelo algoritmo. A temperatura de 300 K foi mantida no conjunto NVT com restrição de átomos de soluto na posição inicial. O método LINCS (HESS et al., 2008) foi usado para restringir ligações envolvendo átomos de hidrogênio. A integração foi realizada pelo algoritmo *leap-frog* usando uma etapa de tempo de integração 2-fs. O tempo das simulações foi programado para 100 ns usando campos de força GROMOS 53A6 (OOSTENBRINK et al., 2004) e condições de contorno periódicas nas direções x, y e z. Por fim, a dinâmica molecular foi executada sob pressão e temperatura constantes de 1 atm e 300 K, respectivamente. Após a dinâmica, foi avaliada a superfície de potencial eletrostático das HbHevs pelo PyMol v.2.5.1.

Resultados

Busca por sequências e caracterização

A **figura 1** sumariza a quantidade total de sequências extraídas (TS), precursoras candidatas (TC) e a eficiência de mineração (TC:TS x 100) a partir das três metodologias de busca. A mineração por HMMER3 permitiu a identificação de 23, 20 e 102 TSs a partir das sondas do PhytAMP, Pfam e UniProt, respectivamente. No caso da mineração por BLASTp, os TSs foram 98, 884 e 939, respectivamente. Apesar do variado número TS, foram obtidas 11 TCs em ambos os métodos de mineração e a partir de qualquer das fontes de sondas utilizadas. A eficiência de mineração (TC:TS) pela metodologia HMMER3 foi 48%, 55% e 11% a partir das sondas obtidas no PhytAMP, Pfam e UniProt, respectivamente. Por outro lado, a metodologia via BLASTp apresentou 11% de eficiência a partir das sondas do PhytAMP e 1% nas demais fontes. Em paralelo as duas metodologias, na mineração por RegEx foram utilizados oito padrões de sequências *hevein-like* (**Tabela suplementar 1**), obtendo, então, um TS e TC iguais a 367 e 10, respectivamente, o que corresponde a uma

eficiência de mineração igual a 3%.

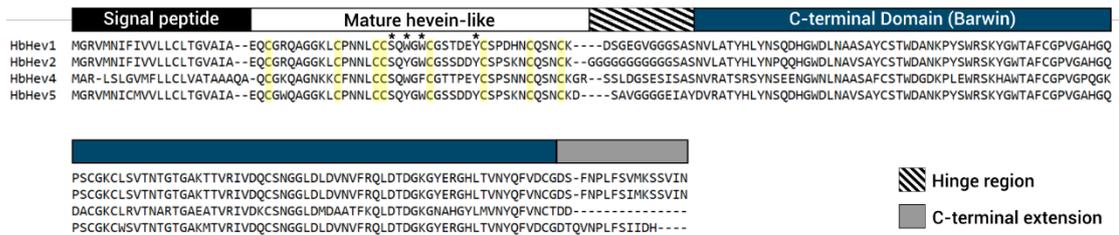
Fig. 1. Sumário de mineração de *hevein-like peptides* em *Hevea brasiliensis* (NCBI: txid3981) pelas metodologias de HMMER3 e BLASTp.

| | PhytAMP <small>a database dedicated to plant antimicrobial peptides</small> | | Pfam | | UniProt | |
|----------------------------|--|--------|--------|--------|---------|--------|
| Nº Probes: | 14 | | 165 | | 84 | |
| Data mining methodology | HMMER3 | BLASTp | HMMER3 | BLASTp | HMMER3 | BLASTp |
| Total sequences (TS): | 23 | 98 | 20 | 884 | 102 | 939 |
| Total candidates (TC): | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 | 11 |
| Mining efficiency (TC/TS): | 0,48 | 0,11 | 0,55 | 0,01 | 0,11 | 0,01 |

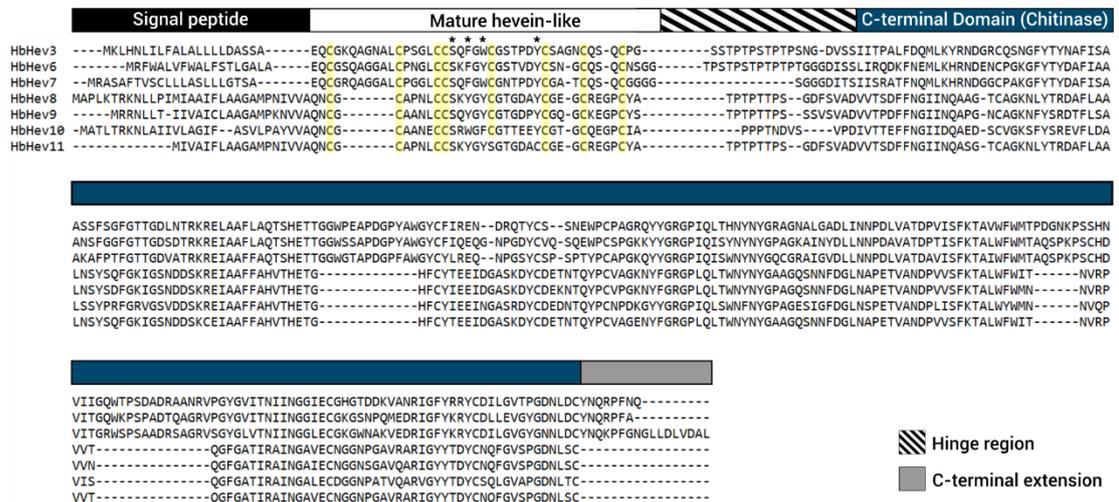
As onze sequências precursoras candidatas (com domínio heveína) (**Tabela suplementar 2; Fig. 2**) apresentaram uma variação de 196 a 321 no número de aminoácidos, sendo os primeiros 18 a 31 aminoácidos correspondentes à região do peptídeo sinal (identificados pelo SignalP-5.0). O domínio heveína de oito cisteínas (região peptídeo *hevein-like* maduro) exibiu tamanho igual de 35 a 44 aminoácidos, enquanto que os demais aminoácidos formam a região ligante e domínio C-terminal, sendo esse último representado pelos domínios Barwin ou quitinase (*Glyco_hydro_19*). A localização subcelular dessas preproteínas foi predita para estruturas como vacúolos, membrana e parede celular ou ainda, direcionadas (secretadas) para a região extracelular.

Fig. 2. As duas arquiteturas dos precursores de *hevein-like peptides* de *Hevea brasiliensis*. As barras pretas, brancas, hachuradas, azuis e cinzas indicam as regiões do peptídeo sinal, *hevein-like* maduro, da dobradiça, domínio C-terminal (barwin ou quitinase) e extensão C-terminal, respectivamente. O padrão de disposição das cisteínas em *hevein-like peptides* maduras está marcado em amarelo. Os resíduos responsáveis pela ligação à quitina estão sinalizados com “*”.

Hevein-like/Barwin precursor



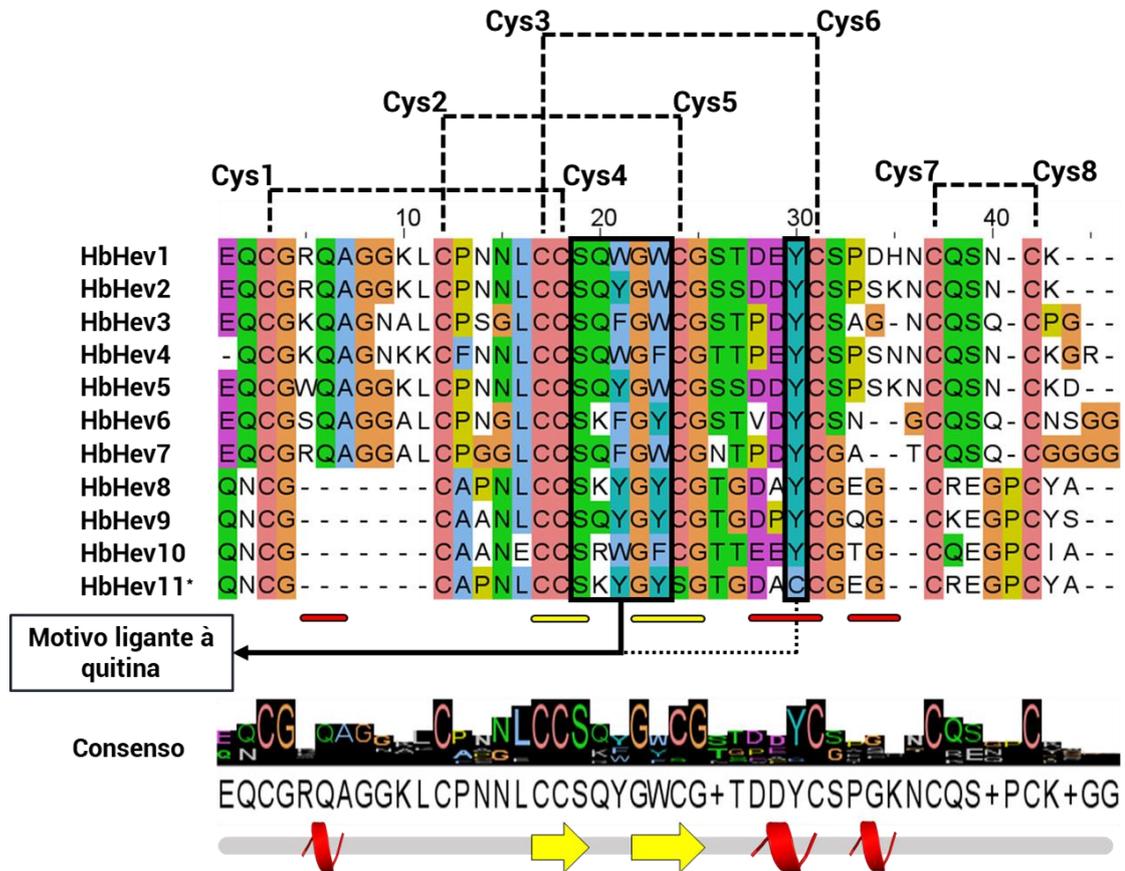
Hevein-like/Chitinase precursor



O alinhamento das 11 HbHevs (**Fig. 3**) revelou uma conservação na posição de suas 8 cisteínas, com exceção da HbHev11 onde houve mutação dos aminoácidos C17S e Y23C. A predição da formação de pontes dissulfeto seguiu o padrão conhecido dos peptídeos *hevein-like* (C¹-C⁴, C²-C⁵, C³-C⁶ e C⁷-C⁸), com exceção para HbHev11 que ausentou a ponte C²-C⁵ (**Fig. 3 e 4A**).

Além disso, as HbHevs são ricas em glicina e apresentam o motivo conservado S*X[WYF]*G[WYF]*[CS]GX{4}[Y*C], onde a presença do “X” seguido (ou não) por um número entre chaves indica a quantidade de qualquer resíduo de aminoácido; os resíduos entre colchetes indicam que a posição é preenchida por qualquer um deles; os resíduos marcados com “*” são os responsáveis pela ligação à quitina.

Fig. 3. Alinhamento do domínio conservado das *hevein-like peptides* de *Hevea brasiliensis* (HbHevs). As linhas pontilhadas acima representam a predição das pontes dissulfeto (o HbHev11, marcado com “*”, foi predito em ausentar a ponte C²-C⁵). O motivo de ligação à quitina se encontra delimitado pelos retângulos pretos. Abaixo do alinhamento, as barras pretas com letras são o nível de conservação e a sequência consenso. Na base da figura estão as estruturas secundárias conservadas das HbHevs.



A massa molecular e o pI foram em média 4.15 kDa (variação entre 3.54 a 4.7 kDa) e 4.9 (4.0 a 7.5), respectivamente. O índice de hidropaticidade, porcentagem hidrofóbica e carga líquida média foram calculados em -0.5 (-0.96 a -0.23), 32.6% (28 a 40%) e -1 (-3 a 4), respectivamente. Ademais, todas as HbHevs foram preditas como antimicrobianas.

Análise fenética de peptídeos hevein-like

Foram alinhadas 682 sequências não redundantes, com identidade mínima de 59% e máxima de 94%. Entre as sequências alinhadas estão *pro-hevein-likes*, proteínas relacionadas à patogênese do tipo 4 (PR-4), quitinases e proteínas hipotéticas. O alinhamento múltiplo do domínio heveína revelou semelhanças entre as

sequências, como riqueza em glicina, conservação da posição das oito cisteínas (exceção à HbHev11, como mencionado anteriormente) e o padrão de resíduos responsáveis pela ligação à quitina (exceto HbHev11, novamente) (**Fig. Suplementar 1**).

Para uma melhor análise de similaridade, a árvore fenética foi construída com 373 sequências precursoras (excluindo aquelas sem peptídeo sinal), as quais se dividiram em três principais *clusters* (**Fig. Suplementar 2**). As HbHevs1, HbHev2, HbHev4 e HbHev5 se posicionaram no *cluster* “A” juntas com sequências que apresentam domínio Barwin C-terminal. As HbHev3, HbHev6 e HbHev7 no *cluster* “B”, juntas com precursores com domínio quitinase C-terminal. As HbHevs8-11 no *cluster* “C”, também unidas às proteínas com domínio quitinolítico.

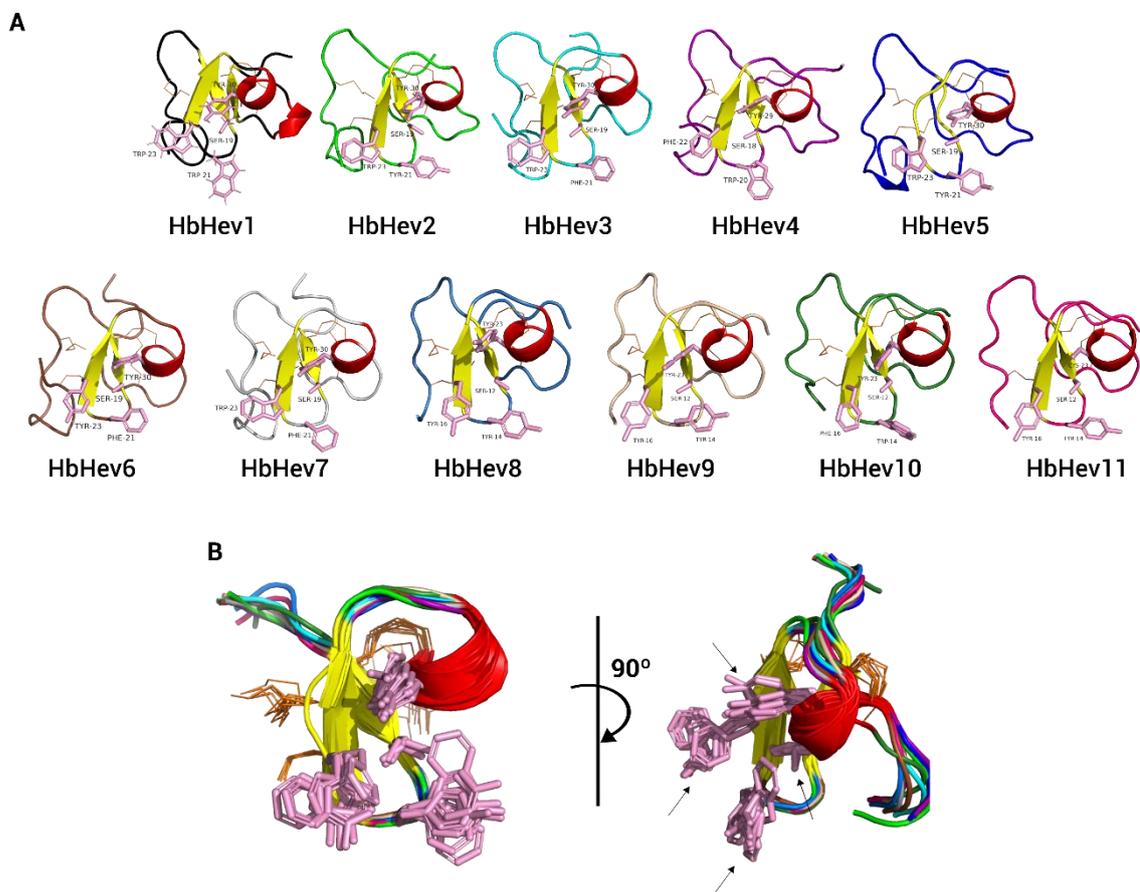
Esses três grupos se dividiram em sete *subclusters*: A-I, onde o HbHev4 se agrupou com duas proteínas PR-4 de *Manihot esculenta* (XP_021621640.1 e XP_021621710.1) com suporte igual a 100; A-II, com HbHev1 e HbHev2 formando um grupo (*bootstrap* 99) próximo às HbHev5 e pro-*hevein-like* de *Ricinus communis* (XP_002531287.1); B-III, formado pela HbHev6 e proteínas de *Tetracentron sinense* (Trochodendraceae); B-IV, com HbHev7 posicionado junto à quitinase de *M. esculenta* (XP_021627349.1) e *bootstrap* 100; B-V, formado por HbHev3 e endoquitinase de *Jatropha curcas* (XP_012065354.1), com *bootstrap* 95; C-VI, onde HbHev8 e HbHev11 (*bootstrap* 100) se posicionaram próximos à HbHev9 (93), bem como os três juntos às endoquitinases PR4 e proteínas hipotéticas de *Populus* spp. (89); C-VII, onde HbHev10 se mostrou semelhante à endoquitinase EP3 de *M. esculenta* (XP_012065081.1), com *bootstrap* 97.

Modelagem comparativa

A estrutura tridimensional da HbHev1 se encontrou resolvida e depositada sob PDB 1HEV, sendo utilizada como *template* para HbHev2 e HbHev5, compartilhando respectivamente 88.1% e 86.1% de identidade (**Tabela suplementar 3**). Para HbHev4 foi utilizado o modelo 1Q9B como *template* (78.1% identidade compartilhada). Por outro lado, para HbHev3, HbHev6 e HbHev7 foi empregado o módulo ligante à quitina de uma quitinase de *Hevea brasiliensis* (PDB: 4MPI), com 73.8%, 69.1% e 85.7% de identidade compartilhada, respectivamente. No caso das HbHev8 e HbHev10 foram usadas endoquitinase de *Arabidopsis thaliana* AF-O24658-F1 (82.8% de identidade)

e AF-Q9M2U5-F1 (61.3%), respectivamente. As HbHev9 e HbHev11 foram usadas quitinases de *Oryza sativa* subsp. *japonica* AF-Q7Y1Z0-F1 (66.7% de identidade) e de *Zea mays* AF-P29022-F1 (69%), respectivamente. Os modelos tridimensionais e a região do sítio de ligação à quitina estão representados nas Figuras 4A e 4B, respectivamente.

Fig. 4. Estrutura tridimensional das HbHevs. **A.** Modelos das HbHevs com estruturas conservadas de dupla fita- β antiparalela e curta α -hélice indicadas em amarelo e vermelho, respectivamente. Os resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação com a quitina estão marcados pela cor rosa. As pontes dissulfeto estão indicadas pela cor laranja. **B.** Alinhamento dos modelos HbHevs com ênfase na região ligante à quitina. As setas indicam os resíduos de serina, triptofano, fenilalanina e tirosina que formam o sítio ligante.



Os melhores modelos das HbHevs apresentaram mais de 90% dos seus resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis à torção pelo *Ramachandran plot* (Fig. suplementar 3). Os valores de Z-score indicaram que todos os modelos possuem qualidade estrutural semelhante aos peptídeos de mesmo tamanho com estruturas tridimensionais resolvidas. A pontuação global dos modelos pelo

QMEANDisCo variou entre 0.66 a 0.77.

Simulação em dinâmica molecular

As modificações estruturais foram avaliadas nos gráficos de configuração de estrutura secundária (**Fig. Suplementar 4**), desvio da raiz média quadrática (RMSD), número de pontes de hidrogênio, raio de giro e flutuação da raiz quadrática média (RMSF) (**Fig. 5 e 6**). Ao longo da dinâmica houveram breves formações e perdas de fitas- β e α -hélices (**Fig. Suplementar 4**). No entanto, a cadeia principal que forma o núcleo ligante (duas fitas- β antiparalelas centrais e a curta α -hélice adjacente) permaneceu estável, com exceção da HbHev11 (**Fig. 7 e Fig. Suplementar 4**). Nessa região, a posição dos seus resíduos de aminoácidos (Ser, [Trp, Tyr, Phe], [Trp, Tyr, Phe] e Tyr) permaneceu exposta ao solvente. Com relação à superfície de potencial eletrostático, foi observada a distribuição das regiões catiônicas e aniônicas (**Fig. 8**).

Fig. 5. Gráficos RMSD (A), pontes de hidrogênio (B) e raio de giro (C) das HbHevs ao longo de 100 ns de dinâmica molecular.

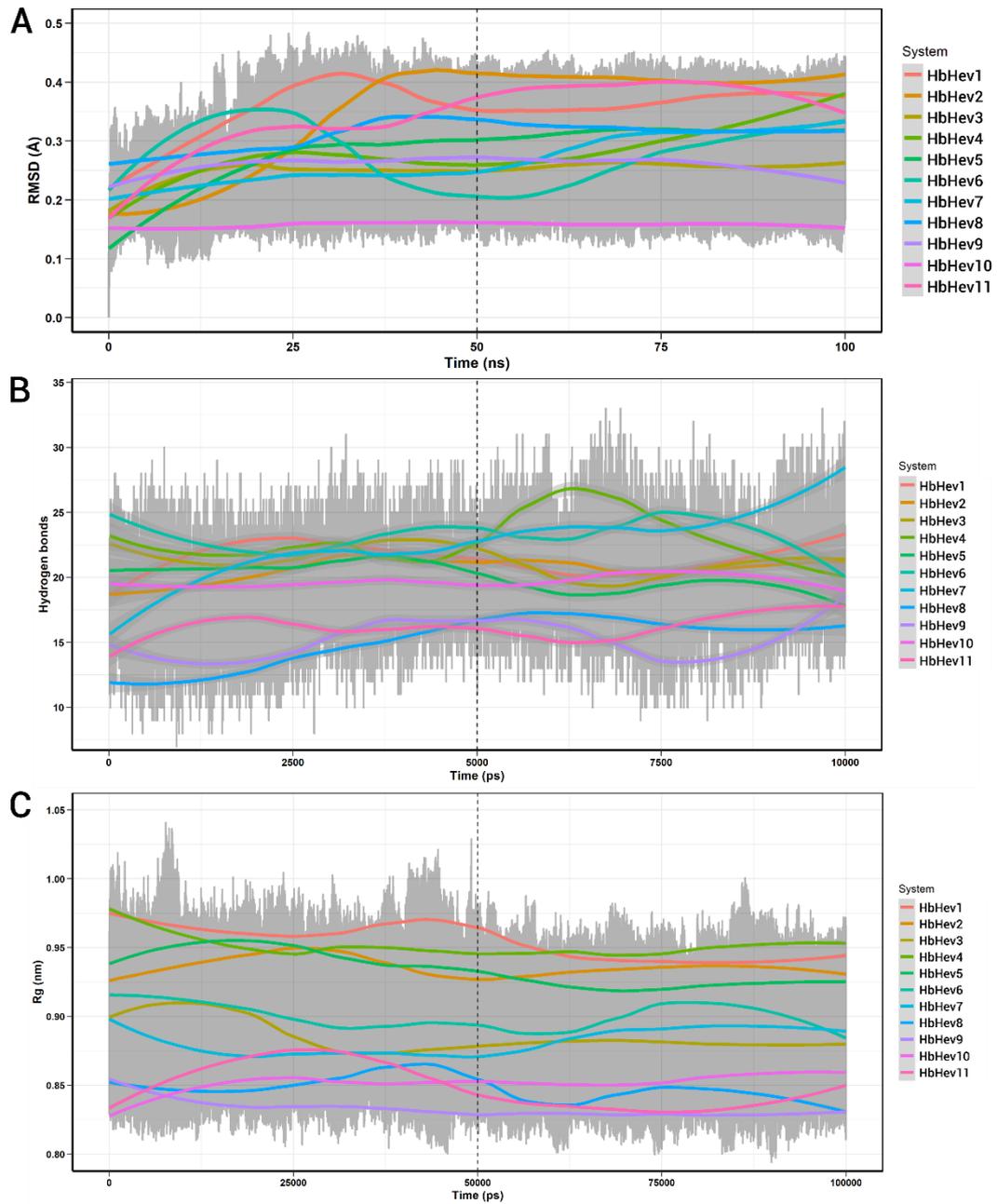
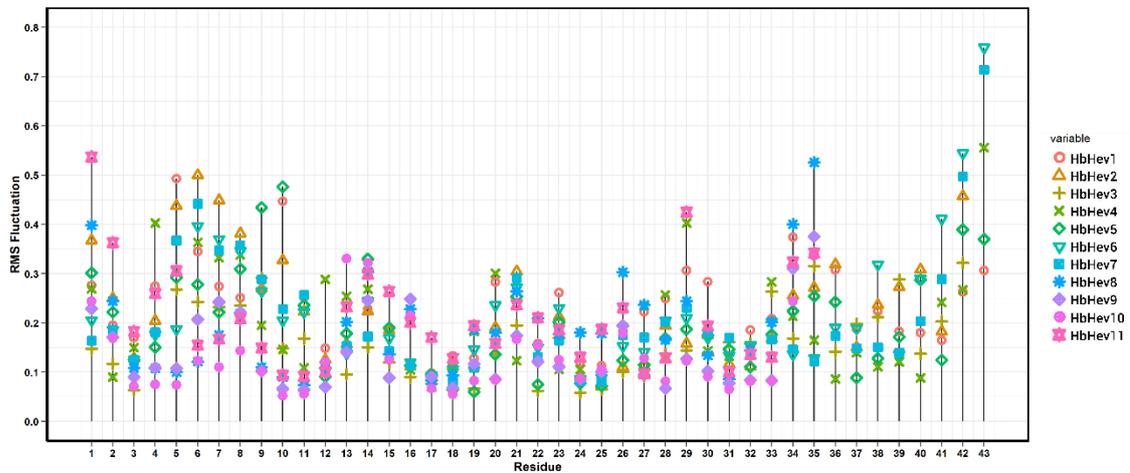


Fig. 6. Gráfico flutuação da raiz quadrática média (RMSF) das onze HbHevs ao longo da dinâmica molecular.



Todos os peptídeos apresentaram maiores flutuações em ambas as extremidades. Além disso, foram observados maiores amplitudes de flutuação nos resíduos de aminoácidos 5-10 da alça dos HbHevs1-7 e nos resíduos 14 e 16 (ligantes à quitina) de HbHevs8-11 (**Fig. 6**). O b-factor (**Fig. 7**) suporta uma alta mobilidade atômica em alças e extremidades, onde estão localizados os aminoácidos com maior flexibilidade.

Ao final da simulação em dinâmica molecular, os modelos estruturais apresentaram número de pontes de hidrogênio (HB) próximos entre si, com exceção do HbHev7 onde foi possível observar um crescimento exponencial (**Fig. 5B**). Apesar disso, os modelos estruturais de todos os HbHevs se mostraram praticamente compactos após a metade da simulação, principalmente os HbHevs8-11 que exibiram os menores raios de giro (**Fig. 5C**).

Fig. 7. Modelos tridimensionais das HbHevs antes e após simulação molecular (cores verde e ciano, respectivamente), bem como seus respectivos b-factor médios. As distâncias (RMSD) entre os modelos no alinhamento antes-pós dinâmica estão indicadas em nanômetros. As cores dos b-factor médios seguem um gradiente de cores, do mais quente (vermelho, regiões que apresentaram maior movimentação durante a dinâmica) ao mais frio (azul, regiões com menor agitação).

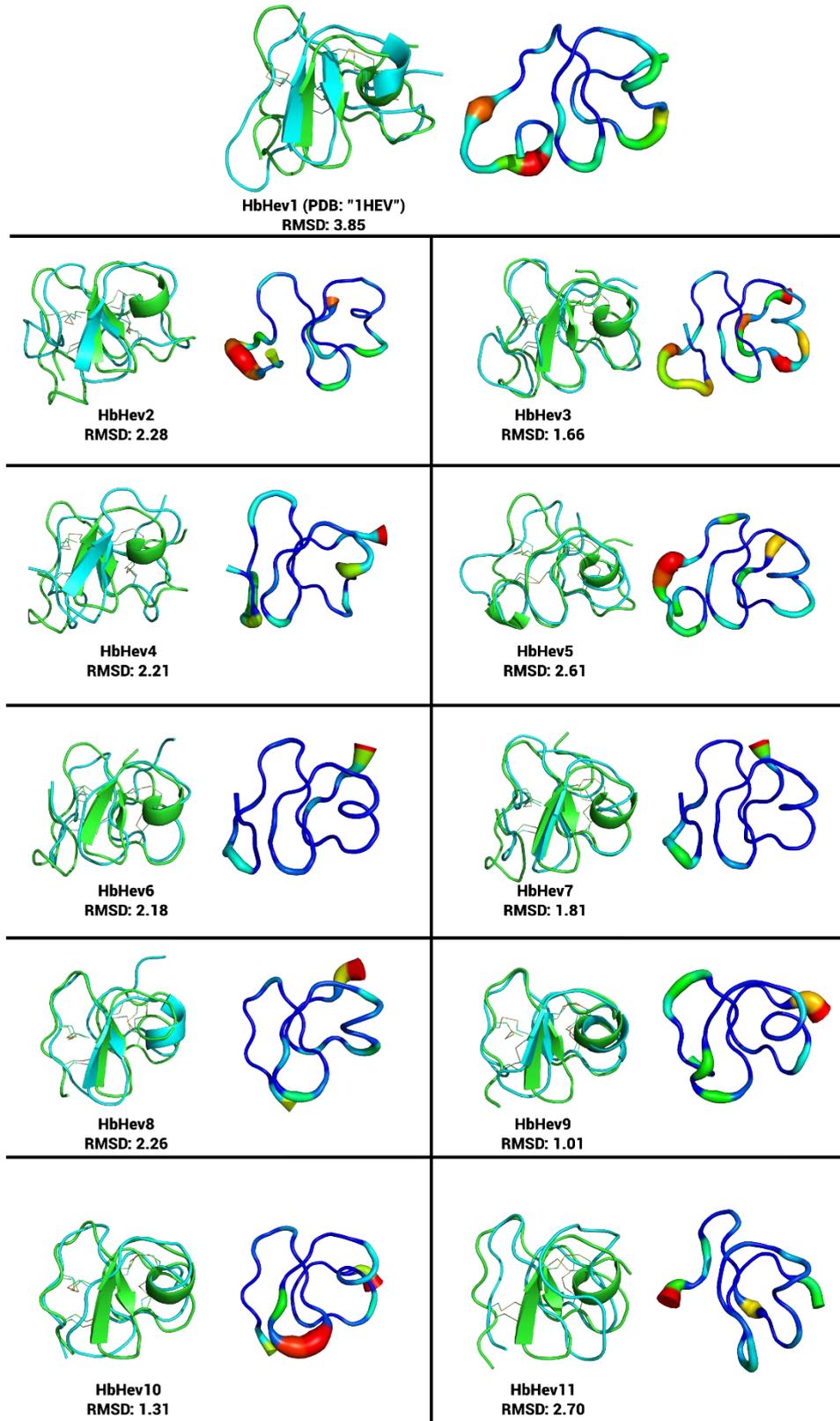
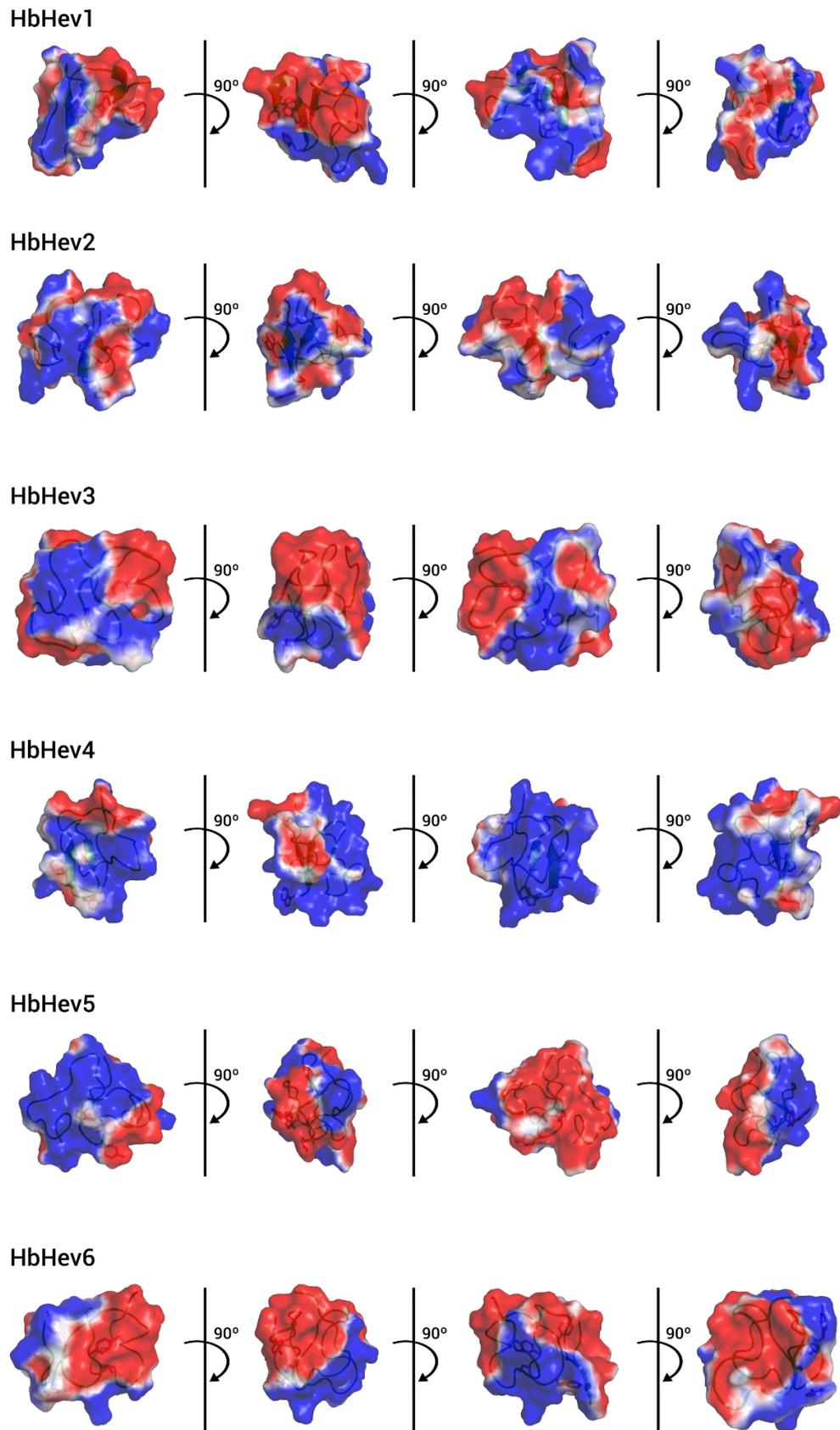
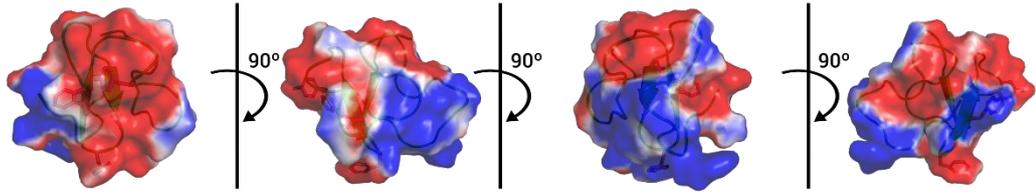


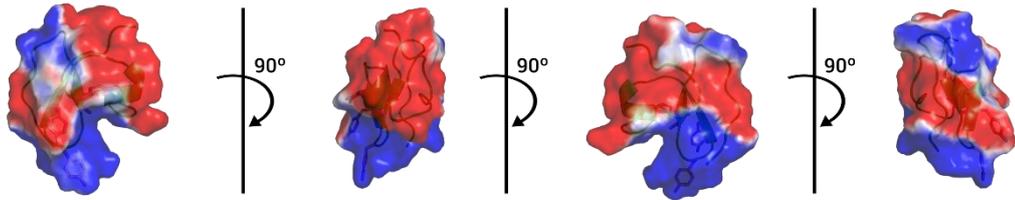
Fig. 8. Superfície de potencial eletrostático das HbHevs após simulações em dinâmica molecular. Regiões catiônicas, aniônicas e neutras estão representadas pelas cores azul, vermelha e branca, respectivamente.



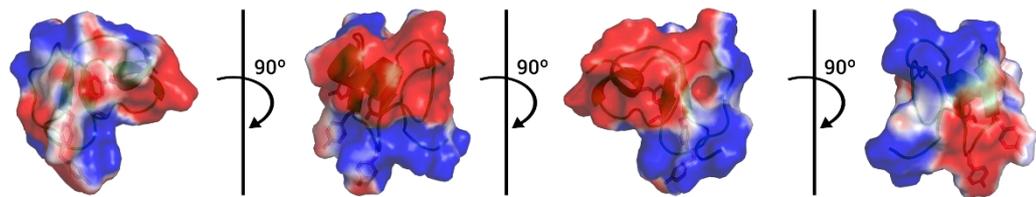
HbHev7



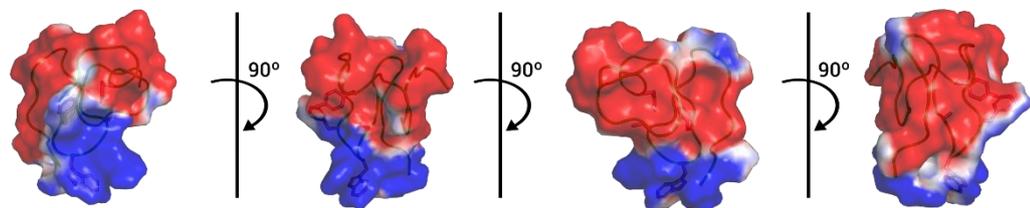
HbHev8



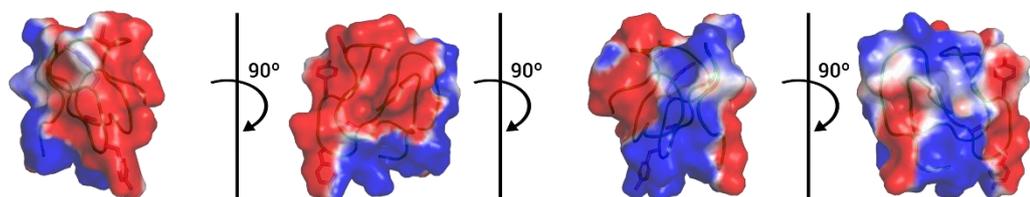
HbHev9



HbHev10



HbHev11



Discussão

A demanda por peptídeos bioativos para tratamento antimicrobiano tem sido um fator decisivo na área de prospecção de compostos bioativos naturais (SANTOS-SILVA et al., 2020). Nesse sentido, as técnicas de mineração *in silico* vêm sendo

escolhidas como uma alternativa preliminar, além de minimizar custos laboratoriais (por ex., reagentes) e geração de resíduos tóxicos para o meio ambiente. Dessa forma, a identificação dos polipeptídeos alvos e predição de suas características bioquímicas fornecem informações importantes para pesquisas seguintes voltadas à extração e purificação dessas moléculas (AMADOR et al., 2021; SANTOS-SILVA et al., 2020).

Na mineração, todos os 11 peptídeos *hevein-like* de *H. brasiliensis* foram extraídos pelas metodologias de BLASTp e HMMER3, porém, essa última se mostrou mais eficiente ao identificar todos eles em um menor número TS. A eficácia do HMMER3 deve-se à rápida busca de sequências através do alinhamento local probabilístico aprimorado pelo HMM, onde parâmetros e suposições são mapeados, e pontuações de probabilidade *log-odds* são calculadas (EDDY, 2009). A precisão do algoritmo o tornou uma ferramenta importante nos estudos de prospecção *in silico* de peptídeos antimicrobianos, como também referencial comparativo para novos métodos desenvolvidos para essa finalidade (HAMID & FRIEDBERG, 2019). Por exemplo, Santos-Silva et al. (2021), na busca por defensinas no genoma de *Manihot esculenta*, utilizaram HMMER3 junto ao BLAST e RegEX onde, ao contrário do presente estudo, todos encontraram o mesmo número de sequências candidatas.

As sequências candidatas encontradas foram constituídas por peptídeo sinal, domínio heveína 8C, região dobradiça e um longo domínio C-terminal. Essas sequências se dividiram em dois grupos baseados na constituição da proteína carga C-terminal (barwin e quitinase) (**Fig. 2**), semelhante à configuração observada na árvore fenética UPGMA (**Fig. Suplementar 2**) onde outros precursores de peptídeos *hevein-like* 8C (Viridiplantae) seguiram esse padrão de clusterização. Van Holle et al. (2017) sugeriram que as pro-proteínas heveína/Barwin tiveram origem a partir da arquitetura heveína/quitinase, apesar que tal interpretação vem de uma inferência fenética e não filogenética. Segundo Van Holle & Van Damme (2019), a ordem heveína/quitinase é destacada como uma característica específica de Angiospermas (Embryophyta), enquanto o inverso quitinase/heveína é típico de algas verdes (Clorophyta). Os domínios heveína e C-terminal podem ser separados pela clivagem da região dobradiça por endopeptidases na etapa pós-traducional (LOO et al., 2021; SLAVOKHOTOVA et al., 2017). No entanto, não se pode afirmar no presente trabalho se os domínios heveínas das HbHevs são separados. Todavia, estudos relataram que longas cadeias com repetição de glicina/prolina/serina na região de dobradiça podem

indicar a capacidade de clivagem entre os domínios (KINI et al., 2017; LOO et al., 2021; SLAVOKHOTOVA et al., 2017; WONG et al., 2017).

Ao observar o alinhamento entre as regiões do peptídeo *hevein-like* maduro (**Fig. 2**), quatro HbHebvs (8-11) de precursores com domínio quitinase ausentaram sete aminoácidos entre as posições 5 e 11 (entre C¹ e C²) (**Figs. 2 e 3**), ocasionando a perda de uma alça no modelo estrutural (**Fig. 4A**). Baseado na árvore UPGMA (**Fig. Suplementar 2**) e em estudos semelhantes, a ausência dessa região aparenta ser uma característica comum entre precursores endoquitinases classe IV. As endoquitinases (ou proteínas PR-3 e PR-4) que apresentam o domínio heveína estão dispostas nas classes I e IV, que se diferenciam, respectivamente, pela presença ou ausência da primeira alça (DZHAVAKHIYA; OZERETSKOVSKAYA; ZINOVYEVA, 2007; PASSARINHO & VRIES, 2002). Entre algumas das sequências similares com esse padrão de estrutura primária estão precursores *chitinase 1* de *Populus x canadenses* (GenBank: AEZ67300.1), *endochitinases EP3-like* de *Prunus dulcis* (XP_034198866.1), de *Syzygium oleosum* (XP_030471779.1), de *Manihot esculenta* (XP_021602528.1) e de *Citrus clementina* (XP_006442844.1).

A predição da localização das HbHevs em vacúolos está de acordo com estudos relacionados às proteínas do látex de *Hevea brasiliensis* que se encontram inseridas em lutóides dos laticíferos (BERTHELOT, PERUCH e LECOMTE, 2016; RAMOS et al., 2019). Lutóides são organelas ácidas (pH interno de aproximadamente 5.5), osmossensíveis, semelhantes aos vacúolos e estocam proteínas líticas (por ex., quitinases), íons (Ca⁺², Mg⁺² e Cu⁺²) e peptídeos *hevein-like*. Após uma lesão, a diferença entre a pressão do laticífero e atmosfera resulta no rompimento dos lutóides, então as heveínas são liberadas para defesa contra herbívoros/patógenos e cicatrização (BERTHELOT, PERUCH e LECOMTE, 2016; NELLESEN et al., 2011; RAMOS et al., 2019; SHI et al., 2019). O processo curativo ocorre, consecutivamente, pela dimerização dessas pequenas lectinas na presença de íons de Ca⁺², ligações com os resíduos N-acetilglicosamina da proteína receptora glicosilada de 22 kDa (encontradas na superfície de partículas de látex), agregação das partículas por pontes multivalentes e então coagulação do látex (BERTHELOT, PERUCH e LECOMTE, 2016; BOTTIER, 2020; GIDROL et al., 1994). Junto a essa possibilidade, os HbHevs1-5 também tiveram suas localizações preditas para o meio extracelular (incluindo parede e membrana celular), semelhante aos outros peptídeos *hevein-like*, como os ginkgotídeos de *Ginkgo biloba* (Gimnosperma) que tiveram sua via de

secreção inferida para fora do citoplasma (WONG et al., 2016). Esse direcionamento extracelular e a presença de domínio C-terminal antimicrobiano (Barwin) sugerem uma função de defesa sistêmica (BERTHELOT et al., 2016; MAIA et al., 2021).

Através da modelagem e simulação em dinâmica molecular, foi possível observar a importância da conservação das posições de cisteínas e glicinas para a estabilidade e dobramento da estrutura das HbHevs. Esse padrão também foi discutido por Van Holle e Van Damme (2019) em seus estudos sobre a história evolutiva das lectinas, onde relatam a permanência desse traço no domínio heveína entre linhagens basais (por exemplo, em algumas bactérias) e derivadas (plantas e metazoários). Os resíduos de cisteína, glicina e prolina (entre demais aminoácidos) participam dos nós e dobramentos que resultam na compactação estrutural, estabilizados pelas pontes de dissulfeto e hidrogênio. Nas HbHevs foi observado raios de giro constantes e próximos entre si (**Fig. 5C**), não havendo relação de proporcionalidade com o número de HBs formadas (**Fig. 5B**). Torna-se claro, dessa maneira, que a estabilidade de compactação desses peptídeos está ligada aos nós de cisteínas e dobramentos estruturais. Ademais, as análises de b-factor nos modelos testados combinadas ao RMSF (**Figs. 6 e 7**) revelaram que as HbHevs apresentam estrutura geral semi-rígida e regiões terminais flexíveis, podendo inclusive conter alças com alta vibração atômica (exceto em HbHevs8-11).

Relativo ao núcleo ligante, os HbHevs apresentaram conservação dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação à quitina, enfatizando a função primária de reconhecimento de carboidratos. Esses resíduos compõem as duas fitas- β antiparalelas centrais (Ser, [Trp, Tyr, Phe] e [Trp, Tyr, Phe]) e a curta α -hélice adjacente (Tyr), as quais são mantidas estáveis em razão das pontes dissulfeto, garantindo, assim, o posicionamento do sítio ligante para o meio externo (**Fig. 4A e B**). Os resíduos ligantes aromáticos (Tyr-14/Trp-14 e Tyr-16/Phe-16) de HbHevs8-11 exibiram maior flexibilidade em relação aos dos demais peptídeos (Trp-21/ Trp-20/Tyr-21/ Phe-21 e Trp-23/ Phe-22/Tyr-23) (**Fig. 6 e 7**). Como observado no estudo de Porto et al. (2012), peptídeos *hevein-like* são caracterizados pelas suas estruturas rígidas, havendo, em alguns casos, resíduos de aminoácidos ligantes à quitina com acentuados picos de flutuação, como em XP_002973523 de *Selaginella moellendorffii*. O sítio ligante apresenta uma forma semelhante a uma “garra de quatro dedos” (4-*finger claw*). Sua propriedade de reconhecimento de oligômeros ou polímeros de N-acetilglicosamina pode ocorrer via interações de empilhamento CH- π entre os

resíduos aromáticos (Trp, Tyr ou Phe) com os anéis da piranose e o grupo acetila, assim como Ser e Tyr formam pontes de hidrogênio entre seus grupos hidroxilas com as porções carbonilas e 3-OH dos sacarídeos (NISHIO et al., 2014; SOLANKE et al., 2019). Todavia, o HbHev11 apresentou mutações que podem impactar no reconhecimento de carboidratos. A substituição C17S, baseado nas simulações em dinâmica moleculares, parece ter desestabilizado a geometria da cadeia principal do núcleo ligante (aminoácidos 13-17 e 21-23) (**Fig. 7**), coincidindo com a alta flutuação nessa região (**Figs. 6**). Fica claro, assim, a importância da ponte C²-C⁵ para formar um alicerce na região e preservar a organização dessas estruturas secundárias. Além disso, a mutação Y23C poderia reduzir a afinidade com N-acetilglicosamina baseado nos peptídeos *hevein-like* de Viridiplantae alinhados, os quais exibiram 95% de conservação da Tyr nessa posição (os demais 5% incluem apenas Phe ou His, que possuem cadeia lateral aromática) (**Fig. Suplementar 1**). Até onde se sabe, esse é o primeiro estudo a reportar um peptídeo *hevein-like* com mutações tão distintas no motivo conservado de ligação à quitina, necessitando, assim, de mais simulações (por ex., *docking*) para avaliar se essas características influenciam no reconhecimento de carboidratos.

Os HbHevs, embora preditos em sua maioria como aniônicos (exceção para HbHev2 e HbHev4), exibiram supostas regiões com superfície eletrostática positiva, como o sítio de ligação à quitina dos HbHev1, HbHevs3-5 e HbHevs 8-10, além da alça catiônica (aminoácidos 4-11) dos HbHevs1-5 e HbHev7 (**Fig. 8**). A carga parcial positiva nessas posições podem ser determinantes no processo de reconhecimento dos carboidratos carregados negativamente, além da possibilidade de interação da alça catiônica com envoltórios de patógenos. Nesse último caso, sua cadeia principal e os resíduos de aminoácidos apresentaram acentuada liberdade de movimentação e flutuação (**Figs. 6 e 7**), o que poderia favorecer a acomodação e desestruturação membranar de patógenos (LIU, FANG e WU, 2013; YEAMAN e YOUNT, 2003). Ao avaliar o alinhamento múltiplo com outros peptídeos *hevein-like* de táxons distintos em Viridiplantae (**Fig. Suplementar 1**), é possível compreender que a presença de aminoácidos catiônicos na alça N-terminal é uma característica compartilhada e que pode estar relacionada à alguma função, como foi sugerido no presente trabalho. Assim, tornam-se necessárias outras simulações a fim de elucidar o papel desse traço estrutural.

Por outro lado, o sítio ligante com carga parcial aniônica dos HbHev2, HbHev6

e HbHev7 poderia auxiliar na acomodação da quitina, tendo em vista que o polissacarídeo pode ser encontrado na forma catiônica. Os grupos amina das unidades N-acetilglicosamina, quando submetidos a pH abaixo do pI, são convertidos na forma carregada positiva (ROY et al., 2017). Sítio ligante com superfície aniônica já foi detectado em outros peptídeos *hevein-like*, como a *morintide 1* (mO1) de *Moringa oleifera* que apresentou atividade antifúngica contra *Alternaria alternata* e *A. brassiciola* (KINI et al., 2017).

É importante ressaltar, no entanto, que a carga líquida e a configuração eletrostática propostas para as HbHevs são baseadas em pH próximo à neutralidade, e sabe-se que os fluidos *in planta* podem ser ácidos pela presença de polifenóis e rompimento dos lutóides ácidos nos laticíferos (BERTHELOT, PERUCH e LECOMTE, 2016). Os parâmetros de simulação em dinâmica molecular não foram configurados para condições ácidas, dada a complexidade de fatores que tornam o meio ácido, assim como não há registro de valores de pH nos fluidos de *H. brasiliensis*. Por outro lado, as condições escolhidas na simulação (meio aquoso com salinidade adequada às condições fisiológicas humana) permitem levantar futuras aplicações das HbHevs na saúde humana.

Apesar da caracterização referente às estruturas das HbHevs consistirem apenas no domínio heveína de maneira isolada, o presente estudo não descartada possíveis interações com proteínas de carregamento C-terminal (quitinase ou Barwin). Existem estudos de purificação que identificaram proteínas quiméricas, como a endoquitinase 6LNR presente em folhas de *Simarouba glauca*, onde a ligação entre os domínios permaneceu intacta (BALU et al., 2020). Tal configuração permite função conjunta do domínio heveína em ancorar à quitina em uma orientação e geometria favorável à quitinólise pelo sítio ativo do domínio quitinase (BALU et al., 2020). Assim, existe a possibilidade dos domínios inseridos nos precursores das HbHevs se manterem conectados *in planta*.

Conclusões e perspectivas

A prospecção *in silico* mostrou-se capaz de detectar onze peptídeos *hevein-like* em *H. brasiliensis* com potencial função antimicrobiana. A árvore fenética UPGMA revelou similaridade entre HbHevs e proteínas com domínio heveína em outras espécies da família Euphorbiaceae, como *M. esculenta*, *R. communis*, *J. curcas*, bem

como outras angiospermas como *T. sinense* e *Populus* spp. As características como carga líquida catiônica ou aniônica, solúveis em água, porcentagem hidrofóbica em média 32.6% e as sequências de aminoácidos irão direcionar em métodos apropriados para suas extrações, identificação e purificações em laboratório.

As simulações em dinâmica molecular das HbHevs evidenciaram rigidez na cadeia principal do núcleo ligante, enquanto que alças e extremidades apresentaram maior flexibilidade na estrutura tridimensional. Tais efeitos associados à carga parcial nessas regiões aparentam ser determinantes na sua função primária de defesa, visto que os resíduos de aminoácidos que se posicionam nessas regiões são compartilhados entre diversos táxons de Viridiplantae. No entanto, nesse estudo foi encontrada a HbHev11 que apresentou mutações que tornou sua estrutura diferente do conhecido dos demais peptídeos *hevein-like*. Sendo assim, mais estudos são mandatórios a fim de avaliar o impacto dessas mutações no seu reconhecimento aos carboidratos.

Diante disso, o presente trabalho sugere que os HbHevs podem atuar na aderência de superfícies ricas em GlcNAc, como também na atração eletroestática com carboidratos e membranas carregadas, o que pode resultar na disrupção dos envoltórios de patógenos. Contudo, são necessários testes *in vitro* para confirmar os mecanismos de ação e avaliar as aplicações biotecnológicas.

Agradecimentos

Os autores expressam suas gratidões ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e bolsas providas.

Referências

AGRAWAL, P. et al. In Silico Approach for Prediction of Antifungal Peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 323, 2018.

ALVES, R. R. et al. Ovicidal lectins from *Moringa oleifera* and *Myracrodruon urundeuva* cause alterations in chorionic surface and penetrate the embryos of *Aedes aegypti* eggs. **Pest Management Science**, v. 76, n. 2, p. 730–736, 2020.

AMADOR, V. C. et al. Lipid Transfer Proteins (LTPs)—Structure, Diversity and Roles beyond Antimicrobial Activity. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1281, 2021.

ARCHER, B. L. The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. 4. Isolation and characterization of crystalline hevein*. **Biochemical Journal**, v. 75, n. 2, p. 236–240, 1960.

BALU, K. E. et al. Structure of intact chitinase with hevein domain from the plant *Simarouba glauca*, known for its traditional anti-inflammatory efficacy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1381–1392, 2020.

BENINI, R. et al. Manual de restauração da vegetação nativa, Alto Teles Pires, MT. **The Nature Conservancy**, 2016.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In: PULLMAN, B. (Ed.). **Intermolecular Forces**. The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry. Dordrecht: Springer Netherlands, v. 14p. 331–342. 1981.

BERTHELOT, K. et al. *Hevea brasiliensis* prohevein possesses a conserved C-terminal domain with amyloid-like properties in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 4, p. 388–399, 2016.

BERTHELOT, K.; PERUCH, F.; LECOMTE, S. Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro)hevein proteins. **Biochimie**, v. 127, p. 258–270, 2016.

BOTTIER, C. Biochemical composition of *Hevea brasiliensis* latex: A focus on the protein, lipid, carbohydrate and mineral contents. In: **Advances in Botanical Research**. [s.l.] Elsevier, v. 93, p. 201–237. 2020.

CAMPOS FILHO, E. M. Guia de Identificação de Espécies-Chave para a Restauração Florestal na Região de Alto Teles Pires Mato Grosso. **The Nature Conservancy**, p. 248, 2016.

DZHAVAKHIYA, V. G.; OZERETSKOVSKAYA, O. L.; ZINOVYEVA, S. V. Chapter 10 - Immune response. In: DYAKOV, Y. T.; DZHAVAKHIYA, V. G.; KORPELA, T. (Eds.). **Comprehensive and Molecular Phytopathology**. Studies in Plant Science. Amsterdam: Elsevier, p. 265–314. 2007.

EDDY, S. R. A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. Genome Informatics 2009. **Proceedings of the 20th international conference**. Pacifico Yokohama, Japan. Published by imperial college press and distributed by world scientific publishing CO., out. 2009. Disponível em: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9781848165632_0019>. Acesso em: 23 nov. 2021

GAMES, P. D. et al. Computer aided identification of a Hevein-like antimicrobial peptide of bell pepper leaves for biotechnological use. **BMC Genomics**, v. 17, n. S12, p. 999, 2016.

GIDROL, X. et al. Hevein, a Lectin-like Protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) Is Involved in the Coagulation of Latex. p. 6, 1994.

GORDTS, S. C. et al. NICTABA and UDA, two GlcNAc-binding lectins with unique antiviral activity profiles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 6, p. 1674–1685, 2015.

HESS, B. et al. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435–447, 2008.

HOFFMANN, D. et al. Identification of lectin receptors for conserved SARS-CoV-2 glycosylation sites. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 19, 2021.

KINI, S. G. et al. Morintides: cargo-free chitin-binding peptides from *Moringa oleifera*. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 68, 2017.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.

LIU, L.; FANG, Y.; WU, J. Flexibility is a mechanical determinant of antimicrobial activity for amphipathic cationic α -helical antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1828, n. 11, p. 2479–2486, 2013.

LOO, S. et al. Anti-Fungal Hevein-like Peptides Biosynthesized from *Quinoa* Cleavable Hololectins. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5909, 2021.

MAIA, L. B. L. et al. Structural and Evolutionary Analyses of PR-4 SUGARWINs Points to a Different Pattern of Protein Function. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 734248, 2021.

MARCHLER-BAUER, A.; BRYANT, S. H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic acids research**, v. 32, n. Web Server issue, p. W327-331, 2004.

NELLESEN, A. et al. Self-Healing in Plants as a Model for Self-Repairing Elastomer Materials. **Polymers from Renewable Resources**, v. 2, n. 4, p. 149–156, 2011.

NISHIO, M. et al. CH– π hydrogen bonds in biological macromolecules. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, n. 25, p. 12648–12683, 2014.

OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656–1676, 2004.

PASSARINHO, P. A.; VRIES, S. C. Arabidopsis Chitinases: a Genomic Survey. **The Arabidopsis Book**, v. 1, p. e0023, 2002.

- PORTO, W. F. et al. *In silico* identification of novel hevein-like peptide precursors. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 127–136, 2012.
- RAMOS, M. V. et al. Laticifers, Latex, and Their Role in Plant Defense. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 6, p. 553–567, 2019.
- RONČEVIĆ, T.; PUIZINA, J.; TOSSI, A. Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5713, 2019.
- ROY, J. C. et al. Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms. In: XU, Z. (Ed.). **Solubility of Polysaccharides**. [s.l.] InTech, 2017.
- SANTOS-SILVA, C. A. DOS et al. Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, *In Silico* Prediction and Perspectives in the Omics Era. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 14, p. 117793222095273, 2020.
- SANTOS-SILVA, C. A. DOS et al. Cassava (*Manihot esculenta*) defensins: Prospection, structural analysis and tissue-specific expression under biotic/abiotic stresses. **Biochimie**, v. 186, p. 1–12, 2021.
- SECCO, R.S.; BIGIO, N.C. *Hevea in Flora do Brasil 2020*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22704>>. Acesso em: 30 out. 2021.
- SHI, M. et al. The formation and accumulation of protein-networks by physical interactions in the rapid occlusion of laticifer cells in rubber tree undergoing successive mechanical wounding. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 8, 2019.
- SLAVOKHOTOVA, A. A. et al. Hevein-like antimicrobial peptides of plants. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, n. 13, p. 1659–1674, 2017.
- SOLANKE, C. O. et al. Atomistic simulation of carbohydrate-protein complex formation: Hevein-32 domain. **Scientific reports**, v.9, n.1, p. 1-7, 2019.
- STUDER, G. et al. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. **Bioinformatics**, v. 36, n. 6, p. 1765–1771, 2020.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 25 jun. 2021.
- THOMAS, S. et al. CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl_1, p. D774–D780, 2010.
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server, p. W71–W74, 2007.
- VAN HOLLE, S. et al. Comparative Study of Lectin Domains in Model Species: New Insights into Evolutionary Dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1136, 2017.

VAN HOLLE, S.; VAN DAMME, E. J. M. Messages From the Past: New Insights in Plant Lectin Evolution. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 36, 2019.

VAN PARIJS, J. et al. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258–264, 1991.

WAGHU, F. H. et al. CAMP_{R3}: a database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides: Table 1. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1094–D1097, 2016.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 54, n. 1, 2016.

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, n. Web Server, p. W407–W410, 2007.

WONG, K. H. et al. Ginkgotides: Proline-Rich Hevein-Like Peptides from Gymnosperm *Ginkgo biloba*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

WONG, K. H. et al. Vaccatides: Antifungal Glutamine-Rich Hevein-Like Peptides from *Vaccaria hispanica*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1100, 2017.

YE, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.

Material suplementar

Tabela suplementar 1. Padrão de seqüências *hevein-like* descrita por Santos-Silva et al. (2020) utilizadas na mineração RegEx.

| | |
|--------------------|--|
| <i>Hevein-like</i> | • CX{12}CCX{5}CX{6}CX{3}CXCX{3}C; |
| | • CX{4,5}CX{4}CCX{5}CX{6}C; |
| | • CX{3,8}CX{4}CCX{5}CX{6}CX{3,5}CX{1,3}C; |
| | • CX{6}CX{8}CCX{3}CX{10}C; |
| | • CX{6}CX{7,8}CCX{3}CX{10}C; |
| | • CX{4,5}CC[GS]X{2}GXCGX[GST]X{2,3}[FWY]C[GS]X[AGS]; |
| | • CX{12}CCX{5}CX{6}CX{3}C; |
| | • CX{1,8}CX{4,5}CCX{5}CX{6}CX{3,5}CX{3,4}C |

“C” indica o resíduo de cisteína; “X” e os números entre chaves indicam a quantidade de qualquer um dos 20 resíduos de aminoácidos naturais; os resíduos de aminoácidos encontrados entre colchetes indicam que a posição pode ser preenchida por um deles.

Tabela suplementar 2. Sumário dos dados de *hevein-like* mineradas, incluindo o código da sequência referência (RefSeq), comprimento do peptídeo sinal, abreviação da região *hevein-like* estudada e descrição do domínio C-terminal.

| Sequência referência (RefSeq) dos candidatos | Comprimento do peptídeo sinal | Abreviação da região <i>hevein-like</i> | Domínio C-terminal |
|--|-------------------------------|---|------------------------|
| XP_021650927.1 | 21 aa* | HbHev1 | Barwin |
| XP_021672285.1 | 21 aa | HbHev2 | Barwin |
| XP_021672589.1 | 21 aa | HbHev3 | Glycoside hydrolase 19 |
| XP_021656801.1 | 22 aa | HbHev4 | Barwin |
| XP_021656794.1 | 21 aa | HbHev5 | Barwin |
| XP_021691072.1 | 19 aa | HbHev6 | Glycoside hydrolase 19 |
| XP_021685895.1 | 22 aa | HbHev7 | Glycoside hydrolase 19 |
| XP_021657784.1 | 31 aa | HbHev8 | Glycoside hydrolase 19 |
| XP_021657786.1 | 25 aa | HbHev9 | Glycoside hydrolase 19 |
| XP_021662463.1 | 28 aa | HbHev10 | Glycoside hydrolase 19 |
| XP_021663467.1 | 18 aa | HbHev11 | Glycoside hydrolase 19 |

*aa" significa aminoácidos

Tabela suplementar 3. Lista dos *templates* utilizados para modelagem comparativa das HbHevs e a porcentagem de identidade compartilhada entre as suas sequências.

| Peptídeo | Template (banco de dados) | % identidade compartilhada |
|----------|---------------------------|----------------------------|
| HbHev1 | - | - |
| HbHev2 | 1HEV (PDB) | 88.1 |
| HbHev3 | 4MPI (PDB)* | 73.8 |
| HbHev4 | 1Q9B (PDB) | 78.1 |
| HbHev5 | 1HEV (PDB) | 86.1 |
| HbHev6 | 4MPI (PDB)* | 69.1 |
| HbHev7 | 4MPI (PDB)* | 85.7 |
| HbHev8 | AF-O24658-F1 (AlphaFold)* | 82.8 |
| HbHev9 | AF-Q7Y1Z0-F1 (AlphaFold)* | 66.7 |
| HbHev10 | AF-Q9M2U5-F1 (AlphaFold)* | 61.3 |
| HbHev11 | AF-P29022-F1 (AlphaFold)* | 69.0 |

"-" significa que não foi realizada a modelagem comparativa, uma vez que já se encontra resolvida e depositada;

"*" significa que foi utilizado apenas o módulo ligante à quitina (o código se refere a uma quitinase quimérica).

Fig.suplementar 1. Parte inicial do alinhamento múltiplo (gerado com auxílio do Jalview) entre regiões maduras *hevein-like* da *Hevea brasiliensis* e outras espécies vegetais depositadas no NCBI. As barras pretas com letras são o nível de conservação e a sequência consenso das 693 sequências. As sequências de aminoácidos foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE. A figura completa foi disponibilizada em arquivo separado.

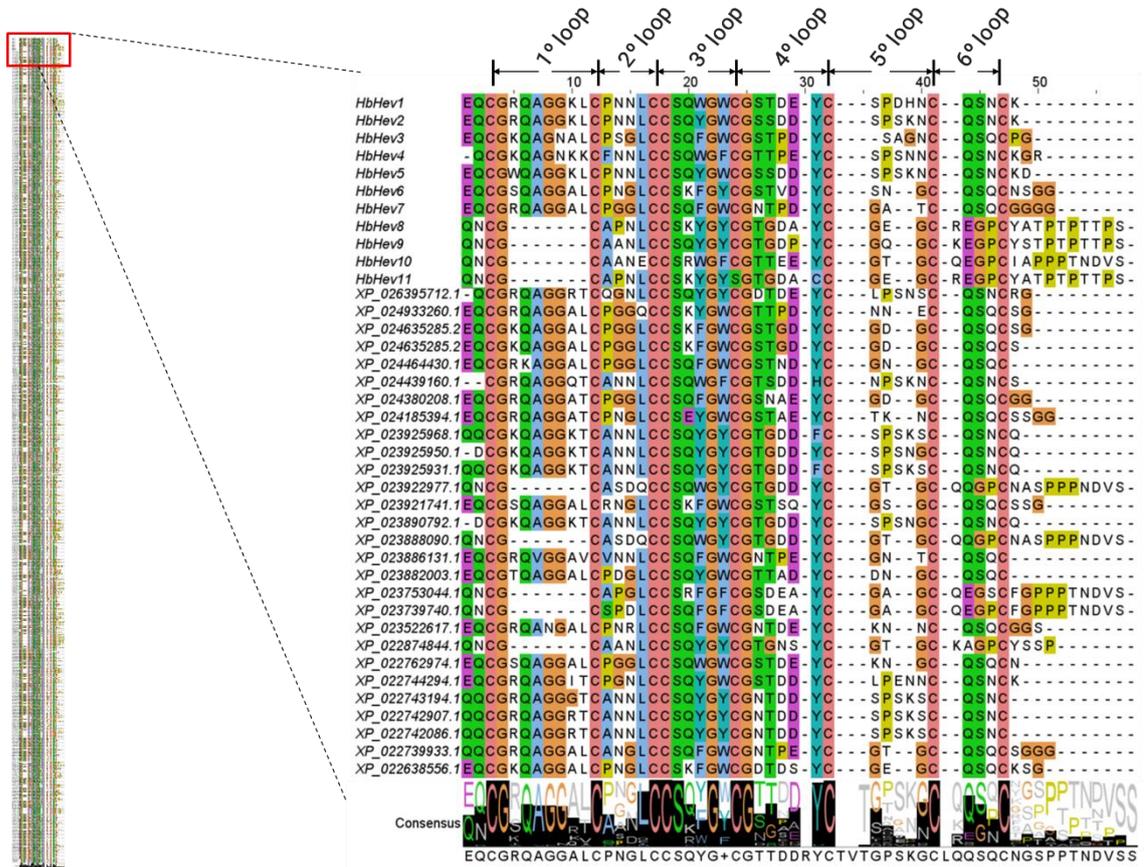


Fig. Suplementar 2. Árvore UPGMA dos 373 precursores de peptídeos *hevein-like*. Três principais *clusters* A, B e C estão marcados pelas cores vermelha, verde e azul, respectivamente. Os ramos com diferentes tonalidades representam os *subclusters* que as HbHevs (essas com fonte laranja) formam com proteínas mais similares de outras espécies em Viridiplantae. Os valores de *bootstrap* estão indicados em números decimais na base dos grupamentos. A figura com alta resolução foi disponibilizada em arquivo separado.

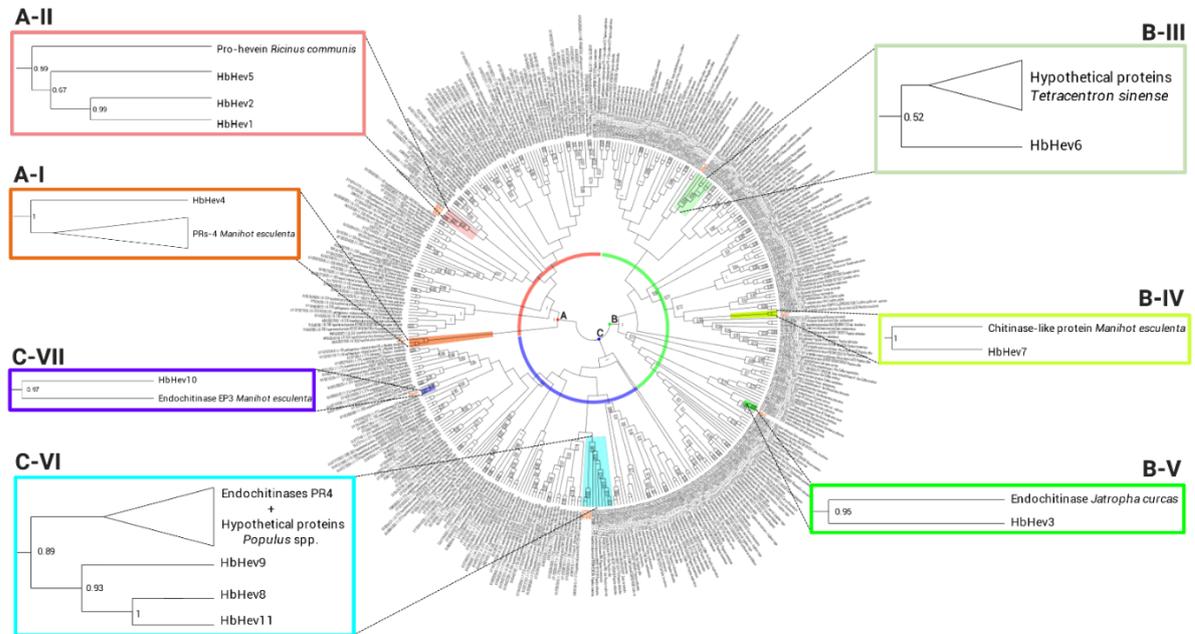


Fig.suplementar 3. Diagrama de Ramachandran das HbHevs, onde estão indicadas as suas respectivas percentagens de resíduos localizados em regiões mais favoráveis à torção (RMFR, *residues in most favoured regions*).

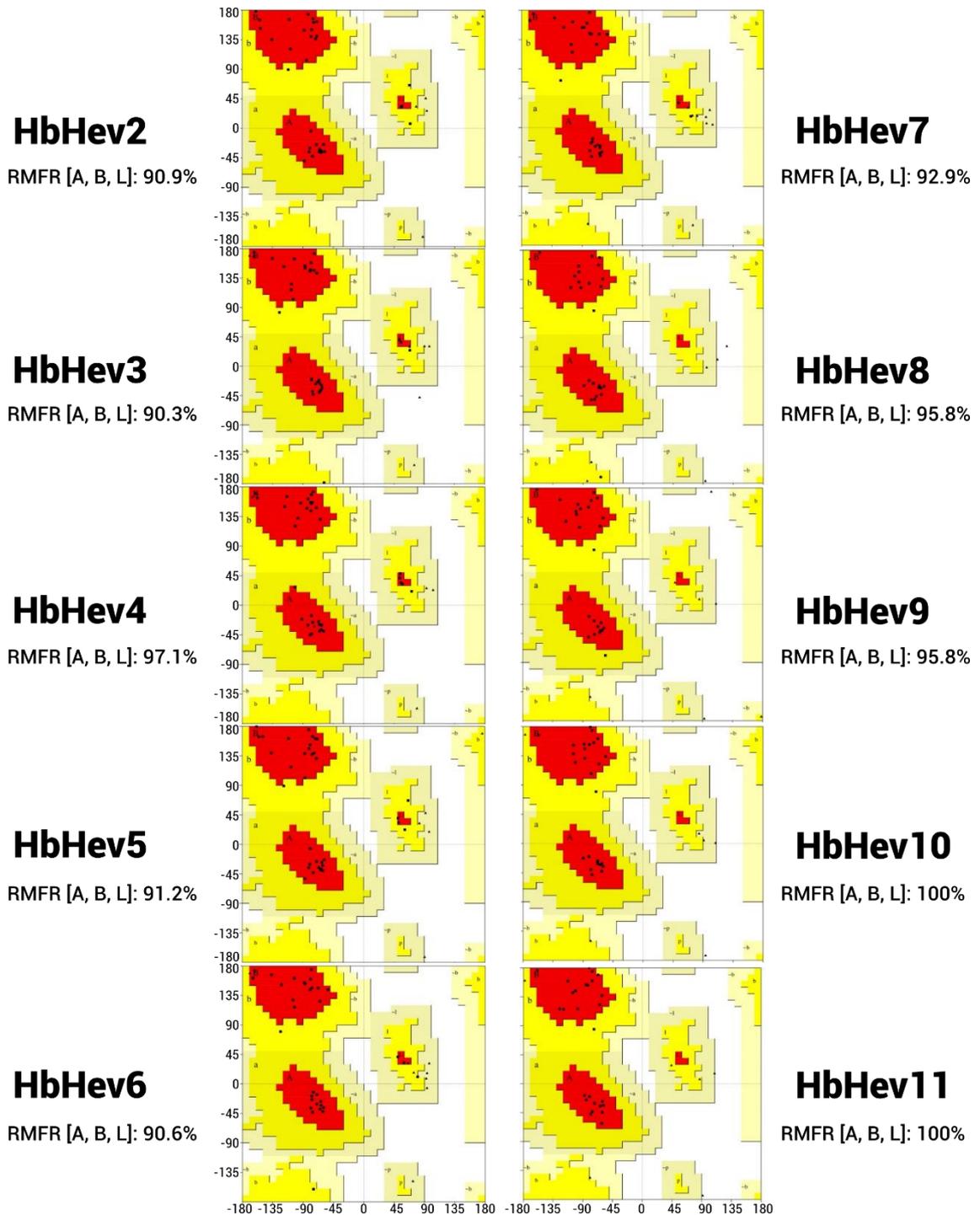
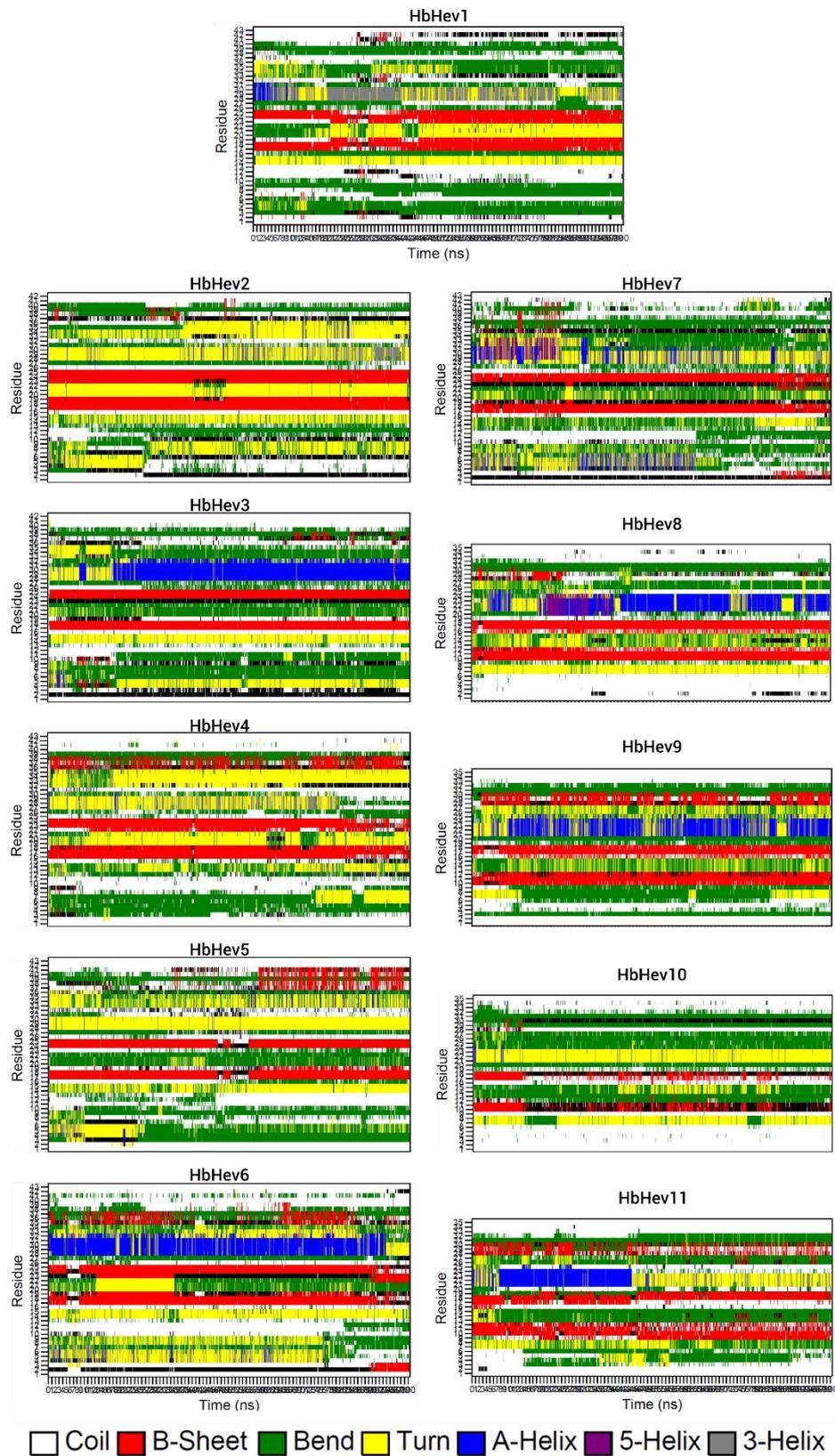


Fig. Suplementar 4. Gráficos de configuração de estrutura secundária das HbHevs ao longo de 100 ns de dinâmica molecular. Estão representados episódios de formação de folhas β (vermelho), α -hélices (azul, roxo e cinza), voltas (amarelo), dobras (verde) e sem estrutura definida (branco).



3.2 ARTIGO 2

Peptídeo bioinspirado com atividade antimicrobiana: sequências modificadas de *hevein-like* de *Hevea brasiliensis*

Ricardo Salas Roldan-Filho¹, Livia Maria Batista Vilela¹, Carlos André dos Santos-Silva², Patrícia Maria Guedes Paiva³, Ana Maria Benko-Iseppon¹

¹*Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil*

²*IRCCS Materno Infantile Burlo Garofolo, Trieste, Itália.*

³*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil*

Resumo

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) têm sido considerados uma importante ferramenta no controle de infecções. No entanto, compostos como peptídeos *hevein-like* podem ser classificados como tóxicos e alergênicos. O desenho racional de peptídeos derivados dessa classe de AMPs pode ser uma forma de desenvolver substâncias não nocivas com potencial ação antimicrobiana. O presente trabalho desenhou racionalmente peptídeos bioinspirados em peptídeos *hevein-like* de *Hevea brasiliensis* (HbHev_PBs). Através de ferramentas computacionais, foram utilizados peptídeos *hevein-like* de *H. brasiliensis* como *templates* para o desenho racional, modificando a sequência em tamanho e mutações pontuais de forma que as estruturas primárias fossem preditas como anfifílicas, catiônicas e antimicrobianas, além de reduzir probabilidades de toxicidade, alergenicidade e atividade hemolítica. Os modelos tridimensionais preditos de algumas HbHev_PBs exibiram conformações β -*hairpin* compactas e semi-rígidas na dinâmica molecular. Entre os peptídeos selecionados para síntese, o HbHev_PB8 foi capaz de inibir o crescimento de *Acinetobacter baumannii*, tendo como concentração mínima inibitória de 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para pesquisas futuras, os peptídeos sintéticos serão testados contra fungos e outras bactérias, além de verificar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* para avaliar uma futura aplicação como antibióticos.

Palavras-chave: Peptídeos *hevein-like*. Modelagem *ab initio*. Simulação em dinâmica molecular. Desenho de peptídeos.

Introdução

As plantas, por muito tempo, têm sido exploradas e cultivadas pelo ser humano para diversos setores, como alimentício, energético, fitoterápico e farmacológico. Esses últimos devem-se ao potencial medicinal de seus compostos, que incluem metabólitos secundários e polipeptídeos. Entre as propriedades pode se destacar a atividade antimicrobiana, importante para mitigar a atual problemática do crescente número de casos de doenças causadas por agentes infecciosos, reportado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças e a Organização Mundial de Saúde (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (U.S.), 2019; WHO, 2016). Os casos de patógenos resistentes aos antibióticos convencionais têm estimulado pesquisas para desenvolvimento de novas moléculas bioativas, como pequenos peptídeos antimicrobianos (AMPs) capazes de atuar na membrana celular desses microrganismos (ALMEIDA et al., 2021).

Os AMPs podem ser organizados em classes de acordo com padrões de cisteína, hidrofobicidade e motivos conservados na estrutura primária, secundária e terciária (SANTOS-SILVA et al., 2020). À medida que AMPs naturais são descobertos, suas sequências podem ser utilizadas como *templates* para desenho de novos peptídeos bioinspirados a partir de regiões conservadas responsáveis pela sua atividade antimicrobiana (HUAN et al., 2020). Muitos peptídeos na sua forma nativa podem ser tóxicos e alergênicos, como a heveína e outros peptídeos *hevein-like*, sendo necessário realizar modificações pontuais para mitigar esses efeitos (KARISOLA et al., 2005). No desenvolvimento de peptídeos bioinspirados devem ser considerados a carga líquida, hidrofobicidade, anfifilicidade e toxicidade, assim como a tendência de formação de estruturas secundárias e sua estabilidade (HUAN et al., 2020).

Peptídeos *hevein-like* possuem como molécula protótipo a “heveína” identificada no látex *Hevea brasiliensis* (SANTOS-SILVA et al., 2020). São ricos em Gly e são classificados de acordo com a quantidade de cisteínas, podendo ser 6C, 8C ou 10C (SANTOS-SILVA et al., 2020; SLAVOKHOTOVA et al., 2017; TAM et al.,

2015). Apresentam motivo conservado responsável pela ligação à quitina, formado por $X_i-X_{i+2}-X_{i+4}-X_{i+11}$, sendo X_i o resíduo de serina, X_{i+2} e X_{i+4} são resíduos aromáticos, e X_{i+11} como resíduo de tirosina (ou, menos comum, outro resíduo aromático) (PORTO et al., 2012). Em estudo anterior de nosso grupo (Roldan-Filho et al., in prep.) foram identificados onze peptídeos *hevein-like* codificados no genoma de *H. brasiliensis* (HbHevs), com predição de carga líquida aniônica ou catiônica, porcentagem hidrofóbica média de 30% e potencial antimicrobiano.

Em razão da toxicidade de certos peptídeos *hevein-like* e a necessidade por novos agentes antimicrobianos, o presente trabalho buscou desenhar racionalmente peptídeos bioinspirados nos HbHevs (HbHev_PBs), avaliar *in silico* sua estrutura primária e tridimensional, assim como testar a atividade antimicrobiana *in vitro* contra patógenos humanos.

Metodologia

Desenho racional e síntese de peptídeos

As sequências de HbHevs foram utilizadas como *templates* para o desenho racional de peptídeos de até 20 aminoácidos. Os peptídeos foram modificados de forma que exibissem carga líquida catiônica, porcentagem hidrofóbica entre 30-60% (RONČEVIĆ; PUIZINA; TOSSI, 2019), predição antimicrobiana *in silico* (CAMPR3, ClassAMP, MLAMP e Antifp) e baixa probabilidade de toxicidade (ToxinPred), alergenicidade (AllerCatPro) e atividade hemolítica (Happenn) (GUPTA et al., 2013; JOSEPH et al., 2012; LIN e XU, 2016; MAURER-STROH et al., 2019; TIMMONS; HEWAGE, 2020).

Os peptídeos foram encomendados da NovoPro Bioscience Inc. (Shangai, China). A pureza dos peptídeos foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa e a massa molecular foi confirmada por espectrometria de massa em electrospray. Os peptídeos foram amidados na região C-terminal.

Modelagem ab initio e simulação em dinâmica molecular

Os modelos estruturais dos HbHev_PBs selecionados foram construídos pelo programa ROSETTA (versão 3.10), gerando mil modelos teóricos (KAUFMANN et al.,

2010). Os melhores modelos foram avaliados pela qualidade estereoquímica e de dobramento no Ramachandran plot (PROCHECK) e QMEANDisCo, respectivamente (LASKOWSKI et al., 1993; PORTO et al., 2012; SANTOS-SILVA et al., 2021; STUDER et al., 2020).

A simulação dos melhores modelos foi realizada pelo pacote computacional GROMACS 2019.4. Os modelos dos HbHevs foram centralizados em uma caixa cúbica com dimensões 4 x 4 x 4 nm e solvatados em água SPC (*Simple Point Charge*) (BERENDSEN et al., 1981). Foram adicionados íons Na e Cl para uma concentração fisiológica de 0.15 M de NaCl, seguido de minimização de energia em até 50.000 passos pelo algoritmo. A temperatura de 300 K foi mantida no conjunto NVT com restrição de átomos de soluto na posição inicial. O método LINCS (HESS et al., 2008) foi usado para restringir ligações envolvendo átomos de hidrogênio. A integração foi realizada pelo algoritmo *leap-frog* usando uma etapa de tempo de integração 2-fs. O tempo para cada simulação foi programado para 100 ns usando campos de força GROMOS 53A6 (OOSTENBRINK et al., 2004) e condições de contorno periódicas nas direções x, y e z. Por fim, a dinâmica molecular foi executada sob pressão e temperatura constantes de 1 atm e 300 K, respectivamente.

Teste atividade antimicrobiana in vitro

A concentração mínima inibitória (CMI) dos HbHev_PBs foram determinados por microdiluição em caldo, seguindo o protocolo de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) com modificações. As células bacterianas foram incubadas no meio Müller-Hinton (MH) *overnight* por 37 °C e diluídas até um índice de turbidez 0.5 McFarland (equivalente à $1-5 \times 10^8$ CFU/mL). O ensaio de microdiluição em caldo foi preparado em placas de 96 poços de microtitulação, com inóculo final de aproximadamente $1-5 \times 10^5$ CFU/mL e os peptídeos diluídos em série (1:1) a partir de 1 mg/mL. O CMI correspondeu a menor concentração de determinado peptídeo em inibir o crescimento bacteriano após incubação à 37 °C por 18h. Os poços que contiveram apenas o inóculo bacteriano corresponderam ao controle negativo (100% de crescimento). Foram testadas as cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Acinetobacter baumannii* (ATCC 13883), todas fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia do instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz-PE).

Resultados

Desenho racional e síntese de peptídeos

Foram desenhados 9 HbHev_PBs com predições de carga líquida entre +1 a +5, porcentagem hidrofóbica calculada entre 30 a 50%, probabilidade hemolítica entre 0.2% a 15.3% e ausência na toxicidade e alergenicidade preditas (**Tabela 1**). A maioria dos preditores antimicrobianos indicaram maiores probabilidades (em relação às sequências originais) e ações antibacterianas, antifúngicas e antivirais, sendo essa última destacada para o HbHev_PB9 por ser o único presumido a ter efeito anti-HIV (53%) (**Tabela 2**).

Tabela 1 – Peptídeos desenhados e suas caracterizações de carga líquida, porcentagem hidrofóbica, alergenicidade e probabilidade hemolítica. As ferramentas de predição utilizadas estão entre parênteses.

| Peptídeo | Carga líquida (APD3) | Porcentagem hidrofobicidade (APD3) | Toxicidade (ToxinPred) | Alergenicidade (AllerCatPro) | Probabilidade hemolítica (Happenn) |
|-----------|----------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| HbHev_PB1 | +4 | 50% | Não tóxico | Sem evidência | 0.106 |
| HbHev_PB2 | +5 | 35% | Não tóxico | Sem evidência | 0.080 |
| HbHev_PB3 | +5 | 30% | Não tóxico | Sem evidência | 0.006 |
| HbHev_PB4 | +4 | 45% | Não tóxico | Sem evidência | 0.055 |
| HbHev_PB5 | +4 | 45% | Não tóxico | Sem evidência | 0.153 |
| HbHev_PB6 | +4 | 35% | Não tóxico | Sem evidência | 0.016 |
| HbHev_PB7 | +5 | 35% | Não tóxico | Sem evidência | 0.011 |
| HbHev_PB8 | +5 | 30% | Não tóxico | Sem evidência | 0.004 |
| HbHev_PB9 | +1 | 40% | Não tóxico | Sem evidência | 0,002 |

Tabela 2 – Peptídeos desenhados e suas predições antimicrobianas pelas ferramentas CAMPR3, ClassAMP, MLAMP e Antifp.

| Peptídeo | CAMPR3 | | | ClassAMP (Predição e probabilidade) | | MLAMP (Predição e probabilidade) | Antifp (Antifúngico? + Score) |
|-----------|--------|------|------|--|-----------------------|---|-------------------------------------|
| | SVM | RF | DA | RF | SVM | | |
| HbHev_PB1 | 0.97 | 1 | 1 | Antibacteriano (0.99) | Antiviral (0.98) | • Antibacteriano (0.98). | Não |
| HbHev_PB2 | 0.87 | 0.82 | 0.88 | Antibacteriano (0.86) | Antiviral (0.94) | • Antibacteriano (0.89). | Sim (0.68) |
| HbHev_PB3 | 0.88 | 0.76 | 0.75 | Antibacteriano (0.86) | Antibacteriano (0.98) | • Antibacteriano (0.97); • Antifúngico (0.63). | Sim (0.48) |
| HbHev_PB4 | 0.94 | 0.97 | 1 | Antibacteriano (0.94) | Antibacteriano (0.91) | • Antibacteriano (0.98); • Antifúngico (0.62). | Sim (0.67) |
| HbHev_PB5 | 0.9 | 0.97 | 0.99 | Antibacteriano (0.93) | Antibacteriano (0.88) | • Antibacteriano (0.99); • Antifúngico (0.68). | Sim (0.10) |
| HbHev_PB6 | 0.95 | 0.9 | 0.93 | Antibacteriano (0.91) | Antiviral (0.94) | • Antibacteriano (0.96); • Antifúngico (0.57). | Não |
| HbHev_PB7 | 0.91 | 0.92 | 0.98 | Antibacteriano (0.82) | Antibacteriano (0.93) | • Antibacteriano (0.93); • Antifúngico (0.6). | Sim (0.26) |
| HbHev_PB8 | 0.96 | 0.87 | 0.95 | Antibacteriano (0.93) | Antiviral (0.96) | • Antibacteriano (0.95); • Antifúngico (0.59). | Sim (0.01) |
| HbHev_PB9 | 0,43 | 0,65 | 0,94 | Antibacteriano (0.71) | Antifúngico (0.94) | • Antibacteriano (0.75); • Antifúngico (0.6); • Antiviral (0.69); • Anti-HIV (0.53). | Sim (0.03) |

SVM = Support Vector Machines; **RF** = Random Forest; **DA** = Discriminant Analysis

Modelagem ab initio e simulação em dinâmica molecular

Os modelos tridimensionais gerados exibiram conformação em β -hairpin (HbHev_PB2 e HbHev_PBs6-9) e α - α -hairpin (HbHev_PB1 e HbHev_PBs3-5) (**Fig. 1**), com 92 a 100% dos seus resíduos de aminoácidos em regiões favoráveis à torção e pontuação global QMEANDisCo entre 0.38 ± 0.12 a 0.69 ± 0.12 . Entre o início e fim da dinâmica molecular, os HbHev_PB2 e HbHev_PBs6-8 não apresentaram diferenças acentuadas em suas estruturas, havendo conservação das fitas- β (**Fig. 1 e Fig. Suplementar 1**). Por outro lado, os HbHev_PB1 e HbHev_PBs3-5 perderam a

conformação helicoidal durante a simulação (**Fig. Suplementar 1**), sendo que apenas o primeiro manteve estabilidade após 50 ns (**Figs. 1 e 2A**). O número de pontes de hidrogênio (HBs) permaneceu constante após metade da simulação, enquanto as análises de raio de giro indicam que os modelos estruturais dos peptídeos são compactos (**Figs. 2B e C**). No geral, os HbHev_PBs exibiram extremidades e alças com maiores flutuações e agitação atômica, sendo HbHev_PB7 o mais rígido enquanto HbHev_PB3 foi o mais flexível (**Figs. 3A e B**). A maioria dos peptídeos apresentou uma predominância catiônica em suas superfícies, contrapondo o HbHev_PB5 e HbHev_PB9 que apresentaram regiões com maiores áreas neutras e aniônicas (**Fig. 1**).

Fig. 1 - Alinhamento entre modelos tridimensionais dos HbHev_PBs antes e após simulação molecular (cores verde e ciano, respectivamente), onde as distâncias (RMSD) estão indicadas em nanômetros. Abaixo dos alinhamentos estão as superfícies eletrostáticas (geradas pelo PyMOL) pós dinâmica, com as regiões catiônicas, aniônicas e neutras representadas pelas cores azul, vermelha e branca, respectivamente.

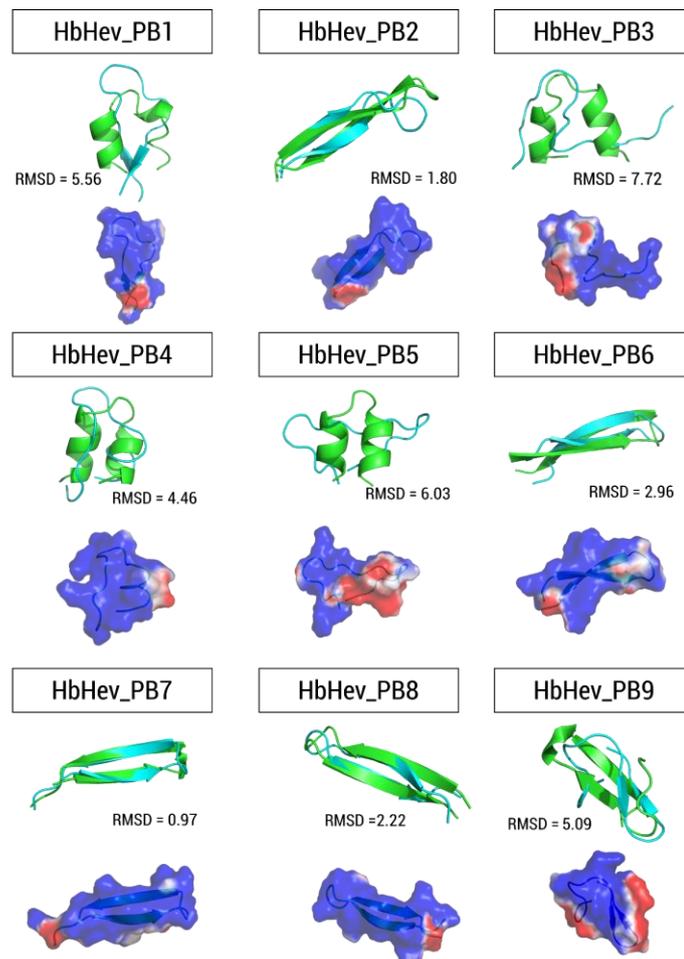


Fig. 2 – Gráficos do desvio quadrático médio (RMSD) (A), pontes de hidrogênio (HB) (B) e raio de giro (Rg) (C) dos modelos dos nove HbHev_PBs ao longo de 100 ns de dinâmica molecular.

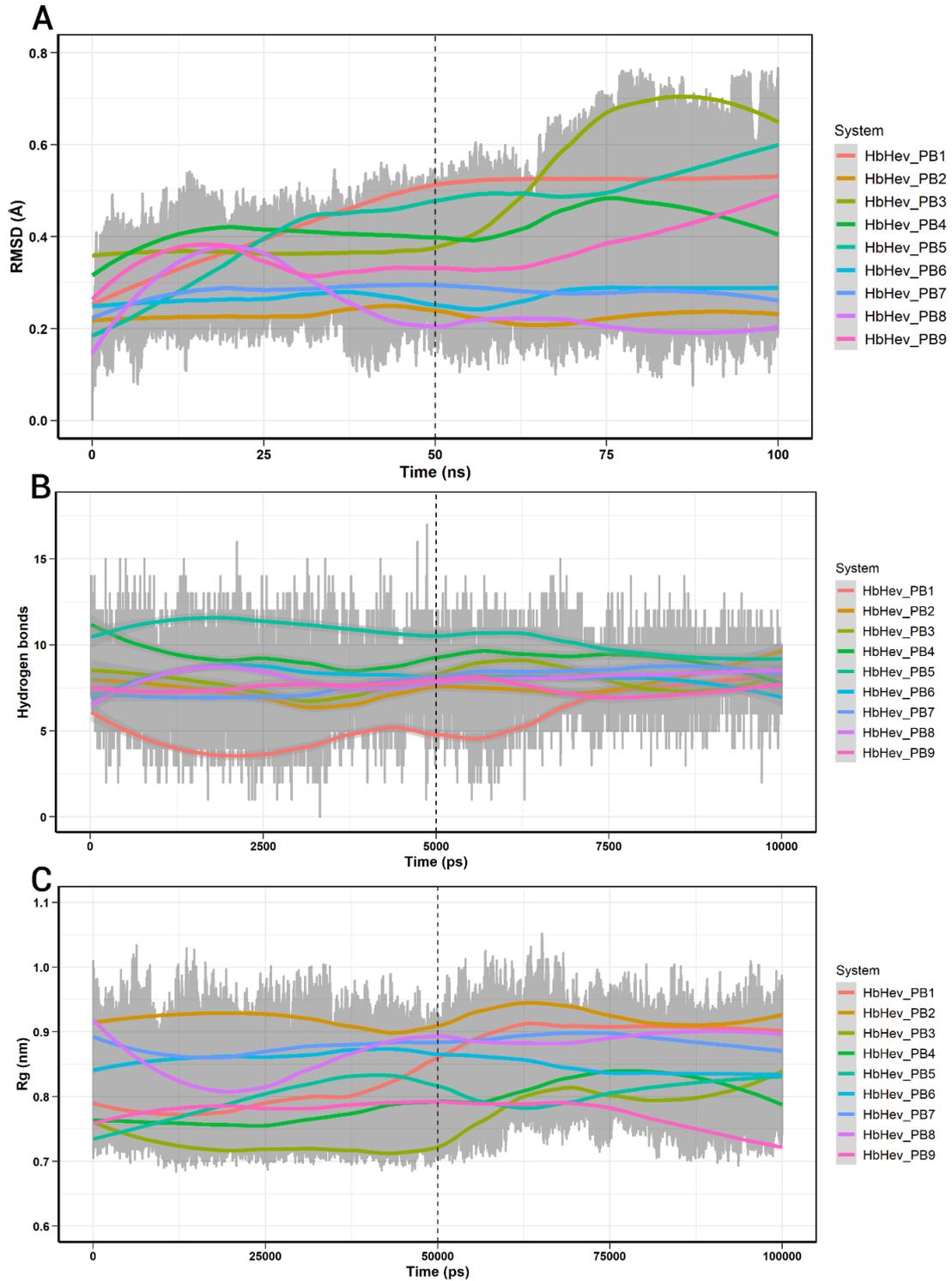
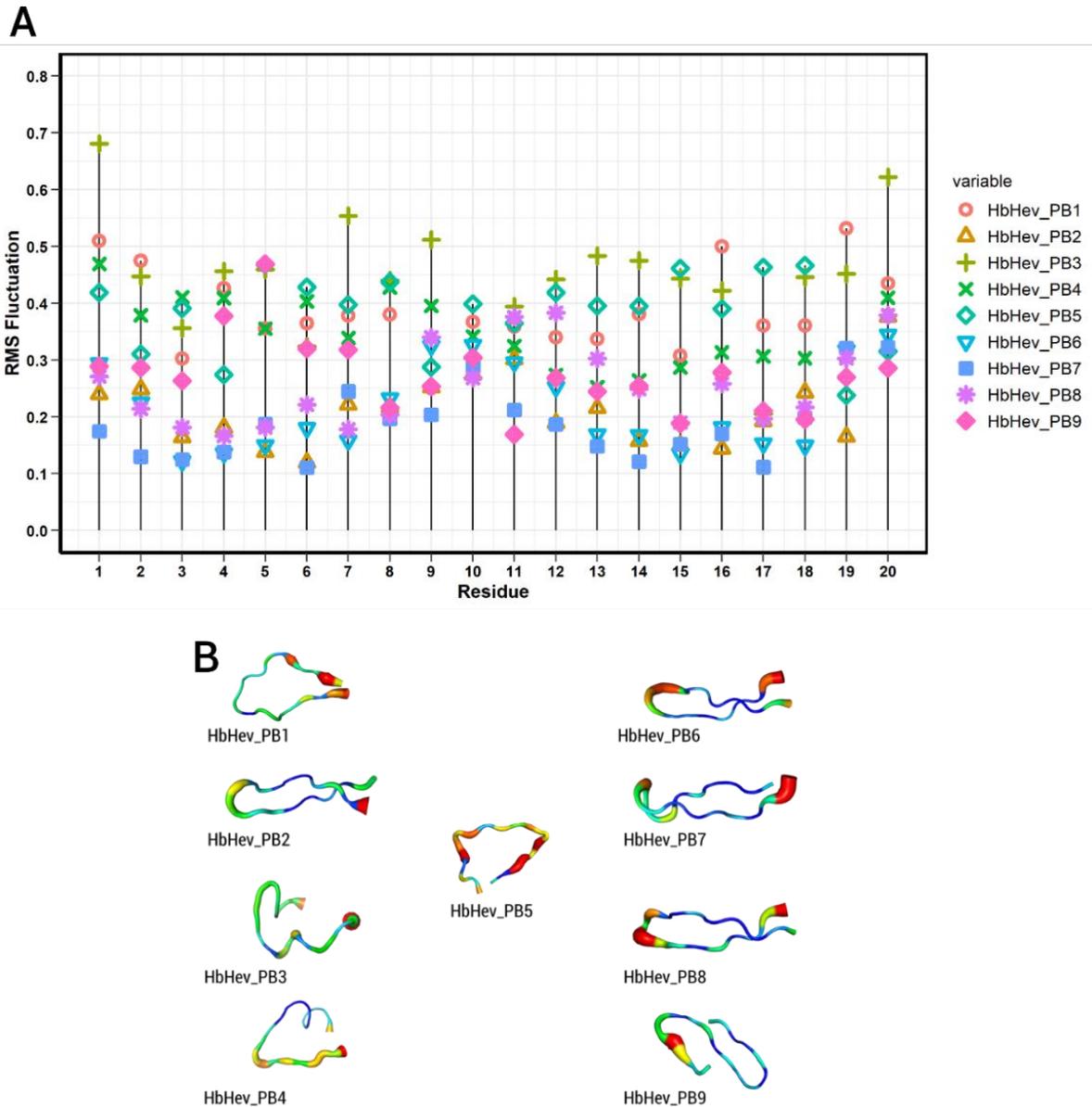


Fig. 3 – Gráfico da raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF) (A) e b-factor médios (B) dos modelos dos nove HbHev_PBs após dinâmica molecular de 100 ns. As cores dos b-factor médios seguem um gradiente de cores, do mais quente (vermelho, regiões que apresentaram maior movimentação durante a dinâmica) ao mais frio (azul, regiões com menor agitação).



Teste atividade antimicrobiana *in vitro*

Os HbHev_PB2, HbHev_PB7, HbHev_PB8 e HbHev_PB9 foram selecionados para os ensaios baseados nos cálculos de carga e hidrofobicidade, além nas predições de estruturas em β -hairpin estáveis com alças flexíveis. Foi observado que apenas o HbHev_PB8 apresentou atividade de inibição bacteriana, porém apenas contra a cepa Gram-negativa *A. baumannii* com CMI de $1024 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Concentração mínima inibitória (CMI) dos peptídeos sintetizados contra bactéria Gram-negativa e Gram-positiva.

| Bactérias testadas | Concentração mínima inibitória (CMI) | | | |
|---|--------------------------------------|-----------|--------------------------|-----------|
| | HbHev_PB2 | HbHev_PB7 | HbHev_PB8 | HbHev_PB9 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 13883) | - | - | 1024 µg.mL ⁻¹ | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | - | - | - | - |

“-“ = não foi observado atividade

Discussão

Peptídeos *hevein-like* são moléculas pouco exploradas para a saúde humana, pelo fato de muitos serem classificados como alergênicos e tóxicos (KARISOLA et al., 2005). O desenvolvimento de peptídeos derivados dessa classe de AMPs aparenta ser uma alternativa para enfrentar tal problemática, porém os estudos encontrados avaliaram apenas ação contra fitopatógenos (ODINTSOVA et al., 2020). Através de ferramentas computacionais, o presente estudo conseguiu desenhar racionalmente e sintetizar novos peptídeos modificados a partir de *hevein-like* de *Hevea brasiliensis* com o objetivo de desenvolver novas moléculas terapêuticas.

As modificações escolhidas na estrutura primária foram baseadas nos seus alvos, os envoltórios de bactérias e fungos. Segundo Almeida et al. (2021), um dos determinantes na potencialidade antimicrobiana é a presença dos resíduos de lisina e arginina que podem interagir com os grupos fosfato da superfície fosfolipídica por interação eletrostática e pontes de hidrogênio (ALMEIDA et al., 2021). A cationicidade limite de +5 foi baseada no estudo de Rončević e colaboradores (2019), onde informam que cargas maiores podem diminuir a atividade antimicrobiana e provocar maiores chances de hemólise para o hospedeiro. A faixa hidrofóbica de 30 a 50% nos HbHev_PBs é considerada ótima segundo esses trabalhos, uma vez que estruturas anfifílicas conseguem permeabilizar membranas dos patógenos, além de facilitar a solubilidade em água/tampões no uso clínico (ALMEIDA et al., 2021; RONČEVIĆ, PUIZINA e TOSSI, 2019).

Os modelos tridimensionais β -*hairpin* de HbHev_PB2 e HbHev_PBs6-8 exibiram menores amplitudes de RMSD e raio de giro (**Figs. 2A e C**), indicando conservação estrutural compacta, possivelmente pelas interações hidrofóbicas e HBs (TORRES et al., 2019). Tanto suas regiões terminais como as que formam alças foram preditas como apresentando maior flexibilidade e carga catiônica (**Fig. 3B**), o que

poderia contribuir para atração eletroestática e desestruturação das membranas dos patógenos (LIU, FANG e WU, 2013; YEAMAN e YOUNT, 2003). Além disso, a anfifilicidade combinada à cationicidade em estruturas fita β pode ampliar a potencialidade antimicrobiana seguindo o mecanismo de “carpete”, onde os peptídeos cobrem a superfície da membrana do patógeno, seguido de desordenação e ruptura (HUAN et al., 2020; JIN et al., 2005).

Dos nove peptídeos desenhados, foram selecionados os HbHev_PB2 e HbHev_PBs7-9 a fim de avaliar os efeitos das modificações pontuais. Apesar da similaridade nas predições de atividade biológica, apenas o HbHev_PB8 se mostrou ativo. Nota-se que uma maior fluutuabilidade na alça do peptídeo sintético, comparado aos demais, poderia estar relacionado com a inibição do crescimento de *A. baumannii*. Randall et al. (2022) desenvolveram o peptídeo sintético symbah-1 com estrutura β -hairpin capaz de inibir bactérias Gram-negativas, incluindo a *A. baumannii*. Seu estudo sugeriu a disrupção da membrana externa e interna como mecanismo de ação, que estaria associado à flexibilidade, anfifilicidade e hidrofobicidade. Apesar da ausência de atividade do HbHev_PB8 contra *S. aureus* e dos demais peptídeos sintetizados contra as cepas testadas, mais estudos serão desenvolvidos contra fungos e outras bactérias para avaliar o potencial desses peptídeos.

Conclusão

O presente trabalho conseguiu desenhar racionalmente peptídeos derivados das sequências de *hevein-like* de *Hevea brasiliensis*. Através de ferramentas computacionais, as HbHev_PBs aparentam ser promissoras pelas suas predições de carga superficial catiônica, anfifilicidade, potencial antimicrobiano e baixa toxicidade/alergenicidade, bem como alguns poderiam exibir estruturas compactas, estáveis e com regiões flexíveis. Entre os peptídeos selecionados, o HbHev_PB8 foi ativo contra *A. baumannii*. O levantamento de atividade antimicrobiana *in vitro* será ampliada para outras espécies de patógenos para definir os principais microrganismos alvos, além da avaliação de toxicidade *in vitro* e *in vivo* que serão importantes na determinação de segurança no uso dos peptídeos sintéticos como futuros fármacos.

Referências

ALMEIDA, C. V. et al. Differential interactions of the antimicrobial peptide, RQ18, with phospholipids and cholesterol modulate its selectivity for microorganism membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1865, n. 9, p. 129937, 2021.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In: PULLMAN, B. (Ed.). . **Intermolecular Forces**. The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry. Dordrecht: Springer Netherlands, v. 14p. 331–342. 1981.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (U.S.). **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019**. [s.l.] Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), nov. 2019. Disponível em: <<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

CLSI, CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A10. 2012.

GUPTA, S. et al. In Silico Approach for Predicting Toxicity of Peptides and Proteins. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–10, set. 2013.

HESS, B. et al. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435–447, 2008.

HUAN, Y. et al. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 582779, 2020.

JIN, Y. et al. Antimicrobial Activities and Structures of Two Linear Cationic Peptide Families with Various Amphipathic β -Sheet and α -Helical Potentials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 4957–4964, 2005.

JOSEPH, S. et al. ClassAMP: A Prediction Tool for Classification of Antimicrobial Peptides. **IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics**, v. 9, n. 5, p. 1535–1538, 2012.

KARISOLA, P. et al. Isolated hevein-like domains, but not 31-kd endochitinases, are responsible for IgE-mediated in vitro and in vivo reactions in latex-fruit syndrome. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 3, p. 598–605, 2005.

LIN, W.; XU, D. Imbalanced multi-label learning for identifying antimicrobial peptides and their functional types. **Bioinformatics**, v. 32, n. 24, p. 3745–3752, 2016.

LIU, L.; FANG, Y.; WU, J. Flexibility is a mechanical determinant of antimicrobial activity for amphipathic cationic α -helical antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1828, n. 11, p. 2479–2486, 2013.

MAURER-STROH, S. et al. AllerCatPro—prediction of protein allergenicity potential from the protein sequence. **Bioinformatics**, v. 35, n. 17, p. 3020–3027, 2019.

ODINTSOVA, T. et al. Hevein-Like Antimicrobial Peptides Wamps: Structure–Function Relationship in Antifungal Activity and Sensitization of Plant Pathogenic Fungi to Tebuconazole by WAMP-2-Derived Peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 7912, 2020.

OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656–1676, 2004.

PORTO, W. F. et al. In silico identification of novel hevein-like peptide precursors. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 127–136, 2012.

RANDALL, J. R. et al. Synthetic antibacterial discovery of symbah-1, a macrocyclic β -hairpin peptide antibiotic. **iScience**, v. 25, n. 1, p. 103611, 2022.

RONČEVIĆ, T.; PUIZINA, J.; TOSSI, A. Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5713, 2019.

SANTOS-SILVA, C. A. DOS et al. Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, In Silico Prediction and Perspectives in the Omics Era. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 14, p. 117793222095273, 2020.

SANTOS-SILVA, C. A. DOS et al. Cassava (*Manihot esculenta*) defensins: Prospection, structural analysis and tissue-specific expression under biotic/abiotic stresses. **Biochimie**, v. 186, p. 1–12, 2021.

SLAVOKHOTOVA, A. A. et al. Hevein-like antimicrobial peptides of plants. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, n. 13, p. 1659–1674, 2017.

TAM, J. et al. Antimicrobial Peptides from Plants. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 4, p. 711–757, 2015.

TIMMONS, P. B.; HEWAGE, C. M. HAPPENN is a novel tool for hemolytic activity prediction for therapeutic peptides which employs neural networks. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10869, 2020.

TORRES, M. D. T. et al. Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3547–3567, 2019.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. At UN, global leaders commit to act on antimicrobial resistance. 2016. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/21-09-2016-at-un-global-leaders-commit-to-act-on-antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 05 jan. 2022.

4 CONCLUSÕES

- A mineração *in silico* (via BLASTp e HMMER3) mostrou-se promissora, sendo identificados onze peptídeos da classe *hevein-like* em *Hevea brasiliensis* (HbHevs);
- As posições dos HbHevs na árvore fenética UPGMA indicaram que suas funções podem estar ligadas à resposta contra lesões e agentes patogênicos, sendo necessária validação de sua expressão;
- Os HbHevs apresentaram similaridade com peptídeos *hevein-like* de espécies da família Euphorbiaceae (*Manihot esculenta*, *Ricinus communis* e *Jatropha curcas*), Trochodendraceae (*Tetracentron sinense*) e Salicaceae (*Populus spp*);
- Os HbHevs foram preditos como catiônicos ou aniônicos, porcentagem hidrofóbica média de 32.6% e hidrossolúveis. A informação das sequências e características levantadas poderão nortear estudos *in vitro* no que tange às suas características físico-químicas, bem como para guiar suas extrações e purificações;
- As simulações moleculares apontaram rigidez na cadeia principal do núcleo ligante, enquanto que regiões de alças e extremidades exibiram maior grau de fluabilidade e liberdade de movimentação atômica;
- A superfície eletrostática aniônica do sítio de ligação dos HbHev2, HbHev6 e HbHev7 poderia aumentar a sua atração para a parede de quitina catiônica dos fungos patogênicos;
- A alça catiônica N-terminal de acentuada flexibilidade e liberdade atômica dos HbHevs1-5 e HbHev7 pode ser um traço funcional, uma vez que também foi observado em muitas sequências de peptídeos *hevein-like* alinhadas de Viridiplantae. Apesar da função ser desconhecida, presume-se que esteja relacionada à interação com a membrana celular aniônica de patógenos;
- O modelo estrutural do HbHev11 se mostrou distinto ao padrão dos demais peptídeos *hevein-like* por ausentar a ponte C²-C⁵. Essa característica pode estar associada à mutação Cys17 → Ser17;
- A HbHev11 também apresentou a mutação Tyr23 → Cys23, podendo resultar em uma redução na afinidade com GlcNAc. Até onde se sabe, o presente estudo é o primeiro a encontrar um peptídeo com mutações que poderiam impactar a estabilidade estrutural e afinidade química;

- Foram desenhados e selecionados nove peptídeos bioinspirados nas HbHevs (HbHev_PBs), os quais apresentaram alta predição antimicrobiana e baixo potencial tóxico, alergênico e hemolítico (com base em predições usando ferramentas computacionais);
- Os HbHev_PB2 e HbHev_PBs6-9 exibiram conformação estrutural β -*hairpin* que se provaram estáveis na simulação molecular.
- Os HbHev_PB2 e HbHev_PBs7-9 foram selecionados e sintetizados para avaliar a atividade antimicrobiana contra uma cepa Gram-negativa e uma Gram-positiva. Apenas o HbHev_PB8 foi ativo contra *Acinetobacter baumannii*, com concentração mínima inibitória de 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

5 SÚMULA CURRICULAR

- Participou como ouvinte do I Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (I CDNB);
- Co-autor da publicação de trabalho completo intitulado como “Perfil descritivo de lectinas de relevante interesse biológico a partir da espécie *Microgramma vacciniifolia*” – 6º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica: Inovações para o enfrentamento da COVID-19;
- Participou como ouvinte do *2nd International Workshop on Cellular and Molecular Biology*;
- Participou como ouvinte do congresso “Genética Viva!”;
- Participou do minicurso “Análise de expressão gênica por PCR em tempo real” – XXIII Encontro de Genética do Nordeste (XXIII ENGENE);
- Participou do minicurso “Análise funcional de dados de transcriptomas” – XXIII Encontro de Genética do Nordeste (XXIII ENGENE);
- Participou como ouvinte do XXIII Encontro de Genética do Nordeste (XXIII ENGENE);
- Foi autor do resumo intitulado como “Prospecção de peptídeos do tipo heveína de *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae) com potencial atividade antimicrobiana” - XXIII Encontro de Genética do Nordeste (XXIII ENGENE);
- Co-autor do artigo de revisão intitulado como “*Lipid Transfer Proteins (LTPs) – Structure, Diversity and Roles beyond Antimicrobial Activity*” – <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111281>;
- Co-autor de capítulo de livro intitulado como “*Approaches for identification and validation of antimicrobial compounds of plant origin: a long way from the field to Market*” – ISBN 9781003243700;
- Co-autor do artigo de revisão intitulado como “*Plant antimicrobial peptides as potential tool for topical treatment of Hidradenitis Suppurativa*” – <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.795217>;
- Autor de artigo intitulado como “*Antimicrobial investigation in Croton heliotropiifolius Kunth and Euphorbia tirucalli Linn (Euphorbiaceae) from acidic extraction*” – a ser submetido.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alerta de Risco GVIMS/GGTES/ANVISA nº 02/2020. Confirmação de caso de *Candida auris* no Brasil.** 2020.
- AKERELE, O. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. 1993.
- ALBUQUERQUE, L. P. et al. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, p. 5, 2014.
- AMADOR, V. C. et al. Lipid Transfer Proteins (LTPs)—Structure, Diversity and Roles beyond Antimicrobial Activity. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1281, 2021.
- ARCHER, B. L. The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. 4. Isolation and characterization of crystalline hevein*. **Biochemical Journal**, v. 75, n. 2, p. 236–240, 1960.
- ASCHRAFI, A. et al. Antimicrobial and Cytotoxic Properties of Extracts from Plants Traditionally Used in North-East Brazil. **International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine**, v. 16, p. 21–32, 2021.
- BALU, K. E. et al. Structure of intact chitinase with hevein domain from the plant *Simarouba glauca*, known for its traditional anti-inflammatory efficacy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1381–1392, 2020.
- BENINI, R. et al. Manual de restauração da vegetação nativa, Alto Teles Pires, MT. **The Nature Conservancy**, 2016.
- BENKO-ISEPPON, A. M.; CROVELLA, S. Ethnobotanical Bioprospection of Candidates for Potential Antimicrobial Drugs from Brazilian Plants: State of Art and Perspectives. **Current Protein & Peptide Science**, v. 11, n. 3, p. 189–194, 2010.
- BERTHELOT, K. et al. *Hevea brasiliensis* prohevein possesses a conserved C-terminal domain with amyloid-like properties in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1864, n. 4, p. 388–399, 2016.
- BERTHELOT, K.; PERUCH, F.; LECOMTE, S. Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro)hevein proteins. **Biochimie**, v. 127, p. 258–270, 2016.
- BOTTIER, C. Biochemical composition of *Hevea brasiliensis* latex: A focus on the protein, lipid, carbohydrate and mineral contents. In: **Advances in Botanical Research**. [s.l.] Elsevier, v. 93p. 201–237. 2020.
- BROEKAERT, I. et al. Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 19, p. 7633–7637, 1990.

CAESAR, L. K.; CECH, N. B. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. **Natural Product Reports**, v. 36, n. 6, p. 869–888, 2019.

CAMPOS FILHO, E. M. Guia de Identificação de Espécies-Chave para a Restauração Florestal na Região de Alto Teles Pires Mato Grosso. **The Nature Conservancy**, p. 248, 2016.

CAMPOS, M. L. et al. The role of antimicrobial peptides in plant immunity. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 21, p. 4997–5011, 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (U.S.). **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019**. [s.l.] Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), nov. 2019. Disponível em: <<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>>. Acesso em: 5 jan. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (U.S.). *Candida auris*. 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/index.html>>. Acesso em: 9 jan. 2022.

CLAUSEN, T. M. et al. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2. **Cell**, p. S0092867420312307, 2020.

CUNHA, C. R. A. et al. Quantum dot–Cramoll lectin as novel conjugates to glycobiology. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 85–91, 2018.

CUNHA, C. R. A. DA et al. Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant *Cratylia mollis* Lectin Expressed in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

DAI, L. et al. The Novel Gene VpPR4-1 from *Vitis pseudoreticulata* Increases Powdery Mildew Resistance in Transgenic *Vitis vinifera* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

DAMME, E. J. M. V. et al. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.

DE HOFF, P. L.; BRILL, L. M.; HIRSCH, A. M. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 282, n. 1, p. 1–15, 2009.

DZHAVAKHIYA, V. G.; OZERETSKOVSKAYA, O. L.; ZINOVYEVA, S. V. Chapter 10 - Immune response. In: DYAKOV, Y. T.; DZHAVAKHIYA, V. G.; KORPELA, T. (Eds.). **Comprehensive and Molecular Phytopathology**. Studies in Plant Science. Amsterdam: Elsevier, p. 265–314. 2007.

FREDERIKSEN, R. F. et al. Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. **Microbiology**, v. 159, n. 5, p. 833–847, 2013.

GAMES, P. D. et al. Computer aided identification of a Hevein-like antimicrobial peptide of bell pepper leaves for biotechnological use. **BMC Genomics**, v. 17, n. S12, p. 999, dez. 2016.

GIDROL, X. et al. Hevein, a Lectin-like Protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) Is Involved in the Coagulation of Latex. p. 6, 1994.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672–679, 2013.

GORDTS, S. C. et al. NICTABA and UDA, two GlcNAc-binding lectins with unique antiviral activity profiles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 6, p. 1674–1685, 2015.

HERBEL, V.; SIEBER-FRANK, J.; WINK, M. The antimicrobial peptide snakin-2 is upregulated in the defense response of tomatoes (*Solanum lycopersicum*) as part of the jasmonate-dependent signaling pathway. **Journal of Plant Physiology**, v. 208, p. 1–6, 2017.

HOFFMANN, D. et al. Identification of lectin receptors for conserved SARS-CoV-2 glycosylation sites. **The EMBO Journal**, v. 40, n. 19, 2021.

ITAKURA, Y. et al. Sugar-Binding Profiles of Chitin-Binding Lectins from the Hevein Family: A Comprehensive Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1160, 2017.

KANOKWIROON, K. et al. Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 301–307, 2008.

KESSEL, A.; BEN-TAL, N. **Introduction to proteins: structure, function, and motion**. [s.l.] CRC Press, 2010.

KHURTSIDZE, E. et al. Galactose-binding lectin from mulberry (*Morus alba* L.) seeds with growth hormone-like activity. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 1, p. 26–30, 2017.

KINI, S. G. et al. Morintides: cargo-free chitin-binding peptides from *Moringa oleifera*. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 68, 2017.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1510–1530, 2011.

KONNO, K. et al. Abnormal swelling of the peritrophic membrane in Eri silkworm gut caused by MLX56 family defense proteins with chitin-binding and extensin domains. **Phytochemistry**, v. 147, p. 211–219, 2018.

LI, J. et al. Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, 2017.

LIU, B.; BIAN, H.; BAO, J. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**, v. 287, n. 1, p. 1–12, 2010.

LIU, C.; ZHANG, N. Nanoparticles in Gene Therapy. In: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Elsevier, v. 104p. 509–562. 2011.

LOO, S. et al. Anti-Fungal Hevein-like Peptides Biosynthesized from Quinoa Cleavable Hololectins. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 5909, 2021.

MAIA, L. B. L. et al. Structural and Evolutionary Analyses of PR-4 SUGARWINS Points to a Different Pattern of Protein Function. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 734248, 2021.

MANDAL, S. M. et al. Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water. **Peptides**, v. 30, n. 4, p. 633–637, 2009.

MARTÍNEZ-ALARCÓN, D.; BLANCO-LABRA, A.; GARCÍA-GASCA, T. Expression of Lectins in Heterologous Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 616, 2018.

MUSIDLAK, O. et al. Chapter Three - Plant latex proteins and their functions. In: NAWROT, R. (Ed.). **Latex, Laticifers and Their Molecular Components**. Advances in Botanical Research. [s.l.] Academic Press, v. 93p. 55–97. 2020.

NAWROT, R. et al. Plant antimicrobial peptides. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 181–196, 2014.

NELLESEN, A. et al. Self-Healing in Plants as a Model for Self-Repairing Elastomer Materials. **Polymers from Renewable Resources**, v. 2, n. 4, p. 149–156, 2011.

NELSON, D.; COX, N. Principios de bioquímica de Lehninger. ed. **Omega, Barcelona**, 2014.

NISHIO, M. et al. CH– π hydrogen bonds in biological macromolecules. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, n. 25, p. 12648–12683, 2014.

NIZET, V.; VARKI, A.; AEBI, M. **Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins**. 3rd. ed. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2015.

OLIVEIRA, W. F. et al. Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe. **Microbiological Research**, v. 230, p. 126330, 2020.

OU, X. et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1620, 2020.

PAIVA, P. M. G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. p. 12, 2010.

PASSARINHO, P. A.; VRIES, S. C. Arabidopsis Chitinases: a Genomic Survey. **The Arabidopsis Book**, v. 1, p. e0023, 2002.

- PEUMANS, W. J. et al. Classification of Plant Lectins in Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins. In: WU, A. M. (Ed.). **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates —2**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Boston, MA: Springer US, v. 491, p. 27–54, 2001
- PORTO, W. F. et al. In silico identification of novel hevein-like peptide precursors. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 127–136, 2012.
- PROCÓPIO, T. F. et al. Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. *Antibacterials: synthesis, properties and biological activities*. New York: Nova Sci Pub, p. 69-90, 2017.
- RAMOS, D. DE B. M. et al. Evaluation of antitumor activity and toxicity of *Schinus terebinthifolia* leaf extract and lectin (SteLL) in sarcoma 180-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 148–157, 2019a.
- RAMOS, M. V. et al. Laticifers, Latex, and Their Role in Plant Defense. **Trends in Plant Science**, v. 24, n. 6, p. 553–567, 2019b.
- REYES-MONTAÑO, E. A.; VEGA-CASTRO, N. A. Plant Lectins with Insecticidal and Insectistatic Activities. In: BEGUM, G. (Ed.). **Insecticides - Agriculture and Toxicology**. [s.l.] InTech, 2018.
- ROBSON, B. Bioinformatics studies on a function of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein as the binding of host sialic acid glycans. **Computers in Biology and Medicine**, v. 122, p. 103849, 2020.
- RONČEVIĆ, T.; PUIZINA, J.; TOSSI, A. Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5713, 2019.
- RÜDINGER, H.; GABIUS, H. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Plant lectins**, p. 25, 2001.
- RUSSELL, C. D. et al. Co-infections, secondary infections, and antimicrobial use in patients hospitalised with COVID-19 during the first pandemic wave from the ISARIC WHO CCP-UK study: a multicentre, prospective cohort study. **The Lancet Microbe**, v. 2, n. 8, p. e354–e365, 2021.
- SANTOS, A. F. S. et al. Strategies to Obtain Lectins from Distinct Sources. p. 28, 2013.
- SANTOS, A. J. C. A. et al. *Schinus terebinthifolia* leaf lectin (SteLL) is an immunomodulatory agent by altering cytokine release by mice splenocytes. **3 Biotech**, v. 10, n. 4, p. 144, 2020.
- SANTOS-SILVA, C. A. DOS et al. Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, In Silico Prediction and Perspectives in the Omics Era. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 14, p. 117793222095273, 2020.
- SECCO, R.S.; BIGIO, N.C. 2020. Hevea in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22704>>. Acesso em: 07 jan. 2022.

SHI, M. et al. The formation and accumulation of protein-networks by physical interactions in the rapid occlusion of laticifer cells in rubber tree undergoing successive mechanical wounding. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 8, 2019.

SILVA, P. M. et al. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 391–400, 2018.

SINHA, R.; SHUKLA, P. Antimicrobial Peptides: Recent Insights on Biotechnological Interventions and Future Perspectives. **Protein & Peptide Letters**, v. 26, n. 2, p. 79–87, 2019.

SLAVOKHOTOVA, A. A. et al. Novel mode of action of plant defense peptides - hevein-like antimicrobial peptides from wheat inhibit fungal metalloproteases. **FEBS Journal**, v. 281, n. 20, p. 4754–4764, 2014.

SLAVOKHOTOVA, A. A. et al. Hevein-like antimicrobial peptides of plants. **Biochemistry (Moscow)**, v. 82, n. 13, p. 1659–1674, 2017.

STOTZ, H. U.; WALLER, F.; WANG, K. Innate Immunity in Plants: The Role of Antimicrobial Peptides. In: HIEMSTRA, P. S.; ZAAT, S. A. J. (Eds.). **Antimicrobial Peptides and Innate Immunity**. Basel: Springer Basel, p. 29–51. 2013

SVENSSON, B. et al. Primary structure of barwin: a barley seed protein closely related to the C-terminal domain of proteins encoded by wound-induced plant genes. **Biochemistry**, v. 31, n. 37, p. 8767–8770, 1992.

TAM, J. et al. Antimicrobial Peptides from Plants. **Pharmaceuticals**, v. 8, n. 4, p. 711–757, 2015.

TANG, S.-S. et al. Antimicrobial peptides from different plant sources: Isolation, characterisation, and purification. **Phytochemistry**, v. 154, p. 94–105, 2018.

TEMPERONI, C.; CAIAZZO, L.; BARCHIESI, F. High Prevalence of Antibiotic Resistance among Opportunistic Pathogens Isolated from Patients with COVID-19 under Mechanical Ventilation: Results of a Single-Center Study. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1080, 2021.

TORTORA, G. J. et al. *Microbiologia*. 8. ed. Editora Artmed, 2005.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, n. 1, p. 4–30, 2000.

VAN HOLLE, S. et al. Comparative Study of Lectin Domains in Model Species: New Insights into Evolutionary Dynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1136, 2017.

VAN HOLLE, S.; VAN DAMME, E. J. M. Messages from the Past: New Insights in Plant Lectin Evolution. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 36, 2019.

VAN PARIJS, J. et al. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258–264, 1991.

VAN SAM, H.; VAN WELZEN, P. C. Revision of *Annesijoa*, *Elateriospermum* and the Introduced Species of *Hevea* in Malesia (Euphorbiaceae). **Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants**, v. 49, n. 2, p. 425–440, 10 dez. 2004.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538–1550, set. 2011.

WANG, C. et al. Lectin-like Intestinal Defensin Inhibits 2019-nCoV Spike binding to ACE2. **BioRxiv**. 2020.

WHO, World Health Organization. 2016. At UN, global leaders commit to act on antimicrobial resistance. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/21-09-2016-at-un-global-leaders-commit-to-act-on-antimicrobial-resistance>> Acesso em: 05 jan. 2022.

WONG, K. H. et al. Ginkgotides: Proline-Rich Hevein-Like Peptides from Gymnosperm *Ginkgo biloba*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

WONG, K. H. et al. Vaccatides: Antifungal Glutamine-Rich Hevein-Like Peptides from *Vaccaria hispanica*. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1100, 2017.

XIAO-DONG, D. E. N. G. et al. Isolation and analysis of rubber hevein gene and its promoter sequence. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 44, n. 8, p. 936, 2002.

ZHANG, L.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Current Biology**, v. 26, n. 1, p. R14–R19, 2016.

ZUBCEVIC, N. et al. Effects of Plant Lectins on Human Erythrocyte Agglutination. **Serbian Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 17, n. 3, p. 207–214, 2016.