

Abraham Omar Espinoza Culupú

Mecanismos moleculares mediados pela ativação celular induzida por Migalina, efeito nos receptores de TLR e sua contribuição no controle de infecções bacterianas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2021

Abraham Omar Espinoza Culupú

Mecanismos moleculares mediados pela ativação celular induzida por Migalina, efeito nos receptores de TLR e sua contribuição no controle de infecções bacterianas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Monamaris Marques Borges

Co-orientador: Dr. Pedro Ismael da Silva Junior

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Espinoza Culupú, Abraham Omar
Mecanismos moleculares mediados pela ativação
celular induzida por Migalina, efeito nos
receptores de TLR e sua contribuição no controle de
infecções bacterianas / Abraham Omar Espinoza
Culupú; orientadora Monamaris Marques Borges;
coorientador Pedro Ismael da Silva Junior. -- São
Paulo, 2021.
152 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Migalina. 2. Acilpoliamina. 3.
Antibacteriano. 4. Inflamação. 5. TLR4. I. Marques
Borges, Monamaris, orientador. II. da Silva Junior,
Pedro Ismael, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Abraham Omar Espinoza Culupú

Título da Tese: Mecanismos moleculares mediados pela ativação celular induzida por Migalina, efeito nos receptores de TLR e sua contribuição no controle de infecções bacterianas

Orientador: Dra. Monamaris Marques Borges.

Co-orientador: Dr. Pedro Ismael da Silva Junior.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Migalina: estudo da regulação de sinais intracelulares em macrófagos murinos in vitro, geração de ROS e atividade bactericida.", protocolada sob o CEUA nº 5609301018 (ID 001500), sob a responsabilidade de **Monamaris Marques Borges e equipe; Abraham Omar Espinoza Culupu** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 12/12/2018.

We certify that the proposal "Migalina: study of the regulation of intracellular signals in macrophages murine in vitro, generation of ROS and bactericidal activity.", utilizing 20 Isogenics mice (20 females), protocol number CEUA 5609301018 (ID 001500), under the responsibility of **Monamaris Marques Borges and team; Abraham Omar Espinoza Culupu** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 12/12/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 12/2018 a 12/2020

Área: [Imunopatologia](#)

Origem:	Biotério Central	sexo:	Fêmeas	idade:	6 a 8 semanas	N:	15
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	18 a 25 g		
Linhagem:	C57BL/6						
Origem:	Biotério Central	sexo:	Fêmeas	idade:	6 a 8 semanas	N:	05
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	18 a 25 g		
Linhagem:	Balb/c						

Local do experimento: Todos os ensaios serão realizados no Laboratório da Dra. Monamaris M. Borges, dentro da área do Lab de Bacteriologia.

São Paulo, 26 de janeiro de 2021



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



**GOVERNO DO ESTADO
DE SÃO PAULO**

Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Ciência, Tecnologia e
Insumos Estratégicos de Saúde
Instituto Butantan



São Paulo, 09 de abril de 2021

Ofício CEUAIB n.º 02/2021

Ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP/I.Butantan/IPT)

Declaro que os experimentos utilizando animais vertebrados vivos apresentados na tese de Doutorado "Mecanismos moleculares mediados pela ativação celular induzida por Migalina, efeito nos receptores de TLR e sua contribuição no controle de infecções bacterianas", desenvolvida pelo aluno Abraham Omar Espinoza Culupu, sob orientação da Dra. Monamaris Marques Borges, são parte do projeto "Migalina: estudo da regulação de sinais intracelulares em macrófagos murinos in vitro, geração de ROS e atividade bactericida". Este projeto foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), recebendo o número de protocolo CEUAIB 5609301018.

A CEUAIB está à disposição para mais esclarecimentos

Atenciosamente,

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenadora CEUA-Instituto Butantan

Instituto Butantan
Avenida Vital Brasil, 1500
Butantã, São Paulo/SP
CEP: 05503-900

www.butantan.gov.br

Centro Administrativo
Avenida da Universidade, 210
Butantã, São Paulo/SP
CEP: 05508-040

SÃO PAULO
GOVERNO DO ESTADO

DEDICATORIA

**DEDICO ESTE TRABALHO À MINHA MÃE
MARIA CULUPÚ, MULHER GUERREIRA,
QUE ME ENSINOU A SER UMA PESSOA
PERSISTENTE.**

EPÍGRAFE

“Solo sé, que no sé nada”

Sócrates (470-399 a. de C.)

AGRADECIMENTOS

À Dra. Monamaris Marques Borges, pela orientação, amizade e pelo aprendizado no período de doutorado;

Ao Dr. Pedro Ismael da Silva J, pela coorientação, amizade e aprendizado no doutorado;

Ao governo Peruano, que mediante o CONCYTEC-FONDECYT financiou minha bolsa para fazer o doutorado no Brasil na Universidade de São Paulo e Instituto Butantan através do contrato N° 092-2016;

Ao Instituto Butantan, pelo apoio na realização de minha tese;

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, professores que contribuíram na minha formação, e a secretaria pelas ajudas nos tramites durante meu doutorado;

À minha esposa Mariella e filhos quem sempre me deram forças para seguir estudando;

À minha mãe María Culupú e Irmãos por sempre apoiarem meus estudos;

Ao MSc Paulo Cesar G. Viera pela grande amizade e ensinamentos nas técnicas de cultura celular;

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Junior por ter me aceitado no laboratório e permitir conhecer a minha orientadora;

À Dra. Rita de Cassia Ruiz pela ajuda, ensinamentos e sugestões na tese;

À Dra. Maristela Camargo do ICB IV pelas sugestões no início da tese;

À Dra. Roxane Fontes Piazza pela ajuda no laboratório permitindo o uso de alguns de seus equipamentos;

À Dra. Marcia Franzolin pela ajuda em alguns ensaios no laboratório;

À Dra. Lilia Coronato Courrol da Universidade Federal de São Paulo, Diadema pela oportunidade de colaboração nos testes de atividade microbidas das nanopartículas de prata revestidas com micalina do qual fui colaborador no artigo publicado;

Ao Dr. Ricardo Ramirez da Universidad Nacional Autónoma de México, México pela colaboração nos estudos de acoplamento molecular de micalina com TLR4;

À Dra Fernanda Calheta Portaro e a seus alunos Cristiane Castilho e Roberto Tadashi, pelo apoio nas quantificações de fluorescência;

À Dra. Paula Calabria e Cristiane Caporrino do laboratório de imunopatologia pela ajuda nas quantificações de ácidos nucleicos;

Ao meu monitor atual da bolsa peruana de FONDECYT senhor. Aldo de la Torre Guzmán e Carmen Castañeda pelos ensinamentos e ajudas no processo que durou a bolsa;

Para pessoal de meu laboratório: Elizabeth Mendes, Nayara e Juliana pela ajuda no laboratório;

À mestre Thaís Mitsunari do laboratório de bacteriologia pela doação de sacos de dialise para o ensaio de marcação do LPS com FITC;

A todos os pesquisadores, funcionários e alunos do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.

RESUMO

ESPINOZA-CULUPÚ A.O: **Mecanismos moleculares mediados pela ativação celular induzida por Migalina, efeito nos receptores de TLR e sua contribuição no controle de infecções bacterianas.** 2021. 152f Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2021.

O aumento de bactérias resistentes aos antibióticos é um grave problema de saúde pública que requer a identificação de moléculas que atuem em alvos moleculares importantes e específicos dos patógenos favorecendo seu controle. Vários análogos de poliaminas foram construídos e usados no controle de microrganismos e células tumorais. Migalina é uma acilpoliamina, derivada da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, sendo um análogo da espermidina e a presença de grupos acil na sua estrutura pode favorecer sua função efetora, cujos mecanismos são desconhecidos. Neste trabalho foi avaliado o mecanismo molecular da interação da migalina sintética com *E. coli* DH5 α e células fagocíticas, da linhagem celular J774A.1, RAW 264.7 e macrófagos primários derivados de medula óssea murina. Paralelamente foi realizada uma análise *in silico* usando acoplamento molecular e similaridade com outras moléculas. Nossos dados mostram que a migalina tem efeito bactericida dose e tempo dependentes em *E. coli*. Houve redução da viabilidade celular após 4 e 6 horas de tratamento com 1 mM deste composto. Além disso, o tratamento de *E. coli* com migalina (250 e 500 μ M) induziu a produção de altos níveis de produtos derivados do oxigênio (ROS), fragmentação e dano oxidativo no DNA. Em outro análise foi comprovado que houve desestruturação da membrana bacteriana, de modo similar ao ocorrido com alguns antibióticos, havendo o mesmo nível de incorporação do iodeto de propídio. Estes dados foram reforçados pelo encontro de níveis elevados de fluorescência no ensaio de atividade de esterase, indicando alteração na membrana celular de *E. coli* após tratamento com a migalina. Ao avaliar o nível de glutathione redutase nas bactérias tratadas, houve redução de 20% em relação aos grupos não tratados. Estes resultados comprovam que o mecanismo de ação da migalina sobre *E. coli* envolve a geração de ROS, quebra do DNA e desestruturação da membrana bacteriana. A migalina não apresentou citotoxicidade, nem induziu a expressão de mediadores inflamatórios em estudos *in vitro* usando células fagocíticas. Em modelo usando células fagocíticas ativadas com LPS, foi definido que os alvos dessa molécula foi o receptores Toll-like 4, uma vez que a adição de migalina às células tratadas com LPS reduziu o nível de NO e TNF- α e a expressão dos genes para iNOS, TNF- α , IL-6 e COX-2, assim como a expressão da proteína p65 do fator NF- κ B em doses superiores a 150 μ M. Foi também comprovado que a migalina se liga ao LPS, sendo que a pré-incubação dessas moléculas antes da ativação dos macrófagos neutralizou a

atividade do LPS, reduzindo a produção de NO de modo dose dependente. A triagem virtual e a modelagem molecular confirmaram que um dos mecanismos de ação da migalina ocorre via TLR4, através da interação com a molécula adaptadora MD2. Os dados mostraram que a migalina pode neutralizar a ação do LPS bloqueando a interação LPS/TLR4-MD2. Os resultados indicam que a migalina tem potencial antibacteriano, além de efeito supressor da resposta inflamatória induzida por LPS, sendo uma nova molécula atrativa a ser estudada para o controle de infecções.

Palavras-chave: Migalina. Acilpoliamina. Antibacteriano. ROS. Inflamação. TLR4. Análise *in silico*. Acoplamento molecular.

ABSTRACT

ESPINOZA-CULUPÚ A.O: **Molecular mechanisms mediated by cellular activation induced by Mygalin, effects on TLR receptors and their contribution in the control of bacterial infections.** 2021. 152p Dissertation (Ph.D. Thesis in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2021.

The increase in antibiotic-resistant bacteria is a serious public health problem, requiring the identification of molecules that act on important and specific molecular targets of pathogens that control bacterial survival and help fight infections. Several polyamine analogues have been constructed and used to control microorganisms and tumour cells. Mygalin is a synthetic acylpolyamine, analogous to spermidine, derived from the hemolymph of the spider *Acanthoscurria gomesiana* and the presence of acyl groups in its structure can differentiate its effector function. However, the mechanisms involved are unknown. In this work, the molecular mechanism of the interaction of mygalin with *E. coli* and phagocytic cells, J774A.1 cell line, RAW and primary macrophages derived from murine bone marrow was evaluated. In parallel, an *in silico* analysis was performed using molecular docking and similarity with other molecules. Our data show that mygalin has a bactericidal effect that is dose and time-dependent on *E. coli*. There was a reduction in cell viability after 4 and 6 hours of treatment with 1 mM of the compound. In addition, the treatment of *E. coli* with mygalin (250 and 500 μ M) induced the production of high levels of reactive oxygen species (ROS), fragmentation and oxidative damage to DNA. Another analysis showed that the compound disrupted the bacterial membrane, similar to the action mechanism of some antibiotics, with the same level of incorporation of propidium iodide. The high fluorescence levels observed in the esterase activity assay reinforce these data, indicating a change in the *E. coli* cell membrane after treatment with mygalin. Additionally, the glutathione reductase levels were 20% decreased as compared to the untreated groups. These results prove that the mechanism of action of mygalin on *E. coli* involves the generation of ROS, DNA breakdown and damage to the bacterial membrane.

In vitro studies using phagocytic cells have shown that mygalin does not present cytotoxicity, nor does it induce the expression of inflammatory mediators. In a model using LPS-activated phagocytic cells, the addition of mygalin in doses greater than 150 μ M to LPS-treated cells reduced the levels of NO and TNF- α , the expression of genes for iNOS, TNF- α , IL-6, and COX2, as well as the expression of the NF- κ B factor p65 protein. These results suggest that Toll-like 4 receptors are the target of mygalin. Our data also indicate that mygalin binds to LPS

and that its pre-incubation with LPS before the activation of macrophages neutralized LPS activity, reducing NO production in a dose-dependent manner. The virtual screening and molecular docking confirmed that one of the mechanisms of action of Mygalin occurs via TLR4, through the interaction with the adapter molecule MD2. The data show that mygalin can act via the neutralization of LPS and blocking the LPS/TLR4-MD2 interaction. The results indicate that mygalin has antibacterial potential, in addition to suppressing the inflammatory response induced by LPS, being a new attractive molecule to be studied for infection control.

Keywords: Mygalin. Acylpolyamine. Antibacterial. ROS. Inflammation. TLR4. Analysis *in silico*. Molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produtos naturais ou derivados aprovados pela FDA no período 1981-2019. N= 1881	20
Figura 2 - Funções das poliaminas.	21
Figura 3 - Análogos de poliaminas estudados em câncer.....	22
Figura 4 - TLR4 e vias de sinalização frente ao LPS.....	25
Figura 5 - Perfil cromatográfico da migalina sintética.	43
Figura 6 – Cromatograma e espectro de massa da migalina sintética.....	44
Figura 7 – Viabilidade de <i>Escherichia coli</i> DH5 α após tratamento com migalina.....	45
Figura 8 - Interação de DNA genômico de <i>Escherichia coli</i> com migalina e espermidina em diferentes pH.....	46
Figura 9 - Efeito da adição de inibidor de DNases e proteção de espermidina sobre dano oxidativo no DNA.	47
Figura 10 - Efeito da adição da migalina, espermidina e H ₂ O ₂ na integridade do DNA de <i>Escherichia coli</i>	48
Figura 11 - Microscopia confocal de <i>Escherichia coli</i> tratada com migalina, e coradas com DAPI.....	49
Figura 12 - Ensaio de filamentação em <i>Escherichia coli</i> tratadas com migalina.....	50
Figura 13 - Efeito de migalina na integridade da membrana e atividade esterase em <i>Escherichia coli</i>	51
Figura 14 - Efeito da migalina nos níveis de GSH intracelular e perfil proteico.	52
Figura 15 - Influência da migalina na geração ROS intracelular.	53
Figura 16 - Interação entre migalina e LPS.....	54
Figura 17 - Atividade quelante de migalina para o Fe.	55
Figura 18 - Mecanismo de ação da migalina proposto para <i>Escherichia coli</i>	56
Figura 19 - Cultura de macrófagos primários diferenciados.	57
Figura 20 – Efeito de migalina na viabilidade celular dos macrófagos.	58
Figura 21 - Eletroforese de RNA e DNA das células tratadas com migalina.	59
Figura 22 - Efeito da migalina no perfil proteico dos macrófagos.....	60
Figura 23 - Efeito de migalina na expressão dos níveis de mRNA em MDM.....	61
Figura 24 - Migalina inibe os níveis de expressão de mRNA para iNOS, TNF- α e COX-2, IL-6 em células RAW estimuladas com LPS.	62
Figura 25 - Efeitos da migalina nos níveis de TNF- α em células RAW estimuladas com LPS.	63
Figura 26 - Efeito da migalina na produção de NO em macrófagos J774A.1.....	64
Figura 27 - Efeitos da migalina na produção de óxido nítrico (NO) induzido por LPS em macrófagos.....	65
Figura 28 - Migalina neutraliza a atividade do LPS.....	66
Figura 29 - Interação de migalina com LPS-FITC.....	67
Figura 30 – Migalina suprime expressão de proteínas iNOS e NF- κ B p65 induzidos por LPS	68
Figura 31 - Migalina inibe o estresse oxidativo induzido pelo PMA.....	69

Figura 32 - Modelo proposto para os mecanismos de ação da mialina para inibir LPS via TLR4.....	69
Figura 33 - Características da mialina.	70
Figura 34 - Predição de alvos moleculares para mialina.	76
Figura 35 - Acoplamento molecular da mialina com 5-Lipoxygenase.	80
Figura 36 - Acoplamento molecular da mialina com COX-2.	81
Figura 37 - Acoplamento molecular da mialina com iNOS.	81
Figura 38 - Estrutura molecular da mialina.	83
Figura 39 - Superposição de MD-2-C e MD-2-D	84
Figura 40 - Complexos de acoplamento de TLR4/MD-2 com os três ligantes.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers usados no RT-PCR	36
Tabela 2 - Propriedades moleculares da migalina.....	71
Tabela 3 - Predição de Toxicidade e Propriedades ADME da migalina usando ferramentas online.....	72
Tabela 4 - Comparação da migalina com moléculas similares estruturalmente.	73
Tabela 5 - Predição de alvos moleculares para migalina usando ferramentas online.	77
Tabela 6 - Possíveis receptores alvos de migalina segundo <i>ImmtorLig_DB</i>.	79
Tabela 7 - Energias de acoplamento e resíduos de ligação para 5-LOX, COX-2 e iNOS com migalina usando <i>Autodock Vina</i>.	82
Tabela 8 - Propriedades moleculares dos ligantes e volume da cavidade de ligação de TLR4/MD-2.....	83
Tabela 9 - Energias de interação dos ligantes e resíduos do bolso de ligação dos complexos TLR4/MD-2.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	Arginina Descarboxilase
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
MDMs	Macrófagos Derivados de Medula Óssea
CeTICS - CEPID	Centro de Pesquisas em Toxinas, Resposta Imunológica e Sinalização Celular
ChEBI	Ontology of Chemical Entities of Biological Interest
DDW	Drug Design Workshop
DHR	Dihidrorodamina
DIC	Differential Interference Contrast
EP	Potencial Eletrostático
HBTU	o-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônico
FAS	Sulfato de Amônio Ferroso
Fe-NTA	Nítrilotriacetato de ferro
LB	Luria-Bertani
LETA	Laboratório de Toxinologia Aplicada
LIPO	Lipoficidade
CIM	Concentração Inibitória Mínima
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NO ₂ -	Nitrito
ODC	Ornitina Descarboxilase
PDB	Protein Data Bank
RFU	Unidades de Fluorescência Relativa
TLRs	Receptores Toll-like
TPSA	Área de Superfície Polar Topológica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Resistência antimicrobiana um problema mundial	19
1.2. A importância de novos fármacos	19
1.3. As poliaminas	20
1.4. Análogos de poliaminas	22
1.5. As poliaminas em artrópodes	23
1.6. As poliaminas e a resposta inflamatória	23
1.7. As poliaminas e os receptores <i>Toll-like</i>	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivos específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Síntese da migalina	28
3.1.1. <i>Condições de purificação e quantificação da migalina sintética</i>	28
3.2. Ensaio em modelo bacteriano	28
3.2.1. <i>Cultura e ensaio antibacteriano</i>	28
3.2.2. <i>Viabilidade celular</i>	29
3.2.3. <i>Dano oxidativo no DNA</i>	29
3.2.4. <i>Dano nas membranas e atividade esterase</i>	31
3.2.5. <i>Determinação de ROS</i>	31
3.2.6. <i>Interação Migalina-LPS</i>	31
3.2.7. <i>Níveis da Glutathiona (GSH) e perfil proteico</i>	32
3.2.8. <i>Atividade quelante da migalina com Fe</i>	32
3.3. Análise usando linhagens macrofágicas	33
3.3.1. <i>Animais</i>	33
3.3.2. <i>Diferenciação dos macrófagos obtidos de medula óssea</i>	33
3.3.3. <i>Cultura celular e ensaio citotóxico</i>	34
3.3.4. <i>Efeito da migalina nos ácidos nucleicos e proteínas</i>	34
3.3.5. <i>Efeito da migalina em células estimuladas com LPS</i>	34
3.3.6. <i>Extração de RNA</i>	34
3.3.7. <i>RT-PCR</i>	35
3.3.8. <i>Eletroforese em géis de agarose</i>	36
3.3.9. <i>Dosagem de Oxido nítrico (NO)</i>	36

3.3.10.	<i>Ensaio de neutralização de LPS por migalina sintética</i>	36
3.3.11.	<i>Ensaio de ligação FITC-LPS</i>	37
3.3.12.	<i>Ensaio de interação de migalina sintética com FITC-LPS</i>	37
3.3.13.	<i>Dosagem de TNF-α</i>	37
3.3.14.	<i>Western blot</i>	38
3.3.15.	<i>Dosagem intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS)</i>	38
3.4.	<i>Análise in silico</i>	39
3.4.1.	<i>Propriedades moleculares da migalina</i>	39
3.4.2.	<i>Toxicidade e propriedades ADME</i>	39
3.4.3.	<i>Triagem virtual por similaridade</i>	39
3.4.4.	<i>Predição de alvos moleculares, atividade anti-inflamatória e ligantes para o sistema imune</i>	40
3.4.5.	<i>Modelagem molecular para COX-2, iNOS e 5-LOX com migalina</i>	40
3.4.6.	<i>Modelagem molecular para TLR4</i>	40
3.4.7.	<i>Cálculos de modelagem</i>	41
3.4.8.	<i>Análises de interação do complexo TLR4/MD-2-ligantes</i>	41
3.5.	<i>Análises estatísticas</i>	42
4.	RESULTADOS	43
4.1.	<i>Síntese de migalina</i>	43
4.2.	<i>Modelo bacteriano</i>	44
4.2.1.	<i>Efeito da migalina no crescimento bacteriano</i>	44
4.2.2.	<i>Interação da migalina com DNA</i>	45
4.2.3.	<i>Marcação do DNA após tratamento com migalina</i>	48
4.2.4.	<i>Inibição da síntese de DNA de E. coli in vivo por migalina, usando o ensaio de filamentação</i>	50
4.2.5.	<i>Ação da migalina na membrana celular e atividade esterase</i>	50
4.2.6.	<i>Efeito da migalina nos níveis de glutathiona e perfil proteico de E. coli</i>	52
4.2.7.	<i>Ação da migalina na geração de ROS</i>	53
4.2.8.	<i>Interação da migalina com LPS</i>	54
4.2.9.	<i>Análise de atividade quelante de migalina</i>	55
4.3.	<i>Modelo in vitro com células macrofágicas</i>	57
4.3.1.	<i>Macrófagos derivados de medula óssea</i>	57
4.3.2.	<i>Efeito da migalina na viabilidade de macrófagos</i>	58
4.3.3.	<i>Ação de migalina nos ácidos nucleicos</i>	58
4.3.4.	<i>Ação da migalina no perfil protéico dos macrófagos J774A.1</i>	59

4.3.5.	<i>Efeito da micalina na expressão dos genes iNOS e COX-2 em MDM</i>	60
4.3.6.	<i>Micalina atenua a expressão de mRNA de iNOS, TNF-α, IL-6 e COX-2 induzido por LPS em células RAW</i>	61
4.3.7.	<i>Efeito da micalina na produção de TNF-α</i>	62
4.3.8.	<i>Efeito da micalina na produção de NO em macrófagos</i>	63
4.3.9.	<i>Neutralização de LPS com micalina</i>	65
4.3.10.	<i>Ligação da micalina com LPS-FITC</i>	66
4.3.11.	<i>Micalina suprime a resposta inflamatória induzida por LPS, interferindo na expressão de iNOS e NF-κB p65 em células RAW 264.7</i>	67
4.3.12.	<i>Micalina suprime as espécies reativas de oxigênio (ROS) em MDM</i>	68
4.4.	<i>Modelo in silico</i>	70
4.4.1.	<i>Parâmetros moleculares da micalina</i>	70
4.4.2.	<i>Predição da toxicidade e propriedades ADME da micalina</i>	71
4.4.3.	<i>Triagem virtual</i>	73
4.4.4.	<i>Alvos moleculares, atividade anti-inflamatória e ligante de receptores imunes</i>	76
4.4.5.	<i>Modelagem molecular de iNOS, COX-2 e 5-LOX</i>	79
4.4.6.	<i>Modelagem molecular de TLR4 com micalina, curcumina e TAK-242</i>	82
5.	DISCUSSÃO	87
6.	CONCLUSÕES	96
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
8.	ANEXOS	111

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resistência antimicrobiana um problema mundial

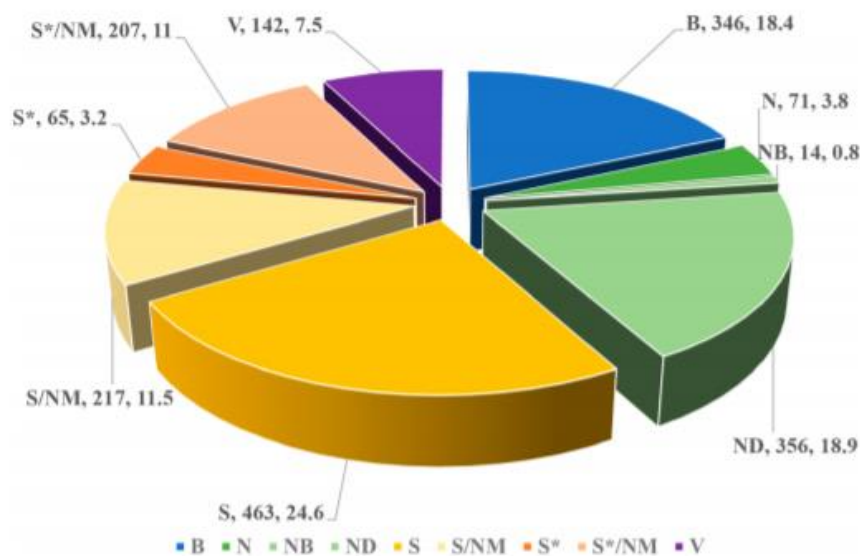
A resistência antimicrobiana é um problema mundial e estima-se que para o ano 2050, aproximadamente 10 milhões de pessoas morrerão devido a este problema (1). Devido ao rápido desenvolvimento dessa resistência há necessidade de definir novos antibióticos. O uso extensivo e a prescrição prolongada e inadequada de antibióticos favorecem a rápida seleção de microrganismos resistentes. Essa resistência é multifatorial, podendo estar associada à falta de higiene, uso indiscriminado dos antimicrobianos, automedicação e negligência nos tratamentos. Assim o desenvolvimento de antibióticos alternativos pode colaborar neste sentido. Os microrganismos desenvolvem mecanismos sofisticados e complexos para contornar os antibióticos em uso, resultando em infecções graves e prolongadas que ameaçam a vida (2).

1.2. A importância de novos fármacos

A urgência no desenvolvimento de novos antibióticos é evidente, uma vez que as doenças infecciosas são uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, especialmente em ambientes hospitalares (3, 4). A indústria farmacêutica reduziu o investimento em pesquisas de novos antibióticos devido a questões econômicas, pois buscam retorno financeiro imediato e este tipo de pesquisa requer longos períodos.

A contribuição de produtos naturais de diversas origens nesta classe terapêutica tem sido apresentada como alternativas para o descobrimento de novas moléculas, podendo auxiliar no controle de microrganismos (5, 6). Os produtos naturais têm sido as principais fontes de pesquisa de novos antibióticos devido à grande diversidade química, impulsionando a descoberta de produtos farmacêuticos nos últimos anos. Um total de 19 medicamentos isolados destes produtos foram aprovados para comercialização mundial entre o ano de 2005 a 2010 (7). A mais de quatro décadas estes produtos são fontes para a exploração de novos fármacos. Entre os anos 1981 a 2019 mais de 1800 moléculas foram aprovadas (8) como mostrasse na figura 1.

Figura 1 - Produtos naturais ou derivados aprovados pela FDA no período 1981-2019. N= 1881



Moléculas que foram aprovados pela FDA como novas drogas. Fonte: Newman, (2020)

B: macromolécula biológica; N: produto natural inalterado; NB: medicamento botânico (mistura definida)
 ND: derivado de produto natural; S: droga sintética; S*: droga sintética (farmacóforo);
 V: vacina; NM: imitação de produto natural

1.3. As poliaminas

As poliaminas naturais (putrescina, espermidina e espermina) são um grupo de compostos catiônicos endógenos, sintetizadas por todas as células vivas, que diferem no número de grupos de amina inseridos na molécula. A putrescina é uma diamina, enquanto, a espermidina e a espermina possuem três e quatro grupos de amino, respectivamente. As diferenças nesses grupos aminas são responsáveis pelas diferentes funções entre essas moléculas, que têm ampla função biológica. Essas moléculas podem controlar a proliferação e diferenciação celular, regular a síntese de proteínas e a expressão gênica, uma vez que podem interagir com porções de DNA e RNA (9), promovendo mudanças conformais na estrutura e função dessas moléculas (10). As poliaminas também modulam sinais intracelulares (11) e funções imunológicas dependendo de sua natureza (12, 13).

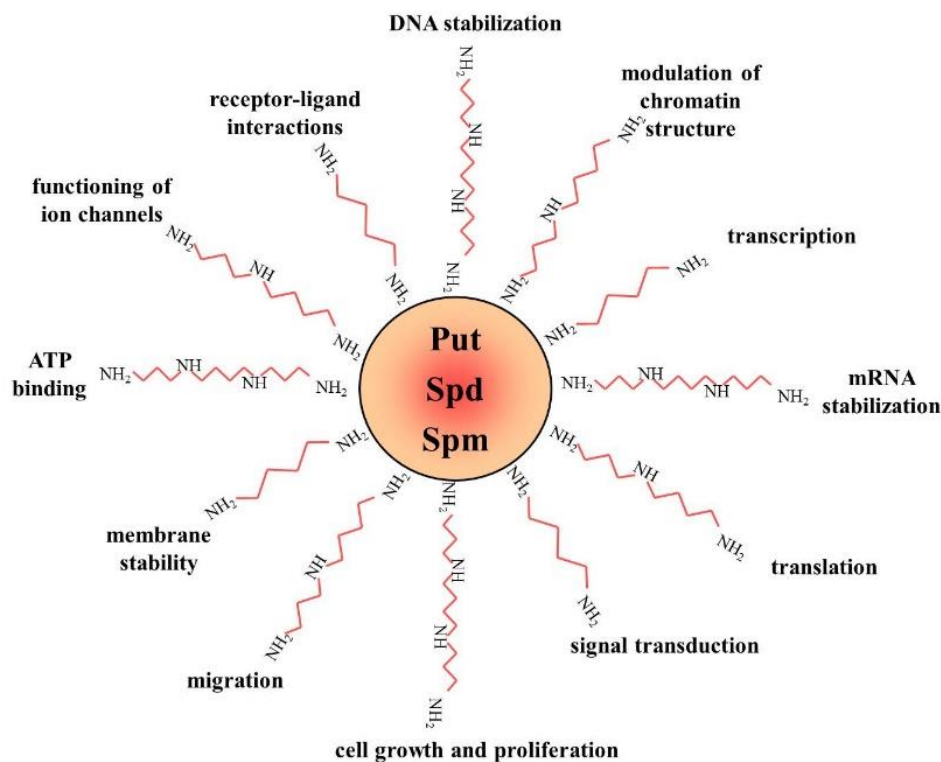
Em infecções por microrganismos patogênicos, foi demonstrado que as poliaminas regulam a expressão de genes de virulência (14), essencial para a adaptação e sobrevivência das bactérias na célula hospedeira. Além disso, elas podem modificar a resistência bacteriana ao estresse oxidativo (15, 16), interferir na formação de biofilme (17) e na resposta aos antibióticos (18). Em *E. coli*, essas moléculas podem controlar a

permeabilidade da membrana bloqueando canais de purina (19), enquanto os análogos de poliaminas sintéticas aumentam a permeabilidade, devido à interrupção da integridade do LPS (20). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos nesses eventos são em sua maioria desconhecidos.

A putrescina é a molécula precursora das poliaminas, formada a partir da descarboxilação de ornitina e da arginina pelas enzimas ornitina descarboxilase (ODC) e arginina descarboxilase (ADC), respectivamente. A principal enzima responsável pela formação da putrescina em animais é a ODC e em microrganismos inclui também ADC. Para que ocorra a conversão de putrescina em espermidina, e em espermina, uma série de reações ocorrem envolvendo transferases, descarboxilases e sintases (21).

A interação das poliaminas com os ácidos nucleicos e as proteínas pode afetar sua estrutura e estabilidade, enquanto sua ligação ao tRNA e mRNA influencia a síntese de proteínas (9), o crescimento e a diferenciação (22). Além disso, podem modular sinais intracelulares (23) e funções imunes, podendo exercer ou não atividade anti-inflamatória e supressiva dependendo da natureza da poliamina (12, 13) (Figura 2).

Figura 2 - Funções das poliaminas.



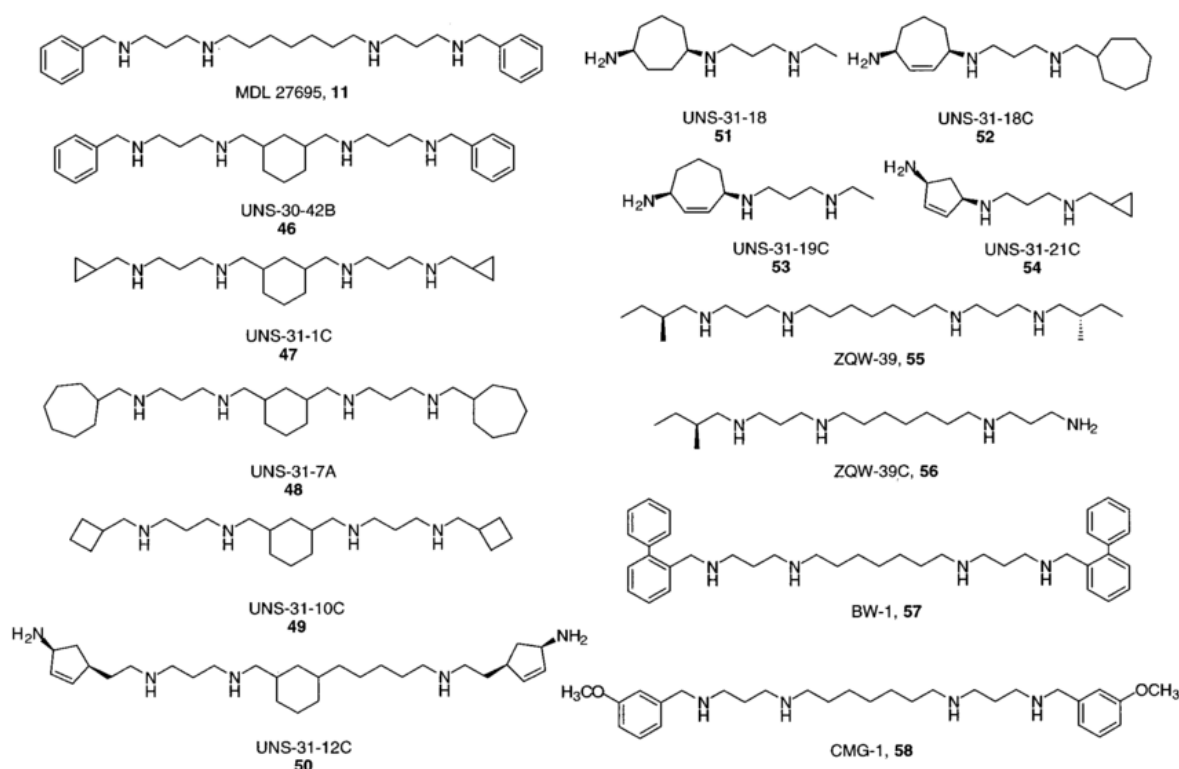
As poliaminas apresentam diversas funções, nas células vivas, mais depende da estrutura da poliamina

Fonte: <http://www.weizmann.ac.il/molgen/Kahana/polyamines>.

1.4. Análogos de poliaminas

As poliaminas naturais diferem no número de agrupamentos de amins inseridos na molécula: a putrecina, que origina as outras moléculas, possui dois grupos amins, enquanto a espermidina e espermina contém três e quatro agrupamentos, respectivamente. Esta diferença pode dar a cada poliamina características efetoras próprias (24). Exemplo disto é o fato da espermina ser predominante em células tumorais e análogos baseados na sua estrutura, induzir efeitos distintos em diferentes tipos celulares, indicando que há especificidade entre os análogos para cada tipo celular (25). Isso significa que estes análogos podem ser explorados para diferentes doenças, por exemplo estudos em câncer, onde seu efeito se dá pela inibição no crescimento de tumores em cultura celular (26, 27) (Figura 3). Várias moléculas têm mostrado efeito anticancerígeno (28, 29), embora muitos de seus mecanismos de ação sejam desconhecidos.

Figura 3 - Análogos de poliaminas estudados em câncer.



Diferentes análogos de poliaminas, sintetizados com atividade anticancerígena.

Fonte: Casero, (2001)

1.5. As poliaminas em artrópodes

Poliaminas como norspermidina, dianinopropano, norespermina são consideradas as principais poliaminas em insetos, aranhas e outros artrópodes, estando presentes em níveis baixos em outros invertebrados e ausentes em vertebrados (30). São prevalentes no veneno de aranhas, contendo uma estrutura à base de hidrofenil, como foi descrito para a nova poliamina PA366, presente no veneno de várias espécies de tarântula. Essa poliamina apresenta toxicidade seletiva para a célula de cancerígenas de mama, MCH-7, devido a estrutura do anel (31). Acilpoliaminas de baixo peso molecular foram também descritas em glândulas de veneno de aranhas. Essas moléculas são hidrofílicas e podem atuar no sistema nervoso como agentes neuroprotetores (32).

1.6. As poliaminas e a resposta inflamatória

Dentre as poliaminas, a mais estudada é a espermina devido à sua ação antiproliferativa e anti-inflamatória sobre linfócitos e macrófagos (12). A espermina sintética, ao contrário da espermidina e da putrecina, inibe a expressão da molécula de superfície LAF-1 (CD11a/CD18) em linfócitos humanos, comprometendo a resposta inflamatória, entretanto não tem efeito sobre monócitos (33). O derivado de espermina CNI-1493 inibiu a síntese de IL-1, IL-6, MIP-1 α/β e IL-12p40 em macrófagos estimulados com LPS (13).

Em modelos de inflamação aguda, subaguda e crônica o tratamento com as poliaminas inibiu o aumento dos peróxidos lipídicos no fígado e da concentração sérica de enzimas marcadoras (glutamato oxalacetato transferase e glutamato piruvato transferase) durante a inflamação, em modelos animais (34).

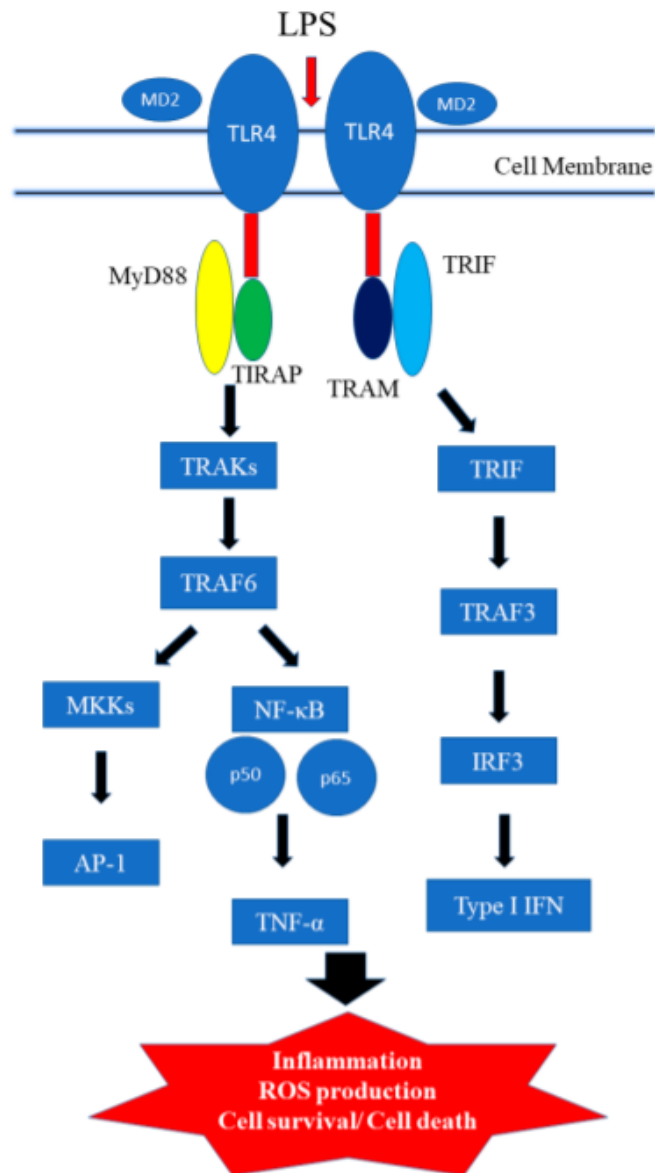
As propriedades anti-inflamatórias da espermidina foram estudadas usando o modelo murino de micróglia BV2 estimulado com LPS, mostrando que o tratamento com espermidina atenuou a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α . O mecanismo de redução da resposta inflamatória mediada pela espermidina envolveu a supressão da translocação da subunidade p65 do NF- κ B (35).

1.7. As poliaminas e os receptores *Toll-like*

Os principais receptores que participam da imunidade inata em infecções são os receptores Toll-like (TLRs), expressos na superfície celular (TLR 1, 2, 4, 5, 6 e 10) ou no endossomo (TLR 3, 7, 8 e 9), os quais reconhecem estruturas de microrganismos ou nucleotídeos (36, 37). Essas proteínas são moléculas chaves no processo inflamatório, podendo ser suprimidas com drogas específicas, anticorpos ou inibidores para tratar doenças, como câncer, sepse e asma. Portanto, os TLRs são considerados uma estratégia terapêutica futura promissora para várias doenças inflamatórias infecciosas, autoimunes (38, 39) e câncer onde tem sido relacionando o papel de sinalização via TLR4 (Figura 4) (40). A inibição dos TLRs pode ocorrer de duas maneiras: bloqueando o receptor por ligação das drogas ou por interferência em vias de sinalização intracelular para evitar a transdução de sinal (38). Neste contexto, várias drogas com potencial farmacológico foram desenvolvidas, dentre elas moléculas pequenas como TAK-242 (41) e ERITORAN (42), que inibem TLR4 e Cloroquina e hidroxicloroquina (43, 44), que inibem TLR 7,8 e 9.

Estudos demonstram que as poliaminas são necessárias para a expressão e ativação de TLR2, desempenhando um papel importante na regulação da função de barreira epitelial (45). Foi comprovado, a supressão de TLR7 por espermidina em modelo murino da psoríases (46), sugerindo que a via do metabolismo da espermidina pode ser considerada um alvo para o tratamento de doenças autoimunes.

Figura 4 - TLR4 e vias de sinalização frente ao LPS.



A ligação de LPS ao MD-2 promove a dimerização de TLR4/MD-2 e ativa as vias de sinalização MyD88 ou TRIF.

Fonte: Chen et al, (2018)

A integração entre os sistemas biológicos e as técnicas computacionais, permite explorar o desenvolvimento de medicamentos e pode fornecer rapidamente dados estruturais, químicos e biológicos, e melhorar nossa compreensão de potenciais alvos de drogas. A associação interativa entre vários métodos, como a triagem virtual e o acoplamento molecular, com vários componentes imunológicos tem sido empregada por pesquisadores para o desenvolvimento de drogas farmacologicamente ativas.

O crescente aumento de resistência dos microrganismos patogênicos e a emergência de novos patógenos, acentua a necessidade de estudar formas alternativas no combate a infecções. Assim, a definição de moléculas com atividade microbicida e que interfira na imunidade inata e adaptativa, potenciando seu efeito, ou que atuem diretamente sobre o microrganismo, associado ou não a outras moléculas, são candidatos atrativos a serem explorados. Vários aspectos discutidos anteriormente sugerem que as poliaminas podem ser moléculas importantes na modulação imune. Os análogos desta molécula têm se mostrado promissores no esclarecimento e tratamento de doenças infecciosas. A migalina foi originalmente isolada de hemócitos da aranha *Acanthoscurria gomesiana*, é uma bis-acilpoliamina sintética, análoga da poliamina espermidina. O fato de ter sido isolado de um organismo invertebrado e por apresentar efeitos microbicidas (47, 48), pode apresentar características biológicas diferenciada.

No presente trabalho, foi investigado o mecanismo molecular de ação da migalina sintética sobre *E. coli* e seus efeitos no receptor Toll-like 4, em macrófagos murinos estimulados com LPS por meio da avaliação da produção de mediadores imunes *in vitro* e análises *in silico* usando triagem virtual e acoplamento molecular.

2. OBJETIVOS

- O objetivo deste estudo foi caracterizar o mecanismo molecular de ação da migalina sintética no modelo bacteriano com *E. coli* DH5 α .
- Avaliar o efeito na resposta inflamatória induzida por LPS, através da ação no receptor Toll-like 4, usando linhagens de células fagocíticas e macrófagos derivados de medula óssea murina associado à triagem virtual e análise de acoplamento molecular.

2.1. Objetivos específicos

- Sintetizar, purificar e quantificar a migalina;
- Determinar *in vitro* o mecanismo de ação desta molécula em modelo bacteriano com *E. coli*;
- Analisar o efeito da migalina sintética na resposta inflamatória induzida pela ativação de células fagocíticas estimuladas com LPS;
- Correlacionar as atividades imunes obtidas nos ensaios *in vitro* com a previsão das atividades biológicas da migalina utilizando ferramentas computacionais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese da migalina

A migalina foi sintetizada no Centro de Pesquisas em Toxinas, Resposta-Imune e Sinalização Celular (CeTICS), Laboratório de Toxinologia Aplicada (LETA) - Instituto Butantan. A molécula foi sintetizada conforme o método clássico de química de peptídeos (49). A síntese foi realizada em solução de HBTU (50) para a esterificação do grupo carboxila do ácido gentísico e assim, permitir a formação de uma carboxamida por condensação formal de dois grupos amino primários da espermidina com um grupo carboxílico de duas moléculas de ácido gentísico (ácido 2,5-dihidroxibenzóico). Os dados estão disponíveis no banco de dados *Ontology of Chemical Entities of Biological Interest* (ChEBI) como *Mygalin* (CHEBI: 64901) (51).

3.1.1. Condições de purificação e quantificação da migalina sintética

Após da síntese o material foi colocado no HPLC, no sistema preparativo Shimadzu® (FR-CLAE) usando uma coluna preparativa Shim-pack XR-ODS C18 (5 µm, 20 mm, 250 mm) com um fluxo de 8 mL/min e comprimento de onda 320 nm com gradiente 0-0% 10 minutos, 0-8% 5 minutos e 8-60% em 55 minutos, com ácido trifluoracético (TFA 0,1%) (bomba A) e acetonitrila/ácido trifluoracético (ACN100%/TFA 0,1%) (bomba B):

Os picos/frações obtidos dos produtos da síntese foram colocados na cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) usando o equipamento Finnigan™ Surveyor MSQ Plus (Quadrupole) da THERMO SCIENTIFIC scan de 100-2000 m/z, duração de 1s e fonte no modo positivo com 3.1kV, 40V.

3.2. Ensaio em modelo bacteriano

Para determinar o mecanismo de ação da migalina em bactérias Gram-negativas, foi escolhida a bactéria *E. coli* DH5α, onde foi investigado a ação da migalina no DNA bacteriano, integridade de membrana, síntese de proteínas, geração de ROS e atividade quelante.

3.2.1. Cultura e ensaio antibacteriano

A bactéria *E. coli* DH5α foi cultivada a 37 °C usando 10 mL de caldo Luria-Bertani (LB) (52), com agitação a 180 rpm *overnight*, posteriormente 100 µL da cultura

foi re-inoculada em 20 mL de caldo LB e crescida até atingir a fase exponencial. A densidade ótica ($OD_{620\text{ nm}}$) foi ajustada para 0,3 (10^8 CFU/mL). Em seguida, 10^5 CFU/mL foram diluídas para obter 10^3 CFU em 100 μ L de M9 (meio mínimo) nas microplacas. Atividade antimicrobiana das moléculas foi determinada em microplacas de 96 poços contendo diluições seriadas da migalina sintética. As placas foram preparadas em triplicata e incubadas a 37 °C com agitação a 180 rpm, sendo o MIC (concentração inibitória mínima) determinado após 18 horas. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi usado como controle de morte das bactérias sendo o experimento realizado no escuro para proteção da reação. Para avaliar a propriedade intrínseca da migalina, 10^7 CFU/mL foram tratadas individualmente com duas concentrações da migalina e H_2O_2 (0,5 e 1 mM), espermidina 1 mM e ácido 2,5-dihidroxibenzoico em PBS a 37 °C por 18 horas (53).

3.2.2. Viabilidade celular

A viabilidade bacteriana foi determinada a partir de dois métodos: Através da contagem das unidades formadoras de colônias (CFU), nas placas após o tratamento e pelo teste de resazurina (54, 55). O teste de resazurina, nas placas de cultura foi realizado após o tratamento com a migalina por 18 horas, sendo adicionado 20 μ L por poço de uma solução de resazurina (0,2 mg/mL), e as placas incubadas por 2 horas a 37 °C. A mudança de cor foi monitorada (cor azul indicando células inviáveis e a cor rosa as células viáveis) e a leitura da placa foi realizada a 550 e 595 nm.

3.2.3. Dano oxidativo no DNA

O dano ao DNA bacteriano foi avaliado por dois métodos diferentes: usando o DNA puro de *E. coli*, que foi incubado direto com a molécula (efeito *in vitro*) e o DNA isolado após o tratamento das bactérias com os compostos (efeito *in vivo*). O produto da reação foi analisado em géis de agarose em condições alcalinas (56).

3.2.3.1. Ensaio *in vitro* com DNA purificado

O DNA foi purificado usando o kit *Wizard Genomic DNA Purification*. Para avaliar o efeito do pH na atividade da molécula contra o DNA purificado, 1 μ g de DNA foi incubado por 2 horas com a migalina e a espermidina (0,25; 0,5 e 1 mM) em tampões com diferentes pH (citrato pH: 3,6; fosfato pH: 7,2 ou bicarbonato pH: 10,6). Como controle positivo do dano ao DNA, foi utilizado a reação de Fenton: 1 μ L de $FeSO_4$ (1mM), 1 μ L de 2 % v/v H_2O_2 e 3 μ L de água ultrapura, foram misturados em um volume

total de reação de 15 μL (57). Em outro ensaio, para descartar a presença de DNases nas amostras, a migalina foi tratada com inibidores de DNases como citrato de sódio (100 mM) e EDTA (100 mM) (58) e submetida a danos físicos por aquecimento a 75 °C por 15 minutos e incubada com 1 μg de DNA.

Para avaliar o efeito da espermidina na proteção do DNA, a reação foi incubada por 2 horas com espermidina (0,5 e 1 mM) e migalina (0,25; 0,5 e 1 mM). Após o tratamento, o DNA foi usado como molde para amplificar por PCR o gene isocitrato desidrogenase, com os primers F: 5' ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA-3' e R 5'GGACGCAGCAGGATCTGTT-3' (59). Após, quantidades iguais de 5 μL de DNA ou produtos de PCR foram misturados com o tampão de carga e aplicados no gel de agarose 1% em condições alcalinas. A eletroforese foi realizada a 70V, e coradas com gelRED (Biotinun). Todas as imagens foram obtidas por um sistema de documentação eletrônica (UVITEC, Cambridge).

3.2.3.2. Ensaio *in vitro* com *E. coli* DH 5 α

As bactérias na fase de crescimento exponencial (10^6 CFU/mL) foram incubadas com migalina (0,5 e 1 mM), espermidina (1 mM) ou H₂O₂ (0,5 e 1 mM) a 37 °C por 5 e 18 horas. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas a 13000 rpm e o *pellet* lavado uma vez com PBS para o procedimento da extração de DNA. Quantidades iguais de eluido de DNA (7 μL) foram separadas por eletroforese em condições alcalinas.

Em outro ensaio, para visualizar a fragmentação do DNA, as culturas bacterianas tratadas por 18 horas com as moléculas, foram lavadas e permeabilizadas com etanol puro, coradas com DAPI (0.3 μM) e visualizadas na microscopia confocal (60).

3.2.3.3. Efeito da migalina na síntese de DNA pelo ensaio de filamentação

O efeito inibitório da migalina na síntese de DNA foi avaliado pelo ensaio de filamentação da *E. coli* descrito por Alfred (61) com pequenas modificações. As bactérias na fase exponencial (10^8 CFU/mL) foram cultivadas em meio M9 e tratadas com migalina (0,5 mM) ou ciprofloxacino (0,5 mM) durante 3 horas. Após tratamento 20 μL de amostra foi colocado na lamínula e corado com a coloração de Gram. As células foram visualizadas em microscopia ótica de luz, com aumento de 1000X. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.4. *Dano nas membranas e atividade esterase*

Para avaliar o dano nas membranas causado pela migalina, as *E. coli* (10^8 CFU/mL) foram cultivadas com migalina ou ampicilina nas concentrações de 0,5 mM por 5 horas, lavadas, centrifugadas e ressuspensas em tampão fosfato 50 mM, pH 7.0. Em seguida as bactérias foram incubadas com iodeto de propídio (PI) na concentração final de 60 μ M e mantidas protegidas da luz por 15 minutos (62), em seguida 20 μ L da amostra foi colocada em uma lâmina com 1% de agarose e coberto com a lamínula. A integridade da membrana foi analisada por microscopia confocal. Para o ensaio da atividade esterase, as bactérias foram tratadas com migalina por 4 horas, lavadas com PBS e ressuspensas em PBS 50 mM. Em seguida 180 μ L da suspensão bacteriana foi colocada nas placas pretas de 96 poços com adição de 20 μ L de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA, 250 μ M). As placas foram incubadas por 30 minutos protegidas da luz e a fluorescência foi monitorada no fluorômetro *PerkinElmer Victor 3TM 1420 multilabel counter* com excitação/emissão de 485/535 nm (62, 63).

3.2.5. *Determinação de ROS*

Para este ensaio, 1 mL de *E. coli* (10^6 CFU/mL) na fase exponencial foi lavado com PBS e ressuspendido em 1 mL de tampão fosfato 50 mM, em seguida foram tratados com migalina (0,25 e 0,5 mM) ou H₂O₂ (0,25; 0,5 e 1 mM) por 15 minutos em temperatura ambiente, seguido da adição do fluoróforo CM-H2DCFDA na concentração final de 1 μ M. Posteriormente 100 μ L da amostra foi transferida para microplacas pretas (64) e a fluorescência foi quantificada usando o fluorômetro *PerkinElmer Victor 3TM 1420 multilabel counter* com excitação/emissão de 485/535 nm.

3.2.6. *Interação Migalina-LPS*

O LPS de *E. coli serotype:0111:B4* foi preparado em água comercial livre de LPS, usando 50 μ L da solução de LPS em diferentes concentrações (10, 20, 40, 80, 160, 320 e 640 ng/mL) foi incubada com 5 μ L de uma concentração fixa de migalina (500 μ M) por 1 hora na estufa a 37 °C. A interação entre Migalina-LPS foi monitorada pela mudança de absorbância 320 nm (absorbância da migalina). A reação foi quantificada usando 2 μ L de cada amostra no espectrofotômetro *NanoVue PlusTM (GE Healthcare Life Science)* empregando o *Pathlength* de 0,5 nm. As placas contendo as amostras foram preparadas em triplicata e todos os experimentos foram realizados no escuro. O branco da reação foi água livre de LPS (65).

3.2.7. Níveis da Glutathiona (GSH) e perfil proteico

As bactérias *E. coli* (10^9 células/mL) tratadas com migalina, ciprofloxacino ou gentamicina por 18 horas, foram centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos, posteriormente lavadas com PBS e ressuspendidas em 250 μ L do tampão de lise (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 2,5 mM, NaF 20 mM, Na₃VO₄ 1 mM, Triton X-100 0,5% e PMSF 1mM). Em seguida, as amostras foram sonicadas com (Homogeneizador ultrassônico HD 2070) em gelo por 5 ciclos de 20 segundos em 50 W e mantidas em repouso no gelo por 1 minuto. O lisado celular foi centrifugado à 4 °C, 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado e usado para quantificar as proteínas usando o *Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)*. Para medir os níveis de GSH foi utilizado o reagente de *Ellman's* (66), onde 25 μ g da proteína celular foi adicionada nas microplacas de 96 poços contendo uma solução de 50 μ L de glutathiona redutase (GR) 50 nM, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NADPH 200 μ M, EDTA 1 mM, DTNB 1 mM (67). A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e a leitura realizada a 412 nm. O nível do GSH foi estimado após normalização da quantidade de proteína.

Para o perfil proteico, os sobrenadantes dos lisados celulares foram diluídos em tampão de amostra com SDS, aquecidos a 90 °C por 10 minutos e separados por eletroforese em géis de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) (68). Quantidades iguais de proteínas (25 μ g) foram aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada no equipamento *Hofer miniVE (Amersham Biosciences)* por 90 minutos a 4 °C, em 100 V. O perfil proteico foi visualizado pela coloração de azul de *Coomassie*.

3.2.8. Atividade quelante da migalina com Fe

Para avaliar a atividade quelante da migalina frente ao Fe, o ensaio foi realizado seguindo a metodologia de Baccan e Vitorino (69, 70). O Fe-NTA (Nitrilotriacetato de ferro) foi preparado por titulação de NTA a 70 mM com NaOH, seguido pela adição de FAS sólido (Sulfato de Amônio Ferroso) à uma concentração final de Fe 20 mM, esta solução foi aquecida em banho maria por 1 hora. As alíquotas de 10 μ L de Fe (NTA) em HBS/Chelex (Tampão HEPES Salino; Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, Chelex 1g/100 mL; pH 7.4) foram transferidas para as microplacas de 96 poços e tratadas com 10 μ L de migalina em diferentes concentrações (0 até 1000 μ M), seguido da adição de 180 μ L da mistura de Dihidrorodamina (DHR 50 μ M) com ácido ascórbico (40 μ M) em água. A curva da

cinética foi registrada em fluorômetro com excitação/emissão de 485/520 nm a 25°C por 40 minutos. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

3.3. Análise usando linhagens macrofágicas

Para demonstrar os efeitos de migalina nas células eucariotas, utilizamos culturas de macrófagos J774A.1 e células RAW264.7 onde avaliamos a expressão de genes e mediadores imunes como iNOS, COX-2 e TNF- α .

3.3.1. Animais

Os camundongos C57BL/6 foram eutanasiados em câmara de CO₂, posteriormente a medula óssea da tíbia e do fêmur foram extraídos para obter as células que foram diferenciadas em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de acordo com o protocolo de *Weischenfeldt* (71). Os animais foram obtidos do biotério da Faculdade de Medicina da USP e do Instituto Butantan. Todo procedimento está de acordo com aprovação do Comitê de Ética Animal do Instituto Butantan Protocolo CEUA N° 1352/14 e CEUA protocolo N° 5609301018.

3.3.2. Diferenciação dos macrófagos obtidos de medula óssea

O conteúdo celular extraídos do fêmur e da tíbia para obtenção das células medulares deram origem aos macrófagos (MDMs), utilizado em nossos experimentos sendo a manutenção de acordo com protocolo padrão (72). Brevemente, as células medulares obtidas foram centrifugadas a 1200 rpm, lavadas com PBS a 4 °C e cultivadas no meio RPMI 1640 (*Gibco Invitrogen Corporation*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Gibco Invitrogen Corporation*), de L-glutamina, 50 UI/mL de penicilina e 50 μ g/mL de estreptomicina, 1 mM de piruvato, 0,2 mM de sódio, 1 mM de aminoácidos não essenciais, 50 μ M de β -mercaptoetanol e 25% do sobrenadante de células L929 (v/v) em placas de Petri durante 7 dias. No terceiro e quinto dia, metade do sobrenadante foi substituído por meio novo e as células foram incubadas nas mesmas condições. No sétimo dia, as células diferenciadas foram lavadas com PBS pH 7,2 para remover células não aderentes e as aderentes foram raspadas e plaqueadas a $1,5 \times 10^6$ células/ 500 μ L/ poço em placas de cultivo de 24 poços e mantidas por 18 horas nas mesmas condições. Após este período de incubação o meio foi desprezado, as células lavadas com PBS e cultivadas em meio RPMI completo (sem o sobrenadante de L929) para os posteriores ensaios.

3.3.3. Cultura celular e ensaio citotóxico

As linhagens celulares J774A.1 (ATCC) e RAW 264.7 foram mantidas a 37 °C com 5% de CO₂ no meio RPMI completo contendo 10% de SFB, gentamicina (25 µg/mL), estreptomicina (50 µg/mL) e penicilina (50 U/mL) foram obtidas na fase exponencial de crescimento e usadas nos ensaios. As células foram plaqueadas na concentração de 1,5x10⁶ células/ 0,5 mL/ poço em placas de 24 poços (Costar®).

Durante os ensaios, macrófagos MDMs e as linhagens celulares J774A.1 e RAW 264.7 foram cultivadas em meio RPMI completo, sendo as culturas tratadas com migalina (0 - 2000 µM) por 24 horas. Posteriormente as células foram coradas com MTT (0,5 mg/mL), para o teste de viabilidade celular. Após 3 horas com MTT, o meio de cultura foi removido e adicionado 100 µL de DMSO (Dimetilsulfoxido) para dissolver os cristais de formazan (73), e após 10 minutos a densidade óptica foi medida em absorvância de 595 nm. A viabilidade celular foi comparada entre grupo controle não tratado (100 % viável) e tratados com migalina. Como controle de morte celular foi utilizado *Triton X-100* (0,1%).

3.3.4. Efeito da migalina nos ácidos nucleicos e proteínas

As células J774A.1 (1,5 x 10⁶ células) foram cultivadas em placas de 24 poços com meio RPMI completo com adição de migalina por 24 horas (0 até 1000 µM), para avaliar o dano no DNA, RNA e nas proteínas por meio das eletroforeses das amostras.

3.3.5. Efeito da migalina em células estimuladas com LPS

As linhagens celulares e os MDMs foram plaqueados a uma concentração de 1,5x10⁶ células/ 0,5 mL/ poço em placas de 24 poços (Costar) por 24 horas a 37 °C. Após este período, as células foram lavadas com PBS e incubadas com meio novo e migalina (50, 150 ou 450 µM) por 1 hora, antes da adição do agonista de TLR4 (LPS 100 ng/mL). Após a adição do agonista, os MDMs foram incubados por 6 e 24 horas, em seguida as células foram coletadas para extração total de RNA, e os sobrenadantes da cultura coletados para dosagem de mediadores imunes e NO.

3.3.6. Extração de RNA

As culturas de macrófagos tratadas ou não por 6 horas com migalina foram lavadas com PBS (500 µL por poço) para descartar resíduos de meio de cultura. Em seguida foi adicionado 180 µL de *QiAzol Lysis Reagent* (Qiagen ®) por poço e as placas foram

colocadas por 10 minutos em gelo seco. O conteúdo foi transferido para um tubo de microcentrífuga livres de *RNase/DNase* e centrifugado a 13000 rpm/minuto. O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo novo, para o processo de purificação de RNA, usando o *Kit Direct-Zol* (ZYMO RESEARCH), seguindo as instruções do fabricante. Finalmente o RNA total foi eluído da coluna com água livre de *RNase/DNase*. Os RNAs foram quantificados pela absorbância a 260 nm usando *GE NanoVue PlusTM Spectrophotometer* (GE Lifesciences) e a integridade dos RNAs foi visualizada em géis de agarose 1,2% (74, 75), corados com *gelRedTM* (Biotium).

3.3.7. RT-PCR

A partir do RNA total, 100 ng foram convertidos para cDNA usando *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (*Applied BiosystemsTM*): 10 µL de 2X RT tampão, 1 µL de Enzima Mix, 4 µL de água *Nuclease-Free DNase/RNase-free* e 5 µL de RNA, para obter o volume final de reação de 20 µL. As reações foram aquecidas no termociclador *Veriti® 96-Well* (*Applied BiosystemsTM*) a 37 °C por 60 minutos, seguido de 95 °C por 5 minutos para inativação da enzima e resfriadas a 4 °C. Finalmente, as amostras foram rotuladas e guardadas no freezer a -20°C. Os cDNA foram usados como molde para a amplificação dos genes de interesse iNOS, Cox-2, TNF- α , IL-6, IL-10 e β -actina (controle interno), os primers empregados neste estudo estão na Tabela 1. Em seguida 5 µL dos produtos de cDNA (0,1 ng) foram amplificados com *Platinum® Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen*): 2,5 µL de tampão de enzima 10x; 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µL de dNTPs 10 mM; 0,5 µL de 10 µM *PrimerF*; 0,5 µL de 10 µM *PrimerR*; 0,1 µL de 5U/µL de Taq Enzima e 15,15 µL de água *Nuclease-Free DNase/RNase-free*, o volume final de reação foi de 25 µL. As reações foram aquecidas no termociclador *Veriti® 96-Well* (*Applied BiosystemsTM*) com as seguintes condições de ciclagem: 1 ciclo de 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58°C (iNOS, β -actina) e 30 segundos a 72 °C, 1 ciclo de 7 minutos a 72 °C e finalmente esfriado a 4 °C. Todas as reações de PCR incluíam os RT negativos e controle negativo de PCR.

Tabela 1 - Primers usados no RT-PCR

Gene	Forward primer (5'-- 3')	Reverse primer (5'-- 3')	Annealing T (°C)
iNOS	GCTCCCTATCTTGAAGCCCC	CCCAAACACCAAGCTCATGC	58°C
COX-2	CTTCGGGAGCACAACAGAGT	AATGTTGAAGGTGTCGGGCA	58°C
TNF- α	GTAGCCCACGTCGTAGCAAA	CTGGAAGACTCCTCCCAGGTA	56°C
IL-6	ACGATGATGCACTTGCAGAAAA	GGTCTTGGTCCTTAGCCACTC	56°C
β -actina	TATGCTCTCCCTCACGCCAT	AGGTCTTTACGGATGTCAACG	58°C

3.3.8. Eletroforese em géis de agarose

Todos os produtos de RT-PCR (10 μ L) foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,5% a 70 V em tampão TAE 1x, corados com *gelRedTM* (Biotium) e visualizados usando o sistema de foto-documentador eletrônico (UVITEC, Cambridge). Para as quantificações das densidades dos produtos de PCR foi usado o programa *Image J* (<http://imagej.nih.gov/ij/>). As densidades dos produtos de PCR foram normalizadas contra a expressão do gene β -actina.

3.3.9. Dosagem de Óxido nítrico (NO)

Os sobrenadantes das culturas de MDMs, J774A.1 ou RAW foram coletados após o tratamento por 24 horas para verificar presença de óxido nítrico, que foi quantificado usando a reação *Griess* (76). Para avaliar a presença de nitrito (NO_2^-), 50 μ L do sobrenadante e 50 μ L de uma solução de 1% de sulfanilamida foi adicionada a uma placa de 96 poços e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente protegida da luz. Em seguida, 50 μ L de 0,1% NED foi adicionado seguido por mais uma incubação nas mesmas condições. A leitura da placa foi realizada em absorbância de 550 nm. A concentração NO_2^- em cada amostra foi baseada na curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) construída entre 1-100 μ M. Os testes foram realizados em quadruplicata (N=4).

3.3.10. Ensaio de neutralização de LPS por migalina sintética

O LPS (100 ng/mL) foi incubado com migalina (50, 150 ou 450 μ M) durante 45 minutos em banho maria a 37 °C. A mistura foi usada para estimular os macrófagos por 24 h, e os sobrenadantes foram coletados para medir a produção de NO. A polimixina (30 μ g/mL) foi utilizada nas mesmas condições como controle positivo para bloquear o efeito biológicos do LPS (77).

3.3.11. Ensaio de ligação FITC-LPS

Um miligrama de LPS de *E. coli* sorotipo 0111: B4 foi conjugado com 4 mg de FITC seguindo a metodologia de Skelly (78) com pequenas modificações, a proporção foi de 1:4 em 1,5 mL de borato de sódio (0,1 M) pH 10,5 por 3 horas a 37 °C e 180 rpm. O conteúdo foi dialisado *overnight* em membrana de MWCO de 1000 (Spectra) em 0,15 M NaCl com 4 trocas.

3.3.12. Ensaio de interação de migalina sintética com FITC-LPS

A interação entre migalina e LPS-FITC foi estudada por meio do monitoramento da fluorescência do conjugado LPS-FITC. Para este ensaio 10 µg/mL LPS-FITC foi incubado com diferentes concentrações de migalina (50, 150 ou 450 µM) em 100 µL de solução salina, em placas pretas de 96 poços, protegidas da luz. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37 °C e a fluorescência lida, empregando uma excitação e emissão fixa de 485/535 nm no equipamento *PerkinElmer Victor 3™ 1420 multilabel counter fluorometer* e outra de varredura com excitação de 475 nm e 500 - 560 nm emissão como foi descrito por (79) utilizando o equipamento *Cytation 3*. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata.

3.3.13. Dosagem de TNF- α

Foi analisado nos sobrenadantes das culturas a presença de TNF- α usando o ensaio imunoenzimático de ELISA com kits de *eBioscience*, seguindo as orientações do fabricante. As placas foram sensibilizadas com anticorpo de captura em tampão de sensibilização na diluição 1:250 com incubação a 4 °C (*overnight*). No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS 0,05% *Tween-20* e bloqueadas por uma hora com o tampão de bloqueio. Em seguida, as placas foram lavadas e os recombinantes padrões e amostras foram adicionados. A reação foi novamente incubada a 4 °C (*overnight*), em seguida foi adicionado o anticorpo de detecção, na diluição 1:250 em tampão apropriado e as placas novamente incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após a lavagem, foi adicionado avidina marcada com peroxidase com posterior incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. Foi feita uma nova lavagem e logo após, adicionado o substrato TMB e a reação interrompida com H₂SO₄ (2N). A reação foi lida a 450 nm no leitor de microplacas (*Multiskan EX, Primary EIA*). A quantidade de citocina presente nas amostras foi calculada baseado nas curvas padrões dos respectivos recombinantes utilizados.

3.3.14. *Western blot*

As células foram colhidas, lavadas com PBS e lisadas com tampão RIPA da Sigma-Aldrich (NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, desoxicolato de sódio a 0,5%, SDS 0,1%, Tris-HCL 50 mM pH 8, inibidores de protease) por 30 minutos a 4 °C, seguindo as instruções do fabricante. Os lisados celulares foram centrifugados a 14.000 rpm por 20 min a 4 °C, e a concentração de proteína foi quantificada usando o Kit de Proteína Pierce™ BCA (*Thermo Scientific*). As proteínas totais (30-50 µg) foram separadas nos géis de 8 – 10% SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente em solução salina tamponada com Tris (pH 7,5) contendo *Tween-20* a 0,1% e leite desnatado a 5%, para o bloqueio da reação. Posteriormente a membrana foi lavada seguindo o protocolo e incubada com anticorpos específicos (anti iNOS de camundongo, específico #2982 de *Cell Signaling Technology*, seguindo as especificações do fabricante) a 1:1500 com agitação suave a 4 °C (*overnight*). O anticorpo IgG anti-coelho, conjugado com peroxidase, foi usado como anticorpo secundário (#7074 de *Cell Signaling Technology*) em uma diluição de 1:2000. As bandas das proteínas foram detectadas por quimiluminescência aprimorada com *IX SignalFire™ ECL Reagente* (# 6883 *Cell Signaling Technology*) e visualizadas usando um sistema de documentação eletrônica (UVITEC, Cambridge).

Para os ensaios da presença de NF-κβ/p65, as linhagens celulares J774A.1 (1,5 x 10⁶ células/poço) foram pré-tratadas com migalina (50, 150 e 450 µM) por 1 hora e em seguida incubadas com LPS (100 ng/mL) por 30 minutos. As proteínas nucleares e citoplasmáticas (80) foram extraídas com *RIPA buffer*, quantificadas com kit BCA e o *western blot* foi realizado usando anticorpo específico NF-κβ/p65 ((#6956 de *Cell Signaling Technology*) de modo similar ao procedimento descrito acima.

3.3.15. *Dosagem intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS)*

MDM (10⁵ células/poço) foram cultivados em microplacas COSTAR® pretas de 96 poços e incubados a 37 °C por 24 horas em meio RPMI, após incubação o meio foi removido e as células pré-tratadas com migalina (300 µM) por 30 minutos em solução de Hans. As células foram estimuladas com PMA (200 nM) por 30 minutos, seguido pela adição de 10 µM de CM-H2DCFDA por mais 30 minutos (81) As placas foram incubadas na ausência de luz e a fluorescência foi medida usando um Multilabel Counter Fluorometer PerkinElmer Victor 3™ 1420 com comprimento de onda de excitação/emissão de 485/535 nm.

3.4. Análise *in silico*

Para prever os parâmetros farmacocinéticos, alvos moleculares e possíveis atividades biológicas da migalina, foi utilizada a estrutura 3D obtida no *Pubchem* (82) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mygalin>) e o formato no sistema de entrada de linha de dados moleculares simplificado SMILES: C1=CC(=C(C=C1O)C(=O)NCCCCNCCCNC(=O)C2=C(C=CC(=C2)O)O)O.

3.4.1. Propriedades moleculares da migalina

Foram estimadas propriedades moleculares da migalina como coeficiente de partição (Log P), área de superfície polar topológica (TPSA), número de átomos, peso molecular, doadores e aceptores de hidrogênio, ligações rotativas e violações da regra de *Lipinski* com o servidor online *Molinspiration* V2018.10 (<https://www.molinspiration.com/>) e *SwissADME*.

3.4.2. Toxicidade e propriedades ADME

Diferentes abordagens foram realizadas para avaliar a Toxicidade, Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME) da migalina usando servidores *web*. O formato SMILES da migalina foi colocado no programa *QSAR Toolbox* (83), um *software* de computador para prever e modelar a toxicidade usando a relação estrutura-atividade quantitativa (QSAR). Também, foi analisado em servidores *web* como, *AdmetSAR* 2.0 (84), *SwissADME* (85), *Lazar toxicity predictions* (86) a previsão do efeito citotóxico para NIH/3T3 usando *MouseTox* (87).

3.4.3. Triagem virtual por similaridade

A partir da transformação da representação estrutural computacional da migalina em formato SMILES, foi possível avaliar sua similaridade com outras moléculas já descritas usando plataformas e bancos de dados; no *Swiss Similarity* (88) sendo avaliado contra 10.639.400 compostos do ZINC *drug-like* e 19.500 ligados provenientes do *Protein Data Bank* (PDB), *PubChem* (82) e *ChEMBL* (89) com um valor de Tanimoto > = 95% e > = 75 respectivamente.

3.4.4. *Predição de alvos moleculares, atividade anti-inflamatória e ligantes para o sistema imune*

Para prever possíveis alvos moleculares da migalina como receptores, enzimas entre outras moléculas, a estrutura deste composto foi submetida nos servidores *web*, DDI-CPI (90), *Swiss Target Prediction* (91) e SEA (92). Essas análises foram baseadas na semelhança com outras moléculas, os *target* foram limitados para o modelo camundongo e humano. Para prever a atividade anti-inflamatória da migalina foi utilizado o servidor *Drug Design Workshop* (DDW) (93) do Instituto Suíço de Bioinformática sendo analisado a proteína COX-2, uma enzima alvo da resposta inflamatória e a síntese de prostaglandina, ambos são modelos para avaliar a atividade anti-inflamatória de moléculas. Para prever se a migalina liga-se a mediadores imune, a estrutura da migalina foi submetida no *ImmtorLig_DB* (94), um repertório de pequenas moléculas com capacidade para ligar-se a receptores do sistema imune tais como TLRs 1, 2, 4 e 6, citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, e moléculas como MHC-I e MHC-II.

3.4.5. *Modelagem molecular para COX-2, iNOS e 5-LOX com migalina*

Os cristais em 3D de iNOS (PDB: 3NQS) (95), COX-2 (PDB: 4PH9) (96), 5-LOX (PDB: 3V99) (97) em complexo com seus inibidores foram obtidos do *Protein Data Bank* (PDB). Os inibidores foram utilizados para gerar o molde e posteriormente removidos das estruturas. O acoplamento molecular de migalina com iNOS, COX-2 e 5-LOX, foi conduzido por *Autodock Vina* (98), os parâmetros adotados foram para 5-LOX (centro_x = 18,39, centro_y = -78,71 e centro_z = -33,90; COX-2 (centro_x = 13,00, centro_y = 23,48 e centro_z = 25,25); iNOS (centro_x = 124,24, centro_y = 115,29 e centro_z = 35,35), com espaçamento de 0,375 Å 8 de exaustividade e tamanho do molde X: 30, Y: 30 e Z: 30 Å para todos. Os resultados das análises do *docking* foram visualizados usando o *software Discovery Studio Visualizer*.

3.4.6. *Modelagem molecular para TLR4*

Estas análises foram realizados em colaboração com o professor Dr. Ricardo Vásquez Ramírez da Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), onde as estruturas moleculares da migalina, curcumina e TAK-242 foram recuperadas do banco de dados *zinc* (99). A curcumina e o TAK-242 foram usados como moléculas de controle para o estudo de acoplamento. Foram calculadas algumas propriedades eletrônicas e físico-químicas selecionadas, incluindo energia total, energia de solvatação, momento do

dipolo, potencial eletrostático (EP), e volume molecular. Todos os cálculos *ab initio* foram realizados com *Spartan'14 software* (100). A estrutura cristalina do TLR4 e seu correceptor MD-2 foi recuperada do PDB, com número PDB ID 3VQ1 (101). TLR4/MD-2 está em um complexo heterotetramérico com seu ligante LPS (lipídio IVa) em dois bolsos de ligação A/C e B/D, onde A e B são monômeros de TLR4 e C e D são monômeros de MD-2. Não foram encontradas moléculas estruturais de água; portanto, todas as moléculas de água, LPS e outros ligantes foram removidos usando o software *Discovery Studio Visualizer* (102). O receptor tetramérico foi dividido em dois dímeros, TLR4-A/MD-2-C e TLR4-B/MD-2-D e cada dímero foi usado como uma estrutura rígida para cálculos independentes de acoplamento.

3.4.7. Cálculos de modelagem

As estruturas moleculares da migalina, curcumina, TAK-242, os dímeros e tetrâmeros de TLR4/MD-2 foram preparadas em formato PDBQT usando o programa *AutoDock* (103), para os cálculos de acoplamento. Todas as ligações rotativas em cada ligante permaneceram livres, enquanto o receptor foi mantido rígido e átomos de hidrogênio e as cargas foram atribuídos. Na configuração de acoplamento, dimensões do molde foi de $36 \times 32 \times 38$ e $36 \times 38 \times 42$ com as seguintes coordenadas: $x = -6.893$, $y = 35.973$, $z = 18.773$ e $x = 11.774$, $y = -21.942$, $z = -2.127$ centrados em MD-2-C e MD-2-D, respectivamente. A caixa de espaçamento foi de $1,0 \text{ \AA}$, e a exaustividade foi definida para 500. Finalmente, o acoplamento molecular foi realizado utilizando-se o *AutoDock Vina* 1.1.2 (98).

3.4.8. Análises de interação do complexo TLR4/MD-2-ligantes

Nos complexos receptor-ligantes obtidos a partir dos cálculos de acoplamento, as energias livres de interação foram analisadas pela mecânica quântica para obter resultados mais precisos do que as afinidades de acoplamento resultantes do *AutoDock Vina*. Foram analisados dois cálculos de energia livre para estruturas diméricas e tetraméricas. A primeira avaliação, investigou o complexo mais fraco com os ligantes obtidos a partir de cálculos de acoplamento. A segunda avaliação, estudou a extensão da influência dos ligantes na interface multimerização durante a formação da estrutura tetramérica. As forças de ligação dos ligantes estavam localizadas na estrutura cristalina da configuração tetramérica de TLR4/MD-2, sem alterações conformais, após a remoção de todos os ligantes acessórios. As coordenadas do ligante no receptor mantiveram a posição obtida

a partir dos cálculos de acoplamento nos dímeros. Assim, na estrutura tetramérica, novas interações de ligantes foram estabelecidas na superfície do TLR4 do segundo dímero. Para evitar confrontos atômicos entre o ligante e o receptor, as cadeias laterais dos resíduos do segundo dímero TLR4 foram relaxadas. Em ambas as avaliações, apenas o primeiro núcleo de resíduos pertencentes à cavidade de ligação foi incluído nas estruturas diméricas e tetraméricas. As energias de interação total incluíam a molécula de ligante e todos os resíduos de bolso de ligação adjacentes. Um procedimento simplificado para calcular a energia de interação (IE) foi fornecido pela seguinte fórmula: $IE = [RL] - [R+L]$, onde IE é a energia de interação de ligação, RL é a energia do complexo formado pelos resíduos do receptor e o ligante, R é a energia dos resíduos TLR4/MD-2, e L é a energia do ligante. As energias de interação de ligação foram determinadas por cálculos de ponto único usando DFT com a função ω B97X-D e o nível de configuração de base 6-31G* (para uma extensa descrição de todos os métodos *ab initio* usados neste trabalho, veja (104) Finalmente, o volume das cavidades de cada tetrâmero TLR4/MD-2 foi calculado usando o programa *Swiss-PDB Viewer* (105). Os cálculos de acoplamento e *ab initio* foram realizados em um computador de 12 núcleos com um processador *Xeon* a 3,4 GHz.

3.5. Análises estatísticas

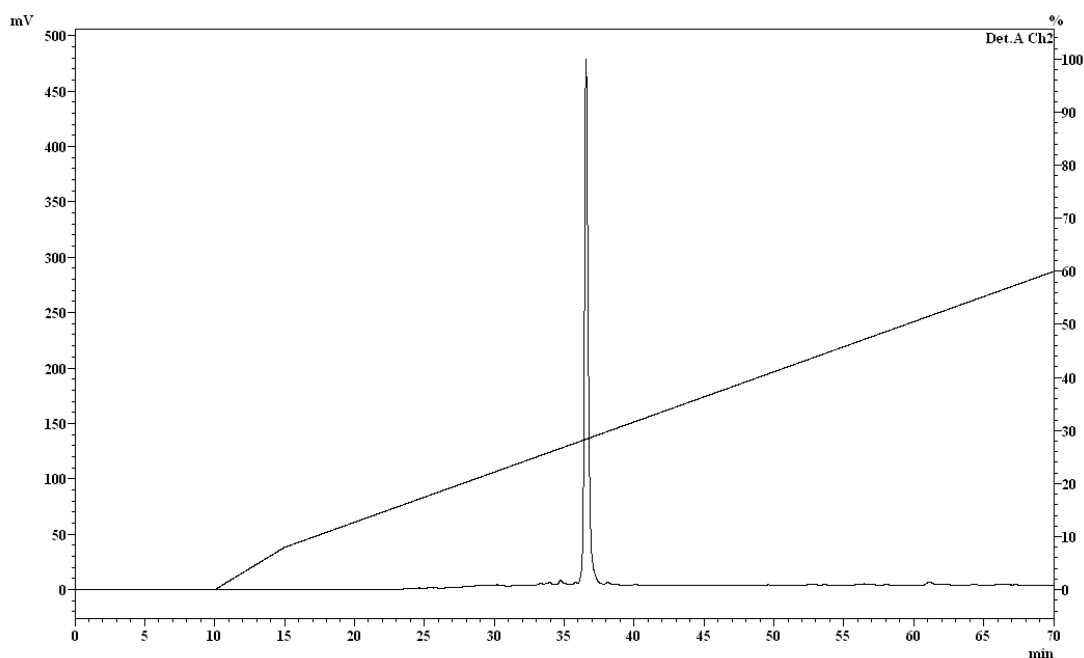
Todos os resultados foram analisados usando *t Student* ou *one-way ANOVA* e a diferença entre grupos determinada pelo teste *Tukey-Kramer* ou *Dunnett*. Múltiplas comparações foram analisadas pelo programa *GraphPad Prism 7* (Graph Pad, San Diego, Califórnia). Os dados foram considerados estatisticamente significativos com um $P < 0,05$ e os resultados representam a média e o erro padrão da média (\pm SEM), de no mínimo três ensaios independentes.

4. RESULTADOS

4.1. Síntese de migalina

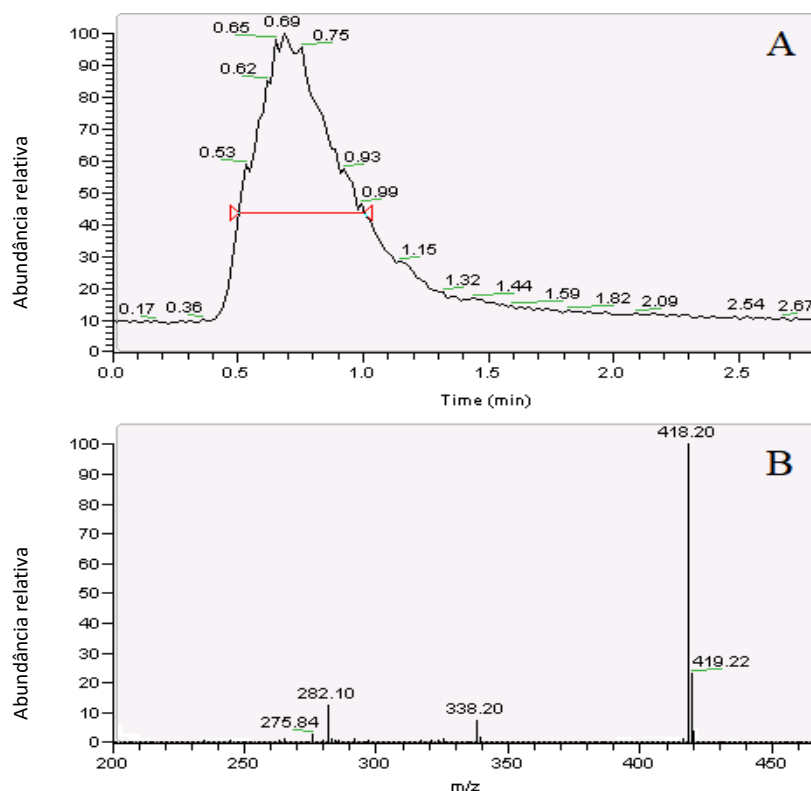
A migalina, foi sintetizada e purificada de acordo com os procedimentos citados na metodologia. A figura 5 mostra o espectro de obtenção da migalina durante sua síntese e purificação após 35 minutos de corrida no HPLC de um tempo total de corrida de 70 minutos, fluxo de 8 mL/minuto, onde foi observado um único pico correspondente a migalina, com absorvância de 320 nm, o qual foi coletado para purificação final do processo da síntese e quantificação no espectrômetro de massas (Figura 6).

Figura 5 - Perfil cromatográfico da migalina sintética.



Fração eluída com 40 % de ACN em TFA, do processo da síntese previamente separada em cartuchos *Sep-Pack C18*, usando um gradiente linear de 0-80% B em 70 min.

Figura 6 – Cromatograma e espectro de massa da migalina sintética.



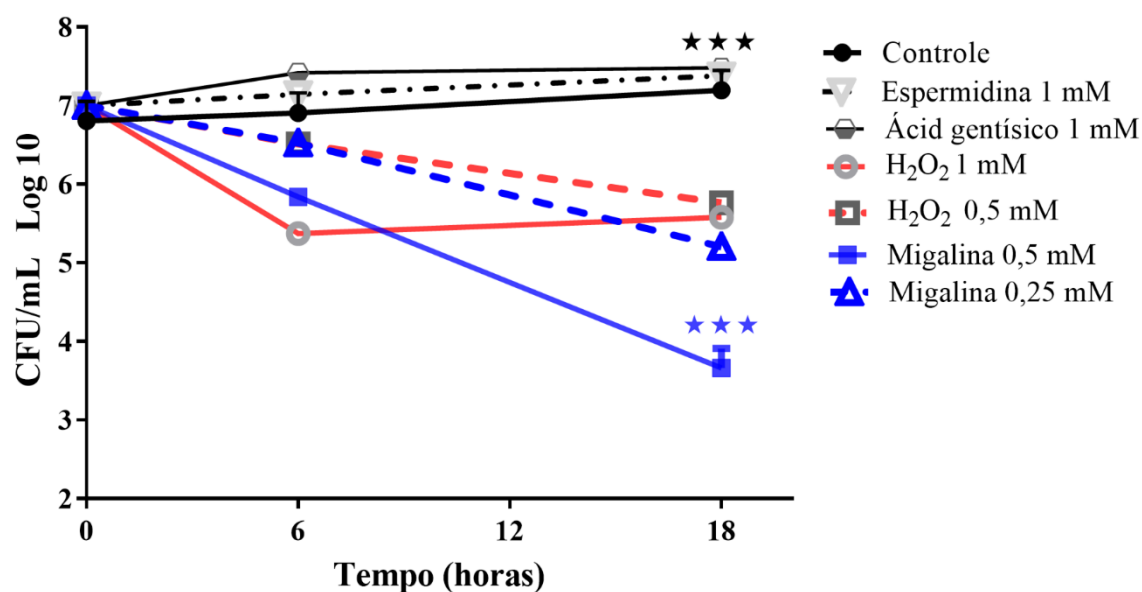
(A) cromatograma de migalina sintética (pureza > 98%) e em (B) espectro de massa (LC-MS) de 418.20 m/z. As análises foram realizadas com espectrômetro operando em modo positivo no LC / MS FinniganTM Surveyor® MSQTM Plus (Quadrupolo).

4.2. Modelo bacteriano

4.2.1. Efeito da migalina no crescimento bacteriano

Para avaliar as propriedades intrínsecas da migalina sintética, sobre o crescimento de *E. coli*, DH5 α usamos uma concentração fixa de bactérias, obtida na fase exponencial e analisamos a viabilidade bacteriana após 6 e 18 horas de tratamento. A viabilidade celular foi realizada através da contagem do número de colônias formadas (CFU) em placas com ágar LB. A figura 7, mostra que a migalina provocou uma diminuição do número de bactérias nas primeiras 6 horas, sendo mais evidenciado após 18 horas de tratamento. A redução bacteriana foi mais evidente ao longo de 18 horas de tratamento com 0,5 mM de migalina, mostrando efeito superior a 1 mM de H₂O₂, utilizado como controle positivo. A especificidade da reação foi confirmada uma vez que o tratamento com ácido gentísico e espermidina não teve efeito sobre o crescimento bacteriano, com valores da CFU semelhantes ao controle sem tratamento.

Figura 7 – Viabilidade de *Escherichia coli* DH5 α após tratamento com micalina.



Bactérias (10^7 CFU/mL) foram cultivadas em meio M9, depois incubadas a 37 °C por 6 e 18 horas com micalina (0,5 e 0,25 mM), espermidina (1 mM), ácido gentsísico (1 mM) e H₂O₂ (0,5 e 1 mM). A viabilidade bacteriana foi determinada por contagem de colônias (CFU) em placas com ágar LB. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes (** $p < 0.001$).

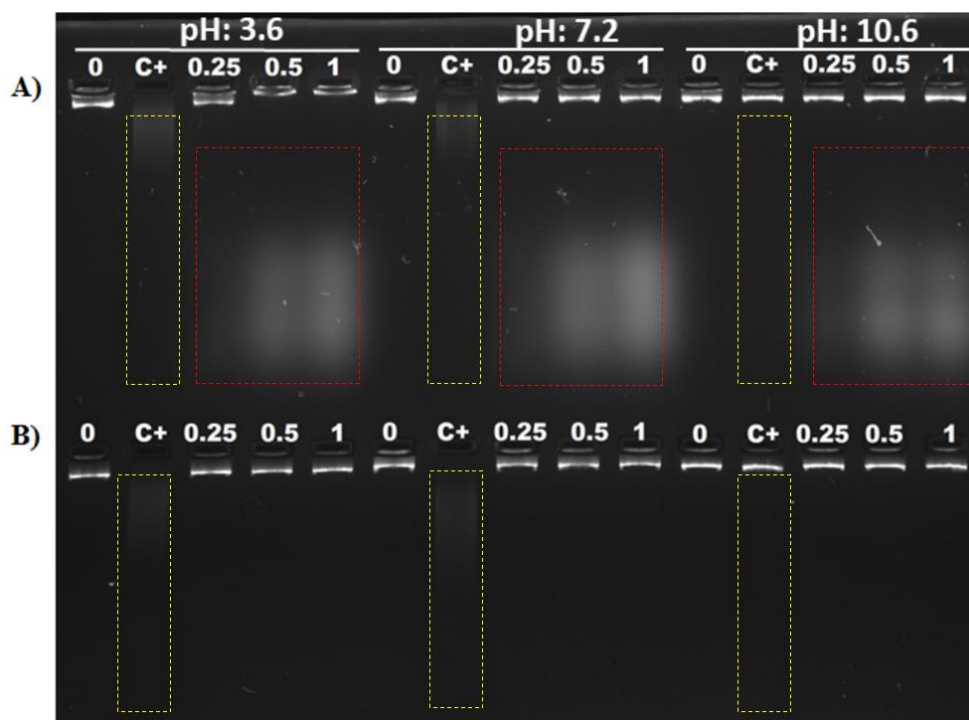
4.2.2. Interação da micalina com DNA

4.2.2.1. Modelo *in vitro* com DNA

Há evidência científica que as poliaminas ligam-se em ácidos nucléicos, podendo provocar uma condensação (106), esta informação nos levou a estudar o DNA como primeiro alvo. Em função disto, os produtos de PCR purificados e de diferentes tamanhos foram misturados com micalina, incubados e visualizados em gel de agarose. Esta mistura resultou na degradação dos produtos (dados não mostrados). Assim, substituímos os produtos de PCR pelo DNA genômico, que após misturado com micalina confirmou o dano no DNA. O mesmo ensaio realizado com a espermidina não provocou danos. Em seguida foi avaliado a influência do pH nesta degradação. Para isto foram utilizados três tampões com diferentes pH (3,6; 7,2 e 10,6), onde ocorreu a reação e após a incubação e revelação no gel alcalino, confirmamos que a micalina (0,25 - 1 mM) provocou danos oxidativos no DNA (Figura 8A). Esse efeito ocorreu em uma faixa variável de pH, conforme visualizado na figura 8 (caixa vermelha), provando que a molécula de micalina tem atividade em uma ampla faixa de pH. O mesmo ensaio realizado com espermidina

(Figura 8B) não causou nenhum dano no DNA. A reação de Fenton foi usada como controle positivo do dano na figura 8 (caixa amarela). Observamos que essa reação foi neutralizada (C+ pH: 10.6), diferindo da observada com migalina no pH alcalino.

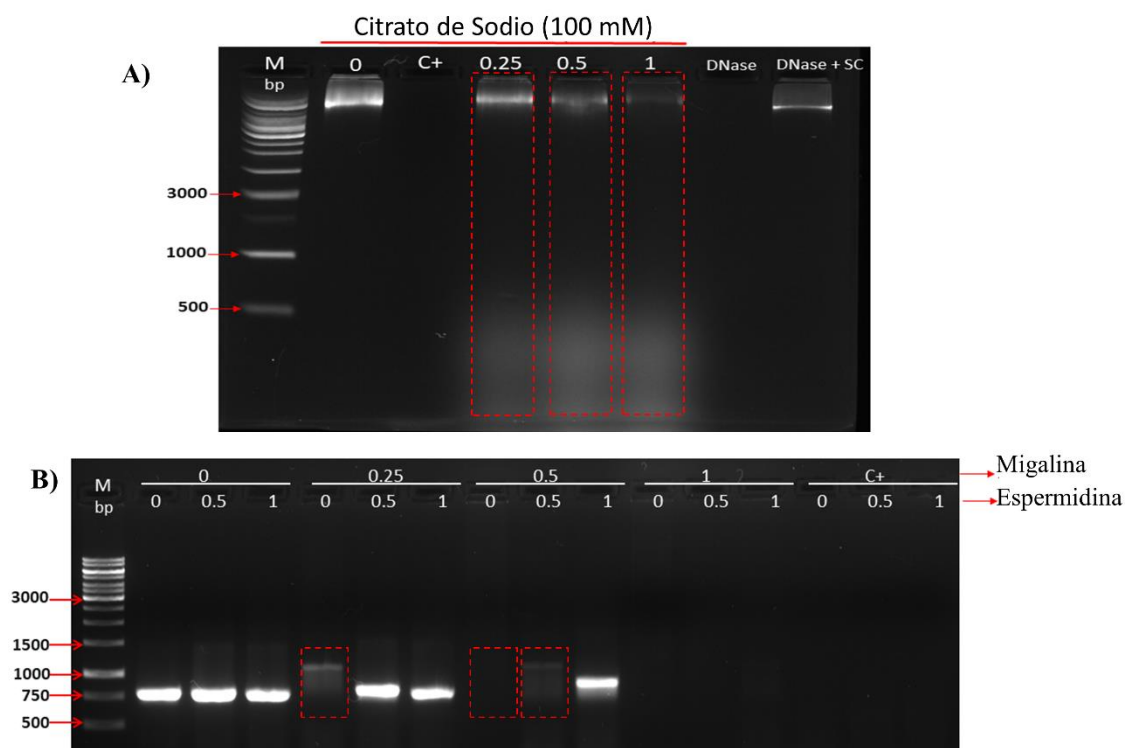
Figura 8 - Interação de DNA genômico de *Escherichia coli* com migalina e espermidina em diferentes pH.



1 μg de DNA foi incubado com diferentes concentrações de Migalina (A) e Espermidina (B) (0,25; 0,5 e 1 mM) em três tampões: Citrato pH: 3.6; Fosfato pH: 7.2 e Bicarbonato-carbonato pH: 10.6 encubados há 37°C por 2 horas. As reações foram colocadas no gel alcalino de agarose 1% e coradas com gelREDTM. C+: Reação de Fenton ($\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$), as imagens foram adquiridas com fotodocumentador eletrônico (UVITEC, Cambridge).

Outro ensaio foi realizado para descartar a presença de DNases externas no dano e degradação de DNA (Figura 9A). Foi demonstrado que a adição do inibidor de DNases como o citrato de sódio (100 mM) não alterou os danos de DNA causados por migalina, ao contrário das amostras de DNA tratadas apenas com DNases (controle de degradação). Este resultado indica que a quebra do DNA foi causada pelo tratamento com migalina. A figura 9B, mostra que a adição de espermidina (0,5 e 1 mM) protegeu amostras de DNA tratadas com migalina nas doses 0,25 e 0,5 mM, não sendo observado com migalina a 1 mM ou com a reação de Fenton (controle positivo), confirmando que altas concentrações de migalina causam danos irreversíveis.

Figura 9 - Efeito da adição de inibidor de DNases e proteção de espermidina sobre dano oxidativo no DNA.



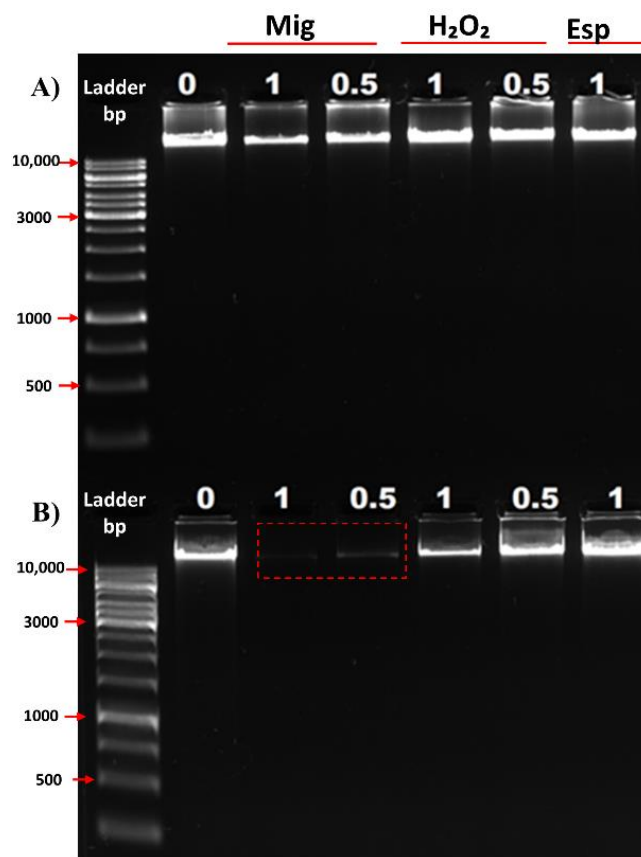
Para demonstrar que o efeito de dano no DNA bacteriano era atribuído à migalina, essa molécula foi incubada com citrato de sódio, inibidor de DNases como é mostrado na figura 9 A) Géis de agarose mostrando DNA tratado com migalina (0,25; 0,5 e 1 mM) na presença do citrato de sódio 100 mM. Controles: DNA não tratado (0), Reação de Fenton (C+), citrato de sódio (SC). O efeito protetor de espermidina no DNA tratado com migalina é observado na figura 9B) PCR de DNA tratado com migalina (0,25; 0,5 e 1 mM) mais espermidina (0,5 e 1 mM). Controles: DNA não tratado (0), Reação de Fenton (C+), *Ladder Gene Ruler* 1 Kb (M).

4.2.2.2. Modelo *in vitro* com *E. coli*

Para comprovar o efeito encontrado no ensaio anterior, usando o DNA isolado (*in vitro*), alguns ensaios foram realizados utilizando bactérias obtidas na fase logarítmica de crescimento. Estas bactérias foram tratadas com migalina (*in vivo*) por 5 e 18 horas, posteriormente lavadas com PBS, o *pellet* foi tratado para extrair o DNA genômico. Em seguida o DNA foi visualizado em eletroforese de agarose, em condições alcalinas. A Figura 10 mostrou que após 5 horas de tratamento com migalina, houve uma redução no DNA genômico, que se acentuou com 18 horas de tratamento, onde o DNA não foi mais visualizado. Em bactérias tratadas com a mesma concentração de H₂O₂, o efeito foi menos pronunciado, enquanto a espermidina não causou nenhum dano no DNA. Isso confirma

os dados anteriores de ensaios *in vitro*, mostrando que o tratamento de *E. coli* com migalina promoveu danos no DNA, diferente do observado com espermidina.

Figura 10 - Efeito da adição da migalina, espermidina e H₂O₂ na integridade do DNA de *Escherichia coli*.



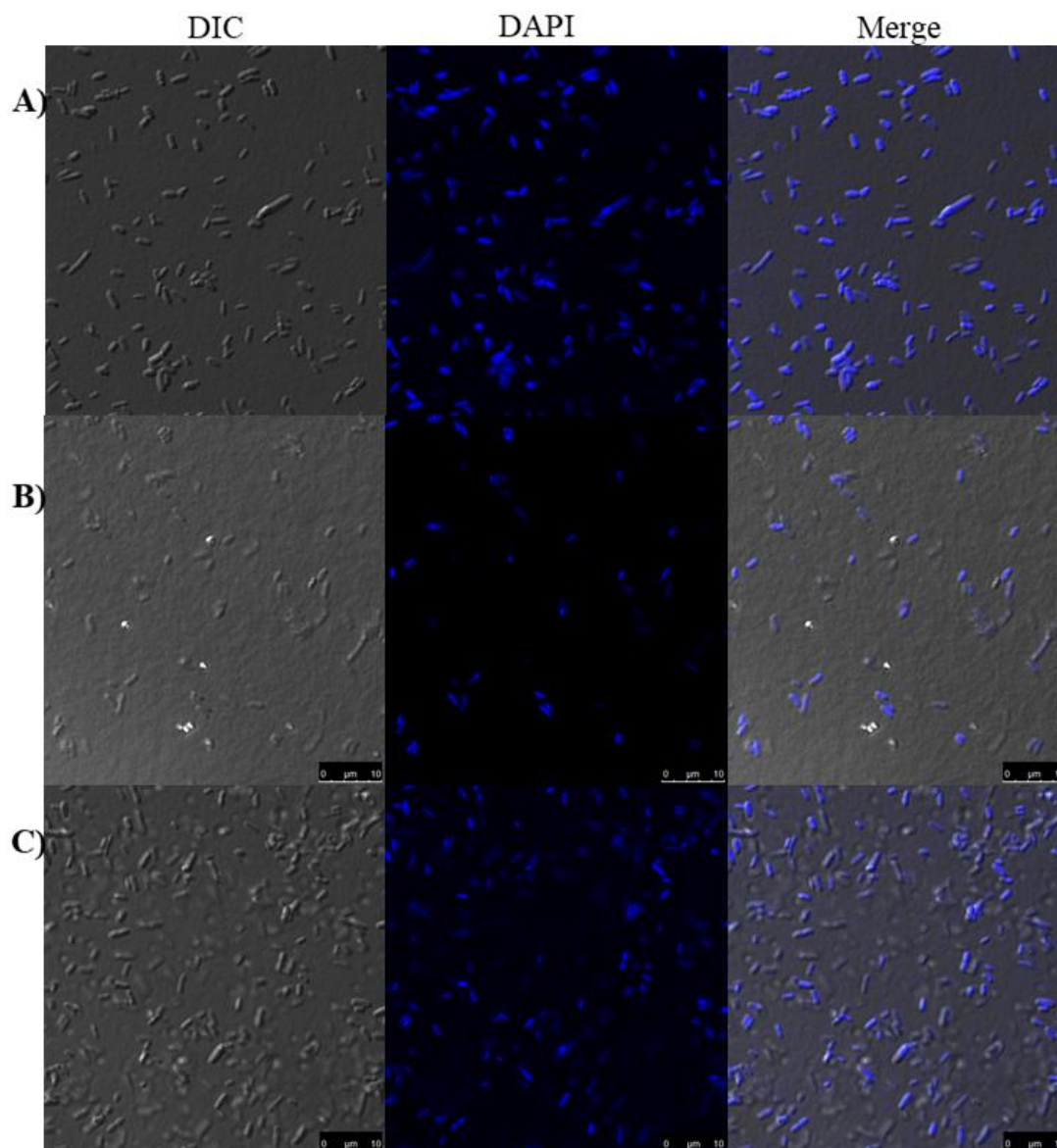
Bactérias (10^6 CFU/mL) obtidas na fase logarítmica foram tratadas ou não com 0,5 e 1 mM de migalina, H₂O₂ ou espermidina (1 mM) por 5 horas (A) e 18 horas (B) a 37 °C. O DNA foi isolado das bactérias e visualizado no gel de agarose em condições alcalinas. Mig = Migalina, Esp = Espermidina.

4.2.3. Marcação do DNA após tratamento com migalina

O DAPI é um corante fluorescente que se liga seletivamente no DNA para formar um forte complexo de DNA-DAPI com alta especificidade. O DAPI tem sido amplamente utilizado para avaliar danos estruturais de DNA. Esta abordagem foi utilizada para confirmar os efeitos nocivos de migalina no DNA bacteriano. Neste ensaio, as bactérias tratadas com ou sem migalina (0,5 mM) ou H₂O₂, como controle positivo foram permeabilizados e corados com DAPI e analisadas por microscopia confocal. A Figura 11 mostra que bactérias não tratadas (Figura 11A) foram completamente marcadas, demonstrando a integridade do DNA. No entanto, as tratadas com migalina (Figura 11B)

ou H_2O_2 (Figura 11C) não mostrou uma coloração intensa, devido ao DAPI não ter intercalado com a fita dupla do DNA danificado. Esses dados reforçam a ideia de que a migalina causa danos oxidativos no DNA bacteriano.

Figura 11 - Microscopia confocal de *Escherichia coli* tratada com migalina, e coradas com DAPI.

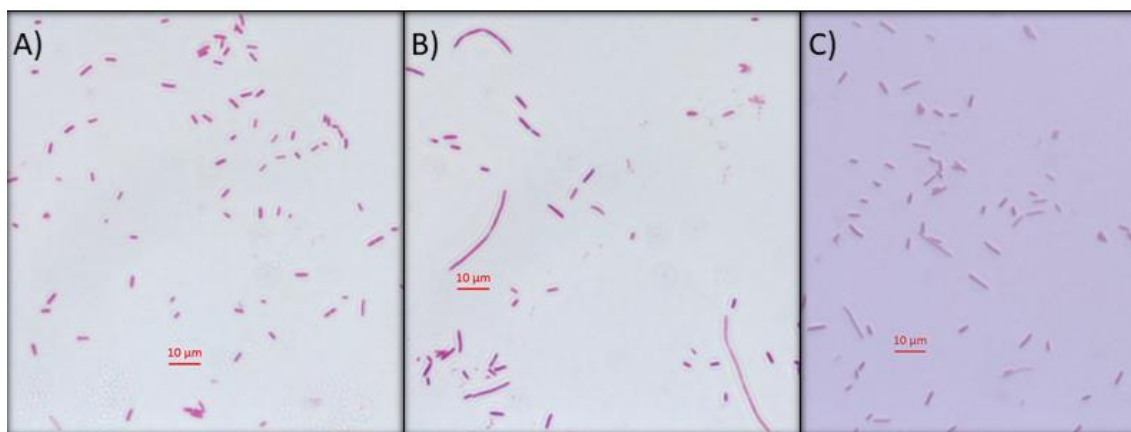


Para evidenciar a fragmentação do DNA, Bactérias (10^6 CFU/mL) não tratada (A) e tratada por 18 horas com migalina (0,5 mM) (B), ou, H_2O_2 (0,5 mM) (C) foram permeabilizados com etanol e coradas com DAPI (3 μM). A microscopia confocal foi usada para visualizar a fragmentação do DNA bacteriano. DIC = *Differential Interference Contrast*

4.2.4. Inibição da síntese de DNA de *E. coli* *in vivo* por migalina, usando o ensaio de filamentação

Outra abordagem usada para determinar a interferência de migalina no DNA de *E. coli*, foi a inibição da síntese de DNA usando o ensaio de filamentação. Para testar se migalina inibe a síntese de DNA, as bactérias foram tratadas por 3 horas com 0,5 mM de migalina (Figura 12B) ou ciprofloxacino (Figura 12C) como controle positivo e sua morfologia e filamentos foram comparados com as de células não tratadas (Figura 12A) por microscopia. Os resultados mostraram que o tratamento com migalina ou ciprofloxacino interferiu na divisão celular, resultando em filamentos bacterianos longos quando comparados com células não tratadas. Esses resultados indicam que a migalina e ciprofloxacino podem se ligar à DNA, inibindo a síntese de DNA *in vivo*.

Figura 12 - Ensaio de filamentação em *Escherichia coli* tratadas com migalina.



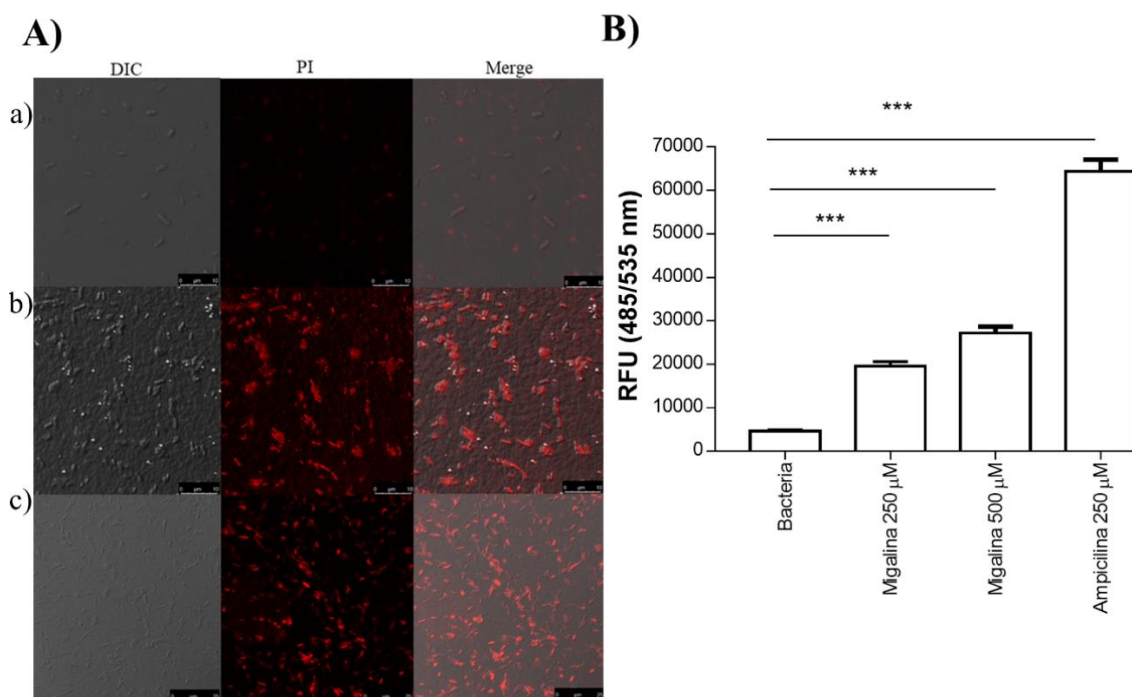
(A) *E. coli* não tratada (10^6 CFU/mL) ou tratado por 3 horas com 0,5 mM de migalina (B) ou ciprofloxacino (C) foram corados pelo Gram. A microscopia ótica (ampliação 1000 \times) foi utilizada para análise de divisão celular e formação de filamentos. Escala 10 μ M.

4.2.5. Ação da migalina na membrana celular e atividade esterase

Além dos danos no DNA, as moléculas antimicrobianas podem atuar em outros mecanismos, incluindo desestruturação da membrana celular (107). Para testar este efeito da migalina na membrana de *E. coli*, as bactérias foram cultivadas por 5 horas na ausência (a) ou presença de 0,5 mM de migalina (b) ou 0,5 mM de ampicilina (c) e coradas com PI para medir alterações de permeabilidade da membrana como pode ser observada na microscopia confocal (Figura 13A). Os resultados indicam que as bactérias não tratadas foram impermeáveis ao PI, enquanto a *E. coli* tratada com migalina ou ampicilina mostrou incorporação de PI, sendo visualizada com coloração vermelha. Isso sugere que migalina

pode promover alterações na permeabilidade da membrana celular em *E. coli*. Para monitorar essa alteração, a atividade esterase intracelular foi avaliada utilizando-se o CFDA. Neste ensaio, o CFDA se difunde para o interior da célula danificada e as esterases clivam o CFDA em um produto altamente fluorescente (108). O tratamento de *E. coli* por 4 horas com 0,25 e 0,5 mM de migalina aumentou o nível de atividade esterase de modo dose dependente, o qual foi quatro vezes maior em relação ao controle não tratado, enquanto a ampicilina (0,25 mM) aumentou essa atividade mais de dez vezes. Estes resultados confirmam que a migalina danifica a membrana celular bacteriana (Figura 13B).

Figura 13 - Efeito de migalina na integridade da membrana e atividade esterase em *Escherichia coli*

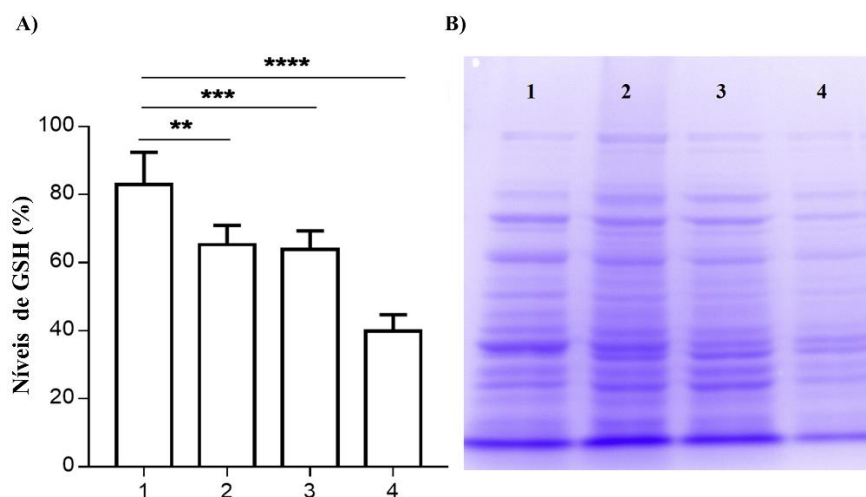


Em (A) Incorporação de iodeto de propídio (PI). (a) *E. coli* não tratada (10^8 CFU/mL) e tratada com 0,5 mM migalina (b) e 0,5 mM de ampicilina (c) controle positivo. As bactérias foram incubadas por 5 horas a 37 °C, corado com PI e observadas por microscopia confocal. As bactérias em vermelho indicam células mortas e membranas danificadas. Em (B) Efeito de migalina na atividade esterase de *E. coli*. 10^8 CFU/mL foram tratados com migalina (250 e 500 μ M) ou ampicilina (250 μ M) por 4 horas seguido de incubação com CFDA. A intensidade da fluorescência foi lida em 485/535 nm. Os resultados representam a intensidade da fluorescência em unidades relativas de fluorescência (RFU). Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes (***) $p < 0.001$.

4.2.6. Efeito da migalina nos níveis de glutathiona e perfil proteico de *E. coli*

A glutathiona tem várias funções, incluindo papel no metabolismo de peróxidos, inativação de radicais livres e manutenção do potencial oxidação-redução, além de participar de reações envolvendo a síntese de proteínas (109). Em função disto, foi avaliado se a migalina poderia atuar em outros alvos moleculares, como proteínas. Para esta análise, foi quantificado os níveis de GSH em *E. coli*, após o tratamento das bactérias com migalina, ciprofloxacino e gentamicina. O tratamento com migalina e ciprofloxacino teve resultados semelhantes, reduzindo o nível de GSH em 17%. No entanto, essa redução foi mais acentuada com gentamicina (controle positivo), sendo de aproximadamente 50% (Figura 14A). Devido à baixa redução dos níveis de GSH no tratamento com a migalina, nós investigamos a influência dessa molécula na expressão do perfil proteico (Figura 14B). Não foi identificada diferenças significativas no perfil proteico entre bactérias tratadas e os controles sem tratamento. Ao contrário, no tratamento com gentamicina foi notável a diferença no perfil de proteínas, assim como nos níveis de GSH. Estes dados sugerem que migalina pode estar envolvida com outros mecanismos de morte bacteriana, dentre eles a geração de ROS, como demonstrado por muitos antibióticos bactericidas que reduziu o nível de GSH e induziu a geração de ROS (110).

Figura 14 - Efeito da migalina nos níveis de GSH intracelular e perfil proteico.

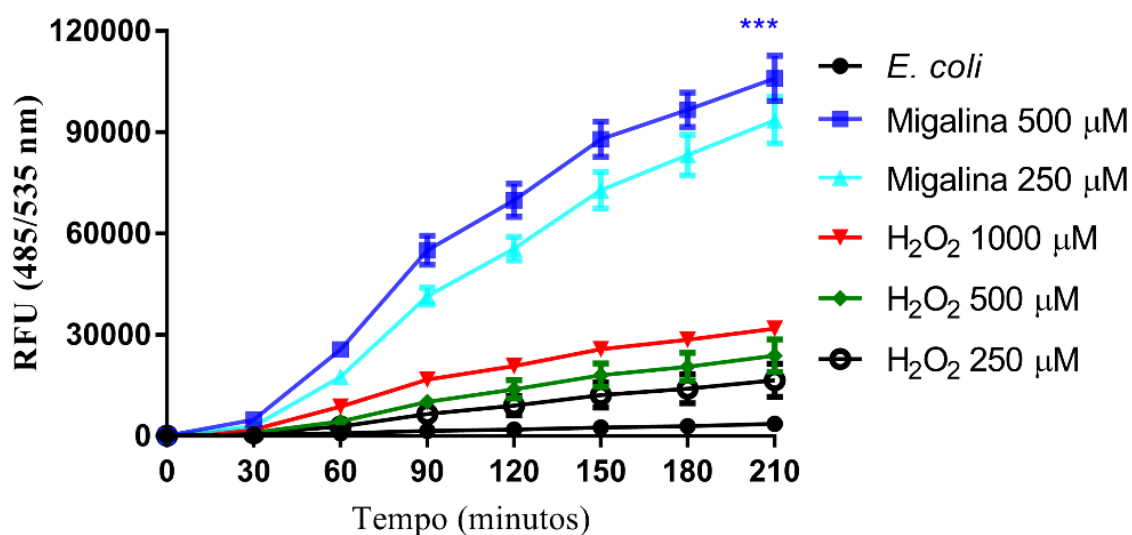


Bactérias (10^9 CFU/mL) foram tratadas ou não por 18 horas, sonicadas e os sobrenadantes foram utilizados para medir GSH intracelular das bactérias (A) não tratadas (1) ou tratadas com 0,5 mM de migalina (2), ciprofloxacino 0,5 mM (3) e gentamicina 0,5 mM (4). O nível de glutathiona foi determinado pelo ensaio de redução com DTNB em extratos celulares de *E. coli* e comparados com o controle sem tratamento. (B) Perfil proteico visualizado através de SDS-PAGE após coloração de Azuis de Coomassie. O valor de p foi calculado empregando o test de *Dunnnett* multiple comparisons: **p < 0.01.

4.2.7. Ação da migalina na geração de ROS

Dados anteriores mostraram que a migalina alterou a permeabilidade da membrana de *E. coli*, causando danos ao DNA. Os mecanismos intrínsecos usados por esta molécula para causar a morte de *E. coli* são desconhecidos. Um dos mecanismos comuns de morte bacteriana causada por antibióticos é o dano oxidativo gerado por radicais livres derivados do oxigênio, denominado ROS (111). Devido a este efeito investigamos se o tratamento de *E. coli* com migalina poderia gerar ROS. Para este teste as bactérias obtidas da fase exponencial, foram cultivadas com migalina (0,25 e 0,5 mM) ou H₂O₂ (0,25 - 1 mM). A produção de ROS foi monitorada por 210 minutos lendo a fluorescência após a adição do fluoróforo CM-H₂DCFDA (112). Na figura 15, mostramos que a adição de migalina nas culturas aumentou progressivamente o nível de ROS entre os 60 e 210 minutos de incubação, independentemente da concentração utilizada. Esses níveis foram superiores ao obtido com o tratamento com H₂O₂ (0,25 - 1 mM). Esses dados sugerem que um dos possíveis mecanismos utilizados pela migalina para promover danos no DNA e a morte em *E. coli* é a geração de ROS intracelular. Resultados semelhantes foram obtidos em *E. coli* tratada com norfloxacin e ampicilina (113).

Figura 15 - Influência da migalina na geração ROS intracelular.

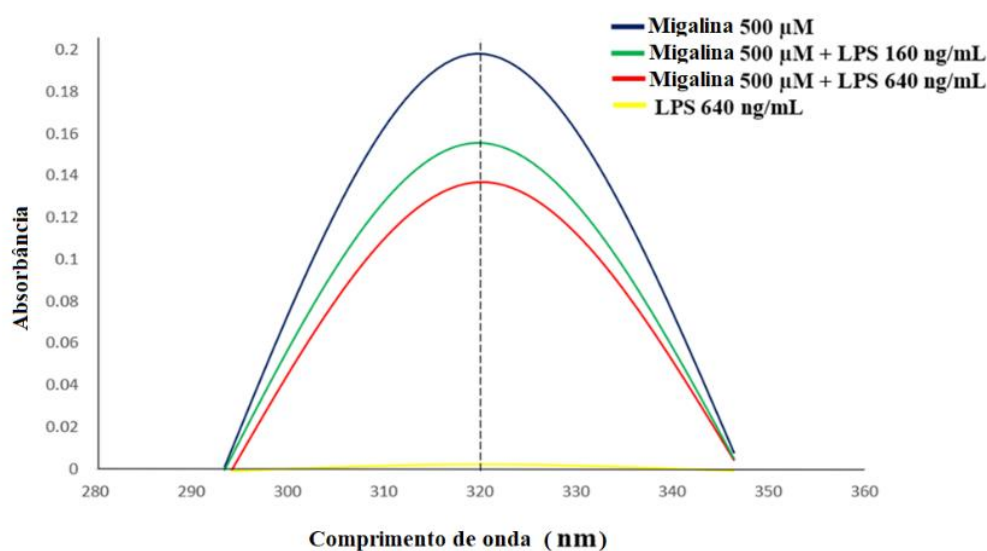


A produção de ROS em *Escherichia coli* (10^6 CFU/mL) devido ao tratamento com migalina (250 e 500 µM) e H₂O₂ (0,25; 0,5 e 1 mM), foi quantificada medindo a fluorescência de CM-H₂DCFDA após 15 minutos de tratamento. RFU = Unidades de Fluorescência Relativa. Esses dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes (***) $p < 0.001$.

4.2.8. Interação da migalina com LPS

A migalina exerce atividade microbicida apenas contra bactérias Gram-negativas (47), que contêm LPS como seu principal componente de membrana mostrando grande atividade biológica. Foi mostrado anteriormente que os análogos de poliamina podem neutralizar LPS *in vitro* (114). Baseado neste fato 500 μM de migalina foi incubado com LPS e analisado o nível de migalina disponível usando espectrofotometria (Figura 16). A incubação da migalina com LPS causou redução na absorbância à medida que aumentou a concentração de LPS, indicando uma interação entre as moléculas. Resultados semelhantes foram descritos com peptídeos incubados com LPS (65, 79). Nossos dados sugerem que a migalina pode interagir com LPS, e isso justificaria em parte sua ação apenas contra bactérias Gram-negativas.

Figura 16 - Interação entre migalina e LPS.

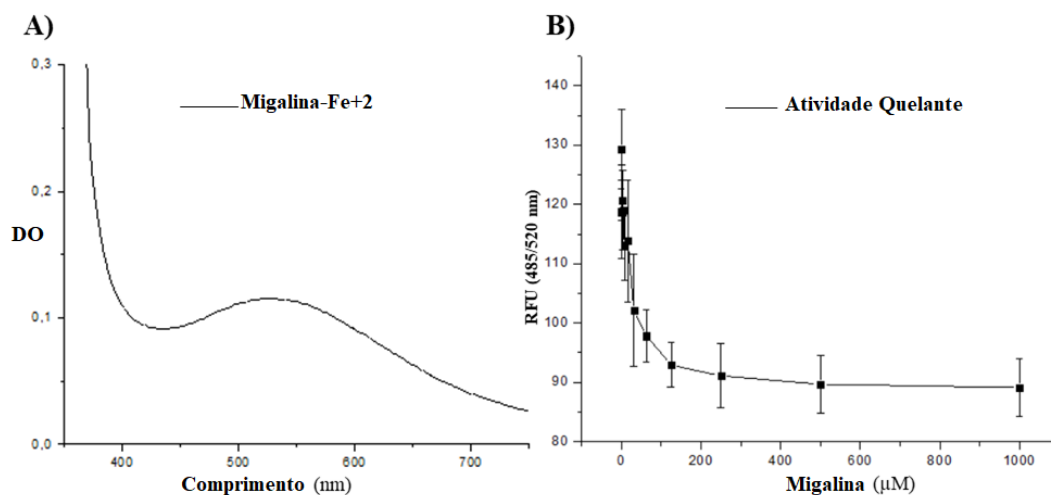


Migalina (500 μM) incubado com LPS (160-640 ng/mL) por 1 hora a 37 °C. Após tratamento as amostras foram lidas no espectrofotômetro 320 nm para quantificar o nível de Migalina livre disponível. A redução na leitura de absorbância foi acentuada com o aumento da concentração de LPS, indicando ligação desta-molécula com LPS. Similares resultados foram encontrados em outros experimentos independentes

4.2.9. Análise de atividade quelante de migalina

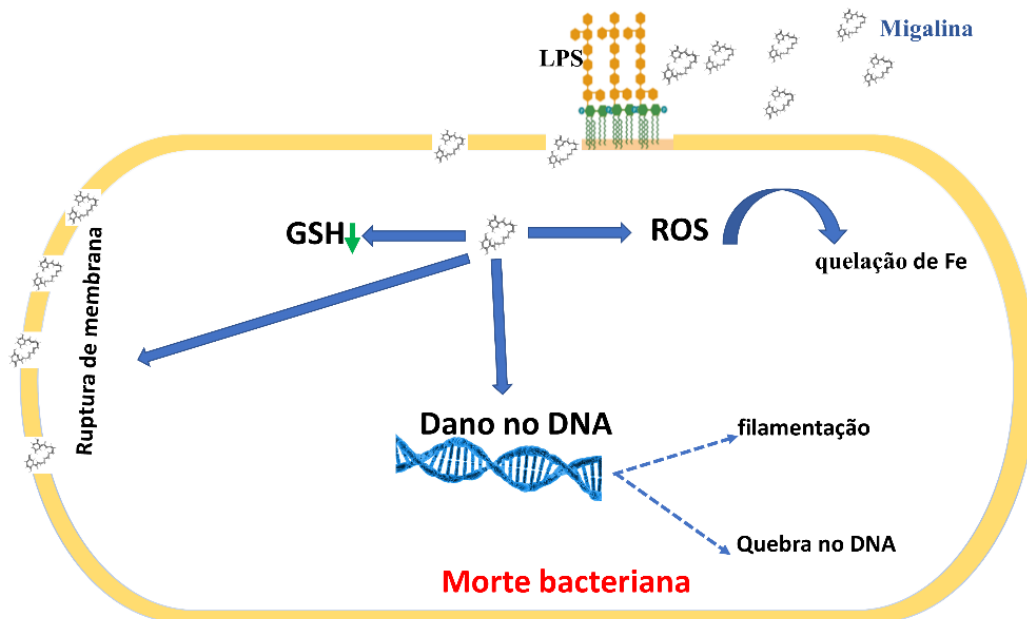
O fato de migalina ser uma molécula geradora de ROS e ter similaridade estrutural com o sideróforo H4-4-LICAM (115) sugere que essa molécula pode funcionar como um quelante de ferro em condições fisiológicas. Investigamos se migalina poderia ter atividade de quelante para o ferro, porque o ferro é um dos metais mais importantes no metabolismo de bactérias e está envolvido no processo de estresse oxidativo (116). Em seguida, avaliamos se a migalina teria atividade quelante de ferro pelo probe (DHR). Observamos que houve aumento da atividade quelante para Fe quando aumentamos as concentrações de migalina (0-1000 μM) ao sistema reduzindo a oxidação de DHR como é observado na Figura 17, comprovando que migalina teria atividade quelante para Fe.

Figura 17 - Atividade quelante de migalina para o Fe.



Em (A) Espectro de absorção *UV-Vis* de migalina-Fe (2,5 mM) em água a 25 °C após 24 h. Mostra-se um espectro máximo de comprimento em 524 nm e em (B). Efeito quelante de migalina (0 até 1000 μM) sobre a taxa de oxidação DHR catalisada por ferro / ascorbato em água a 25 °C. Os resultados são a média \pm SEM dos experimentos realizados em quadruplicada.

Figura 18 - Mecanismo de ação da migalina proposto para *Escherichia coli*.



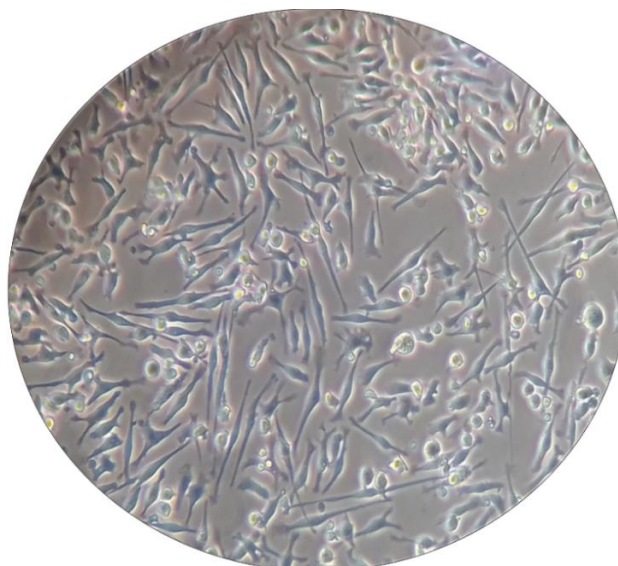
Migalina liga-se a LPS na membrana celular externa de bactérias gram-negativas isso leva à ruptura da membrana celular e no interior induz ROS nas primeiras horas, isso leva à quebra do DNA bacteriano prevenindo a divisão celular e induzindo a morte bacteriana.

4.3. Modelo *in vitro* com células macrofágicas

4.3.1. *Macrófagos derivados de medula óssea*

Uma das funções mais importantes dos macrófagos é o seu papel na imunidade inata e adaptativa. Os macrófagos teciduais funcionam como barreira contra agentes invasores sendo capazes de imediatamente nos defender e emitir sinais que recrutam outras células imunes. Os macrófagos medulares representam a população de células que será distribuída para vários órgãos do corpo. Assim os macrófagos derivados de medula óssea (MDMs) são excelentes modelos para estudar vários mecanismos por se tratar de cultura primária “virgem” sem qualquer possível estímulo que possa alterar a expressão gênica em resposta a estímulos. (71). Estas células são especializadas, realizam diferentes tarefas no sistema imune dentre elas: degradação e apresentação de antígeno, produção de citocinas, migração entre outras funções, sendo considerado bom modelo para avaliar os primeiros efeitos de vários compostos na ativação imune, através da expressão de genes da resposta imune inata e síntese de mediadores como citocinas (117), Após 7 dias de diferenciação, as culturas apresentaram bom rendimento e 98% foram marcados com F4/80, marcador típico desta população (dados não mostrados) e apresentam grande atividade metabólica. A figura 19 representa a população (7 dias de cultura) de macrófagos diferenciados.

Figura 19 - Cultura de macrófagos primários diferenciados.

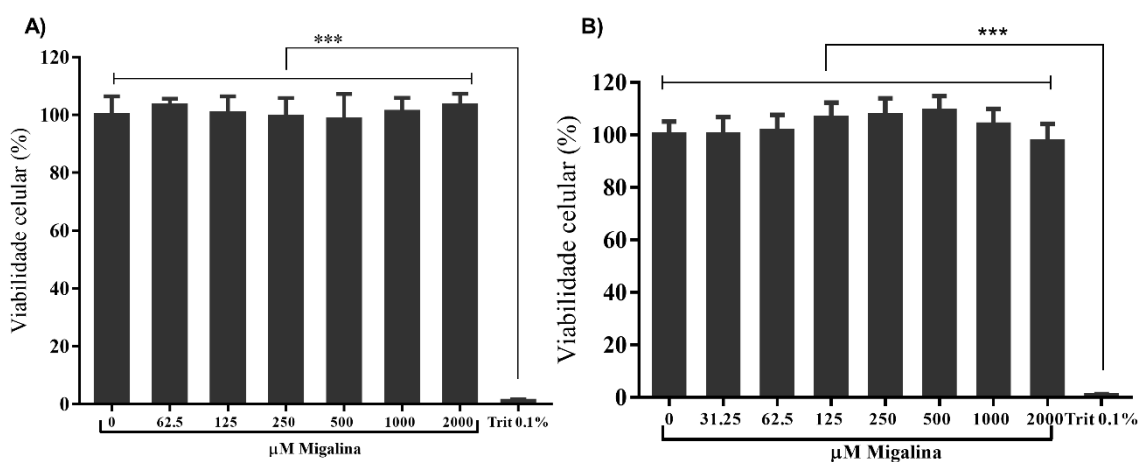


Microfotografia das culturas primarias de macrófagos isolados de medula óssea de camundongo no 7º dia de cultivo. Aumento:1200x.

4.3.2. Efeito da migalina na viabilidade de macrófagos

Realizamos uma avaliação *in vitro* para verificar os efeitos da migalina na viabilidade dos macrófagos (Figura 20). Foi utilizado linhagens celulares J774A.1 e RAW264.7, utilizando o ensaio com MTT. Não foram observadas alterações morfológicas nas células e observamos 100% de viabilidade celular após o tratamento com diversas doses de migalina (0 -2000 μM). Esses dados mostram que a migalina não é tóxica para macrófagos nas concentrações avaliadas e reforça os dados *in silico* sobre a toxicidade que serão apresentados posteriormente.

Figura 20 – Efeito de migalina na viabilidade celular dos macrófagos.



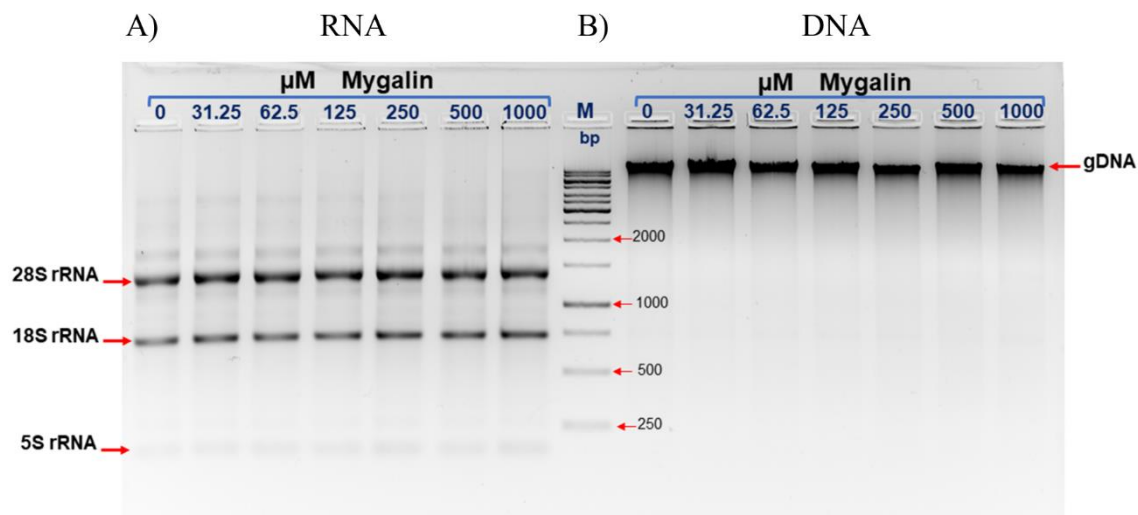
Linhagens celulares J774A.1 (A) e RAW 264.7 (B) tratadas com migalina por 24 horas, e coradas com MTT. A viabilidade celular foi calculada usando células não tratadas (100 % células viáveis) e as tratadas com migalina e comparadas com as culturas tratadas com Triton X-100 (controle de morte). As barras representam a média \pm SEM de três experimentos independentes (***) $p < 0.001$.

4.3.3. Ação de migalina nos ácidos nucleicos

Há evidências científicas provando que as poliaminas se ligam aos ácidos nucleicos, podendo causar condensação (106, 118, 119). Isso ocorre em parte, porque essas moléculas carregam múltiplas cargas positivas e seus grupos amino podem se associar com DNA e RNA (120, 121). O fato da migalina ser uma acilpoliamina análoga da espermidina, levou-nos a avaliar seu efeito sobre ácidos nucleicos, após tratamento das células por 24 horas com diferentes doses. A extração de DNA e RNA foi realizada e posteriormente analisado a ação da migalina sobre a integridade dos ácidos nucleicos, assim como realizado em outros modelos de ação de moléculas que danificam o DNA (122, 123). A figura 21 mostra que o tratamento com migalina não causou danos às células

eucarióticas sendo que os ácidos nucleicos de DNA e RNA permaneceram íntegros, sem alterações, independente da dose usada.

Figura 21 - Eletroforese de RNA e DNA das células tratadas com migalina.

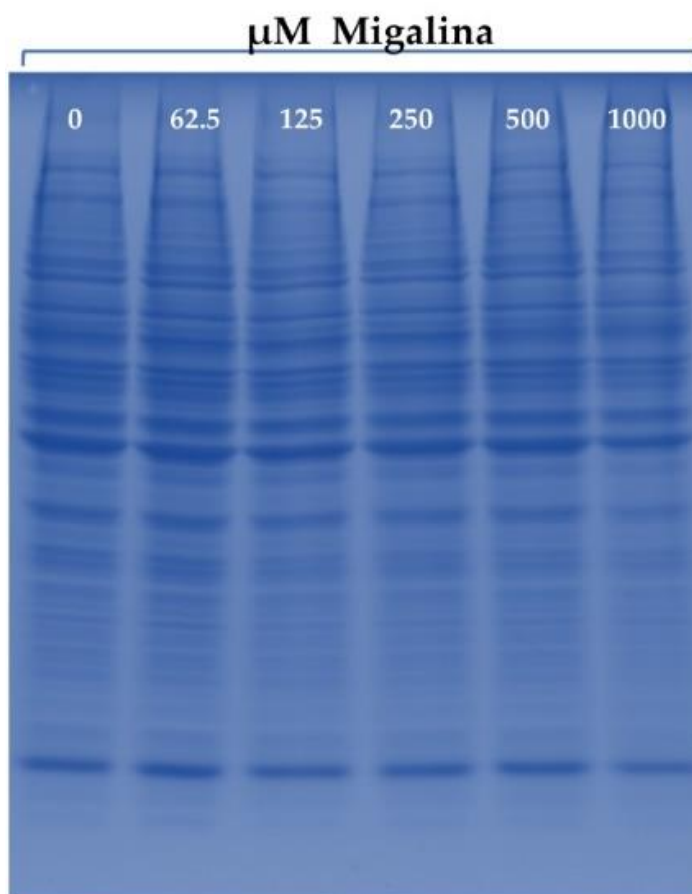


Células J774A.1 (1.5×10^6 células/poço) foram tratadas com migalina (0 - 1000 μM) por 24 horas, extraído o RNA (A) e DNA (B) e visualizados em géis de agarose. As flechas em vermelho indicam o RNA (A) e DNA (B) sem degradação. M: Ladder DNA 1kb plus.

4.3.4. Ação da migalina no perfil protéico dos macrófagos J774A.1

Foi comprovado que alguns análogos de poliamina favoreceram a síntese proteica, uma vez que seus grupos diaminas potenciaram em 8 a 12 vezes a síntese proteica, enquanto poliaminas com terminais contendo grupos benzol e alquil reduziram a síntese proteica (124). Com base nessas evidências, foi realizando a extração total de proteínas das células tratadas ou não com migalina e analisado o perfil protéico através da visualização em gel de acrilamida SDS-PAGE 12 %. A figura 22 mostra que não houve diferenças significativas entre células tratadas ou não com a molécula, sugerindo que a migalina não interferiu na síntese de proteínas das células eucarióticas não havendo diferença entre o perfil proteico das células tratadas ou não com migalina, sugerindo que este composto não interferiu na síntese proteica.

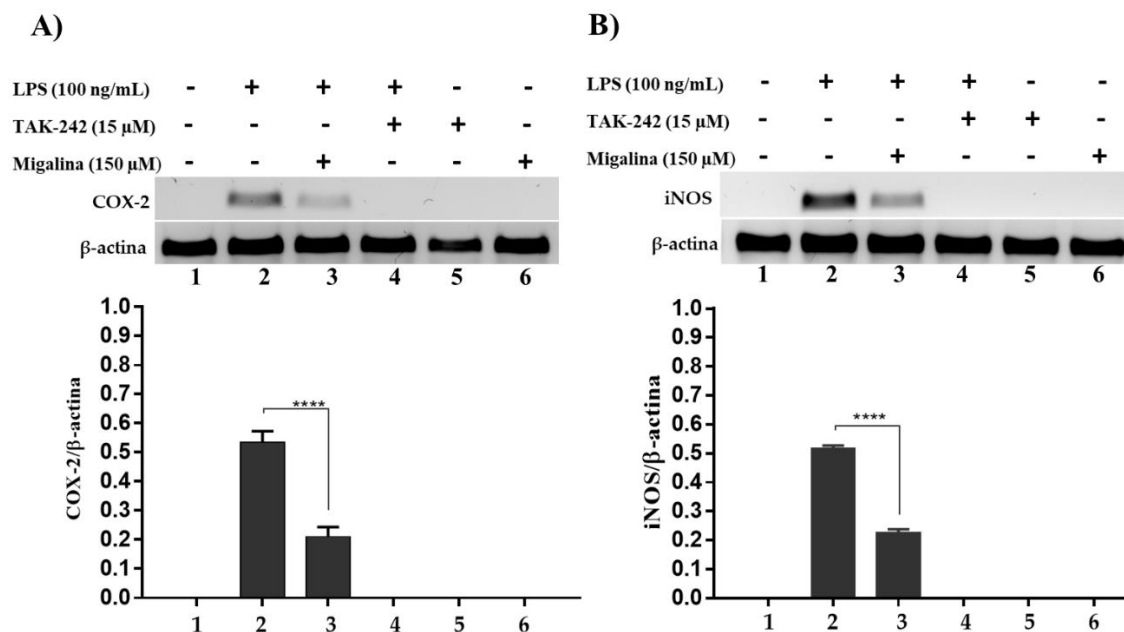
Figura 22 - Efeito da migalina no perfil proteico dos macrófagos.



Células J774A.1 tratadas ou não com migalina (0 -1000 µM) por 24 horas foram lisadas com tampão RIPA e as proteínas visualizadas no gel de acrilamida SDS-PAGE 12 % e coradas com azul de *Coomassie*.

4.3.5. Efeito da migalina na expressão dos genes *iNOS* e *COX-2* em MDM

As células primárias originárias de medula óssea são virgens e precursoras de outras células nos organismos, em função disso usamos este modelo para analisar a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória. Foi analisado expressão de mRNA para os genes *iNOS* e *COX-2* através de RT-PCR após 6 horas de tratamento com LPS (Figura 23). Observamos que a adição de 150 µM de migalina, reduziu significativamente a expressão dos genes estimulados com LPS. Como controle positivo de inibição foi usado a droga TAK-2. Notamos que o tratamento das células com LPS + TAK2, inibiu totalmente a expressão destes genes enquanto com migalina não diferiu das células sem tratamento. Os resultados indicam que migalina pode interferir na transcrição dos genes para *iNOS* e *COX-2* induzido pelo LPS, para diminuir o efeito inflamatório gerado pelo LPS, confirmando os achados *in silico* como possíveis molécula anti-inflamatória.

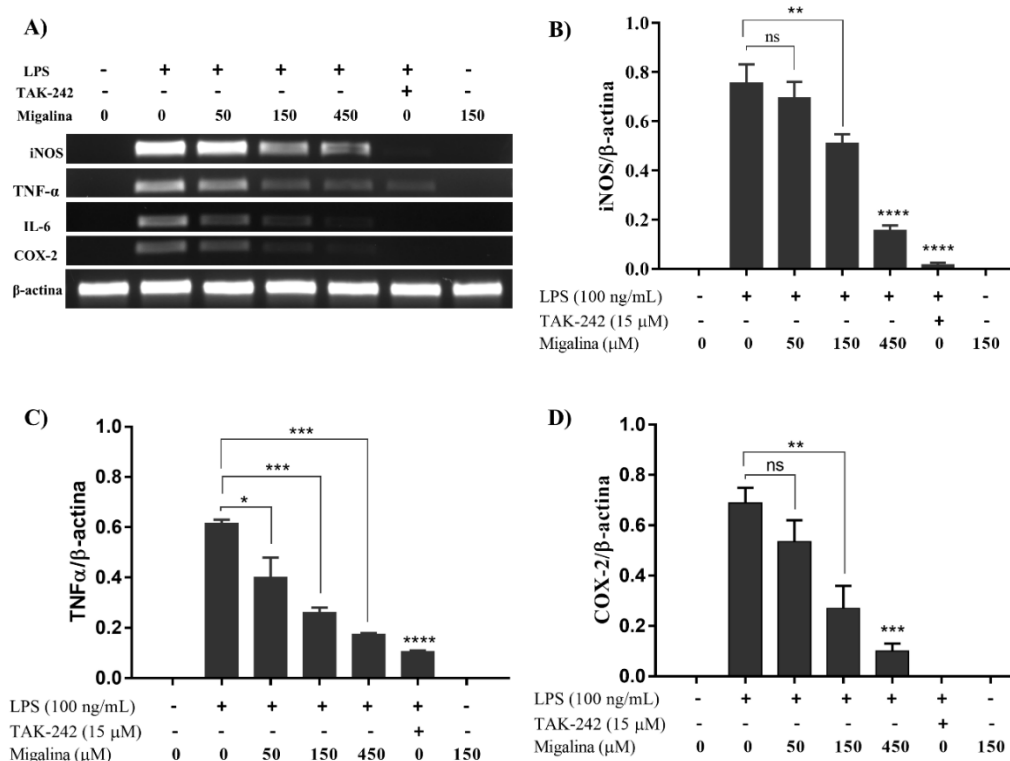
Figura 23 - Efeito de migalina na expressão dos níveis de mRNA em MDM.

Expressão de (A) COX-2 e (B) iNOS. MDMs tratados com migalina e LPS. Células ($1,5 \times 10^6$ células/poço) foram pré tratadas por 1 hora com migalina (150 μ M) e incubados com LPS (100 ng/mL) por 6 horas. Os níveis de mRNA foram analisados por RT-PCR e normalizados com β -actina. (N = 3 ensaios). Os produtos do RT-PCR foram visualizados em gel de agarose de 1,5 %.

4.3.6. Migalina atenua a expressão de mRNA de iNOS, TNF- α , IL-6 e COX-2 induzido por LPS em células RAW

A Figura 24 mostra a expressão do mRNA para iNOS, TNF- α , COX-2 e IL-6 realizado por RT-PCR após 6 horas de tratamento de células RAW com LPS. O tratamento destas células com migalina em diferentes concentrações reduziu a expressão de mRNA dos genes envolvidos na resposta inflamatória de modo dose dependente. A inibição da expressão gênica começou em 150 μ M de migalina, sendo mais pronunciada a 450 μ M, exceto para IL-6, onde 50 μ M causou uma redução acentuada. Os resultados indicam que a migalina foi capaz de interferir nos níveis da expressão de genes da resposta inflamatória (TNF- α , IL-6 e COX-2) induzidos pelo LPS, diminuindo os efeitos inflamatórios gerados pelo agonista de TLR4.

Figura 24 - Migalina inibe os níveis de expressão de mRNA para iNOS, TNF- α e COX-2, IL-6 em células RAW estimuladas com LPS.

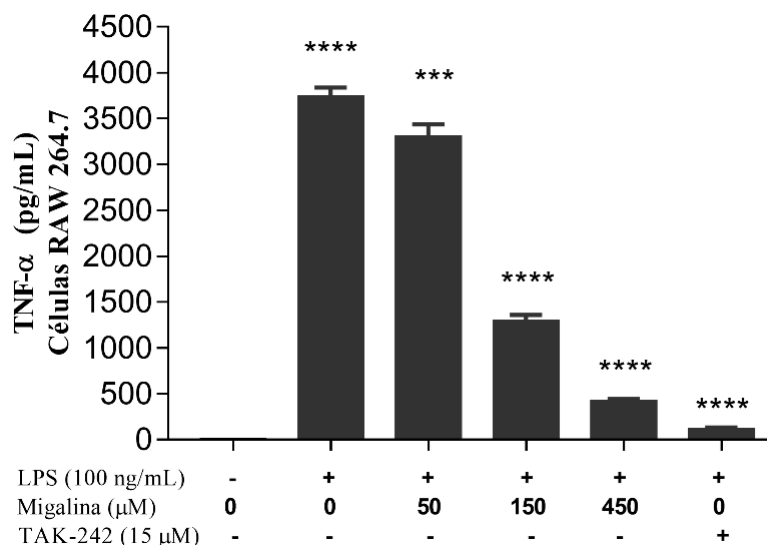


Células RAW ($1,5 \times 10^6$ células/poço) foram pré tratadas com migalina por 1 hora e posteriormente estimuladas com LPS por 6 horas. O RNA total destas células foi isolado e submetido ao RT-PCR. (A) Produtos de PCR quantificados por densitometria e os níveis relativos de mRNA para (B) iNOS, (C) TNF- α e (D) Cox-2, foram normalizados em relação ao gene β -actina e comparados com o grupo tratado com LPS. As barras representam a média \pm SEM das quantidades relativas de mRNA dos genes avaliados a partir de três experimentos independentes. (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ e ns: não significativo).

4.3.7. Efeito da migalina na produção de TNF- α

Além da análise da expressão dos genes da resposta inflamatória mencionados anteriormente, foi avaliado o efeito da migalina na síntese de TNF- α . A figura 25 mostra que a adição da migalina nas concentrações de 50, 150 e 450 μ M nas culturas de células RAW ativadas pelo LPS, houve redução significativa na produção de TNF- α de forma dose dependente, confirmando os dados obtidos na Figura 24 que mostrou a redução da expressão destes genes. Em tratamentos com dose mais alta (450 μ M), os níveis desta citocina se aproximou do obtido com o controle TAK-242, que inibe o TLR4. O mesmo efeito foi observado para cordecepina (um análogo nucleosídeo), curcumina e espermidina após as células serem estimuladas com LPS (35, 80).

Figura 25 - Efeitos da migalina nos níveis de TNF- α em células RAW estimuladas com LPS.

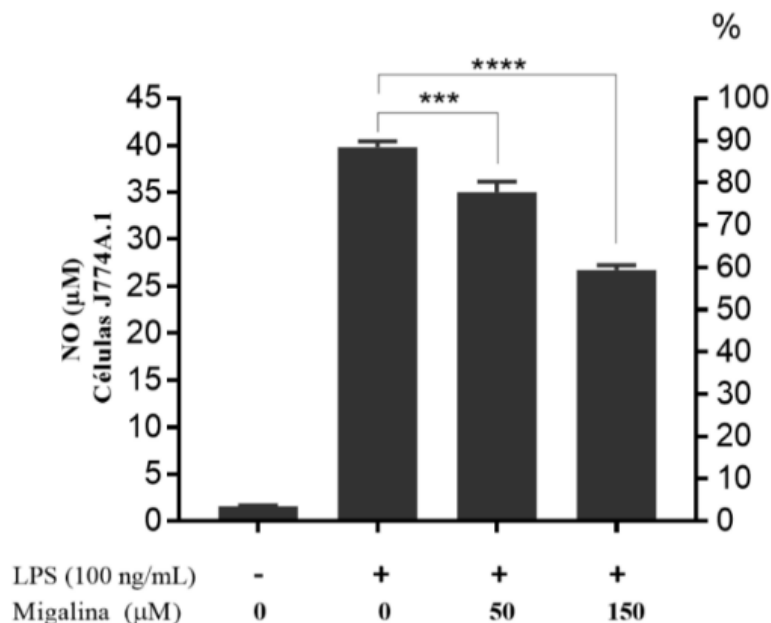


Níveis de TNF- α sintetizados pelas células RAW após 24 horas de estimulação com LPS. As células ($1,5 \times 10^6$ células/poço) foram pré-tratadas por 1 hora com migalina ou TAK-242 e posteriormente com LPS. A droga TAK-242, foi usado como controle de bloqueio para LPS. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicado e o valor P foi calculado utilizando o teste de Tukey (***) $P < 0.001$, ****) $P < 0.0001$ em comparação com LPS).

4.3.8. Efeito da migalina na produção de NO em macrófagos

Foi mostrado nas figuras 23 e 24 que a migalina reduziu a expressão da enzima iNOS que controla a síntese de NO. Em outro estudo as células J774A.1 foram tratadas com migalina (50 e 150 μ M) por 1 hora, o meio de cultura foi removido e substituído por meio novo contendo 100 ng/mL de LPS e incubado por 24 horas para dosagem de óxido nítrico.

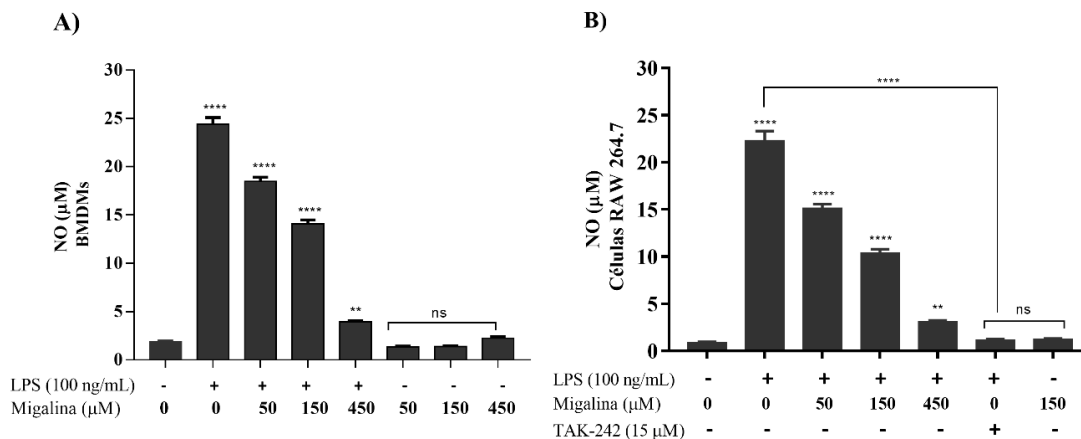
O resultado (Figura 26) sugere que a migalina, bloqueou a resposta inflamatória produzida pelo LPS, mesmo quando a migalina foi removida antes da adição do LPS. A redução, no entanto, foi menos pronunciada em comparação ao obtido durante os ensaios onde o meio não foi trocado (Figura 27), sugerindo a existência de uma ligação da migalina com o receptor TLR4 (proteína alvo de LPS).

Figura 26 - Efeito da migalina na produção de NO em macrófagos J774A.1.

As células foram pré-tratadas com migalina, após o tratamento, o meio de cultura foi trocado por meio novo e estimulado com LPS, o NO (óxido nítrico) foi medido pela reação de Griess.

Em seguida, determinamos os níveis de NO em outras populações de fagócitos, usando macrófagos derivados de medula óssea e células RAW e correlacionamos com os níveis de NO encontrados em células J774A.1 (Figura 26) e com a expressão gênica previamente observada na Figura 23 e 24. A figura 24 mostra que a adição de migalina a essas duas populações de macrófagos em concentrações de 50, 150 e 450 µM não gerou quantidades significativas de NO. No entanto, quando a migalina foi adicionada às culturas ativadas pelo LPS, o nível de NO foi significativamente reduzido de modo dose dependente. O efeito mais pronunciado ocorreu quando utilizamos 450 µM de migalina, confirmando assim, os resultados obtidos com a linhagem celular J774A.1 (Figura 26) e a redução na expressão gênica observada na Figura 23 com macrófagos medulares e com células RAW (Figura 24).

Figura 27 - Efeitos da migalina na produção de óxido nítrico (NO) induzido por LPS em macrófagos

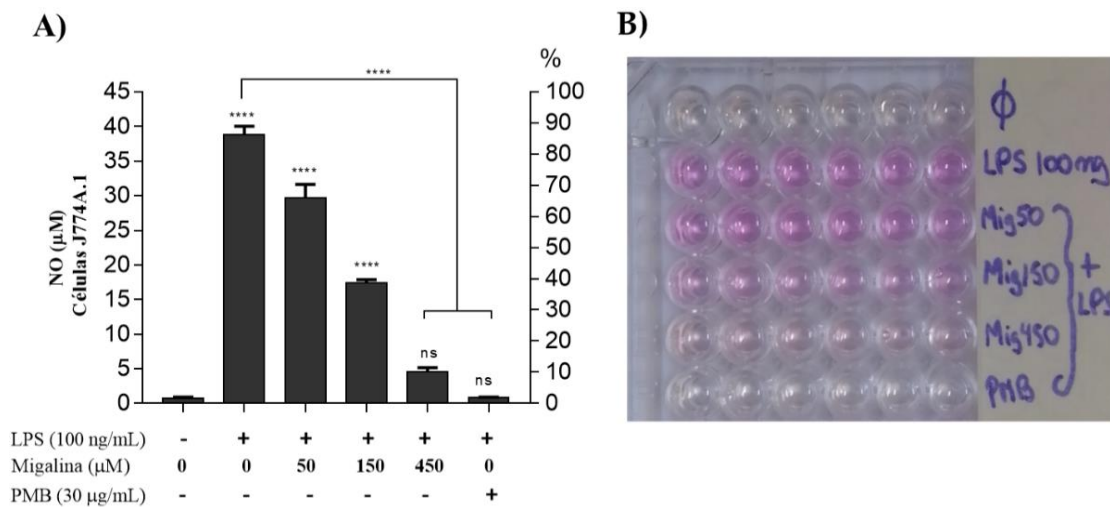


As células foram pré-tratadas por 1 hora com migalina (50, 150 ou 450 μM), e posteriormente adicionado o LPS (100 ng/mL). Os sobrenadantes foram coletados após 24 horas para quantificar o nível NO em MDMs (A) e células RAW 264.7 (B). Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes realizados em triplicado (** P<0,01, **** P<0,0001 em comparação com LPS) ns (não significativo)

4.3.9. Neutralização de LPS com migalina

Sabendo-se que a migalina é capaz de interagir com LPS, foi analisado se essa interação poderia bloquear a via de TLR4. Diversas concentrações de migalina (50, 150 e 450 μM) foram incubadas com concentração fixa de LPS (100 ng/mL) por 45 minutos a 37 °C. Em seguida, essa solução foi adicionada às culturas celulares por 24 horas, e a produção NO foi medida pela reação de *Griess* (Figura 28). Os resultados indicam que a migalina foi capaz de neutralizar a atividade de LPS, reduzindo assim a produção de NO de modo dose dependente. Os efeitos mais acentuados foram com 150 e 450 μM de migalina. O efeito máximo de neutralização usando 450 μM teve efeito próximo ao controle com polimixina B mostrando intensa atividade inibitória na ação desta endotoxina.

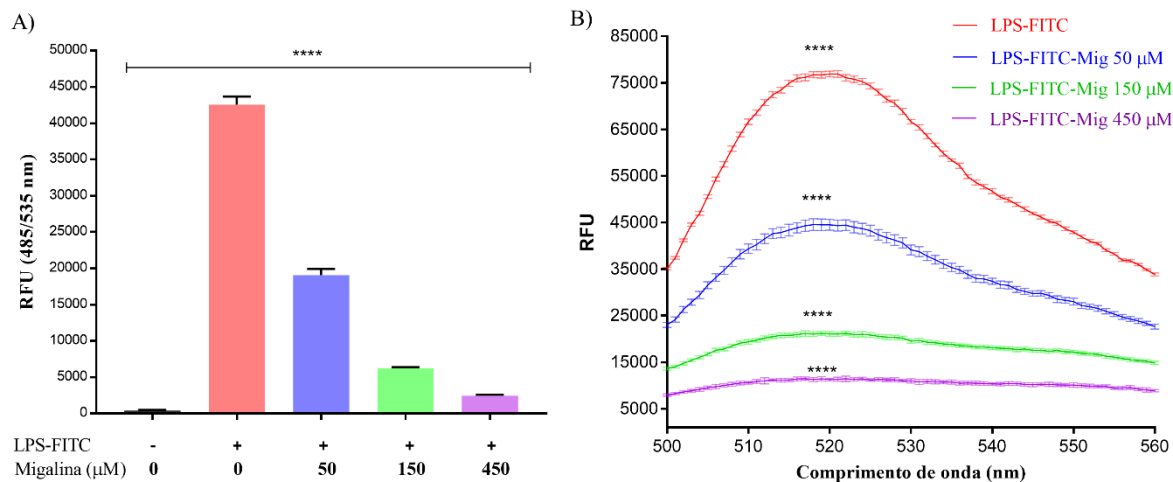
Figura 28 - Migalina neutraliza a atividade do LPS.



LPS foi pre-incubado com migalina ou polimixina B por 45 minutos a 37 °C e depois adicionado nas culturas de macrófagos J774A.1. (A) NO_2^- quantificado após 24 horas. (B) Visualização da reação de Griess. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicado (**** $P < 0,0001$ em comparação com LPS) e ns (não significativo) em comparação com um grupo não tratado.

4.3.10. Ligação da migalina com LPS-FITC

Para investigar a interação da migalina com LPS, diferentes concentrações de migalina foi adicionada ao LPS conjugado com fluoresceína e a fluorescência do complexo migalina-LPS-FITC foi monitorada e comparada com o LPS conjugado. Após incubação da migalina com LPS-FITC, observamos uma diminuição da intensidade de fluorescência em relação ao controle sem migalina. A diminuição da fluorescência foi proporcional ao aumento da concentração da molécula, confirmando a interação entre as moléculas de migalina e LPS (Figura 29 A e B). Resultados semelhantes foram encontrados com peptídeos após incubação com LPS-FITC, mostrando assim a interação entre esses peptídeos e LPS (79).

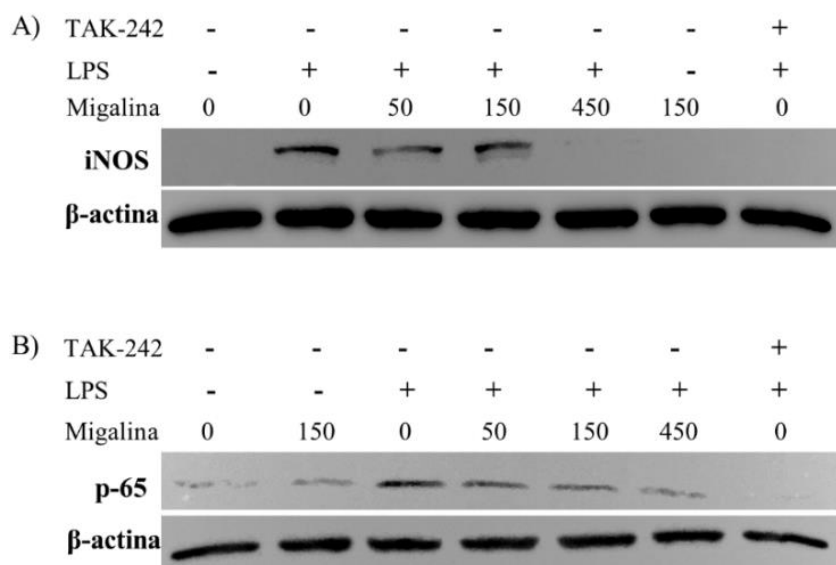
Figura 29 - Interação de migalina com LPS-FITC.

Diferentes concentrações de migalina foram incubadas com 10 μg/mL LPS-FITC em solução salina a 37 °C por 45 minutos e em seguida, os níveis de fluorescência foram monitorados usando excitação e uma emissão fixa (A) e emissão de varredura (500-560 nm) (B). As barras representam a média ± SEM de quatro experimentos independentes. (**** P<0,0001).

4.3.11. Migalina suprime a resposta inflamatória induzida por LPS, interferindo na expressão de iNOS e NF-κB p65 em células RAW 264.7

Os TLRs reconhecem padrões moleculares expressos por diferentes agentes infecciosos, que levam à ativação dos fatores de transcrição NF-κB e IRF(125). O TLR4 reconhece os processos de sinalização celular acionados pelo LPS. Por isso, foram analisados os efeitos da migalina na expressão NF-κB, principal fator de transcrição que regula a síntese de proteínas inflamatórias. Paralelamente, foi avaliado a expressão da enzima iNOS, que controla a síntese de NO. A figura 30 mostra que a estimulação das células com LPS (100 ng/mL) ativou síntese de iNOS e NF-κB p65, enquanto a adição de migalina (50, 150 e 450 μM) reduziu essa resposta após 30 minutos de tratamento. Este resultado indica que a migalina pode bloquear a sinalização de LPS, diminuindo assim o efeito inflamatório induzido por este agonista de TLR4.

Figura 30 – Migalina suprime expressão de proteínas iNOS e NF- κ B p65 induzidos por LPS

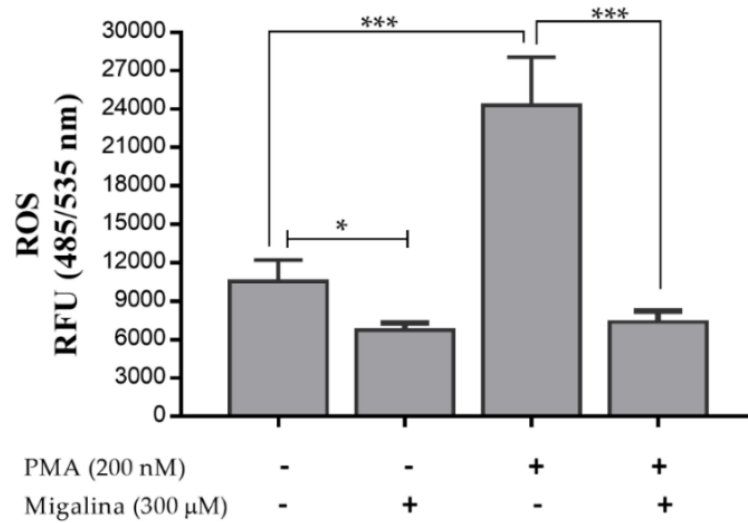


Efeito da migalina (0 – 450 μ M) na expressão de iNOS (A) e NF- κ B p65 (B) visualizado por western blot usando anticorpos específicos contra iNOS e NF- κ B p65. A droga TAK-242 foi usada como inibidor de sinal para TLR4.

4.3.12. Migalina suprime as espécies reativas de oxigênio (ROS) em MDM

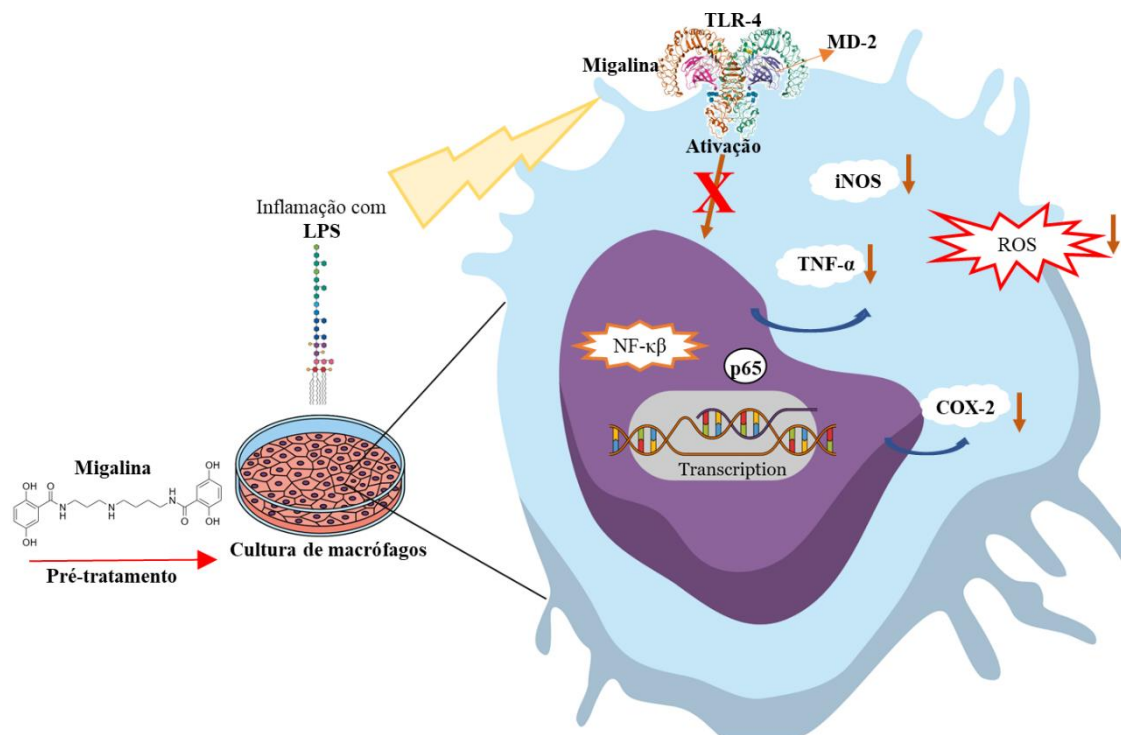
As poliaminas naturais (espermina e espermidina) contribuem para a proteção das células contra espécies reativas de oxigênio, ROS (126, 127). Sendo a migalina uma acilpoliamina análoga de poliamina, e sintetizada a partir da espermidina, foi examinado se a migalina poderia impedir o acúmulo de ROS desencadeada pelo PMA (molécula geradora de ROS via a proteína quinase C). Nossos resultados mostraram que a migalina exerce atividade antioxidante contra o estresse oxidativo induzido pelo PMA nos macrófagos MDM (Figura 31).

Figura 31 - Migalina inibe o estresse oxidativo induzido pelo PMA.



MDM (10^5 células/poço) foram pré-tratadas por 30 minutos com migalina (300 μ M) e incubados subsequente com PMA (200 nM) por 30 minutos e quantificado o nível de ROS. O gráfico da barra representa as unidades relativas de fluorescência (RFU) de ROS intracelular das médias \pm S.E.M de N = 3 ensaios) (*P < 0,05 e ***P < 0,001)

Figura 32 - Modelo proposto para os mecanismos de ação da migalina para inibir LPS via TLR4.



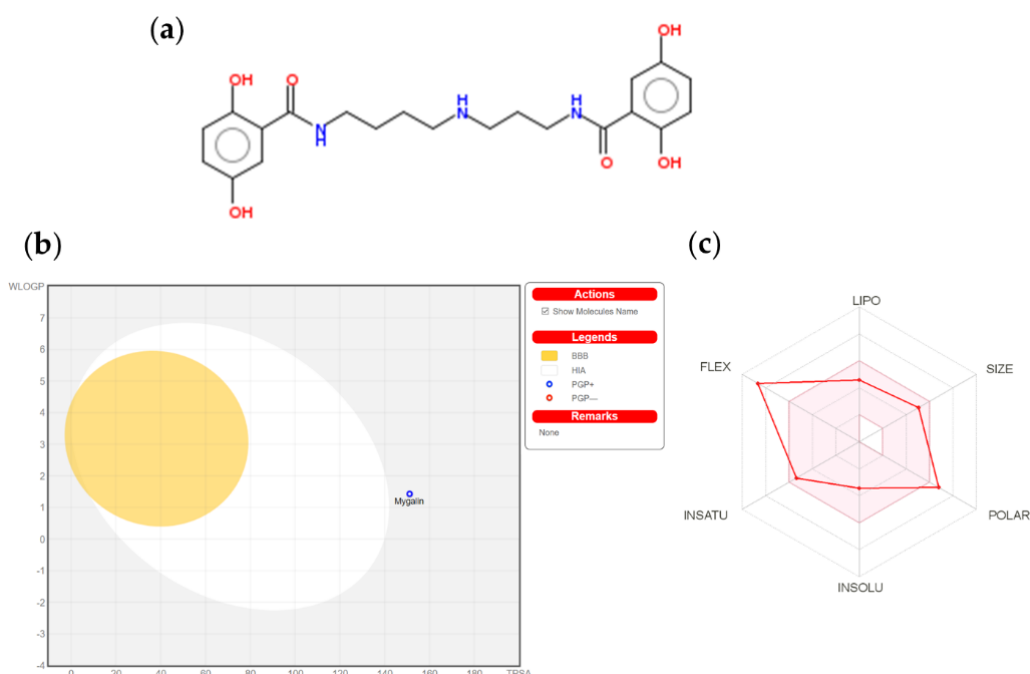
A migalina atua ligando-se à proteína MD-2, bloqueando os efeitos inflamatórios do LPS.

4.4. Modelo *in silico*

4.4.1. Parâmetros moleculares da migalina

De acordo com a regra de *Lipinski*, a molécula migalina (Figura 33a) apresenta um peso molecular de 417,46 menos de 500 Da, o coeficiente de partição octanol/água (Log P) é < 5 (tabela 2), há menos de dez aceptores de hidrogênio (N e O), mais apresentam uma violação, ele tem mais de 5 doadores de ligações de hidrogênio (OH e NH). O radar de biodisponibilidade de migalina pode ser visto na figura 33c, onde os vértices representam um parâmetro e as regiões em cor de rosa representam a faixa ideal para migalina.

Figura 33 - Características da migalina.



Em (A) temos a estrutura química de migalina obtida pelo servidor *Molinspiration*, (B) predição do diagrama *BOILED-Egg* e (C) radar de biodisponibilidade da ferramenta web *SwissADME*, neste último a área rosa mostra uma gama ideal de propriedade específica. LIPO (lipoficidade), TAMANHO (peso molecular), POLAR (polaridade), INSOLU (insolubilidade na água), INSATU (insaturação) e FLEX (flexibilidade).

Tabela 2 - Propriedades moleculares da migalina.

Propriedades moleculares	Molinspiration	SwissADME
Massa molar	417.46	417.46
Átomos pesados	30	30
Átomos pesados aromáticos	-	12
Rotativo	-	13
H-bond aceptores	9	7
H-bond doadores	7	7
Refratividade molar	-	111.69
TPSA [Å ²]	151.13	151.15
Consensus log P 0/w or miLogP	2.17	1.77
Violação de Lipinski	1	1
Solubilidade Log S	-	-3.44

4.4.2. Predição da toxicidade e propriedades ADME da migalina

As predições *in silico* para avaliar toxicidade e as propriedades ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) da molécula de migalina geram uma contribuição importante no desenvolvimento da molécula. Essas propriedades foram calculadas com diferentes ferramentas computacionais, como é mostrado na tabela 3. Os resultados indicam que migalina para o teste AMES não é tóxica nem cancerígena após a previsão das ferramentas, incluindo a predição sobre *MouseTox*, onde o resultado foi não citotóxico e confiável. Em relação à absorção no BBB, migalina tem baixa penetrabilidade (Tabela 3) (Ferramenta QSAR e *SwissADME*) ou não apresenta penetração, em admetSAR e nenhuma possibilidade de penetração segundo (admetSAR)

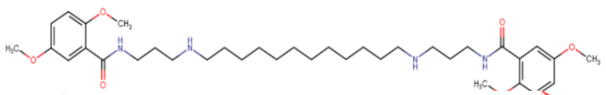
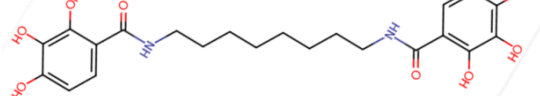
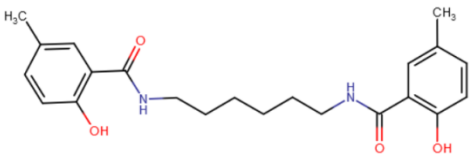
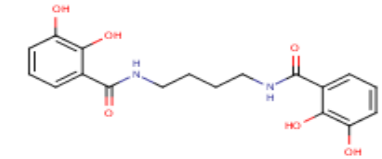
Tabela 3 - Predição de Toxicidade e Propriedades ADME da migalina usando ferramentas online

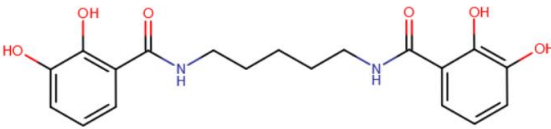
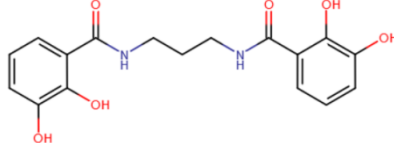
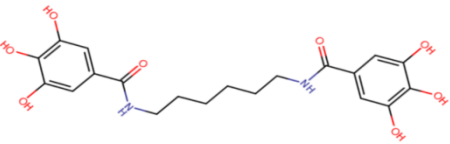
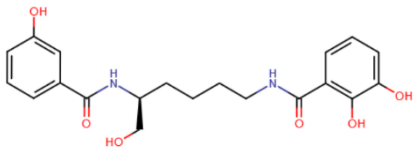
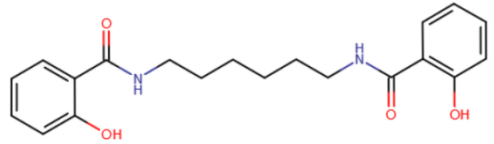
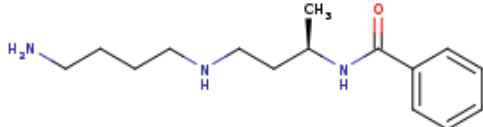
Modelo	admetSAR V2	Lazar toxicity	SwissADME	QSAR Toolbox
Toxicidade				
Inibição da proteína Humana Ether-a-go-go-Related	Inibidor fraco			
Toxicidade AMES	Não AMES	Não mutagênico		Não
Carcinogênico	Não	Não		Não
Em peixes	Alta FHMT			
Em <i>Tetrahymena pyriformis</i>	Alta TPT			
Em abelhas	Baixa HBT			
Absorção				
Barreira Hemato encefálica (BBB)	Negativo	Penetração	Não	Pobre
Intestinal Humana	Positiva		Baixa	
Permeabilidade para Caco-2	Negativo			
Distribuição				
Localização subcelular	Mitocôndrias			
Metabolismo				
Substrato CYP450 2C9	Não – Substrato		Sim	
Substrato CYP450 2D6	Não – Substrato			
Substrato CYP450 3A4	Não – Substrato			
Inibidor CYP450 1A2	Não -inibidor		Não	
Inibidor CYP450 2C9	Não -inibidor		Sim	
Inibidor CYP450 2D6	Não -inibidor		Sim	
Inibidor CYP450 2C19	Não -inibidor		Não	
Inibidor CYP450 3A4	Inibidor		Não	

4.4.3. Triagem virtual

A migalina no formato SMILES foi usada para realizar triagem virtual em diferentes bancos de dados, encontrando moléculas muito similares, com um índice de Tanimoto > 75% e com diferentes atividades biológicas, como bactericidas (128, 129), sideróforo (130), antimaláricas (131), como é mostrado na tabela 4, indicando que a migalina poderia ter outras atividades biológicas desconhecidas.

Tabela 4 - Comparação da migalina com moléculas similares estruturalmente.

Moléculas	Formato SMILE	Similaridade %	Base de dados	Atividade	Estrutura	Referência
N,N'-[1,12-Dodecanediylbis(imino-3,1-propanediyl)]bis(2,5-dimethoxybenzamide)	<chem>COc1ccc(OC)c(c1)C(=O)NCCCCCCCCCCCCCNC(=O)c2cc(OC)ccc2OC</chem>	91.3	ChEMBL	Poliamina antimalárica		(131)
N,N'-1,8-Octanediylbis(2,3,4-trihydroxybenzamide)	<chem>Oc1ccc(C(=O)NCCCCCNC(=O)c2ccc(O)c(O)c2O)c(O)c1O</chem>	88.9	ChEMBL	Inibidor anti-HCV		(132)
2-hydroxy-N-[6-[(2-hydroxy-5-methylbenzoyl)amino]hexyl]-5-methylbenzamide	<chem>Cc1ccc(O)c(c1)C(=O)NCCCCCNC(=O)c2cc(C)ccc2O</chem>	88.7	ChEMBL	Atividade antibacteriana		(129)
LCM (N,N'-butane-1,4-diylbis(2,3-dihydroxybenzamide))	<chem>O=C(c1cccc(c1O)O)NCCCNC(=O)c1cccc(c1O)O</chem>	88.6	SwissSimilarity - Ligantes do PDB	Sideroforo		(130) PDB: 5A1J

N,N'-1,5-Pentanediylbis(2,3-dihydroxybenzamide)	<chem>Oc1cccc(C(=O)NCCCCCNC(=O)c2cccc(O)c2O)c1O</chem>	86.0	ChEMBL	Agente anticâncer		(133)
N-[3-[(2,3-dihydroxybenzoyl)amino]propyl]-2,3-dihydroxybenzamide	<chem>Oc1cccc(C(=O)NCCCCNC(=O)c2cccc(O)c2O)c1O</chem>	80.9	ChEMBL	Inibidor da integrase HIV-1		(134)
N,N'-1,6-Hexanediylbis(3,4,5-trihydroxybenzamide)	<chem>Oc1cc(cc(O)c1O)C(=O)NCCCCCCNC(=O)c2cc(O)c(O)c(O)c2</chem>	80.2	ChEMBL	Inibidor de catechol-O-methyltransferase (COMT)		(135)
2,3-dihydroxy-N-[(5S)-6-hydroxy-5-[(3-hydroxybenzoyl)amino]hexyl]benzamide	<chem>OC[C@H](CCCCNC(=O)c1cccc(O)c1O)NC(=O)c2ccc(O)c2</chem>	79.8	ChEMBL	Antiproliferativo em células leucemic K-562		(136)
2-hydroxy-N-[6-[(2-hydroxybenzoyl)amino]hexyl]benzamide	<chem>Oc1cccc1C(=O)NCCCCCNCNC(=O)c2cccc2O</chem>	79.6	ChEMBL	Atividade antibacteriana		(128)
SP9 N-[(1R)-3-[(4-aminobutyl)amino]-1-methylpropyl]benzamide	<chem>NCCCCNCC[C@H](NC(=O)c1cccc1)C</chem>	76.8	SwissSimilarity – Ligante PDB			PDB:3CNT

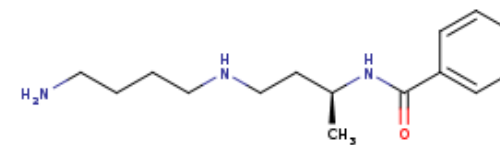
SP8

N-((1S)-3-[(4-aminobutyl)amino]-1-methylpropyl}benzamide

NCCCCNCC[C@@H](NC(=O)c1ccccc1)C

76.8

SwissSimilarity -
Ligante PDB

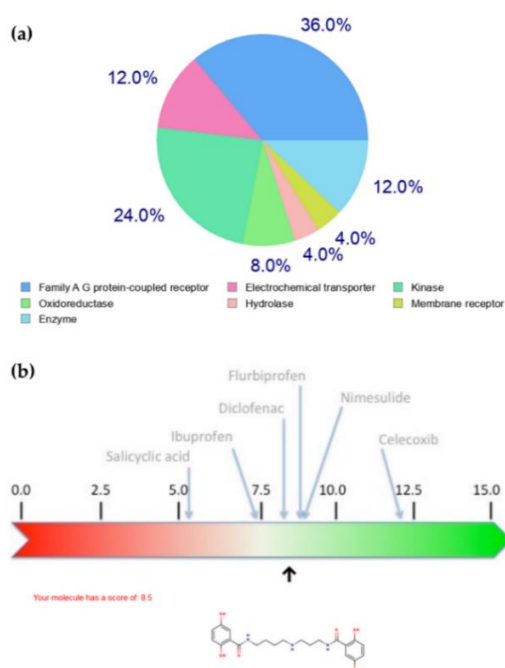


PDB:3CNS

4.4.4. Alvos moleculares, atividade anti-inflamatória e ligante de receptores imunes

Para as análises de possíveis alvos moleculares, confirmamos que migalina poderia se unir com algumas proteínas importantes envolvidas na atividade celular: quinases da família AG, receptores de membrana, entre outros (Figura 34) estas predições foram para células eucarióticas (modelo de camundongo) usando o *SwissTargetPrediction Server* baseado na similaridade estrutural de moléculas conhecidas ligadas a alvos protéicos. Os resultados encontrados com os outros servidores, como DDI-CPI e SEA, são mostrados na tabela 5, indicando que migalina pode ter alvos no sistema nervoso, receptores de membrana, entre outros, um alvo encontrado foi a proteína 5-LOX envolvida no processo inflamatório. Partindo destas informações, decidimos avaliar a migalina no servidor *Drug Desing Workshop* utilizando a proteína COX-2 como alvo molecular, e obtivemos uma pontuação de 8,5 superior ao ibuprofeno como mostrado na Figura 34B, este servidor realiza um acoplamento molecular com a composto a ser testado e compara os escores com moléculas conhecidas. COX-2 é uma proteína induzida em processos inflamatórios sendo um dos alvos mais estudados para descobrir moléculas anti-inflamatórias (137-140). Baseado nestas análises nossos dados sugere que migalina pode ter atividade anti-inflamatória.

Figura 34 - Predição de alvos moleculares para migalina.



Distribuição de possíveis alvos moleculares com *SwisTargetPrediction* N° 25 (a) e avaliação de migalina usando DDW (b)

Tabela 5 - Predição de alvos moleculares para migalina usando ferramentas online.

SEA Server	UniProt ID	DDC-PI	PDB ID	SwissTargetPrediction	UniProt ID
5-hydroxytryptamine receptor 2 ^a	P50129	5'(3')-deoxyribonucleotidase, mitochondrial	1Q91	Dopamine D2 receptor	P61168
Acetylcholinesterase	P22303	Adenosine kinase	2I6A	Serotonin transporter	Q60857
Acetylcholine receptor subunit delta	Q07001	Amiloride-sensitive amine oxidase [copper-containing]	3HIG	Muscarinic acetylcholine receptor M2	Q9ERZ4
Aldo-keto reductase family 1 member B10	O60218	Amine oxidase [flavin-containing] A	2Z5Y	Tyrosine-protein kinase ABL	P00520
Aldose reductase	P07943	Amine oxidase [flavin-containing] B	1S3E	Serotonin 4 (5-HT ₄) receptor	P97288
Amine oxidase [flavin-containing] A	P21398	Arylamine N-acetyltransferase 1	2PQT	Arachidonate 5-lipoxygenase	P48999
Carbonic anhydrase 14	Q9ULX7	Arylamine N-acetyltransferase 2	2PFR	Dihydrofolate reductase	P00375
Cholinesterase	P06276	Bifunctional epoxide hydrolase 2	3I28	Gonadotropin-releasing hormone receptor	Q01776
Catechol O-methyltransferase	Q99028	Bile salt sulfotransferase	1EFH	Acetylcholinesterase	P21836
Deoxyhypusine synthase	Q6AY53	Carboxypeptidase B2	3D67	Epidermal growth factor receptor erbB1	Q01279
DNA polymerase catalytic subunit	P28857	Guanidinoacetate N-methyltransferase	3ORH	Sigma opioid receptor	O55242
D(1A) dopamine receptor	P50130	Histamine N-methyltransferase	1JQE	Norepinephrine transporter	O55192
Dynamamin-1	Q05193	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	1BZY	Mu opioid receptor	P42866
Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A	Q61214	Leukotriene A-4 hydrolase	3FUN	Delta opioid receptor	P32300
Epidermal growth factor receptor	Q01279	Lysine-specific histone demethylase 1A	2UXX	Kappa opioid receptor	P33534
Fatty acid desaturase 1	O60427	Nicotinamide N-methyltransferase	2IIP	Serotonin 5a (5-HT _{5a}) receptor	P30966
Fibrinogen beta chain	P02675	Nicotinamide phosphoribosyltransferase	3DKJ	C-C chemokine receptor type 5	P51682
Glutamate receptor 1	P42261	Oxysterols receptor LXR-beta	3KFC	Dopamine transporter	Q61327

Histone deacetylase 1	Q13547	Phenylalanine--tRNA ligase, mitochondrial	3HFV	Mast/stem cell growth factor receptor Kit	P05532
Histone deacetylase 3	O15379	Phenylethanolamine N-methyltransferase	2G8N	Dual specificity protein kinase CLK4	O35493
Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1	Q12791	Plasminogen activator inhibitor 1			
Lysine-specific demethylase 3 ^a	Q9Y4C1	Retinoic acid receptor beta	1A7C	Serine/threonine-protein kinase mTOR	Q9JLN9
Low-density lipoprotein receptor	P01130	Serum albumin	1XAP	Glycogen synthase kinase-3 alpha	Q2NL51
Arachidonate 15-lipoxygenase	P16050	Sulfotransferase 1A1	3SQJ	Phosphatidylinositol 4	Pik3cg
		Sulfotransferase family cytosolic 1B member 1	1LS6	PI3-kinase p110-alpha subunit	P42337
Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2A	Q12879		2Z5F	MAP kinase ERK2	P63085
	Q13224	Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1			
Glutamate receptor ionotropic, NMDA 2B			1Q22		
Glutamate receptor ionotropic, NMDA 1	Q05586	Thiopurine S-methyltransferase	2BZG		
Polymerase acidic protein	Q9IQ47	Xanthine dehydrogenase/oxidase	2E1Q		
Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit	P23921				
DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1	O95602				
Sodium- and chloride-dependent GABA transporter 2	P31649				
Sodium- and chloride-dependent glycine transporter 2	Q9Y345				
Thyroid hormone receptor alpha	P10827				
Taste receptor type 1 member 2	Q8TE23				
Trypanothione reductase	P28593				

Outra análise foi realizada com um repertório virtual de pequenas moléculas contra receptores imunológicos chamado “*ImmtorLig_DB*”. Este programa conta com um banco de dados de 5000 moléculas ligantes de receptores imunológicos humanos: (TLR1/TLR2, TLR4/MD-2, TLR2/TLR6); mincle; complexo principal de histocompatibilidade 1 e 2 (MHC-I and MHC-II); moléculas co-estimulatórias CD28, CD40, CD80 e CD86; moléculas co-inibitórias CTLA-4, PD-L1, Tim-3, *receptor decoy*, Ligante Fas, e receptor Fas; Citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, e IL-23; e moléculas de adesão celular ICAM, VCAM, CEACAM1. A migalina foi avaliada em relação a todos esses receptores, sendo demonstrado que apresenta afinidade para ligar-se a IL-4 com uma pontuação de 0,161; TLR2/TLR6 (0,153); TLR4/MD-2 (0,136) e outras moléculas como é mostrado na tabela 6. Esses resultados indicam que migalina poderia atuar como uma molécula ligante para alguns TLRs (2, 4 e 6) contribuindo como uma molécula de sinalização e bloqueio. Análise *in silico* sugere que a migalina tem afinidade com receptores e moléculas que participam do controle da resposta imune e poderia ter atividades biológicas diferentes da bactericida e siderófora achados em nossos resultados anteriores (48).

Tabela 6 - Possíveis receptores alvos de migalina segundo *ImmtorLig_DB*.

<i>Immtorlig_db Compound SMILES</i>	<i>Zinc Database ID</i>	<i>Factors</i>	<i>Tanimoto Similarity Score</i>
<chem>CS(=O)(=O)NCCCNC(=O)c1cc2c([nH]c1=O)CCCC2=O</chem>	32355850	IL4	0.161
<chem>CCNC(=O)NCC(=O)N1CCc2ccccc21</chem>	33127803	TLR2/TLR6	0.153
<chem>CS(=O)(=O)NCCCNC(=O)c1cc2ccccc2oc1=O</chem>	44706237	IL4	0.143
<chem>CCNC(=O)CNC(=O)NC(C)(C)C(=O)O</chem>	22170390	IL17	0.143
<chem>CCS(=O)(=O)NCCCNC(=O)c1cc2ccccc2oc1=O</chem>	51461652	IL4	0.141
<chem>CCS(=O)(=O)NCCCNC(=O)c1nc(Cl)ccc1Cl</chem>	51448237	IL4	0.138
<chem>O=C(O)CCCNC(=O)N1CCC[C@H](O)C1</chem>	42471780	TLR4/MD2	0.136
<chem>Cc1esc(NC(=O)NCCC(=O)O)n1</chem>	40558977	IL17	0.135
<chem>CCCNC(=O)NCc1ccc2ccccc2c1</chem>	49301164	TLR2/TLR6	0.133
<chem>O=C1N=c2ccc(C(=O)NCCC3=CCCC3)cc2=NC1=O</chem>	38776626	IL4	0.133

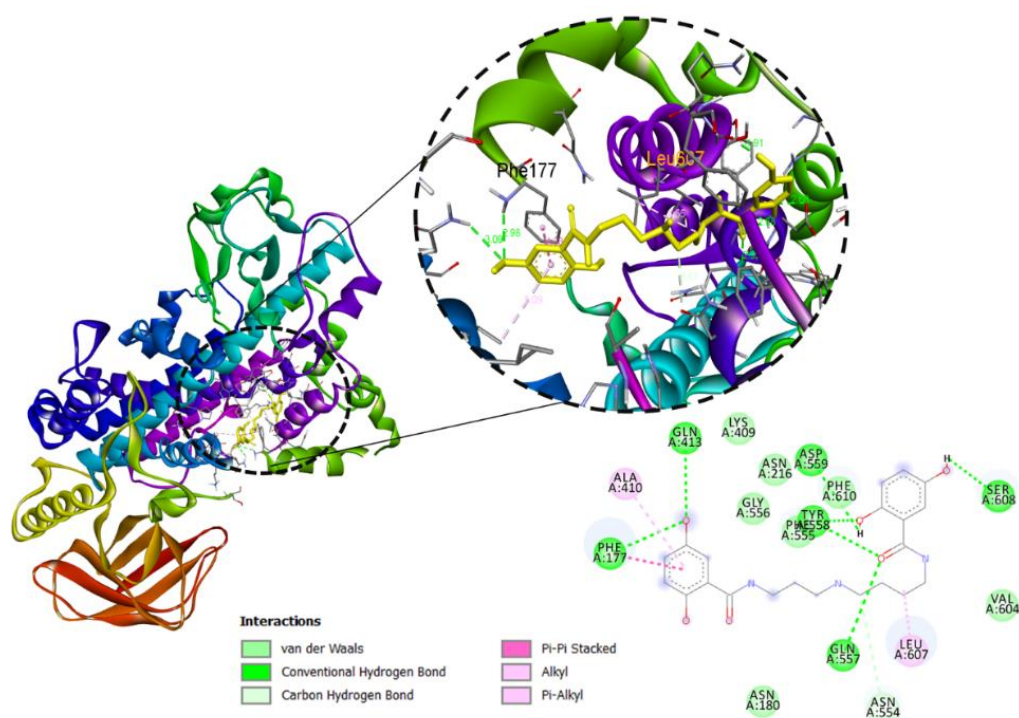
4.4.5. Modelagem molecular de iNOS, COX-2 e 5-LOX

Algumas moléculas atuam como mediadores inflamatórios desempenhando papel importante na resposta inflamatória, dentre elas as enzimas: 5-LOX que participam da biossíntese de leucotrienos, os quais são um grupo de mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico, COX-2 que catalisa a formação de prostaglandinas e iNOS que gera óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina e desempenha papel importante na defesa

imunológica contra patógenos. Com base nestes possíveis alvos, decidimos avaliar por modelagem molecular as proteínas correspondentes.

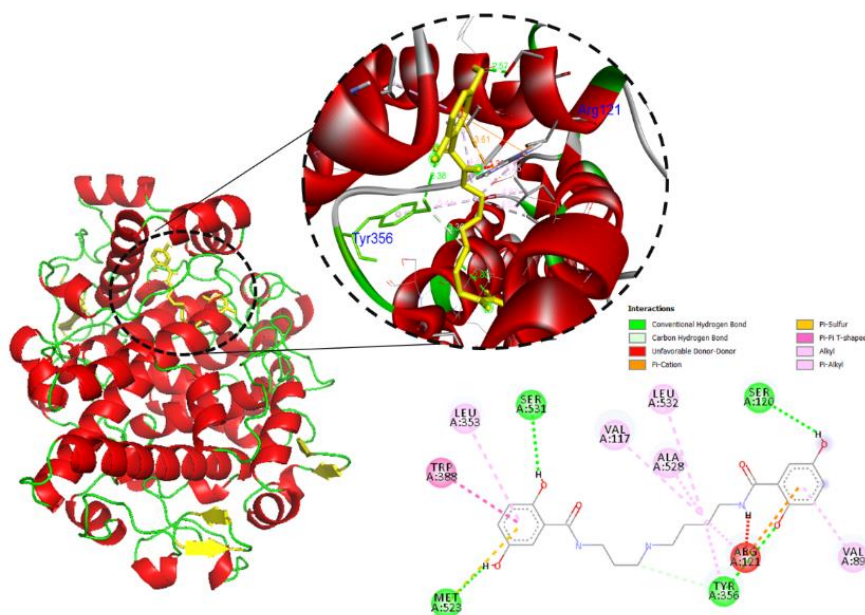
Os resultados de modelagem molecular são mostrados na tabela 7 e figuras 35, 36 e 37, sendo observado que a migalina tem interações com os principais resíduos de aminoácidos para os três alvos mencionados, 5-LOX (ALA410 e LEU607); COX-2 (ARG121 e TYR356); iNOS (GLN257 e GLU371). Estes aminoácidos são chaves, pois interagem com seus substratos, como o ácido araquidônico da proteína 5-LOX e com anti-inflamatórios como paracetamol e ibuprofeno para COX-2 e iNOS.

Figura 35 - Acoplamento molecular da migalina com 5-Lipoxygenase.



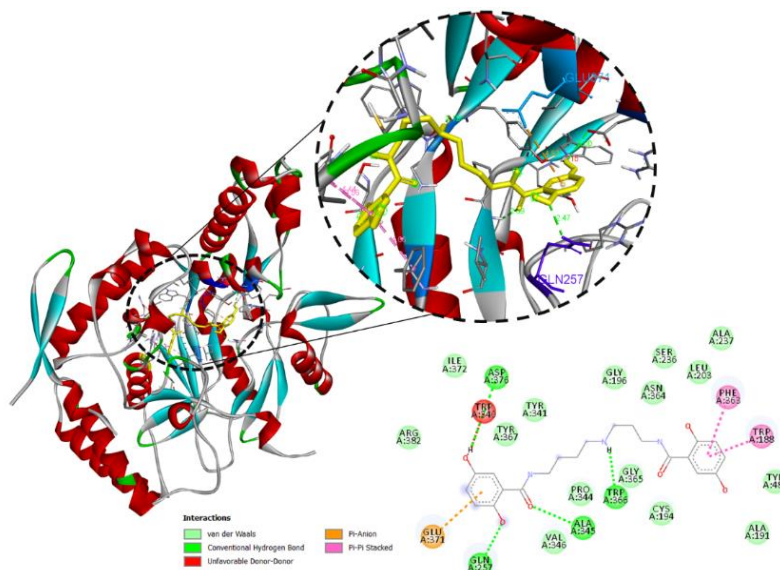
A interação da migalina (amarelo) com o sítio ativo da estrutura cristalina de 5-Lipoxygenase (5-LOX) (código PDB: 3V99), foi conduzido pelo programa *Autodock Vina* e visualizado usando o *software Discovery Studio*. A estrutura 2D da migalina mostra as interações com os resíduos de aminoácidos: PHE177, ALA410, GLN413, ASN554, PHE555, GLN557, TYR558, ASP559, LEU607 e SER608.

Figura 36 - Acoplamento molecular da mialgina com COX-2.



A interação da mialgina (amarelo) com o sítio ativo da estrutura cristalina de ciclooxigenase-2 (COX-2) (código PDB:4PH9), foi conduzido pelo programa *Autodock Vina*. A estrutura 2D da mialgina mostra as interações com os resíduos de aminoácidos: VAL89, VAL117, SER120, ARG121, LEU353, TYR356, TRP388, MET523, ALA528, SER531 e LEU532.

Figura 37 - Acoplamento molecular da mialgina com iNOS.



A interação da mialgina (amarelo) com o sítio ativo da estrutura cristalina de do iNOS (código PDB:3NQS), foi conduzido pelo programa *Autodock Vina* e visualizado usando o *software Discovery Studio Visualizer*. A estrutura 2D da mialgina mostra as interações com os resíduos de aminoácidos: TRP188, GLN257, TRP340, ALA345, PHE363, TRP366, GLU371 e ASP376

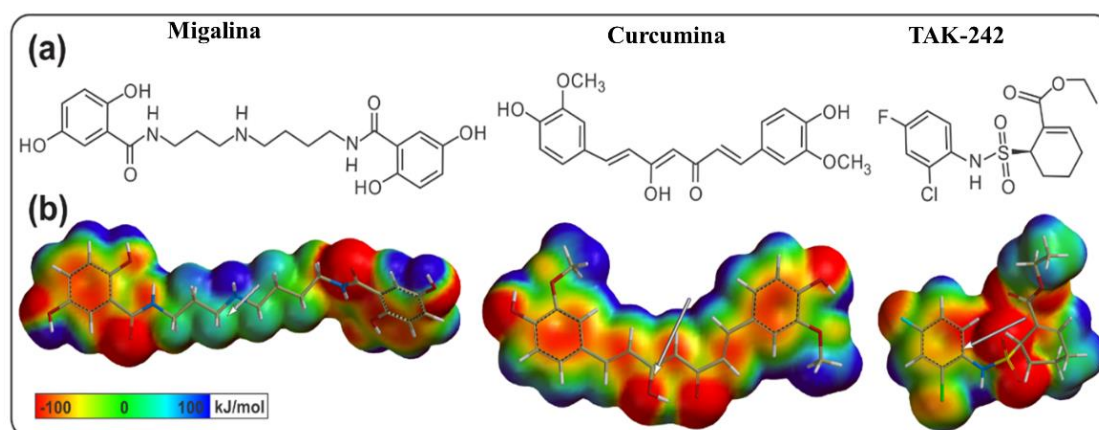
Tabela 7 - Energias de acoplamento e resíduos de ligação para 5-LOX, COX-2 e iNOS com migalina usando *Autodock Vina*.

Proteína	Energia de acoplamento (kcal/mol)	Resíduos de união
5-LOX	-7.70	PHE177, ALA410, GLN413, ASN554, PHE555, GLN557, TYR558, ASP559, LEU607 e SER608.
COX-2	-7.40	VAL89, VAL117, SER120, ARG121, LEU353, TYR356, TRP388, MET523, ALA528, SER531 e LEU532.
iNOS	-8.00	TRP188, GLN257, TRP340, ALA345, PHE363, TRP366, GLU371 e ASP376

4.4.6. Modelagem molecular de TLR4 com migalina, curcumina e TAK-242

4.4.6.1. Estrutura molecular dos ligantes

As propriedades eletrônicas e físico-químicas de migalina, curcumina e TAK-242 foram obtidas por cálculos *ab initio*. Os compostos apresentaram diferentes padrões de potencial eletrostático (Figura 38). A migalina e curcumina apresentaram maior semelhança entre si quando comparado com TAK-242 e apresentaram regiões negativas (vermelhas) expostas nas extremidades da estrutura capazes de formar ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. Devido a estrutura compacta do TAK-242, houve uma região negativa muito concentrada no centro. Os três ligantes mostraram-se como moléculas polares que mostravam grandes momentos de dipolo (especialmente curcumina e TAK-242), enquanto a migalina teve um momento menor de dipolo devido à sua simetria (Figura 38a).

Figura 38 - Estrutura molecular da migalina.

Em (a) Estrutura molecular dos ligantes construídos no programa *ChemDraw*. (b) Estrutura eletrônica dos ligantes em suas mais baixas conformações energéticas, com curcumina em sua forma enólica. Potenciais eletrostáticos e vetor de momento dipolo (seta) são mostrados.

Em relação às propriedades físico-químicas, as energias de solvatação e a superfície polar notamos que a migalina é o composto mais solúvel em água em relação a TAK-242. Finalmente, a migalina e curcumina apresentam os maiores volumes quando comparado com TAK-242, podendo significar uma melhor ocupação da cavidade de ligação (Tabela 8).

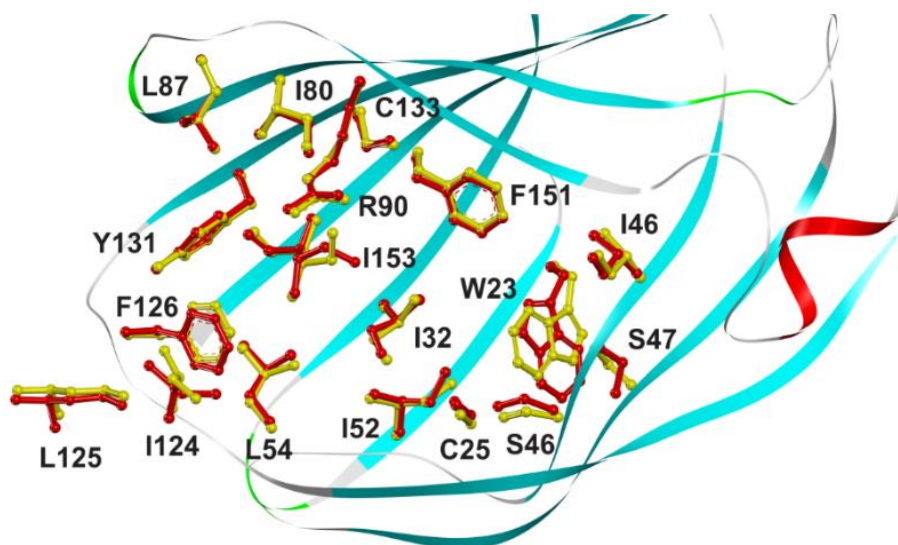
Tabela 8 - Propriedades moleculares dos ligantes e volume da cavidade de ligação de TLR4/MD-2.

Moléculas	Energia total (AU)	Energia de solvatação (kJ/mol)	Dipole (Debyes)	Superfície Polar (Å ²)	Volume (Å ³)	Área (Å ³)	TLR4/MD-2 Volume de pocket (Å ³)
Migalina	-1431.66	-94.27	3.41	128.27	417.14	457.35	C=1,187
Curcumina	-1263.16	-49.19	4.21	75.75	373.53	300.12	D=803
TAK-242	-1895.3	-26.87	4.27	59.93	321.17	344.7	

4.4.6.2. Comparação estrutural entre complexos TLR4/MD-2

A estrutura de raios-X dos complexos (TLR4-A/MD-2-C e TLR4-B/MD-2-D) sem ligantes foi comparada por superposição tridimensional e RMSD. A RMSD de 0,225 Å e a superposição mostraram um bom acordo estrutural global entre os dois complexos. No entanto, pequenas diferenças conformais foram observadas nas cadeias laterais dos resíduos entre dois complexos. No domínio vinculante de LPS, a maioria dos resíduos apresentam uma conformação semelhante ou com pequenas diferenças, enquanto W23, S47 e I153 (MD-2) apresentam maiores diferenças conformais (Figura 39).

Figura 39 - Superposição de MD-2-C e MD-2-D



Resíduos mostrados da cavidade bolso de ligação hidrofóbica envolvidos na interação usando SuperPose (Tabela 9) com os ligantes. A maioria dos resíduos apresentou conformações semelhantes ou pequenas diferenças, embora W23, S47 e I153 tenham apresentado altas diferenças conformacionais. Apenas as cadeias laterais são mostradas para clareza.

4.4.6.3. Cálculos de acoplamento no complexo TLR4/MD-2

No complexo receptor-ligantes obtidos a partir dos cálculos de acoplamento, as energias livres de interação foram analisadas com base na teoria da mecânica quântica para obter resultados mais precisos do que as afinidades de acoplamento resultantes do *AutoDock Vina*. Foram analisados os cálculos de energia livre. Essa avaliação investigou o TLR4/MD-2 complexos com ligantes obtidos a partir de cálculos de acoplamento.

Como resultado dos cálculos de acoplamento, foram obtidos 9 modelos de união receptor-ligantes, e apenas as energias livres mais baixas dos três ligantes para TLR4-A/MD-2-C e TLR4-B/MD-2-D foram consideradas para análise posterior.

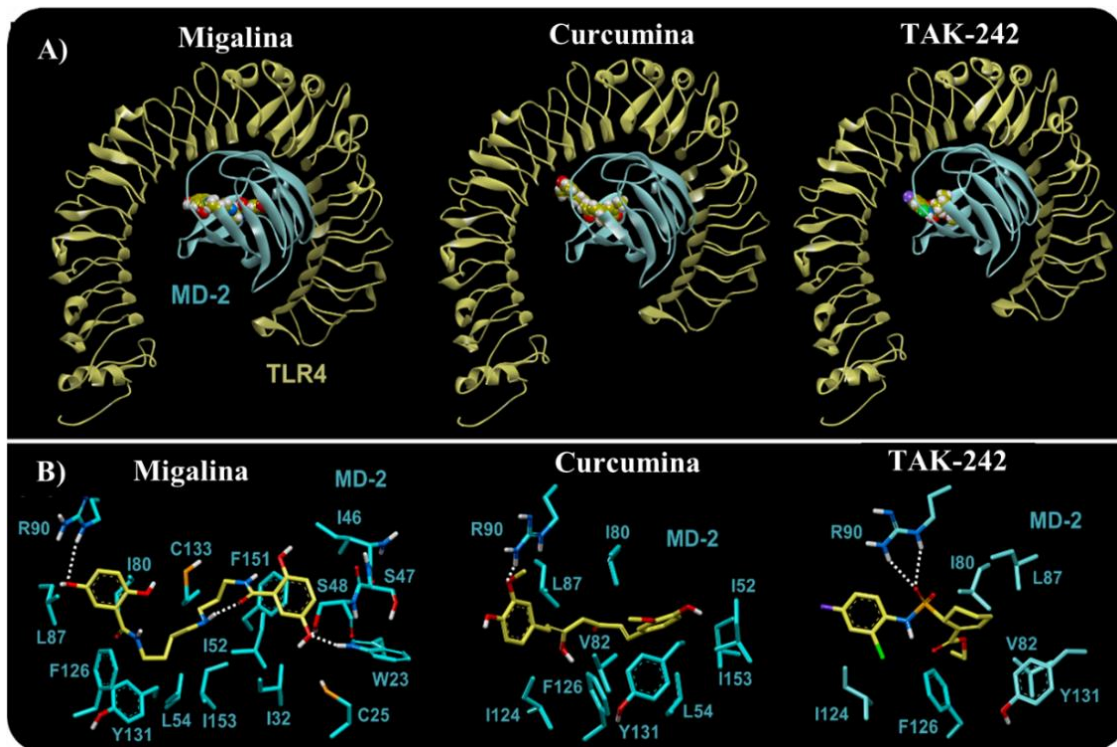
Os resíduos MD-2 ligados aos ligantes que mostram interações hidrofílicas (polares) atingiram uma distância de aproximadamente 3,4 Å, enquanto aqueles com interações hidrofóbicas (*van der Waals*) atingiram 4 Å (Figura 40). Identificou-se o número de resíduos de ligação, todos pertencentes ao MD-2. A maioria dos resíduos eram hidrofóbicos (7-15), enquanto o número de resíduos polares variou de 2 a 4, e curiosamente o resíduo R90 foi encontrado com interações polares em todos os complexos de baixa energia livre. R90 está na fronteira do MD-2 perto da interface de multimerização e estabeleceu fortes interações polares com os oxigênios dos três ligantes. Quanto à energia livre de interação, a menor conformação energética de cada um dos três

ligantes foi semelhante em ambos os bolsões de ligação de MD-2 (C e D), com a migalina mostrando a menor energia livre de interação das três moléculas (Tabela 9). Migalina e curcumina mostraram conformações estendidas ao longo do bolso de ligação MD-2 e ancoradas em R90 através de seu hidroxilo fenólico, enquanto TAK-242 associa-se com R90 através de seu oxigênio sulfonamida (Figura 40).

Tabela 9 - Energias de interação dos ligantes e resíduos do bolso de ligação dos complexos TLR4/MD-2.

Sítio de União MD-2-C	Energia livre (kJ/mol) TLR4-B/MD-2-C	MD-2-C Resíduos	Resíduos Total
Migalina	-236.07	W23, I32, I46, S47, S48, I52, I80, L87, R90, Y131, C133, F151, I153	13
Curcumina	-134.77	I32, I52, L54, I80, R90, I124, F126, Y131, C133, I153	10
TAK-242	-86.99	L54, L78, I80, V82, L87, R90, I124, L125, F126, Y131	10
Sítio de União MD-2-D	Energia livre (kJ/mol) TLR4-A/MD-2-D	MD-2-D Resíduos	Resíduos Total
Migalina	-259.74	W23, C25, I32, I46, S47, S48, I52, L54, I80, L87, R90, F126, Y131, C133, F151	15
Curcumina	-177.35	I32, I52, L54, I80, L87, R90, I124, F126, Y131, C133, I153	11
TAK-242	-62.94	I80, V82, L87, R90, I124, F126, Y131	7

Figura 40 - Complexos de acoplamento de TLR4/MD-2 com os três ligantes.



Cavidade de união de MD-2-D representativo dos complexos TLR4/MD-2; o mesmo evento ocorreu em MD-2-C. A) Os complexos TLR4/MD-2 apresentam um potencial local de ligação central em MD-2. Migalina no bolso de ligação MD-2 não mostrou interação com resíduos TLR4. B) Ligantes (amarelo) após interação com resíduos MD-2 (azul). A maioria das interações eram hidrofóbicas, embora os resíduos R90 e W23 mostrassem interações polares, devido a ligações de hidrogênio. Linhas pontilhadas mostram ligações de hidrogênio.

5. DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana é um problema sério para a saúde pública. A Organização Mundial da Saúde (141) tem incentivado pesquisas sobre a busca de novos medicamentos e vacinas, para aumentar a eficácia do tratamento e reduzir a resistência aos antibióticos. É necessário encontrar novas estratégias terapêuticas combinando produtos ou definindo novas moléculas com atividade microbicida.

As poliaminas participam do controle de genes de virulência em microrganismos, mas foram negligenciadas em relação à sua atividade bactericida. Vários análogos de poliamina foram construídos, mostrando atividade efetiva significativa sozinhas ou em combinação com outras moléculas contra tumores (142) e bactérias resistentes a antibióticos (143). No entanto, a contribuição dos análogos no controle de infecções é limitada.

Neste trabalho exploramos os mecanismos envolvidos na atividade microbicida de migalina utilizando o modelo bacteriano com *E. coli* DH5 α *in vitro*, como estratégia para o uso de agentes antimicrobianos. Migalina sintética resulta da associação da espermidina com ácido gentísico, tendo dois grupos acil em sua estrutura (Figura 33). Individualmente, nenhum desses compostos apresentou atividade bactericida. Isso sugere que a atividade microbicida é atribuída ao grupo acil presente na estrutura de migalina. Este efeito foi dose dependente, iniciado após 5 horas de tratamento a 1 mM de migalina.

Estudos que relacionam a atividade e estrutura dos análogos da espermidina mostraram uma forte relação entre o comprimento da cadeia acil e a potência antimicrobiana, sugerindo que esses análogos poderiam ser usados para melhorar a eficácia dos antibióticos convencionais (144). Um dos mecanismos de ação das moléculas bactericidas é o dano ao DNA devido à sua fragmentação ou interação proteica (145). A grande maioria dos efeitos da poliamina estão associados com interação ao DNA e RNA.

O efeito de migalina na fragmentação do DNA foi investigado mediante dados *in vitro* e *in vivo* mostrando que o tratamento de DNA genômico ou purificado de uma cultura bacteriana com migalina promoveu a quebra de DNA. Este efeito foi independente do pH usado nas reações. Em contraste, a espermidina não induziu nenhum dano no DNA, demonstrando seu efeito protetor e antioxidante (146-149). Isso mostra que ambas as moléculas têm efeitos distintos em relação à sua ação no DNA. A degradação do DNA causada pelo tratamento de bactérias com migalina foi independente da *DNase*, uma vez que a adição de inibidores desta enzima não alterou o resultado (Figura 9). Moléculas antimicrobianas, apresentam vários mecanismos de ação (107) que influenciam na

viabilidade bacteriana, como alteração da permeabilidade celular, liberação de componentes intracelulares, inativação de vias metabólicas, inibição do crescimento bacteriano por quelação de nutrientes e metais (145), estes mecanismos foram explorados para identificar a ação de migalina em *E. coli*.

Observamos pela microscopia confocal que as bactérias tratadas com migalina ou H₂O₂ incorporaram o corante DAPI, mostrando que a migalina pode induzir danos ao DNA. Em outra análise, o efeito de migalina sobre a capacidade de romper a membrana de *E. coli* foi evidenciado uma vez que as bactérias tratadas incorporaram iodeto de propídio (PI), semelhante ao visualizado com ampicilina. Danos no DNA e membrana foram descritos no tratamento de bactérias com antibióticos (111), metais tóxicos (150) e peptídeos antimicrobianos (151-153), o que levou à morte bacteriana.

A inibição do DNA foi confirmada por microscopia ótica, durante o tratamento de *E. coli* com migalina e ciprofloxacino, um antibiótico indutor de estresse bacteriano (154). Esse tratamento interferiu no ciclo de divisão celular das bactérias e induziu a formação de bactérias filamentosas. Antes da divisão de *E. coli*, várias proteínas são organizadas para a montagem do "anel Z", incluindo a proteína FtsZ (proteína formadora de filamentos), essencial para a divisão celular e viabilidade de *E. coli* (155). Estudos sugerem que a inibição da montagem de FtsZ pode ser usada para o desenvolvimento de moléculas contra bactérias patogênicas (156), como proposto por Rai (157), usando curcumina que inibiu a divisão celular *B. subtilis* interrompendo o "anel Z". Futuras investigações serão conduzidas para analisar se migalina atua nesse mecanismo.

A enzima esterase está envolvida tanto na hidrólise de éster quanto na peroxidação lipídica. O aumento do nível de esterase é um indicador de ruptura de membrana celular induzida por moléculas. O tratamento de *E. coli* com migalina aumentou a emissão de fluorescência de modo dose dependente semelhante a ampicilina. Portanto, a migalina pode quebrar a membrana externa de *E. coli* facilitando danos no DNA.

A glutatona (GSH) é essencial para a regulação do sistema redox e proteção do estresse oxidativo em todas as células. A presença de mecanismos antioxidantes é necessária para limitar os níveis intracelulares desses compostos. A redução da glutatona é um dos sistemas que controla a formação de radical livre e os danos oxidativos para proteger as células contra o estresse ambiental (109). Observou-se uma ligeira redução no nível de GSH redutase durante o tratamento de *E. coli* com migalina, sem alterar o perfil proteico. Isso difere do tratamento com a gentamicina, onde houve intensa redução da enzima e mudança de perfil proteico em relação ao controle.

Portanto, além de migalina danificar a membrana celular e promovendo danos ao DNA, também altera a síntese de enzimas que participam do controle do estresse oxidativo em *E. coli*. Altos níveis de radicais livres no ambiente intracelular podem contribuir para todas essas formas de danos. Foi confirmada a presença de ROS intracelular em *E. coli* tratadas com migalina, confirmando intenso aumento no nível de ROS, que foi superior aos encontrados com tratamento de H₂O₂ e proporcional ao tempo de incubação. Nossos resultados indicaram que a migalina promove danos no DNA e a morte de *E. coli* através da geração de altos níveis intracelulares de ROS, o que pode contribuir à morte bacteriana. Essas considerações apoiam o envolvimento da ROS na morte de *E. coli* induzida por migalina assim como acontece com outros antibióticos (113). Testes anteriores mostraram que a adição de catalase, tiourea ou espermidina às culturas *E. coli* tratadas com migalina recuperou a viabilidade bacteriana em 80%, (47), confirmando a importância do mecanismo ROS na morte de *E. coli*.

O LPS é o componente estrutural predominante da membrana externa das bactérias Gram-negativas sendo responsável pela morte de pacientes com choque séptico, além de causar intensa atividade inflamatória (158). Comprovamos que houve interação da migalina com o LPS, explicando parcialmente sua ação sobre bactérias Gram-negativas. Outras moléculas como curcumina e peptídeos antimicrobianos têm a mesma capacidade de interagir com LPS, reduzindo sua atividade (65, 79).

A presença de quelantes pode interferir no metabolismo *E. coli* levando à sua morte. A capacidade da migalina sequestrar nutrientes importantes para o metabolismo bacteriano foi analisada e notamos que houve redução de modo dose dependente na oxidação da sonda DRH, significando que migalina pode sequestrar ferro e alterar o metabolismo de *E. coli*. A estrutura química da migalina se assemelha à dos sideróforos, que têm a função de solubilizar e capturar ferro II para incorporá-lo ao metabolismo bacteriano, como ocorre com a poliamina denominada vulnibactina que contém atividade sideróforo e foi isolada de *Vibrio vulnificus* by Okujo em 1994 (159) e ao composto LCM (130). Nossos resultados indicam que um aumento da ROS intracelular em *E. coli* e a redução da biodisponibilidade de ferro podem contribuir para a morte de *E. coli* induzida por migalina.

Análises *in vitro* usando células eucarióticas foram realizadas para avaliar o efeito da migalina. Primeiro, avaliamos a viabilidade celular de macrófagos após o tratamento com essa molécula, uma vez que estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que baixas concentrações de migalina (0-100 μM) não foram tóxicas para esplenócitos (160). Em nossos testes, utilizamos concentrações superiores de migalina, com o máximo de 2000 μM , e testamos outros tipos celulares, como células primárias derivadas de medula óssea (MDMs) e as linhagens celulares RAW e J774A.1. Nestes ensaios não foi comprovado alteração na viabilidade dessas células (Figura 20), nos ácidos nucleicos (Figura 21) e nas proteínas (Figura 22). Estes resultados confirmam que mesmo em alta dose a migalina não foi tóxica para essas células eucarióticas confirmando os achados *in silico* onde migalina não se mostrou toxica (Tabela 3). Com base nesses dados, escolhemos três doses (50, 150 e 450 μM) da migalina para nossos testes, sendo estas concentrações abaixo dos níveis necessários para a atividade biológica de poliaminas, que estão na faixa de milimolar (161). Esses dados mostraram que os efeitos da migalina nas células de mamíferos diferem dos encontrados em bactérias, onde doses superiores a 1000 μM foram tóxicas para *E. coli* (Espinoza-Culupú, 2019); esses efeitos podem ser atribuídos a diferenças na estrutura da membrana entre esses tipos de células.

O processo inflamatório é uma reação complexa e envolve vários mediadores inflamatórios, incluindo NO, PGE2, TNF- α , IL-6 e IL-1 β e IL-10 (162). O LPS é o principal componente das bactérias Gram negativas e induz forte reação inflamatória. Assim sendo, investigamos o potencial mecanismo anti-inflamatório da migalina em células fagocíticas estimuladas com LPS. Foram realizados uma série de ensaios para determinar os mediadores, como TNF- α e IL-6, e a expressão gênica das enzimas iNOS e COX-2 para correlacionar com a produção de NO e a expressão de NF- κB p65, que são vias relacionadas à inflamação.

O pré-tratamento das culturas celulares com migalina reduziu a expressão dos genes iNOS, TNF- α , COX-2 e IL-6 após 6 horas de estimulação com LPS. Os efeitos celulares foram mais significativos após o tratamento com concentrações mais elevadas da molécula (Figura 23 e 24). Notamos que a concentração de 450 μM teve um efeito semelhante ao TAK-242, que é um potente inibidor de citocinas e sinais via TLR4. Resultados semelhantes para a expressão dos mesmos genes em macrófagos estimulados com LPS foram descritos para outras moléculas, como β -carotenos (163), resveratrol (164) e curcumina. Esses dados sugerem que a migalina pode atuar via TLR4, bloqueando a ação inflamatória do LPS.

Em seguida, avaliamos os efeitos da migalina nos níveis de TNF- α e NO nos sobrenadantes das culturas após 24 horas de estimulação com LPS, sendo o lisado celular utilizado para análise do perfil de proteínas destes mediadores imunes usando western blot. Notamos que houve redução na síntese de TNF- α (Figura 25) e NO (Figura 26, 27 e 28), assim como na expressão gênica desses mediadores. Foi observado também redução das enzimas iNOS e COX-2, indicando que a migalina desempenha papel anti-inflamatório durante a ativação do LPS, confirmando os achados *in silico* onde foi sugerido que a migalina poderia ter atividade anti-inflamatória (Figura 34) e possuir afinidade de ligação com a proteína 5-LOX (Figura 35), bem como no acoplamento molecular para as enzimas INOS e COX-2 que tem interações com drogas anti-inflamatórias (Figura 36, 37 e tabela 7). Nas investigações iniciais, as doses 50 e 150 μ M de migalina reduziram os níveis de NO nas células J774A.1, apesar de termos trocado o meio de cultura contendo a molécula, antes da adição do LPS. Neste ensaio o efeito de redução não foi tão pronunciado (Figura 26) em comparação ao obtido com migalina + LPS, adicionadas juntas durante o ensaio (Figura 27 e 28). Isto mostra que o pré-tratamento das células com migalina permite que a molécula bloqueie a via de ativação do LPS, através de seu receptor TLR4, indicando que essa molécula pode liga-se ao TLR4 como foi demonstrado nos ensaios *in silico* e de acoplamento molecular.

O TNF- α é um dos principais mediadores da resposta inflamatória (165), sendo ativado por sinais moleculares mediados pelo contato de PAMPs como LPS via TLRs. Em nossos ensaios o LPS causou aumento nos níveis de TNF- α , enquanto o tratamento destas células com migalina reduziu a expressão de mRNA para TNF- α , refletindo na inibição da síntese de TNF- α de forma semelhante à droga controle TAK-242. Esses resultados são semelhantes aos descritos na literatura, onde moléculas como a espermidina (35), curcumina (166), e peptídeos (167) inibiram a síntese de TNF- α e outras citocinas proinflamatórias em células ativadas com LPS.

A produção de TNF- α é essencial para a indução sinérgica de síntese de NO tanto *in vitro* quanto *in vivo* (168). Produtos bacterianos podem ativar iNOS, que gera altas concentrações de NO; no entanto, a superprodução de NO pode ser tóxica. Alterações nos níveis de NO através da indução ou inibição da atividade da enzima iNOS representa um método de avaliação dos efeitos de uma droga no processo inflamatório. Nossos dados indicam que tanto as células fagocíticas de cultura primária quanto as de linhagens celulares tratadas com migalina e LPS tiveram o mesmo padrão de redução NO, mostrando que esse efeito não dependeu do tipo celular.

Burns (169), combinou vários análogos de espermidina com lisina marcada com fluoresceína e observou que funcionavam como um poderoso sequestrador de LPS, comprovando que esses análogos neutralizaram a toxicidade do LPS. O mesmo autor (170) criou uma biblioteca destes compostos, alguns com 1 grupo acil e observou que esses compostos neutralizavam o LPS. Para determinar se a migalina se liga especificamente ao LPS e neutraliza sua atividade, incubamos migalina com LPS, e em seguida a mistura foi usada para ativar as células. A pré-incubação dessas moléculas reduziu drasticamente a produção de NO de forma semelhante ao observado com polimixina B (Figura 28). Esse achado corrobora com nossos resultados anteriores. Outros compostos, como peptídeos antimicrobianos (171) e a poliamina espermidina na concentração de 800 μ M (172), também neutralizou a atividade do LPS em alguns ensaios reportados por outros autores.

Outra abordagem complementar foi conjugar LPS com FITC e medir essa interação usando ensaio de fluorescência. Os resultados (Figura 29) mostraram que a migalina interage com o complexo LPS-FITC reduzindo a intensidade da fluorescência deste composto à medida que a concentração de migalina aumentou. A mesma abordagem foi usada para kukoamine B (173), que interferiu na ligação do LPS com o TLR4. Nossos dados provaram que a migalina é capaz de liga-se ao LPS.

A ligação do LPS ao TLR4 ativa vias de transcrição gênicas responsáveis pela resposta inflamatória, produção de PGE2 e NO através da ativação das enzimas COX-2 e iNOS (174). O NF- κ B desempenha papel muito importante na regulação da resposta imune mediada por diferentes fatores como estresse, antígenos ou doenças inflamatórias (175), induzindo assim a expressão de genes pró-inflamatórios (176) e anti-inflamatório (177). Observou-se que o pré-tratamento de macrófagos com migalina (450 μ M) e posterior ativação com LPS reduziu significativamente a expressão de NF- κ B p65 e iNOS (Figura 30), com resultados semelhantes aos da nossa droga controle TAK-242. Portanto, a migalina suprime a síntese de NO, TNF- α e COX-2 regulando a expressão de NF- κ B, impedindo sua translocação e inibindo a cascata inflamatória induzida pelo LPS. Esses achados sugerem que a migalina pode bloquear a ativação celular de LPS via TLR4 como acontece com outras moléculas anti-inflamatórias, como corticosteroides (178), peptídeos (179); e chalcones incluindo okanin (180) dentre outros, mostrando assim que a migalina pode interferir nessas vias, e possivelmente ter potencial terapêutico para diferentes doenças inflamatórias, cânceres e infecções (178). Essa droga também reduziu o estres

oxidativo causado pelo PMA, reforçando a ideia de que migalina pode atuar como molécula anti-inflamatória.

A triagem virtual (VS) *in silico* para a descoberta de moléculas está se tornando uma ferramenta essencial para prever novas atividades biológicas de pequenas moléculas ou moléculas existentes (181-183). Ferramentas online ou servidores web, como *Swiss Similarity*, ou bancos de dados de compostos químicos, como PubChem e ChEMBL, facilitam esses tipos de análises e permite a comparações das estruturas de interesse com estruturas existentes nas bases de dados. Neste estudo avaliamos a molécula de migalina (Figure 33a) nessas bases de dados, obtendo moléculas com similaridade estrutural e atividades conhecidas (Tabela 4). Entre as moléculas com índice tanimoto >75% incluiu um análogo de poliamina com atividade antimalárica (131), que apresentou semelhança de 91.3%, moléculas com atividade contra vírus, como HCV (132) e HIV (134), ou inibidor de *catechol-O-methyltransferase* (COMT) (135), moléculas com atividade siderófora (130), antibacteriana (128, 129) e anticancerígenas (133, 136). Estas três últimas atividades biológicas foram demonstradas em testes *in vitro*, relatada por Pereira (184) e Espinoza-Culupú, 2019, que mostrou o mecanismo molecular de ação em bactérias e sua atividade quelante (48).

Trabalho em colaboração com a Dra. Courrol, no 2020 (185) que usou migalina conjugada com nanopartículas de prata e analisou a atividade anticâncer, mostrou intensa atividade citotóxica contra células cancerígenas, confirmando assim as previsões *in silico*. Além disso, foi previsto que a migalina pode ter outras propriedades tais como atuar no sistema nervoso, ter atividade inibitória antiviral ou ter atividade inibitória para COMT.

Outra análise realizada com migalina previu que ela pode interagir com proteínas do sistema nervoso, como o receptor glutamato (ressaltado em amarelo na tabela 5) e a proteína 5-LOX envolvida no processo inflamatório, podendo atuar em ambos alvos moleculares, mais também receptores celulares associados com células imunes. Para isso, migalina em formato SMILE foi avaliado em ImmtorLig_DB, comprovando que essa molécula pode interagir com TLRs, incluindo TLR2 e TLR4, como observado na tabela 6. Este banco de dados (ImmtorLig_DB) inclui pequenas moléculas com atividade envolvendo esses receptores e poderia ser usado em comparações com moléculas como a migalina. Com estas análises obtivemos pontuações que indicavam possíveis alvos para migalina.

Através da abordagem de VS, diversas moléculas antagonistas de TLR foram identificadas incluindo moléculas para TLR2 (186) e TLR4 como descrito por Urban (187), que encontraram pequenas moléculas antagonistas para TLR4 usando as metodologias de acoplamento molecular e testes experimentais e validaram os resultados do VS *in vitro*.

Estudos *in silico* e *in vitro* foram realizados para identificar e verificar moléculas ligantes de TLR, incluindo TLR4, fornecendo assim informações sobre seus mecanismos de ativação ou inativação. As principais interações nesse processo permitem a descoberta de novas moléculas como moduladores imunes. Resultados de VS para migalina indicam que ela é um possível ligante para TLR4; por isso decidimos realizar um estudo de acoplamento molecular para corroborar essas previsões, e incluímos duas moléculas com evidências científicas de atividade antagonista para TLR4: curcumina e TAK-242 (41).

Antes do estudo de acoplamento, as estruturas de raios-X dos dois complexos TLR4/MD-2 foram comparadas através de RMSD e superposição tridimensional. O RMSD de 0,225Å indicou semelhança estrutural entre os dois complexos. A superposição apresentou pequenas diferenças nos resíduos do sítio de ligação (Pocket) de LPS, especialmente em W23, S47 e I153 (MD-2); no entanto, a maioria dos resíduos apresentou bom acordo estrutural (Figura 39). Essas pequenas diferenças na conformação dos resíduos podem estar correlacionadas com a diferença no volume do sítio de ligação (Tabela 8), número de resíduos ligados a ligantes e energias livres de interação (Tabela 8). No entanto, a atividade geral entre os três ligantes foi preservada.

Em outra análise foi realizado um estudo de acoplamento para prever os modos de ligação e afinidades da migalina, curcumina e TAK-242 com TLR4/MD-2, que se concentrou no domínio de ligação do LPS. As interações moleculares foram analisadas em todos os complexos receptor-ligante. Os domínios de ligação mostraram resíduos conservados e um padrão semelhante de interações em ambos os complexos TLR4/MD-2, sendo as energias de afinidades obtidas a partir de cálculos de acoplamento, porém as diferenças de energia entre os ligantes foram inferiores a 3 kJ/mol. Devido a pequenas diferenças de afinidades e para melhorar a precisão, as energias livres de interação foram avaliadas com a teoria da mecânica quântica (Tabela 9).

O LPS se liga ao TLR4 mediante a dimerização dos dois complexos TLR4/MD-2 (101), podendo se vincular a um dímero (TLR4-A/MD-2-C), em seguida ocorre a multimerização com o acoplamento de outro dímero (TLR4-B/MD-2-D). Da mesma forma, os cálculos de acoplamento foram realizados nos dímeros (TLR4/MD-2) e em

seguida, as coordenadas foram usadas para avaliar os efeitos estruturais e energéticos em um tetrâmero. O sítio de ligação do LPS apresenta um grande sítio (*pocket*) hidrofóbico em MD-2 e um conjunto de resíduos polares e positivamente carregados de TLR4 e MD-2, que conecta diretamente os dois componentes do multímeros (188). Embora a migalina seja um composto polar e altamente solúvel em água, como indicado pelas propriedades físico-químicas e eletrônicas (Tabela 2), a energia livre da interação mostra que a migalina pode formar complexos TLR4/MD-2 na configuração dimérica da mesma forma que outros antagonistas (curcumina e TAK-242) e com energias mais baixas nos complexos diméricos e tetraméricos (Tabela 8).

O estudo de acoplamento mostrou que a migalina foi capaz de ocupar parcialmente o bolso de ligação de MD-2 (Figura 40), sendo pequeno em comparação com LPS, e interage com alguns resíduos que são usados por LPS durante sua ligação e parte da interface de dimerização, como I80, R90, F126, Y131 de MD-2(101, 188),(189)

O *pocket* de ligação é uma cavidade hidrofóbica centrada em MD-2, embora tenha um grupo de resíduos polares na borda do MD-2 perto da área de dimerização do TLR4 (188). Na interação da ligação TLR4/MD-2 a força motriz é expulsar os ligantes da parte inferior do bolso de ligação e ocupar os resíduos polares, como ocorreu com a migalina, formando uma ligação de hidrogênio com R90. No entanto, a ausência de um grupo com carga formal negativa reduziu a possibilidade de uma associação iônica muito forte com os resíduos de TLR4 carregados positivamente, podendo ser incapaz de causar uma mudança conformacional, como foi demonstrado com outros ligantes que carecem de grupos fosfatos (188). Migalina teve uma distribuição energética boa para estabelecer um complexo estável com MD-2. Devido às suas características polares e solúveis em água, a migalina foi capaz de interagir com resíduos polares na interface de dimerização, mas não apresentou interações iônicas com o TLR4. No entanto, a energia livre reduzida encontrada no tetrâmero indica um forte vínculo com o MD-2, mas talvez seja insuficiente para gerar ativação ou multimerização como foi proposto para outros antagonistas sintéticos (190).

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi definido alguns mecanismos celulares e moleculares da ação da migalina em *E. coli* DH5 α e em células fagocíticas ativadas com LPS.

A- *E. coli* DH5 α

- O efeito microbicida em *E. coli*, envolveu alteração na atividade esterase, na permeabilidade da membrana, danos no DNA, geração de ROS e atividade quelante de ferro, além de ser capaz de ligar-se ao LPS.
- Nossos dados mostraram que o aumento de ROS intracelular associado ao sequestro de ferro e danos no DNA, em resposta ao tratamento com migalina pode ser um mecanismo responsável pela morte de *E. coli*. Com base nestes resultados propomos um mecanismo de ação de migalina para *E. coli* (Figura 18).
- Sugerimos que a migalina deve ser explorada como uma nova molécula alternativa com potencial antimicrobiano.

B- Células fagocíticas

- Os estudos *in vitro* usando linhagens celulares e macrófagos primários derivados de medula óssea, mostraram que migalina não foi citotóxica nas concentrações testadas, dados estes comprovados pelas predições *in silico*.
- Migalina suprimiu a expressão dos genes para TNF- α , IL-6, iNOS e COX-2, bem como suas proteínas em resposta ao LPS, através da interferência no receptor celular Toll-like 4 (TLR4) e inibição de sinais moleculares envolvendo o fator de transcrição NF- κ B p65, fundamental na regulação da resposta inflamatória. Em conjunto esses resultados sugerem que a migalina tem potencial anti-inflamatório na resposta induzida por LPS.
- Nós confirmamos e comprovamos pela primeira vez através de estudos *in silico*, usando molecular docking e predição de alvos moleculares, as atividades anti-inflamatória da migalina, demonstrando que essa molécula controla a ação de LPS.
- Estes resultados comprovaram que a migalina pode interferir na resposta imune inata devido sua ação antagonista mediada via a ligação com a proteína MD-2/TLR4 conforme modelo proposto na Figura 32.
- Em resumo, a ação anti-inflamatória da migalina nas células fagocíticas ativadas com LPS no modelo estudado envolve dois mecanismos: ligação ao LPS e

interação ao complexo TLR4/MD-2.

- Confirmamos que o uso de análises *in silico* é uma excelente ferramenta para estudos desta natureza.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. O'Neil J. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations 2014. 2014.
2. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013;13(12):1057-98.
3. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal chemistry*. 2014;6:25-64.
4. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 2015;40(4):277-83.
5. Bush K. Antibacterial drug discovery in the 21st century. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004;10:10-7.
6. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. 2016;529:336.
7. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011;46(10):4769-807.
8. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*. 2020;83(3):770-803.
9. Igarashi K, Kashiwagi K. Modulation of cellular function by polyamines. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42(1):39-51.
10. Panagiotidis CA, Artandi S, Calame K, Silverstein SJ. Polyamines alter sequence-specific DNA-protein interactions. *Nucleic acids research*. 1995;23(10):1800-9.
11. Huang Y, Pledgie A, Casero RA, Jr., Davidson NE. Molecular mechanisms of polyamine analogs in cancer cells. *Anti-cancer drugs*. 2005;16(3):229-41.
12. Zhang M, Caragine T, Wang H, Cohen PS, Botchkina G, Soda K, et al. Spermine Inhibits Proinflammatory Cytokine Synthesis in Human Mononuclear Cells: A Counterregulatory Mechanism that Restrains the Immune Response. *The Journal of Experimental Medicine*. 1997;185(10):1759-68.
13. Haskó G, Kuhel DG, Marton A, Nemeth ZH, Deitch EA, Szabó C. Spermine differentially regulates the production of interleukin-12 p40 and interleukin-10 and suppresses the release of the T helper 1 cytokine interferon-gamma. *Shock*. 2000;14(2):144-9.
14. Jelsbak L, Thomsen LE, Wallrodt I, Jensen PR, Olsen JE. Polyamines are required for virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS One*. 2012;7(4):e36149.
15. Chattopadhyay MK, Tabor CW, Tabor H. Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(5):2261-5.
16. Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM, Casero RA. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(19):11140-5.

17. Patel CN, Wortham BW, Lines JL, Fetherston JD, Perry RD, Oliveira MA. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *J Bacteriol.* 2006;188(7):2355-63.
18. Kwon D-H, Lu C-D. Polyamine Effects on Antibiotic Susceptibility in Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2007;51(6):2070-7.
19. Dela Vega AL, Delcour AH. Polyamines decrease *Escherichia coli* outer membrane permeability. *Journal of bacteriology.* 1996;178(13):3715-21.
20. Yasuda K, Ohmizo C, Katsu T. Mode of action of novel polyamines increasing the permeability of bacterial outer membrane. *International journal of antimicrobial agents.* 2004;24(1):67-71.
21. Takahashi T, Kakehi J-I. Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of botany.* 2010;105(1):1-6.
22. Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annual review of biochemistry.* 1984;53(1):749-90.
23. Liu L, Li L, Rao JN, Zou T, Zhang HM, Boneva D, et al. Polyamine-modulated expression of c-myc plays a critical role in stimulation of normal intestinal epithelial cell proliferation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2005;288(1):C89-C99.
24. Cordeiro-da-Silva A, Tavares J, Araújo N, Cerqueira F, Tomás A, Kong Thoo Lin P, et al. Immunological alterations induced by polyamine derivatives on murine splenocytes and human mononuclear cells. *International Immunopharmacology.* 2004;4(4):547-56.
25. Casero RA, Jr., Celano P, Ervin SJ, Wiest L, Pegg AE. High specific induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in a human large cell lung carcinoma. *The Biochemical journal.* 1990;270(3):615-20.
26. Huang Y, Pledge A, Rubin E, Marton LJ, Woster PM, Sukumar S, et al. Role of p53/p21(Waf1/Cip1) in the regulation of polyamine analogue-induced growth inhibition and cell death in human breast cancer cells. *Cancer biology & therapy.* 2005;4(9):1006-13.
27. Casero RA, Woster PM. Terminally alkylated polyamine analogues as chemotherapeutic agents. *Journal of medicinal chemistry.* 2001;44(1):1-26.
28. Li M, Wang Y, Ge C, Chang L, Wang C, Tian Z, et al. Synthesis and biological evaluation of novel alkylated polyamine analogues as potential anticancer agents. *European journal of medicinal chemistry.* 2018;143:1732-43.
29. Casero RA, Jr., Woster PM. Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents. *Journal of medicinal chemistry.* 2009;52(15):4551-73.
30. Hamana K, Niitsu M, Samejima K, Matsuzaki S. Novel polyamines in insects and spiders. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry.* 1991;100(2):399-402.
31. Wilson D, Boyle GM, McIntyre L, Nolan MJ, Parsons PG, Smith JJ, et al. The Aromatic Head Group of Spider Toxin Polyamines Influences Toxicity to Cancer Cells. *Toxins (Basel).* 2017;9(11):346.
32. Estrada G, Villegas E, Corzo G. Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs. *Natural Product Reports.* 2007;24(1):145-61.

33. Soda K, Kano Y, Nakamura T, Kasono K, Kawakami M, Konishi F. Spermine, a Natural Polyamine, Suppresses LFA-1 Expression on Human Lymphocyte. *The Journal of Immunology*. 2005;175(1):237.
34. Lagishetty CV, Naik SR. Polyamines: Potential anti-inflammatory agents and their possible mechanism of action. *Indian J Pharmacol*. 2008;40(3):121-5.
35. Choi YH, Park HY. Anti-inflammatory effects of spermidine in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Journal of Biomedical Science*. 2012;19(1):31.
36. Netea MG, Van der Graaf C, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004;75(5):749-55.
37. Kielian T. Overview of toll-like receptors in the CNS. *Current topics in microbiology and immunology*. 2009;336:1-14.
38. Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Frontiers in physiology*. 2017;8:508-.
39. Jeziarska A, Kolosova IA, Verin AD. Toll Like Receptors Signaling Pathways as a Target for Therapeutic Interventions. *Curr Signal Transduct Ther*. 2011;6(3):428-40.
40. Chen C-Y, Kao C-L, Liu C-M. The Cancer Prevention, Anti-Inflammatory and Anti-Oxidation of Bioactive Phytochemicals Targeting the TLR4 Signaling Pathway. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).
41. Matsunaga N, Tsuchimori N, Matsumoto T, Ii M. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Molecular pharmacology*. 2011;79(1):34-41.
42. Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, Shomura S, Takayama H, Fleisig AJ, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I270-4.
43. Wozniacka A, Lesiak A, Narbutt J, McCauliffe D, Sysa-Jedrzejowska A. Chloroquine treatment influences proinflammatory cytokine levels in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2006;15(5):268-75.
44. Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Romero M, Sánchez M, Zarzuelo MJ, Gómez-Morales M, et al. Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension*. 2014;64(2):330-7.
45. Chen J, Rao JN, Zou T, Liu L, Marasa BS, Xiao L, et al. Polyamines are required for expression of Toll-like receptor 2 modulating intestinal epithelial barrier integrity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2007;293(3):G568-G76.
46. Li G, Ding H, Yu X, Meng Y, Li J, Guo Q, et al. Spermidine Suppresses Inflammatory DC Function by Activating the FOXO3 Pathway and Counteracts Autoimmunity. *Iscience*. 2020;23(1):100807.
47. Pereira LS, Silva PI, Miranda MTM, Almeida IC, Naoki H, Konno K, et al. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated

63. Hyldgaard M, Mygind T, Piotrowska R, Foss M, Meyer RL. Isoeugenol has a non-disruptive detergent-like mechanism of action. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:754.
64. Dong TG, Dong S, Catalano C, Moore R, Liang X, Mekalanos JJ. Generation of reactive oxygen species by lethal attacks from competing microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(7):2181-6.
65. Lakshminarayanan R, Tan WX, Aung TT, Goh ET, Muruganantham N, Li J, et al. Branched Peptide, B2088, Disrupts the Supramolecular Organization of Lipopolysaccharides and Sensitizes the Gram-negative Bacteria. *Sci Rep*. 2016;6:25905.
66. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1):70-7.
67. Zou L, Lu J, Wang J, Ren X, Zhang L, Gao Y, et al. Synergistic antibacterial effect of silver and ebselen against multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *EMBO molecular medicine*. 2017;9(8):1165-78.
68. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
69. Vitorino HA, Mantovanelli L, Zanotto FP, Esposito BP. Iron metallodrugs: stability, redox activity and toxicity against *Artemia salina*. *PLoS One*. 2015;10(4):e0121997.
70. Baccan MM, Chiarelli-Neto O, Pereira RMS, Espósito BP. Quercetin as a shuttle for labile iron. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012;107(1):34-9.
71. Weischenfeldt J, Porse B. Bone marrow-derived macrophages (BMM): isolation and applications. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2008;2008(12):pdb. prot5080.
72. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rößner S, Koch F, Romani N, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods*. 1999;223(1):77-92.
73. Wang HM-D, Fu L, Cheng CC, Gao R, Lin MY, Su HL, et al. Inhibition of LPS-Induced Oxidative Damages and Potential Anti-Inflammatory Effects of *Phyllanthus emblica* Extract via Down-Regulating NF- κ B, COX-2, and iNOS in RAW 264.7 Cells. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(8):270.
74. Raynaud S, Le Pabic H, Felden B. Selective recovery of RNAs from bacterial pathogens after their internalization by human host cells. *Methods*. 2018.
75. Vieira PCG, Espinoza-Culupú AO, Nepomuceno R, Alves MR, Lebrun I, Elias WP, et al. Secreted autotransporter toxin (Sat) induces cell damage during enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *PloS one*. 2020;15(2):e0228959.
76. Ding AH, Nathan CF, Stuehr D. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology*. 1988;141(7):2407-12.
77. Lu X-X, Jiang Y-F, Li H, Ou Y-Y, Zhang Z-D, Di H-Y, et al. Polymyxin B as an inhibitor of lipopolysaccharides contamination of herb crude polysaccharides in mononuclear cells. *Chinese journal of natural medicines*. 2017;15(7):487-94.
78. Skelly RR, Munkenbeck P, Morrison DC. Stimulation of T-independent antibody responses by hapten-lipopolysaccharides without repeating polymeric structure. *Infection and immunity*. 1979;23(2):287-93.

79. Sinha S, Zheng L, Mu Y, Ng WJ, Bhattacharjya S. Structure and Interactions of A Host Defense Antimicrobial Peptide Thanatin in Lipopolysaccharide Micelles Reveal Mechanism of Bacterial Cell Agglutination. *Sci Rep.* 2017;7(1):17795.
80. Choi YH, Kim GY, Lee HH. Anti-inflammatory effects of cordycepin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages through Toll-like receptor 4-mediated suppression of mitogen-activated protein kinases and NF- κ B signaling pathways. *Drug design, development and therapy.* 2014;8:1941-53.
81. Zou J, Feng D, Ling W-H, Duan R-D. Lycopene suppresses proinflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by inhibiting ROS-induced trafficking of TLR4 to lipid raft-like domains. *The Journal of nutritional biochemistry.* 2013;24(6):1117-22.
82. Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic acids research.* 2018;47(D1):D1102-D9.
83. Dimitrov SD, Diderich R, Sobanski T, Pavlov TS, Chankov GV, Chapkanov AS, et al. QSAR Toolbox – workflow and major functionalities. *SAR and QSAR in environmental research.* 2016;27(3):203-19.
84. Yang H, Lou C, Sun L, Li J, Cai Y, Wang Z, et al. admetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics.* 2018;35(6):1067-9.
85. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports.* 2017;7(1):42717.
86. Maunz A, Gütlein M, Rautenberg M, Vorgrimmeler D, Gebele D, Helma C. Iazar: a modular predictive toxicology framework. *Frontiers in pharmacology.* 2013;4(38).
87. Varsou D-D, Melagraki G, Sarimveis H, Afantitis A. MouseTox: An online toxicity assessment tool for small molecules through Enalos Cloud platform. *Food and Chemical Toxicology.* 2017;110:83-93.
88. Zoete V, Daina A, Bovigny C, Michielin O. SwissSimilarity: A Web Tool for Low to Ultra High Throughput Ligand-Based Virtual Screening. *Journal of chemical information and modeling.* 2016;56(8):1399-404.
89. Gaulton A, Hersey A, Nowotka M, Bento AP, Chambers J, Mendez D, et al. The ChEMBL database in 2017. *Nucleic acids research.* 2017;45(D1):D945-D54.
90. Luo H, Zhang P, Huang H, Huang J, Kao E, Shi L, et al. DDI-CPI, a server that predicts drug-drug interactions through implementing the chemical-protein interactome. *Nucleic acids research.* 2014;42(Web Server issue):W46-W52.
91. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic acids research.* 2019;47(W1):W357-W64.
92. Keiser MJ, Roth BL, Armbruster BN, Ernsberger P, Irwin JJ, Shoichet BK. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nature biotechnology.* 2007;25(2):197-206.
93. Daina A, Blatter M-C, Baillie Gerritsen V, Palagi PM, Marek D, Xenarios I, et al. Drug Design Workshop: A Web-Based Educational Tool To Introduce Computer-Aided Drug Design to the General Public. *Journal of Chemical Education.* 2017;94(3):335-44.

94. Chatterjee D, Kaur G, Muradia S, Singh B, Agrewala JN. ImmTORLig_DB: repertoire of virtually screened small molecules against immune receptors to bolster host immunity. *Scientific reports*. 2019;9(1):3092.
95. Rosenfeld RJ, Bonaventura J, Szymczyna BR, MacCoss MJ, Arvai AS, Yates JR, 3rd, et al. Nitric-oxide synthase forms N-NO-pterin and S-NO-cys: implications for activity, allostery, and regulation. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(41):31581-9.
96. Orlando BJ, Lucido MJ, Malkowski MG. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. *Journal of structural biology*. 2015;189(1):62-6.
97. Gilbert NC, Rui Z, Neau DB, Waight MT, Bartlett SG, Boeglin WE, et al. Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenase by a point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(8):3222-9.
98. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*. 2010;31(2):455-61.
99. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *Journal of chemical information and modeling*. 2012;52(7):1757-68.
100. Spartan'14. Wavefunction Inc. Irvine CA, USA 2014.
101. Ohto U, Fukase K, Miyake K, Shimizu T. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(19):7421.
102. BIOVIA DS. Discovery Studio Modeling Environment [Internet] .[cited 2019] Release 2017, San Diego: Dassault Systèmes, 2016. 2016.
103. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. 2009;30(16):2785-91.
104. Kubli-Garfias C, Vázquez-Ramírez R, Trejo-Muñoz C, Berber A. Insights on the mechanism of action of immunostimulants in relation to their pharmacological potency. The effects of imidazoquinolines on TLR8. *PloS one*. 2017;12(6):e0178846.
105. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997;18(15):2714-23.
106. Feuerstein BG, Williams LD, Basu HS, Marton LJ. Implications and concepts of polyamine-nucleic acid interactions. *Journal of cellular biochemistry*. 1991;46(1):37-47.
107. Epanand RM, Walker C, Epanand RF, Magarvey NA. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2016;1858(5):980-7.
108. Hong J, Guan W, Jin G, Zhao H, Jiang X, Dai J. Mechanism of tachyplesin I injury to bacterial membranes and intracellular enzymes, determined by laser confocal scanning microscopy and flow cytometry. *Microbiol Res*. 2015;170:69-77.
109. Smirnova GV, Oktyabrsky ON. Glutathione in bacteria. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70(11):1199-211.

110. Belenky P, Jonathan DY, Porter CB, Cohen NR, Lobritz MA, Ferrante T, et al. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. *Cell reports*. 2015;13(5):968-80.
111. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature reviews Microbiology*. 2010;8(6):423-35.
112. Dong TG, Dong S, Catalano C, Moore R, Liang X, Mekalanos JJ. Generation of reactive oxygen species by lethal attacks from competing microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(7):2181-6.
113. Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, MacDonald IC, Martell JD, Takahashi N, et al. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(20):E2100-E9.
114. Miller KA, Suresh Kumar E, Wood SJ, Cromer JR, Datta A, David SA. Lipopolysaccharide sequestrants: structural correlates of activity and toxicity in novel acylhomospermines. *Journal of medicinal chemistry*. 2005;48(7):2589-99.
115. Raines DJ, Moroz OV, Wilson KS, Duhme-Klair AK. Interactions of a periplasmic binding protein with a tetradentate siderophore mimic. *Angewandte Chemie*. 2013;125(17):4693-6.
116. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal*. 1984;219(1):1-14.
117. Mosser DM, Zhang X. Activation of murine macrophages. *Current protocols in immunology*. 2008;Chapter 14:Unit-14.2.
118. Bloomfield VA. Condensation of DNA by multivalent cations: considerations on mechanism. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. 1991;31(13):1471-81.
119. Katz AM, Tolokh IS, Pabit SA, Baker N, Onufriev AV, Pollack L. Spermine Condenses DNA, but Not RNA Duplexes. *Biophysical Journal*. 2017;112(1):22-30.
120. Watanabe S-i, Kusama-Eguchi K, Kobayashi H, Igarashi K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(31):20803-9.
121. Lightfoot HL, Hall J. Endogenous polyamine function--the RNA perspective. *Nucleic acids research*. 2014;42(18):11275-90.
122. Wu K-C, Yang S-T, Hsu S-C, Chiang J-H, Hsia T-C, Yang J-S, et al. Propofol induces DNA damage in mouse leukemic monocyte macrophage RAW264. 7 cells. *Oncology reports*. 2013;30(5):2304-10.
123. Ji B-C, Yu C-C, Yang S-T, Hsia T-C, Yang J-S, Lai K-C, et al. Induction of DNA damage by deguelin is mediated through reducing DNA repair genes in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells. *Oncology reports*. 2012;27(4):959-64.
124. Snyder RD, Edwards ML. Effects of polyamine analogs on the extent and fidelity of in vitro polypeptide synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1991;176(3):1383-92.
125. Kawasaki T, Kawai T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in immunology*. 2014;5(461).
126. Park I-H, Kim M-M. Inhibitory effect of spermidine with antioxidant activity on oxidative stress in human dermal fibroblasts. *Journal of Life Science*. 2011;21(5):693-9.

127. Gaboriau F, Vaultier M, Moulinoux J-P, Delcros J-G. Antioxidative properties of natural polyamines and dimethylsilane analogues. *Redox Report*. 2005;10(1):9-18.
128. Cheng K, Zheng Q-Z, Qian Y, Shi L, Zhao J, Zhu H-L. Synthesis, antibacterial activities and molecular docking studies of peptide and Schiff bases as targeted antibiotics. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2009;17(23):7861-71.
129. Coburn RA, Batista AJ, Evans RT, Genco RJ. Potential salicylamide antiplaque agents: in vitro antibacterial activity against *Actinomyces viscosus*. *Journal of medicinal chemistry*. 1981;24(10):1245-9.
130. Raines DJ, Moroz OV, Wilson KS, Duhme-Klair A-K. Interactions of a Periplasmic Binding Protein with a Tetradentate Siderophore Mimic. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013;52(17):4595-8.
131. Liew LPP, Pearce AN, Kaiser M, Copp BR. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of antimalarial polyamines. *European journal of medicinal chemistry*. 2013;69:22-31.
132. Rivero-Buceta E, Carrero P, Doyagüez EG, Madrona A, Quesada E, Camarasa MJ, et al. Linear and branched alkyl-esters and amides of gallic acid and other (mono-, di- and tri-) hydroxy benzoyl derivatives as promising anti-HCV inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*. 2015;92:656-71.
133. Miyanaga S, Sakurai H, Saiki I, Onaka H, Igarashi Y. Synthesis and evaluation of myxochelin analogues as antimetastatic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2009;17(7):2724-32.
134. Zhao XZ, Semenova EA, Vu BC, Maddali K, Marchand C, Hughes SH, et al. 2,3-dihydro-6,7-dihydroxy-1H-indol-1-one-based HIV-1 integrase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*. 2008;51(2):251-9.
135. Brevitt SE, Tan EW. Synthesis and in vitro evaluation of two progressive series of bifunctional polyhydroxybenzamide catechol-O-methyltransferase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*. 1997;40(13):2035-9.
136. Schieferdecker S, König S, Koeberle A, Dahse H-M, Werz O, Nett M. Myxochelins target human 5-lipoxygenase. *Journal of natural products*. 2015;78(2):335-8.
137. Patil KR, Mahajan UB, Unger BS, Goyal SN, Belemkar S, Surana SJ, et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(18):4367.
138. Meena A, Yadav DK, Srivastava A, Khan F, Chanda D, Chattopadhyay SK. In Silico Exploration of Anti-Inflammatory Activity of Natural Coumarinolignoids. *Chemical biology & drug design*. 2011;78(4):567-79.
139. Joshi T, Sharma P, Joshi T, Chandra S. In silico screening of anti-inflammatory compounds from Lichen by targeting cyclooxygenase-2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2019:1-19.
140. Cuzzocrea S, Salvemini D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes. *Kidney international*. 2007;71(4):290-7.
141. WHO. WHO Global strategy for containment of antimicrobial resistance. 2001.

142. Nair SK, Verma A, Thomas TJ, Chou TC, Gallo MA, Shirahata A, et al. Synergistic apoptosis of MCF-7 breast cancer cells by 2-methoxyestradiol and bis(ethyl)nor-spermine. *Cancer letters*. 2007;250(2):311-22.
143. Blanchet M, Borselli D, Brunel JM. Polyamine derivatives: a revival of an old neglected scaffold to fight resistant Gram-negative bacteria? *Future Medicinal Chemistry*. 2016;8(9):963-73.
144. Balakrishna R, Wood SJ, Nguyen TB, Miller KA, Kumar ES, Datta A, et al. Structural correlates of antibacterial and membrane-permeabilizing activities in acylpolyamines. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(3):852-61.
145. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 2007;130(5):797-810.
146. Douki T, Bretonniere Y, Cadet J. Protection against radiation-induced degradation of DNA bases by polyamines. *Radiation research*. 2000;153(1):29-35.
147. von Deutsch AW, Mitchell CD, Williams CE, Dutt K, Silvestrov NA, Klement BJ, et al. Polyamines protect against radiation-induced oxidative stress. *Gravit Space Biol Bull*. 2005;18(2):109-10.
148. Tkachenko AG, Fedotova MV. Dependence of protective functions of *Escherichia coli* polyamines on strength of stress caused by superoxide radicals. *Biochemistry Biokhimiia*. 2007;72(1):109-16.
149. Terui Y, Yoshida T, Sakamoto A, Saito D, Oshima T, Kawazoe M, et al. Polyamines protect nucleic acids against depurination. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2018;99:147-53.
150. Espirito Santo C, Lam EW, Elowsky CG, Quaranta D, Domaille DW, Chang CJ, et al. Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(3):794-802.
151. Farkas A, Maróti G, Kereszt A, Kondorosi É. Comparative Analysis of the Bacterial Membrane Disruption Effect of Two Natural Plant Antimicrobial Peptides. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8(51).
152. Diaz-Roa A, Patarroyo MA, Bello FJ, Da Silva PI, Jr. Sarconesin: Sarconesiopsis magellanica Blowfly Larval Excretions and Secretions With Antibacterial Properties. *Front Microbiol*. 2018;9:2249.
153. Diaz-Roa A, Espinoza-Culupu A, Torres-Garcia O, Borges MM, Avino IN, Alves FL, et al. Sarconesin II, a New Antimicrobial Peptide Isolated from *Sarconesiopsis magellanica* Excretions and Secretions. *Molecules*. 2019;24(11).
154. Goswami M, Mangoli SH, Jawali N. Involvement of Reactive Oxygen Species in the Action of Ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(3):949-54.
155. Addinall SG, Bi E, Lutkenhaus J. FtsZ ring formation in fts mutants. *Journal of bacteriology*. 1996;178(13):3877-84.
156. Wang J, Galgoci A, Kodali S, Herath KB, Jayasuriya H, Dorso K, et al. Discovery of a small molecule that inhibits cell division by blocking FtsZ, a novel therapeutic target of antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(45):44424-8.

157. Rai D, Singh JK, Roy N, Panda D. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem J.* 2008;410(1):147-55.
158. Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700.
159. Okujo N, Saito M, Yamamoto S, Yoshida T, Miyoshi S, Shinoda S. Structure of vulnibactin, a new polyamine-containing siderophore from *Vibrio vulnificus*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine.* 1994;7(2):109-16.
160. Mafra DG, da Silva PI, Galhardo CS, Nassar R, Daffre S, Sato MN, et al. The spider acylpolyamine Mygalin is a potent modulator of innate immune responses. *Cellular immunology.* 2012;275(1):5-11.
161. Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and biophysical research communications.* 2000;271(3):559-64.
162. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of inflammation.* 2014;2014:561459-.
163. Bai S-K, Lee S-J, Na H-J, Ha K-S, Han J-A, Lee H, et al. β -Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF- κ B activation. *Experimental & molecular medicine.* 2005;37(4):323.
164. Zong Y, Sun L, Liu B, Deng Y-S, Zhan D, Chen Y-L, et al. Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells. *PloS one.* 2012;7(8):e44107-e.
165. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2009;388(4):621-5.
166. Jin C-y, Lee J-d, Park C, Choi Yh, Kim G-y. Curcumin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Acta pharmacologica Sinica.* 2007;28(10):1645-51.
167. Ibrahim HR, Hamasaki K, Miyata T. Novel peptide motifs from lysozyme suppress pro-inflammatory cytokines in macrophages by antagonizing toll-like receptor and LPS-scavenging action. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2017;107:240-8.
168. Smith SR, Manfra D, Davies L, Terminelli C, Denhardt G, Donkin J. Elevated levels of NO in both unchallenged and LPS-challenged *C. parvum*-primed mice are attributable to the activity of a cytokine-inducible isoform of iNOS. *Journal of leukocyte biology.* 1997;61(1):24-32.
169. Burns MR, Wood SJ, Miller KA, Nguyen T, Cromer JR, David SA. Lysine-spermine conjugates: hydrophobic polyamine amides as potent lipopolysaccharide sequestrants. *Bioorganic & medicinal chemistry.* 2005;13(7):2523-36.
170. Burns MR, Jenkins SA, Wood SJ, Miller K, David SA. Structure-Activity Relationships in Lipopolysaccharide Neutralizers: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a 540-Membered Amphipathic Bisamide Library. *Journal of combinatorial chemistry.* 2006;8(1):32-43.

171. Pulido D, Nogués MV, Boix E, Torrent M. Lipopolysaccharide neutralization by antimicrobial peptides: a gambit in the innate host defense strategy. *Journal of innate immunity*. 2012;4(4):327-36.
172. Jeong J-W, Cha H-J, Han MH, Hwang SJ, Lee D-S, Yoo JS, et al. Spermidine protects against oxidative stress in inflammation models using macrophages and zebrafish. *Biomolecules & therapeutics*. 2018;26(2):146.
173. Yang D, Zheng X, Wang N, Fan S, Yang Y, Lu Y, et al. Kukoamine B promotes TLR4-independent lipopolysaccharide uptake in murine hepatocytes. *Oncotarget*. 2016;7(36):57498-513.
174. Park MH, Hong JT. Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*. 2016;5(2):15.
175. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2017;2(1):17023.
176. Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology*. 2004;25(6):280-8.
177. Lawrence T, Fong C. The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF- κ B. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42(4):519-23.
178. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(2):135-42.
179. Ramani V, Madhusoodhanan R, Kosanke S, Awasthi S. A TLR4-interacting SPA4 peptide inhibits LPS-induced lung inflammation. *Innate immunity*. 2013;19(6):596-610.
180. Hou Y, Li G, Wang J, Pan Y, Jiao K, Du J, et al. Okanin, effective constituent of the flower tea *Coreopsis tinctoria*, attenuates LPS-induced microglial activation through inhibition of the TLR4/NF- κ B signaling pathways. *Scientific reports*. 2017;7(1):45705.
181. Lionta E, Spyrou G, Vassilatis DK, Cournia Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Current topics in medicinal chemistry*. 2014;14(16):1923-38.
182. Byrne R, Schneider G. In Silico Target Prediction for Small Molecules. *Methods in molecular biology*. 2019;1888:273-309.
183. Alam S, Khan F. Virtual screening, Docking, ADMET and System Pharmacology studies on *Garcinia caged Xanthone* derivatives for Anticancer activity. *Scientific reports*. 2018;8(1):5524.
184. Pereira LS, Silva PI, Jr., Miranda MT, Almeida IC, Naoki H, Konno K, et al. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;352(4):953-9.
185. Courrol LC, Espinoza-Culupú A, da Silva PI, de Oliveira Gonçalves K, de Oliveira Silva FR, Borges MM. Antibacterial and Antitumoral Activities of the Spider Acylpolyamine Mygalin Silver Nanoparticles. *BioNanoScience*. 2020;10(2):463-72.
186. Durai P, Shin HJ, Achek A, Kwon HK, Govindaraj RG, Panneerselvam S, et al. Toll-like receptor 2 antagonists identified through virtual screening and experimental validation. *The FEBS journal*. 2017;284(14):2264-83.

187. Švajger U, Brus B, Turk S, Sova M, Hodnik V, Anderluh G, et al. Novel toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists identified by structure- and ligand-based virtual screening. *European journal of medicinal chemistry*. 2013;70:393-9.
188. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi B-S, Lee H, Lee J-O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature*. 2009;458(7242):1191-5.
189. Wang Y, Su L, Morin MD, Jones BT, Whitby LR, Surakattula MM, et al. TLR4/MD-2 activation by a synthetic agonist with no similarity to LPS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(7):E884-E93.
190. Zhang S, Hu Z, Tanji H, Jiang S, Das N, Li J, et al. Small-molecule inhibition of TLR8 through stabilization of its resting state. *Nature chemical biology*. 2018;14(1):58.

8. ANEXOS

➤ Artigos publicados durante o período de doutorado

1. **Espinoza-Culupú A**, Mendes E, Vitorino HA, da Silva PI, Borges MM. Mygalin: An Acylpolyamine With Bactericidal Activity. *Frontiers in microbiology*. 2020;10(2928).
2. **Espinoza-Culupu A**, Vazquez-Ramirez R, Farfan-Lopez M, Mendes E, Notomi Sato M, da Silva Junior PI, et al. Acylpolyamine Mygalin as a TLR4 Antagonist Based on Molecular Docking and In Vitro Analyses. *Biomolecules*. 2020;10(12).

Artigo publicado em colaboração

1. Courrol LC, **Espinoza-Culupú A**, da Silva PI, de Oliveira Gonçalves K, de Oliveira Silva FR, Borges MM. Antibacterial and Antitumoral Activities of the Spider Acylpolyamine Mygalin Silver Nanoparticles. *BioNanoScience*. 2020;10(2):463-72.



Mygalin: An Acylpolyamine With Bactericidal Activity

Abraham Espinoza-Culupú^{1,2}, Elizabeth Mendes², Hector Aguilar Vitorino³, Pedro Ismael da Silva Jr.⁴ and Monamaris Marques Borges^{2*}

¹ Ph.D. Program in Biotechnology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Bacteriology Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, ³ Institute of Marine and Environmental Technology, University of Maryland Center for Environmental Science, Columbus Center, Baltimore, MD, United States, ⁴ Laboratory for Applied Toxicology (LETA), Butantan Institute, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Adler Ray Dillman,
University of California, Riverside,
United States

Reviewed by:

Autar Krishen Mattoo,
Agricultural Research Service (USDA),
United States
Taku Takahashi,
Okayama University, Japan

*Correspondence:

Monamaris Marques Borges
monamaris.borges@butantan.gov.br

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 12 July 2019

Accepted: 05 December 2019

Published: 10 January 2020

Citation:

Espinoza-Culupú A, Mendes E,
Vitorino HA, da Silva PI Jr and
Borges MM (2020) Mygalin: An
Acylpolyamine With Bactericidal
Activity. *Front. Microbiol.* 10:2928.
doi: 10.3389/fmicb.2019.02928

Inappropriate use of antibiotics favors the selection and spread of resistant bacteria. To reduce the spread of these bacteria, finding new molecules with activity is urgent and necessary. Several polyamine analogs have been constructed and used to control microorganisms and tumor cells. Mygalin is a synthetic acylpolyamine, which are analogs of spermidine, derived from the hemolymph of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. The effective activity of polyamines and their analogs has been associated with their structure. The presence of two acyl groups in the Mygalin structure may give this molecule a specific antibacterial activity. The aim of this study was to identify the mechanisms involved in the interaction of Mygalin with *Escherichia coli* to clarify its antimicrobial action. The results indicated that Mygalin exhibits intense dose and time-dependent bactericidal activity. Treatment of *E. coli* with this molecule caused membrane rupture, inhibition of DNA synthesis, DNA damage, and morphological changes. The esterase activity increased along with the intracellular production of reactive oxygen species (ROS) after treatment of the bacteria with Mygalin. In addition, this molecule was able to sequester iron and bind to LPS. We have shown that Mygalin has bactericidal activity with underlying mechanisms involving ROS generation and chelation of iron ions that are necessary for bacterial metabolism, which may contribute to its microbicidal activity. Taken together, our data suggest that Mygalin can be explored as a new alternative drug with antimicrobial potential against Gram-negative bacteria or other infectious agents.

Keywords: acylpolyamine, Mygalin, oxidative stress, *E. coli*, antimicrobial, biomolecule

INTRODUCTION

There is a constant need for new antibiotics due to the rapid development of antibiotic resistance. Extensive and prolonged use and inappropriate prescribing of antibiotics favor rapid selection of resistant microorganisms. This resistance is multifactorial but is associated with poor hygiene and often a delay in the diagnosis of bacterial infections. Each year, microorganisms develop sophisticated and complex mechanisms to circumvent the antibiotics in use, resulting

in serious and prolonged life-threatening infections (Laxminarayan et al., 2013). The urgency for developing new antibiotics is evident as infectious diseases are one of the leading causes of mortality worldwide, especially in hospital settings (Fair and Tor, 2014; Ventola, 2015). It is estimated that by 2050, approximately 10 million people will die due to antimicrobial resistance (O'Neil, 2014). The pharmaceutical industry has reduced investments in research on new antibiotics due to economic issues since these companies seek an immediate financial return, and this research is carried out over long periods. Diverse natural products in this therapeutic class have been presented as alternatives for meeting new targets, since such products provide novel and diverse chemicals, aiding in the control of microorganisms (Bush, 2004; Brown and Wright, 2016). Natural polyamines are a group of endogenous cationic compounds that differ in the number of amine groups inserted into the molecule. Putrescine is a diamine, while spermidine and spermine contain three and four amino groups, respectively. The differences in these clusters generate different functions between these molecules and are associated with broad biological functions. These molecules can control cell proliferation and differentiation and regulate protein synthesis and gene expression as they can interact with portions of DNA and RNA (Igarashi and Kashiwagi, 2010), promoting conformational changes in the structure and function of these molecules (Panagiotidis et al., 1995). The largest fraction of polyamines present in eukaryotic cells and *Escherichia coli* was found in complexed RNA (Igarashi and Kashiwagi, 2010). Polyamines also modulate intracellular signals (Huang et al., 2005) and immune functions, depending on their nature (Zhang et al., 1997; Haskó et al., 2000). In addition, these molecules have been shown to bind and alter DNA and RNA (Pegg, 2016). In infections by pathogenic microorganisms, polyamines regulate virulence gene expression (Jelsbak et al., 2012), modify bacterial resistance to oxidative stress (Ha et al., 1998; Chattopadhyay et al., 2003), interfere with biofilm formation (Patel et al., 2006) and response to antibiotics depending on the characteristics of the bacterial structure and the antimicrobial agent (Kwon and Lu, 2007). In *E. coli*, these molecules may control membrane permeability by blocking purine channels (De la Vega and Delcour, 1996), while synthetic polyamine analogs increase membrane permeability by disruption of LPS integrity (Yasuda et al., 2004). However, the molecular mechanisms involved in these events are mostly unknown. Mygalin is a synthetic molecule originally isolated from hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana* and is characterized as a bis-acylpolyamine N1, N8-bis (2,5-dihydroxybenzoyl) spermidine of 417 Da (Pereira et al., 2007). This molecule also does not promote cytotoxicity of murine splenocytes and interferes with innate immunity (Mafra et al., 2012). Polyamines play an important role in the pathogenesis and control of some infections (Blanchet et al., 2016) and evidence suggests an association between the structure and microbicidal activity of some polyamine analogs (Balakrishna et al., 2006). Our aim was to analyze the mechanisms involved in the microbicidal activity of Mygalin using *E. coli* as a model to explore the potential of this compound for the development of a new alternative antibiotic.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents

Antibiotics (ciprofloxacin, gentamicin, and ampicillin), 2,5-dihydroxybenzoic acid (gentisic acid), spermidine, HBTU, EDTA, DNTB, DAPI, propidium iodide (PI), carboxyfluorescein diacetate assay (CFDA), Triton X-100, LPS from *E. coli* serotype:0111:B4 and agarose were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, United States), and CM-H2DCFDA was purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, United States).

Synthesis of Mygalin

Mygalin was synthesized at the Center for Research on Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS - CEPID), Laboratory for Applied Toxinology (LETA) - Butantan Institute and provided by Dr. Pedro Ismael da Silva Jr. Mygalin was synthesized according to the classical method of peptide chemistry (Atherton, 1989). Briefly, the synthesis was carried out in HBTU solution (Knorr et al., 1989) for the esterification of the carboxyl group of gentisic acid and thus permitting the formation of one carboxamide by formal condensation of two primary amino groups from spermidine with a carboxylic group of two molecules of gentisic acid (2,5-dihydroxybenzoic acid). Data is available on the Ontology of Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI) database as Mygalin (ChEBI:64901) (EBI, 2014).

Bacterial Strain, Culture Condition and Antibacterial Assay

All tests were performed with *E. coli* DH5 α . The bacterial culture was grown at 37°C using 10 mL of Luria-Bertani broth (Kasetty et al., 2011) in a shaker incubator at 180 rpm, and 100 μ L of culture grown overnight was reinoculated in 20 mL of Luria-Bertani broth and allowed to grow to the initial log phase OD₆₂₀ of 0.3 (10⁸ cells/mL). Then, 10⁵ cells/mL were diluted 1:10 in 100 μ L of M9 (minimal medium). The antimicrobial activity of the drugs was determined in 96-well microplates containing serial dilutions of Mygalin. The plates were then incubated in a shaker incubator at 180 rpm at 37°C and were protected from light, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined after 18 h. H₂O₂ was used as the positive control of the reaction. Plates were prepared in triplicate, and light was excluded during the experiments. To assess the intrinsic property of Mygalin, 10⁷ cells/mL were individually treated with two concentrations of Mygalin and H₂O₂ (0.5 and 1 mM), 1 mM spermidine and 2,5-dihydroxybenzoic acid in PBS at 37°C for 18 h (Kumar et al., 2011).

Cell Viability Assay With Resazurin-Assay and CFU Definition

Bacterial viability was determined by two methods: counting the colony forming units (CFU) and the resazurin test (Riss et al., 2004; Sarker et al., 2007). For the resazurin test, plates containing 10⁴ cells/mL were incubated at 37°C and protected from light for 18 h, and 20 μ L of resazurin solution (0.2 mg/mL) was added

thereafter. The reaction was incubated for 2 h, and the color change was monitored (blue, indicating non-viable and purple or pink, indicating viable) and measured at 550 and 595 nm.

Mechanism of Action of Mygalin Against *E. coli*

To study the mechanism of action of Mygalin, we examined the action against DNA, membrane integrity, protein synthesis, ROS generation and ferrous ion-chelating activity.

DNA Oxidative Damage

Bacterial DNA damage was evaluated by two different methods: using pure DNA from *E. coli* DH5 α incubated with the drug (*in vitro* effects) and DNA isolated from drug-treated bacteria (*in vivo* effects). The reaction product was analyzed by alkaline electrophoresis gel (Drouin et al., 1996).

In vitro Assay

For this assay, the DNA was purified using the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit. To assess the effect of pH on the drug activity against purified bacterial DNA, 1 μ g of DNA was incubated for 2 h with Mygalin or spermidine (0.25; 0.5 and 1 mM) in buffers with different pH values (citrate pH 3.6, phosphate, pH 7.2 and bicarbonate-carbonate, pH 10.6). As a positive control of DNA damage, the Fenton reaction was used, where 1 μ L of FeSO₄ (1 mM), 1 μ L of 2% v/v H₂O₂, and 3 μ L of Milli-Q water were mixed in a total reaction volume of 15 μ L (Cheng et al., 2013). In another assay, to rule out the presence of DNases in the samples, Mygalin was treated with DNase inhibitors such as sodium citrate (100 mM) and EDTA (100 mM) (Kolarevic et al., 2014) or subjected to physical damage by heating at 75°C for 15 min and incubate with 1 μ g of DNA. To assess the effect of spermidine on the protection of DNA the reaction was incubated for 2 h with spermidine (0.5 and 1 mM) and Mygalin (0.25; 0.5 and 1 mM). The treated DNA was used as a template to amplify the ICD (Isocitrate dehydrogenase) house-keeping gene using the primers F: 5'-ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA-3' and R 5'-GGACGCAGCAGGATCTGTT-3' (Wirth et al., 2006). After treatment, equal amounts of DNA or PCR products were mixed with alkaline charge buffer, loaded into a 1% agarose gel under alkaline conditions at 70 V, and then stained with gelRed[™] (Biotinun). All DNA images were obtained with an electronic documentation system (UVITEC, Cambridge).

In vivo Assay

Bacteria in the exponential growth phase (10⁶ CFU/mL) were incubated with Mygalin (0.5 and 1 mM), spermidine (1 mM) or H₂O₂ (0.5 and 1 mM) at 37°C for 5 and 18 h. After the incubation, the cultures were centrifuged at 13,000 rpm. The pellet was washed once with PBS, and DNA was isolated with the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit. Equal amounts of DNA sample were mixed with alkaline buffer as described above.

In another assay, to visualize DNA fragmentation, bacterial cultures treated for 18 h with Mygalin or H₂O₂ were permeabilized with ethanol and stained with DAPI. These

samples were fixed on a slide with 1% agarose and visualized by confocal microscopy (Kumar et al., 2011).

Inhibitory Effect of Mygalin on DNA Synthesis as Determined by Filamentation Assay

The inhibitory effect of Mygalin on DNA synthesis was evaluated by the *E. coli* filamentation assay described by Alfred et al. (2013) with a slight modification. Log phase bacteria (10⁸ cells/mL) were cultured at 37°C in M9 medium and treated with Mygalin (0.5 mM) or ciprofloxacin (0.5 mM) for 3 h. A total of 20 μ L of the sample was placed on a glass slide, air-dried and stained with Gram staining. The cells were visualized by light microscopy (1000 \times). All assays were performed in triplicate.

Action on Membrane Integrity and Esterase Activity in *E. coli*

To evaluate the damage caused by Mygalin to the cell membrane, *E. coli* (10⁸ CFU/mL) were cultured with Mygalin (0.5 mM) or ampicillin (0.5 mM) for 5 h and then washed and suspended in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0. Then, the bacteria were incubated with PI at a final concentration of 60 μ M and kept in the dark for 15 min (Nocker et al., 2011). Then, 20 μ L of sample was added to a slide with 1% agarose, the slide was covered with a coverslip, and the membrane integrity was analyzed by confocal microscopy. For the esterase activity assay, untreated bacteria and those treated with the drugs for 4 h were washed once in PBS and suspended in 50 mM phosphate buffer. A total of 180 μ L of bacterial suspension was placed on black COSTAR[®] 96-well microplates with the addition of 20 μ L of CFDA (250 μ M). The samples were incubated for 30 min in the dark, and fluorescence was measured at 485/535 nm excitation/emission wavelengths (Nocker et al., 2011; Hyldgaard et al., 2015).

Determination of Reactive Oxygen Species (ROS)

For this assay, one milliliter of *E. coli* (10⁶ cells/mL) obtained in the exponential growth phase was washed with PBS and resuspended in 1 mL of 50 mM phosphate buffer. The mixtures were treated or not treated with Mygalin (0.25 and 0.5 mM) or H₂O₂ (0.25, 0.5, and 1 mM) for 15 min at room temperature. After that, CM-H2DCFDA (1 μ M) was added. Subsequently, 100 μ L of the bacteria were transferred to black 96-well microplates (Dong et al., 2015), and the fluorescence was measured every 30 min using a PerkinElmer Victor 3[™] 1420 Multilabel Counter Fluorometer with 485/535 nm excitation/emission wavelengths.

Mygalin-LPS Interactions

The LPS from *E. coli* serotype: O111: B4 was prepared in water endotoxin-free, and 50 μ L of LPS solution (10, 20, 40, 80, 160, 320, and 640 ng/mL) was incubated with a fixed concentration of Mygalin (500 μ M) for 1 h at 37°C. The interaction between Mygalin and LPS was determined by monitoring the change in the absorbance of Mygalin, using 2 μ L of each sample in a NanoVue Plus[™] spectrophotometer (GE Healthcare Life

Science) with a Pathlength of 0.5 mm. The plates containing the samples were prepared in triplicate, and light was excluded during the experiments. The blank was endotoxin-free water (Lakshminarayanan et al., 2016).

Glutathione (GSH) Levels and Protein Profile

Escherichia coli (10^9 cells/mL) were treated with Mygalin, ciprofloxacin, and gentamicin for 18 h, then centrifuged at 13,000 rpm for 5 min, thoroughly washed three times with PBS. Next, the cells were resuspended in 250 μ L of lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.5% Triton X-100 and 1 mM PMSF). The cells were sonicated on ice for five cycles of 20 s at 50 W power and allowed to rest for 1 min on the HD 2070 ultrasonic homogenizer. The cell lysate suspension was centrifuged at 4°C and 14,000 rpm for 10 min. The recovered supernatant was used to quantify the protein level using a Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, United States). To measure glutathione (GSH) levels, Ellman's reagent was used (Ellman, 1959); 25 μ g of protein was added into 96-well microplates containing 50 μ L of solution (50 nM GR, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 μ M NADPH, 1 mM EDTA, 1 mM DTNB) (Zou et al., 2017). The plates were read after 15 min of incubation at room temperature at 412 nm. The GSH levels were estimated after determination of the protein levels. Cell lysates were placed in SDS gel loading buffer at 90°C for 10 min and then separated with 10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), as described by Laemmli (1970). Equal amounts of protein were loaded per lane. Protein separation was performed at 4°C for 1.5 h at 100 V in a Hoefer miniVE (Amersham Biosciences). Proteins were visualized by Coomassie Blue Staining.

Ferrous Ion-Chelating Activity

The ferrous ion-chelating activity of Mygalin was investigated according to Baccan et al. (2012) and Vitorino et al. (2015) with ferric nitrotriacetate. Fe(NTA) was prepared by the titration of 70 mM NTA to pH 7.0 with NaOH, followed by the addition of solid FAS (ferric ammonium sulfate) to attain a final iron concentration of 20 mM, and the solution was heated in a water bath for 1 h. Aliquots of 10 μ L of 2 μ M Fe(NTA) in HBS/Chelex were transferred to a flat, transparent 96-well microplate and treated with 10 μ L of Mygalin (0–1000 μ M), followed by 180 μ L of a mixture of 50 μ M DHR and ascorbic acid (40 μ M) in Milli-Q water. The kinetic curve was registered with excitation/emission wavelengths of 485/520 nm at 25°C for 40 min. The slopes ($F \text{ min}^{-1}$, where F stands for arbitrary fluorescence units), calculated from 15–40 min, were then plotted against the chelator concentration. The experiment was conducted in quadruplicate.

Statistical Analysis

All results were analyzed using Student's *t*-test and one-way ANOVA, and the difference between groups was determined by the Tukey–Kramer test or Dunnett's multiple comparisons

analyzed by the GraphPad Prism 7 program (Graph Pad, San Diego, California). The data were considered statistically significant at $p < 0.05$, and the results represent the mean and standard error of the mean (\pm SEM) from at least three independent experiments.

RESULTS

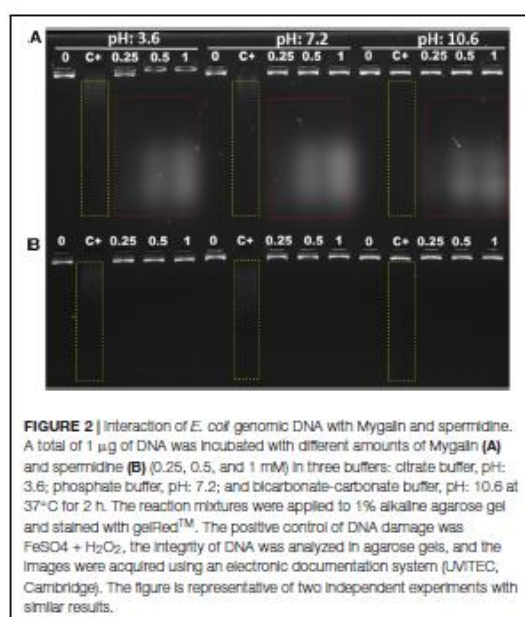
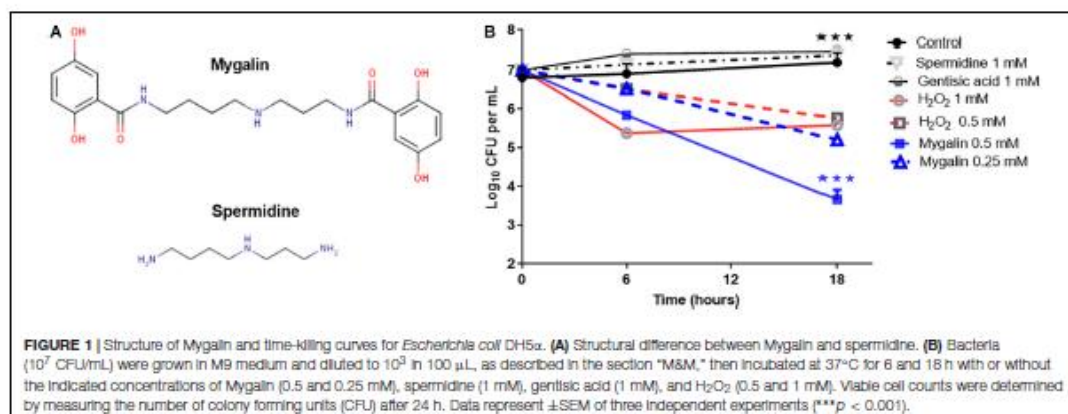
Chemical Structure of Mygalin and Effect of Mygalin on *E. coli* Viability

To explore the microbicidal activity of Mygalin, the *E. coli* DH5 α model was used. **Figure 1A** shows the chemical structure of Mygalin (Pereira et al., 2007) compared with spermidine including the presence of two acyl groups, which can be used to differentiate between these molecules. To evaluate the effect of Mygalin on *E. coli* viability (**Figure 1B**), a fixed number of bacteria were treated for 6 and 18 h, and the number of colonies formed (CFU) was counted on LB agar plates after 6 and 24 h of incubation. Bacterial treatment for 6 h reduced the bacterial viability (CFU) compared to the control containing spermidine and gentisic acid, both used for Mygalin synthesis. The reduction was more apparent over 18 h of treatment with 0.5 mM Mygalin treatment showing greater effects than 1 mM H₂O₂, which was used as a positive control. The specificity of the reaction was confirmed since the treatment with spermidine or gentisic acid had no effect on the viability of the bacteria, with CFU values similar to the control without treatment.

Interaction of Mygalin With DNA

In vitro Model

Polyamines bind to nucleic acids, causing their condensation (Feuerstein et al., 1991). Since Mygalin is an acylpolyamine analog of spermidine, this led us to study DNA as its first target. Initially, we evaluated whether pH influences the action of Mygalin against bacterial DNA. Three buffers with different pH values (3.6, 7, and 10.6) were used to dilute the Mygalin. We confirmed, using alkaline electrophoresis gel, that the effect of Mygalin (0.25–1 mM) includes oxidative DNA damage (**Figure 2A**). This effect occurred in a variable pH range from acidic to alkaline, as highlighted in the figure (red box). The same assay performed with spermidine (**Figure 2B**) did not cause any DNA damage. The Fenton reaction was used as a positive control of DNA damage (yellow box). We observed that this reaction was neutralized, differing from that observed with Mygalin at the alkaline pH (**Figures 2A,B**). Another assay was performed to rule out the presence of external DNase (**Figure 3A**), it was shown that the addition of the DNase inhibitor did not alter the DNA damage caused by Mygalin, unlike the DNA samples treated with DNases alone. This result indicates that the breakdown of DNA was caused by treatment with Mygalin. **Figure 3B**, shows that the addition of spermidine (0.5 and 1 mM) protected DNA samples treated with Mygalin at doses below 0.5 mM. However, this effect was not observed with Mygalin (1 mM) or the Fenton reaction (positive control), confirming that high concentrations of Mygalin causes irreversible damage.



In vivo Model

To further examine the ability of Mygalin to promote DNA damage, we used viable bacteria obtained in the exponential phase of growth to confirm the effect of previous *in vitro* assays. Bacteria were cultured with Mygalin (0.5 and 1 mM) for 5 and 18 h and later washed with PBS, and the pellet was used to extract the genomic DNA. The DNA was analyzed by electrophoresis under alkaline conditions (Figure 4). After 5 h incubation with Mygalin, there was a marked reduction in genomic DNA, which accentuated at 18 h, when DNA was no longer visualized. In bacteria treated with the same concentration of H₂O₂, the effect

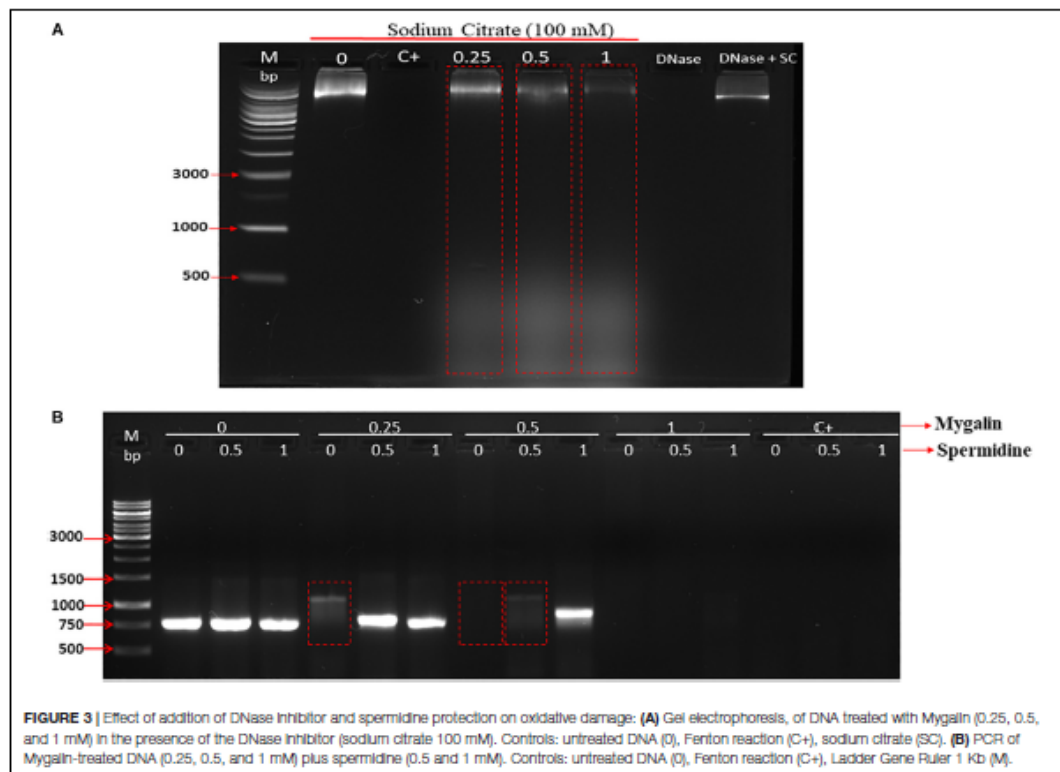
was less pronounced, while spermidine did not cause any DNA damage. This confirms the previous data from *in vitro* assays, showing that the treatment of *E. coli* with Mygalin promotes DNA damage differing from that observed with spermidine.

DNA Labeling After Treatment With Mygalin

DAPI is a fluorescent dye that selectively binds DNA to form a strong fluorescent DNA-DAPI complex with high specificity. When DAPI is intercalated into cellular DNA, it fluoresces and DAPI has been widely used to evaluate DNA structural damage. This approach was used to confirm the bacterial DNA damaging effects of Mygalin. In this assay, bacteria treated with or without Mygalin (0.5 mM) or H₂O₂ as a positive control were permeabilized and stained with DAPI and analyzed by confocal microscopy. Figure 5 shows that untreated bacteria (Figure 5A) were completely stained, demonstrating the integrity of the DNA. However, those treated with either Mygalin (Figure 5B) or H₂O₂ (Figure 5C) did not show extensive staining due to DAPI not being intercalated with the double strand of the damaged DNA. These data reinforce the idea that Mygalin causes oxidative damage in bacterial DNA.

Inhibition of DNA Synthesis *in vivo* by Mygalin Using *E. coli* Filamentation Assay

Another approach used to determine the interference of this compound on *E. coli* DNA was inhibition of DNA synthesis using the filamentation assay (Alfred et al., 2013). To test if Mygalin uses this system, the bacteria were treated for 3 h with 0.5 mM of Mygalin (Figure 6B) or ciprofloxacin (Figure 6C) as a positive control and their morphology and filament formation were compared with those of untreated cells (Figure 6A) by light microscopy (Figure 6). The results showed that treatment with Mygalin or ciprofloxacin interfered with cell division, resulting in long bacterial filaments when compared to untreated cells. These



results indicate that Mygalin and ciprofloxacin can bind to DNA, inhibiting DNA synthesis *in vivo*.

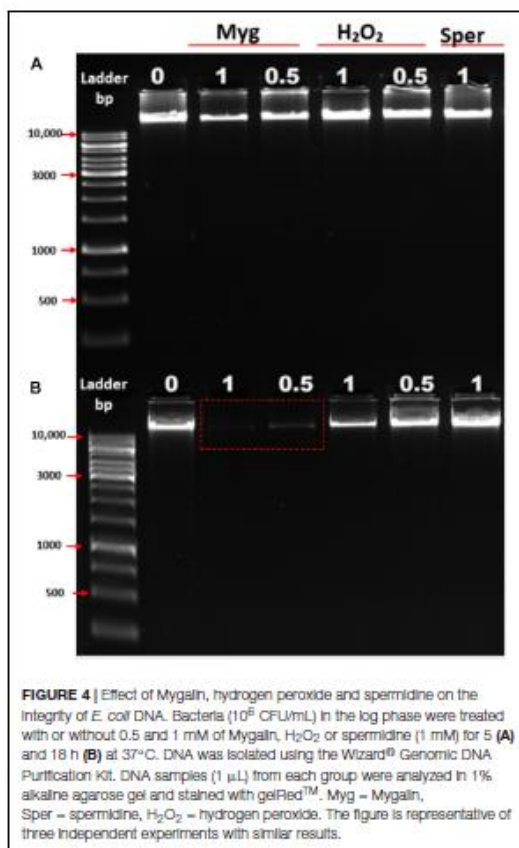
Action of Mygalin on Cell Membrane and Esterase Activity

In addition to DNA damage, antimicrobial drugs can act on several other mechanisms, including disrupting the cell membrane (Epan et al., 2016). To test the effect of Mygalin on the *E. coli* membrane, bacteria were cultured for 5 h in the absence (a) or presence of 0.5 mM of Mygalin (b) or 0.5 mM of ampicillin (c) and a PI uptake assay was used to measure membrane permeability changes under confocal microscopy (Figure 7A). The results indicate that untreated bacteria were impermeable to PI, while *E. coli* treated with Mygalin or ampicillin showed PI uptake, visualized as cells with red staining. This suggests that Mygalin can promote cell membrane rupture in *E. coli*. To monitor this membrane change, the intracellular esterase activity was assayed using the CFDA. If the membrane breaks, fluorochrome diffuses into the cells being cleaved, and a highly fluorescent product is released that corresponds to esterase activity (Hong et al., 2015). The treatment of *E. coli* for 4 h with 0.25 and 0.5 mM of Mygalin increased the dose-dependent esterase level, which was four times higher than that of the

untreated control, while ampicillin (0.25 mM) increased the activity more than ten-fold. These results confirm that Mygalin damages the bacterial cell membrane (Figure 7B).

Effect of Mygalin on the Glutathione Level and Protein Profile in *E. coli*

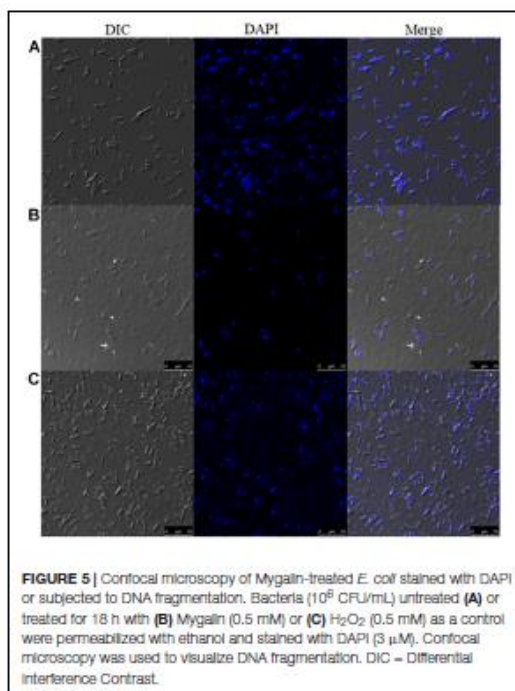
Glutathione has several functions, including a role in the metabolism of peroxides, inactivation of free radicals, and maintenance of oxidation-reduction potential, in addition to participating in reactions involving the synthesis of proteins (Smirnova and Oktyabrsky, 2005). We evaluated whether Mygalin could act on other molecular targets such as proteins; for this, we quantified the levels of GSH in *E. coli* following treatment with Mygalin, ciprofloxacin or gentamicin. Treatment with Mygalin and ciprofloxacin produced similar results, reducing the GSH level by 17%. However, GSH was more markedly reduced with gentamicin, with a reduction of approximately 50% (Figure 8A). Due to the low reduction in GSH levels with Mygalin, the influence of this molecule on protein profile expression was investigated (Figure 8B). There were no significant differences in the protein profile between untreated bacteria (1) or bacteria treated with Mygalin (2) or ciprofloxacin (3). However, with



gentamicin (4), the protein profile and GSH levels were as previously described. These data suggest that the microbicidal effect of Mygalin involves, in addition to the generation of ROS, other mechanisms already common to antibiotics, since GSH reduction is associated with ROS generation (Belenky et al., 2015).

Contribution of Mygalin to ROS Generation

The results of this study showed that Mygalin altered the permeability of the *E. coli* membrane, causing DNA damage. The intrinsic mechanisms used by this molecule to cause *E. coli* death are unknown. One of the common mechanisms of bacterial death caused by antibiotics is the oxidative damage generated by free radicals derived from oxygen, known as ROS (Kohanski et al., 2010). Thus, we investigated whether treatment of *E. coli* with Mygalin induced ROS generation (Figure 9). Bacteria were grown to the exponential phase, and Mygalin (0.25 and 0.5 mM) or H_2O_2 control (0.25–1 mM) was added



to the cultures. ROS production was monitored for 210 min by reading the fluorescence after adding the fluorophore CM-H2DCFDA (Dong et al., 2015). As shown, the addition of Mygalin to *E. coli* cultures progressively increased the level of ROS between 60 and 210 min of incubation, regardless of the concentration used. These levels were higher than those of the H_2O_2 (0.25–1 mM) treatment. These data suggest that one of the possible mechanisms used by Mygalin to promote DNA damage and death of *E. coli* is the generation of intracellular ROS. Similar results were obtained with *E. coli* treated with norfloxacin and ampicillin (Dwyer et al., 2014) using the same fluorophore.

Interaction of Mygalin With LPS

Mygalin exerts microbicidal activity against Gram-negative bacteria only (Pereira et al., 2007), which contain LPS as their main component with major biological activity. It was previously shown that polyamine analogs can neutralize LPS *in vitro* (Miller et al., 2005). Based on this, 0.5 mM Mygalin was incubated with LPS, and the available free Mygalin level was analyzed by spectrophotometry (Figure 10). The incubation of Mygalin with LPS caused a reduction in the absorbance as a function of the increase in the LPS concentration, indicating an interaction between the molecules. Similar results were described with peptides incubated with LPS (Lakshminarayanan et al., 2016; Sinha et al., 2017). Our data suggest that Mygalin may interact

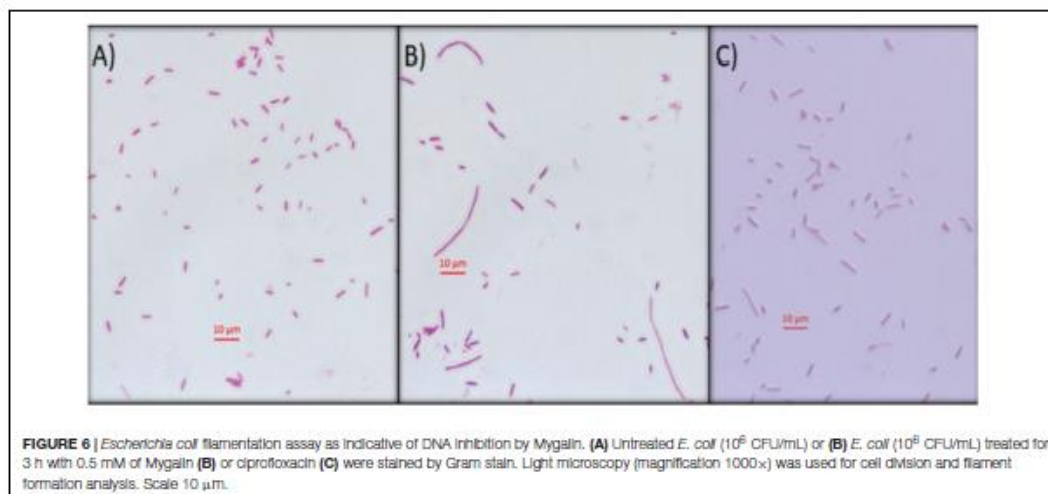


FIGURE 6 | *Escherichia coli* filamentation assay as indicative of DNA inhibition by Mygalin. **(A)** Untreated *E. coli* (10^8 CFU/mL) or **(B)** *E. coli* (10^8 CFU/mL) treated for 3 h with 0.5 mM of Mygalin **(B)** or ciprofloxacin **(C)** were stained by Gram stain. Light microscopy (magnification 1000 \times) was used for cell division and filament formation analysis. Scale 10 μ m.

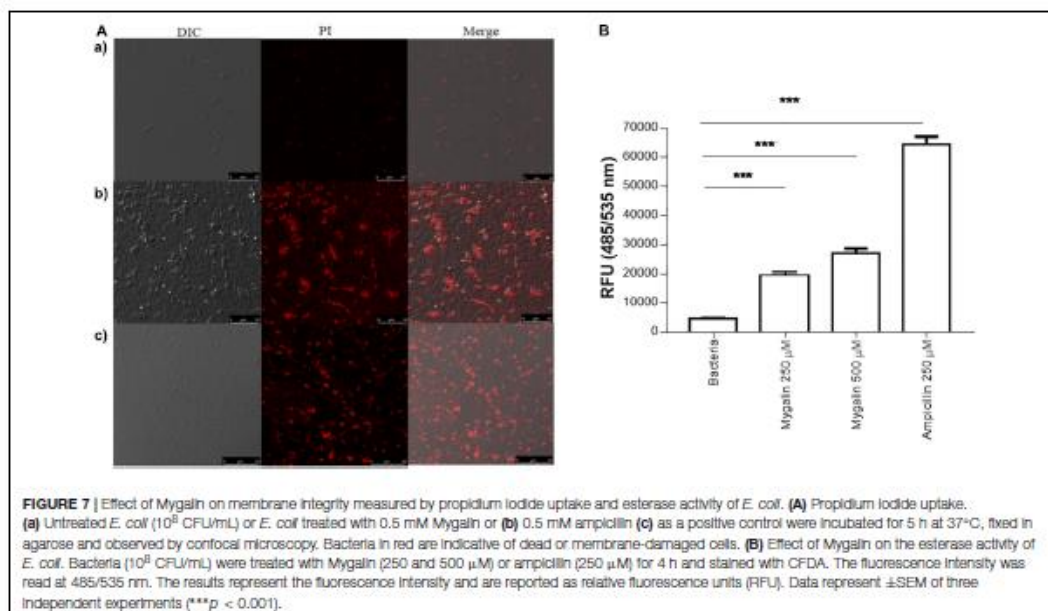


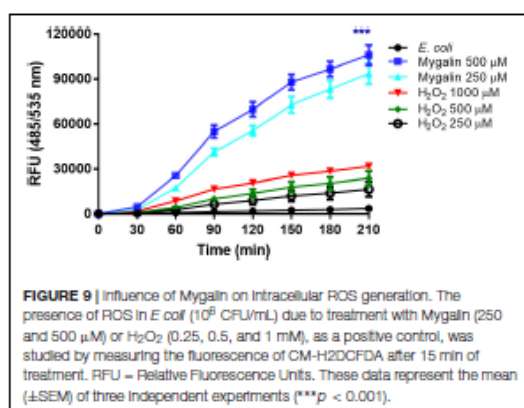
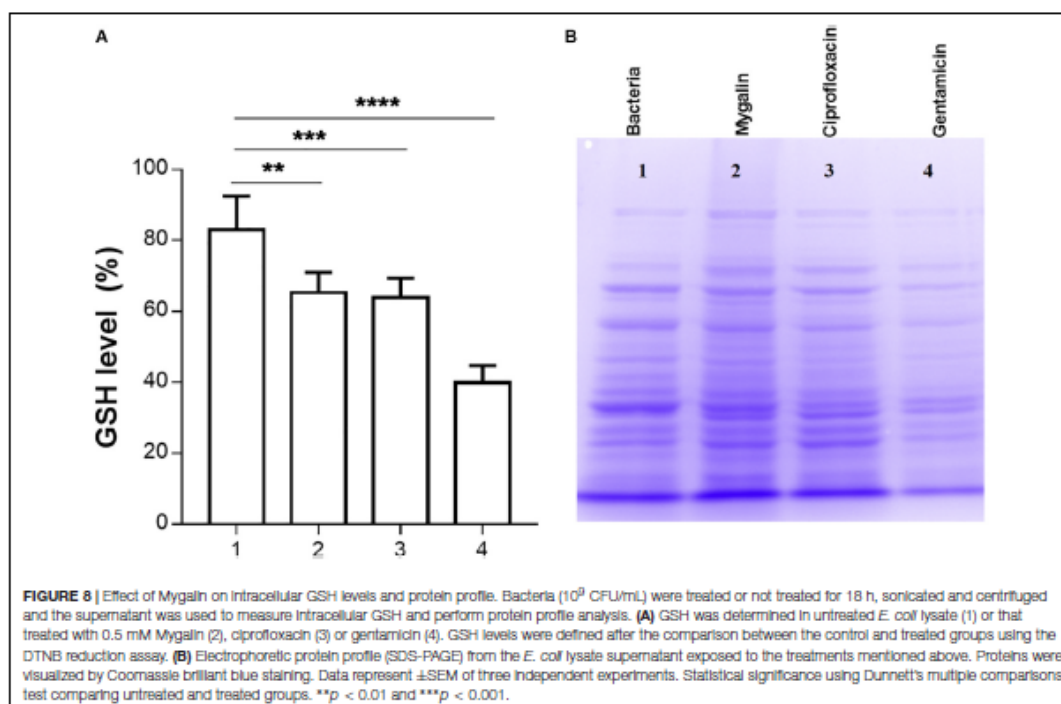
FIGURE 7 | Effect of Mygalin on membrane integrity measured by propidium iodide uptake and esterase activity of *E. coli*. **(A)** Propidium iodide uptake. **(a)** Untreated *E. coli* (10^8 CFU/mL) or *E. coli* treated with 0.5 mM Mygalin or **(b)** 0.5 mM ampicillin **(c)** as a positive control were incubated for 5 h at 37°C, fixed in agarose and observed by confocal microscopy. Bacteria in red are indicative of dead or membrane-damaged cells. **(B)** Effect of Mygalin on the esterase activity of *E. coli*. Bacteria (10^8 CFU/mL) were treated with Mygalin (250 and 500 μ M) or ampicillin (250 μ M) for 4 h and stained with CFDA. The fluorescence intensity was read at 485/535 nm. The results represent the fluorescence intensity and are reported as relative fluorescence units (RFU). Data represent \pm SEM of three independent experiments (***) $p < 0.001$.

with LPS, and this would justify its action only against Gram-negative rather than Gram-positive bacteria.

Analysis of the Iron Chelating Activity of Mygalin

The fact that Mygalin is a ROS generating molecule and has structural similarity with siderophore H4-4-LICAM

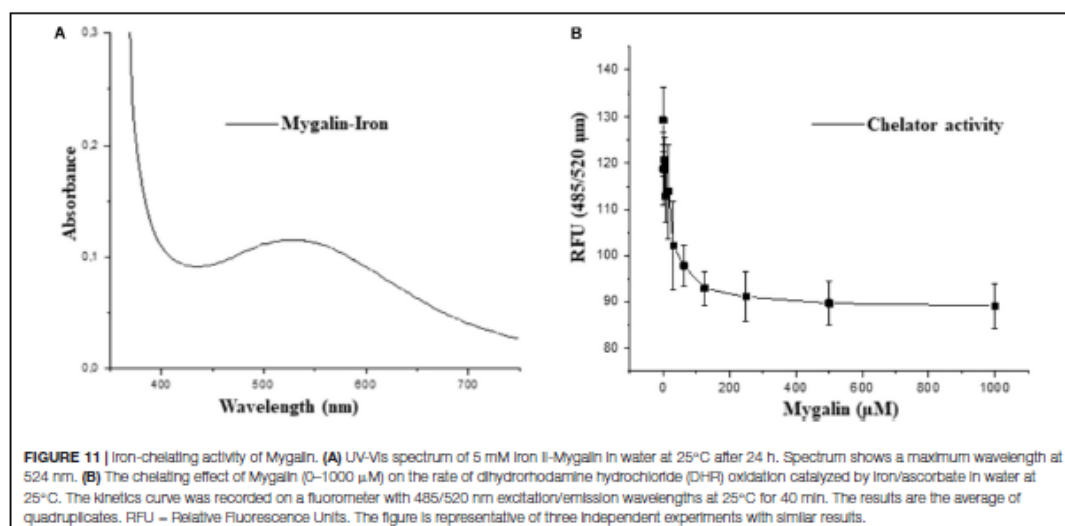
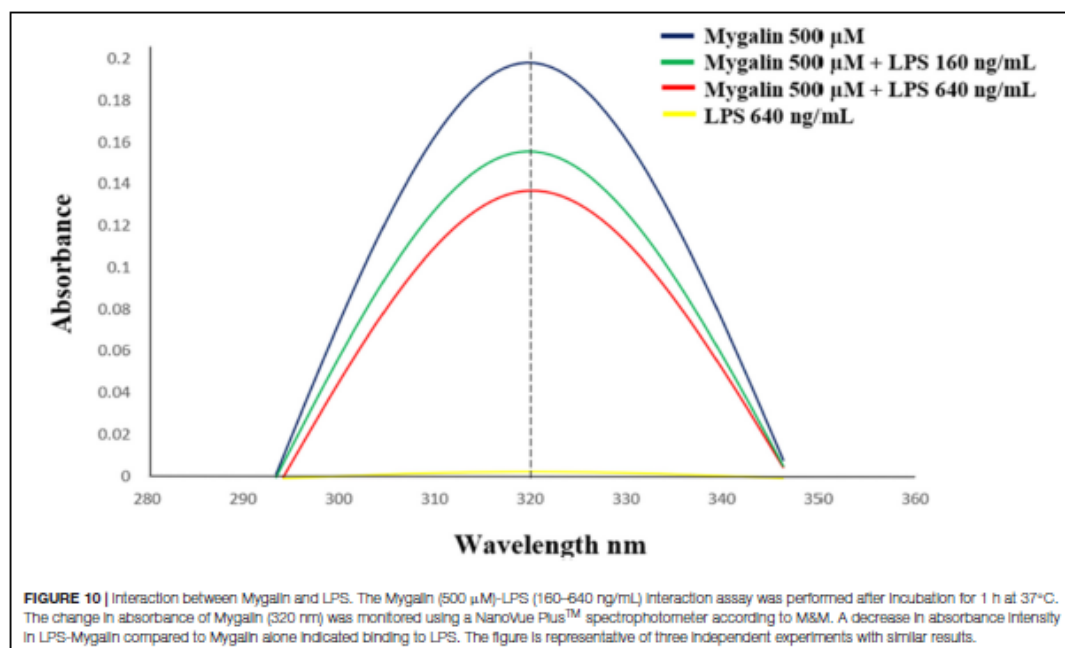
(Raines et al., 2013) suggests that this molecule can function as an iron chelator. Under physiological conditions, labile Fe can generate ROS in the presence of low concentrations of ascorbate. We investigated whether Mygalin could have iron chelating activity because iron is one of the most important metals and is involved in the process of oxidative stress (Halliwell and Gutteridge, 1984). Bacteria were treated with Mygalin (0–1000 μ M) followed by the addition of the DHR



probe. When the chelator binds to the metal, ROS generation is interrupted, decreasing DHR oxidation. We observed that the addition of increasing concentrations of Mygalin (0–1000 μ M) to the system reduced the oxidation of DHR (Figure 11B), which was reflected in the reduction of the spectrum absorption of this molecule due to its association with Fe (Figure 11A).

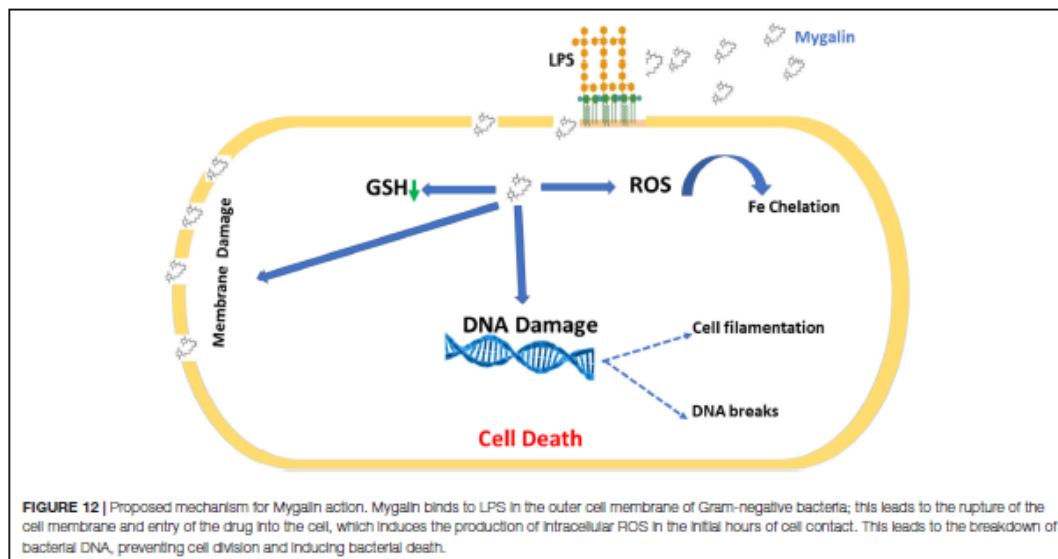
DISCUSSION

Bacterial drug resistance is a concerning public health problem. The World Health Organization (World Health Organization [WHO], 2001) has encouraged research into the search for new drugs and vaccines to increase the effectiveness of treatment and reduce resistance to antibiotics. It is necessary to find new therapeutic strategies by combining products or defining new target molecules with microbicidal activity. Polyamines participate in the control of virulence genes in microorganisms but have been neglected regarding their bactericidal activity. Several polyamine analogs were constructed, showing significant effector activity alone or in combination with other drugs against tumors (Nair et al., 2007) and bacteria resistant to antibiotics (Blanchet et al., 2016). However, the contribution of analogs to the control of infections is limited. We explored the mechanisms involved in the microbicidal activity of Mygalin using the *E. coli* model *in vitro* as a strategy to evaluate the use of antimicrobial agents. Synthetic Mygalin results from the association of spermidine with gentisic acid, having two acyl groups in its structure. Individually, none of these compounds showed bactericidal activity. This suggests that the microbicidal activity could be attributed to the acyl group present in the structure of Mygalin. This effect was dose-dependent and started after 5 h of contact and was stronger than that of 1 mM H_2O_2 . Studies relating the activity and structure of spermine analogs



have shown a strong relationship between acyl chain length and antimicrobial potency, suggesting that these analogs could be used to improve the effectiveness of conventional antibiotics (Balakrishna et al., 2006). One of the mechanisms of action of bactericidal drugs is DNA damage due to their fragmentation or protein interaction activities (Kohanski et al., 2007, 2010). The

vast majority of the effects of polyamines are associated with their interaction with DNA and RNA (Igarashi and Kashiwagi, 2010). The effect of Mygalin on DNA fragmentation was investigated, and our *in vitro* and *in vivo* data showed that the treatment of genomic or purified DNA from a bacterial culture with Mygalin promoted DNA breakdown. This effect was independent of the



pH used in the reactions. In contrast, spermidine did not induce any DNA damage, proving its protective effect (Douki et al., 2000; von Deutsch et al., 2005) and anti-oxidant activity (Tkachenko and Fedotova, 2007; Terui et al., 2018). This shows that both molecules have distinct effects in relation to their action on DNA. The degradation of DNA caused by the treatment of bacteria with Mygalin was independent of DNase since the addition of the enzyme inhibitors did not alter the DNA damage caused by Mygalin. Treatment of *E. coli* with antibiotics promotes oxidative stress and spermidine reduces this effect (Tkachenko et al., 2012), therefore it was analyzed whether this effect could occur when DNA was treated with Mygalin. Our data showed that the addition of spermidine protected DNA samples treated with Mygalin at doses below 0.5 mM. However, this effect did not occur with Mygalin (1 mM) or in the Fenton reaction (positive control), confirming that high concentrations of Mygalin cause irreversible DNA damage. Antimicrobial drugs, as well as antibiotics, have several mechanisms of action (Epanand et al., 2016). Factors that influence bacterial viability, such as alteration of cell permeability, release of intracellular components, inactivation of metabolic pathways, inhibition of bacterial growth by chelation of nutrients and metals (Kohanski et al., 2010), were explored to identify the action of Mygalin against *E. coli*. We observed by confocal microscopy that bacteria treated with Mygalin or H₂O₂ incorporated DAPI dye, showing that this acylpolyamine can induce DNA damage. In another analysis, the ability of Mygalin to disrupt the cellular membranes of *E. coli* was evidenced since the treated bacteria incorporated PI, similar to that visualized with ampicillin. DNA damage has been described in the treatment of bacteria with antibiotics (Kohanski et al., 2010), toxic metals (Espirito Santo et al., 2011) and antimicrobial peptides (Farkas et al., 2017; Diaz-Roa et al., 2019),

which led to bacterial death. Inhibition of DNA synthesis was confirmed by light microscopy (Alfred et al., 2013) during the treatment of *E. coli* with Mygalin and ciprofloxacin, a high bacterial stress-inducing antibiotic (Goswami et al., 2006). This treatment interfered with the cell division cycle of the bacteria and induced the formation of filamentous bacteria. Before *E. coli* divides, several proteins are organized for "Z-ring" assembly, including the PtsZ protein (filament-forming protein), which is essential for cell division and viability of *E. coli* (Addinall et al., 1996). Studies suggest that PtsZ assembly inhibition can be used for the development of drugs against pathogenic bacteria (Wang et al., 2003), as proposed by Rai et al. (2008), who used curcumin to inhibit *Bacillus subtilis* cell division by disrupting the "Z-ring." Future investigations will be conducted to analyze whether Mygalin also utilizes this mechanism. The esterase enzyme is involved in both ester hydrolysis and lipid peroxidation. An increased esterase level is an indication of drug-induced cell membrane and DNA damage. Treatment of *E. coli* with Mygalin increased fluorescence emission in a dose-dependent manner similar to ampicillin. Therefore, Mygalin can break up the *E. coli* outer membrane, facilitating DNA damage. GSH is essential for redox system regulation and protection against oxidative stress in all cells. The presence of antioxidant mechanisms is necessary to limit the intracellular levels of these compounds. GSH reductase is one of the systems that controls free radical formation and oxidative damage to protect cells against environmental stress (Smirnova and Oktyabrsky, 2005). We observed a slight reduction in GSH reductase levels during the treatment of *E. coli* with Mygalin, without altering the protein profile. This differed from the results of gentamicin treatment, in which there was intense reduction of enzyme and protein profile change in relation to those of the control. Therefore, in addition

to Mygalin breaking down the cell membrane and promoting DNA damage, this drug also alters the synthesis of enzymes that participate in the control of oxidative stress in *E. coli*. High levels of free radicals in the intracellular environment can contribute to all of these forms of damage. The presence of intracellular ROS in cells due to treatment with Mygalin was confirmed. There was an intense increase in the level of ROS, which was greater than that observed with 1 μ M H₂O₂ and proportional to incubation time. Our results indicated that Mygalin promotes DNA damage and the death of *E. coli* through the generation of high intracellular ROS levels, which may contribute to the damage found in previous tests. These considerations support the involvement of ROS in Mygalin-induced *E. coli* death as with certain antibiotics (Dwyer et al., 2014). Previous tests conducted in our laboratory showed that the addition of catalase, thiourea or spermidine to Mygalin-treated *E. coli* cultures recovered bacterial viability by 80% (manuscript in preparation), confirming the importance of the ROS mechanism in *E. coli* death. Experiments with other strains and species of bacteria are being performed in our laboratory to confirm that Mygalin treatment and ROS generation is a common mechanism for killing other bacteria. It was suggested that the microbicidal effect of Mygalin extends to Gram-negative bacteria only (Pereira et al., 2007). LPS is the predominant structural component of the outer membrane of Gram-negative bacteria and is responsible for the death of patients with septic shock in addition to causing intense inflammatory activity (Raetz and Whitfield, 2002). The possible interaction of Mygalin with LPS showed that there was an interaction between these two molecules, partially explaining its action against Gram-negative bacteria. Other drugs, such as curcumin and antimicrobial peptides, have the same ability to interact with LPS, reducing their activity (Lakshminarayanan et al., 2016; Sinha et al., 2017). The presence of chelating metals can interfere with *E. coli* metabolism, leading to its death. The ability of Mygalin to sequester important nutrients for bacterial metabolism was analyzed, and we found a dose-dependent reduction in oxidation of the DRH probe. This means that Mygalin can sequester iron and alter *E. coli* metabolism. The chemical structure of Mygalin resembles that of siderophores. These compounds have the function of solubilizing and capturing iron II for use in bacterial metabolism. A new polyamine, Vulnibactin, which contains siderophore activity, was isolated from *Vibrio vulnificus* by Okujo et al. (1994). This polyamine has two acyl groups similar to Mygalin. This evidence indicates that an increase in intracellular ROS in *E. coli* and reduced iron bioavailability may contribute to Mygalin-induced *E. coli* death. In conclusion, we describe some effector mechanisms of Mygalin, an acylpolyamine, as a new molecule with a microbicidal effect against *E. coli* DH5 α . The mechanism of action involves

bacterial membrane permeability changes, DNA damage, and ROS generation. In addition, Mygalin chelates iron and binds to LPS. Our data showed that the increase in intracellular ROS associated with iron sequestration and DNA damage in response to Mygalin treatment may be responsible for the death of *E. coli*. Taken together, our data suggest that Mygalin must be explored as a new alternative drug with antimicrobial potential against Gram-negative bacteria and other infectious agents. Based on our results, we propose a mechanism of action of Mygalin, as shown in Figure 12. Studies are underway to confirm these effects and the consequences of this oxidative stress on other bacterial groups and biofilm formation. The most interesting point of this study is that this molecule does not promote cytotoxicity in eukaryotic cells and may interfere with the innate immune response, another aspect that is being explored.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AE-C, PS, and MB carried out the study design, conducted the study, and wrote the manuscript. EM and HV helped with the experiments.

FUNDING

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) Grants No. 2013/11212-9 and 2014/04307-6, FAPESP/CeTICS – Grant No. 2013/07467-1, the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) – Grant No. 472744/2012-7 and the Ph.D. Scholarship by CONCYTEC-FONDECYT Institution of Peruvian State (N092-2016), and the Butantan Foundation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful for the collaboration of Dr. Breno Esposito (Institute of Chemistry of USP), Dr. Maristela Camargo (Institute of Biomedical Sciences/USP) for the suggestions, and Dr. Alexandre Seixas de Souza (Laboratory of Cellular Biology, Butantan Institute) for support with photos taken with the confocal microscope LSM: Confocal TCS SP8, Leica, Germany.

REFERENCES

- Addinall, S. G., Bi, E., and Lutkenhaus, J. (1996). PtsZ ring formation in *fts* mutants. *J. Bacteriol.* 178, 3877–3884. doi: 10.1128/jb.178.13.3877-3884.1996
- Alfred, R. L., Palombo, E. A., Panozzo, J. F., and Bhawe, M. (2013). The antimicrobial domains of wheat puroindolines are cell-penetrating peptides with possible intracellular mechanisms of action. *PLoS One* 8:e75488. doi: 10.1371/journal.pone.0075488
- Atherton, E. (1989). *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press.
- Baccan, M. M., Chiarelli-Neto, O., Pereira, R. M. S., and Espósito, B. P. (2012). Quercetin as a shuttle for labile iron. *J. Inorg. Biochem.* 107, 34–39. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.11.014



- Nair, S. K., Verma, A., Thomas, T. J., Chou, T. C., Gallo, M. A., Shirahata, A., et al. (2007). Synergistic apoptosis of MCF-7 breast cancer cells by 2-methoxyestradiol and bis(ethyl)nonpermine. *Cancer Lett.* 250, 311–322. doi: 10.1016/j.canlet.2006.10.027
- Nocker, A., Caspers, M., Esveld-Amanatidou, A., Van Der Vossen, J., Schuren, F., Montijn, R., et al. (2011). Multiparameter viability assay for stress profiling applied to the food pathogen *Listeria monocytogenes* F2365. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6433–6440. doi: 10.1128/AEM.00142-11
- Okujo, N., Saito, M., Yamamoto, S., Yoshida, T., Miyoshi, S., and Shinoda, S. (1994). Structure of vulnibactin, a new polyamine-containing siderophore from *Vibrio vulnificus*. *Biomolecules* 7, 109–116. doi: 10.1007/BF00140480
- O'Neil, J. (2014). *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations*. London: Review on Antimicrobial Resistance.
- Panagiotidis, C. A., Artandi, S., Calame, K., and Silverstein, S. J. (1995). Polyamines alter sequence-specific DNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 23, 1800–1809. doi: 10.1093/nar/23.10.1800
- Patel, C. N., Wortham, B. W., Lines, J. L., Fetherston, J. D., Perry, R. D., and Oliveira, M. A. (2006). Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *J. Bacteriol.* 188, 2355–2363. doi: 10.1128/JB.188.7.2355-2363.2006
- Pegg, A. E. (2016). Functions of polyamines in mammals. *J. Biol. Chem.* 291, 14904–14912. doi: 10.1074/jbc.R116.731661
- Pereira, L. S., Silva, P. I., Miranda, M. T. M., Almeida, I. C., Naoki, H., Konno, K., et al. (2007). Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 953–959. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.128
- Raetz, C. R. H., and Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635–700. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414
- Rai, D., Singh, J. K., Roy, N., and Panda, D. (2008). Curcumin inhibits PtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem. J.* 410, 147–155. doi: 10.1042/BJ20070891
- Raines, D. J., Moroz, O. V., Wilson, K. S., and Duhme-Klair, A.-K. (2013). Interactions of a periplasmic binding protein with a tetradentate siderophore mimic. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 4595–4598. doi: 10.1002/anie.201300751
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., et al. (2004). "Cell viability assays," in *Assay Guidance Manual*, eds G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, K. Brimacombe, A. Grossman, M. Arkin, D. Auld, et al. (Rockville: Bethesda).
- Sarker, S. D., Nahar, L., and Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42, 321–324. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.01.006
- Sinha, S., Zheng, L., Mu, Y., Ng, W. J., and Bhattacharjya, S. (2017). Structure and interactions of a host defense antimicrobial peptide thanatin in lipopolysaccharide micelles reveal mechanism of bacterial cell agglutination. *Sci. Rep.* 7:17795. doi: 10.1038/s41598-017-18102-6
- Smirnova, G. V., and Oktyabrsky, O. N. (2005). Glutathione in bacteria. *Biochemistry* 70, 1199–1211. doi: 10.1007/s10541-005-0248-3
- Terui, Y., Yoshida, T., Sakamoto, A., Saito, D., Oshima, T., Kawazoe, M., et al. (2018). Polyamines protect nucleic acids against depurination. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 99, 147–153. doi: 10.1016/j.biocel.2018.04.008
- Tkachenko, A. G., Akhova, A. V., Shumkov, M. S., and Nesterova, L. Y. (2012). Polyamines reduce oxidative stress in *Escherichia coli* cells exposed to bactericidal antibiotics. *Res. Microbiol.* 163, 83–91. doi: 10.1016/j.resmic.2011.10.009
- Tkachenko, A. G., and Fedotova, M. V. (2007). Dependence of protective functions of *Escherichia coli* polyamines on strength of stress caused by superoxide radicals. *Biochemistry* 72, 109–116. doi: 10.1134/S0006297907010130
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 40, 277–283.
- Vitorino, H. A., Mantovanelli, L., Zanotto, F. P., and Esposito, B. P. (2015). Iron metalodrugs: stability, redox activity and toxicity against *Artemia salina*. *PLoS One* 10:e0121997. doi: 10.1371/journal.pone.0121997
- von Deutsch, A. W., Mitchell, C. D., Williams, C. E., Dutt, K., Silvestrov, N. A., Klement, B. J., et al. (2005). Polyamines protect against radiation-induced oxidative stress. *Gravit. Space Biol. Bull.* 18, 109–110.
- Wang, J., Galgoci, A., Kodali, S., Herath, K. B., Jayasuriya, H., Dorso, K., et al. (2003). Discovery of a small molecule that inhibits cell division by blocking PtsZ, a novel therapeutic target of antibiotics. *J. Biol. Chem.* 278, 44424–44428. doi: 10.1074/jbc.M307625200
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., et al. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* 60, 1136–1151. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x
- World Health Organization [WHO], (2001). *WHO Global Strategy For Containment of Antimicrobial Resistance*. Geneva: WHO.
- Yasuda, K., Ohmizo, C., and Katsu, T. (2004). Mode of action of novel polyamines increasing the permeability of bacterial outer membrane. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 67–71. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.01.006
- Zhang, M., Caragine, T., Wang, H., Cohen, P. S., Botchkina, G., Soda, K., et al. (1997). Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J. Exp. Med.* 185, 1759–1768. doi: 10.1084/jem.185.10.1759
- Zou, L., Lu, J., Wang, J., Ren, X., Zhang, L., Gao, Y., et al. (2017). Synergistic antibacterial effect of silver and selenium against multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *EMBO Mol. Med.* 9, 1165–1178. doi: 10.15252/emmm.201707661

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Espinoza-Culupú, Mendes, Vitorino, da Silva and Borges. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article

Acylpolyamine Mygalin as a TLR4 Antagonist Based on Molecular Docking and In Vitro Analyses

Abraham Espinoza-Culupú ^{1,2} , Ricardo Vázquez-Ramírez ³, Mariella Farfán-López ⁴, Elizabeth Mendes ², Maria Notomi Sato ⁵ , Pedro Ismael da Silva Junior ^{1,6} and Monamaris Marques Borges ^{1,2,*}

- ¹ Interunits Graduate Program in Biotechnology, USP/IBU/IPT, São Paulo 01000-000, Brazil; abraham.culupu@usp.br (A.E.-C.); pedro.junior@butantan.gov.br (P.I.d.S.J.)
² Bacteriology Laboratory, Butantan Institute, São Paulo 01000-000, Brazil; abraham.culupu@butantan.gov.br
³ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 00-16, Mexico; ricardo1v@yahoo.com
⁴ Microbiology Molecular and Biotechnology Laboratory, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima District 15081, Peru; mariella.farfan@unmsm.edu.pe
⁵ Laboratory of Dermatology and Immunodeficiencies, Medical School, University of São Paulo, São Paulo 01000-000, Brazil; marisato@usp.br
⁶ Laboratory for Applied Toxinology (LETA), Butantan Institute, São Paulo 01000-000, Brazil
 * Correspondence: monamaris.borges@butantan.gov.br

Received: 22 September 2020; Accepted: 25 November 2020; Published: 1 December 2020



Abstract: Toll-like receptors (TLRs) are transmembrane proteins that are key regulators of innate and adaptive immune responses, particularly TLR4, and they have been identified as potential drug targets for the treatment of disease. Several low-molecular-weight compounds are being considered as new drug targets for various applications, including as immune modulators. Mygalin, a 417 Da synthetic bis-acylpolyamine, is an analog of spermidine that has microbicidal activity. In this study, we investigated the effect of mygalin on the innate immune response based on a virtual screening (VS) and molecular docking analysis. Bone marrow-derived macrophages and the cell lines J774A.1 and RAW 264.7 stimulated with lipopolysaccharide (LPS) were used to confirm the data obtained *in silico*. Virtual screening and molecular docking suggested that mygalin binds to TLR4 via the protein myeloid differentiation factor 2 (MD-2) and LPS. Macrophages stimulated by mygalin plus LPS showed suppressed gene expression of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukine 6 (IL-6), cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), as well as inhibition of signaling protein p65 of the nuclear factor κ B (NF- κ B), resulting in decreased production of nitric oxide (NO) and TNF- α . These results indicate that mygalin has anti-inflammatory potential, being an attractive option to be explored. In addition, we reinforce the importance of virtual screening analysis to assist in the discovery of new drugs.

Keywords: mygalin; TLR4; inflammation; drug discovery; virtual screening; molecular docking

1. Introduction

The main receptors involved in innate immunity to infections are the Toll-like receptors (TLRs), which are expressed on the cell surface (TLR 1, 2, 4, 5, 6, and 10) or on endosomes (TLR 3, 7, 8, and 9) [1]. TLRs are transmembrane proteins that constitute the first line of defense, and they recognize molecular patterns associated with pathogens (PAMPs) that are expressed by infectious agents such as zymosan, peptidoglycan, lipopolysaccharide (LPS), flagellin, and CpG DNA, and mediate the development of an efficient innate immune response system and inflammatory response [2].

These proteins are key molecules in the inflammatory process, and they can be suppressed with specific drugs, antibodies, or inhibitors to treat diseases, such as cancer, sepsis, and asthma; therefore, TLRs are considered a promising future therapeutic strategy for various infectious inflammatory and autoimmune diseases [3,4]. The intracellular activation of TLR4 by LPS requires the cooperation of the adapter molecule MD-2 and cluster of differentiation 14 (CD14) to mediate intracellular transduction signals and initiate a cascade of signal activation coordinated by two distinct transcription factors, the nuclear factor kappa B (NF- κ B), responsible for inducing the transcription of the proinflammatory cytokine gene (TNF- α , IL-1, IL-6) and the interferon regulatory factor-3 (IRF3), through the production of type I interferon (IFN- α/β). However, other transcription factors, such as cyclic AMP-responsive element-binding protein (CREB) and activator protein 1 (AP1), are also important [5]. It was demonstrated that TLR4-MD-2 dimers are the basic signaling units for the LPS receptor and that the binding of LPS to the MD-2 molecule results in the formation of a complex, necessary for LPS activity and essential for TLR4 activation. The recognition of LPS by the TLR4 receptor system is accompanied by a series of sequential steps in which the LPS is linked by different LPS-binding proteins and transferred to MD-2/TLR4, then dimerization occurs in the cell membrane, initiating the signaling cascade that leads to the production of pro-inflammatory cytokines and interferons [6].

Proinflammatory mediators, regulated by NF- κ B, (COX-2), prostaglandins, and iNOS, are essential to the evaluation of inflammation levels [3]. LPS activates macrophages by binding TLR4, and this activation triggers inflammatory processes through the activation of NF- κ B and the synthesis of proinflammatory cytokines [7].

A variety of proinflammatory genes are induced by NF- κ B; thus, inhibiting NF- κ B activation contributes to the regulation of inflammatory processes and the control of infection. TLR4 is involved in various pathological conditions; therefore, it is considered a potential therapeutic target for the development of drugs [4]. Bacterial infections can cause sepsis by inducing an intense systemic inflammatory process [8]. Thus, molecules that can block the interaction between LPS and TLR4 and its signaling cascade and thereby interfere with the inflammatory process must be identified. Several investigations of molecules with LPS antagonist activity, such as curcumin, sulforaphane, xanthohumol, and celastrol [9], and anti-inflammatory potential, such as mygalin, are underway.

Inhibition of TLRs can occur in two ways: By blocking ligand binding to the receptor and by interfering with intracellular signaling pathways to prevent signal transduction [3]. In this context various drugs with pharmacological potential have been developed, such as: The small molecules TAK-242 [10] and ERITORAN [11], which inhibit TLR4; CQ and CHQ [12,13], which inhibit TLR 7, 8, and 9.

Natural polyamines (putrescine, spermidine, and spermine) are a group of endogenous cationic compounds synthesized by all living cells [14], and depending on the nature of the polyamine, they present several functions, such as anti-inflammatory and immune-suppressive activity [15]. The most studied polyamine is spermine due to its antiproliferative and anti-inflammatory actions on lymphocytes and macrophages [15]. Studies have shown that polyamines are necessary for the expression of TLR2 and that polyamine-induced TLR2 activation plays an important role in regulating epithelial barrier function [16]. Polyamine analogs have been very well studied as anticancer molecules [17,18], although many of their mechanisms of action are unknown. Our molecule named "Mygalin" is a bis-acylpolyamine spermidine analog isolated from the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. This molecule has microbicidal effects [19,20], and its invertebrate origin may be responsible for the differentiated characteristics of this molecule.

The integration between biological systems and computational techniques makes it possible to explore drug development and can rapidly provide structural, chemical, and biological data and improve our understanding of potential drug targets. The interactive association between various methods, such as virtual screening and molecular docking, with various immune components has been employed by researchers for the development of pharmacologically active drugs.

In the current study, we investigated the effects of mygalin on TLR4 in LPS-stimulated murine macrophages by *in silico* analyses of molecular docking and the *in vitro* production of immune mediators. Our data prove that mygalin can be a promising molecule that efficiently block the LPS/TLR4 signaling at different points.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

LPS from *E. coli* serotype 0111:B4 as well as, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), fluoresceine-5-isothiocyanate (FITC), dimethyl sulfoxide (DMSO), α -naphthylethylenediamine (NED), and agarose were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co (St. Louis, MO, USA). RPMI 1640, bovine serum albumin (BSA), antibiotic and primers were purchased from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). The ELISA kit and antibodies were purchased from eBioscience, (San Diego, CA, USA). Mygalin was synthesized and purified at the Center for Research on Toxins, Immune-Response and Cell Signaling (CeTICS), Laboratory for Applied Toxinology (LETA) Butantan Institute following the methodology described by Espinoza-Culupú [19].

2.2. Similarity-Based Virtual Screening (VS) of Mygalin

The representation of the mygalin structure in SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry) format is as follows: C1=CC(=C(C=C1O)C(=O)NCCCCNCCCNC(=O)C2=C(C=CC(=C2)O)O)O. This structure was used to evaluate the similarity of mygalin with previously reported drugs using the Swiss Similarity [21] web platform against 10,639,400 compounds from the ZINC drug-like database and 19,500 ligands from the Protein Data Bank (PDB) (available 23/02/2020), of PubChem [22] with a Tanimoto threshold $\geq 95\%$ and the ChEMBL database [23] with a Tanimoto threshold ≥ 75 .

2.3. Ligand Prediction Against Immune Receptors

Mygalin in SMILES format was used to predict its binding to selected immune cell receptors. Mygalin was evaluated by ImmLig_DB [24], a repertoire of small molecules that bind to immune system receptors such as TLR 1, 2, 4, and 6, the cytokines IL-1 β , IL-4, and IL-6, and major histocompatibility complexes 1 and 2 (MHC-I and MHC-II).

2.4. Ligand and TLR4/MD-2 Structures

The molecular structures of mygalin (N-[3-((4-((2,5-dihydroxybenzoyl) amino) butyl)amino) propyl]-2,5-dihydroxybenzamide), curcumin (1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) hepta-1,6-diene-3,5-dione) and TAK-242 (ethyl (6R)-6-[(2-chloro-4-fluorophenyl) sulfamoyl] cyclohexene-1-carboxylate) were retrieved from the ZINC database [25]. Curcumin and TAK-242 were used as control molecules for the docking study. Initially, the energy profile and geometry optimization calculations were carried out to obtain the lowest energy conformations of three ligands with density functional theory (DFT) using the ω B97X-D function and the 6-31G* basis set level. Selected electronic and physicochemical properties were calculated, including the total energy, solvation energy, dipole moment, electrostatic potential (EP), and molecular volume. All *ab initio* calculations were performed with Spartan'14 software. The crystal structure of TLR4 and its coreceptor MD-2 was retrieved from the PDB [26] using PDB ID 3VQ1 [27]. TLR4/MD-2 is in a heterotetrameric complex with its LPS (lipid IVa) ligand in two binding pockets. No structural water molecules were found; therefore, all of water molecules, LPS, and other ligands were removed using Discovery Studio Visualizer (DSV) software [28]. The tetrameric receptor was divided into two dimers, namely, TLR4-A/MD-2-C and TLR4-B/MD-2-D, and each complex was used as a rigid structure for independent docking calculations. In addition, the structures of the TLR4/MD-2 complexes were compared based on they superpositions by measuring the root mean square deviation (RMSD) of the protein backbone using SuperPose version 1 (<http://superpose.wishartlab.com>).

2.5. Docking Calculations

The molecular structures of mygalin, curcumin, TAK-242, and TLR4/MD-2 were converted to PDBQT format for docking calculations using AutoDock Tools [29]. All rotatable bonds in each ligand remained free, while the receptor was kept rigid and hydrogen atoms and Gasteiger charges were assigned. In the docking setup, grid dimensions of $36 \times 32 \times 38$ and $36 \times 38 \times 42$ had following coordinates of: $x = -6.893$, $y = 35.973$, $z = 18.773$ and $x = 11.774$, $y = -21.942$, $z = -2.127$, respectively, which centered on MD-2-C and MD-2-D respectively. The spacing box was 1.0 \AA , and the exhaustiveness was set to 500. Finally, molecular docking was performed using AutoDock Vina 1.1.2 [30].

2.6. Interaction Analysis of the TLR4/MD-2-Ligand Complex

The free energy of the ligand-receptor complexes (TLR4-A/MD-2-C and TLR4-B/MD-2-D) was calculated using the coordinates of the docking calculations.

In the TLR4/MD-2 complexes, the amino acids and molecular interactions that stabilize the TLR4/MD-2-ligand complexes were identified with DSV software. Only the first core of residues belonging to the TLR4/MD-2 binding pocket was included, and the cut off distance between the ligands and the receptor was set at 4 \AA for hydrophobic interactions and 3.4 \AA for hydrogen bonds.

The interaction energy of the TLR4/MD-2-ligand complex was calculated. The total free energies of interaction included the ligand molecule and all adjacent binding pocket residues. A simplified procedure to calculate the interaction energy (IE) was provided by the following formula: $IE = [RL] - [R + L]$, where IE is the interaction energy of binding, RL is the energy of the complex formed by the receptor residues and the ligand, R is the energy of the TLR4/MD-2 residues, and L is the energy of the ligand. The binding interaction energies were determined by single point calculations using DFT with the ω B97X-D function and the 6-31G* basis set level (for an extensive description of all ab initio methods used in this work, see [31]). Finally, the volume of the binding pocket cavities of each TLR4/MD-2 tetramer was calculated using the Swiss-PDB Viewer program [32]. Docking and ab initio calculations were performed on a 12-core computer with a Xeon processor at 3.4 GHz.

2.7. In Vitro Analysis

C57BL/6 mice were euthanized in a CO_2 chamber, and then the bone marrow from the tibia and femur was extracted to obtain cells that were differentiated into bone marrow-derived macrophages (BMDMs) according to Weischenfeldt [33]. The animals were obtained from the animal center of the School of Medicine of USP and the Butantan Institute. All procedures were performed in accordance with the approval of the Animal Ethics Committee of the Butantan Institute under CEUA protocol no. 1352/14 and CEUA protocol no 5609301018.

2.8. Cell Culture and Cytotoxicity Assay

BMDMs, J774A.1 and RAW 264.7 cells were cultivated in RPMI medium supplemented with 10% FBS and gentamicin ($25 \mu\text{g/mL}$) at 37°C with 5% CO_2 . Macrophages were maintained in cultures with 5% CO_2 at 37°C . For the tests, they were plated at a concentration of 1.5×10^6 cells/ 0.5 mL/well in 24-well plates (Costar, Cambridge, MA, USA). After incubation for 24 h, they were washed with PBS and used for the RT-PCR assay or for the quantification of immune mediators. RAW cells (1×10^5) treated with mygalin (0 – $2000 \mu\text{M}$) for 24 h were tested for cellular viability using the MTT assay (0.5 mg/mL). After 3 h of treatment with MTT, $100 \mu\text{L}$ of DMSO was added with thorough mixing for 10 min to dissolve the purple formazan crystals [34]. Then, the optical density was measured at 595 nm .

2.9. Effect of Mygalin on LPS-Stimulated Cells

Macrophage cell lines or BMDMs were plated at a concentration of 1.5×10^6 cells/ 0.5 mL/well in 24-well plates (Costar) for 24 h at 37°C . After washing with PBS, the cells were incubated or not

with mygalin (50, 150, or 450 μM) for 1 h before the addition of TLR4 agonist (LPS 100 ng/mL) for 6 h. After washing with PBS, the cells were harvested for total RNA extraction, and after 24 h of stimulation, the culture supernatants were collected for cytokine and (NO) measurements.

In some assays after 1 h of treatment of J774A.1 cells with mygalin (50 and 150 μM), the culture medium was removed, the cells were washed with medium new medium containing LPS (100 ng/mL) was added and then the cells were incubated for 24 h to confirm the influence of mygalin on LPS-induced NO production.

2.10. RNA Isolation and RT-PCR

After 6 h of treatment, the cells were washed with PBS (500 μL per well). Total RNA was extracted from the macrophages with 180 μL of QIAzol lysis reagent (Qiagen®) and purified using a Direct-zol kit (ZYMO RESEARCH) following the manufacturer's instructions. RNA was quantified by measuring the absorbance at 260 nm using a GE NanoVue Plus™ spectrophotometer (GE Lifesciences) and the integrity was visualized on 1.2% agarose gels stained with red GelRed™ (Biotium) [35]. Total RNA (100 ng) was converted into cDNA using a High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems™). For the negative control, the enzyme was replaced with water. cDNAs were used as a template for the amplification of the genes of interest using specific primers designed in this study (Table 1) with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), and the final reaction volume was 25 μL . All PCRs included the negative reverse transcriptase (RT) and negative PCR control. RT-PCR products (10 μL) were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels at 70 V in TAE 1X buffer and stained with GelRed, and bands were visualized using an electronic photo-document system (UVITEC, Cambridge). The densities of the PCR products were quantified using the ImageJ program (<http://imagej.nih.gov/ij/>) and compared against the expression of the β -actin gene.

Table 1. Primer sequences used in the RT-PCR assay.

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Annealing T (°)
iNOS	GCTCCCTATCTTGAAGCCCC	CCCAAACACCAAGCTCATGC	58°C
COX-2	CTTCGGGAGCAACAACAGAGT	AATGTTGAAGGTGTCCGGGCA	58°C
TNF- α	GTAGCCACGTCGTAGCAAA	CTGGAAGACTCCTCCAGGTA	56°C
IL-6	ACGATGATGCACTTGCAGAAAA	GGTCTGGTCCTTAGCCACTC	56°C
β -actin	TATGCTCTCCCTCACGCCAT	AGGTCTTTACGGATGTCAACG	58°C

2.11. Measurement of NO

Supernatants of BMDMs, J774A.1 or RAW cells were collected after treatment for 24 h to measure the presence of nitric oxide, which was quantified using the Griess reaction method [36]. To assess the presence of nitrite (NO_2^-), which is a common reaction product, 50 μL of the supernatant and 50 μL of a 1% sulfanilamide solution were added to a 96-well plate and incubated for 10 min at room temperature under dark conditions. Then 50 μL of 0.1% NED was added followed by further incubation under the same conditions. The absorbance was then measured at 550 nm. The NO_2^- concentration in each sample was based on the standard sodium nitrite (NaNO_2) curve constructed between 1 and 100 μM . The tests were performed in quadruplicate (N = 4).

2.12. Neutralization Assay of LPS by Mygalin

LPS (100 ng/mL) was treated with mygalin (50, 150, or 450 μM) for 45 min in a water bath at 37 °C. The mixture was used to stimulate macrophages for 24 h, and the supernatants were collected to measure the NO production. Polymyxin (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was used under the same conditions as a positive control to block the biological effects of LPS [37].

2.13. Conjugation of FITC-LPS

In this assay, 1 mg of LPS from *E. coli* serotype 0111: B4 was conjugated with 4 mg of FITC following the methodology of Skelly [38] with minor modifications. Briefly, the proportion was 1:4 in 1.5 mL of sodium borate (0.1 M) pH 10.5 for 3 h at 37 °C and 180 rpm. The mixture was dialyzed by membrane dialysis with a MWCO of 1000 (Spectra) overnight against 0.15 M NaCl with 4 exchanges. All solutions were prepared with sterilized ultrapure water.

2.14. Interaction of Mygalin with FITC-LPS

The interaction between mygalin and LPS-FITC was studied by monitoring the fluorescence of conjugated FITC-LPS. For this analysis 10 µg/mL conjugate was incubated with different concentrations of mygalin (50, 150, or 450 µM) in 100 µL of saline solution using black 96 well plates protected from light. The plates were incubated for 45 min at 37 °C to measure the fluorescence changes, which were calculated using 485/535 nm excitation and fixed emission on a PerkinElmer Victor 3™ 1420 multilabel counter fluorometer and another test at 475 nm excitation and 500–560 nm emission as previously described [39] using a Cytation 3 Imaging Reader Biotek Instrument. All experiments were performed in quadruplicate.

2.15. Measurement of TNF- α

The presence of TNF- α was analyzed in the supernatants of the cell cultures using ELISA immunoenzymatic assay kits from eBioscience following the manufacturer's guidelines. The reaction was measured at 450 nm in a microplate reader (Multiskan EX, Primary EIA). The amount of cytokines present in the samples was calculated based on standard curves.

2.16. Western Blot Analysis

Cells were harvested and lysed with RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8, protease inhibitor) for 30 min at 4 °C following the manufacturer's instructions. Cell lysates were centrifuged at 14,000 rpm for 20 min at 4 °C, and the protein concentration was measured using a Pierce™ BCA protein kit (Thermo Scientific). The total proteins (30–50 µg) were separated on 10% SDS-PAGE gels. The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and preincubated for 2 h at room temperature in saline solution buffered with Tris (pH 7.5) containing 0.1% Tween-20, 5% skim milk, and specific antibodies (iNOS, β -actin or NF- κ B/p65) at 1:1500 with gentle agitation overnight at 4 °C. Anti-rabbit IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase was used as the secondary antibody at a dilution of 1:2000. Protein bands were detected by chemiluminescence enhanced with 1X SignalFire™ ECL reagent and photographed using an electronic documentation system (UVITEC, Cambridge).

For the NF- κ B/p65 assays, RAW cells (2×10^6 cells/well) were pretreated with mygalin (50, 150, or 450 µM) for 1 h and then incubated with LPS (100 ng/mL) for 30 min. Nuclear and cytoplasmic proteins [40] were extracted with RIPA buffer, and Western blotting was performed using a specific antibody against NF- κ B/p65 as described above.

2.17. Statistical Analysis

All results were analyzed using Student's *t*-test and one-way ANOVA, and the difference between groups were determined by Dunnett's multiple comparisons test and analyzed by the program GraphPad Prism 7 (Graph Pad, San Diego, CA, USA). The data were considered statistically significant at $p < 0.05$, and the results represent the mean and standard error of the mean (\pm SEM) from at least three independent experiments.

3. Results

3.1. Virtual Screening

Mygalin in SMILES format was used to perform virtual screening with different databases using web servers, to identify molecules with a Tanimoto similarity index > 75% and different biological activities such as bactericidal [41,42], siderophoric [43], and antimalarial activity [44] as shown in Table S1. The results indicate that mygalin could have more than one biological activity

3.2. Prediction Against Immune Receptors

Mygalin was evaluated in the virtual repertoire of small molecules against immune receptors ImmTORLig_DB, in which the program database counts human immune receptors such as Toll-like receptors (TLR1/TLR2, TLR4/MD-2, TLR2/TLR6) and mincle; MHC-I and MHC-II; costimulatory molecules CD28, CD40, CD80, and CD86; coinhibitory molecules CTLA-4, PD-L1, Tim-3, decoy receptor, Fas ligand, and Fas receptor; cytokines IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17, and IL-23; and cell adhesion molecules ICAM, VCAM, CEACAM1. Mygalin was evaluated with all of these receptors, and it appears that mygalin could have binding affinity for IL-4 (score of 0.161), TLR2/TLR6 (0.153), TLR4/MD-2 (0.136) and other molecules as shown in Table 2. These results indicate that mygalin could act as a binding molecule for some TLR 2, 4 and 6) as a signaling or blocking molecule. The in silico analysis suggests that mygalin has affinity for receptors or molecules that participate in the control of the immune response and could have biological activities that are different from the bactericidal and siderophoric activities found in our previous study [19].

Table 2. Toll-like receptors and other immune factors binding to the ligand mygalin.

ImmTORLig_db Compound SMILES	Zinc Database ID	Factors	Tanimoto Similarity Score
<chem>CS(=O)(=O)NCCCCNC(=O)c1cc2c([nH]c1=O)CCCC2=O</chem>	32355850	IL4	0.161
<chem>CCNC(=O)NCC(=O)N1CCc2ccccc21</chem>	33127803	TLR2/TLR6	0.153
<chem>CS(=O)(=O)NCCCCNC(=O)c1cc2ccccc2oc1=O</chem>	44706237	IL4	0.143
<chem>CCNC(=O)CNC(=O)NC(C)(C)C(=O)O</chem>	22170390	IL17	0.143
<chem>CCS(=O)(=O)NCCCCNC(=O)c1cc2ccccc2oc1=O</chem>	51461652	IL4	0.141
<chem>CCS(=O)(=O)NCCCCNC(=O)c1nc(Cl)ccc1Cl</chem>	51448237	IL4	0.138
<chem>O=C(O)CCCNC(=O)N1CCC[C@H](O)C1</chem>	42471780	TLR4/MD-2	0.136
<chem>Cc1ccc(NC(=O)NCCC(=O)O)n1</chem>	40558977	IL17	0.135
<chem>CCCNC(=O)NCc1ccc2ccccc2c1</chem>	49301164	TLR2/TLR6	0.133
<chem>O=C1N=c2ccc(C(=O)NCCC3=CCCCC3)cc2=NC1=O</chem>	38776626	IL4	0.133

3.3. Molecular Structure of the Ligands

The electronic and physicochemical properties of mygalin, curcumin, and TAK-242 were obtained by ab initio calculations. The compounds exhibited different EP patterns (Figure 1). Mygalin and curcumin were more similar to each other than to TAK-242 and showed negative regions (red) exposed at the ends of the structure that are capable of forming hydrogen bonds and electrostatic interactions. Because of the compact structure of TAK-242 it had a very concentrated negative region at the center. The three ligands were polar molecules that showed large dipole moments (especially curcumin and TAK-242), while mygalin had a smaller dipole moment due to its symmetry (Figure 1).

Regarding the physicochemical properties, the solvation energies and polar surface showed that mygalin is the most water-soluble compound and TAK-242 the least water-soluble. Finally, the greater volumes of mygalin and curcumin compared to TAK-242 could mean improved occupation of a large binding pocket (Table 3).

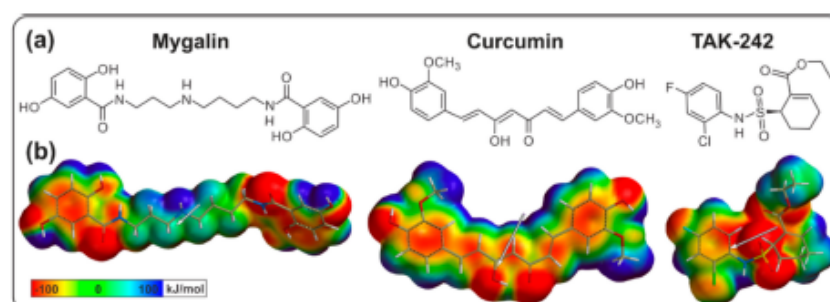


Figure 1. (a) Molecular structure of the ligands constructed in the program ChemDraw. (b) Electronic structure of the ligands in their lowest energy conformations, with curcumin in its enolic form. Electrostatic potentials and dipole moment vector (arrow) are shown.

Table 3. Molecular properties of the ligands and volume of the binding pocket of TLR4/MD-2.

Drugs	Total Energy (AU)	Solvation Energy (kJ/mol)	Dipole (Debyes)	Polar Surface Area (Å ²)	Volume (Å ³)	Area (Å ²)	TLR4/MD-2 Binding Pocket Volume (Å ³)
Mygalin	-1431.66	-94.27	3.41	128.27	417.14	457.35	C = 1187
Curcumin	-1263.16	-49.19	4.21	75.75	373.53	300.12	D = 803
TAK-242	-1895.3	-26.87	4.27	59.93	321.17	344.7	

3.4. Structural Comparison between TLR4/MD-2 Complexes

The X-ray structure of the complexes (TLR4-A/MD-2-C and TLR4-B/MD-2-D) without ligands was compared by three-dimensional superposition and RMSD. The RMSD of 0.225 Å and superposition showed a good overall structural agreement between the two complexes. However, small conformational differences were observed in the side chains of the residues between two complexes. In the LPS-binding domain, most of residues showed a similar conformation or small differences, whereas W23, S47, and I153 (MD-2) showed highest conformational differences (Figure S1).

3.5. Docking Calculations in the TLR4/MD-2 Complex

In the receptor-ligand complexes obtained from the docking calculations, the free energies of interaction were analyzed based on quantum mechanics theory to obtain more accurate results than the docking affinities resulting from AutoDock Vina. The free energy calculations were analyzed. This assessment investigated the TLR4/MD-2 complexed with ligands obtained from docking calculations.

As a result of the docking calculations, 9 binding receptor-ligand modes were obtained, and only the lowest free energies of the three ligands for TLR4-A/MD-2-C and TLR4-B/MD-2-D were considered for further analysis.

The MD-2 residues bound to the ligands showing hydrophilic (polar) interactions reached a distance of approximately 3.4 Å, while those with hydrophobic interactions (van der Waals) reached 4 Å (Figure 2). The number of binding residues was identified, all of which belonged to MD-2. Most of the residues were hydrophobic (7–15), while the number of polar residues ranged from 2 to 4, and interestingly, R90 was found to have polar interactions in all the low free energy complexes. R90 is on the border of MD-2 close to the multimerization interface and established strong polar interactions with the oxygens of the three ligands. Regarding the free energy of interaction, the lowest energy conformation of each of the three ligands was similar in both binding pockets of MD-2 (C and D), with mygalin showing the lowest free energy of interaction of the three molecules (Table 4). Mygalin and curcumin showed extended conformations along the MD-2 binding pocket and anchored to R90 through their phenolic hydroxyl, while TAK-242 associates with R90 through its sulfonamide oxygen (Figure 2).

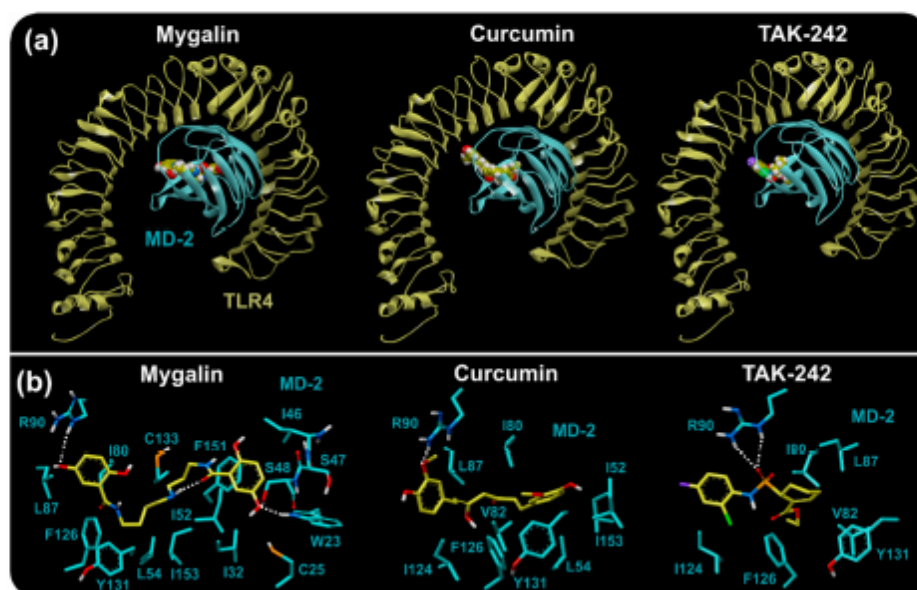


Figure 2. TLR4/myeloid differentiation factor 2 (MD-2) complexes from the docking study of three ligands. Representative MD-2-D binding pocket of the TLR4/MD-2 complexes; the same event occurred in MD-2-C. (a) TLR4/MD-2 complexes showed a potential center binding site in MD-2. Mygalin in the MD-2 binding pocket showed no interaction with TLR4 residues. (b) Ligands (yellow) upon interaction with MD-2 (blue) residues. Most of the interactions were hydrophobic, although residues R90 and W23 show polar interactions, due to hydrogen bonds. Dotted lines show hydrogen bonds.

Table 4. Interaction energies of the ligands and residues of the binding pocket of the TLR4/MD-2 complexes.

Binding Pocket MD-2-C	Total Free Energy (kJ/mol)	MD-2-C Residues	Total Residues
	TLR4-B/MD-2-C		
Mygalin	-236.07	W23, I32, I46, S47, S48, I52, I80, L87, R90, Y131, C133, F151, I153	13
Curcumin	-134.77	I32, I52, L54, I80, R90, I124, F126, Y131, C133, I153	10
TAK-242	-86.99	L54, L78, I80, V82, L87, R90, I124, L125, F126, Y131	10
Binding Pocket MD-2-D	Total Free Energy (kJ/mol)	MD-2-D Residues	Total Residues
	TLR4-A/MD-2-D		
Mygalin	-259.74	W23, C25, I32, I46, S47, S48, I52, L54, I80, L87, R90, F126, Y131, C133, F151	15
Curcumin	-177.35	I32, I52, L54, I80, L87, R90, I124, F126, Y131, C133, I153	11
TAK-242	-62.94	I80, V82, L87, R90, I124, F126, Y131	7

3.6. In Vitro Cytotoxic Activity

After the *in silico* analysis of mygalin binding to LPS, we performed an *in vitro* evaluation to verify whether TLR4 binding to LPS may influence the activation of the signaling pathway. First, we analyzed the effects of mygalin on macrophage viability. The effects of mygalin (Figure 1A) on the viability of mouse BMDMs and the cell lines J774A.1 and RAW 264.7 were assessed using the MTT assay. No morphological alterations were observed, and 100% viability of the cells was observed after treatment with mygalin. These data show that mygalin is not toxic to macrophages at the concentrations evaluated (Figure 3).

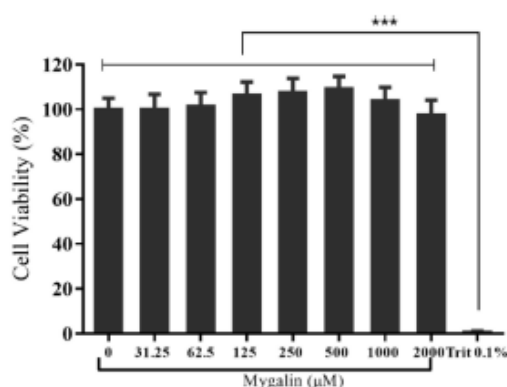


Figure 3. Effect of mygalin on cell viability. The effects of mygalin (0–2000 μM) were compared with the effects of 0.1% Triton (nonviable cells). The results represent the mean ±SEM from three independent experiments (** $p < 0.001$).

3.7. Mygalin Attenuates LPS-Induced iNOS, TNF- α , IL-6 and Cox-2 mRNA Expression in RAW Cells

The mRNA expression of iNOS, TNF- α , COX-2, and IL-6 was analyzed by RT-PCR (Figure 4) after 6 h of treatment with LPS. Treatment of cells with mygalin at different concentrations reduced transcriptional expression in a dose-dependent manner. Inhibition of gene expression started at 150 μM mygalin and was more pronounced at 450 μM except for IL-6, for which 50 μM had a significant effect (Figure 4). TAK-242, a signal inhibitor via TLR4, was used as a control. The results indicated that mygalin was able to interfere with LPS-induced iNOS, TNF- α , IL-6, and COX-2 expression levels and, decreased the inflammatory effects generated by the TLR4 agonist.

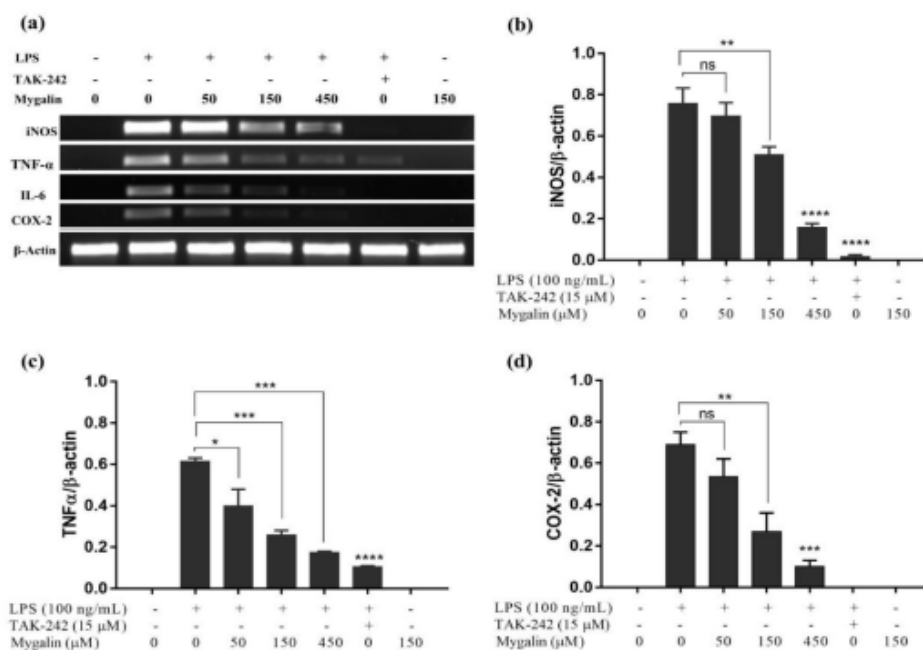


Figure 4. Mygalin inhibits the mRNA expression levels of iNOS, TNF- α , and COX-2 in RAW cells stimulated with LPS. Cells were pretreated with mygalin for 1 h and then stimulated with LPS for 6 h.

(a) Total RNA was isolated from the cells treated with LPS and submitted to RT-PCR. The agarose gels were stained with GelRed and visualized. PCR products were quantified by densitometry. Relative levels of (b) iNOS, (c) TNF- α , and (d) COX-2 mRNA were normalized against the β -actin gene and compared with the group treated with LPS. The bars represent the mean \pm SEM of the relative amounts of mRNA from the genes evaluated from three independent experiments. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ and ns: Not significant). RT-PCR: Reverse transcription followed by polymerase chain reaction. TAK-242 was used as an LPS inhibitor control.

3.8. Effects of Mygalin on the Production of TNF- α

We next evaluated the effects of mygalin on TNF- α production. Figure 5 shows that mygalin at concentrations of 50, 150, and 450 μ M in LPS-activated macrophage cultures significantly reduced TNF- α production in a dose-dependent manner. At higher dose treatments, the levels of this cytokine approached those of the control TAK-2, which inhibits TLR4. The same effect has been observed for cordycepin (a nucleoside analog), curcumin, and spermidine after the cells were stimulated with LPS [40,45].

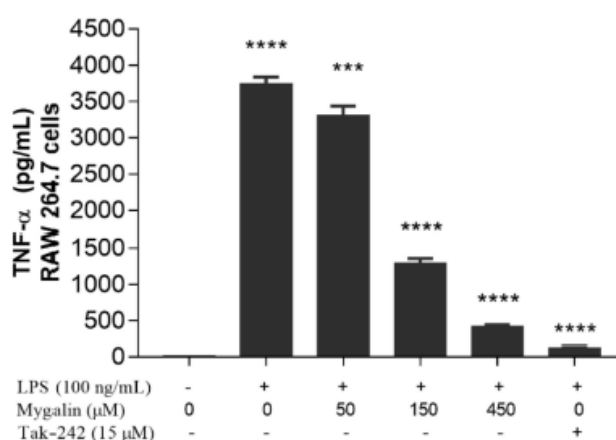


Figure 5. Effects of mygalin on TNF- α levels in cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS). The levels of TNF- α secreted in RAW cells were measured 24 h after stimulation with LPS. The cells were pretreated for 1 h with mygalin, and TAK-242 was used as a positive control as an LPS blockade. The data represent the mean \pm SEM of three independent experiments carried out in triplicate and the p value was calculated using multiplex comparisons with the Tukey test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared to LPS).

3.9. Effects of Mygalin on NO Production in Macrophages

In another assay, after 1 h of pre-treatment with mygalin (50 and 150 μ M); J774A.1 cells were washed with medium and new medium containing LPS (100 ng/mL) was added. NO was measured in the culture supernatant after 24 h. The data shown in Figure 6, suggest that even in the absence of mygalin at the time of the addition of LPS, the anti-inflammatory effect of this molecule was maintained. There was a 40% reduction in NO production by J774A.1 cells, similar to that obtained with BMDMs (40%) and RAW cells (48%) treated with the same concentration, when both molecules were present (Figure 7a,b).

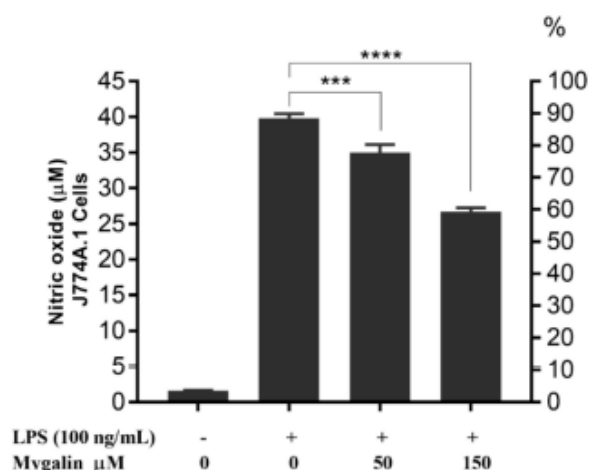


Figure 6. Effect of mygalin on the production of NO induced by LPS in J774A.1 cell. Cells were pretreated for 1 h with mygalin (50 and 150 μM), and then washed with medium and new media plus LPS (100 ng/mL) were added. After 24 h NO was measured in the culture supernatant. The bars represent the mean ± SEM of three independent experiments. (** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

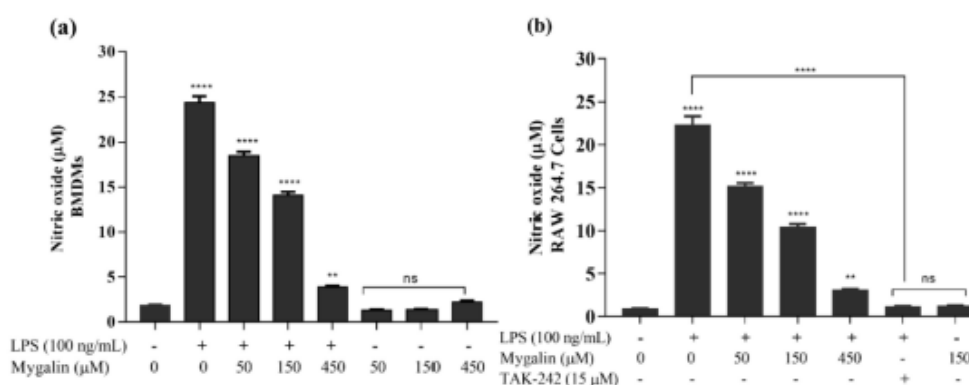


Figure 7. Effects of mygalin on the production of nitric oxide (NO) induced by LPS in macrophages. The cells were pretreated for 1 h with mygalin (50, 150 or 450 μM), and then LPS was added. The culture supernatant was obtained after 24 h to quantify the NO level. (a) Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and (b) RAW 264.7 cells. The data represent the mean ± SEM of three independent experiments performed in triplicate (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ compared to LPS) and ns (not significant) compared to the untreated group.

In another assay, the levels of NO in two cell types, BMDMs and RAW cells, were quantified and correlated with the previously observed gene expression shown in Figure 4a,b. Figure 7 shows that mygalin in the macrophage cultures at concentrations of 50, 150, and 450 μM did not generate significant amounts of NO. However, when mygalin was added to the LPS-activated cultures, the level of NO was significantly reduced in a dose-dependent manner. The most pronounced effect occurred when we used 450 μM mygalin, thus confirming the previously observed reduction in gene expression.

3.10. Neutralizing LPS with Mygalin

Mygalin is able to interact with LPS; therefore, we analyzed whether this complex interaction may block the interaction with TLR4. Mygalin at different concentrations (50, 150, and 450 μM) was incubated with a fixed concentration of LPS (100 ng/mL) for 45 min at 37 °C. Then, this solution

was added to the cell cultures for 24 h, and NO production was measured by the Griess reaction (Figure 8). The results indicated that mygalin was able to neutralize LPS activity, thereby reducing NO production in a dose-dependent manner. The most accentuated effects were 150 and 450 μ M mygalin. The maximum neutralization effect was close to the control, with polymyxin B showing intense inhibitory activity of the action of this endotoxin.

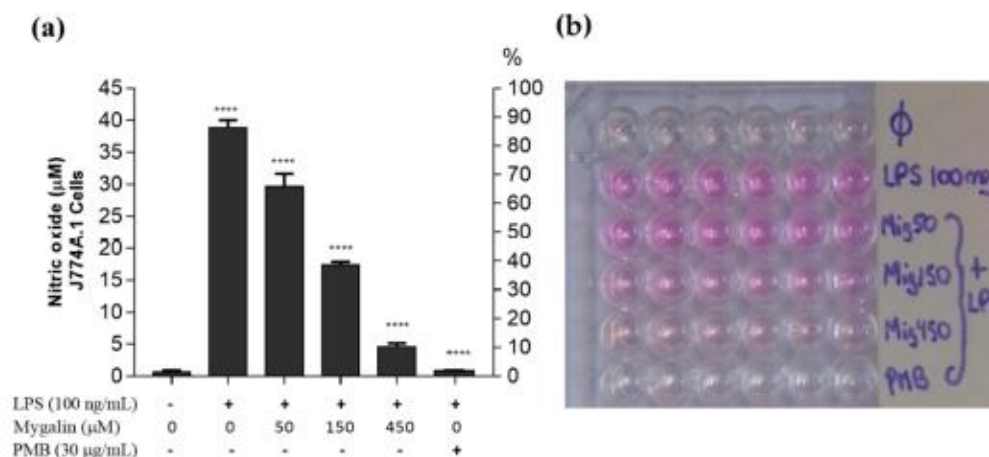


Figure 8. Mygalin neutralizes LPS activity. LPS was incubated with mygalin (50, 150, and 450 μ M) or polymyxin B (PMB, 30 μ g/mL) for 45 min at 37 $^{\circ}$ C and then added to the J774A.1 macrophage cell culture. (a) NO_2^- was quantified at 550 nm after 24 h. (b) Visualization of the Griess reaction. The data represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate (**** $p < 0.0001$ compared to LPS) and ns (not significant) compared to an untreated group.

3.11. Binding of Mygalin to LPS-FITC

To demonstrate the mygalin-neutralizing effects of LPS, its binding with the endotoxin was quantified. Mygalin was incubated at several concentrations with LPS conjugated to fluorescein. Fluorescein reduction was monitored and compared to conjugated LPS. After incubation of mygalin with different doses of LPS labeled with FITC, we observed a decrease in fluorescence compared to the control without mygalin. The decrease in fluorescence was proportional to the increase in the concentration of mygalin. Similar results were found with peptides after incubation with LPS, thus showing the interaction between the two [39]. Our data confirm that mygalin can interact with LPS (Figure 9).

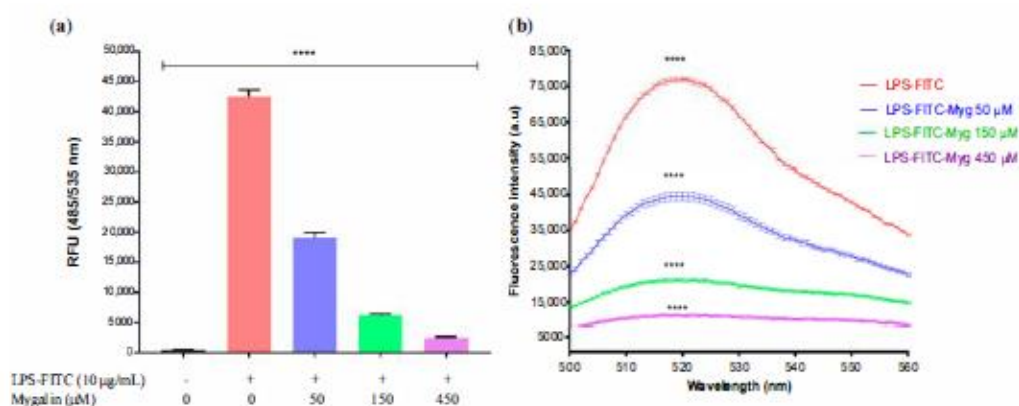


Figure 9. Mygalin binds to LPS. To demonstrate the binding of mygalin to LPS, different concentrations

of mygalin were incubated with 10 µg/mL LPS labeled with FITC in saline solution. Mygalin was incubated at 37 °C for 45 min, and then the fluorescence levels were monitored using excitation and a fixed emission (500–560 nm). (a) Level of interaction between mygalin and LPS-FITC. (b) LPS-FITC fluorescence intensity reduction curve due to mygalin binding measured between 500 and 560 nm. The bars represent the mean ± SEM of four independent experiments. (**** $p < 0.0001$).

3.12. Mygalin Suppresses the Inflammatory Response of LPS by Interfering with the Expression of iNOS and NF-κB p65 in RAW 264.7 Macrophages

TLRs recognize molecular patterns expressed by different infectious agents, which leads to activation of the transcription factors NF-κB and IRF [46]. TLR4 recognizes LPS triggered cellular signaling processes. Therefore, the effects of mygalin on NF-κB expression, the main transcription factor that regulates the synthesis of inflammatory proteins, was analyzed. In parallel, we evaluated the expression of the iNOS enzyme that controls NO synthesis. Figure 10 shows that stimulation of cells with LPS (100 ng/mL) upregulates the expression of both iNOS and NF-κB p65, while mygalin (50, 150, and 450 µM), was able to reduce this response after 30 min of treatment. This result indicates that mygalin could block LPS signaling, thereby decreasing the inflammatory effect induced by TLR4 agonists.

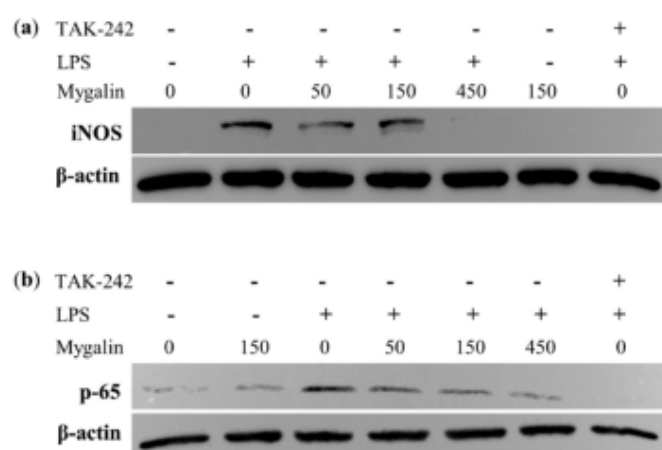


Figure 10. Effects of mygalin on LPS-induced. (a) inducible nitric oxide synthase (iNOS) and (b) NF-κB p65 protein expression by SDS-PAGE. Western blotting was performed using specific antibodies against iNOS and NF-κB p65 (Cell Signaling). TAK-242 was used as a TLR4 signal inhibitor.

4. Discussion

Virtual screening (VS) for drug discovery is becoming an essential *in silico* tool to predict new biological activities of small molecules or existing molecules [47–49]. Online tools or web servers, such as Swiss Similarity, or databases of chemical compounds, such as PubChem and ChEMBL, facilitate these types of analyses and allow comparisons of the structures of interest with existing structures in the databases. In this study we evaluated the molecule mygalin (Figure 1a) with these databases and identified molecules with structural similarity and known activities (Table S1). Among the molecules with a Tanimoto index > 75% included a polyamine analog with antimalarial activity [44], with a similarity of 91.3%; molecules with activity against viruses, such as HCV [50] and HIV [51]; a catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibitor [52]; and molecules with siderophoric [43], antibacterial [41,42], and anticancer [53,54] activities. These last three biological activities have been demonstrated in *in vitro* and *in vivo* tests, with the antibacterial activity reported by Pereira [20] and Espinoza-Culupú, who showed the molecular mechanism of action in bacteria and their siderophoric activity [19]. In the case of anticancer activity, silver nanoparticles conjugated with mygalin [55] showed intense cytotoxic activity against cancer cell lines, thus confirming the *in silico* predictions.

In addition, it was predicted that mygalin may have other properties in nervous system, antiviral and COMT inhibitory activity.

Another analysis carried out with mygalin predicted whether it could interact with cellular receptors related to immune cells. For this, mygalin in SMILES format, which was evaluated in ImmTORLig_DB, was found to bind to TLRs, including TLR2 and TLR4, as observed in Table 2. This database includes small drugs with activity against these receptors and could be used in comparisons with molecules such as ours. We obtained scores that indicated possible binders for mygalin. Through these VS approaches, different TLR antagonist molecules have been identified included molecules that target TLR2 [56] and TLR4 as described by Urban [57], who found small molecule TLR4 antagonists using the molecular docking and experimental testing methodologies and validated the results of VS.

In silico and in vitro studies have been carried out to search for and verify TLR-binding molecules, including TLR4, thus providing information on their activation or inactivation mechanisms. The key interactions in this process allow for the discovery of new molecules as modulators. The VS results for mygalin indicated that it was a possible binding agent for TLR4; therefore, we decided to perform a molecular docking study to corroborate these predictions, and we included two drugs with scientific evidence of antagonistic activity against TLR4: Curcumin and TAK-242 [10].

Before the docking study, the X-ray structures of the two TLR4/MD-2 complexes were compared through RMSD and three-dimensional superposition. The RMSD of 0.225 Å indicated structural similarity between the two complexes. The superposition showed small differences in the LPS-binding pocket residues, especially in W23, S47 and I153 (MD-2); however, most of residues showed good structural agreement (Figure S1). These small differences in the conformation of the residues could be correlated with the difference in the volume of the binding pocket (Table 3), number of residues bound to ligands and free energies of interaction (Table 4). However, the overall activity between the three ligands was preserved.

A docking study was performed to predict the binding modes and affinities of mygalin, curcumin and TAK-242 with TLR4/MD-2, which focused on the LPS binding domain.

Molecular interactions were analyzed in all receptor-ligand complexes and the binding domains showed conserved residues and a similar pattern of interactions in both TLR4/MD-2 complexes. Affinities were obtained from docking calculations, but the energy differences between the ligands were less than 3 kJ/mol. Due to such small differences in affinities and to improve accuracy, free energies of interaction were evaluated with theory of quantum mechanical (Table 4).

The binding of agonistic ligands has been proposed to cause dimerization of the extracellular domains, which is believed to trigger the recruitment of specific adaptor proteins to the intracellular domains, thus initiating a signaling cascade [5]. LPS binds to this pocket and directly mediates dimerization of the two TLR4/MD-2 complexes [27]; thus LPS is expected to bind to a dimer (TLR4-A/MD-2-C) and multimerization subsequently occurs with the coupling of another dimer (TLR4-B/MD-2-D). The LPS binding site is a large hydrophobic pocket in MD-2 and a cluster of polar and positively charged residues of TLR4 and MD-2 that directly bridges the two components of the multimer [5]. Although mygalin is a polar compound and highly water soluble, as indicated by the physicochemical and electronic properties (Table 3), the free energy of interaction shows that mygalin can form TLR4/MD-2 complexes in the dimeric configuration in the same way as other antagonists (curcumin and TAK-242) and with lower energies in the dimeric complexes (Table 4).

Synthetic small antagonists have been shown to bind to TLR8, stabilize the dimer conformation and prevent further conformational changes that are necessary for TLR8 activation but to antagonize the binding of TLR8 activators that occupy the active site [58]. The docking study showed that mygalin was capable of partially occupying the binding pocket of MD-2 (Figure 2), which is due to the small size compared to LPS, and it interacts with some residues that are used by LPS during its binding and part of the dimerization interface, such as I80, R90, F126, Y131 of MD-2 Y131, or MD-2 [5,27,59].

The binding pocket is a hydrophobic cavity centered on MD-2, although it has a polar patch on the edge of MD-2 near to the dimerization area of TLR4 [5]. In the TLR4/MD-2–ligand interaction, the driving force is to expel the ligands from the bottom of the binding pocket and to occupy the polar patch, as occurred with mygalin by forming a hydrogen bond with R90. However, the absence of a group with a negative formal charge reduces the possibility of a very strong ionic association with the positively charged residues of TLR4 and may be unable to cause a conformational change to occur, as has been shown with other ligands that lack phosphate groups [5]. Mygalin had very good energy agreement to establish a stable complex with MD-2. Due to its polar and water-soluble characteristics, mygalin was able to interact with a patch of polar residues at the dimerization interface but lacked groups capable of forming ionic interactions with TLR4, thereby may be insufficient to generate activation or multimerization as has been proposed for other synthetic antagonists [60].

Since the in-silico results predicted mygalin to be a possible binder of TLR4, we decided to carry out in vitro analyses to confirm these results. First, we evaluated the cellular viability after treatment with mygalin in macrophages. Previous studies from our laboratory showed that low concentrations of mygalin (0–100 μM) were not toxic to splenocytes [61]. In our tests, we used higher concentrations of mygalin, with a maximum of 2000 μM , and tested two other cell types, primary cells derived from BMDMs and the cell lines RAW and J774A.1 (data not shown). No change in the viability of these cells was proven (Figure 3). These results confirm that even at a high dose, mygalin is not toxic to eukaryotic cells. Based on these data, we chose three doses (50, 150, and 450 μM) of the drug for our tests at levels below the levels required for biological activity of known polyamines, which are in the millimolar range [61]. These data showed that the effects of mygalin in mammalian cells differs from those found in bacteria, where doses greater than 1000 μM are toxic to *E. coli* (Espinoza-Culupú, 2019); these effects are attributed to differences in the membrane structure between these types of cells.

Inflammation is a complex reaction that is common to various injuries in the body and usually presents itself as a protective mechanism. It is a cascade reaction involving several inflammatory mediators, including NO, PGE2, TNF- α , IL-6, IL-1 β , and IL-10 [62]. Because mygalin acts mainly in Gram-negative bacteria [20] and LPS is the main inflammatory component of these bacteria, we investigated the potential inflammatory mechanism of mygalin in LPS-stimulated phagocytic cells. For this, a series of assays were performed to determine the mediators, such as TNF- α and IL-6, and the gene expression of the enzymes iNOS and COX-2 to correlate with the production of NO and the expression of NF- κB p65 which are pathways related to inflammation.

Pretreatment of the cell cultures with mygalin reduced the expression of the iNOS, TNF- α , COX-2 and IL-6 genes after 6 h of stimulation with LPS. The cellular effects were more significant after treatment with higher concentrations of the drug (Figure 4). We noticed that the concentration of 450 μM had a similar effect to TAK-242, which is a potent inhibitor of cytokines and signals via TLR4. Similar results regarding the expression of the same genes against stimulation by LPS have been described for other molecules, such as β -carotenes [63], resveratrol [64], and curcumin. These data suggest that mygalin can act via TLR4, which was similar to the TAK-242 molecule that binds to the TLR4 receptor, blocking LPS actions.

We next assessed the effects of mygalin on the levels of TNF- α and NO in the culture supernatant after 24 h of stimulation with LPS, and the cell lysate was used for protein analysis by Western blot. A great reduction in the synthesis of TNF- α (Figure 5) and NO (Figures 6–8) was observed, which was similar to the reduction observed for the gene expression of these mediators, and a reduction in the enzymes iNOS and COX-2 (Figure 4), indicating that mygalin plays an anti-inflammatory role during LPS activation. The data in Figure 6 showed that even in the absence of mygalin during stimulation with LPS, the anti-inflammatory effect of the molecule remained, reducing NO production, similarly to the observed effect when the molecules added together. Our data showed that mygalin can bind to LPS neutralizing its activity, as well as bind to the adapter protein MD-2 inhibiting intracellular signaling pathways that lead to reduced LPS activity. This suggests that the pretreatment of cells with mygalin was sufficient to block signaling pathways induced by LPS activation. The level of NO reduction

during the treatment of J774A.1 cell with 150 μM of mygalin was similar to that observed in BMDMs and RAW cells stimulated with both molecules, ranging from 40 to 48% (Figure 7a,b). These results indicate that mygalin can bind to TLR4 as demonstrated by *in silico* and molecular docking assays.

In addition to this, there are others molecular signals that can occur, due to phosphorylation of intracellular proteins, which reflect in the cascade of signals generated during the contact of LPS with TLR4, which were not analyzed here, but are being investigated in our laboratory.

TNF- α [65] is one of the main mediators of the inflammatory response, and it is activated by molecular signals mediated by the contact of PAMPs with TLRs. LPS caused an increase in the levels of TNF- α , while treatment of the cells with mygalin reduced the expression of TNF- α mRNA, reflecting inhibition of TNF- α synthesis in a similar way to the control drug TAK-242. These results are similar to those described in the literature, where molecules such as spermidine [45], curcumin [66], and peptides [67] were shown to inhibit the synthesis of TNF- α and other proinflammatory cytokines.

The production of TNF- α is essential for the synergistic induction of NO synthesis both *in vitro* and *in vivo* [68]. Bacterial products, activate iNOS, which generates high concentrations of NO; however, overproduction of NO can be toxic. Changes in NO levels through the induction or inhibition of iNOS enzymatic activity represent a method of assessing the effects of a drug on the inflammatory process. Our data indicated that both primary culture cells and cell lines treated with mygalin had the same NO reduction pattern, showing that this effect does not depend on the cell type (Figure 7).

Burns [69] combined several spermine analogs with fluorescein-labeled lysine and observed that they functioned as a powerful LPS sequestrators. The fluorescence intensity of these analogs, as well as the NO produced by the J774A.1 macrophage, proved that the analogs neutralized the toxicity of LPS. The same author [70] also created a library of compounds, some with an acyl group and noted that these compounds neutralized LPS. To determine whether mygalin specifically binds to LPS and neutralizes its activity, the molecules were preincubated together, and then the mixture was subsequently used to activate cells. Preincubation of these molecules dramatically reduced NO production in a similar manner to that of polymyxin B (Figure 8). This finding corroborates our previous results. Mygalin, as well as other compounds, such as antimicrobial peptides [71] and the polyamines spermidine at a concentration of 800 μM [72], may act to neutralize the activity of LPS.

Another complementary approach was to conjugate LPS with FITC and measure this interaction with a fluorescence assay. Our results (Figure 9) showed that mygalin interacts with the labeled LPS and, the fluorescence intensity decreased as the mygalin concentration increased. The same approach was used by another author with kukoamine B [73], which interfered with the binding of LPS with TLR4. Our data prove that mygalin is a TLR4 antagonist.

The binding of LPS to TLR4 activates inflammatory gene transcription pathways, and the production of PGE2 and NO through the activation of the enzymes COX-2 and iNOS [74]. NF- κB plays a very important role in the regulation of the immune response mediated by different factors such as stress, antigens or diseases with an inflammatory response [75], thereby inducing the expression of several proinflammatory [76] and anti-inflammatory [77] genes. We observed that the treatment of cells with mygalin (450 μM) and LPS significantly reduced the expression of NF- κB p65 and iNOS (Figure 10), similar to level observed with our control drug TAK-242. Therefore, mygalin suppresses NO, TNF- α , and COX-2 synthesis by regulating NF- κB , preventing its translocation and inhibiting the inflammatory cascade induced by LPS. These findings suggest that mygalin can block activation by LPS via TLR4 as with other anti-inflammatory molecules, such as corticosteroids [78], peptides [79], and chalcones (including okanin [80] and others thereby showing that this pathway has therapeutic potential for different inflammatory diseases and cancers) [80].

5. Conclusions

In conclusion, in this study VS of mygalin similarity was shown to be a fast and economical method of finding potential targets. We demonstrated for the first time via *in silico* analysis, VS, molecular docking, and *in vitro* analysis of LPS inflammation in murine macrophages that acylpolyamine mygalin

is a TLR4 antagonist since it sequesters LPS and suppresses the gene and protein expression of TNF- α , IL-6, iNOS, and COX-2 via inhibition of NF- κ B p65 protein signaling. Together, our data showed that mygalin can bind to LPS, as well as to the adapter protein MD-2, inhibiting intracellular signaling pathways that lead to the reduction of LPS-induced inflammation, and that mygalin may be an attractive option to protect against inflammatory disorders. Finally, our research provides a model for identifying specific molecules with anti-inflammatory potential, using online tools through in silico analysis and an in vitro model suggesting that MD-2 may be one of mygalin target.

Therefore, we suggest that the mygalin action model represented in Figure 11, in which mygalin blocks the inflammatory effects of LPS via TLR4.

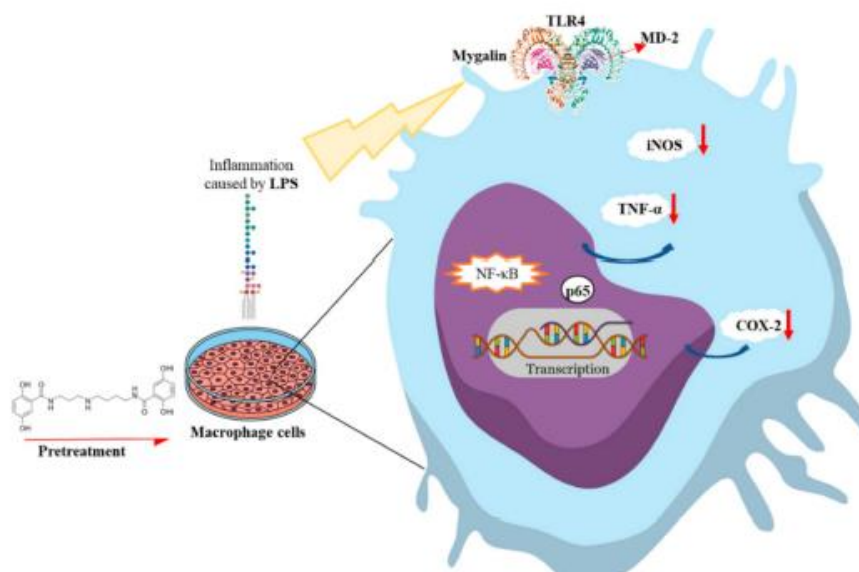


Figure 11. Model of the mechanisms of action of mygalin to inhibit LPS via TLR4. Mygalin binds to the MD-2 protein and blocks the inflammatory effects of LPS.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2218-273X/10/12/1624/s1>, Table S1: Comparison of mygalin to similar drug and Figure S1: Superposition of MD-2-C and MD-2-D.

Author Contributions: A.E.-C. and M.M.B. conceived the experiments. R.V.-R. performed the molecular docking and analyzed the data. M.F.-L. performed virtual screening experiments and analyzed the data, A.E.C. performed the in vitro experiments and analyzed the data. E.M. helped in the cell culture. M.N.S. participated with critiques and suggestions for the manuscript. P.I.d.S.J. performed the mygalin synthesis. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant no. 2013/11212-9, a Ph.D. Scholarship from CONCYTEC-FONDECYT Institution of Peruvian State no 092-2016, FAPESP/CeTICS grant no. 2013/07467-1, the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant no. 472744/2012-7 and the Butantan Foundation.

Acknowledgments: Drs Carla Squaiella and Osmair Silva (Laboratory of Immunochemistry) are acknowledged for support with the LPS-FITC fluorescence by Cytation 3 Imaging Reader, BioTek Instruments, and Gen5 3.08 software.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Netea, M.G.; van der Graaf, C.; Van der Meer, J.W.; Kullberg, B.J. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: Bringing specificity to the innate-immune system. *J. Leukoc. Biol.* **2004**, *75*, 749–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. El-Zayat, S.R.; Sibaii, H.; Mannaa, F.A. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: An overview. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2019**, *43*, 187. [[CrossRef](#)]
3. Gao, W.; Xiong, Y.; Li, Q.; Yang, H. Inhibition of toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: A journey from molecular to nano therapeutics. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jezierska, A.; Kolosova, I.A.; Verin, A.D. Toll like receptors signaling pathways as a target for therapeutic interventions. *Curr. Signal Transduct. Ther.* **2011**, *6*, 428–440. [[CrossRef](#)]
5. Park, B.S.; Song, D.H.; Kim, H.M.; Choi, B.S.; Lee, H.; Lee, J.O. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **2009**, *458*, 1191–1195. [[CrossRef](#)]
6. Kim, S.J.; Kim, H.M. Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14. *BMB Rep.* **2017**, *50*, 55–57. [[CrossRef](#)]
7. Tsujimoto, H.; Ono, S.; Efron, P.A.; Scumpia, P.O.; Moldawer, L.L.; Mochizuki, H. Role of toll-like receptors in the development of sepsis. *Shock* **2008**, *29*, 315–321. [[CrossRef](#)]
8. Kuzmich, N.N.; Sivak, K.V.; Chubarev, V.N.; Porozov, Y.B.; Savateeva-Lyubimova, T.N.; Peri, F. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. *Vaccines* **2017**, *5*, 34. [[CrossRef](#)]
9. Molteni, M.; Bosi, A.; Rossetti, C. Natural products with toll-like receptor 4 antagonist activity. *Int. J. Inflamm.* **2018**, *2018*, 2859135. [[CrossRef](#)]
10. Matsunaga, N.; Tsuchimori, N.; Matsumoto, T.; Li, M. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Mol. Pharmacol.* **2011**, *79*, 34–41. [[CrossRef](#)]
11. Shimamoto, A.; Chong, A.J.; Yada, M.; Shomura, S.; Takayama, H.; Fleisig, A.J.; Agnew, M.L.; Hampton, C.R.; Rothnie, C.L.; Spring, D.J.; et al. Inhibition of toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* **2006**, *114*, 1-270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wozniacka, A.; Lesiak, A.; Narbutt, J.; McCauliffe, D.; Sysa-Jedrzejowska, A. Chloroquine treatment influences proinflammatory cytokine levels in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* **2006**, *15*, 268–275. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Gómez-Guzmán, M.; Jiménez, R.; Romero, M.; Sánchez, M.; Zarzuelo, M.J.; Gómez-Morales, M.; O’Valle, F.; López-Farré, A.J.; Algieri, E.; Gálvez, J.; et al. Chronic hydroxychloroquine improves endothelial dysfunction and protects kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension* **2014**, *64*, 330–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Takahashi, T.; Kakehi, J.I. Polyamines: Ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann. Bot.* **2010**, *105*, 1–6. [[CrossRef](#)]
15. Zhang, M.; Caragine, T.; Wang, H.; Cohen, P.S.; Botchkina, G.; Soda, K.; Bianchi, M.; Ulrich, P.; Cerami, A.; Sherry, B.; et al. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: A counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 1759–1768. [[CrossRef](#)]
16. Chen, J.; Rao, J.N.; Zou, T.; Liu, L.; Marasa, B.S.; Xiao, L.; Zeng, X.; Turner, D.J.; Wang, J.Y. Polyamines are required for expression of Toll-like receptor 2 modulating intestinal epithelial barrier integrity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2007**, *293*, G568–G576. [[CrossRef](#)]
17. Li, M.; Wang, Y.; Ge, C.; Chang, L.; Wang, C.; Tian, Z.; Wang, S.; Dai, F.; Zhao, L.; Xie, S.; et al. Synthesis and biological evaluation of novel alkylated polyamine analogues as potential anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 1732–1743. [[CrossRef](#)]
18. Casero, R.A., Jr.; Woster, P.M. Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4551–4573. [[CrossRef](#)]
19. Espinoza-Culupú, A.; Mendes, E.; Vitorino, H.A.; Da Silva, P.L.; Borges, M.M. Mygalin: An acylpolyamine with bactericidal activity. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 2928. [[CrossRef](#)]

20. Pereira, L.S.; Silva, P.L., Jr.; Miranda, M.T.; Almeida, I.C.; Naoki, H.; Konno, K.; Daffre, S. Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthocurria gomesiana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *352*, 953–959. [[CrossRef](#)]
21. Zoete, V.; Daina, A.; Bovigny, C.; Michielin, O. SwissSimilarity: A Web tool for low to ultra high throughput ligand-based virtual screening. *J. Chem. Inf. Mdlng.* **2016**, *56*, 1399–1404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J.; He, S.; Li, Q.; Shoemaker, B.A.; Thiessen, P.A.; Yu, B.; et al. PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *47*, D1102–D1109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gaulton, A.; Hersey, A.; Nowotka, M.; Bento, A.P.; Chambers, J.; Mendez, D.; Mutowo, P.; Atkinson, E.; Bellis, L.J.; Cibrián-Uhalte, E.; et al. The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D945–D954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chatterjee, D.; Kaur, G.; Muradia, S.; Singh, B.; Agrewala, J.N. ImmLig_DB: Repertoire of virtually screened small molecules against immune receptors to bolster host immunity. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Irwin, J.J.; Sterling, T.; Mysinger, M.M.; Bolstad, E.S.; Coleman, R.G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Mdlng.* **2012**, *52*, 1757–1768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bernstein, F.C.; Koetzle, T.F.; Williams, G.J.B.; Meyer, E.F.; Brice, M.D.; Rodgers, J.R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535–542. [[CrossRef](#)]
27. Ohto, U.; Fukase, K.; Miyake, K.; Shimizu, T. Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 7421. [[CrossRef](#)]
28. Biovia, D.S. *Discovery Studio Visualizer 2020. Release v20 1.0.19295*; Dassault Systèmes: San Diego, CA, USA, 2016.
29. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791. [[CrossRef](#)]
30. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. [[CrossRef](#)]
31. Kubli-Garfias, C.; Vázquez-Ramírez, R.; Trejo-Muñoz, C.; Berber, A. Insights on the mechanism of action of immunostimulants in relation to their pharmacological potency. The effects of imidazoquinolines on TLR8. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 0178846. [[CrossRef](#)]
32. Guex, N.; Peitsch, M.C. Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2714–2723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Weischenfeldt, J.; Porse, B. Bone marrow-derived macrophages (BMM): Isolation and applications. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2008**, *2008*, pdb.prot5080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wang, H.M.D.; Fu, L.; Cheng, C.C.; Gao, R.; Lin, M.Y.; Su, H.L.; Belinda, N.E.; Nguyen, T.H.; Lin, W.H.; Lee, P.C.; et al. Inhibition of LPS-induced oxidative damages and potential anti-inflammatory effects of *Phyllanthus emblica* extract via down-regulating NF- κ B, COX-2, and iNOS in RAW 264.7 Cells. *Antioxidants* **2019**, *8*, 270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Vieira, P.C.G.; Espinoza-Culupú, A.O.; Nepomuceno, R.; Alves, M.R.; Lebrun, I.; Elias, W.P.; Ruiz, R.C. Secreted autotransporter toxin (Sat) induces cell damage during enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *PLoS ONE* **2020**, *15*, 0228959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ding, A.H.; Nathan, C.F.; Stuehr, D. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **1988**, *141*, 2407–2412.
37. Lu, X.X.; Jiang, Y.F.; Li, H.; Ou, Y.Y.; Zhang, Z.D.; Di, H.Y.; Chen, D.E.; Zhang, Y.Y. Polymyxin B as an inhibitor of lipopolysaccharides contamination of herb crude polysaccharides in mononuclear cells. *Chin. J. Nat. Med.* **2017**, *15*, 487–494. [[CrossRef](#)]
38. Skelly, R.R.; Munkenbeck, P.; Morrison, D.C. Stimulation of T-independent antibody responses by hapten-lipopolysaccharides without repeating polymeric structure. *Infect. Immun.* **1979**, *23*, 287–293. [[CrossRef](#)]

39. Sinha, S.; Zheng, L.; Mu, Y.; Ng, W.J.; Bhattacharjya, S. Structure and Interactions of a host defense antimicrobial peptide thanatin in lipopolysaccharide micelles reveal mechanism of bacterial cell agglutination. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 17795. [[CrossRef](#)]
40. Choi, Y.H.; Kim, G.Y.; Lee, H.H. Anti-inflammatory effects of cordycepin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages through Toll-like receptor 4-mediated suppression of mitogen-activated protein kinases and NF- κ B signaling pathways. *Drug Des. Dev. Ther.* **2014**, *8*, 1941–1953. [[CrossRef](#)]
41. Cheng, K.; Zheng, Q.Z.; Qian, Y.; Shi, L.; Zhao, J.; Zhu, H.L. Synthesis, antibacterial activities and molecular docking studies of peptide and Schiff bases as targeted antibiotics. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7861–7871. [[CrossRef](#)]
42. Coburn, R.A.; Batista, A.J.; Evans, R.T.; Genco, R.J. Potential salicylamide antiplaque agents: In vitro antibacterial activity against *Actinomyces viscosus*. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 1245–1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Raines, D.J.; Moroz, O.V.; Wilson, K.S.; Duhme-Klair, A.K. Interactions of a periplasmic binding protein with a tetradentate siderophore mimic. *Angewandte Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 4595–4598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Liew, L.P.P.; Pearce, A.N.; Kaiser, M.; Copp, B.R. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of antimalarial polyamines. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 22–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Choi, Y.H.; Park, H.Y. Anti-inflammatory effects of spermidine in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *J. Biomed. Sci.* **2012**, *19*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kawasaki, T.; Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 461. [[CrossRef](#)]
47. Lionta, E.; Spyrou, G.; Vassilatis, D.K.; Cournia, Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: Principles, applications and recent advances. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 1923–1938. [[CrossRef](#)]
48. Byrne, R.; Schneider, G. In silico target prediction for small molecules. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1888*, 273–309. [[CrossRef](#)]
49. Alam, S.; Khan, F. Virtual screening, docking, ADMET and system pharmacology studies on garcinia caged xanthone derivatives for anticancer activity. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 5524. [[CrossRef](#)]
50. Rivero-Buceta, E.; Carrero, P.; Doyagüez, E.G.; Madrona, A.; Quesada, E.; Camarasa, M.J.; Pérez-Pérez, M.J.; Leyssen, P.; Paeshuyse, J.; Balzarini, J.; et al. Linear and branched alkyl-esters and amides of gallic acid and other (mono-, di- and tri-) hydroxy benzoyl derivatives as promising anti-HCV inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 656–671. [[CrossRef](#)]
51. Zhao, X.Z.; Semenova, E.A.; Vu, B.C.; Maddali, K.; Marchand, C.; Hughes, S.H.; Pommier, Y.; Burke, T.R. 2,3-dihydro-6,7-dihydroxy-1H-indolizino[1,2-b]pyridin-5(1H)-one-based HIV-1 integrase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 251–259. [[CrossRef](#)]
52. Brevitt, S.E.; Tan, E.W. Synthesis and in vitro evaluation of two progressive series of bifunctional polyhydroxybenzamide catechol-O-methyltransferase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2035–2039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Miyanaga, S.; Sakurai, H.; Saiki, I.; Onaka, H.; Igarashi, Y. Synthesis and evaluation of myxochelin analogues as antimetastatic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2724–2732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Schieferdecker, S.; König, S.; Koeberle, A.; Dahse, H.-M.; Werz, O.; Nett, M. Myxochelins target human 5-lipoxygenase. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 335–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Courrol, L.C.; Espinoza-Culupú, A.; Da Silva, P.I.; De Oliveira Gonçalves, K.; De Oliveira Silva, F.R.; Borges, M.M. Antibacterial and antitumoral activities of the spider acylpolyamine Mygalin silver nanoparticles. *BioNanoScience* **2020**, *10*, 463–472. [[CrossRef](#)]
56. Durai, P.; Shin, H.J.; Acheh, A.; Kwon, H.K.; Govindaraj, R.G.; Panneerselvam, S.; Yesudhas, D.; Choi, J.; No, K.T.; Choi, S.; et al. Toll-like receptor 2 antagonists identified through virtual screening and experimental validation. *FEBS J.* **2017**, *284*, 2264–2283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Švajger, U.; Brus, B.; Turk, S.; Sova, M.; Hodnik, V.; Anderluh, G.; Gobec, S. Novel toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists identified by structure- and ligand-based virtual screening. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 393–399. [[CrossRef](#)]
58. Zhang, S.; Hu, Z.; Tanji, H.; Jiang, S.; Das, N.; Li, J.; Sakaniwa, K.; Jin, J.; Bian, Y.; Ohto, U.; et al. Small-molecule inhibition of TLR8 through stabilization of its resting state. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 58. [[CrossRef](#)]
59. Wang, Y.; Su, L.; Morin, M.D.; Jones, B.T.; Whitby, L.R.; Surakattula, M.M.; Huang, H.; Shi, H.; Choi, J.H.; Wang, K.W.; et al. TLR4/MD-2 activation by a synthetic agonist with no similarity to LPS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E884–E893. [[CrossRef](#)]

60. Mafra, D.G.; Da Silva, P.I.; Galhardo, C.S.; Nassar, R.; Daffre, S.; Sato, M.N.; Borges, M.M. The spider acylpolyamine Mygalin is a potent modulator of innate immune responses. *Cell. Immunol.* **2012**, *275*, 5–11. [[CrossRef](#)]
61. Igarashi, K.; Kashiwagi, K. Polyamines: Mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *271*, 559–564. [[CrossRef](#)]
62. Wojdasiewicz, P.; Poniatowski, Ł.A.; Szukiewicz, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 561459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Bai, S.K.; Lee, S.J.; Na, H.J.; Ha, K.S.; Han, J.A.; Lee, H.; Kwon, Y.G.; Chung, C.K.; Kim, Y.M. β -Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF- κ B activation. *Exp. Mol. Med.* **2005**, *37*, 323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Zong, Y.; Sun, L.; Liu, B.; Deng, Y.S.; Zhan, D.; Chen, Y.L.; He, Y.; Liu, J.; Zhang, Z.J.; Sun, J.; et al. Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 2647 macrophage cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 44107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Kumar, H.; Kawai, T.; Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *388*, 621–625. [[CrossRef](#)]
66. Jin, C.Y.; Lee, J.D.; Park, C.; Choi, Y.H.; Kim, G.Y. Curcumin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Acta Pharmacologica Sinica* **2007**, *28*, 1645–1651. [[CrossRef](#)]
67. Ibrahim, H.R.; Hamasaki, K.; Miyata, T. Novel peptide motifs from lysozyme suppress pro-inflammatory cytokines in macrophages by antagonizing toll-like receptor and LPS-scavenging action. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *107*, 240–248. [[CrossRef](#)]
68. Smith, S.R.; Manfra, D.; Davies, L.; Terminelli, C.; Denhardt, G.; Donkin, J. Elevated levels of NO in both unchallenged and LPS-challenged *C. parvum*-primed mice are attributable to the activity of a cytokine-inducible isoform of iNOS. *J. Leukoc. Biol.* **1997**, *61*, 24–32. [[CrossRef](#)]
69. Burns, M.R.; Wood, S.J.; Miller, K.A.; Nguyen, T.; Cromer, J.R.; David, S.A. Lysine–spermine conjugates: Hydrophobic polyamine amides as potent lipopolysaccharide sequestrants. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2523–2536. [[CrossRef](#)]
70. Burns, M.R.; Jenkins, S.A.; Wood, S.J.; Miller, K.; David, S.A. Structure–activity relationships in lipopolysaccharide neutralizers: Design, synthesis, and biological evaluation of a 540-membered amphipathic Bisamide library. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 32–43. [[CrossRef](#)]
71. Pulido, D.; Nogués, M.V.; Boix, E.; Torrent, M. Lipopolysaccharide neutralization by antimicrobial peptides: A gambit in the innate host defense strategy. *J. Innate Immun.* **2012**, *4*, 327–336. [[CrossRef](#)]
72. Jeong, J.W.; Cha, H.J.; Han, M.H.; Hwang, S.J.; Lee, D.S.; Yoo, J.S.; Choi, I.W.; Kim, S.; Kim, H.S.; Kim, G.Y.; et al. Spermidine protects against oxidative stress in inflammation models using macrophages and zebrafish. *Biomol. Ther.* **2018**, *26*, 146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Yang, D.; Zheng, X.; Wang, N.; Fan, S.; Yang, Y.; Lu, Y.; Chen, Q.; Liu, X.; Zheng, J. Kukoamine B promotes TLR4-independent lipopolysaccharide uptake in murine hepatocytes. *Oncotarget* **2016**, *7*, 57498–57513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Park, M.H.; Hong, J.T. Roles of NF- κ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells* **2016**, *5*, 15. [[CrossRef](#)]
75. Liu, T.; Zhang, L.; Joo, D.; Sun, S.C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 17023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Bonizzi, G.; Karin, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **2004**, *25*, 280–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Lawrence, T.; Fong, C. The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF- κ B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 519–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Yamamoto, Y.; Gaynor, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Investig.* **2001**, *107*, 135–142. [[CrossRef](#)]
79. Ramani, V.; Madhusoodhanan, R.; Kosanke, S.; Awasthi, S. A TLR4-interacting SPA4 peptide inhibits LPS-induced lung inflammation. *Innate Immun.* **2013**, *19*, 596–610. [[CrossRef](#)]

80. Hou, Y.; Li, G.; Wang, J.; Pan, Y.; Jiao, K.; Du, J.; Chen, R.; Wang, B.; Li, N. Okanin, effective constituent of the flower tea *Coreopsis tinctoria*, attenuates LPS-induced microglial activation through inhibition of the TLR4/NF- κ B signaling pathways. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 45705. [CrossRef]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Antibacterial and Antitumoral Activities of the Spider Acylpolyamine Mygalin Silver Nanoparticles

Líliá Coronato Courrol¹ · Abraham Espinoza-Culupú² · Pedro Ismael da Silva Jr³ · Karina de Oliveira Gonçalves¹ · Flávia Rodrigues de Oliveira Silva⁴ · Monamaris Marques Borges²

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Mygalin is a synthetic analog of polyamine spermidine isolated from spider hemocytes. Polyamines show potential therapeutic activity against a wide range of human diseases such as cancer and microbial infections. In this work, we analyzed the antibacterial and antitumoral activities of Mygalin silver nanoparticles synthesized by the photoreduction method. The formation and distribution of MygAgNPs were confirmed by UV-visible spectroscopy, zeta potential, and transmission electron microscopy. The obtained nanoparticles were mostly spherical with a particle size distribution in the range of ~10–60 nm. We have demonstrated that MygAgNPs increased the effectiveness of the native Mygalin by approximately 6400-fold. Cytotoxicity tests were performed, and it was possible to reach a concentration that was not toxic to healthy cells (NHI-3T3) and at the same time toxic to the tumor cell line (MCF-7). The obtained results suggest that this system shows potential enhanced antibacterial activity against *Escherichia coli*, DH5 α and anticancer activity against MCF-7 cell line.

Keywords Antibacterial polyamine · Mygalin · Spider acylpolyamine · Silver nanoparticles · Anticancer

1 Introduction

The global scenario of antibacterial resistance has been of great concern for public health since it can lead patients to death. In the face of continually increasing numbers of bacterial strains that present resistance to current therapies, new treatment strategies have been pursued.

Nature can show us new approaches to fight against antibacterial resistance. For example, arthropods, widespread in several places and found mainly in highly contaminated environments, can defend themselves against microorganisms and parasites by their antibacterial peptides (AMPs). Besides, several AMPs display the ability to modulate the innate immune

responses of the host and thereby indirectly promote pathogen clearance [1].

The natural AMPs present in several organisms are not stable and present toxic side effects. For clinical applications, it is necessary to develop the synthetic AMP analogs that overcome these disadvantages [2].

Synthetic Mygalin is a bis- acylpolyamine, N (1),N(8)-bis(2,5-dihydroxybenzoyl) spermine, has 417 Da and was initially isolated from hemocytes of *Acanthoscurria gomesiana* spider [3]. Mygalin exhibits a pronounced effect on splenocyte and macrophage nitric oxide production, implying a potential role in the defense against microorganisms. Mygalin is not cytotoxic to murine cells in vitro and does not affect cellular proliferation or IL-2 production in response to concanavalin A (ConA) [3].

New set-ups to develop novel antibacterial compositions can also be obtained with distinct types of nanoparticles with different sizes and shapes produced by physical, chemical, or biological methods [4–6].

Silver nanoparticles are considered the most effective nanomaterial against bacteria [7–10]. The antibacterial effect is not dependent on the size of the nanoparticles, and positive surface charge nanoparticles have higher antibacterial activity [11]. Coupling nanoparticles and natural-based antimicrobials can inhibit the activity of bacterial efflux pumps and the

✉ Líliá Coronato Courrol
 lccourrol@gmail.com

¹ Department of Physics, Federal University of São Paulo, Diadema CEP, Sao Paulo 009972-270, Brazil

² Laboratory of Bacteriology, Butantan Institute, São Paulo CEP, Sao Paulo 05503-900, Brazil

³ Laboratory for Applied Toxicology (LETA), Butantan Institute, São Paulo CEP, Sao Paulo 05503-900, Brazil

⁴ Center of Science and Materials Technology, Energetic and Nuclear Research Institute, IPENCNEN, Sao Paulo, Brazil