

## INIBIDORES DE PROTEASES PRODUZIDOS POR CIANOBACTÉRIAS: UMA REVISÃO

*Maria Estela Silva-Stenico<sup>1</sup>, Adriana Sturion Lorenzi<sup>1</sup>, Caroline Souza Pamplona Silva<sup>1</sup>, Janaina Rigonato<sup>1</sup> & Marli Fátima Fiore<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias, Av. Centenário 303, Piracicaba, SP, Brasil. CEP: 13400-970.

E-mails: [estela@cena.usp.br](mailto:estela@cena.usp.br), [asllorenz@gmail.com](mailto:asllorenz@gmail.com), [carolpamplona@gmail.com](mailto:carolpamplona@gmail.com), [jana\\_rigonato@yahoo.com.br](mailto:jana_rigonato@yahoo.com.br), [fiore@cena.usp.br](mailto:fiore@cena.usp.br)

### RESUMO

Cianobactérias produzem vários peptídeos tóxicos e não-tóxicos, alguns dos quais mostram notável atividade biológica, e por isto atraem a atenção da indústria farmacêutica. Os peptídeos que apresentam atividades contra proteases são consideravelmente estudados. As proteases estão envolvidas em uma grande variedade de processos fisiológicos no corpo humano, incluindo a progressão do ciclo celular, digestão de alimentos, angiogênese, coagulação sanguínea, regulação da pressão arterial, apresentação do antígeno, inflamação e apoptose. Assim, esforços são feitos para caracterizar esses inibidores de proteases por meio da identificação de sua estrutura, biossíntese, fisiologia, bioatividade, toxicologia e fatores que levam à sua produção. Embora um número crescente de estudos sobre cianopeptídeos e suas respectivas vias biossintéticas estejam disponibilizados, ainda são escassos os dados sobre suas funções fisiológicas ou ecológicas. Novos peptídeos, assim como novos congêneros de cianopeptídeos, continuam sendo descobertos juntamente com suas respectivas vias biossintéticas. Nesta revisão são apresentadas informações detalhadas da caracterização química, biossíntese e genética, mecanismo de ação, atividade biológica e aplicação clínica dos peptídeos inibidores de proteases aeruginosinas, cianopeptolinas e microgininas produzidos pelas cianobactérias.

**Palavras-chave:** Compostos halogenados; produtos naturais; aeruginosina; cianopeptolina; microginina.

### ABSTRACT

**PROTEASE INHIBITORS PRODUCED BY CYANOBACTERIA: A REVIEW.** Cyanobacteria produce various toxic and non-toxic peptides, some of which show remarkable biological activity, and thus have attracted the attention of the pharmaceutical industry. The peptides that have activities against protease have been considerably studied. Proteases are involved in a wide variety of physiological processes in the human body, including cell cycle progression, digesting food, angiogenesis, blood clotting, blood pressure regulation, antigen presentation, inflammation and apoptosis. Therefore, efforts have been made to characterize these protease inhibitors by identifying their structure, biosynthesis, physiology, bioactivity, toxicology and factors that regulate their production. Although a growing number of studies on cyanopeptides and their biosynthetic pathways are being made available, there are still scarce data on their physiological or ecological functions. New peptides, as well as new congeners of cyanopeptides, are being discovered along with their respective biosynthetic pathways. This review presents detailed information on the chemical characterization, biosynthesis and genetic, mechanism of action, biological activity and clinical application of peptide protease inhibitors aeruginosins, cyanopeptolins and microginins produced by cyanobacteria.

**Keywords:** Halogenated compounds; natural products; aeruginosin; cyanopeptolin; microginin.

### RESUMEN

**INHIBIDORES DE PROTEASAS PRODUCIDOS POR CIANOBACTERIAS: UNA REVISIÓN.** Las cianobacterias producen varios péptidos tóxicos y no tóxicos, algunos de los cuales exhiben una marcada

actividad biológica, por esto atraen la atención de la industria farmacéutica. Los péptidos que tienen actividad anti proteasa han sido considerablemente estudiados. Las proteasas están envueltas en una amplia variedad de procesos fisiológicos en el cuerpo humano, incluyendo la progresión del ciclo celular, la inflamación y la apoptosis. Además, se han hecho esfuerzos para caracterizar estos inhibidores de proteasas por medio de la identificación su estructura, biosíntesis, fisiología, biactividad, toxicología y factores que regulan su producción. Si bien existe un número creciente de estudios de cianopéptidos y sus respectivas vías biosintéticas están disponibles, todavía hay pocos datos sobre sus funciones fisiológicas y ecológicas. Nuevos péptidos, así como también nuevos congéneres de cianopéptidos, continúan siendo descubiertos junto con sus respectivas vías biosintéticas. En esta revisión se presentan informaciones detalladas de las características químicas, biosintéticas y genéticas, mecanismos de acción, actividad biológica y aplicaciones clínicas de los péptidos inhibidores de proteasas aeruginosinas, cianopeptolinas e microgininas producidas por las cianobacterias.

**Palabras clave:** Compuestos halogenados; productos naturales; aeruginosina; cianopeptolina; microginina.

## INTRODUÇÃO

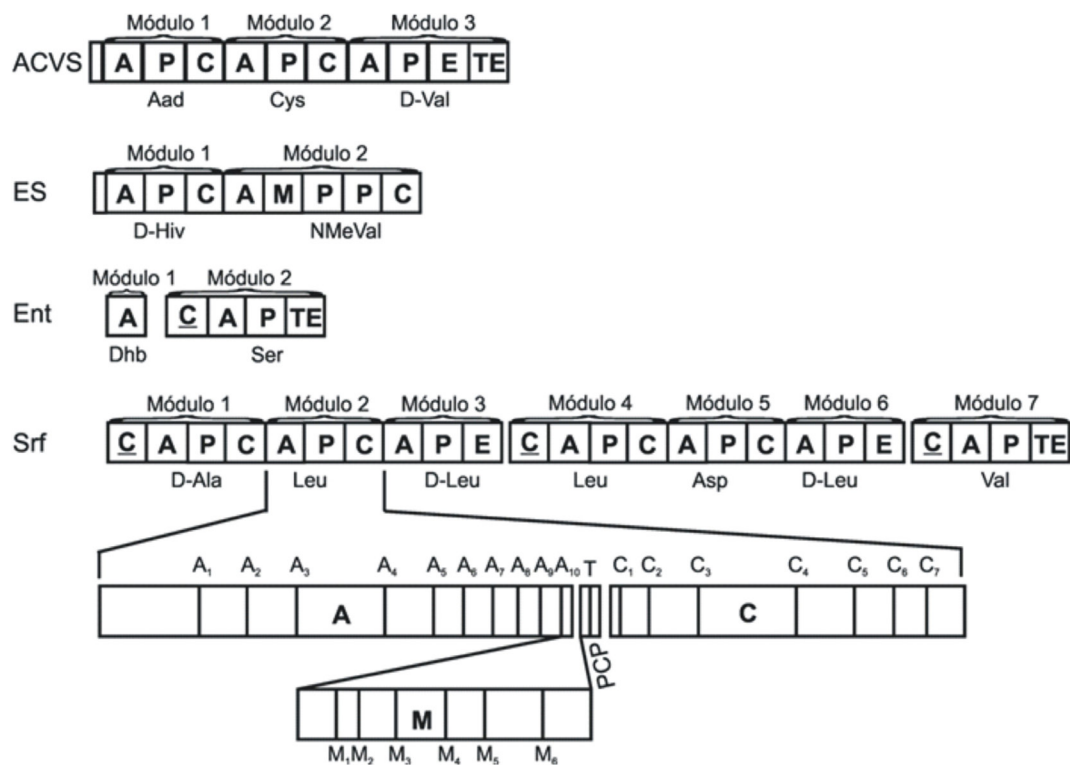
As cianobactérias compreendem um grupo de micro-organismos diverso e abundante dentro do domínio Bacteria, capazes de realizar fotossíntese oxigênica e fixar nitrogênio atmosférico (Castenholz 2001). Evidências paleontológicas, geológicas, geoquímicas e isotópicas indicam que esses organismos já existiam na Terra há aproximadamente 3.500 milhões de anos (Schopf 1996). Investigações conduzidas durante a última década mostraram que as cianobactérias são fontes potenciais de produtos naturais bioativos, sendo que substâncias com ação citotóxica, antifúngica, antibacteriana e antiviral foram identificadas (Burja *et al.* 2001). Alguns desses produtos naturais são toxinas prejudiciais à saúde de humanos, como microcistinas (Rinehart *et al.* 1994), saxitoxinas (Lagos *et al.* 1999), anatoxinas (Namikoshi *et al.* 2003, Watanabe *et al.* 2003) e lyngbyatoxinas (Cardellina *et al.* 1979), dentre outros. Além das toxinas, diversos outros compostos de cianobactérias possuem aplicações terapêuticas com atividade anticancerígena (Gerwick *et al.* 1994, Wrasidlo *et al.* 2008), antibiótica (Burja *et al.* 2001) e anti-inflamatória (Villa *et al.* 2010). A maioria dessas moléculas bioativas é sintetizada por enzimas gigantes, contendo multi-domínios, denominadas peptídeo sintetases não ribossômicas (NRPS, do inglês *Non-Ribosomal Peptide Synthetase*) e policetídeo sintases (PKS, do inglês *Polyketide Synthase*) (EtcheGARAY *et al.* 2004). As NRPSs funcionam como uma linha de montagem industrial, ou seja, os aminoácidos que constituem a estrutura do peptídeo são incorporados sequencialmente, por meio de uma série de reações

enzimáticas parciais e repetitivas. As NRPSs são arranjadas em estrutura modular, na qual cada módulo é um bloco funcional independente, que realiza um ciclo de elongação peptídica. Para a incorporação de um aminoácido em uma NRPS, a enzima utiliza um módulo composto por cerca de 1.000 aminoácidos, o qual é subdividido em regiões menores envolvidas em reações enzimáticas específicas, denominadas domínios. Cada domínio apresenta funções distintas, tais como: adenilação (domínio A), tioesterificação (domínio T ou PCP, de proteína carreadora de peptídeos, do inglês *Peptidyl Carrier Protein*) e condensação (domínio C) (von Döhren *et al.* 1997, Marahiel *et al.* 1997, EtcheGARAY 1998). O domínio A incorpora um substrato de aminoácido específico, um aminoacil adenilato que, em seguida, é ligado covalentemente à 4'-fosfopantoteína do domínio PCP para formar um tioéster, denominado aminoacil-S-PCP. O domínio C, então, catalisa a formação da ligação entre dois aminoacil-S-PCPs para produzir um dipeptídeo. Durante a elongação da cadeia, os peptídeos intermediários permanecem covalentemente ligados às PCPs. Domínios adicionais também foram identificados como responsáveis pela modificação da cadeia de peptídeos, como por exemplo, o domínio de epimerização (E), o qual promove a conversão de L para D-aminoácidos. Um domínio tioesterase (TE) é usualmente encontrado ao final da NRPS para a clivagem de peptídeos da enzima ao final da biossíntese.

As PKSs tipo I, assim como as NRPSs, também apresentam estrutura modular que funciona como pequenos blocos de construção. Acetato e ácidos carboxílicos pequenos são substratos para as PKSs

(ativados como o acil-S-ACP) e, assim como na síntese de ácidos graxos, sofrem condensações decarboxilativas sequenciais (Hopwood 1997, Staunton & Weissman 2001). As PKSs tipo I são responsáveis pela biossíntese de substâncias macrocíclicas. Elas são enzimas multifuncionais estruturalmente organizadas em módulos e cada módulo possui diversos sítios ativos distintos, chamados domínios, responsáveis por cada passo enzimático. Nas PKSs tipo I de bactérias, um módulo é geralmente responsável por um ciclo de elongação policetídic e modificações associadas (Staunton & Weissman 2001). Os módulos de PKS consistem nos domínios  $\beta$ -cetoacil sintase (KS), uma aciltransferase (AT) e uma proteína carreadora de acil (ACP, do inglês *Acyl Carrier Protein*). Muitas PKSs também

contêm domínios adicionais, como  $\beta$ -cetoacil redutase (KR), desidratase (DH), enoil redutase (ER) e metiltransferase (MT) (Figura 1). A elongação de policetídeos intermediários está relacionada à ligação do substrato ao domínio ACP via cofator 4'-fosfopantotênico (Lambalot *et al.* 1996, Walsh *et al.* 1997), similar às NRPSs. Normalmente, o domínio da TE está localizado no último módulo e é responsável pela liberação da substância sintetizada. Reações químicas semelhantes ocorrem na elongação tanto de cadeias de peptídeo (produzidas por NRPSs), como de policetídeo (produzidas por PKSs). Ainda, módulos de PKS podem integrar-se com módulos de NRPS formando sistemas híbridos (NRPS/PKS). Nestes sistemas a condensação ocorre através do domínio de cetossintase da PKS, entre um ácido carboxílico e



**Figura 1.** Organização modular de peptídeo sintetases. Módulos em NRPSs possuem como estrutura básica os domínios de adenilação (A), tioesterificação (P ou PCP, proteína carreadora de peptídeos) e condensação (C). Outros domínios incluem o de condensação (C), epimerização (E), tioesterase (TE) e de N-metiltransferase (M). Sequências conservadas dos domínios A, PCP e C estão indicadas, por exemplo, de A1 a A10. Conforme indicado, quando presente, o domínio M está inserido entre os domínios A e PCP. Sítios de sequência conservada no domínio M estão indicados pelos números 1 a 6. Representando a família de peptídeo sintetases, tem-se a organização modular das enzimas ACVS ( $\delta$ -L- $\alpha$ -aminoadipil-L-cisteinil-D-valina sintetase), ES (eniatina sintetase), Ent (enterobactina sintetase), Srf (surfactina sintetase), onde estão indicados os módulos e os aminoácidos que são incorporados na estrutura dos peptídeos pela atividade enzimática de cada módulo (Figura adaptada de von Döhren *et al.* 1997).

**Figure 1.** Modular organization of peptide synthetases. NRPS modules have its minimal architecture composed by domains such as adenylation (A), thioesterification (P or PCP, peptidyl carrier protein) and condensation (C). Other domains include condensation (C), epimerization (E), thioesterase (TE) and N-methyl-transferase (M). Conserved sequences of the A, PCP and C domains are indicated, for example, in A1 to A10. As indicated, when present, the M domain is inserted between the A and PCP domains. Sites of conserved sequences within the M domain are indicated by numbers 1 to 6. The peptide synthetase family represented here are the modular organization of ACVS ( $\delta$ -L- $\alpha$ -aminoadipyl-L-cysteinyl-D-valine synthetase) enzymes, ES (eniatin synthetase), Ent (enterobactin synthetase), Srf (surfactin synthetase), where modules and the aminoacids that are incorporated in the peptide structure by the enzymatic activity of each module are indicated (Figure adapted from von Döhren *et al.* 1997).

um aminoácido. No entanto, a condensação entre um aminoácido e um ácido carboxílico é realizada pelo módulo da NRPS.

Existem algumas ocorrências únicas envolvidas no metabolismo secundário de cianobactérias. Essas puderam ser descritas devido à eficácia de técnicas como isótopos estáveis e ensaios bioquímicos, sendo confirmadas por ferramentas de bioinformática e sequenciamento de genomas. Dentre essas transformações únicas, pode-se citar a halogenação, que é uma reação química onde um átomo de hidrogênio é substituído por um átomo do grupo dos halogênios. Mais de um átomo de halogênio pode ser incorporado na mesma molécula, como por exemplo, a adição de um, dois ou três átomos de cloro, denominada mono, di ou tricloração, respectivamente. A halogenação de compostos orgânicos pode ocorrer a partir da haloperoxidase (via peróxido de hidrogênio-dependente) ou halogenase (enzima oxigênio-dependente) por meio de hipohaleto reativo. Ainda, carbonos não ativados podem também ser halogenados por enzimas que realizam a incorporação direta de ânions haleto (Hopwood 1997, Perrin *et al.* 2007, Eustaquio *et al.* 2008).

Domínios responsáveis pela monocloração das moléculas híbridas de NRPS/PKS curacina A1 e jamaicamida 2 são codificados pelos genes *curA* e *jamE*, respectivamente (Gu *et al.* 2009). Já na formação de hectoclorina 3, um diclorinato híbrido de NRPS/PKS, produzido por *Lyngbya majuscula*, ocorre o processo de dicloração (Marquez *et al.* 2002). Tricloração foi observada na formação da barbamida 4, produto natural também produzido por *L. majuscula*. Nesse caso, o início da biossíntese ocorre pela incorporação de uma unidade do aminoácido leucina (Sitachita *et al.* 2000) e o composto formado possui três átomos de cloro em um único átomo de carbono, produzindo um grupo triclorometil (Chang *et al.* 2002). A *L. majuscula* produz jamaicamida A, a qual passa por um processo de bromação. Esse composto, além de uma molécula de cloreto de vinila, também possui um átomo de halogênio na forma incomum de um brometo de alquila (Edwards *et al.* 2004). Outra modificação estrutural em produtos naturais de cianobactérias diz respeito à incorporação de grupos metila. Exemplos desta variação podem ser encontrados nos produtos da *L. majuscula*, como

curacina A1 e barbamida 4. A metilação mais comum é a *N*-metilação de aminoácidos, encontrada em 17% de todos os produtos naturais de cianobactérias marinhas e de água doce (Tidgewell *et al.* 2010), sendo que esta reação pode ocorrer pela via S-adenosil metionina em cianobactérias.

Os peptídeos produzidos por cianobactérias podem ser classificados conforme suas estruturas químicas e, desta forma, encontram-se divididos em classes de acordo com suas propriedades estruturais. Dentre essas se encontram os inibidores de proteases como: aeruginosinas (46 variantes), cianopeptolinas (129 variantes) e microgininas (36 variantes). A terminologia desses peptídeos é bastante diversa em decorrência da publicação quase simultânea de vários estudos conduzidos no mesmo ano por diferentes autores. Além disso, muitos utilizam designações tanto do táxon do qual o peptídeo foi isolado (por ex. micro-, anabaeno-), como da localização geográfica na qual a amostra foi coletada, em associação a sufixos que se referem a propriedades estruturais do composto isolado (por ex. -peptina, -peptilida, -ciclina, -ciclâmida). Os sufixos desses termos, em geral, se referem ao número da linhagem, por ex. anabaenopeptilida 90-A, isolada de *Anabaena* 90 (Fujii *et al.* 1996); à origem de uma amostra, por ex. micropeptina T, do lago Teganuma (Kodani *et al.* 1999); ou à massa, por ex. micropeptina SF995 (Banker & Carmeli 1999), onde as letras SF se referem à lagoa central do Parque Safári de Tel Aviv, e 995 à massa em Dalton.

Novos peptídeos vêm sendo descobertos com o avanço das pesquisas. No entanto, a denominação dessas moléculas não segue um sistema de nomenclatura, e assim muitos peptídeos similares apresentam nomes que não conferem similaridade, ou ainda nomes semelhantes são dados para estruturas diferentes, por exemplo: microcina SF608, uma aeruginosina isolada de uma floração de *Microcystis* (Banker & Carmeli 1999) e microcina J25, um resíduo de um antibiótico de *Escherichia coli* (Blond *et al.* 1999). Em outro exemplo, tem-se a aeruginosina A, descrita como um pigmento de *Pseudomonas aeruginosa* (Holliman 1969) e também descrita como um tetrapéptido linear, inibidor de protease e produzido por cianobactéria (Murakami *et al.* 1995).

## AERUGINOSINAS

Aeruginosina foi primeiramente isolada de *Microcystis aeruginosa* por Murakami *et al.* (1994). As aeruginosinas são peptídeos lineares naturais, caracterizados estruturalmente, em sua maioria, pela presença de quatro subunidades: um grupo aminoácido N-terminal (ácido 3-4 hidroxifenil láctico – Hpla), um aminoácido hidrofóbico, um resíduo central 2-carboxi-6-hidroxi-octahidroindol (Choi) e um grupo com uma guanidina C-terminal (Hanessian *et al.* 2006, Ersmark *et al.* 2008, Nie & Wang 2008, Ishida *et al.* 2009) (Figura 2A). Modificações podem ocorrer nas subunidades Hpla (monocloração, dicloração e sulfatação) e Choi (sulfatação, glicosilação e cloração). Sendo assim, o número de variantes possíveis de serem encontradas seria cerca de 500, no entanto, apenas uma pequena fração é conhecida até o momento.

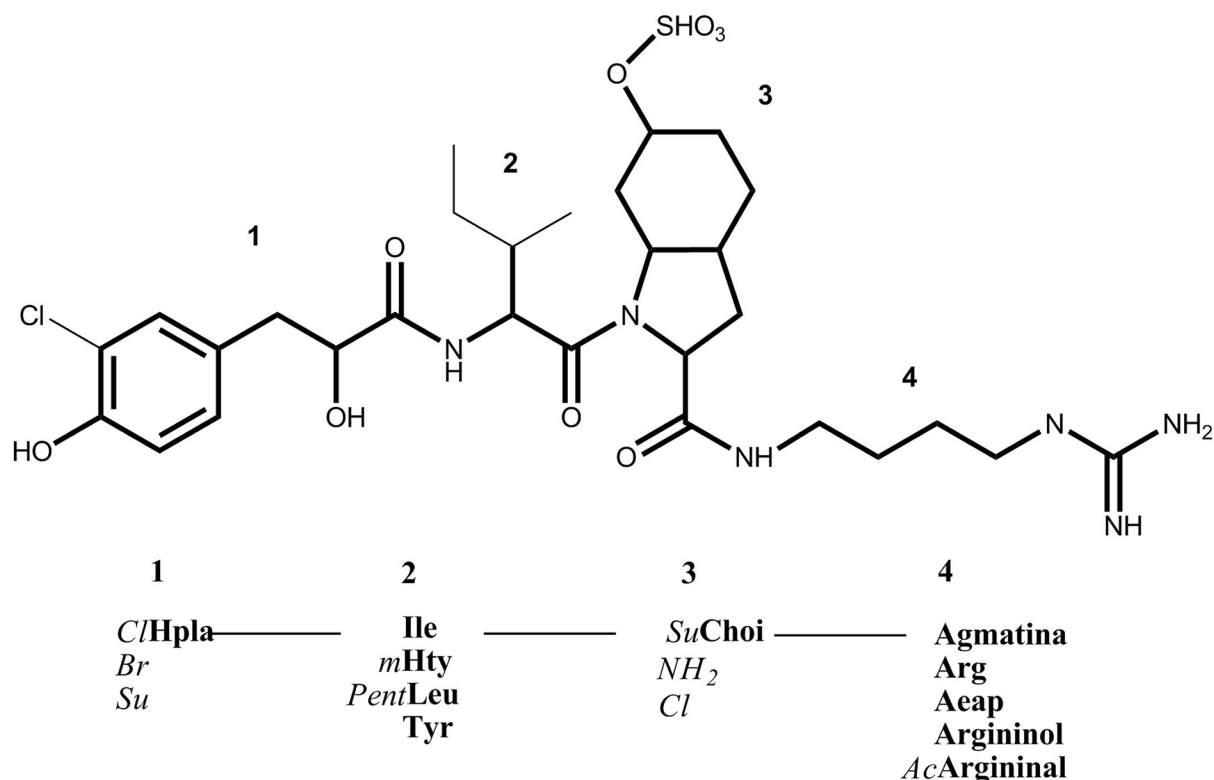
Os derivados da arginina C-terminal são: agmatina, proveniente de arginina por descarboxilação; argininol, originado da arginina pela redução do grupo carboxi em um álcool; ou argininal, derivado de um argininol por uma ciclização (Matsuda *et al.* 1996, Banker & Carmeli 1999, Ishida *et al.* 1999). A unidade Hpla é

um composto prontamente disponível para NRPS a partir do metabolismo da tirosina, e é encontrado na configuração D na maioria dos congêneros. A porção Choi tem sido sintetizada *in vitro* a partir da tirosina, no entanto, não foi ainda demonstrado que a tirosina é o precursor na biossíntese do peptídeo (Valls *et al.* 2001).

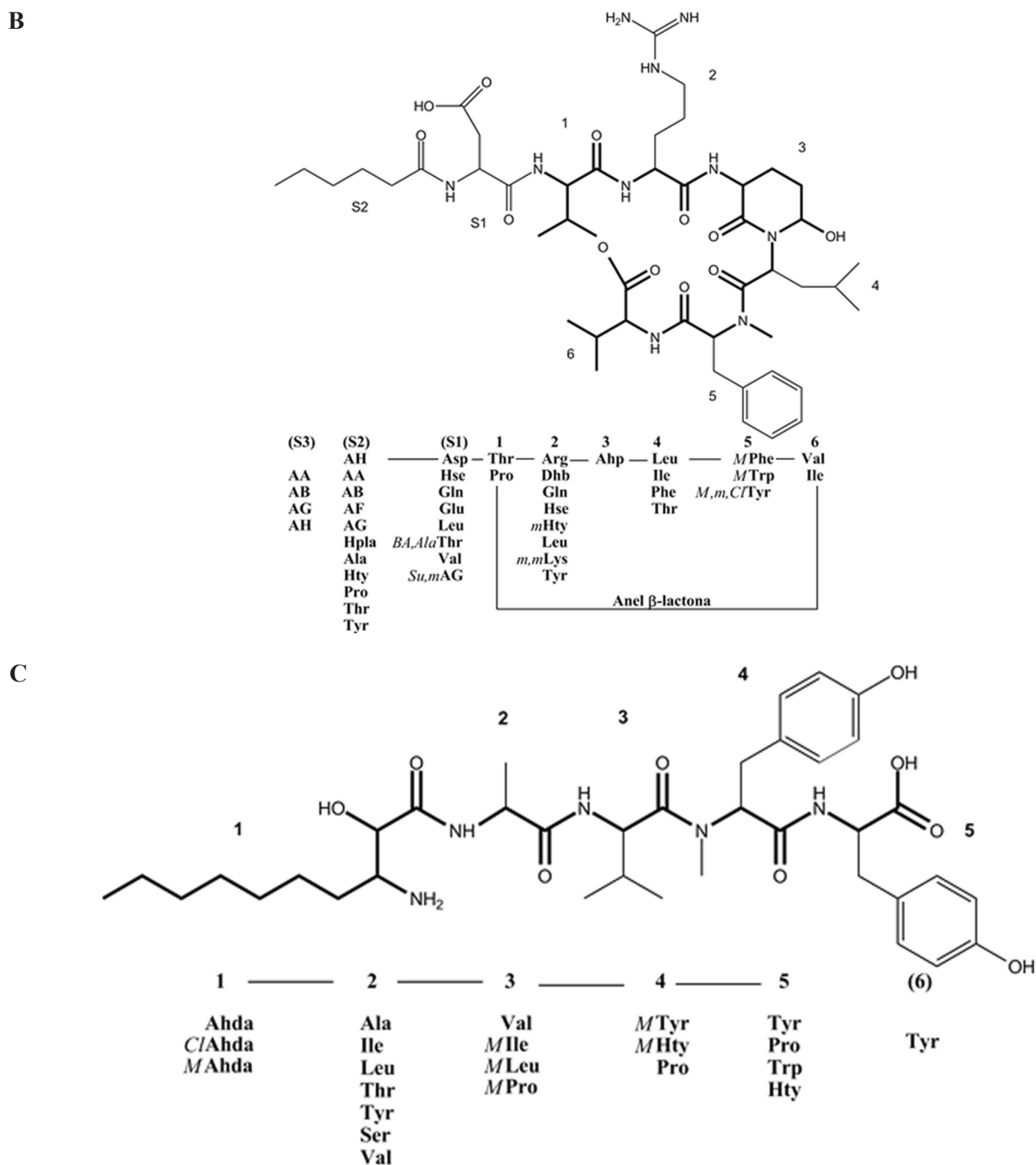
O arranjo estrutural desse peptídeo, bem como suas características funcionais, é responsável pela afinidade desta molécula pelo sítio catalítico de enzimas serina proteases como, por exemplo, tripsina, trombina e outras serina proteases envolvidas na cadeia de reações da coagulação sanguínea (Ersmark *et al.* 2008), fato este que demonstra a importância dos estudos desta molécula. A maioria das aeruginosinas compartilha a mesma estereoquímica e padrão de substituição, embora existam relatos de algumas exceções (Ishida *et al.* 2009).

Vários congêneros de aeruginosinas exibem diversos níveis de atividade inibitória contra trombina (EC 3.4.21.5), a penúltima enzima na cadeia de reações da coagulação sanguínea, que converte fibrinogênio em monômeros de fibrinas solúveis e ativa o processo de agregação plaquetária (Prager *et al.* 1995). Essas moléculas também apresentam atividade inibitória

A







**Figura 2.** Estrutura química dos cianopeptídeos inibidores de proteases: A) aeruginosina 98-A (Murakami *et al.* 1995); B) cianopeptolina A (Martin *et al.* 1993); C) microginina (Okino *et al.* 1993). 3-aminoetil-1-N-amidino-D-3-pirrolina (Aeap), ácido acético (AA), ácido butanóico (AB), ácido hexanóico (AH), ácido octanóico (AO), ácido glicérico (AG), ácido fórmico (AF). Linhas em negrito na estrutura plana representam as partes conservadas da molécula que podem ser encontradas em todos ou na maioria das congêneros; linhas finas referem-se às partes variáveis. Na estrutura, todos os aminoácidos e outros resíduos encontrados nas respectivas posições da molécula estão listados juntamente com as eventuais modificações (Cl, cloração; Br, bromação; Su, sulfatação; Pent, glicosilação; M,  $\alpha$ -aminometilação; m, O-metilação). A primeira linha representa a estrutura plana. Os aminoácidos estão em códigos de três letras, incluindo homovariantes de aminoácidos proteogênicos. No caso da cianopeptolina, a numeração da cadeia lateral está na ordem inversa e S1 é a fração ao lado da Thr (1). A biossíntese começa a partir da cadeia lateral e termina em 6. Estruturas adaptadas de Welker & von Döhren (2006).

**Figure 2.** Chemical structure of cyanopeptides protease inhibitors: A) aeruginosin 98-A (Murakami *et al.* 1995); B) cyanopeptolin A (Martin *et al.* 1993); C) microginin (Okino *et al.* 1993). 3-aminoethyl-1-N-amidino-D-3-pyrroline (Aeap), acetic acid (AA), butanoic acid (AB), hexanoic acid (AH), octanoic acid (AO), glyceric acid (AG), formic acid (AF). Lines in bold in the flat structure represent the conserved parts of the molecule that can be found in all or most congeners; thin lines refer to variable parts. In the structure, all amino acid and other residues found in the respective positions of the molecule are listed together with any modifications (Cl, chlorination; Br, bromination; Su, sulfation; Pent, glycosylation; M,  $\alpha$ -aminomethylation; m, O-methylation). The first line represents the flat structure. Amino acids are in three-letter codes, including homovariants of proteinogenic amino acids. For cyanopeptolin, the side chain is numbered in a reverse order and S1 is the fraction next to Thr (1). The biosynthesis starts from the side chain and ends at 6. Structures were adapted from Welker & von Döhren (2006).

contra outros fatores de coagulação vitais na homeostase (Pfau 2003). As implicações medicinais da identificação de novas, potentes e seletivas moléculas inibidoras de serina proteases estimulam o desenvolvimento de metodologias eficientes para a síntese de subunidades de aeruginosinas, bem como análogos para avaliações biológicas por vários grupos de pesquisa (Fukuta *et al.* 2004, Hanessian *et al.* 2005).

Mais de 20 compostos relacionados estruturalmente e farmacologicamente com aeruginosina 298A foram citados por Ersmark *et al.* (2008), sendo produzidos por organismos de diversos biomas no globo terrestre, além de florações de *Microcystis* (Hanessian *et al.* 2006). Posteriormente à descrição de aeruginosina isolada de *M. aeruginosa*, membros do gênero *Planktothrix* e de esponjas marinhas da família Dysideidae mostraram-se produtoras da estrutura nuclear *cis*-Choi (Ersmark *et al.* 2008). A síntese total de seis aeruginosinas de cianobactérias já foi descrita (Valls *et al.* 2000, Ohshima *et al.* 2003), sendo que quatro destas tiveram suas estruturas originalmente propostas revisadas (Ersmark *et al.* 2008). Vários trabalhos sobre a produção de variantes sintéticas desse peptídeo foram publicados (Valls *et al.* 2000, Ohshima *et al.* 2003, Radau *et al.* 2003, Fukuta *et al.* 2004, van Wagonen *et al.* 2006). Nie & Wang (2008) sintetizaram dois análogos de aeruginosina 298-A, nos quais a unidade L-Choi foi substituída por um anel peridroindol-2-ácido carboxílico oxigenado. As variantes de Choi foram sintetizadas a partir de D- e L-glicose, respectivamente. Análogos de O-Choi também foram produzidos usando D-galactose (Ella-Menye *et al.* 2008).

Aeruginosinas são também conhecidas como microcina (Banker & Carmeli 1999), spumigina (Fujii *et al.* 1997) ou oscilarina (Hanessian *et al.* 2004). Aeruginosina 298A, isolada de *M. aeruginosa* NIES-298, foi a primeira molécula descrita como inibidora de protease da classe das aeruginosinas (Murakami *et al.* 1995). Esse cianopeptídeo contém quatro subunidades: Hpla, leucina, Choi central e arginina reduzida (Argol). Também foram descritas duas novas variantes de aeruginosina (98A e 98B), isoladas de *M. aeruginosa* NIES-98 (Murakami *et al.* 1995).

Ploutno *et al.* (2002) descreveram o menor inibidor de protease isolado de uma floração de *M. aeruginosa*, a aeruginosina EI461. A biossíntese dessa molécula foi posteriormente descrita, bem como a sugestão de correção da estrutura proposta (Valls *et al.* 2003).

Matsuda *et al.* (1996) isolaram novos inibidores de trombinas produzidos pela linhagem *Microcystis viridis* NIES-102 (aeruginosinas 102A e 102B), sendo que suas estruturas foram elucidadas e a mesma fórmula molecular (C<sub>33</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>S) foi descrita para ambos os peptídeos. Entretanto, a diferença entre eles está na presença de D-Argal para 102A e L-Argal para 102B. Também foi isolada e caracterizada a aeruginosina 103-A, produzida por *M. viridis* NIES-103, com ação inibidora de trombina (Kodani *et al.* 1998).

Ishida *et al.* (1999) descreveram cinco novos inibidores de proteases relacionados com aeruginosina 298A: aeruginosina 98C e 101 que diferem da 298A na unidade Hpla; aeruginosina 298B (a qual não possui a unidade argininol) e aeruginosina 89A e 89B, que foram observadas como tautômeros por cromatografia líquida devido à presença de formas L- e D-argininal, respectivamente. Banker & Carmeli (1999) reportaram a descoberta da microcina SF608 e, pela combinação de ressonância magnética nuclear em duas dimensões (2D RMN) e análises de cromatografia líquida, a estrutura desta molécula foi completamente elucidada, apresentando grandes semelhanças com aeruginosina 298A.

Três novas variantes de aeruginosina (686, 602 e 670) foram descritas por Welker *et al.* (2006) em colônias de *Microcystis*, originadas de reservatórios da República Tcheca. Para essas mesmas colônias foram encontradas outras dez isoformas de aeruginosina, sendo que a variante 686 também foi relatada para *M. aeruginosa* PCC7806 (Ishida *et al.* 2009).

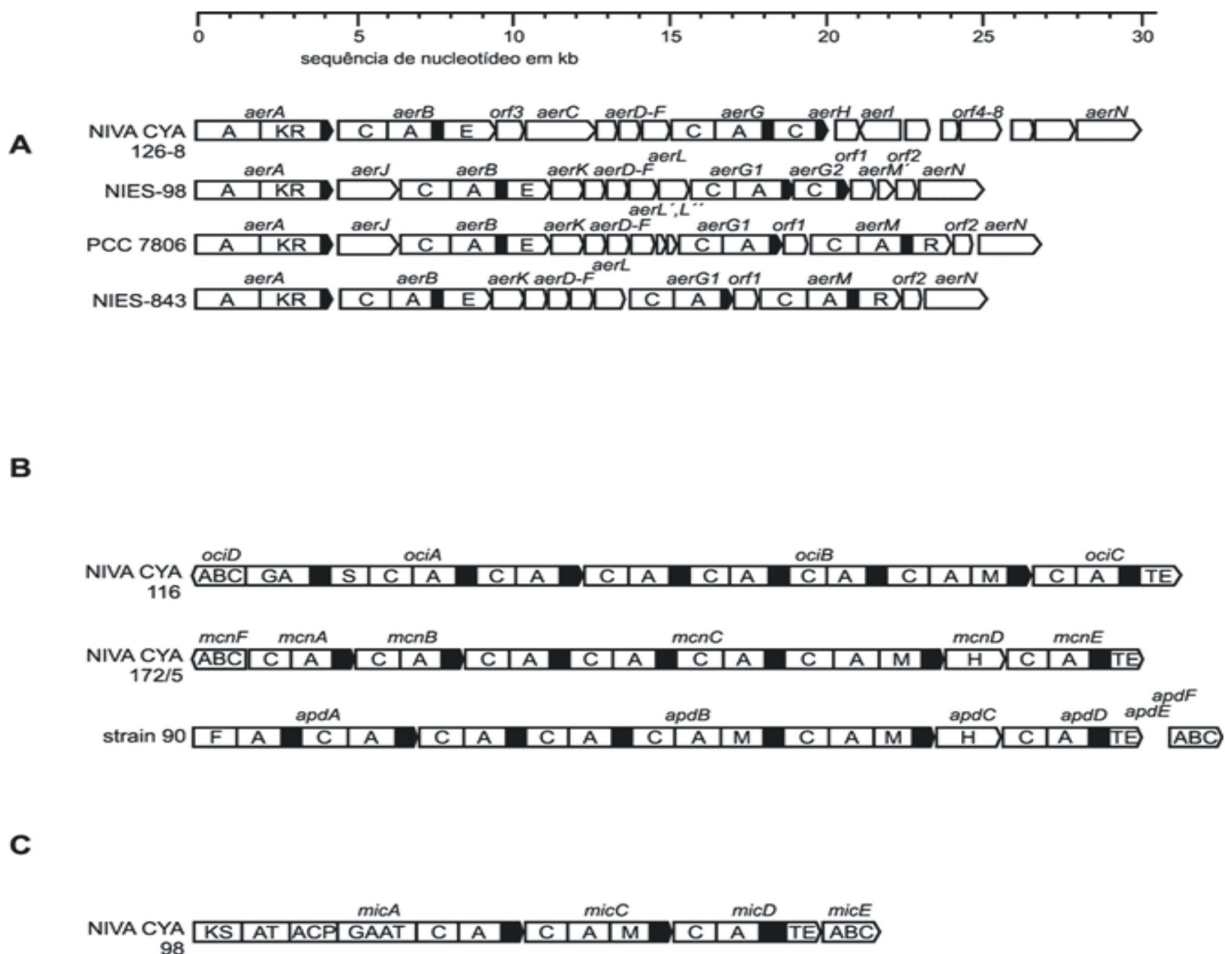
Além do gênero *Microcystis*, também foi descrita a produção de inibidores de proteases aeruginosina 205A e 205B por *Planktothrix*. Esses peptídeos estão entre os menores produtos naturais contendo açúcar, isolados de cianobactérias, conhecidos como aeruginosinas glicopeptídicas (Ersmark *et al.* 2008). Também para *Planktothrix aghardii* foi descrita oscilarina como o terceiro membro da classe das aeruginosinas, a qual contém uma subunidade amidinopirrolina como resíduo no lugar de arginina. Sua estrutura foi revista por Hanessian *et al.* (2004), bem como sua síntese total. *Planktothrix aghardii* NIVA CYA 126-8 demonstrou ser produtora dos peptídeos 126A e B descritos por Ishida *et al.* (2007). A metodologia de extração para várias aeruginosinas foi detalhadamente reportada por Ishida *et al.* (1999).

Dois isômeros derivados de aeruginosina foram caracterizados para uma linhagem brasileira, *Radiocystis fernandoi* SPC714, que também é produtora de hepatotóxina microcistina (Lombardo *et al.* 2006).

### BIOSSÍNTESE E GENÉTICA

O agrupamento gênico envolvido na produção de aeruginosina foi descrito para quatro linhagens de

cianobactérias e os genes denominados de *aerA-N*. No entanto, a presença destes genes, bem como sua distribuição dentro do agrupamento, podem variar de acordo com a linhagem. O agrupamento gênico *aer* foi sequenciado em três linhagens de *Microcystis* (Kaneko *et al.* 2007, Frangeul *et al.* 2008, Ishida *et al.* 2009) e uma *Planktothrix* (Ishida *et al.* 2009) (Figura 3A), sendo que o seu tamanho total é de 25 kb em *M. aeruginosa* NIES-98 e NIES-843, e de 27 kb em *M. aeruginosa* PCC7806 (Ishida *et al.* 2009), enquanto



**Figura 3.** A) Agrupamento gênico da biossíntese de aeruginosina de *Planktothrix agardhii* NIVA CYA 126-8 e três linhagens de *Microcystis* (NIES-98, PCC7806 e NIES-843). Os genes são nomeados como *aerABCDEFGHIJKLMN*. Genes NRPS estão marcados de acordo com suas funções. Os domínios envolvidos são: adenilação (A), condensação (C), epimerização (E), cetoreductase (KR) e reductase (R) (Ishida *et al.* 2009). B) Agrupamento dos genes *oci* de *Planktothrix* NIVA CYA 116, *mcn* de *Microcystis* NIVA CYA 172/5 e *apd* de *Anabaena* strain 90, todos codificando cianopeptolina sintetases. Os domínios envolvidos são: A, C, metiltransferase (M), sulfotransferase (S), halogenação (H) e tioesterase (TE). O gene para o transportador ABC está localizado anterior aos genes de sintetase e está transcrito em direções opostas nos agrupamentos gênicos *oci* e *mcn*, onde aparece posterior ao agrupamento *apd* (Roungue *et al.* 2008). C) Agrupamento gênico da biossíntese de microginina de *Planktothrix* NIVA CYA 98 (Roungue *et al.* 2009). Os domínios envolvidos são: cetoacilssintase (KS), aciltransferase (AT), proteína carreadora de acil (ACP), glutamato semialdeído aminotransferase (GAAT). A porção em preto representa domínios de tioilação. Os domínios estão apresentados com abreviações da primeira letra. **Figure 3.** A) *Aeruginosin biosynthesis gene clusters* from *Planktothrix agardhii* NIVA CYA 126-8 and three *Microcystis* strains (NIES-98, PCC7806 and NIES-843). The genes are named *aerABCDEFGHIJKLMN*. NRPS genes are marked according to their functions. The domains are: adenylation (A), condensation (C), epimerization (E), ketoreductase (KR) and reductase (R) (Ishida *et al.* 2009). B) Cluster of *oci* gene from *Planktothrix* NIVA CYA 116, *mcn* from *Microcystis* NIVA CYA 172/5 and *apd* from *Anabaena* strain 90, all coding cyanopeptolin synthetases. The domains are: A, C, methyltransferase (M), sulfotransferase (S), halogenation (H) and thioesterase (TE). The gene for the ABC transporter is placed before the synthetase genes and is transcribed in the opposite direction in the *oci* and *mcn* gene clusters, where appears downstream of the *apd* cluster (Roungue *et al.* 2008). C) *Microginin biosynthesis gene cluster* from *Planktothrix* NIVA CYA 98 (Roungue *et al.* 2009). The domains are: ketosynthase (KS), acyltransferase (AT), acyl carrier protein (ACP), glutamate semialdehyde aminotransferase (GAAT). The black portion represents thiolation domains. The domains are presented with the first letter abbreviations.



que em *P. agardhii* NIVA CYA 126/8 o agrupamento gênico apresenta 35 kb (Ishida *et al.* 2007).

A presença do agrupamento gênico *aer* em linhagens distantes filogeneticamente, como *Microcystis* e *Planktothrix*, indica que ele possa ter origem em um ancestral comum. O polimorfismo dos genes homólogos desse agrupamento gênico nas quatro linhagens de cianobactéria demonstra que eles evoluíram independentemente. Ainda, é verificada uma maior similaridade entre as sequências gênicas das linhagens de *Microcystis* do que com *Planktothrix*. Entretanto, foi verificado que alguns isolados destes gêneros não produzem este peptídeo, sugerindo a ocorrência de repetidas perdas gênicas (Rantala *et al.* 2004) ou ainda inativação dos genes envolvidos na síntese de aeruginosina (Christiansen *et al.* 2006).

Em todos os agrupamentos gênicos de *Microcystis*, o primeiro gene *aerA* codifica para um sistema híbrido (NRPS/PKS) e os genes *aerB* e *aerG1* codificam para módulos de NRPS. Esses genes também estão presentes em *Planktothrix*, sendo que o gene *aerG1* corresponde à porção 5' do *aerG*. *Microcystis aeruginosa* NIES-98 apresenta o gene *aerG2*, em homologia à porção final de *aerG* de *Planktothrix* (Ishida *et al.* 2009) (Figura 3). Foram encontrados genes para halogenases, glicosiltransferases e sulfotransferases (Cadel-Six *et al.* 2008). Esses mesmos autores, ao avaliarem 28 linhagens de *Microcystis*, encontraram genes *aer* para 22 dessas linhagens. Outra evidência da presença desses genes foi pela detecção dos peptídeos, nas formas cloradas ou não, por análise em espectrometria de massas, indicando que esse agrupamento gênico está bastante distribuído dentro do gênero *Microcystis*.

Posterior ao gene *aerB*, somente nos isolados de *Microcystis*, encontra-se o gene *aerK*. Entre os genes *aerA* e *aerB*, nas linhagens *M. aeruginosa* NIES-98 e PCC7806, existe um gene que codifica uma halogenase putativa, *aerJ* (Cadel-Six *et al.* 2008), sendo que este gene está ausente na *M. aeruginosa* NIES-843 e na *P. agardhii* NIVA CYA 126-8. As regiões intergênicas anterior e posterior ao gene *aerJ* apresentam mais de 90% de identidade mesmo em linhagens onde este gene não está presente. O gene *aerJ* em *Microcystis* apresenta conteúdo GC pouco menor do que o encontrado no genoma total. Assim, é sugerido que esse gene tenha sido adquirido pelas linhagens de *Microcystis*

também por transferência lateral de genes (Ishida *et al.* 2009). Uma clara correlação entre a presença desse gene com a produção de variantes contendo cloro foi encontrada; no entanto, pequenas exceções foram observadas. Welker *et al.* (2006) observaram em amostras ambientais a presença de congêneros com variações no número de cloro nas moléculas de aeruginosinas encontradas.

Os genes *aerDEF* são comuns aos agrupamentos gênicos de *M. aeruginosa* e *P. agardhii* NIVA-CYA 126-8 e foi demonstrado que estes genes estão envolvidos na formação da porção Choi do peptídeo (Ishida *et al.* 2007). Posteriormente a esses genes, foram encontrados quadros abertos de leitura (ORFs, do inglês *Open Reading Frames*) em *Microcystis*.

#### MECANISMO DE AÇÃO

A trombina tornou-se um alvo especial no isolamento de agentes naturais antitrombóticos, bem como no desenvolvimento de produtos sintéticos com este fim (Toyota *et al.* 2005, Ella-Menye *et al.* 2008). Ela é o principal fator na coagulação sanguínea, pois converte fibrinogênio em fibrina, ativa outros fatores de coagulação, como fatores V, VIII, XIII, e proteína C. Também ativa plaquetas e atua como indutor de mitose para vários tipos celulares. Sendo assim, como as aeruginosinas são inibidoras de trombina, elas tornaram-se moléculas atrativas na busca de novos anticoagulantes (Ersmark *et al.* 2008).

A coagulação sanguínea é uma sequência complexa de reações químicas que resulta na formação de um coágulo de fibrina. Assim que um vaso é lesado ocorre vasoconstrição e formação de tampão plaquetário, pelo acúmulo de plaquetas. Logo em seguida, moléculas sinalizadoras provindas da lesão do vaso ou das plaquetas ativam enzimas que desencadeiam uma complexa rede de reações, ocorrendo ao final da cascata a ativação da trombina (Guyton & Hall 1996). Essa serina protease, por sua vez, converte o fibrinogênio em fibrina formando uma rede de filamentos que retém plaquetas, células sanguíneas e plasma, formando o coágulo. Existem mais de 12 fatores de coagulação do sangue que se apresentam como formas inativas de enzimas proteolíticas. Quando convertidas nas suas formas ativas, suas reações enzimáticas causam as sucessivas reações em cascata do processo de coagulação (Guyton &

Hall 1996). Em condições fisiológicas normais, existe um balanço entre os sistemas de coagulação e de fibrinólise. A alteração em um desses sistemas pode acarretar processos hemorrágicos ou de formação de coágulos, fator causador de trombose em humanos.

A atividade contra tripsina (EC 3.4.21.4) também foi verificada para moléculas desse grupo, como a aeruginosina 98B, onde observou-se que a seletividade pode ser devida à posição do grupo sulfato da tripsina (Sandler *et al.* 1998). Sendo a tripsina uma enzima serina protease digestiva liberada pelo pâncreas no duodeno durante o processo de digestão (Guyton & Hall 1996), processos de inibição dessa enzima são considerados de interesse para o tratamento de desordem pancreática, como pancreatite (Ersmark *et al.* 2008). A ligação da aeruginosina à tripsina é semelhante àquela demonstrada para a trombina. Em geral, o grupo P1 da tripsina (os aminoácidos na porção N-terminal da ligação peptídica clivada pela protease são enumerados de acordo com sua posição na cadeia iniciando-se por P1, P2, P3 e assim por diante) mostra-se crítico para a formação do complexo e inibição da enzima (Schechter & Berger 1967).

A ação das aeruginosinas como inibidoras de outras enzimas serina proteases tem sido avaliada, como por exemplo, a plasmina (Murakami *et al.* 1995), envolvida no sistema da quebra de fibrinas. Essa enzima também está envolvida nos processos de angiogênese e metástase do câncer, apresentando potencial de aplicação no desenvolvimento de drogas contra esta doença. A aeruginosina inibidora de plasmina mais potente encontrada até o momento é aeruginosina 89A. Também possui ação contra papaína conforme verificado por Ishida *et al.* (1999), porém com baixa atividade. Microcina SF608 foi a única aeruginosina testada contra a metaloprotease neprilisina; no entanto, não foi encontrada atividade inibitória (Banker & Carmeli 1999).

Atividade biológica associada com a classe das aeruginosinas tem sido avaliada principalmente por estudos *in vitro*, na tentativa de elucidar suas atividades inibitórias contra serina proteases (Ersmark *et al.* 2008). Aeruginosina 298A mostrou-se potente inibidora de trombina e tripsina em  $CI_{50}$  (concentração inibitória para 50% das moléculas enzimáticas) de 0,3 e 1,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente; porém não apresentou atividade contra papaína (EC 3.4.22.4), quimotripsina (EC 3.4.21.1), elastase (EC

3.4.21.36) e plasmina (EC 3.4.21.7) (Murakami *et al.* 1994). Quatro anos mais tarde, foi publicada a estrutura por cristalografia de raio-X para o complexo aeruginosina 298A/hirugen-trombina (Steiner *et al.* 1998), confirmando a sua configuração estereoquímica. As variantes 98A e 98B apresentaram potente ação inibitória contra tripsina a uma  $CI_{50}$  de 0,6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Murakami *et al.* 1995). Quando a atividade de inibição de protease foi testada para os peptídeos isolados de *M. viridis* (102A e B), os autores verificaram que estes foram potentes inibidores de trombina, tripsina e plasmina, mostrando ação maior do que os peptídeos 98A e B e 298A, anteriormente descritos. Ainda, 102A, a qual possui D-argal, teve ação mais forte do que 102B (Matsuda *et al.* 1996).

As aeruginosinas 98-A e B, 102-A, 89A, 205-A e B possuem em suas estruturas uma unidade argininal (Argal) ou agmatina (Agma), ao invés de Argol e Hpla, com um éster de sulfato (Doi *et al.* 2006), sendo que estas diferenças são indicativas da interação destes peptídeos com as serina proteases. Hanessian *et al.* (2006) descreveram a oscilarina, isolada de *P. aghardii* com ação de inibição de trombina a uma  $CI_{50}$  de 28nM, relatada como a aeruginosina mais potente.

#### APLICAÇÃO CLÍNICA

Depois do lançamento bem sucedido em 2004 do inibidor de trombina melagatran (Gustafsson *et al.* 2004) ou ximelagatran, um pró-fármaco, biodisponível pela via oral para a trombose venosa, este teve que ser retirado do mercado em vista de incidentes relatados de aumento de enzimas hepáticas (FDA 2004). Já o medicamento argatroban, uma mistura 64:36 dos epímeros no C-21, não é biodisponível pela via oral e é administrado pela via intravenosa (Moledina *et al.* 2001). Hoje este medicamento está aprovado para o tratamento de trombose em pacientes afetados por trombocitopenia induzida pela heparina, que é o anticoagulante mais utilizado. Algumas estratégias utilizadas no desenho de novos inibidores diretos da trombina são discutidas na revisão de Schwienhorst (2006). No estudo conduzido por Radau *et al.* (2003) foram investigadas, a partir de extratos de cianobactérias, novas estruturas de inibidores de trombina, com interessantes atividades biológicas. A partir da aeruginosina 98-B, foram desenvolvidos

e sintetizados novos e seletivos inibidores que agem na trombina. Neste estudo foram desenvolvidos três potentes inibidores de trombina (denominados de 21, RA-1001 e RA-1002) com base na estrutura do cianopeptídeo aeruginosina 98-B. Radau *et al.* (2003) reportaram a ação de aeruginosinas implicadas nos tratamentos de complicações tromboembólicas como: trombose venosa e arterial, derrame, estreitamento dos vasos sanguíneos, bem como enfartes recorrentes do miocárdio.

## CIANOPEPTOLINAS

As cianopeptolinas compreendem uma classe de peptídeos cíclicos de estrutura química altamente variável, sintetizadas não ribossomicamente (Welker & von Döhren 2006). A produção de cianopeptolinas tem sido observada principalmente em espécies planctônicas de água doce. Em cianobactérias, esses compostos já foram isolados de diversos gêneros tais como *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Scytonema*, *Symploca*, *Lyngbya* (Welker & von Döhren 2006) e *Aphanocapsa* (Choi *et al.* 2008). Além disso, as cianopeptolinas também apresentam uma impressionante semelhança estrutural com a dolastatina 13, peptídeo linear encontrado em pequenas quantidades no molusco *Dolabella auricularia*, e que age em concentrações picomolares em diversos tipos de células tumorais (Pettit *et al.* 1989).

Diferentes gêneros de cianobactérias podem produzir cianopeptolinas, incluindo os produtores de hepatotoxinas microcistinas, o que sugere a coexistência dos dois agrupamentos gênicos envolvidos na síntese destes cianopeptídeos em um mesmo genoma (Welker & von Döhren 2006). Esse fato tem sido observado em várias linhagens do gênero *Microcystis* (Birk *et al.* 1989, Martin *et al.* 1990, Murakami *et al.* 1997, Yasuno *et al.* 1998, Tooming-Klunderud *et al.* 2007). Juntamente com as microcistinas, as cianopeptolinas parecem ser os peptídeos mais comuns produzidos por espécies do gênero *Microcystis*. Em estudos realizados por Welker *et al.* (2006), a produção de cianopeptolinas foi detectada em 60% das colônias isoladas de *Microcystis*. Os agrupamentos gênicos responsáveis pela produção dessas duas classes de peptídeos (microcistina e cianopeptolina) também coexistem na linhagem

*Anabaena* 90 (Rouhiainen *et al.* 2004). Estudos realizados por Straub *et al.* (2011) mostraram também que a biossíntese de microcistinas e cianopeptolinas ocorre essencialmente durante o período claro (luz), sugerindo que estes metabólitos possam interagir com a fase diurna do metabolismo. As funções biológicas de oligopeptídeos produzidos por cianobactérias são desconhecidas, apesar de estudos envolvendo nocaute gênico para microcistinas e cianopeptolinas já terem sido conduzidos (Rouhiainen *et al.* 2000, Tillett *et al.* 2000, Christiansen *et al.* 2003). Assim, a associação entre um dado oligopeptídeo e o agrupamento gênico que o codifica é difícil de ser estabelecida. Partindo-se do pressuposto de que as funções dos peptídeos produzidos pelas cianobactérias são desconhecidas, as razões para sua vasta diversidade estrutural (tanto dentro, como entre classes de oligopeptídeos) permanecem obscuras (Rouge *et al.* 2009).

Os cianopeptídeos, tais como a aeruginopeptina 917S-C (Harada *et al.* 2001), anabaenopeptilida 90-A (Fujii *et al.* 1996), cianopeptolina S (Jakobi *et al.* 1995), simplostatina 2 (Harrigan *et al.* 1999), hofmannolina (Matern *et al.* 2003a), microcistilida A (Tsukamoto *et al.* 1993), micropeptina 88-A (Ishida *et al.* 1998a), nostociolina (Kaya *et al.* 1996), oscilapeptilida 97-B (Fujii *et al.* 2000), oscilapeptina F (Itou *et al.* 1999), sciptolina A (Matern *et al.* 2001), somamida A (Nogle *et al.* 2001) e tasipectina A (Williams *et al.* 2003) são todos depsipeptídeos cíclicos pertencentes à classe das cianopeptolinas.

As primeiras cianopeptolinas estudadas em cianobactérias (cianopeptolinas A, B, C e D) foram descritas por Martin *et al.* (1993) e isoladas de *Microcystis* sp. PCC7806. Após essa descoberta, outras variantes foram elucidadas quimicamente, apresentando massa molar variando de 839 a 1187Da (Czarnecki *et al.* 2006, Welker & Erhard 2007).

Dois cianopeptolinas, sciptolinas A e B, foram caracterizadas a partir de culturas axênicas de *Scytonema hofmanni* PCC7110 (Matern *et al.* 2001). Posteriormente, Matern *et al.* (2003a) descreveram uma terceira cianopeptolina (hofmannolina) produzida pela mesma cultura.

A cianopeptolina CB071, um inibidor de tripsina, foi isolada a partir da cianobactéria de água doce *Aphanocapsa* sp. (Choi *et al.* 2008). Já von Elert

*et al.* (2005) denominaram de cianopeptolina 954 um inibidor clorado de quimotripsina, isolado de *M. aeruginosa* NIVA CYA 43.

O depsipeptídeo cianopeptolina 963A, isolado da linhagem *Microcystis* PCC7806 produtora de toxina, teve sua estrutura elucidada por meio de análises químicas e espectroscópicas, incluindo a espectrometria de massas de ressonância ciclôtrica de íons com transformada de Fourier (FTICR-MS) de alta resolução, 2D RMN, e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas do material hidrolisado (Bister *et al.* 2004).

O isolamento e a elucidação da estrutura química da cianopeptolina 1020 (ácido hexanóico-Glu-N[-O-Thr-Arg-Ahp-Phe-N-Me-Tyr-Val-]) produzida pela linhagem *M. aeruginosa* UV-006, foram reportados por Gademann *et al.* (2010).

Quimicamente, as cianopeptolinas são bastante variáveis, tanto entre gêneros de cianobactérias, como entre linhagens do mesmo gênero (Welker & von Döhren 2006). A estrutura geral dessa classe de peptídeos é caracterizada por uma peptidolactona ramificada (Figura 2B), composta por sete aminoácidos, na qual seis aminoácidos C-terminal formam um anel (Namikoshi & Rinehart 1996, Weckesser *et al.* 1996). Todas as cianopeptolinas contêm o resíduo 3-amino-6-hidróxi-2-piperidona (Ahp) e a ciclização do peptídeo ocorre por meio de uma ligação éster entre o grupo  $\beta$ -hidróxi da treonina e o grupo carboxila do aminoácido C-terminal (Martin *et al.* 1993). Em alguns casos, a unidade de treonina pode ser substituída por uma unidade de prolina hidroximetil (Figura 2B) e a ligação éster para o fechamento do anel é formada por meio deste grupo hidroxila como, por exemplo, em nostopeptinas (Okino *et al.* 1997).

Uma cadeia lateral (Figura 2B), de comprimento variável, é ligada através do grupo amino da unidade treonina nessa estrutura. O ácido glicérico pode ser ligado diretamente à treonina na posição 1 ou a uma cadeia lateral de aminoácidos (Bonjouklian *et al.* 1996). Sulfatação e *O*-metilação do ácido glicérico também já foram relatadas em oscilapeptinas A-C (Itou *et al.* 1999). Em algumas variantes, o Hpla foi observado na cadeia lateral da microcistilida A (Tsukamoto *et al.* 1993) e da aeruginopeptina 95A/B (Harada *et al.* 1993). Outros aminoácidos não proteinogênicos ou hidroxíácidos encontrados

nas cianopeptolinas são: tirosina tetrahidro (H<sub>4</sub>Tyr, também chamada de alanina hidróxi-ciclohexenil, HcAla) na posição 2 em aeruginopeptina-95B (Harada *et al.* 1993) e micropeptina 88-D (Ishida *et al.* 1998a), quinurenina na posição 5 em micropeptina SD999 (Reshef & Carmeli 2001), ácido hidroximetil valérico na cadeia lateral em hofmannolina (Matern *et al.* 2003a) e ácido aminobutenóico na posição 2 em somamida A (Nogle *et al.* 2001).

Todas as posições no anel, com exceção da treonina (posição 1) e Ahp (posição 3), podem ser ocupadas por aminoácidos variáveis. No entanto, o número de aminoácidos já observados na estrutura química das cianopeptolinas tem variado de dois na posição 6 a nove na posição 2 (Figura 2B). Na posição 5, um aminoácido aromático é encontrado em todas as variantes; a posição 6 é ocupada por aminoácidos neutros. A posição 2 do anel pode também ser ocupada por uma ampla variedade de aminoácidos, como os aromáticos, básicos, alifáticos e hidróxi. Nessa posição, a dehidrobutirina (Dhb) se mostrou comum à microcistina produzida pelo gênero *Planktothrix* (Harrigan *et al.* 1999).

Em todas as variantes estruturais de cianopeptolinas, o aminoácido na posição 5 é *N*-metilado. Monocloração tem sido relatada na posição 5 apenas quando ocupada por uma tirosina *N*-metilada ou homotirosina (Rouhiainen *et al.* 2000, von Elert *et al.* 2005), porém dicloração não foi encontrada até o momento. Em muitos casos, o tipo, número e posição dos grupos halogênicos em compostos orgânicos são importantes para a atividade biológica (Nogami *et al.* 1990, Sancelme *et al.* 1994, Otsuka *et al.* 2004). Estudos conduzidos por Eustaquio *et al.* (2003) envolvendo a biossíntese de clorobiocina em *Streptomyces*, mostraram que a cloração de um pequeno peptídeo foi capaz de modificar as propriedades da molécula, com consequências em sua atividade biológica. Em relação às cianopeptolinas, peptídeos clorados e não clorados foram bastante descritos, como por exemplo, as variantes anabaenopeptilida 90A (não clorada) e 90B anabaenopeptilida (clorada) (Fujii *et al.* 1996). Contudo, sabe-se que a inibição de serina proteases pelas cianopeptolinas não é influenciada pela cloração por si só, conforme mostrado em estudos de raios X de uma variante clorada e outra não clorada, cocrystalizadas com proteases (Lee *et al.* 1994, Matern



*et al.* 2003a). De acordo com Cadel-Six *et al.* (2008), embora as halogenases de cianopeptolinas sejam funcionais, aparentemente não são essenciais para a biossíntese destes peptídeos, ou seja, a ausência de cloração não interrompe as etapas biossintéticas do processo.

### BIOSSÍNTESE E GENÉTICA

Os agrupamentos gênicos da biossíntese de cianopeptolina (Figura 3B) foram, até o presente momento, descritos para *Microcystis wesenbergii* NIVA CYA-172/5 e *M. aeruginosa* NIES 843 (genes *mcn*) (Kaneko *et al.* 2007, Tooming-Klunderud *et al.* 2007), *Anabaena* 90 (genes *apd*) (Rouhiainen *et al.* 2000) e *P. agardhii* NIVA-CYA 116 (genes *oci*) (Roungue *et al.* 2007), indicando o potencial de produção desta classe de peptídeos não ribossômicos entre as cianobactérias. Tal como ocorre com as aeruginosinas, linhagens de uma mesma espécie de cianobactérias podem apresentar ou não genes para cianopeptolina sintetases (Welker & von Döhren 2006).

Em geral, a estrutura modular dos genes envolvidos na biossíntese de cianopeptolina contém um domínio de condensação (C), um de adenilação (A) e um de tiorilação (T) (Figura 3B).

Em *Microcystis*, o agrupamento *mcn* contém quatro genes que codificam para NRPSs (McnE, McnC, McnB e McnA), uma proteína com função desconhecida, uma transposase, McnF (uma proteína tipo transportadora ABC) e McnG (desconhecido) (Kaneko *et al.* 2007). *Microcystis wesenbergii* NIVA CYA-172/5 apresenta um gene *mcnD* (Figura 3B) que codifica para uma halogenase, indicando que a variante sintetizada é halogenada (Tooming-Klunderud *et al.* 2007). Contudo, um homólogo ao *mcnD* não foi identificado no genoma da linhagem *M. aeruginosa* NIES 843 (Kaneko *et al.* 2007), sugerindo que esta linhagem pode produzir uma variante não halogenada de cianopeptolina.

O agrupamento gênico da anabaenopeptilida, produzida pela *Anabaena* 90, contém três genes que codificam para NRPSs (*apdA*, *B* e *D*). Além disso, da mesma forma que o gene *mcnD* no agrupamento *mcn* de *Microcystis* NIVA-CYA-172/5, *Anabaena* 90 também contém um gene que codifica para uma halogenase (*apdC*), que estaria envolvida na cloração

de um resíduo de tirosina (Rouhiainen *et al.* 2000). Em *P. agardhii* NIVA-CYA 116 a halogenase está ausente (Cadel-Six *et al.* 2008), sugerindo que sua atividade enzimática não é uma característica de todas as cianopeptolinas sintetases e que a halogenação não é essencial do ponto de vista funcional.

A comparação entre o agrupamento *mcn*, descrito para *M. wesenbergii* NIVA CYA-172/5, apresentou alta similaridade com o grupo de genes da anabaenopeptilida (*apd*) da *Anabaena* 90, resultando em 52 a 93% de similaridade entre módulos para sequências de aminoácidos. Identidade elevada (80% nas regiões codificadoras de módulos de NRPSs) entre os agrupamentos gênicos de cianopeptolinas produzidas por *Microcystis* (*mcn*) e *Planktothrix* (*oci*) também foram relatadas por Roungue *et al.* (2008). Esses autores sugerem que, como demonstrado para as microcistinas, é provável que uma maior identidade de sequências gênicas ocorra dentro de um mesmo gênero, do que entre gêneros distintos. Contudo, não está clara em que proporção essas semelhanças são conservadas em todas as cianopeptolina sintetases (Tooming-Klunderud *et al.* 2007).

O arranjo dos genes e da estrutura dos peptídeos sugere que a síntese de cianopeptolinas tenha seu início a partir da cadeia lateral e que a etapa final seja o fechamento do anel entre o aminoácido na posição 6 e a treonina na posição 1 (Figura 2B), visto que todos os aminoácidos estão na configuração L em todas as cianopeptolinas descritas até o momento (Welker & von Döhren 2006).

Metiltransferases também estão presentes nos três grupos de genes de cianopeptolinas descritos para *Anabaena*, *Microcystis* e *Planktothrix* (*apd*, *mcn* e *oci*, respectivamente). Além dos domínios A, C e T, vários outros domínios foram associados às cianopeptolina sintetases, e domínios complementares, responsáveis pela modificação da cadeia lateral do aminoácido N-terminal, são únicos para cada linhagem (isto é, formil transferase em *apd*, sulfotransferase e ácido glicérico transferase em *oci*, ausente em *mcn*) (Roungue *et al.* 2008).

### MECANISMO DE AÇÃO

A estrutura cristalina da elastase pancreática de suínos complexada com sciptolina A, uma variante de depsipeptídeos da classe da cianopeptolina, produzida

pela cianobactéria *S. hofmanni* foi descrita por Matern *et al.* (2003b). Elastases catalisam a degradação da elastina encontrada no tecido conjuntivo. A elastase pancreática suína está intimamente relacionada à elastase humana, que é alvo farmacêutico atual para várias doenças, incluindo enfisema, artrite e fibrose cística. Sciptolinas A e A90720A possuem um anel com 19 ramificações, contendo uma lactona (envolvendo a hidroxila da cadeia lateral de um resíduo de treonina), cinco elos lactâmicos e um resíduo Ahp incomum. Esse último é composto de um glutamato semialdeído, ligado como hemiaminal ao nitrogênio amida do aminoácido subsequente. A seletividade das sciptolinas e de A90720A pela elastase e tripsina, respectivamente, provavelmente é governada pelo resíduo na posição 4, que corresponde à posição P1 (sítio de ligação P1 da cadeia lateral) de um substrato, ou seja, leucina na sciptolina e arginina em A90720A. As conformações de ligação proteolítica de sciptolinas A e A90720A são muito semelhantes, e ambas as estruturas revelam ligação nos subsítios S1 ao S4, como observado para substratos. Apesar do esqueleto do grupo carbonila do resíduo equivalente de P1 se projetar para a cavidade oxianion, nenhuma evidência para a hidrólise do anel macrocíclico foi observada. O resíduo Ahp ocupa espaço adjacente ao His57, que está altamente envolvido na tríade catalítica de serina proteases, e a comparação com complexos acil-enzima, obtidos com substratos peptídicos simples/inibidores, indica que pode haver interrupção da hidrólise, pela exclusão da água hidrolítica. Essa exclusão tem sido proposta para inibidores de moléculas pequenas, incluindo  $\beta$ - e  $\gamma$ -lactâmicos (Firestone *et al.* 1990, Wilmouth *et al.* 1999). Obviamente, o mecanismo de ação dos inibidores da classe das cianopeptolinas requer muito mais do que o deslocamento da água hidrolítica, mas a observação de que pode haver a inibição de mais de uma protease deve estimular estudos voltados para a definição de componentes inibitórios essenciais, disponibilizando um modelo acessível e facilmente modificável que se liga reversivelmente (McDonough & Schofield 2003).

A inibição de serina proteases (tripsina, quimotripsina e elastase) tem sido relatada para as variantes estruturais de cianopeptolinas em diversos estudos (Matern *et al.* 2003b, Bister *et al.* 2004, Welker *et al.* 2004, von Elert *et al.* 2005, Choi *et al.*

2008). A cianopeptolina 954 inibiu a quimotripsina a uma  $CI_{50}$  de 45nM (von Elert *et al.* 2005). Já a cianopeptolina 963A apresentou atividade inibitória contra quimotripsina a uma  $CI_{50}$  de 0,9 $\mu$ M (Bister *et al.* 2004). Com relação à hofmannolina, sua interação com a elastase foi demonstrada por cocristalização e espectroscopia de raio-X, revelando a importância da fração Ahp para a atividade inibitória (Matern *et al.* 2003b).

Gademann *et al.* (2010) avaliaram a atividade inibitória da cianopeptolina 1020 contra tripsina, quimotripsina e várias outras proteases envolvidas na coagulação do sangue. O isolamento da cianopeptolina 1020, extraída de *M. aeruginosa* UV-006, permitiu a verificação de sua atividade inibitória contra a tripsina em escala picomolar ( $CI_{50}$  de 670pM), enquanto que para o fator XIa e para caliceína humana (EC 3.4.21.35) a inibição ocorreu em escala nanomolar (3,9 e 4,5nM, respectivamente). A cianopeptolina 1020 também se mostrou tóxica para o crustáceo de água doce *Thamnocephalus platyurus* e sua toxicidade ( $CL_{50}$  8,8 $\mu$ M, concentração letal) foi comparável à de microcistinas comumente encontradas, descritas como biotoxinas de cianobactérias. Esses resultados sugerem que as cianopeptolinas podem ser consideradas como uma segunda classe de toxinas, e incentivam ainda mais a avaliação da toxicidade da cianopeptolina 1020 em mamíferos (Gademann *et al.* 2010). A coexistência de cianopeptolina 1020 tóxica e microcistina em linhagens de *Microcystis* indicam a necessidade de uma reavaliação das diretrizes que visam assegurar a qualidade de água para o consumo, atualmente apenas focadas em microcistinas. Nesse caso, a inclusão de outros compostos relevantes, como a cianopeptolina, deve ser levada em consideração (Gademann *et al.* 2010).

A diversidade estrutural das cianopeptolinas descritas até o momento é grande, mas todas podem ser consideradas inibidoras de serina proteases de crustáceos e mamíferos (Welker & von Döhren 2006). Embora a inibição de serina proteases digestivas de vários organismos seja conhecida, a toxicidade aguda de algumas variantes de cianopeptolinas ainda não foi demonstrada. Nesse sentido, a microcistilida A, quando aplicada por via intraperitoneal em camundongos, induziu convulsões e espasmos musculares, mas não a morte (Tsukamoto *et al.* 1993). Por outro lado, a cianopeptolina SS causou a morte de

crustáceos (Jakobi *et al.* 1996), da mesma forma que oscilapeptina J em *T. platyurus* (Blom *et al.* 2003).

Em cianopeptolinas, a presença ou ausência de um átomo de cloro na tirosina (posição 5 do anel) pode modular a atividade inibidora do peptídeo, de modo que a produção de um conjunto de peptídeos variáveis poderia levar à inibição de uma seleção mais ampla de proteases (Tooming-Klunderud *et al.* 2007). Todas as especulações sobre os efeitos da cloração dessa classe de peptídeos são, no entanto, dificultadas pelo fato de que suas funções biológicas não são conhecidas (Cadel-Six *et al.* 2008). A existência de cianopeptolinas halogenadas e não halogenadas pode, de fato, desempenhar um papel na regulação da atividade biológica, ou sugerir múltiplas funções para as cianopeptolinas. Nesse aspecto, estudos envolvendo nocaute gênico direcionado para a halogenase devem ser encorajados.

#### APLICAÇÃO CLÍNICA

Dentre os inibidores de protease de origem cianobacteriana, as cianopeptolinas podem ser usadas no tratamento de asma e infecções virais (Singh *et al.* 2011).

Algumas cianopeptolinas são conhecidas como inibidoras específicas de elastase. Essa protease parece ser objeto de pesquisa bastante relevante, uma vez que sua atividade é de fundamental importância para uma série de doenças humanas, por exemplo, enfisema pulmonar, que é mediado pela ação excessiva de elastase (Mal *et al.* 1999). Além disso, tem sido proposto que níveis elevados de atividade da elastase estão envolvidos em danos ao miocárdio (Zaidi *et al.* 1999) e podem causar uma forma particular de psoríase (Orem *et al.* 1997). Assim, os inibidores naturais de elastase podem servir como estruturas valiosas na pesquisa farmacêutica dedicada ao desenvolvimento de medicamentos novos e mais eficazes (Matern *et al.* 2001).

Já a simplostatina 1, isolada da cianobactéria marinha *Symploca* sp. VP642 é um composto análogo à dolastatina 10, isolada do molusco *D. auricularia*, que é um potente agente antitumoral. A atividade antitumoral da simplostatina 1 foi avaliada *in vivo* contra vários tumores murinos. Simplostatina 1 foi eficaz contra um tumor mamário e um tumor de cólon insensíveis às drogas; no entanto, foi apenas

ligeiramente eficaz contra dois tumores resistentes à múltiplas drogas (Luesch *et al.* 2001).

#### MICROGININAS

Microgininas pertencem à classe de peptídeos lineares, compostos de três a seis resíduos de aminoácidos (Figura 2C). Inicialmente, as microgininas foram caracterizadas como inibidoras de zinco metaloproteases, tais como a enzima conversora de angiotensina (ACE, do inglês *Angiotensin-Converting Enzyme*) (EC 3.4.15.1) e leucina aminopeptidase (LAP) (EC 3.4.11.2). Consequentemente, esses compostos são de grande interesse e são considerados moléculas líderes na descoberta de novos fármacos anti-hipertensivos, bem como tratamentos para a insuficiência cardíaca congestiva.

A primeira microginina isolada de cianobactéria foi descrita em 1993, a partir do gênero *Microcystis* (Okino *et al.* 1993). Posteriormente, foram encontradas em florações de cianobactérias (Neumann *et al.* 1997, Kodani *et al.* 1999), em *M. aeruginosa* (Ishida *et al.* 1997, Ishida *et al.* 1998b, Ishida *et al.* 2000, Welker *et al.* 2006), *Microcystis* sp. (Reshef & Carmeli 2001, Czarnecki *et al.* 2006, Welker *et al.* 2006, Gesner-Apter & Carmeli 2008), *Microcystis ichthyoblabe* e *M. wesenbergii* (Fastner *et al.* 2001), *Planktothrix rubescens* (Rouge *et al.* 2009) e *P. agardhii*, anteriormente denominada de *Oscillatoria* (Sano & Kaya 1997).

A presença de D-aminoácidos, aminoácidos não-usuais, bem como seu tamanho pequeno, sugere que os oligopeptídeos das cianobactérias mencionadas acima são sintetizados pela via não ribossômica por meio das NRPSs (Kleinkauf & von Döhren 1996).

As microgininas são também conhecidas como cianostatina, nostoginina ou oscilaginina (Welker & von Döhren 2006). Nostogininas produzidas por *Nostoc* (Ploutno & Carmeli 2002) e oscilagininas produzidas por *Oscillatoria* (agora denominadas de *Planktothrix*) (Sano & Kaya 1997, Rouge *et al.* 2009) possuem as mesmas características estruturais das microgininas. Outros peptídeos similares às microgininas também já foram encontrados em extratos de *Lyngbya* (van Wagonen *et al.* 2006). Sua massa molar pode variar de 574 a 930Da (Ishida *et al.* 2000).

Essa classe de peptídeo linear é caracterizada por um ácido decanóico derivado, o ácido 3-amino-2-hidróxi-decanóico (Ahda) e um predomínio de duas unidades de tirosina C-terminal (Figura 3C) (Okino *et al.* 1993). As microgininas variam em tamanho de acordo com o número de aminoácidos, ou seja, de quatro (microginina 91A) (Ishida *et al.* 2000) a seis (microginina 299C) (Ishida *et al.* 1998b), sendo que a variabilidade ocorre na posição C-terminal. A posição 2 é a mais variável, com sete aminoácidos diferentes já relatados, enquanto nas duas posições seguintes, já foram observados de três a quatro aminoácidos diferentes. *N*-metilação pode ocorrer nas posições 1, 3 e 4 (Ishida *et al.* 1998b). Cloração alifática foi relatada no Ahda (Kodani *et al.* 1999) e, em alguns casos, também ocorreu dicloração na unidade C-terminal (Ishida *et al.* 1998b). Cloração aromática não foi observada em nenhuma das unidades homotirosina.

### BIOSSÍNTESE E GENÉTICA

O agrupamento gênico responsável pela biossíntese da microginina em *M. aeruginosa* já foi sequenciado (Kramer 2007). O resíduo Ahda é gerado a partir do ácido octanóico e para isso um domínio de adenilação ativa esse ácido em acil adenilato, que é então transferido para uma ACP. A formação do Ahda é realizada por uma PKS e, provavelmente, é a unidade inicial de microgininas. Um módulo de alongação de uma PKS, consistindo de uma KS, uma aciltransferase (AT) e uma ACP, é responsável pela condensação de um resíduo malonil-CoA com o ácido octanóico ativado à um ácido 3-oxodecanóico, o qual é transaminado por uma aminotransferase (AMT), produzindo o  $\beta$ -amino tioéster na posição C-2, levando ao (2S, 3R)-Ahda-ACP. Os resíduos de alanina, valina e duas tirosinas são adicionados ao (2S, 3R)-Ahda pela ação dos módulos de alongação das NRPSs (Kramer 2007).

O genoma da *Planktothrix* NIVA CYA 98 também contém genes híbridos de NRPS/PKS (*micACDE*). Este agrupamento gênico codifica três módulos de NRPS, um módulo de PKS e uma aminotransferase (Figura 3C). Análises *in silico* do *micACDE* sugere que o agrupamento gênico corresponde à microginina oscilagininina B, produzida pela *Planktothrix* NIVA CYA 98. A oscilagininina A é clorada e, portanto, uma

halogenase parece fazer parte da via biossintética. No entanto, o gene que codifica para a halogenase não foi identificado no agrupamento gênico ou no genoma desta linhagem.

### MECANISMO DE AÇÃO

A estrutura das microgininas é muito semelhante à de peptídeos como probestina e amastatina, que são tetrapeptídeos lineares ou maiores contendo  $\alpha$ -hidróxi- $\beta$ -aminoácido. Esses peptídeos, assim como actinonina, leuhistina e bestatina já são conhecidos inibidores de LAP e aminopeptidase M (APM) (EC 3.4.11.2). Bestatina causa uma redução na taxa de infecção por HIV (Pulido-Cejudo *et al.* 1997). Sendo assim, é sugerido que as microgininas tenham mecanismo de ação semelhante (Ishida *et al.* 2000).

Microgininas 299-A, -B, -C e -D são inibidoras de LAP, porém não inibem ACE, papaína, tripsina, trombina, plasmina, quimotripsina e elastase (Ishida *et al.* 1997, Ishida *et al.* 1998b). Já as microgininas 99-A e 99-B, as quais possuem um grupamento anidro Ahda e microgininas 478 e 51-B não inibem LAP a  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Ishida *et al.* 2000). Microgininas 91-A a 91-E (congêneros de microginina) mostraram atividade mais fraca do que microgininas. A razão pode ser que a estereoquímica do C-2 nestes compostos possuem a configuração R (Ishida *et al.* 2000). Microgininas T1 inibem ACE e LAP em concentrações de 5 e  $7\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, e microginina T2 inibe tanto ACE quanto LAP a uma concentração de  $2\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Kodani *et al.* 1999). Microginina FR1 apresentou atividade inibidora para ACE a  $16\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Neumann *et al.* 1997). Microginina inibiu a ACE a uma  $\text{CI}_{50}$  de  $7,0\mu\text{g.mL}^{-1}$ , mas não inibiu papaína, tripsina, quimotripsina e elastase a  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Okino *et al.* 1993).

Além de cianobactérias, outros organismos são capazes de produzir microgininas. K-26, um inibidor da ACE produzido por actinomicetos, tem uma estrutura parcial de ditirosina (Kase *et al.* 1987, Yasuzawa *et al.* 1987). Outro inibidor natural da ACE, K-13, isolado de *Micromonospora halophytica*, é também derivado de ditirosina. Além disso, a atividade inibitória da microginina contendo ditirosina é aproximadamente 100 vezes maior do que microginina sem esse resíduo.

A estrutura C-terminal (N-MeTyr-Tyr) é considerada importante para a inibição da ACE.



Dipeptídeos que consistem em aminoácidos C-terminal prolina e aminoácidos aromáticos e N-terminal valina ou isoleucina têm potente atividade inibitória (Cheung *et al.* 1980). A atividade inibitória do tri- e pentapeptídeo contendo valina-tirosina é considerada fraca, pois estes peptídeos são facilmente hidrolisados por ACE (Opie 1992). Os resultados descritos por Ishida *et al.* (2000) também relatam que os dipeptídeos tirosina-tirosina e valina-tirosina apresentaram quase a mesma ordem de inibição da atividade da microginina, porém os tri- e tetrapeptídeos alanina-valina-Me-tirosina e alanina-tirosina-valina-Me-tirosina, respectivamente, mostraram apenas atividade inibitória fraca. No entanto, os pentapeptídeos microgininas, microgininas 478, T1 e T2, apresentaram atividade inibitória em concentração de cerca de 10 $\mu$ M. Este resultado sugere que a unidade Ahda também é importante na inibição da ACE. Ainda, confirmam que não somente a unidade ditirosina, mas também os grupos amino e hidroxila do  $\beta$ -aminoácido lipídico Ahda desempenham um papel importante na inibição da ACE por peptídeos do tipo microginina.

### APLICAÇÃO CLÍNICA

ACE catalisa a conversão da angiotensina I em angiotensina II dentro do sistema renina-angiotensina de mamíferos, levando à estenose arterial, que por sua vez provoca um aumento da pressão arterial. Os inibidores da ACE combatem esse processo e, portanto, desempenham um papel na medicina humana como agentes hipertensivos. A microginina é uma molécula importante e pode ser candidata ao desenvolvimento de um medicamento para a inibição da ACE. Até 2007, apenas 38 variantes estruturais de microginina eram conhecidas, tornando sua utilização clínica difícil (Welker & von Döhren 2006, Kramer 2007). No passado, a produção de variantes de microgininas só era possível por meio da síntese química de  $\alpha$ -hidróxi- $\beta$  aminoácidos (Bergmeier & Stanchina 1999).

### POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASES EM CIANOBACTÉRIAS BRASILEIRAS

O laboratório de Ecologia Molecular de Cianobactérias do CENA/USP mantém uma coleção de cianobactérias isoladas de diversos biomas brasileiros,

tais como caatinga, Mata Atlântica e Amazônia, bem como vários ecossistemas: manguezais, lagos, rios, represas, nascentes, reservatórios, além de isolados da Antártica. Possui também várias linhagens provenientes de coleções de culturas internacionais. O Brasil, devido às suas dimensões continentais, possui espécies adaptadas aos diferentes microclimas existentes e apresentam potencial para a produção de substâncias inéditas, fato que o torna uma rica fonte de informações voltadas à bioprospecção. Em maio de 2006, a Europa finalizou o projeto Pepcy (*PEPtides in CYanobacteria*), cujo objetivo central foi o de melhorar a avaliação e gestão dos riscos voltados às cianotoxinas. Com o apoio de vários laboratórios europeus, foi possível encontrar um grande número de ciano-peptídeos, obtidos de centenas de linhagens estudadas e mais de 3.000 metabólitos, identificados por espectrometria de massas em desorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (MALDI-TOF). Também foi possível evidenciar a presença de um grande número de diferentes classes de peptídeos e uma grande diversidade de variantes em cada classe (mais de 500 variantes podem existir só para o ciano-peptídeo aeruginosina). Esse projeto permitiu identificar os ciano-peptídeos mais frequentemente encontrados na Europa, ou seja, as anabaeno-peptinas, microcistinas e aeruginosinas. Anabaeno-peptinas B e F foram encontradas em todas as amostras analisadas. Com a coleção brasileira de cianobactérias, esses resultados podem ser diferentes e haver dominância de outros ciano-peptídeos. Estudos conduzidos em nosso laboratório mostraram que diversas cianobactérias são produtoras de aeruginosina (Silva-Stenico *et al.* 2011, Silva-Stenico *et al.* 2012) e ciano-peptolina (Silva-Stenico *et al.* 2012), indicando o potencial desses organismos em produzir substâncias de interesse farmacêutico e biotecnológico.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novas variantes das diferentes classes de peptídeos conhecidos, assim como novos peptídeos ainda não descritos, poderão ser descobertos, incluindo a elucidação de seus respectivos genes biossintéticos. Informações estruturais e químicas irão melhorar a nossa compreensão sobre o potencial biossintético de cianobactérias e da distribuição de peptídeos nos níveis taxonômicos e geográficos.

**Tabela 1.** Peptídeos inibidores de proteases produzidos por cianobactérias.  
**Table 1.** *Peptides inhibitors of proteases produced by cyanobacteria.*

Cianopeptídeos inibidores de protease	Propriedades	Fonte	Modo de ação	Usos clínicos potenciais	Sinônimos
Aeruginosina	Inibidor de trombina, tripsina, plasmina e papaína	<i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> e <i>Radiocystis</i>	Envolve a inibição de proteases, suprimindo a ação da trombina, que atua no processo de agregação de plaquetas; da tripsina, que atua no processo de digestão; e da plasmina, que atua na quebra de fibrinas e processos de angiogênese e metástase do câncer.	A ação de aeruginosinas já foi verificada em complicações como: trombose venosa e arterial, derrame, estreitamento dos vasos sanguíneos, bem como, enfartes recorrentes do miocárdio e pancreatite.	microcina, spumigina e oscilarina
Cianopeptolima	Inibidor de elastase, tripsina, quimotripsina e calicreína humana	<i>Anabaena</i> , <i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Symploca</i> , <i>Lyngbya</i> e <i>Aphanocapsa</i>	Envolve a inibição de proteases, suprimindo a ação da elastase, que atua no processo de enfisema pulmonar, danos ao miocárdio e psoríase; da quimotripsina, que também atua no sistema digestivo, sendo produzida pelo pâncreas; e da calicreína humana que é expressa em diversos tecidos como glândulas salivares, pâncreas e rim.	As cianopeptolimas podem ser usadas no tratamento de asma e infecções virais, tal como o enfisema pulmonar, além de ter uso em tratamentos do miocárdio e psoríase.	aeruginopeptina, anabaenopeptilida, hofmannolina, microcistilida, micropeptina, nostociclina, nostopeptina, oscilapeptilida, oscilapeptina, planktopeptina, scyptolina, somamida, simplostatina e tasipectina
Microginina	Inibidor de ACE e LAP	<i>Microcystis</i> e <i>Planktothrix</i>	Envolve a inibição de proteases, suprimindo a ação da ACE que catalisa a conversão da angiotensina I em angiotensina II dentro do sistema renina-angiotensina de mamíferos, levando à estenose arterial, que por sua vez provoca um aumento da pressão arterial.	Seu uso se dá como um agente anti-hipertensivo, bem como em tratamentos para a insuficiência cardíaca congestiva.	cianostatina, oscilaginina e nostoginina

Estudos genéticos fornecerão dados sobre a evolução de agrupamentos gênicos responsáveis pela produção de cianopeptídeos que, muitas vezes, são variações de uma única molécula. As informações gerais sobre os oligopeptídeos constantes nesta revisão foram sumarizadas na Tabela 1.

As estruturas de novos peptídeos receberam denominações que não estão incluídas num sistema de nomenclatura e, portanto, muitos peptídeos estruturalmente semelhantes têm nomes distintos. Além da variabilidade de aminoácidos em posições especiais nos peptídeos, várias modificações de aminoácidos e outros ácidos orgânicos podem ocorrer, complicando assim a introdução de um sistema de nomenclatura. No caso de microcistinas, é comum apenas *N*- ou *O*-metilação de aminoácidos, enquanto que em aeruginosinas, pode ocorrer cloração, sulfatação e hidroxilação. Além disso, o número de ácidos orgânicos não proteinogênicos variáveis é elevado em cianopeptolinas.

O código usado de uma letra é restrito a 26 aminoácidos, mas isso não é aplicável quando resíduos de ácido fórmico, acético, glicérico, butanóico, hexanóico ou octanóico precisam se encaixar no mesmo esquema, diferente de microcistinas, onde aminoácidos não proteinogênicos estão em posições conservadas. Dessa forma, uma nomenclatura simples, mas com um sistema eficiente, tal como a utilizada para microcistinas não seria aplicável para a maioria das classes de peptídeos, havendo a necessidade de se desenvolver outros sistemas.

As moléculas descritas neste estudo apresentam ação contra enzimas causadoras de patologias humanas. Com isso, é esperado que esforços futuros nessa área conduzam à produção de medicamentos seguros e efetivos para o tratamento de diversas desordens, como exemplo, doenças cardiovasculares, enfisema pulmonar, artrite e fibrose cística, dentre outras.

**AGRADECIMENTOS:** Os autores agradecem a FAPESP (2009/05474-5) e CNPq (559720/2009-2). M.F. Fiore agradece ao CNPq pela bolsa de pesquisa (308299/2009-4). M.E. Silva-Stenico agradece a bolsa de pós-doutorado concedida pela FAPESP (2010/09867-9) e CNPq (151931/2010-0). A.S. Lorenzi agradece a bolsa de pós-doutorado concedida pela FAPESP (2008/53627-2). C.S.P. Silva agradece a CAPES pela bolsa PNPd (02565/09-9). J. Rignonato agradece ao CNPq pela bolsa DTI (384180/2011-6).

## REFERÊNCIAS

- BANKER, R. & CARMELI, S. 1999. Inhibitors of serine proteases from a waterbloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Tetrahedron*, 55: 10835-10844, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)00597-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00597-9)
- BERGMEIER, S.C. & STANCHINA, D.M. 1999. Acyl nitrene route to vicinal amino alcohols. Application to the synthesis of (-)-bestatin and analogues. *Journal of Organic Chemistry*, 64: 2852-2859, <http://dx.doi.org/10.1021/jo9823893>
- BIRK, I.M.; DIERSTEIN, R.; KAISER, I.; MATERN, U.; KÖNIG, W.A.; KREBBER, R. & WECKESSER, J. 1989. Nontoxic and toxic oligopeptides with D-amino acids and unusual residues in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Archives of Microbiology*, 151: 411-415.
- BISTER, B.; KELLER, S.; BAUMANN, H.I.; NICHOLSON, G.; WEIST, S.; JUNG, G.; SUSSMUTH, R.D. & JÜTTNER, F. 2004. Cyanopeptolin 963A, a chymotrypsin inhibitor of *Microcystis* PCC 7806. *Journal of Natural Products*, 67: 1755-1757, <http://dx.doi.org/10.1021/np049828f>
- BLOM, J.F.; BISTER, B.; BISCHOFF, D.; NICHOLSON, G.; JUNG, G.; SUSSMUTH, R.D. & JÜTTNER, F. 2003. Oscillapeptin J, a new grazer toxin of the freshwater cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Journal of Natural Products*, 66: 431-434, <http://dx.doi.org/10.1021/np020397f>
- BLOND, A.; PEDUZZI, J.; GOULARD, C.; CHIUCHIOLO, M.J.; BARTHÉLÉMY, M.; PRIGENT, Y.; SALOMON, R.N.; MORENO, F. & REBUFFAT, S. 1999. The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 259: 747-755, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00085.x>
- BONJOUKLIAN, R.; SMITKA, T.A.; HUNT, A.H.; OCCOLOWITZ, J.L.; PERUN, T.J.; DOOLIN, L.; STEVENSON, S.; KNAUSS, L.; WIJAYARATNE, R.; SZEWCZYK, S. & PATTERSON, G.M.L. 1996. a90720a, a serine protease inhibitor isolated from a terrestrial blue-green alga *Microchaete lohtakensis*. *Tetrahedron*, 52: 395-404, [http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00857-8](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020(95)00857-8)
- BURJA, A.M.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; BURGESS, J.G. & WRIGHT, P.C. 2001. Marine cyanobacteria: a prolific source of natural products. *Tetrahedron Letters*, 57: 9347-9377.
- CADEL-SIX, S.; DAUGA, C.; CASTETS, A.M.; RIPPKA, R.; BOUCHIER, C.; TANDEAU DE MARSAC, N. & WELKER, M.

2008. Halogenase genes in nonribosomal peptide synthetase gene clusters of *Microcystis* (Cyanobacteria): sporadic distribution and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 2031-2041, <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn150>
- CARDELLINA, J.H.; MARNER, F.J. & MOORE, R.E. 1979. Seaweed dermatitis: structure of lyngbyatoxin A. *Science*, 204: 193-195, <http://dx.doi.org/10.1126/science.107586>
- CASTENHOLZ, R.W. 2001. Oxygenic photosynthetic bacteria. Pp. 473-600. In: D.R. Boone & R.W. Castenholz (eds.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2 ed. Springer-Verlag, New York. 2898p.
- CHANG, Z.; FLATT, P.; GERWICK, W.H.; NGUYEN, V.A.; WILLIS, C.L. & SHERMAN, D.H. 2002. The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed polyketide synthase (PKS)-non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving an unusual trichloroleucyl starter unit. *Gene*, 296: 235-247, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00860-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00860-0)
- CHEUNG, H.S.; WANG, F.L.; ONDETTI, M.A.; SABO, E.F. & CUSHMAN, D.W. 1980. Binding of peptide-substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme - importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 255: 401-407.
- CHOI, H.; OH, S.K.; YIH, W.; CHIN, J.; KANG, H. & RHO, J.R. 2008. Cyanopeptoline CB071: a cyclic depsipeptide isolated from the freshwater cyanobacterium *Aphanocapsa* sp. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 56: 1191-1193, <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.56.1191>
- CHRISTIANSEN, G.; FASTNER, J.; ERHARD, M.; BÖRNER, T. & DITTMANN, E. 2003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation. *Journal of Bacteriology*, 185: 564-572, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.185.2.564-572.2003>
- CHRISTIANSEN, G.; KURMAYER, R.; LIU, Q. & BÖRNER, T. 2006. Transposons inactivate biosynthesis of the nonribosomal peptide microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 117-123, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.1.117-123.2006>
- CZARNECKI, O.; LIPPERT, I.; HENNING, M. & WELKER, M. 2006. Identification of peptide metabolites of *Microcystis* (Cyanobacteria) that inhibit trypsin-like activity in planktonic herbivorous *Daphnia* (Cladocera). *Environmental Microbiology*, 8: 77-87, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00870.x>
- DOI, T.; HOSHINA, Y.; MOGI, H.; YAMADA, Y. & TAKAHASHI, T. 2006. Solid-phase combinatorial synthesis of aeruginosin derivatives and their biological evaluation. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 8: 571-582, <http://dx.doi.org/10.1021/cc0600270>
- EDWARDS, D.J.; MARQUEZ, B.L.; NOGLE, L.M.; MCPHAIL, K.; GOEGER, D.R.; ROBERTS, M.A. & GERWICK, W.H. 2004. Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Chemistry & Biology*, 11: 817-833, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.03.030>
- ELLA-MENYE, J.R.; NIE, X. & WANG, G. 2008. Synthesis of octahydropyrano[3,2-b]pyrrole-2-carboxylic acid derivatives from D-mannose. *Carbohydrate Research*, 343: 1743-1753, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2008.03.017>
- ERSMARK, K.; DEL VALLE, J.R. & HANESSIAN, S. 2008. Chemistry and biology of the aeruginosin family of serine protease inhibitors. *Angewandte Chemie International*, 47: 1202-1223, <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200605219>
- ETCHEGARAY, A. 1998. Biosíntese de antibióticos peptídicos em microrganismos. Pp. 393-419. In: I.S. Melo & J.L. Azevedo (eds.). *Ecologia microbiana*. Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, SP. 488p.
- ETCHEGARAY, A.; SILVA-STENICO, M.E.; MOON, D.H. & TSAI, S.M. 2004. *In silico* analysis of nonribosomal peptide synthetase of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: identification of putative siderophore and lipopeptide biosynthetic genes. *Microbiological Research*, 159: 425-437, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2004.09.009>
- EUSTAQUIO, A.S.; GUST, B.; LUFT, T.; LI, S.M.; CHATER, K.F. & HEIDE, L. 2003. Clorobiocin biosynthesis in *Streptomyces*: identification of the halogenase and generation of structural analogs. *Chemistry & Biology*, 10: 279-288.
- EUSTAQUIO, A.S.; POJER, F.; NOEL, J.P. & MOORE, B.S. 2008. Discovery and characterization of a marine bacterial SAM-dependent chlorinase. *Nature Chemical Biology*, 4: 69-74, <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2007.56>
- FASTNER, J.; ERHARD, M. & VON DÖHREN, H. 2001. Determination of oligopeptide diversity within a natural population of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) by typing single colonies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5069-5076, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.11.5069-5076.2001>



- FDA (Food and Drug Administration). 2004. Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee September 10. <<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/cder04.html#cardiovascular>>. (Acesso em 26/04/2012).
- FIRESTONE, R.A.; BARKER, P.L.; PISANO, J.M.; ASHE, B.M. & DAHLGREN, M.E. 1990. Monocyclic  $\beta$ -lactam inhibitors of human leukocyte elastase. *Tetrahedron*, 46: 2255-2262, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)82006-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(01)82006-8)
- FRANGEUL, L.; QUILLARDET, P.; CASTETS, A.M.; HUMBERT, J.F.; MATTHIJS, H.C.P.; CORTEZ, D.; TOLONEN, A.; ZHANG, C.C.; GRIBALDO, S.; KEHR, J.C.; ZILLIGES, Y.; ZIEMERT, N.; BECKER, S.; TALLA, E.; LATIFI, A.; BILLAULT, A.; LEPELLETIER, A.; DITTMANN, E.; BOUCHIER, C. & TANDEAU DE MARSAC, N. 2008. Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium. *BMC Genomics*, 9: 274, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-274>
- FUJII, K.; HARADA, K.-I.; SUZUKI, M.; KONDO, F.; IKAI, Y.; OKA, H. & SIVONEN, K. 1996. Novel cyclic peptides together with microcystins produced by toxic cyanobacteria. Pp. 559-562. *In*: T. Yatsunoto, Y. Oshima, Y. Fukuyo (eds.). Harmful and toxic algal blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris. 600p.
- FUJII, K.; SIVONEN, K.; ADACHI, K.; NOGUCHI, K.; SANO, H.; HIRAYAMA, K.; SUZUKI, M. & HARADA, K.-I. 1997. Comparative study of toxic and non-toxic cyanobacterial products: novel peptides from toxic *Nodularia spumigena* AV1. *Tetrahedron Letters*, 38: 5525-5528, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)01192-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(97)01192-1)
- FUJII, K.; SIVONEN, K.; NAGANAWA, E. & HARADA, K.-I. 2000. Non-toxic peptides from toxic cyanobacteria. *Tetrahedron*, 56: 725-733, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)01017-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(99)01017-0)
- FUKUTA, Y.; OHSHIMA, T.; GNANADESIKAN, V.; SHIBUGUCHI, T.; NEMOTO, T.; KISUGI, T.; OKINO, T. & SHIBASAKI, M. 2004. Enantioselective syntheses and biological studies of aeruginosin 298-A and its analogs: Application of catalytic asymmetric phase-transfer reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 5433-5438, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307154101>
- GADEMANN, K.; PORTMANN, C.; BLOM, J.F.; ZEDER, M. & JÜTTNER, F. 2010. Multiple toxin production in the cyanobacterium *Microcystis*: isolation of the toxic protease inhibitor cyanopeptolin 1020. *Journal of Natural Products*, 73: 980-984, <http://dx.doi.org/10.1021/np900818c>
- GERWICK, W.H.; PROTEAU, P.J.; NAGLE, D.G.; HAMEL, E.; BLOKHIN, A. & SLATE, D.L. 1994. Structure of curacin A, a novel antimitotic, antiproliferative, and brine shrimp toxic natural product from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Organic Chemistry*, 59: 1243-1245, <http://dx.doi.org/10.1021/jo00085a006>
- GESNER-APTER, S. & CARMELI, S. 2008. Three novel metabolites from a bloom of the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Tetrahedron*, 64: 6628-6634, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2008.05.031>
- GU, L.; WANG, B.; KULKARNI, A.; GEDERS, T.W.; GRINDBERG, R.V.; GERWICK, L.; HAKANSSON, K.H.; WIPF, P.; SMITH, J.; GERWICK, W.H. & SHERMAN, D.H. 2009. Metamorphic enzyme assembly in polyketide diversification. *Nature*, 459: 731-735, <http://dx.doi.org/10.1038/nature07870>
- GUSTAFSSON, D.; BYLUND, R.; ANTONSSON, T.; NILSSON, I.; NYSTRÖM, J.E.; ERIKSSON, H.; BREDBERG, H. & TEGER-NILSSON, A.C. 2004. A new oral anticoagulant: the 50-year challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3: 649-659, <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1466>
- GUYTON, A.C. & HALL, J.E. 1996. *Tratado de Fisiologia Médica*. 9 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. 1264p.
- HANESSIAN, S.; TREMBLAY, M.; MARZI, M. & DEL VALLE, J.R. 2005. Synthetic studies in the intramolecular carbocyclization of *n*-acyloxyiminium ions. Stereoelectronic and steric implications of nucleophilic alkene, alkyne, and allene tethers. *Journal of Organic Chemistry*, 70: 5070-5085, <http://dx.doi.org/10.1021/jo050326w>
- HANESSIAN, S.; TREMBLAY, M. & PETERSEN, J.F.W. 2004. The *N*-acyloxyiminium ion aza-prins route to octahydroindoles: total synthesis and structural confirmation of the antithrombotic marine natural product oscillarin. *Journal of the American Chemical Society*, 126: 6064-6071, <http://dx.doi.org/10.1021/ja030669g>
- HANESSIAN, S.; DEL VALLE, J.R.; XUE, Y. & BLOMBERG, N. 2006. Total synthesis and structural confirmation of chlorodysinosin A. *Journal of the American Chemical Society*, 128: 10491-10495, <http://dx.doi.org/10.1021/ja0625834>
- HARADA, K.-I.; MAYUMI, T.; SHIMADA, T.; FUJII, K.; KONDO, F.; PARK, H.D. & WATANABE, M.F. 2001. Co-production of microcystins and aeruginopeptins by natural cyanobacterial bloom. *Environmental Toxicology*, 16: 298-305, <http://dx.doi.org/10.1002/tox.1036>

- HARADA, K.-I.; MAYUMI, T.; SHIMADA, T.; SUZUKI, M.; KONDO, F. & WATANABE, M.F. 1993. Occurrence of four depsipeptides, aeruginopeptins, together with microcystins from toxic cyanobacteria. *Tetrahedron Letters*, 34: 6091-6094, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)61736-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(00)61736-7)
- HARRIGAN, G.G.; LUESCH, H.; YOSHIDA, W.Y.; MOORE, R.E.; NAGLE, D.G. & PAUL, V.J. 1999. Symplostatin 2: a dolostatin 13 analogue from the marine cyanobacterium *Symploca hypnoides*. *Journal of Natural Products*, 62: 655-658, <http://dx.doi.org/10.1021/np980553b>
- HOLLIMAN, F.G. 1969. Pigments of *Pseudomonas* species. Part I. Structure and synthesis of aeruginosin A. *Journal of the Chemical Society C-Organic*, 18: 2414-2516.
- HOPWOOD, D.A. 1997. Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Review*, 97: 2465-2498, <http://dx.doi.org/10.1021/cr960034i>
- ISHIDA, K.; CHRISTIANSEN, G.; YOSHIDA, W.Y.; KURMAYER, R.; WELKER, M.; VALLS, N.; BONJOCH, J.; HERTWECK, C.; BÖRNER, T.; HEMSCHIEDT, T. & DITTMANN, E. 2007. Biosynthesis and structure of aeruginoside 126a and 126b, cyanobacterial peptide glycosides bearing a 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole moiety. *Chemistry & Biology*, 14: 565-576, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.04.006>
- ISHIDA, K.; KATO, T.; MURAKAMI, M.; WATANABE, M. & WATANABE, M.F. 2000. Microginins, zinc metalloproteases inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*, 56: 8643-8656, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)00770-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00770-5)
- ISHIDA, K.; MATSUDA, H. & MURAKAMI, M. 1998a. Micropeptins 88-A to 88-F, chymotrypsin inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (NIES-88). *Tetrahedron*, 54: 5545-5556, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00242-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00242-7)
- ISHIDA, K.; MATSUDA, H. & MURAKAMI, M. 1998b. Four new microginins, linear peptides from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*, 54: 13475-13484, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00826-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00826-6)
- ISHIDA, K.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M. & YAMAGUCHI, K. 1997. Microginins 299-A and -B, leucine aminopeptidase inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (NIES-299). *Tetrahedron*, 53: 10281-10288, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)00684-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00684-4)
- ISHIDA, K.; OKITA, Y.; MATSUDA, H.; OKINO, T. & MURAKAMI, M. 1999. Aeruginosins, protease inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*, 55: 10971-10988, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)00621-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00621-3)
- ISHIDA, K.; WELKER, M.; CHRISTIANSEN, G.; CADEL-SIX, S.; BOUCHIER, C.; DITTMANN, E.; HERTWECK, C. & DEMARSAC, N.T. 2009. Plasticity and evolution of aeruginosin biosynthesis in cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 2017-2026, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02258-08>
- ITOU, Y.; ISHIDA, K.; SHIN, S.J.; MURAKAMI, M. 1999. Oscillapeptins A to F, serine protease inhibitors from the three strains of *Oscillatoria agardhii*. *Tetrahedron*, 55: 6871-6882, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(99\)00341-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(99)00341-5)
- JAKOBI, C.; OBERER, L.; QUIQUEREZ, C.; KÖNIG, W.A. & WECKESSER, J. 1995. Cyanopeptolin S, a sulfate-containing depsipeptide from a water bloom of *Microcystis* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 129: 129-134.
- JAKOBI, C.; RINEHART, K.L.; NEUBER, R.; MEZ, K.; WECKESSER, J. 1996. Cyanopeptolin SS, a disulphated depsipeptide from a water bloom: structure elucidation and biological activities. *Phycology*, 35: 111-116, <http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-35-6S-111.1>
- KANEKO, T.; NAKAJIMA, N.; OKAMOTO, S.; SUZUKI, I.; TANABE, Y.; TAMAOKI, M.; NAKAMURA, Y.; KASAI, F.; WATANABE, A.; KAWASHIMA, K.; KISHIDA, Y.; ONO, A.; SHIMIZU, Y.; TAKAHASHI, C.; MINAMI, C.; FUJISHIRO, T.; KOHARA, M.; KATOH, M.; NAKAZAKI, N.; NAKAYAMA, S.; YAMADA, M.; TABATA, S. & WATANABE, M.M. 2007. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. *DNA Research*, 14: 247-256, <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/dsm026>
- KASE, H.; KANEKO, M. & YAMADA, K. 1987. K-13, a novel inhibitor of angiotensin-I converting enzyme produced by *Micromonospora halophytica* subsp. *exilis*. 1. Fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Antibiotics*, 40: 450-454, <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.40.450>
- KAYA, K.; SANO, T.; BEATTIE, K.A. & CODD, G.A. 1996. Nostocyclin, a novel 3-amino-6-hydroxy-2-piperidone-containing cyclic depsipeptide from the cyanobacterium *Nostoc* sp. *Tetrahedron Letters*, 37: 6725-6728, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(96\)01452-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(96)01452-9)
- KLEINKAUF, H. & VON DÖHREN, H. 1996. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 236: 335-351, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00335.x>
- KODANI, S.; ISHIDA, K. & MURAKAMI, M. 1998. Aeruginosin 103-A, a thrombin inhibitor from the cyanobacterium *Microcystis viridis*. *Journal of Natural Products*, 61: 1046-1048, <http://dx.doi.org/10.1021/np980106w>
- KODANI, S.; SUZUKI, S.; ISHIDA, K. & MURAKAMI, M. 1999. Five new cyanobacterial peptides from water bloom materials of

- lake Teganuma (Japan). *FEMS Microbiology Letters*, 178: 343-348, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08697.x>
- KRAMER D. 2007. Microginin producing proteins and nucleic acids encoding a microginin gene cluster as well as methods for creating microginins. Patent EP1792981A1.
- LAGOS, N.; ONODERA, H.; ZAGATTO, P.A.; ADRINOLO, D.; AZEVEDO, S.M.O. & OSHIMA, Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from Brazil. *Toxicon*, 37: 1359-1373, [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(99\)00080-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(99)00080-X)
- LAMBALOT, R.H.; GEHRING, A.M.; FLUGEL, R.S.; ZUBER, P.; LACELLE, M.; MARAHIEL, M.A.; REID, R.; KHOSLA, C. & WALSH, C.T. 1996. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry & Biology*, 3: 923-936, [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521\(96\)90181-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(96)90181-7)
- LEE, A.Y.; SMITKA, T.A.; BONJOUKLIAN, R. & CLARDY, J. 1994. Atomic structure of the trypsin-A90720A complex: a unified approach to structure and function. *Chemistry & Biology*, 1: 113-117, [http://dx.doi.org/10.1016/1074-5521\(94\)90049-3](http://dx.doi.org/10.1016/1074-5521(94)90049-3)
- LOMBARDO, M.; PINTO, F.C.R.; VIEIRA, J.M.S.; HONDA, R.Y.; PIMENTA, A.M.C.; BEMQUERER, M.P.; CARVALHO, L.R. & KIYOTA, S. 2006. Isolation and structural characterization of microcystin-LR and three minor oligopeptides simultaneously produced by *Radiocystis feernandoi* (Chroococcales, Cyanobacteria): A Brazilian toxic cyanobacterium. *Toxicon*, 47: 560-566, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.01.024>
- LUESCH, H.; MOORE, R.E.; PAUL, V.J.; MOOBERRY, S.L. & CORBETT, T.H. 2001. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species. VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1. *Journal of Natural Products*, 64: 907-910, <http://dx.doi.org/10.1021/np010049y>
- MAL, H.; CRESTANI, B.; AUBIER, M. & FOURNIER, M. 1999. Emphysema: new concepts. *Medicine Sciences*, 15: 833-841.
- MARAHIEL, M.A.; STACHELHAUS, T. & MOOTZ, H.D. 1997. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Review*, 97: 2651-2673, <http://dx.doi.org/10.1021/cr960029e>
- MARQUEZ, B.L.; WATTS, K.S.; YOKOCHI, A.; ROBERTS, M.A.; VERDIER-PINARD, P.; JIMENEZ, J.I.; HAMEL, E.; SCHEUER, P.J. & GERWICK, W.H. 2002. Structure and absolute stereochemistry of hectochlorin, a potent stimulator of actin assembly. *Journal of Natural Products*, 65: 866-871, <http://dx.doi.org/10.1021/np0106283>
- MARTIN, C.; OBERER, L.; INO, T.; KÖNIG, W.A.; BUSCH, M. & WECKESSER, J. 1993. Cyanopeptolins, new depsipeptides from the cyanobacterium *Microcystis* sp. PCC 7806. *Journal of Antibiotics*, 46: 1550-1556, <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.46.1550>
- MARTIN, C.; SIVONEN, K.; MATERN, U.; DIERSTEIN, R. & WECKESSER, J. 1990. Rapid purification of the peptide toxins microcystin-LR and nodularin. *FEMS Microbiology Letters*, 56: 1-5, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04112.x>
- MATERN, U.; OBERER, L.; ERHARD, M.; HERDMAN, M. & WECKESSER, J. 2003a. Hofmannolin, a cyanopeptolin from *Scytonema hofmanni* PCC7110. *Phytochemistry*, 64: 1061-1067, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00467-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00467-9)
- MATERN, U.; OBERER, L.; FALCHETTO, R.A.; ERHARD, M.; KÖNIG, W.A.; HERDMAN, M. & WECKESSER, J. 2001. Scyptolin A and B, cyclic depsipeptides from axenic cultures of *Scytonema hofmanni* PCC 7110. *Phytochemistry*, 58: 1087-1095, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00400-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00400-9)
- MATERN, U.; SCHLEBERGER, C.; JELAKOVIC, S.; WECKESSER, J. & SCHULZ, G.E. 2003b. Binding structure of elastase inhibitor scyptolin A. *Chemistry & Biology*, 10: 997-1001, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.10.001>
- MATSUDA, H.; OKINO, T.; MURAKAMI, M. & YAMAGUCHI, K. 1996. Aeruginosins 102-A and B, new thrombin inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis viridis* (NIES-102). *Tetrahedron*, 52: 14501-14506, [http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020\(96\)00890-3](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020(96)00890-3)
- MCDONOUGH, M.A. & SCHOFIELD, C.J. 2003. New structural insights into the inhibition of serine proteases by cyclic peptides from bacteria. *Chemistry & Biology*, 10: 898-900, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2003.10.002>
- MOLEDINA, M.; CHAKIR, M. & GHANDI, P.J. 2001. A synopsis of the clinical uses of argatroban. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 12: 141-149, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1012919404290>
- MURAKAMI, M.; ISHIDA, K.; OKINO, T.; OKITA, Y.; MATSUDA, H. & YAMAGUCHI, K. 1995. Aeruginosins 98-A and B, trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-98). *Tetrahedron Letters*, 36: 2785-2788, [http://dx.doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)00396-T](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4039(95)00396-T)
- MURAKAMI, M.; OKITA, Y.; MATSUDA, H.; OKINO, T. & YAMAGUCHI, K. 1994. Aeruginosin 298-A, a thrombin and trypsin inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (NIES-298). *Tetrahedron Letters*, 35: 3129-3132, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)76848-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(00)76848-1)

- MURAKAMI, M.; SHIN, H.J.; MATSUDA, H.; ISHIDA, K. & YAMAGUCHI, K. 1997. A cyclic peptide, anabaenopeptin B, from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Phytochemistry*, 44: 449-452, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00437-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00437-2)
- NAMIKOSHI, M.; MURAKAMI, T.; WATANABE, M.F.; ODA, T.; YAMADA, J.; TSUJIMURA, S.; NAGAI, H. & OISHI, S. 2003. Simultaneous production of homoanatoxin-a, anatoxin-a, and a new non-toxic 4-hydroxyhomoanatoxin-a by the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja. *Toxicon*, 42: 533-538, [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00233-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00233-2)
- NAMIKOSHI, M. & RINEHART, K.L. 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 17: 373-384, <http://dx.doi.org/10.1007/BF01574768>
- NEUMANN, U.; FORCHERT, A.; FLURY, T. & WECKESSER, J. 1997. Microginin FR1, a linear peptide from a water bloom of *Mycrocystis* species. *FEMS Microbiology Letters*, 153: 475-478, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12612.x>
- NIE, X. & WANG, G. 2008. Total synthesis of aeruginosin 298-A analogs containing ring oxygenated variants of 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole. *Tetrahedron*, 64: 5784-5793, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2008.03.107>
- NOGAMI, T.; SHIGIHARA, Y.; MATSUDA, N.; TAKAHASHI, Y.; NAGANAWA, H.; NAKAMURA, H.; HAMADA, M.; MURAOKA, Y.; TAKITA, T.; IITAKA, Y. & TAKEUCHI, T. 1990. Neopyrrolomycin, a new chlorinated phenylpyrrole antibiotic. *Journal of Antibiotics*, 43: 1192-1194, <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.43.1192>
- NOGLE, L.M.; WILLIAMSON, R.T. & GERWICK, W.H. 2001. Somamides A and B, two new depsipeptide analogues of dolastatin 13 from a Fijian cyanobacterial assemblage of *Lyngbya majuscula* and *Schizothrix* species. *Journal of Natural Products*, 64: 716-719, <http://dx.doi.org/10.1021/np000634j>
- OHSHIMA, T.; GNANADESIKAN, V.; SHIBUGUCHI, T.; FUKUTA, Y.; NEMOTO, T. & SHIBASAKI, M. 2003. Enantioselective syntheses of aeruginosin 298-A and its analogues using a catalytic asymmetric phase-transfer reaction and epoxidation. *Journal of the American Chemical Society*, 125: 11206-11207, <http://dx.doi.org/10.1021/ja037290e>
- OKINO, T.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M. & YAMAGUCHI, K. 1993. Microginin, an angiotensin-converting enzyme inhibitor from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Letters*, 34: 501-504, [http://dx.doi.org/10.1016/0040-4039\(93\)85112-A](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4039(93)85112-A)
- OKINO, T.; QI, S.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, M. & YAMAGUCHI, K. 1997. Nostopeptins A and B, elastase inhibitors from the cyanobacterium *Nostoc minutum*. *Journal of Natural Products*, 60: 158-161, <http://dx.doi.org/10.1021/np960649a>
- OPIE, L.H. 1992. *Angiotensin converting enzyme inhibitors*. Wiley-Liss, New York, NY. 316p.
- OREM, A.; DEGER, O.; CIMSIT, G. & BAHADIR, S. 1997. Plasma polymorphonuclear leukocyte elastase levels and its relation to disease activity in psoriasis. *Clinica Chimica Acta*, 264: 49-56, [http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981\(97\)00072-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0009-8981(97)00072-7)
- OTSUKA, M.; ICHINOSE, K.; FUJII, I. & EBIZUKA, Y. 2004. Cloning, sequencing, and functional analysis of an iterative type I polyketide synthase gene cluster for biosynthesis of the antitumor chlorinated polyenone neocarzilin in *Streptomyces carzinostaticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 3468-3476, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.9.3468-3476.2004>
- PERRIN, C.L.; RODGERS, B.L. & O'CONNOR, J.M. 2007. Nucleophilic addition to a p-benzyne derived from an enediyne: a new mechanism for halide incorporation into biomolecules. *Journal of the American Chemical Society*, 129: 4795-4799, <http://dx.doi.org/10.1021/ja070023e>
- PETTIT, G.R.; KAMANO, Y.; HERALD, C.L.; DUFRESNE, C.; CERNY, R.L.; HERALD, D.L.; SCHMIDT, J.M. & KIZU, H.J. 1989. Antineoplastic agent. 174. Isolation and structure of the cytostatic depsipeptide dolastatin13 from the sea hare *Dolabella auricularia*. *Journal of the American Chemical Society*, 111: 5015-5017, <http://dx.doi.org/10.1021/ja00195a084>
- PFAU, R. 2003. Structure-based design of thrombin inhibitors. *Current Opinion in Drug Discovery*, 6: 437-450.
- PLOUTNO, A. & CARMELI, S. 2002. Modified peptides from a water bloom of the cyanobacterium *Nostoc* sp. *Tetrahedron*, 58: 9949-9957, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)01326-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(02)01326-1)
- PLOUTNO, A.; SHOSHAN, M. & CARMELI, S. 2002. Three novel protease inhibitors from a natural bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Natural Products*, 65: 973-978, <http://dx.doi.org/10.1021/np010597b>
- PRAGER, N.A.; ABENDSCHEIN, D.R.; MCKENZIE, C.R. & EISENBERG, P.R. 1995. Role of thrombin compared with factor XA in the procoagulant activity of whole blood clots. *Circulation*, 92: 962-967.
- PULIDO-CEJUDO, G.; CONWAY, B.; PROULX, P.; BROWN, R. & IZAGUIRRE, C.A. 1997. Bestatin-mediated inhibition of leucine aminopeptidase may hinder HIV infection. *Antiviral Research*, 36: 167-177, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-3542\(97\)00052-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-3542(97)00052-1)
- RADAU, G.; SCHERMULY, S. & FRITSCH, A. 2003. New cyanopeptide-derived low molecular weight inhibitors of trypsin-like serine proteases. *Archiv der Pharmazie*, 336: 300-309, <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.200300765>



- RANTALA, A.; FEWER, D.; HISBERGUES, M.; ROUHIAINEN, L.; VAITOMAA, J.; BÖRNER, T. & SIVONEN, K. 2004. Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 568-573, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0304489101>
- RESHEF, V. & CARMELI, S. 2001. Protease inhibitors from a water bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron*, 57: 2885-2894, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00141-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00141-7)
- RINEHART, K.L.; NAMIKOSHI, M. & CHOI, B.M. 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*, 6: 159-176, <http://dx.doi.org/10.1007/BF02186070>
- ROUHIAINEN, L.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; HYYTIAINEN, H.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R. & SIVONEN, K. 2000. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Molecular Microbiology*, 37: 156-167, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01982.x>
- ROUHIAINEN, L.; VAKKILAINEN, T.; SIEMER, B.L.; BUIKEMA, W.; HASELKORN, R. & SIVONEN, K. 2004. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (Microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 686-692, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.2.686-692.2004>
- ROUNGE, T.B.; ROHRLACK, T.; KRISTENSEN, T. & JAKOBSEN, K.S. 2008. Recombination and selectional forces in cyanopeptolin NRPS operons from highly similar, but geographically remote *Planktothrix* strains. *BMC Microbiology*, 8: 141, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-8-141>
- ROUNGE, T.B.; ROHRLACK, T.; NEDERBRAGT, A.J.; KRISTENSEN, T. & JAKOBSEN, K.S. 2009. A genome-wide analysis of nonribosomal peptide synthetase gene clusters and their peptides in a *Planktothrix rubescens* strain. *BMC Genomics*, 10: 396-406, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-396>
- ROUNGE, T.B.; ROHRLACK, T.; TOOMING-KLUNDERUD, A.; KRISTENSEN, T. & JAKOBSEN, K.S. 2007. Comparison of cyanopeptolin genes in *Planktothrix*, *Microcystis*, and *Anabaena* strains: evidence for independent evolution within each genus. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7322-7330, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01475-07>
- SANCELME, M.; FABRE, S. & PRUDHOMME, M. 1994. Antimicrobial activities of indolocarbazole and bis-indole protein kinase C inhibitors. *Journal of Antibiotics*, 47: 792-798, <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.47.792>
- SANDLER, B.; MURAKAMI, M. & CLARDY, J. 1998. Atomic structure of the trypsin-aeruginosin 98-B complex. *Journal of the American Chemical Society*, 120: 595-596, <http://dx.doi.org/10.1021/ja972991v>
- SANO, T. & KAYA, K. 1997. A 3-amino-10-chloro-2-hydroxydecanoic acid containing tetrapeptide from *Oscillatoria agardhii*. *Phytochemistry*, 44: 1503-1505, [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00767-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00767-4)
- SCHECHTER, I. & BERGER, A. 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27: 157-162, [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(67\)80055-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(67)80055-X)
- SCHOPF, J.W. 1996. Cyanobacteria: pioneers of the early Earth. *Beihefte zur Nova Hedwigia*, 112: 13-32.
- SCHWIENHORST, A. 2006. Direct thrombin inhibitors - a survey of recent developments. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 2773-2791, <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6219-z>
- SILVA-STENICO, M.E.; RIGONATO, J.; LEAL, M.G.; VAZ, M.G.M.V.; ANDREOTE, A.P.D.; SILVA, C.S.P. & FIORE, M.F. 2012. Screening protease inhibitors in cyanobacterial isolates. In: Fourth International Conference on Drug Discovery and Therapy (ICDDT). Dubai, Emirados Árabes Unidos. 1 CD-ROM.
- SILVA-STENICO, M.E.; SILVA, C.S.P.; LORENZI, A.S.; SHISHIDO, T.K.; ETCHEGARAY, A.; LIRA, S.P.; MORAES, L.A.B. & FIORE, M.F. 2011. Non-ribosomal peptides produced by Brazilian cyanobacterial isolates with antimicrobial activity. *Microbiological Research*, 166: 161-175, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2010.04.002>
- SINGH, R.K.; TIWARI, S.P.; RAI, A.K. & MOHAPATRA, T.M. 2011. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *Journal of Antibiotics*, 64: 4011-4012, <http://dx.doi.org/10.1038/ja.2011.21>
- SITACHITTA, N.; MARQUEZ, B.L.; WILLIAMSON, R.T.; ROSSI, J.; ROBERTS, M.A.; GERWICK, W.H.; NGUYEN, V. & WILLIS, C.L. 2000. Biosynthetic pathway and origin of the chlorinated methyl group in barbamide and dechlorobarbamide, molluscicidal agents from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Tetrahedron*, 56: 9103-9114, [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(00\)00763-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00763-8)
- STAUNTON, J. & WEISSMAN, J.K. 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Report*, 18: 380-416, <http://dx.doi.org/10.1039/a909079g>
- STEINER, J.L.R.; MURAKAMI, M. & TULINSKY, A. 1998. Structure of thrombin inhibited by aeruginosin 298-a from a blue-green alga. *Journal of the American Chemical Society*, 120: 597-598, <http://dx.doi.org/10.1021/ja973038t>
- STRAUB, C.; QUILLARDET, P.; VERGALLI, J.; DE MARSAC, N.T. & HUMBERT, J.-F. 2011. A day in the life of *Microcystis*

- aeruginosa* strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. *Plos One*, 6:e16208, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016208>
- TIDGEWELL, K.; CLARK, B.R. & GERWICK, W.H. 2010. The natural products chemistry of cyanobacteria. Pp. 141-188. In: L. Mander, H.-W. Lui (eds.). *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biologym*, vol. 2. Elsevier, Oxford. 683p.
- TILLETT, D.; DITTMANN, E.; ERHARD, M.; VON DÖHREN, H.; BÖRNER, T. & NEILAN, B.A. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology*, 7: 753-764, [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00021-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00021-1)
- TOOMING-KLUNDERUD, A.; ROHRLACK, T.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; KRISTENSEN, T. & JAKOBSEN, K.S. 2007. Structural analysis of a non-ribosomal halogenated cyclic peptide and its putative operon from *Microcystis*: implications for evolution of cyanopeptolins. *Microbiology*, 153: 1382-1393, <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2006/001123-0>
- TOYOTA, E.; SEKIZAKI, H.; TAKAHASHI, Y.; ITOH, K. & TANIZAWA, K. 2005. Amidino-containing schiff base copper(II) and iron(III) chelates as a thrombin inhibitor. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 53: 22-26, <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.53.22>
- TSUKAMOTO, S.; PAINULY, P.; YOUNG, K.; YANG, X. & SHIMIZU, Y. 1993. Microcystilide A: a novel cell-differentiation-promoting depsipeptide from *Microcystis aeruginosa* NO-15-1840. *Journal of the American Chemical Society*, 115: 11046-11047, <http://dx.doi.org/10.1021/ja00076a095>
- VALLS, N.; LÓPEZ-CANET, M.; VALLRIBERA, M. & BONJOCH, J. 2000. Total synthesis and reassignment of configuration of aeruginosin 298-A. *Journal of the American Chemical Society*, 122: 11248-11249, <http://dx.doi.org/10.1021/ja002341i>
- VALLS, N.; LOPEZ-CANET, M.; VALLRIBERA, M. & BONJOCH, J. 2001. First total syntheses of aeruginosin 298-A and aeruginosin 298-B, based on a stereocontrolled route to the new amino acid 6-hydroxyoctahydroindole-2-carboxylic. *Chemistry-A European Journal*, 7: 3446-3460, [http://dx.doi.org/10.1002/1521-3765\(20010817\)7:16<3446::AID-CHEM3446>3.0.CO;2-0](http://dx.doi.org/10.1002/1521-3765(20010817)7:16<3446::AID-CHEM3446>3.0.CO;2-0)
- VALLS, N.; VALLRIBERA, M.; CARMELI, S. & BONJOCH, J. 2003. Syntheses of both the putative and revised structures of aeruginosin EI461 bearing a new bicyclic  $\alpha$ -amino acid. *Organic Letters*, 5: 447-450, <http://dx.doi.org/10.1021/ol0273250>
- VAN WAGONEN, R.M.; DRUMMOND, A.K. & WRIGHT, J.L.C. 2006. Biogenetic diversity of cyanobacterial metabolites. *Advances in Applied Microbiology*, 61: 89-182, [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(06\)61004-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(06)61004-6)
- VILLA, F.; LIESKE, K. & GERWICK, L. 2010. Selective MyD88-dependent pathway inhibition by the cyanobacterial natural product malyngamide F acetate. *European Journal of Pharmacology*, 629: 140-146, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.12.002>
- VON DÖHREN, H.; KELLER, U.; VATER, J. & ZOCHER, R. 1997. Multifunctional peptide synthetases. *Chemical Review*, 97: 2675-2705, <http://dx.doi.org/10.1021/cr9600262>
- VON ELERT, E.; OBERER, L.; MERKEL, P.; HUHN, T. & BLOM, J.F. 2005. Cyanopeptolin 954, a chlorine-containing chymotrypsin inhibitor of *Microcystis aeruginosa* NIVA Cya 43. *Journal of Natural Products*, 68: 1324-1327, <http://dx.doi.org/10.1021/np050079r>
- WALSH, C.T.; GEHRING, A.M.; WEINREB, P.H.; QUADRI, L.E.N. & FLUGEL, R.S. 1997. Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthetases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1: 309-315, [http://dx.doi.org/10.1016/S1367-5931\(97\)80067-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1367-5931(97)80067-1)
- WATANABE, M.F.; TSUJIMURA, S.; OISHI, S.; NIKI, T. & NAMIKOSKI, M. 2003. Isolation and identification of homoanatoxin-a from a toxic strain of the cyanobacterium *Raphidiopsis mediterranea* Skuja isolated from Lake Biwa, Japan. *Phycologia*, 42: 364-369, <http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-42-4-364.1>
- WECKESSER, J.; MARTIN, C. & JAKOBI, C. 1996. Cyanopeptolins, depsipeptides from cyanobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 133-138, [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80038-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80038-5)
- WELKER, M.; BRUNKE, M.; PREUSSEL, K.; LIPPERT, I. & VON DÖHREN, H. 2004. Diversity and distribution of *Microcystis* (Cyanobacteria) oligopeptide chemotypes from natural communities studied by single colony mass spectrometry. *Microbiology*, 150: 1785-1796, <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26947-0>
- WELKER, M. & VON DÖHREN, H. 2006. Cyanobacterial peptides - Nature's own combinatorial biosynthesis. *FEMS Microbiological Review*, 30: 530-563, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00022.x>
- WELKER, M. & ERHARD, M. 2007. Consistency between chemotyping of single filaments of *Planktothrix rubescens* (cyanobacteria) by MALDI-TOF and the peptide patterns of strains determined by HPLC-MS. *Journal of Mass Spectrometry*, 42: 1062-1068, <http://dx.doi.org/10.1002/jms.1237>
- WELKER, M.; MARŠÁLEK, B.; SEJNOHOVÁ, L. & VON DÖHREN, H. 2006. Detection and identification of oligopeptides in *Microcystis* (cyanobacteria) colonies: toward an understanding of metabolic diversity. *Peptides*, 27: 2090-2103, <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.014>
- WILLIAMS, P.G.; YOSHIDA, W.Y.; MOORE, R.E.; PAUL, V.J. 2003. Tasipeptins A and B: new cytotoxic depsipeptides from

the marine cyanobacterium *Symploca* sp. *Journal of Natural Products*, 66: 620-624, <http://dx.doi.org/10.1021/np020582t>

WILMOUTH, R.C.; KASSAMALLY, S.; WESTWOOD, N.J.; SHEPPARD, R.J.; CLARIDGE, T.D.W.; APLIN, R.T.; WRIGHT, P.A.; PRITCHARD, G.J. & SCHOFIELD, C.J. 1999. Mechanistic insights into the inhibition of serine proteases by monocyclic lactams. *Biochemistry*, 38: 7989-7998, <http://dx.doi.org/10.1021/bi990098y>

WRASIDLO, W.; MIELGO, A.; TORRES, V.A.; BARBERO, S.; STOLETOV, K.; SUYAMA, T.L.; KLEMKE, R.L.; GERWICK, W.H.; CARSON, D.A. & STUPACK, D.G. 2008. The marine lipopeptide somocystinamide A triggers apoptosis via caspase 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 2313-2318, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0712198105>

YASUNO, M.; SUGAYA, Y.; KAYA, K. & WATANABE, M. 1998. Variations in the toxicity of *Microcystis* species to *Moina macrocopa*. *Phycological Research*, 46: 31-36, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1835.1998.00121.x>

YASUZAWA, T.; SHIRAHATA, K. & SANO, H. 1987. K-13, a novel inhibitor of angiotensin-I converting enzyme produced by *Micromonospora halophytica* subsp *exilis*. 2. Structure determination. *Journal of Antibiotics*, 40: 455-458, <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.40.455>

ZAIDI, S.H.E.; HUI, C.C.; CHEAH, A.Y.L.; YOU, X.-M.; HUSAIN, M. & RABINOVITCH, M. 1999. Targeted overexpression of elafin protects mice against cardiac dysfunction and mortality following viral myocarditis. *Journal of Clinical Investigation*, 103: 1211-1219, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI5099>

Submetido em 23/12/2011

Aceito em. 09/03/2012