



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Desenho, caracterização e encriptação de peptídeos bioativos como estratégia para o processo de entrega e otimização do perfil de atividade.

Mariana Magalhães Nóbrega

Orientador: Prof. Dr. Carlos Bloch Júnior

Brasília - DF, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR
LABORATÓRIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

Desenho, caracterização e encriptação de peptídeos bioativos como estratégia para o processo de entrega e otimização do perfil de atividade

Mariana Magalhães Nóbrega

Orientador: Prof. Dr. Carlos Bloch Júnior

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em ciências biológicas, área de concentração: Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Dr. Carlos Bloch Jr. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Membro Externo vinculado ao Programa de Pós-Graduação e Presidente da banca

Prof. Dr Marcelo de Macedo Brígido. Instituto de Ciências Biológicas / Universidade de Brasília. Membro Interno vinculado ao Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos. Universidade Federal de Santa Catarina. Membro Externo não vinculado ao Programa de Pós-Graduação.

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand. Instituto de química/Universidade de Brasília. Membro externo não vinculado ao programa de pós graduação.

SUPLENTE:

Dr. Elibio Leopoldo Rech Filho. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Membro Externo vinculado ao Programa de Pós-Graduação.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus avós, Edmilson (*in memoriam*) e Nilda, Eudes (*in memoriam*) e Anete, por todo amor, entusiasmo e inspiração para a vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer aos meus pais por terem me criado e por toda a contribuição de valores e exemplos que são fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional. Vocês são os pilares da minha vida, muito obrigada por todo amor e carinho.

Quero agradecer também minha mãe Gláucia e ao Pitinha, por todo amor, convívio e dedicação comigo, vocês são especiais !

Ao meu amigo, companheiro, namorado, marido o Fernando Fonseca por toda a admiração, respeito, amor, afeto , por cuidar sempre de mim, tudo ao seu lado parece ser mais fácil.

Ao meu orientador, professor Carlos Bloch Jr, pela orientação, convívio, reflexões, discussões, paciência, por ser uma pessoa que me apoiou em momentos difíceis e nas minhas conquistas.

À toda minha família, em especial ao meu irmão Rodrigo e meus eternos priminhos, Zé Carlos, Pedro Vidal, Isabella, Bia e Vanessa.

Aos amigos do Laboratório de Espectrometria de Massa, Marcelo Ramada, Eder, Zé, Lipe, Daniel, Diego, Eduardo (fofinho), Maura, Bia, Luciano, Jorge, muito obrigada por toda ajuda, churrascos e momentos de descontração.

I would like to thank professor Bruno and Dr. Barbara for all the assistance during my stay in Belgium. I also would like to thank the PFI lab group: Sara, Katy, Tanne, Jasper, Els, Jenny.

À todos servidores e funcionários do IFG campus Águas Lindas-GO que se empenham constantemente em proporcionar um ensino de qualidade para uma comunidade tão acolhedora, que enfrenta muitas dificuldades. Agradeço em especial ao professor Tiago Araújo, Dirceu, Marcos e Willian.

Aos meus amigos, Annya, Eduardo, Felipe, Ingrid, Juliana, Maria Claudia, Mariana Lima, Mariana Simonetti, Milena e Patrícia. Muito obrigada por estarem presentes na minha vida.

Ao Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, por ter aceito o convite, pelas sugestões e revisões.

Ao Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand, por todas as sugestões e discussões sobre a tese.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido por sua participação e sugestões.

À Ana, da secretaria do Departamento de Pós Graduação em Biologia Molecular por toda sua competência, obrigada.

Ao departamento de pós graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB) e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo espaço físico, equipamentos e tudo o que foi necessário para possibilitar o desenvolvimento do trabalho. À CAPES e o CNPq pelas bolsas de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIACÇÕES E ACRÔNIMOS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1.0 INTRODUÇÃO GERAL	16
1.1 Peptídeos endógenos	17
1.2 Peptídeos encriptados	20
1.3 Peptídeos com mais de uma função	22
1.4 Fluxograma dos resultados apresentados ao longo da tese	23
CAPITULO 1 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICPATIVA DE PEPTÍDEOS OPIÓIDES E ESTRATÉGIAS PARA O PROCESSO DE ENTREGA E OTIMIZAÇÃO DO PERFIL DE ATIVIDADE.	24
1.0 Peptídeos opioides	25
1.1 Pontes dissulfeto	27
1.2 Estratégias para otimização de peptídeos bioativos	28
2.0 JUSTIFICATIVA	32
3.0 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivos específicos	34
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Síntese dos peptídeos	35
4.2 Síntese da MTOXI	36
4.3 Clivagem dos peptídeos e da MTOXI	37
4.4 Purificação dos peptídeos	37
4.5 Testes com animais	38
4.6 Digestão enzimática MTOXI	39
4.7 Cromatografia líquida e espectrometria de massa LC-MS	40
4.8 Dicroísmo circular MTOXI	41
4.9 Estratégia para identificar a formação das pontes dissulfeto	41
5.0 RESULTADOS	42
5.1 Análise dos componentes obtidos (MS) do PSLEM 11011 e 11012	42
Figura 10. Espectro obtido para o PSLEM 11012 purificado, após análise por eletrospray, dupla carga 574.2968 Da.	45
5.2 Confirmação da identidade molecular	45

5.3 Purificação dos peptídeos	47
5.4 Análise antinociceptiva.....	49
5.5 Análise das possibilidades das pontes dissulfeto predominante	51
5.6 Análise dos componentes obtidos (MS)	52
5.7 Verificação da identidade dos fragmentos peptídicos (MS/MS).....	53
5.8 Dicroísmo circular (dc).....	63
5.9 Análise dos fragmentos peptídicos digeridos da MTOPIOXI por LC-MS	64
5. 10 Perfil comparativo de cinética entre a MTOXI e a proteína reduzida	72
6.0 DISCUSSÃO	76
CAPITULO 2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS ENCRIPADOS NO GENOMA DE <i>Arabidopsis thaliana</i>.	
1.0 INTRODUÇÃO.....	83
2.0 JUSTIFICATIVA	85
3.0 OBJETIVO	87
3.1 Objetivos específicos	87
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	88
4.1 Obtenção das sequências dos peptídeos.....	88
4.2 Construção dos vetores de expressão.....	89
4.3 Recombinação vetor de destino (pB2GW7)	89
4.4 Preparação de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> e Transformação com o vetor de expressão.....	90
4.5 Transformação de <i>A.thaliana</i>	92
4.6 Cultivo e Manutenção de <i>A. thaliana</i>	92
4.7 Semeadura das sementes.....	92
4.8 Transferência para o solo	92
4.9 Isolamento do RNA	92
4.10 Quantificação RNA.....	93
4.11 Tratamento com DNase e preparo do cDNA.....	93
4.12 Desenho de <i>primers</i>	93
4.13 qRT-PCR	94
4.14 Susceptibilidade da planta ao fungo <i>Botrytis cinerea</i>	94
4.15 Segunda geração de plantas	95
5.0 RESULTADOS	96
5.1 Desenho dos <i>primers</i>	96

5.2 qRT-PCR	96
5.3 Ensaio de infecção da planta pelo fungo <i>Botrytis cinerea</i>	100
6.0 DISCUSSÃO	103
7.0 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS GERAIS	105
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXO-I	123
ANEXO-II	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Em A) Esquema representando o gene da proencefalina (<i>proenkephalin</i>).....	17
Figura 2. Esquema representando o Sistema Renina Angiotensina e Aldosterona (RAA) no controle da pressão arterial sistêmica.	18
Figura 3. Esquema representando o Sistema Renina Angiotensina e Aldosterona com enfoque na síntese da angiotensina 1-7 e suas funções.	19
Figura 4: Esquema ilustrativo representando o mecanismo molecular dos receptores opioides no controle da nocicepção	26
Figura 5. Peptídeos opioides inseridos na proteína MTOXI (abreviatura de <i>molecular tailoring</i> , opioides e oxidação)	32
Figura 6. Espectro coma série isotópica teórica para o PSLEM 11011 (YPPFGWGGIPP), obtido por meio do programa Compass Isotopic Pattern.	42
Figura 7. Espectro do PSLEM 11011 (YPPFGWGGIPP), representação da série isotópica obtida por ESI.....	43
Figura 8. Espectro com a série isotópica teórica para o PSLEM 11012 (YPPFKWGGVPP), obtido por meio do programa <i>Compass Isotopic Pattern</i>	43
Figura 9. Espectro do PSLEM 11012 (YPPFKWGGVPP), representação da série isotópica obtida por ESI.....	44
Figura 10. Espectro obtido para o PSLEM 11011 purificado	44
Figura 11. Espectro obtido para o PSLEM 11012 purificado	45
Figura 12. Espectro obtido por MS/MS para confirmação da identidade do PSLEM 11011 ..	46
Figura 13. Espectro obtido por MS/MS para confirmação da identidade do PSLEM 11012 ..	47
Figura 14. Cromatograma obtido para o PSLEM 11011	48
Figura 15. Cromatograma obtido para o PSLEM 11012.....	48
Figura 16. Índice de antinocicepção do PSLEM 11011 no teste do <i>Tail Flick</i>	49
Figura 17. Índice de antinocicepção do PSLEM 11012 no teste do <i>Tail Flick</i>	49
Figura 18. Índice de antinocicepção do PSLEM 11011 no teste do <i>Hot Plate</i>	50
Figura 19. Índice de antinocicepção do PSLEM 11012 no teste do <i>Hot Plate</i>	50
Figura 20. Possibilidades para os pares dissulfeto	51
Figura 21. Possibilidade predominante de formação das pontes dissulfeto	51
Figura 22. Espectro indicando a série isotópica e a identidade do fragmento YPPFGWGGK..	54
Figura 23. Espectro indicando a série isotópica e a identidade do fragmento YPPFGWGGKK.	55
Figura 24. Espectro indicando a série isotópica e a identidade do fragmento CRYPPFKNCNGGK.....	56
Figura 25. Espectro indicando a série isotópica e a identidade do fragmento CLDSEACK. ..	57
Figura 26. Espectro indicando a série isotópica e a identidade do fragmento YGGIPP.	58
Figura 27. Em A $[M+H]^+ = 911.43\text{Da}$ e B $[M+H]^+ = 1039.53\text{Da}$ espectros indicando a série isotópica mono carregado para a proteína aberta.	59
Figura 28. Em C $[M+H]^+ = 813.40\text{Da}$ e D $[M+H]^+ = 554.29\text{Da}$ espectro indicando a série isotópica mono carregado para a proteína aberta.	60

Figura 29. Em E $[M+H]^+ = 406.22\text{Da}$, em F $[M+H]^+ = 592.24\text{Da}$ espectros indicando a série isotópica mono carregado para a proteína aberta.	61
Figura 30. Em G $[M+H]^+ = 868.34\text{Da}$, em H $[M+H]^+ = 603.31\text{Da}$ espectros indicando a série isotópica mono carregado para a proteína aberta.	62
Figura 31. Espectro obtido na região do U.V distante, proteína reduzida.....	63
Figura 32. Espectro obtido na região do U.V distante para a MTOXI.....	63
Figura 33. Área de cada fragmento obtido com 5 minutos de digestão.	65
Figura 34. Área de cada fragmento obtido com 10 minutos de digestão.	66
Figura 35. Área de cada fragmento obtido com 15 minutos de digestão.	67
Figura 36. Área de cada fragmento obtido com 30 minutos de digestão.	68
Figura 37. Área de cada fragmento obtido com 45 minutos de digestão.	69
Figura 38. Área de cada fragmento obtido com 60 minutos de digestão.	70
Figura 39. Gráfico de barras com a média para cada fragmento no respectivo tempo	71
Figura 40. Cinética de proteólise nos tempos 5 e 10 minutos para a proteína aberta e fechada.	73
Figura 41. Cinética de proteólise nos tempos 15 e 30 minutos para a proteína aberta e fechada	74
Figura 42. Cinética de proteólise nos tempos 45 e 60 minutos para a proteína aberta e fechada	75
Figura 43. Representação esquemática do vetor pB2GW7	91
Figura 44. Gráfico em barras representando a taxa de expressão relativa para cada planta do gene AT1S.	97
Figura 45. Gráfico em barras representando a taxa de expressão relativa para cada planta do gene AT2S.	98
Figura 46. Gráfico em barras representando a taxa de expressão relativa para cada planta do gene AT3S.	98
Figura 47. Gráfico em barras representando a taxa de expressão relativa para cada planta do gene AT4S.	99
Figura 48. Gráfico em barras representando a taxa de expressão do gene AT1.....	99
Figura 49. Gráfico em barras representando a taxa de expressão do gene AT4.....	100
Figura 50. Exemplo do ensaio de infecção com esporo de <i>B. cinerea</i>	100
Figura 51. Gráfico com resultados obtidos para o ensaio de infecção em plantas (T1).	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequência de íons liberados após digestão com tripsina	51
Tabela 2- Sequências nucleotídicas dos peptídeos antimicrobianos.	88
Tabela 3. Tabela referente as sequências de <i>primers</i> utilizados no qRT-PCR.....	96
Tabela 4. Planilha com o resultado da infecção por <i>B. cinerea</i> (T1).	101

LISTA DE ABREVIACOES E ACRONIMOS

ACN- Acetonitrila
ADP- Adenosina difosfato
AMPc- Adenosina monofosfato cíclico
ATP- Adenosina trifosfato
Da- Dalton
DCM- Diclorometano
DIPEA- N,N-Diisopropiletilamina
DMF- N,N-Dimetilformamida
DOR- *Delta opioid receptor*
DRT- Núcleo reticular dorsal
ECA- Enzima conversora de angiotensina
EDT- 1,2-etanoditiol
ESI - *Eletrospray Ionization*
Fmoc - Fluorenilmetiloxicarbonil
GDP- Guanosina difosfato
GPCRs- *G protein-coupled receptors*
GTP- Guanosina trifosfato
h- Horas
HPLC- *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)
KOR- *Kappa opioid receptor*
LC- *Locus Coeruleus*
Maldi - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*
M- Molar
mM- Millimolar
min- Minutos
MOR- *Mu opioid receptor*
MS- Espectrometria de Massa
MS/MS- Espectro de Fragmentação
nm- Nanmetros
r.p.m- Rotações por minuto
ORL- *Opioid receptor-like*
PAG- Região periaquedutal cinza
PKA- Proteína quinase A
RMV- Medula rostroventral
s- Segundos
SNC- Sistema nervoso central
TBTU- Tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurnio
TFA - cido trifluoracético
TIS - Triisopropilsilano
TOF- *Time-of-flight*

RESUMO

A caracterização de peptídeos encriptados em proteínas pode ser uma estratégia que possibilita diversas aplicações na biotecnologia, que vão desde o desenvolvimento de novos fármacos até a produção de plantas geneticamente modificadas. O presente estudo tem como objetivo geral a prospecção, bem como, o desenho de novas moléculas a partir de peptídeos encriptados em proteínas que possam apresentar atividades biológicas. Dessa forma, foram desenhados dois peptídeos que apresentam dupla atividade (opioide e hipotensora). Tais peptídeos foram sintetizados isoladamente e também de maneira que formassem uma única cadeia polipeptídica, dando origem a uma pequena proteína de 35 resíduos contendo duas pontes dissulfeto denominada MTOXI. O objetivo do desenho da MTOXI é a otimização da atividade frente à ação de proteases, permitindo uma liberação possivelmente controlada de peptídeos. Tanto os peptídeos separadamente, quanto a proteína MTOXI foram sintetizados por meio de síntese química em fase sólida, seguida da purificação em cromatografia líquida em alta eficiência. O grau de pureza e a confirmação foram determinados por espectrometria de massa, MALDI e ESI. Os peptídeos foram testados em camundongos por via intraperitoneal, com intuito de avaliar sua possível atividade antinociceptiva nos testes da placa quente (*Hot Plate*) e teste de retirada da cauda (*Tail Flick*). Os testes *in vivo* demonstraram que os peptídeos sintéticos PSLEM 11011 e 11012 apresentaram atividade antinociceptiva com perfil de atividade mais lento e duradouro em relação à morfina. A proteína MTOXI foi digerida com tripsina, em quadruplicatas, sendo avaliado o perfil de proteólise e liberação dos fragmentos peptídicos durante uma hora. O ensaio da digestão foi analisado por LC-MS incluindo os controles positivo (digestão da proteína reduzida) e negativo. A área de cada fragmento no respectivo tempo foi determinada. Os peptídeos bioativos permaneceram íntegros durante o processo de digestão e apresentaram aumento na área ao longo do tempo, o que sugere que a estratégia desenvolvida é promissora para a liberação controlada de peptídeos e para otimização do perfil de atividade. Posteriormente foi iniciada a expressão de peptídeos antimicrobianos encriptados no genoma de *Arabidopsis thaliana* (planta modelo) para serem reinseridos no genoma da própria planta com o objetivo de diminuir a suscetibilidade da planta contra o fungo *Botrytis cinerea*. A utilização de peptídeos encriptados para desenhar peptídeos e proteínas com atividade biológica mostrou-se promissora para futuras aplicações biotecnológicas.

Palavras chave: Peptídeos encriptados, peptídeos opioides e expressão de peptídeos antimicrobianos.

ABSTRACT

The characterization of encrypted peptides from source proteins can be a strategy that enables several biotechnological applications, ranging from the development of new drugs to the production of genetically modified organisms. The following work aimed at prospecting and designing new molecules using peptides encrypted in proteins that may present biological activities. Thus, two peptides with dual activity (opioid and hypotensive) were designed and subsequently inserted into a small protein (MTOXI) with two disulfide bridges, in order to optimize activity against the action of proteases and allowing a controlled release of the peptides. The peptides and the MTOXI protein were synthesized by chemical solid-phase synthesis using the fmoc strategy, followed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) purification. The purity and sequence confirmation were determined by MALDI and ESI mass spectrometry. The peptides were intraperitoneally injected in mice with the purpose of evaluating the antinociceptive activity via Hot plate and Tail Flick tests. In the *in vivo* assays, the synthetic peptides PSLEM 11011 and PSLEM 11012 presented antinociceptive activity with a later and long-lasting activity profile compared to morphine. The MTOXI protein was digested with trypsin, in four replicates, and the proteolysis profile and peptide fragment release analyzed during 5, 10, 15, 30, 45 and 60 minutes. The digestion assay was analyzed in each time by LC-MS, including the positive (reduced protein digestion) and negative controls. Determination of the area of each fragment in the respective time was obtained and disulfide pair formation identified. Bioactive peptides remained intact during the digestion process and showed increased area over time, which suggests that the developed strategy for the controlled release of peptides and optimization of activity profile is promising. Later, the identification and selection of peptides with antimicrobial physicochemical properties, encrypted in the genome of *Arabidopsis thaliana* was conducted. These peptides were reintroduced into *A. thaliana*'s own genome aiming at reducing plant susceptibility to the pathogen *Botrytis cinerea*. The use of encrypted peptides to design peptides and proteins with biological activity has shown promise for future biotechnological applications.

Keywords: Encrypted peptides, opioid peptides, antimicrobial peptide expression.

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

A prospecção e caracterização de peptídeos e proteínas bioativos oriundos da biodiversidade, contribui para o desenvolvimento da biotecnologia tanto na área de novas moléculas terapêuticas como na produção de plantas transgênicas (Brand *et al.*, 2012). A diversidade química e biológica presente nessas moléculas constitui um potencial exploratório promissor para o desenho de novas moléculas sintéticas (Cheek, 2006; Cragg, 2007; Daly, 2011).

Atualmente mais de 7000 peptídeos bioativos foram identificados no organismo humano, esses exercem diversas funções biológicas que incluem: hormônios, neurotransmissores, fatores de crescimento entre outros. Esses peptídeos são altamente seletivos e específicos na interação com o seu respectivo alvo molecular (receptores, canais iônicos entre outros) (Keld Fosgerau, 2015). Além disso, possuem algumas propriedades intrínsecas a sua atividade, que incluem: alta especificidade, potência elevada e pouca toxicidade (Mason, 2010).

Alguns peptídeos, como os peptídeos endógenos, estão presentes em sua forma inativa na proteína parental e são liberados por meio da clivagem proteolítica de polipeptídeos. Outros peptídeos podem ser obtidos por meio da alimentação (componentes de natureza proteica), durante a digestão enzimática que ocorre no trato gastro intestinal ou ainda, por meio de alimentos processados (Steffi Rudolph, 2016) .

A estrutura primária dos peptídeos é determinante no processo de desencadeamento da atividade biológica no organismo. Eles podem exercer diversas ações associadas a modulação fisiológica do sistema endócrino, imune, cardiovascular e sistema nervoso (Martha Phelan A, 2009; Wada e Lonnerdal, 2014). Na literatura já foram caracterizados peptídeos que apresentam diversas atividades biológicas, como antimicrobianas (Zaslhoff, 2002; Fjell *et al.*, 2012), opióides (Goldberg, 2010), hipotensoras (Ruiz-Gimenez *et al.*, 2011), antitrombóticas (Menezes *et al.*, 2011) entre outras.

Devido a essas propriedades, os peptídeos bioativos destacam-se atualmente como um ponto de partida interessante no desenho de novos fármacos e de aplicação na indústria de alimentos (Fosgerau e Hoffmann, 2015).

1.1 Peptídeos endógenos

Dentre os peptídeos que podem estar presentes em diferentes matrizes proteicas, este trabalho irá focar nos peptídeos que possuem as seguintes atividades biológicas: os opioides, hipotensores e antimicrobianos.

O primeiro opioide endógeno descrito foi a Met encefalina e a Leu encefalina em 1975 por Hughes e colaboradores, que identificaram a existência de uma substância endógena que agia como agonista nos receptores opioides (Hughes.J, 1975). Posteriormente, outros grupos identificaram diversos peptídeos endógenos, que foram caracterizados em relação a especificidade entre os receptores opioides, como também em relação ao processo de síntese desses peptídeos (Douglas. J, 1984).

A síntese de alguns neuropeptídeos não ocorre de forma direta nos ribossomos, como no processo de síntese de proteínas. Eles são provenientes de proteínas precursoras e quando ocorre o processo de proteólise eles são liberados, ou seja, eles são produzidos a partir de um proneuropeptídeo. As encefalinas são formadas a partir do processo de clivagem enzimática da proencefalina (precursor proteico), elas apresentam meia vida curta quando comparada com o precursor proencefalina (Ueli Gluber, 1982; Ernst. A, 2006). A figura 1, ilustra o processo de síntese dos neuropeptídeos com os respectivos sítios de clivagem para a Met encefalina (ME) e Leu encefalina (L) a partir de proteína precursora a proencefalina.

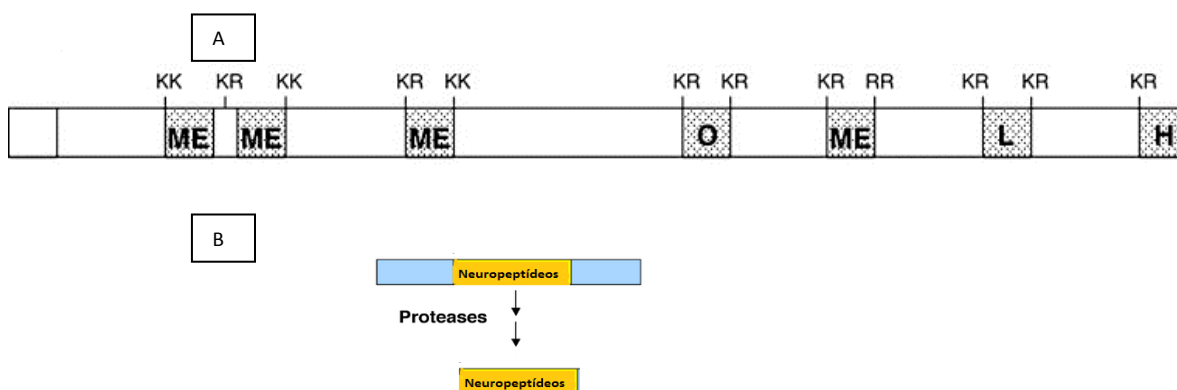


Figura 1. Em A) Esquema representando o gene da proencefalina (*proenkephalin*) com os sítios de clivagem (KK, KR, RR) que vão originar os peptídeos Met Encefalina (ME) e Leu Encefalina (L). Outros peptídeos opioides relacionados são o ME-Arg-Phe (H) e ME-Arg-Gly-Cleu (O). Adaptado de (Hook *et al.*, 2010).

Os receptores opioides (μ , κ e δ) localizados no Sistema Nervoso Central (SNC) e periférico, são extensivamente estudados como alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos que possam atuar no controle da dor crônica (Aldrich e Mclaughlin, 2012).

Além dos peptídeos endógenos da classe dos opioides, existem outros peptídeos como as angiotensinas (I e II) e angiotensina 1-7 que possuem papel central no sistema cardiovascular. Muitos peptídeos que possuem atividade hipotensora, podem ter como alvo a inibição da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA). A ECA possui atividade central na regulação do sistema Renina Angiotensina e Aldosterona (RAA). Ela é uma zinco metalopeptidase com dois sítios catalíticos (domínios catalíticos no N e C - terminal) e catalisa a formação da angiotensina II a partir da angiotensina I e também influencia no metabolismo da bradicinina (Fagyas *et al.*, 2014; Wada e Lonnerdal, 2014). A angiotensina II possui ação vasoconstritora, que afeta a função renal e o sistema cardiovascular. Já a bradicinina possui ação vasodilatadora. A figura 2 ilustra o esquema de atividades relacionadas ao sistema RAA.

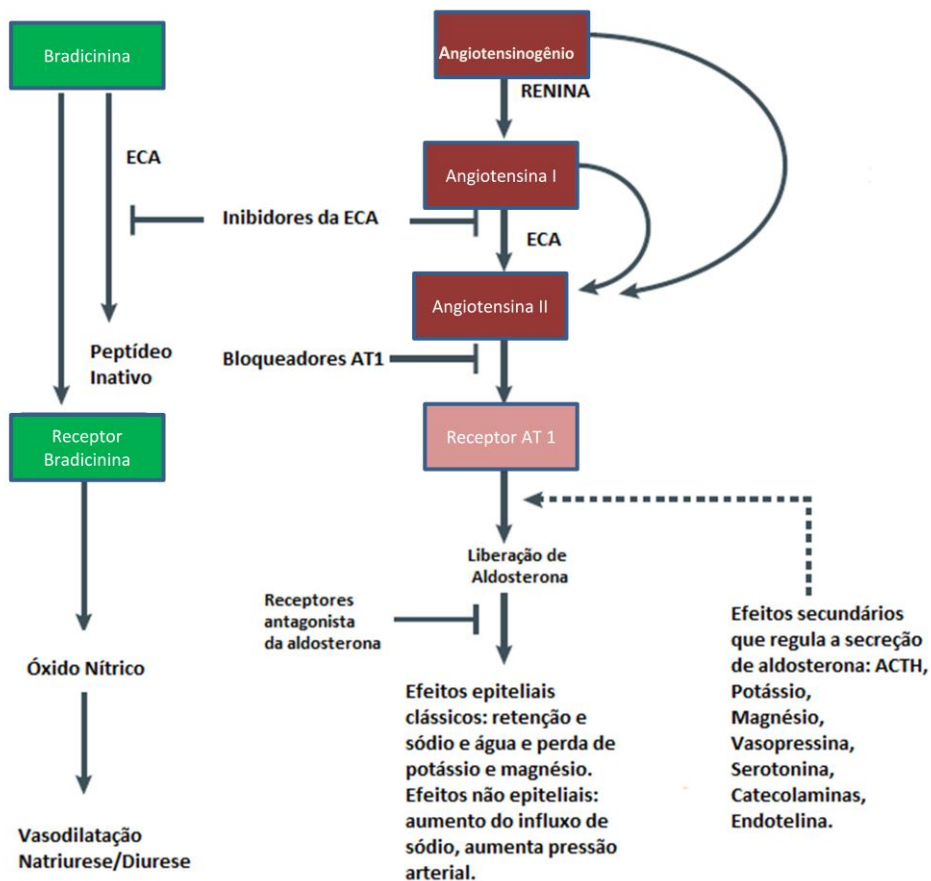


Figura 2. Esquema representando o Sistema Renina Angiotensina e Aldosterona (RAA) no controle da pressão arterial sistêmica. Também está representado a via das Bradicininas e a Enzima conversora da angiotensina (ECA) que é um alvo molecular para os fármacos anti-hipertensivos, como o captopril. Esquema adaptado de (Zaman *et al.*, 2002).

Na década de 60 pesquisadores brasileiros Sérgio ferreira e Rocha e Silva, conseguiram isolar peptídeos presentes no veneno da cobra Jararaca *Bothrops jararaca*, os quais possuem atividade de inibir a degradação da bradicinina, ou seja, potencializam sua ação vasodilatadora, sendo denominados de fatores potenciadores de bradicinina(Ferreira, 1965; Ferreira e Silva, 1969). A partir desses estudos , foi possível desenhar um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA), que foi o fármaco anti-hipertensivo, captopril. Ele age inibindo a síntese da angiotensina II como também evita a degradação da bradicinina (Camargo *et al.*, 2012).

Desde de sua descoberta, o sistema RAA se tornou um alvo de estudos para o desenvolvimento de novos fármacos que possam atuar no controle da pressão arterial. O sistema (RAA) é responsável por controlar diversos processos regulatórios, mas principalmente o controle da pressão arterial e o balanço eletrolítico do corpo. Recentemente, outras funções que vão além do sistema cardiovascular vêm sendo atribuídas ao peptídeo angiotensina 1-7. Esse peptídeo possui efeitos opostos a angiotensina II e pode ser formado a partir de 3 vias como ilustrado na figura 3:

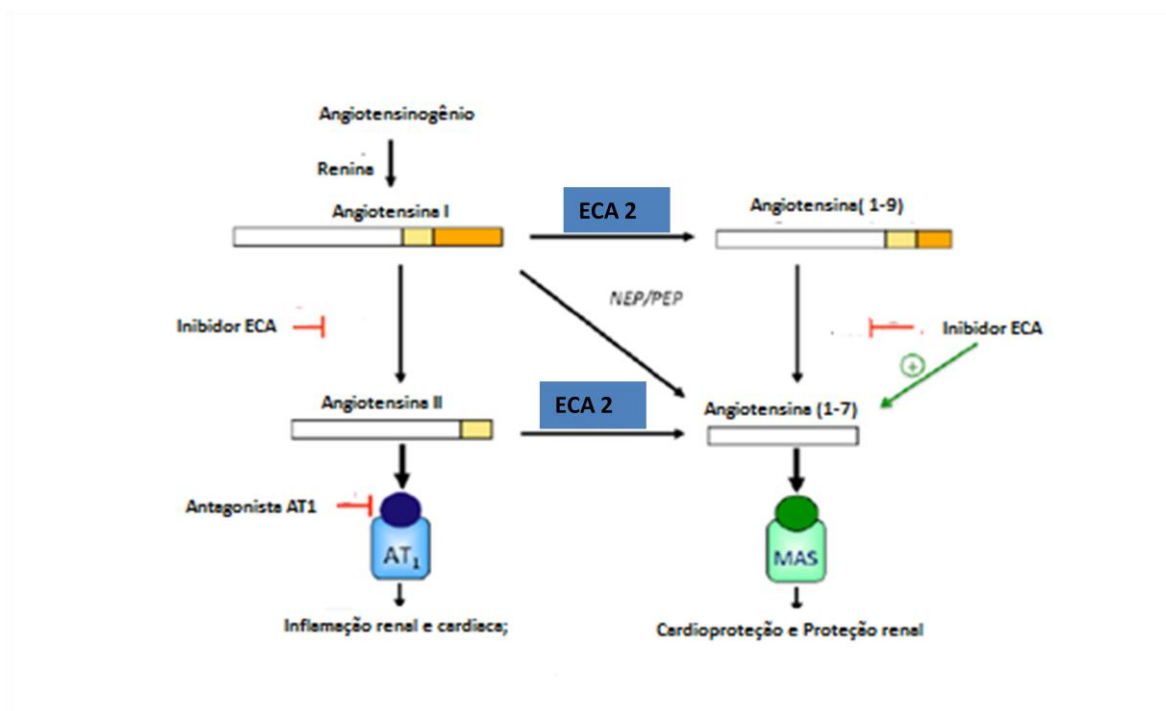


Figura 3. Esquema representando o Sistema Renina Angiotensina e Aldosterona com enfoque na síntese da angiotensina 1-7 e suas funções. As endopeptidases neutra (NEP) e Prolil endopeptidase (PEP) também podem participar da formação da angiotensina 1-7. Adaptado de (Simões E Silva e Teixeira, 2016).

Os peptídeos antimicrobianos são outro grupo de peptídeos que possuem atividade de proteger o organismo contra a infecção de patógenos, principalmente bactérias, fungos e vírus. Eles são produzidos por diferentes células e tecidos nos seres vivos. Esses peptídeos representam uma das estratégias de defesa do sistema imune do organismo e estão presentes tanto na imunidade inata quanto na adquirida (Hilchie *et al.*, 2013; Mansour *et al.*, 2014).

Diversas famílias de genes que codificam proteínas e peptídeos com características antimicrobianas são encontrados em diferentes espécies por exemplo, as catalecidinas e as defensinas possuem atividades contra micro-organismos e também atuam no processo de sinalização para desencadear respostas do tecido do hospedeiro. No ser humano, esses são os peptídeos presentes em maior abundância, as células que produzem esses peptídeos se localizam principalmente no tecido epitelial, no trato gastrointestinal e bronquial (Yang *et al.*, 2001; Oppenheim *et al.*, 2003). As catalecidinas e as defensinas estão presentes nos mamíferos e são encontradas nos vertebrados, invertebrados e plantas. Os peptídeos antimicrobianos também podem ser produzidos a partir do processo de proteólise de proteínas precursoras (Zasloff, 2002; Yamasaki *et al.*, 2006; Yamasaki *et al.*, 2007; Hemshekhar *et al.*, 2016).

1.2 Peptídeos encriptados

Além da produção fisiológica de peptídeos bioativos, também é possível obter esses peptídeos por meio da digestão proteica ou a partir da ingestão de alimentos processados. Muitos peptídeos bioativos com atividade opioide, inibidor da ECA, antimicrobiano, dentre outras, são encontrados em proteínas de origem animal e vegetal. Esses peptídeos estão encriptados em proteínas fontes e são liberados por meio de clivagem proteolítica. Esse processo ocorre durante a digestão alimentar no trato gastrointestinal, com a participação de diversas enzimas (Pessione e Cirrincione, 2016).

Os peptídeos encriptados podem ser clivados por enzimas presentes no trato gastrointestinal como pepsina, tripsina e quimotripsina, como também por meio da ação de bactérias presentes na microbiota intestinal. A partir desse processo, os peptídeos bioativos podem afetar a fisiologia humana por meio de suas atividades (Mohanty *et al.*, 2016; Steffi Rudolph, 2016).

Alguns alimentos contém grande variedade de peptídeos bioativos que já foram isolados e caracterizados, como a soja, trigo, frutos do mar, carnes, laticínios dentre outros

(Hartmann e Meisel, 2007). Muitos desses peptídeos contém de 2 a 20 resíduos de aminoácidos (Mohanty *et al.*, 2016).

Dentre essas fontes proteicas os laticínios são um dos grupos de alimentos que possuem maior diversidade de peptídeos bioativos descritos na literatura. A proteína caseína presente no leite, possui muitos peptídeos encriptados e uma vez liberados, podem apresentar atividade opioide, hipotensor e antimicrobiana (Pessione e Cirrincione, 2016).

Os peptídeos opioides são moléculas promissoras para o tratamento da dor crônica e também de diversas desordens de natureza mental como ansiedade, depressão e transtornos de humor. Os peptídeos opioides atuam no equilíbrio entre o apetite e a saciedade como foi demonstrado em 2012 por Duraffourd e colaboradores que analisaram a comunicação e a função cognitiva do eixo intestino-cérebro a partir da liberação de peptídeos oriundos da ingestão de proteínas. Posteriormente Pflugger e colaboradores chamaram esses peptídeos de "nutropioides". O mecanismo de ação dos opioides ocorre a partir da estimulação dos receptores (μ , κ e δ) localizados no sistema nervoso central (SNC) e periférico (Duraffourd *et al.*, 2012; Pflugger *et al.*, 2012).

Dentre os peptídeos opioides, o mais estudado é a beta casomorfina (age no receptor μ) e a alfa s1 caseína (age no receptor δ) ambos derivados da caseína. A beta casomorfina contém a sequência YPF em todas as suas variações, a sua liberação no sangue por meio da ingestão da caseína faz com que o fragmento YPF interaja com receptores opioides presentes no cérebro e tecidos periféricos desencadeando ações relaxantes e ansiolítica que induzem o sono. Já a alfa s1 caseína origina o peptídeo alfa casozepine que apresenta atividade ansiolítica, mas não interage diretamente com receptores opioides. Sua ação é dependente da ativação dos receptores de serotonina que libera as substâncias endógenas: serotonina, dopamina. Os neurotransmissores serotonina e dopamina são produzidos a partir dos aminoácidos triptofano e tirosina respectivamente (Capuron *et al.*, 2002; Pessione e Cirrincione, 2016).

Outros peptídeos que também estão encriptados na β e κ caseína são os peptídeos com ação antihipertensivas. Esses peptídeos podem controlar a pressão arterial, pois agem inibindo a ação da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA), que contribui para a redução de angiotensinas que resultará na diminuição da pressão arterial e são liberados por meio da proteólise. Os peptídeos inibidores da ECA geralmente são di ou tri peptídeos e contém no C-terminal prolina, lisina ou arginina. Os peptídeos com mais de 3 resíduos de aminoácidos são menos ativos que os peptídeos menores, como por exemplo os tripeptídeos VPP /IPP. Os

tripeptídeos também apresentam maior resistência à clivagem enzimática e a variações no pH. Com essas propriedades esses peptídeos são promissores para aplicações tanto na área nutracêutica quanto na farmacêutica (Yamamoto *et al.*, 1999; Gobbetti *et al.*, 2004; Mohanty *et al.*, 2016).

Além dos peptídeos com ação opioides e hipotensoras, os peptídeos antimicrobianos também são liberados por meio da digestão proteolítica da proteína caseína. Esses peptídeos possuem ação bactericida e bacteriostático. A alfa s1 caseína e K caseína produz os peptídeos Isracidin e K casecidin respectivamente. Os 2 peptídeos possuem atividade de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, e outras bactérias por exemplo. Os peptídeos antimicrobianos possuem determinadas características físico químicas que permitem a sua interação com micro-organismos. Essas características são principalmente a hidrofobicidade, cationicidade, formação de hélice anfipática, dentre outros. (Hintz *et al.*, 2015).

Esses compostos antimicrobianos estão sendo apreciados pela indústria alimentar como preservativos naturais contra contaminações indesejáveis. A estabilidade (não degradação enzimática) desses peptídeos no sangue é fundamental para que sejam promissores no controle de agentes infecciosos (Pessione e Cirrincione, 2016).

1.3 Peptídeos com mais de uma função

Além das atividades já abordadas, existem ainda os peptídeos que estão encriptados em proteínas precursoras e podem apresentar mais de uma atividade. No exemplo da proteína caseína, os tripeptídeos VPP e IPP possuem atividade de inibição da ECA (hipotensores) como também são imunomodulatórios. O efeito no sistema imune é devido a via das bradicininas, que uma vez inibindo a ECA a bradicinina poderá estimular (ou recrutar) macrófagos e a secreção de linfocinas (proteína de secreção dos linfócitos) (Pessione e Cirrincione, 2016).

Outros peptídeos encriptados, derivados de proteínas do leite e que apresentam mais de uma atividade descrita são: a casomorfina, lactofins e 7 beta casomorfina. Todas tem ação opioides e hipotensoras, contudo a 7 beta casomorfina também exerce ação imunomodulatória (estimulação/inibição de linfócitos, depende da concentração do peptídeo) (Meisel e Bockelmann, 1999). A existência de peptídeos bioativos com mais de uma atividade pode ser devido a presença de domínios que são resistentes a ação de proteases (Fiat e Jollès, 1989).

1.4 Fluxograma dos resultados apresentados ao longo da tese

O presente estudo explorou as potencialidades de peptídeos encriptados em proteínas para aplicações biotecnológicas que incluem o desenvolvimento de novos fármacos e a geração de plantas geneticamente modificadas.

Em um primeiro momento, foram utilizados peptídeos encriptados em diferentes proteínas como fonte para o desenho de peptídeos com possíveis atividades (antinociceptivo e hipotensor). Posteriormente, foi realizado o processo de inserção desses peptídeos em um arcabouço molecular proteico que possibilite o desenvolvimento de uma estratégia para a liberação controlada dos peptídeos de interesse (descritos no capítulo 1).

Por fim, foi iniciada a expressão de peptídeos encriptados, que foram previamente identificados e selecionados no genoma de *Arabidopsis thaliana* para avaliar se a reinserção desses peptídeos encriptados poderá contribuir com a diminuição da susceptibilidade da planta contra fitopatógenos (descritos no capítulo 2).

**CAPITULO 1 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICPETIVA DE
PEPTÍDEOS OPIOIDES E ESTRATÉGIAS PARA O PROCESSO DE ENTREGA E
OTIMIZAÇÃO DO PERFIL DE ATIVIDADE.**

1.0 Peptídeos opioides

Atualmente, diversos fármacos estão em desenvolvimento para promover o controle da dor. Um dos fármacos mais potentes que é empregado até hoje na terapêutica, para o tratamento da dor crônica é a morfina. A morfina é um alcaloide que foi isolado da papoula, *Papaver somniferum*, e possui capacidade de interagir, como agonista, com os receptores opioides, que são receptores acoplados a proteína G inibitória (Pathan e Williams, 2012).

O conceito de dor, empregado pela Sociedade Internacional de Estudos para a Dor, IASP, é uma experiência sensorial e emocional desagradável associado a uma lesão tecidual real ou potencial. A dor crônica pode ser caracterizada de acordo com o tempo de duração. Alguns estudos descrevem a dor crônica como a dor que pode persistir por mais de 3 meses, outros por mais de 6 meses. (Bayman e Brennan, 2014; Henry *et al.*, 2015; Treede *et al.*, 2015).

A nociceção ou estímulo nocivo pode ser de natureza térmica, mecânica ou química e é propagado como estímulo (potencial de ação), pelos neurônios aferentes primários, denominados de nociceptores. Nos nociceptores ocorre uma despolarização da membrana e esse estímulo é transmitido ao Sistema Nervoso Central, SNC, (formado pela medula espinal e encéfalo). De forma resumida, esse estímulo é conduzido até a medula espinal onde poderá seguir para os centros superiores do SNC (tálamo, amígdala). A propagação desse estímulo da medula até o tálamo é conduzido por nervos aferentes que integram a via ascendente da dor. Em sentido oposto a via ascendente, existe a via descendente inibitória da dor, que conduz o estímulo, por meio de projeções de nervos (motores), da amígdala e do hipotálamo passando pela região periaquedutal cinza até a região rostroventral da medula espinal (Julius e Basbaum, 2001; Ossipov *et al.*, 2010).

A capacidade de inibir a dor (na via descendente) inicia-se com a substância cinzenta periaquedutal, que ativa o sistema endógeno de controle da dor, que consiste na produção e liberação de diferentes mediadores químicos como os peptídeos opioides endógenos, principalmente a encefalina a qual interage com receptores opioides do tipo mu, capaz de reduzir a sensação sensorial e promover a analgesia (inibição da propagação da nociceção). Além dos peptídeos opioides, existe também a liberação de 5- hidroxitriptamina, 5-HT, (serotonina) que é um neurotransmissor presente em abundância na região rostroventral da medula. A atividade do 5-HT pode ser tanto pronociceptiva quanto antinociceptiva e vai depender do subtipo de receptor 5-HT que será ativado. As famílias de receptores que causam

a antinocicepção são: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT₇ (Ossipov *et al.*, 2014; Tamano *et al.*, 2016).

Os receptores opioides clássicos, Mu, Kappa e Delta estão localizados preferencialmente no SNC e na periferia. Na presença de um agonista, por exemplo a morfina, as subunidades (alfa, beta e gama) dos receptores acoplados a proteína G inibitória, libera o GDP que estava ligado a sub unidade alfa para ligar com o GTP. As subunidades se dissociam de tal forma que a subunidade beta e gama permanecem juntas provocando a inibição dos canais de cálcio e ativação dos canais de potássio o que promoverá uma hiperpolarização da membrana neuronal que dificultará a propagação do estímulo nociceptivo (estímulo nocivo ao organismo). Já a subunidade alfa age inibindo a enzima adenilato ciclase que diminuirá os níveis de AMP cíclico e da proteína quinase A (PKA) que também contribui para uma diminuição da excitabilidade neuronal, ver o esquema descrito na figura 4. A subunidade alfa possui atividade intrínseca de GTPase que formará novamente a associação do heterodímero (alfa, beta e gama) de forma a encerrar o ciclo de transdução e mantém as subunidades juntas até a ocorrência de novo estímulo. O bloqueio da propagação do estímulo nocivo da periferia até o SNC é chamado de antinocicepção (Galligan e Akbarali, 2014).

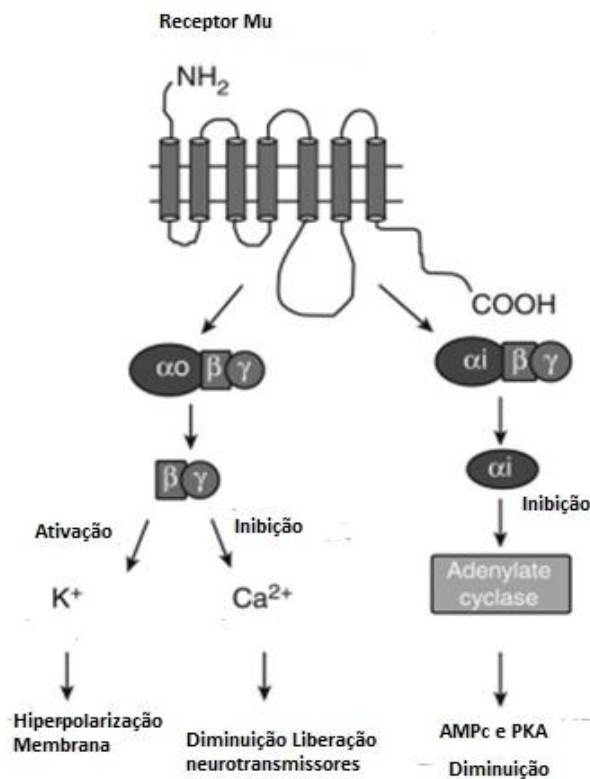


Figura 4: Esquema ilustrativo representando o mecanismo molecular dos receptores opioides no controle da nocicepção. Na figura está representado o receptor mu opioide que na presença de um agonista ocorrerá a dissociação das subunidades da proteína G inibitória. Adaptado de Galligan e Akbarali (Galligan e Akbarali, 2014).

A maioria dos fármacos opioides possuem efeitos indesejáveis e seu uso contínuo pode desencadear um processo de tolerância farmacológica, no qual é necessário aumentar a dose do fármaco para obter o efeito. No caso do uso contínuo da morfina (fármaco utilizado no tratamento da dor crônica), o processo de tolerância poderá contribuir para o desencadeamento de depressão respiratória. Assim, é interessante o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos que possam atuar de forma mais específica com o respectivo alvo molecular, sem causar efeitos indesejáveis intensos (Spahn *et al.*, 2017).

A descoberta do mecanismo de ação dos neuropeptídeos endógenos e, da farmacocinética e farmacodinâmica da morfina por exemplo, são fundamentais para elucidar o mecanismo de interação entre os fármacos que agem nos receptores opioides. A elucidação do mecanismo de ação, contribui para o desenho de novos peptídeos bioativos que podem ser empregados no desenvolvimento de candidatos a fármacos devido a algumas propriedades que eles apresentam como, alta especificidade com o alvo molecular e poucos efeitos indesejáveis (Keresztes *et al.*, 2010; Lazarus e Okada, 2012). Além disso, considerando o emprego de peptídeos como fármacos é importante desenvolver novas estratégias que possibilitem a administração por via oral, uma dessas ferramentas pode ser a adição de pontes dissulfeto.

1.1 Pontes dissulfeto

A cisteína é o único dos 20 L-alfa aminoácidos que consegue formar pontes dissulfeto. Sua cadeia lateral contém o grupo funcional tiol (SH), que ao ser submetido a uma reação de oxidação, pode formar pontes dissulfeto com outros grupos SH dos resíduos de cisteína (Jan Riemer, 2009; Patil *et al.*, 2015). Essa ponte pode ser formada entre cisteínas da mesma cadeia ou entre subunidades diferentes como acontece com toxinas bacterianas, cólera, difiteria, ricina (toxina de planta) entre outras (Go Saito, 2003). A ligação dissulfeto covalente ocorre durante a transição de estruturas, quando a proteína está enovelando para obter sua conformação nativa, o que contribui para a estabilidade da estrutura tridimensional de proteínas. (Borges e Sherma, 2014; Dombkowski *et al.*, 2014).

A formação ou clivagem da ponte dissulfeto é um processo reversível que depende das características físicas químicas do meio o qual se encontra a proteína. (Gilbert, 1995; Göthel e Marahiel, 1999; Kosuri *et al.*, 2012).

Nas células eucarióticas após a síntese de proteínas, a formação da ponte dissulfeto ocorre no retículo endoplasmático. Nesse compartimento celular está presente a enzima

dissulfeto isomerase proteica, (PDI), que catalisa o *fold*ing oxidativo e o rearranjo de pontes dissulfeto incorretas. Outras proteínas que também participam do enovelamento proteico são as chaperonas, dissulfeto oxirredutase, prolyl isomerases e algumas moléculas redutoras como a glutationa (Ren e Bardwell, 2011; Kosuri *et al.*, 2012).

Durante o dobramento de proteínas alguns erros podem acontecer, muitos erros são identificados pela maquinaria celular e são degradados, mas alguns são resistentes ao controle celular e permanecem com o enovelamento inadequado podendo alterar a atividade fisiológica da célula. Assim, alguns estudos associam a atividade incorreta da proteína dissulfeto isomerase proteica com a etiologia de algumas doenças neurodegenerativas principalmente mal de Alzheimer e doença de Parkinson (Andreu *et al.*, 2012).

Outras doenças não degenerativas que também estão associadas a erros no enovelamento incluem o câncer, devido a ocorrência de mutações conformacionais na proteína de supressão tumoral p53, catarata, esclerose lateral amiotrófica dentre outras (Naeem e Fazili, 2011). Alterações no equilíbrio redox de enzimas presentes no retículo endoplasmático também podem ocasionar propensão a infecções virais (Ploegh, 2005). Quanto maior o número de resíduos de cisteína na sequência primária, maior a ocorrência de arranjo dissulfeto incorretos. (Ren e Bardwell, 2011).

A desnaturação proteica é um processo que causa a instabilidade de proteínas nativa. Alguns fatores internos e externos podem ocasionar a desnaturação. Os fatores internos são as características físico-química referente a sequência de aminoácidos e o nível de organização estrutural (estrutura secundária, terciária e quaternária). Já os fatores externos são variações no pH, temperatura, sais, detergentes, alta concentração de substâncias orgânicas específicas. Todos esses fatores podem provocar alterações conformacionais como a perda da estrutura tridimensional da proteína, a desnaturação (Maulik V. Trivedi, 2009).

Devido à importância estrutural e fisiológica que as pontes dissulfeto desempenham, a adição de cisteínas em proteínas e peptídeos pode ser utilizada para otimizar a atividade proteica, pois as pontes mantém a conformação bioativa de peptídeos e proteínas (Gongora-Benitez *et al.*, 2014).

1.2 Estratégias para otimização de peptídeos bioativos

Atualmente, os peptídeos bioativos são considerados moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos devido a algumas propriedades intrínsecas a sua

atividade, como alta especificidade, potência elevada, pouca toxicidade e a diversidade química e biológica (Mason, 2010).

Entretanto, algumas características dos peptídeos precisam ser aprimoradas como a baixa disponibilidade quando administrado por via oral e a meia vida curta. Essas características representam os desafios na área do planejamento e desenho de peptídeos terapêuticos (Furman *et al.*, 2015).

Para solucionar essas características, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas e tem contribuído para melhorar o processo de entrega da droga e sua biodisponibilidade. As modificações físico químicas que incluem a adição de pontes dissulfeto são abordagens que vem sendo utilizada com frequência para otimizar o perfil de atividade dos peptídeos e proteínas bioativos (Gongora-Benitez *et al.*, 2014).

Uma de suas vantagens é a possibilidade de ciclização das moléculas proteicas, pois este permite uma maior restrição espacial que estabiliza a estrutura de forma mais rígida, menos flexível. A ciclização pode estabilizar o peptídeo em estrutura secundária específica. Diferentes padrões de estruturações podem ser adotados, principalmente, alfa-helice, folha beta, turns e loops. As ligações de hidrogênio são as forças que organizam esses diferentes padrões (Argos, 1995; Perticaroli *et al.*, 2013). A ciclização via ligação dissulfeto contribui, por exemplo para uma maior afinidade de ligação com o receptor, ainda mais se o peptídeo estiver em sua conformação preferencial mais estável. Vale ressaltar que os peptídeos cíclicos são mais resistente a ação de proteases (Craik *et al.*, 2012; Masa Cemazar, 2012).

Outra estratégia que também pode ser adotada é a incorporação de peptídeos não naturais, D-aminoácidos. A adição desses aminoácidos na sequência proteica permite uma maior estabilidade, porque poucos organismos possuem enzimas para hidrolisar D-aminoácidos (Takashi Watanabe, 1996).

Assim, peptídeos ricos em pontes dissulfeto vem ganhando destaque na área do desenho de fármacos devido a sua estabilidade e propriedades farmacocinéticas (Gongora-Benitez *et al.*, 2014).

Diversos peptídeos e proteínas terapêuticas como hormônios, fatores de crescimento, toxinas e imunoglobulinas vêm sendo investigados como candidatos a novos fármacos. Alguns peptídeos com pontes dissulfeto já estão disponíveis comercialmente como o Linaclotide, Ziconotide, Romidopsin, dentre outros. (Vlieghe *et al.*, 2010; Gongora-Benitez *et al.*, 2014; Patil *et al.*, 2015).

As pontes dissulfeto tem um papel essencial na estabilização da estrutura proteica. As pontes reduzem a flexibilidade e agem no enovelamento, prevenindo assim qualquer tipo de dano e melhora a meia vida da proteína. Alguns exemplos de famílias de proteínas ricas em pontes dissulfeto incluem: defensinas, conotoxinas, toxinas de aranha e escorpiões (Liskamp *et al.*, 2011).

A introdução de pontes dissulfeto artificiais em proteínas e peptídeos proporciona diversas aplicações principalmente no âmbito industrial e biomédico (Dombkowski *et al.*, 2014).

Alguns estudos pioneiros na área de introdução de pontes artificiais foram divulgados em 1989, a partir da análise comparativa entre a termo estabilidade da T4 lisozima natural com mutantes que sofreram adição das pontes. Os mutantes apresentaram mais estabilidade em relação ao natural (Masazumi Matsumura, 1989). Desde então, muitas outras abordagens foram desenvolvidas, como a bioconjugação do captopril (fármaco para controle da pressão arterial) com a lisozima por meio da ligação dissulfeto. Essa bioconjugação permite uma melhor entrega do fármaco no alvo molecular desejado que é a enzima conversora da angiotensina. Com isso, foi possível aumentar a concentração do captopril nos rins (Kok *et al.*, 1999). Na área industrial, a celulase enzima que catalisa material lignocelulósico, como o bagaço da cana, obteve otimização térmica e química após a adição de pontes dissulfeto (Badieyan *et al.*, 2012).

Um exemplo de peptídeo terapêutico rico em pontes dissulfeto que já está disponível comercialmente é o MVIIA (ziconotide, Prialt) que é uma droga sintética desenvolvida a partir do caramujo (*Cone Snail*), pertencente à família de peptídeo conotoxinas. O ziconotide é um bloqueador seletivo de canais de cálcio do tipo N, localizado no neurônio pré-sináptico no sistema nervoso central. Devido ao bloqueio, neurotransmissores nociceptivos tem atividade reduzida o que proporciona diminuição da dor. O fármaco possui potência elevada e é uma droga não opioide para o tratamento de dores neuropáticas. A sua maior desvantagem é a rota de administração que é apenas intratecal (IT) (Craik *et al.*, 2013).

Muitas pesquisas no âmbito do desenvolvimento de novos fármacos vêm tentando desenvolver peptídeos sintéticos da família das conotoxinas, como o ziconotide, mas que possa ser administrado por via oral. Uma das estratégias promissoras no processo de entrega da droga é por meio da adição de resíduos de cisteínas que vão formar novas pontes dissulfeto (Mcgovern, 2007; Craik *et al.*, 2013).

Assim, a caracterização, expressão e otimização de proteínas e peptídeos bioativos ricos em pontes dissulfeto vem despertando cada vez mais interesse nas últimas décadas devido ao seu amplo campo de aplicações tanto na indústria biomédica (novos fármacos, liberação controlada de fármacos, terapia gênica, nutracêutica dentre outros) como na área de biomateriais e bioenergia (Gongora-Benitez *et al.*, 2014).

2.0 JUSTIFICATIVA

O desenho de novos peptídeos com atividade biológica surgiu a partir da exploração do repertório de peptídeos encriptados em proteínas precursoras, as quais possuem atividade opioide e hipotensora.

Além disso, foram utilizados trabalhos anteriores do grupo ao qual pertence este estudo que focam na prospecção e predição de peptídeos oriundos da secreção cutânea de anfíbios e da peçonha de serpentes (Leite *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2010), e também no desenvolvimento de ferramentas que permitam a identificação de peptídeos bioativos encriptados em proteínas (Brand *et al.*, 2012).

Os primeiros peptídeos que estão descritos nesta tese (PSLEM 11011 e 11012), tiveram seus estudos iniciados durante o mestrado da aluna, mas os testes apresentados ao longo do capítulo, só foram finalizados no doutorado.

A estrutura primária dos peptídeos são: **Y**PFGWGG**I**PP (PSLEM 11011) e **Y**PFKWGG**V**PP (PSLEM 11012). Em vermelho, região N-terminal dos peptídeos com a sequência que promove atividade opioide **YPF**. Em azul, região C-terminal com a sequência que poderá complexar com a ECA **IPP/VPP** inibindo-a. As Glicinas conferem flexibilidade ao peptídeo. A lisina poderá ser clivada pela enzima tripsina, liberando as duas partes para agir em alvos distintos e o triptofano poderá contribuir com a produção de serotonina.

Posteriormente, foi realizado o desenvolvimento de nova estratégia que possa otimizar o processo de entrega desses peptídeos (PSLEM 11011 E 11012), por meio do desenho de uma nova sequência (proteica) que possibilite uma maior absorção e atividade do peptídeo. A proteína foi montada a partir da inserção dos peptídeos (PSLEM 11011 e 11012), em sequência com 35 resíduos que possam formar duas pontes dissulfeto. Foram adicionados sítios para clivagem da enzima tripsina para promover a liberação dos fragmentos.

A seguir está a sequência elaborada, a qual denominamos MTOXI. Também está representado as possibilidades de formação dos pares de pontes dissulfeto (a,b,c).

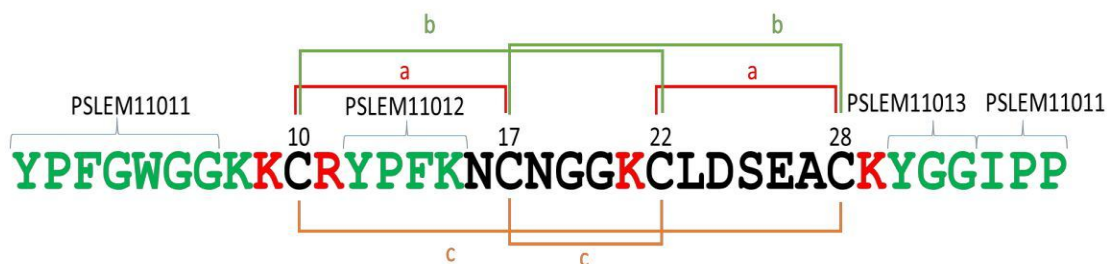


Figura 5. Peptídeos opioides em verde inseridos na proteína MTOXI (abreviatura de *molecular tailoring*, opioides e oxidação) com os sítios de clivagem para enzima tripsina em vermelho. As possibilidades para os pares dissulfeto estão representados pelas letras a, b e c. PSLEM é uma abreviatura utilizada em nosso laboratório para indicar os diferentes peptídeos sintetizados.

A sigla PSLEM significa Peptídeo Sintético Laboratório de Espectrometria de Massa e o número indica a ordem cronológica em que o peptídeo foi sintetizado.

As proteínas modelo que nos inspiraram para o desenho são famílias de proteínas que contêm o nó de cisteína (*Inhibitor cystine knots*) como as defensinas. O desenho de pequenas proteínas com a presença de pontes dissulfeto é uma estratégia que contribui para a otimização da atividade biológica e uma ferramenta que poderá ser importante para o processo de entrega de peptídeos bioativos nos alvos moleculares desejados. Atualmente, a inserção de pontes dissulfeto em peptídeos e proteínas pode contribuir para o processo de administração dos peptídeos por via oral.

Dessa forma o fluxo de informações que vêm sendo elucidado sobre os processos de biossínteses de peptídeos endógenos, neurotransmissores e hormônios, servem como fonte exploratória para o desenvolvimento de novas estratégias que possam ser empregadas no processo de desenvolvimento de novos fármacos, na elaboração de novos alimentos funcionais e no controle de pragas na agricultura.

3.0 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo desenhar duas novas sequências de peptídeos que possam apresentar atividade opioide. Assim como, elaborar uma nova estratégia para o processo de entrega dos peptídeos a partir da inserção de peptídeos bioativos em uma proteína que apresente estrutura favorável para uma possível liberação controlada dos peptídeos.

3.1 Objetivos específicos

- Realizar testes biológicos *in vivo* e avaliar o perfil de atividade dos peptídeos desenhados.
- Desenhar sequência de proteína que favoreça o processo de entrega do peptídeo por meio de liberação controlada.
- Determinar a combinação predominante de formação dos pares dissulfeto.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Síntese dos peptídeos

Os peptídeos PSLEM 11011 (YPFGWGGIPP) e 11012 (YPFKWGGVPP) foram sintetizados por meio de síntese química em fase sólida, utilizando a estratégia Fmoc. A resina com o *linker* escolhido foi a H-Pro-2-cl-trt-resina, (*Peptides international*, Kentucky, Estados Unidos). O grau de substituição da resina foi de 0,66 mmol/g, a escala de síntese utilizada foi de 0,2 mmol que é equivalente a 303 mg da resina. A síntese foi realizada dentro de um dosador oral de 5 ml com filtro de polipropileno. Para a formação da ligação peptídica (ligação amida) utilizou-se um reagente químico para ativar o grupamento ácido carboxílico de um *N*-acil-aminoácido, o qual sofre o ataque nucleofílico do grupo amino de outro aminoácido ou fragmento peptídico *C*-bloqueados por ligação com um suporte polimérico, resultando na formação da ligação peptídica entre eles (Machado *et al.*, 2004).

Iniciou-se a síntese com a reação de acoplamento do penúltimo aminoácido, pois o último aminoácido presente no C-terminal do peptídeo já vem acoplada na resina e desprotegida. Primeiramente utilizou-se 0,8 mmol de derivado de aminoácido (Fmoc-AA-OH) com excesso molar de 4 vezes. O reagente para a ativação do grupo carboxila, o composto carboxilatetrafluoroborato de [benzotriazol-1-iloxi(dimetilamino) metilideno]-dimetilazânio (TBTU), foi adicionado ao dosador oral na quantidade equimolar ao derivado de aminoácido a ser ativado. O *N,N*-Diisopropylethylamine, DIPEA, é uma base e foi adicionado na quantidade 255 µL (1.5mmol) para desprotonar o grupo ácido carboxílico.

A reação foi conduzida em *N,N*-dimetilformamida (DMF), 3,0 mL como solvente (Chan, 2000). Os acoplamentos foram conduzidos por 90 min. à temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, conduz-se a desproteção do grupamento Fmoc, que é quando o grupo N-terminal fica desprotegido, podendo então reagir com o próximo derivado de aminoácido. Para isso foi necessário utilizar uma solução de 4-metilpiperidina (Hachmann e Lebl, 2006) a 25% (v:v) em DMF durante duas etapas de 15 minutos, à temperatura ambiente sob agitação.

A estratégia utilizada Fmoc, (9-fluorenilmetoxicarbonila), denomina o grupo protetor temporário da função amina com o qual estabelece ligações estáveis ao TFA e lábeis a bases orgânicas. Já o grupo protetor da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos é ácido lábil e é removido durante a desproteção final, ao término da síntese. (Isidro-Llobet *et al.*, 2009). As duas reações (desproteção do grupamento Fmoc amino-terminal e ativação do grupo carboxila do Fmoc-aminoácido para a formação da ligação peptídica) foram repetidas sucessivamente

até a adição do último derivado de aminoácido e a última desproteção do grupamento Fmoc ligado ao grupo N-terminal de toda a cadeia peptídica. Entre uma reação de acoplamento e a reação de desproteção, foram feitas oito lavagens alternadas da resina com 2-propanol e DMF. Fez-se uma última lavagem com diclorometano (DCM), seguida de filtração a vácuo. (Chan, 2000).

Após terminar uma reação de desproteção ou acoplamento, foi conduzido o teste da Ninhidrina ou Kaiser (Chan, 2000) que é um teste colorimétrico que detecta em quantidades pequenas a presença de grupamentos amins livres. A ninhidrina (2,2- dihidroxindeno-1,3-diona) reage com o grupo amino do aminoácido a 110°C em meio alcalino. Se a coloração ficar azul (resultado positivo) após a desproteção, o teste indica a presença de grupos amina livres e que pode-se fazer o acoplamento. Se a coloração for amarela (resultado negativo), após o acoplamento, o teste indica que ocorreu a formação da ligação peptídica entre o grupamento N-terminal da cadeia peptídica ligada à resina e o derivado de aminoácido adicionado. Caso não ocorra a formação dessas cores, deve-se repetir a reação de desproteção ou de acoplamento.

A etapa final do processo de síntese consistiu na desproteção de todos os grupos protetores das cadeias laterais e da clivagem para a produção do peptídeo bruto que foi posteriormente clivado, purificado e caracterizado quimicamente.

4.2 Síntese da MTOXI

Diferente dos peptídeos, a proteína MTOXI foi sintetizada por meio de síntese química em fase sólida de forma automática utilizando a estratégia fmoc com a resina H-Pro-2-cl-trt (0,66 mmol/g) (Peptides international, USA) em 4 vezes de excesso molar. A reação ocorreu no equipamento Prelude *peptide synthesizer* (Protein technologies, USA) à temperatura ambiente e agitação constante. O TBTU foi o reagente acoplador. O *N,N*-Diisopropylethylamine, DIPEA, é uma base e foi adicionado na quantidade (1.5 mmol) para desprotonar o grupo ácido carboxílico. A reação foi conduzida em *N,N*-dimetilformamida (DMF) 3,0 mL como solvente. Para a reação de desproteção foi utilizado metil piperidina (20%) em DMF (Chan, 2000). As etapas relacionadas aos testes de acoplamento e de desproteção, como também a reação de clivagem foram executados da mesma forma na síntese manual e automática.

4.3 Clivagem dos peptídeos e da MTOXI

A clivagem é um procedimento necessário para promover o rompimento da ligação entre o peptídeo e a resina e para a desproteção de cadeias laterais não alquílicas e nesta etapa é fundamental impedir que ocorram reações secundárias entre carbocátions provenientes dos grupos protetores removidos e grupamentos susceptíveis presentes na cadeia peptídica (Howl, 2005). A ligação do resíduo C-terminal do peptídeo com a resina é ácido lábil, por isso a reação foi conduzida na presença de ácido trifluoroacético, TFA e reagentes nucleófilos (Howl, 2005) nas proporções estabelecida no protocolo da Novabiochem®, de 81,5%, ácido trifluoroacético, (TFA), 5% de tioanisol, 5% de fenol, 5% de água, 2,5% de EDT e 1% de TIS para um volume final de 10 mL (Novabiochem, 2007).

Os reagentes permaneceram sob constante agitação por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente dentro de um tubo Falcon (50ml). Decorrido esse tempo, utilizou-se nitrogênio gasoso para a retirada completa do TFA e em seguida foram feitas lavagens com éter diisopropílico congelado em nitrogênio líquido para precipitar o peptídeo e retirar o excesso de produtos de reação formados entre os grupamentos protetores. O peptídeo foi extraído da resina devido às lavagens com água: acetonitrila (1:1; v:v), por meio de filtração em funil de placa porosa. Terminada a filtração, transferiu-se o líquido que contém o peptídeo ou a proteína para tubos de polipropileno (tubos Falcon) o líquido foi congelado com nitrogênio líquido e liofilizados durante aproximadamente 72 h. Para as lavagens foi necessário o uso do funil de placa porosa, bomba de vácuo e capela de exaustão. Após a clivagem, a reação de oxidação dos resíduos de cisteína foi realizada com peróxido de hidrogênio em excesso molar para 1mg da proteína MTOXI, durante 1 hora a temperatura ambiente.

4.4 Purificação dos peptídeos

A purificação foi realizada por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC a coluna C12 jupiter 4u proteo semi preparative (250X10.00mm) (Phenomenex, USA) em fase reversa Shimadzu LC-20 UFLC system. Para cada separação cromatográfica, foram pesados aproximadamente 2 mg de peptídeo sintético bruto que foram diluídos em 2 mL de água Milli-Q®. Em seguida a solução foi centrifugada por 15 min a 13.400 r.p.m. As fases móveis utilizadas foram as seguintes: a fase móvel A, 0,1% em volume TFA/H₂O e a fase móvel B, 0,1% TFA/ACN em volume. As amostras foram injetadas com

volume de 500µL por cromatografia e em seguida eluídas por incrementos da solução B de 5% a 95% durante 60 min, em gradiente linear com um fluxo de 2,5 mL/min, à temperatura ambiente. Os peptídeos foram detectados nos comprimentos de onda de 216 nm, (absorbância da ligação peptídica) e 280 nm (absorbância do anel indol do triptofano) (Brand *et al.*, 2002) As frações foram coletadas manualmente.

Foram realizadas separações cromatográficas para cada peptídeo, purificando-se o equivalente a 32 mg, quantidades essas suficientes para os testes antinociceptivos *in vivo*.

4.5 Testes com animais

Os animais utilizados foram camundongos *Mus musculus* da linhagem raça swiss, fêmeas, com peso entre 20-25g, do biotério da Universidade de Brasília (UnB) e os testes foram realizados no laboratório de toxicologia. Os peptídeos (PSLEM 11011 e 11012) foram analisados em dois modelos de testes, considerado clássicos, para avaliação da antinocicepção a partir de um estímulo térmico. Os modelos de testes foram o *Hot Plate* ou placa quente e o *Tail Flick* ou teste de retirada da cauda. Em ambos os testes foram mensurados a latência a partir de um estímulo de natureza térmica (Berge, 2011).

A antinocicepção é expressa a partir da análise entre a latência média basal do animal, a qual é mensurada 3 vezes antes de iniciar a administração dos grupos controles e experimentais. A latência teste, foi obtida após administração dos grupos controles e experimentais e a latência máxima é determinada para minimizar o risco de lesão tecidual. Quantitativamente o índice de antinocicepção (IA) é definido pela seguinte fórmula (Rodriguez-Munoz *et al.*, 2012). $IA = \frac{\text{Latência Teste} - \text{Latência média basal}}{\text{Latência máxima} - \text{Latência média basal}}$

No teste da placa quente, *Hot Plate*, o animal foi colocado em uma placa metálica aquecida em 55 ± 1 °C (AVS, Brasil), a partir daí foi observado quanto tempo o camundongo permaneceu até eliciar uma resposta ao estímulo térmico intenso que é representada pela ação de pular ou o lambear da pata traseira. Para o teste de retirada da cauda, *Tail Flick*, o camundongo foi colocado sobre um equipamento denominado analgesímetro (*Insight*, Brasil), de modo que sua cauda ficasse em contato com a resistência capaz de aumentar a temperatura até o animal retirar a cauda. O equipamento registra o tempo que o animal leva até retirar a cauda a partir do estímulo térmico (Le Bars *et al.*, 2001).

Os grupos foram compostos por 6-8 animais e a via de administração foi intraperitoneal (i.p.). As doses utilizadas foram baseadas na dose e molaridade da morfina (10

mg/kg de animal; $3,50 \times 10^{-5}$ M), (Ruiz-Durántez *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2012). Como controle positivo foi utilizado além do sulfato de morfina (10mg/ml) (*Dimorf, Cristália*, Brasil) a Leu-encefalina (19,3 mg/kg de animal; $3,50 \times 10^{-5}$ M) que foi sintetizada com o mesmo protocolo descrito para a síntese do PSLEM 11011 e 11012. Como controle negativo foi utilizada solução fisiológica de cloreto de sódio, salina, (0.9%) (*Equiplex*, Brasil). A dose do PSLEM 11011 foi de 38mg/kg ($3,50 \times 10^{-5}$ M). A dose utilizada do PSLEM 11012 foi de 40mg/kg ($3,50 \times 10^{-5}$ M). Foi utilizado também o antagonista de receptores opioides (μ , κ e δ) a naloxona, cloridrato de naloxona (0,4mg/ml) (*Narcan, Cristália*, Brasil) (Kane *et al.*, 2006; Goldberg, 2010) na dose de 4 mg/kg (1,13mM) (Hao *et al.*, 2011) que foi administrado em doses seriadas de hora em hora com o intuito de inibir a atividade da Leu-encefalina e dos peptídeos PSLEM 11011 e PSLEM 11012. Na Leu-encefalina a administração foi realizada em todos os tempos (tempo zero, 1h, 2h, 3h), mas nos peptídeos apenas nos tempos zero, 1h, 2h para os dois modelos de testes.

Após realização dos testes *in vivo* foi realizada análise estatística com o programa *Graphpad Prism* (Graphpad software, Estados Unidos) para auxiliar na interpretação das mensurações do índice de antinociceção (IA). Para a comparação entre os grupos experimentais e controles foi utilizada análise de variância *two way* anova seguida de Bonferroni pós teste que determinou como a resposta do teste foi afetada de acordo com o tratamento e o tempo.

4.6 Digestão enzimática MTOXI

A proteína MTOXI foi digerida com a tripsina imobilizada (immobilized TPCK-treated trypsin Thermo Scientific, USA) acrescentada de 0,1M de tampão carbonato de amônio, em pH 8. Cerca de 1mg da proteína purificada foi dissolvida em 0,5ml de tampão de digestão, seguida da adição de 0.10 ml da enzima (de acordo com as instruções do produto). Essa solução foi incubada a 37° em agitação constante, por uma hora, utilizando um thermomixer (Eppendorf, Alemanha). As frações da proteína digerida foram coletadas nos seguintes tempos: 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos. Imediatamente após sua coleta, foi realizada a adição de TFA com concentração final a 3% para interromper a atividade da enzima, seguida de centrifugação a 12000 rpm por 5 min a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado para as análises de MALDI-TOF e LC-MS.

4.7 Cromatografia líquida e espectrometria de massa LC-MS

Após a síntese e purificação por cromatografia líquida de alta eficiência a MTOXI foi analisada por espectrometria de massa com ionização do tipo MALDI (*matrix-assisted laser desorption ionization*; MALDI-TOF-MS, ultrafleXtreme Bruker Daltonics, Alemanha) para confirmar a reação de síntese e oxidação. O método empregado foi o linear e refletido com ionização no modo positivo de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos (PSLEM 11011 e 11012) também tiveram a estrutura primária confirmada por meio de espectrometria de massa.

A ionização por electrospray também foi utilizada com o equipamento MicroTOF-QII ESI, no modo positivo com voltagem na fonte e capilar respectivamente de 500V e 4500V, gás nebulizante nitrogênio a 2.0 Bar e 8L/min de gás secante, mantido a 180°C. O filtro de massa do quadrupolo foi no mínimo de 50m/z e a colisão com radio frequência de 400 Vpp. Auto MS/MS foi realizado a partir dos precursores que foram os fragmentos gerados nos diferentes tempos de digestão, com um limite mínimo de 276cts.

As frações digeridas foram separadas em sistema de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa, utilizando uma coluna Kinetex® 2.6 µm diâmetro da partícula C18 100 Å *pore size*, LC Column 100 x 2.1 mm (Phenomenex, USA) num cromatógrafo líquido ultra rápido (UFLC Prominence System Shimadzu Co.,Japan). A fase móvel para a cromatografia líquida foi 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água (A) e 0,1% (v/v) ácido fórmico em acetonitrila (B) com fluxo de 0,3ml/min e o gradiente variando de 05% a 95% em 32 min.

O espectrômetro de massa utilizado foi o TOF-QIII (Impact III, Bruker Daltonics, Germany), com ionização por electrospray (ESI), em modo positivo (voltagem do capilar: 4500V, usando nitrogênio a 8.0L/min at 200°C, e gás nebulizante 2.0 bar). A faixa de varredura foi de 50m/z a 2500m/z usando 100 m/z como a massa mínima para o quadrupolo e 2000 Vpp de energia para célula de colisão. O modo auto MS/MS foi ativado, tendo como precursor os peptídeos da digestão (energia de colisão media para um íon monocarregado, de acordo com a massa do precursor:50eV; Limiar de corte do precursor: 229cts).

4.8 Dicroísmo circular MTOXI

A estrutura secundária foi elucidada por dicroísmo circular (DC) a partir de varreduras consecutivas para a mesma amostra, a faixa do espectro variou de 185nm a 260nm, em uma velocidade de 50 nm/min, utilizando o espectro polarímetro Jasco CD 815 (Jasco, Japan). As amostras foram dissolvidas em água ultrapura.

4.9 Estratégia para identificar a formação das pontes dissulfeto

Para identificar os pares de cisteínas, um esquema com as possibilidades para a formação de duas pontes foi criado (ver figura 19). As técnicas analíticas possibilitam uma abordagem simples para a determinação das pontes na proteína, sem a necessidade de realizar a redução. O software Data analysis® (Bruker Daltonics, Alemanha) foi utilizado para identificar e sequenciar os fragmentos peptídicos e assim observar qual a prevalência de formação de pontes de acordo com o mapa.

5.0 RESULTADOS

5.1 Análise dos componentes obtidos (MS) do PSLEM 11011 e 11012

Para a confirmação de que as sínteses dos peptídeos foram bem sucedidas, foi realizada a comparação entre a massa molecular esperada (massa teórica) e a massa molecular encontrada. A massa monoisotópica em Da esperada para os peptídeos foi obtida por meio do programa *Compass isotopic pattern*, da Bruker Daltonics. Os espectros a seguir mostram os valores encontrados para os peptídeos PSLEM 11011 e 11012 segundo o programa e também os valores observados durante a análise por espectrometria de massa. As massas moleculares teóricas e experimentais apresentam acurácia, para o PSLEM 11011 como pode ser observado pelas figuras 6 e 7 e para o PSLEM 11012 figuras 8 e 9. As figuras 10 e 11 mostram os espectros obtidos após a purificação (Nóbrega, M.M.- dados não publicados).

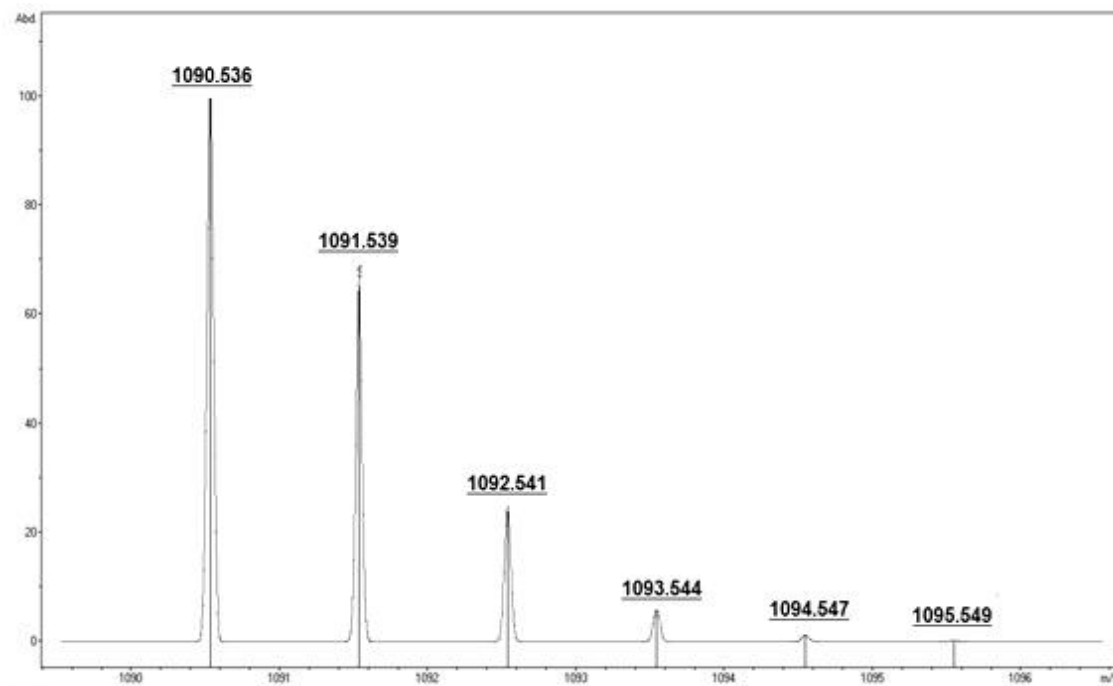


Figura 6. Espectro com a série isotópica teórica para o PSLEM 11011 (YPFGWGGIPP), obtido por meio do programa Compass Isotopic Pattern.

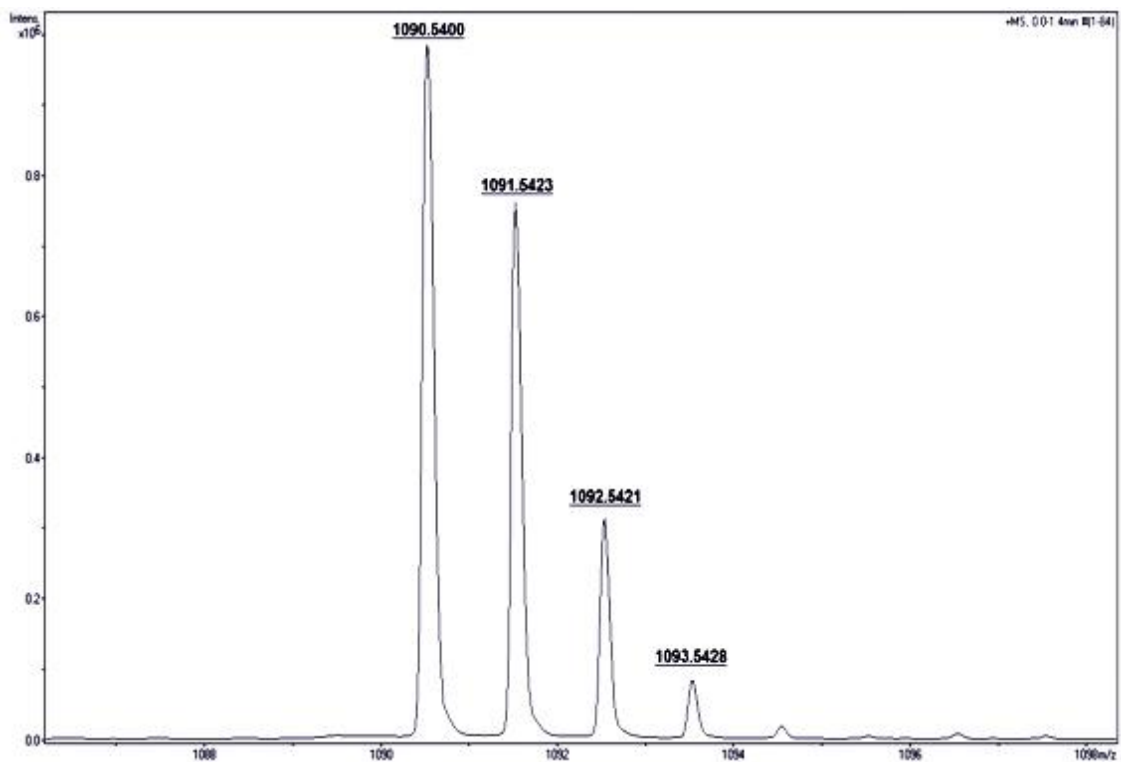


Figura 7. Espectro do PSLEM 11011 (YPLFGWGGIPP), representação da série isotópica obtida por ESI.

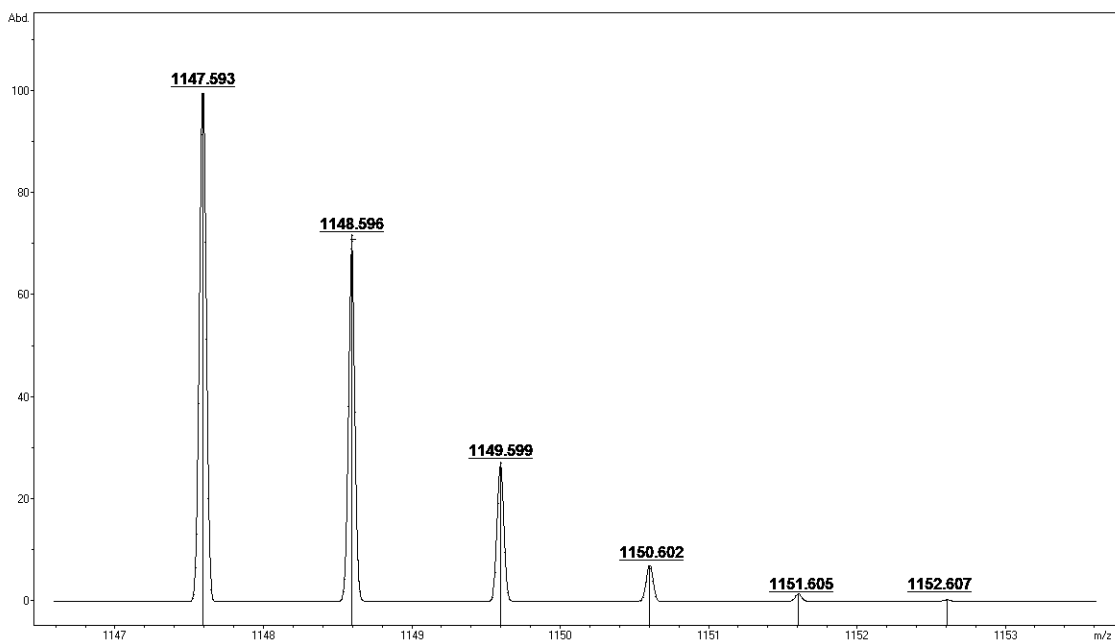


Figura 8. Espectro com a série isotópica teórica para o PSLEM 11012 (YPLFKWGGVPP), obtido por meio do programa *Compass Isotopic Pattern*.

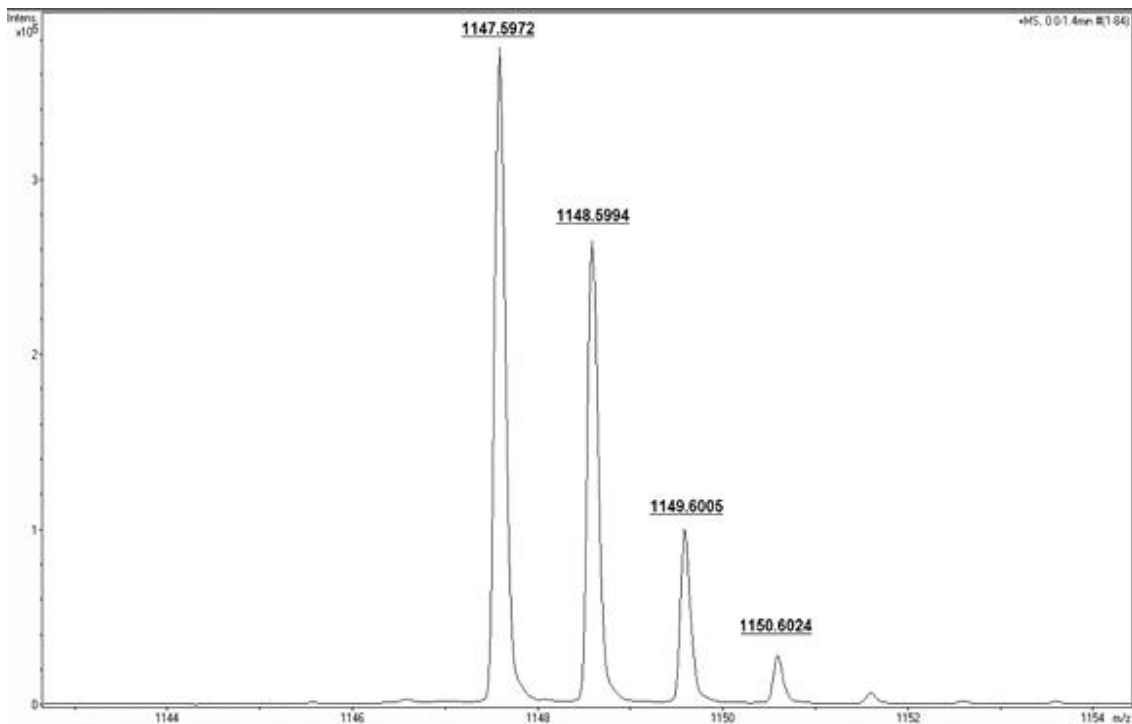


Figura 9. Espectro do PSLEM 11012 (YPFKWGGVPP), representação da série isotópica obtida por ESI.

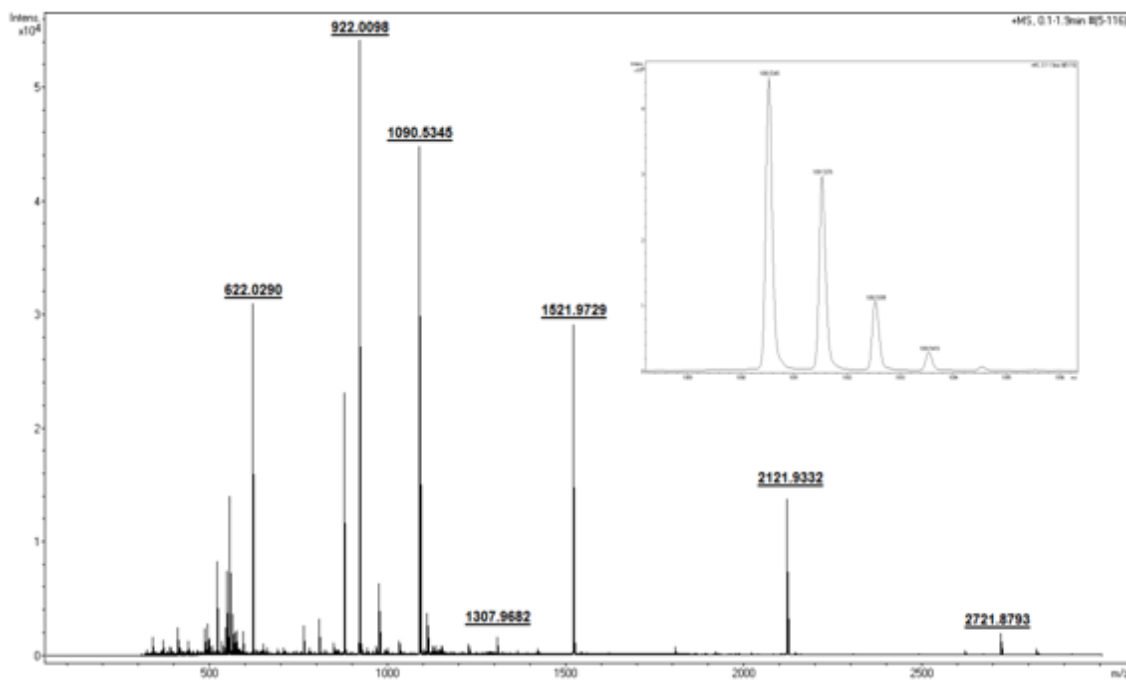


Figura 10. Espectro obtido para o PSLEM 11011 purificado, após análise por *eletrospray*, monocarregado 1090.5340 Da. Espectro com calibração interna indicando as massas moleculares dos calibrantes (622.02 Da, 922.00 Da, 1521.9 Da, 2121.93 Da, 2721.87 Da).

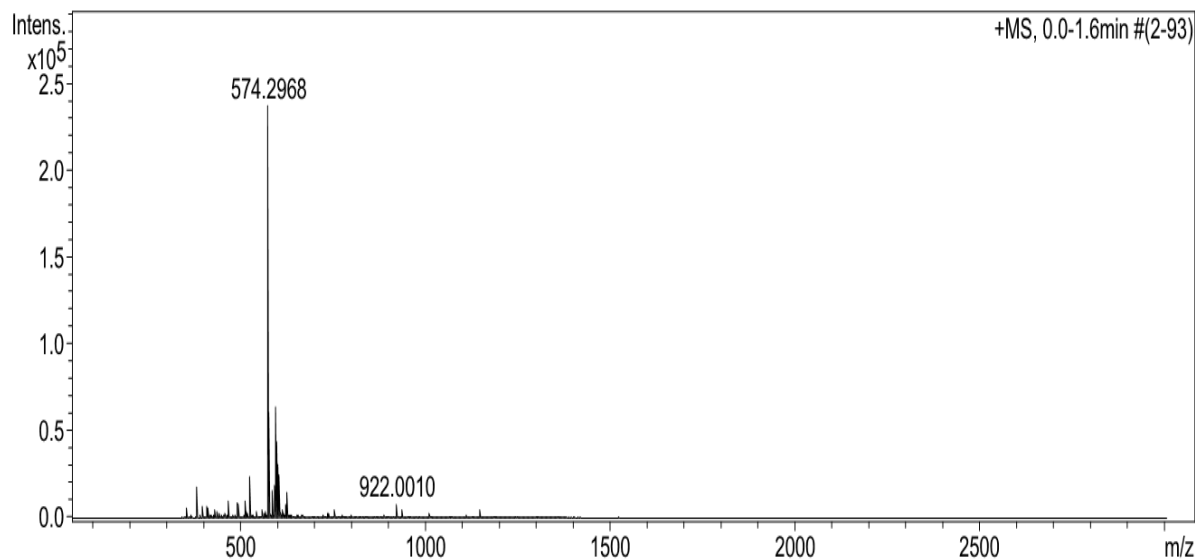


Figura 11. Espectro obtido para o PSLEM 11012 purificado, após análise por eletrospray, dupla carga 574.29 Da.

5.2 Confirmação da identidade molecular

A determinação da estrutura primária dos peptídeos foi realizada utilizando a técnica de ionização por *eletrospray*, por meio de fragmentação do íon precursor, experimento de MS/MS. A partir da fragmentação foi possível obter as séries y e b. A interpretação dos espectros foi realizada de modo manual com o auxílio do programa computacional *Compass Data Analysis* (Bruker Daltonics, Alemanha). A seguir nas figuras 12 e 13 os espectros com o sequenciamento para o PSLEM 11011 (YPFGWGGIPP) e PSLEM 11012 (YPFKWGGVPP). (Nóbrega, 2013) dados não publicados.

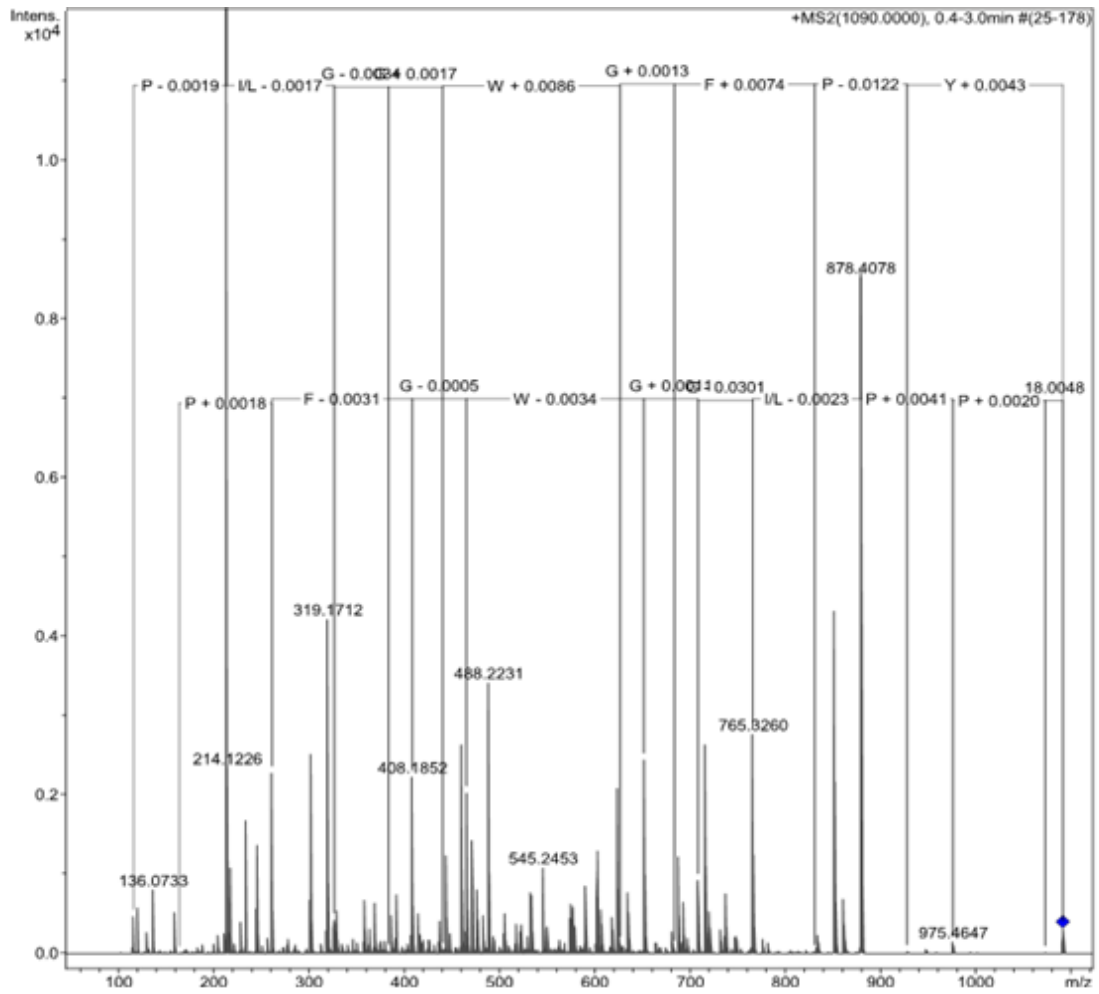


Figura 12. Espectro obtido por MS/MS para confirmação da identidade do PSLEM 11011. A série y íons fragmentados no C- terminal e a série b fragmentos no N-terminal.

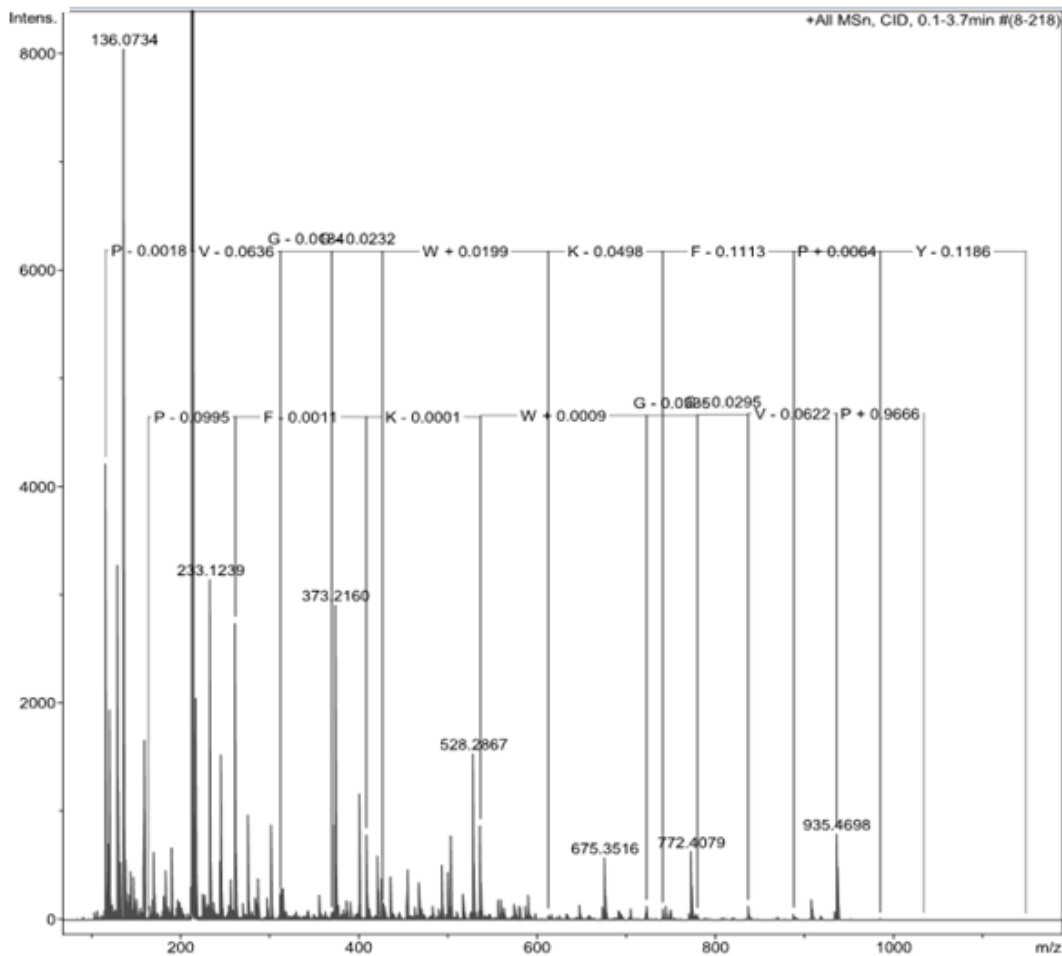


Figura 13. Espectro obtido por MS/MS para confirmação da identidade do PSLEM 11012. A série y íons fragmentados no C- terminal e a série b fragmentos no N-terminal.

5.3 Purificação dos peptídeos

Os peptídeos sintetizados foram fracionados utilizando-se o sistema de cromatografia líquida em fase reversa. As frações coletadas tiveram seus tempos de retenções, de acordo com a concentração de acetonitrila, em que eluíram. Foi observada uma diferença no tempo de retenção do PSLEM 11011 com o PSLEM 11012 que está sendo exibido nos cromatogramas nas figuras 14 e 15.

A cromatografia foi monitorada nos comprimentos de onda de 216 nm e 280 nm. A linha em preto representa a absorbância no comprimento de onda em 216nm e a linha vermelha indica a absorbância no comprimento de onda em 280 nm. O método utilizado com variação na concentração da fase móvel de 5% até 95% foi representado pela linha rosa.

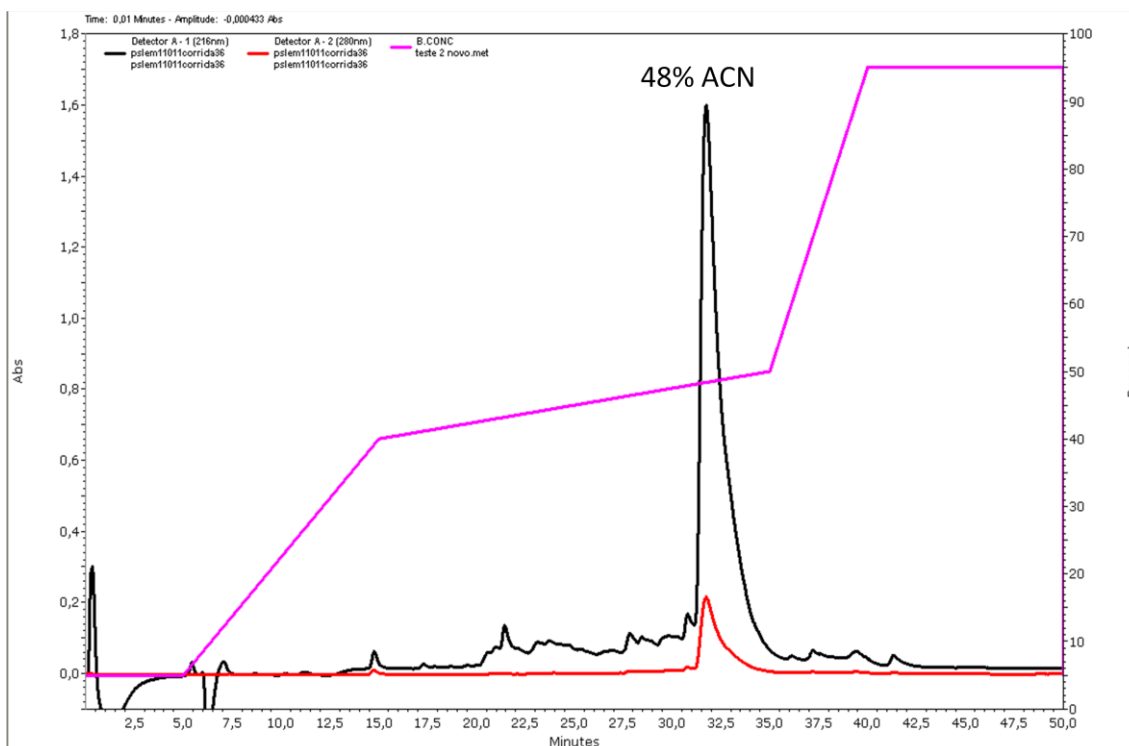


Figura 14. Cromatograma obtido para o PSLEM 11011. A eluição ocorreu aos 31 min. utilizando-se um gradiente de ACN (5% - 95%) com fluxo de 2,5 ml/ min à temperatura ambiente.

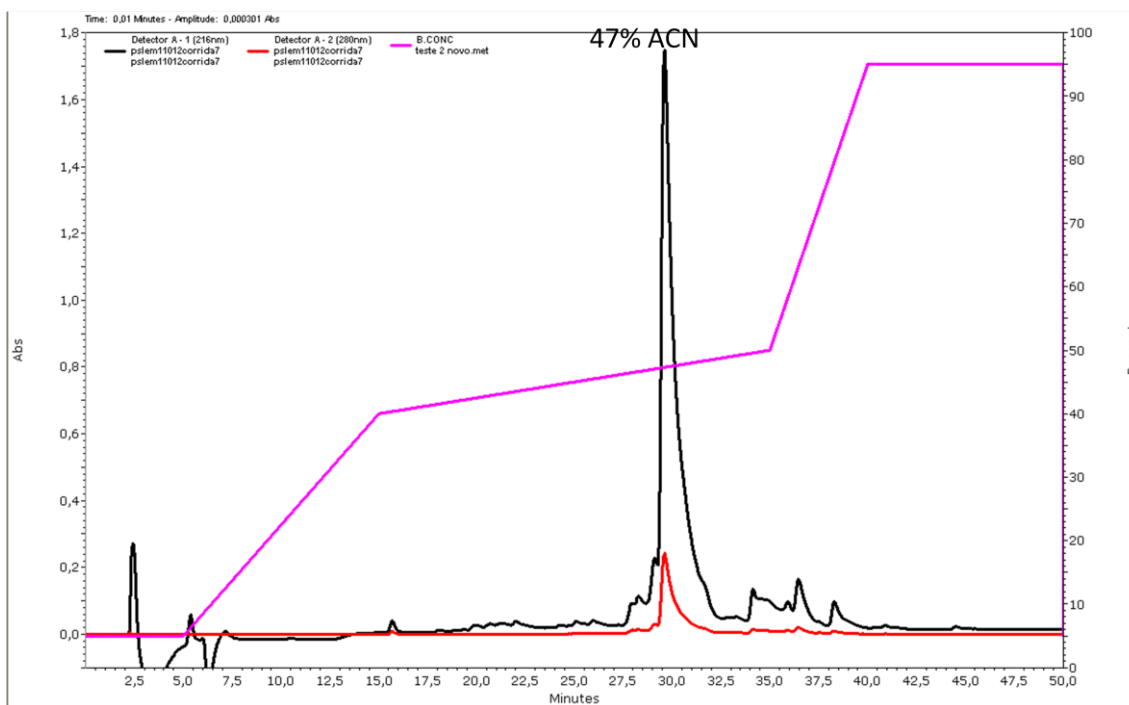


Figura 15. Cromatograma obtido para o PSLEM 11012. A eluição ocorreu aos 29 min. utilizando-se um gradiente de ACN (5% - 95%) com fluxo de 2,5 ml/ min à temperatura ambiente.

5.4 Análise antinociceptiva

Os gráficos a seguir mostram a atividade antinociceptiva para o ensaio do *tail flick* (figura 16 e 17) e do *hot plate* (figura 18 e 19) para o PSLEM 11011 e PSLEM 11012. A partir desses resultados, foi proposto o desenho de uma nova sequência por meio da inserção de peptídeos em um arcabouço proteico que possibilite o aprimoramento da atividade do peptídeo.

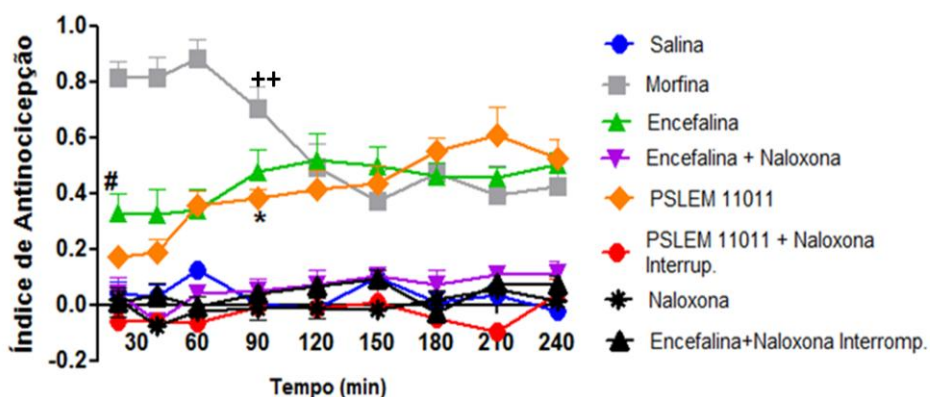


Figura 16- Índice de antinocicepção do PSLEM 11011 no teste do *Tail Flick*

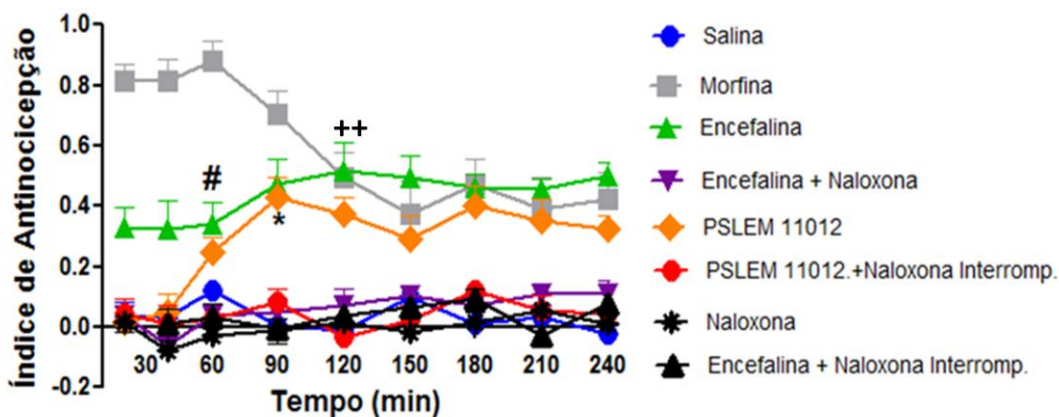


Figura 17 - Índice de antinocicepção do PSLEM 11012 no teste do *Tail Flick*

Figuras 16 e 17 : Índice de antinocicepção representado por símbolos (#, ++, *) atividade estatisticamente significativa (S) ou quando não existe diferenças estatisticamente significativa (NS) do **PSLEM11011** e **11012 (PEPTÍDEOS SINTÉTICOS)** comparado com os grupos controles . Índice de antinocicepção analisado por Two Way ANOVA seguida de Bonferroni (Graphpad Prism 5.0,software,USA). Em (*) início da atividade do PSLEM 11011, 11012 $P < 0,001$ (S); (++) PSLEM11011/11012 comparado com a morfina com $P > 0.05$ (NS) - 11012 $P > 0.005$ (NS); (#) PSLEM 11011/11012 comparado com a Leu - encefalina $P > 0.05$ (NS).

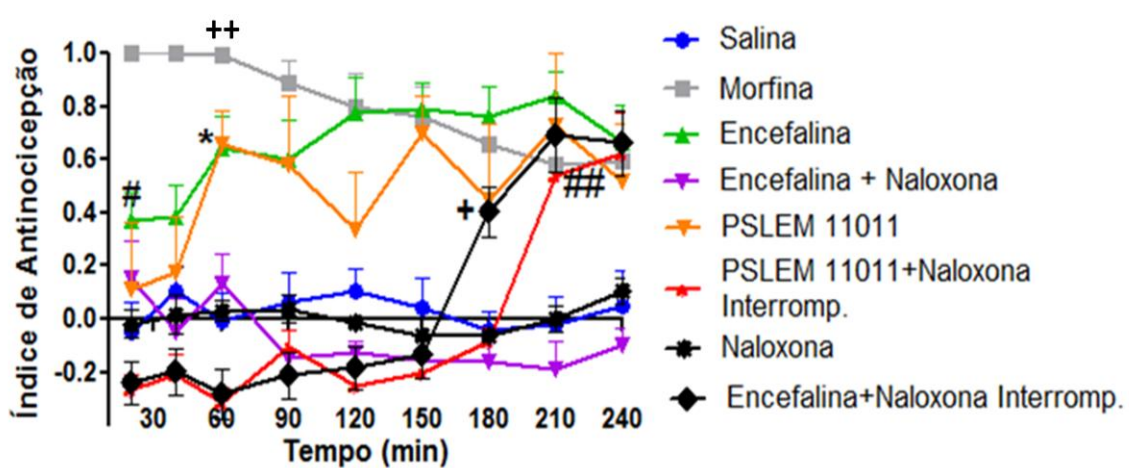


Figura 18. Índice de antinociceção do PSLEM 11011 no teste do *Hot Plate*

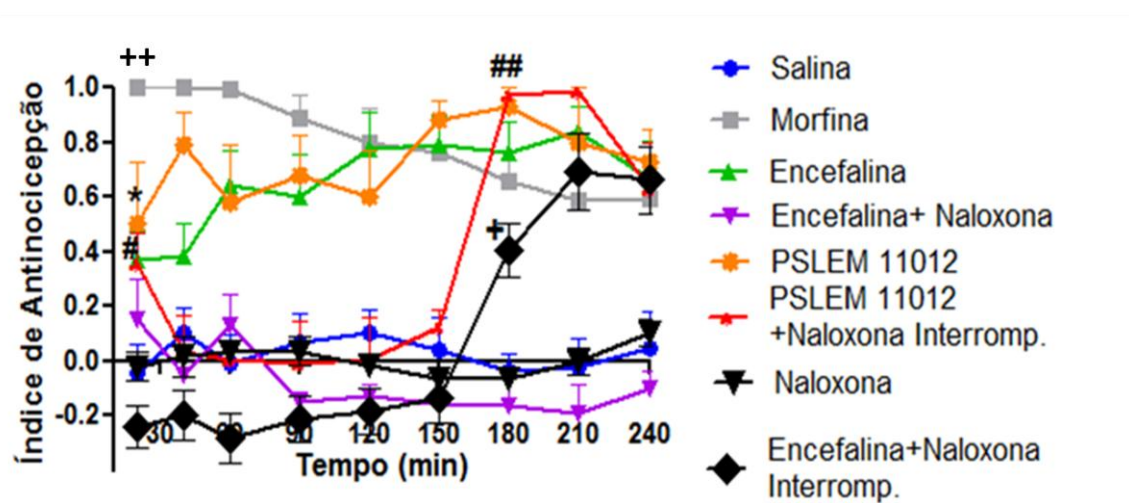


Figura 19. Índice de antinociceção do PSLEM 11012 no teste do *Hot Plate*

Figura 18 e 19: Índice de antinociceção representado por símbolos (#, ++, *, ##, +) referente a atividade estatisticamente significativa (S) ou quando não existe diferenças estatisticamente significativa (NS) do PSLEM11011 e PSLEM 11012 comparado com os grupos controle. Em (*) início da atividade do PSLEM 11011, $P < 0,01$ (S) - PSLEM 11012, $P < 0,001$ (S). (++) PSLEM11011 comparado com a morfina com $P > 0,05$ (NS).- PSLEM 11012 $P > 0,005$ (NS).(#) PSLEM 11011, 11012 comparado com a Leu encefalina $P > 0,05$ (NS). (##) PSLEM 11011, 11012 + Naloxona interrompida comparado apenas com PSLEM11011 e PSLEM 11012 $P > 0,05$ (NS). (+) PSLEM 11011,11012 + Naloxona interrompida comparada com a Leu-encefalina + Naloxona interrompida. Somente com 180 min. existe diferença estatisticamente significativa PSLEM 11011 $P < 0,05$ (S) - PSLEM 11012 $P < 0,01$ (S).

5.5 Análise das possibilidades das pontes dissulfeto predominante

Para análise das possibilidades de formação de pares dissulfeto, foi criado um mapa com todas as possibilidades de fragmentos para cada combinação possível (a,b,c ver figura 20 a seguir).

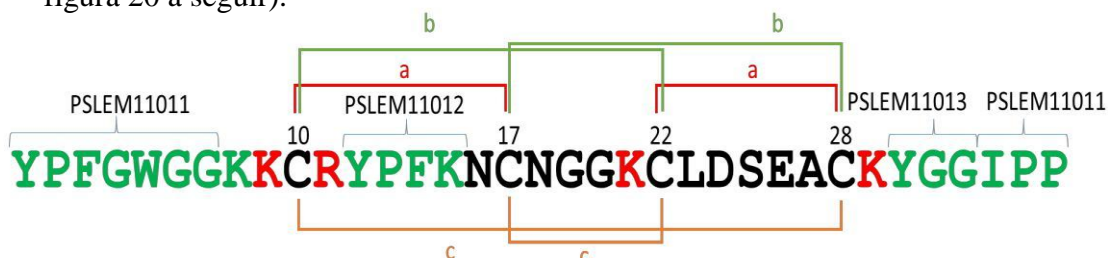


Figura 20. Possibilidades para os pares dissulfeto estão representados pelas letras a, b e c

A partir da análise por LC-MS foi possível observar os fragmentos liberados e compara-los com as possibilidades do mapa. A combinação de formação dos pares dissulfeto foi a **a**: uma ponte entre as cisteínas 10-17 e a outra entre as cisteínas 22-28 (ver figura 21). A combinação e os fragmentos obtidos a partir da análise por LC-MS serão mostrados a seguir:

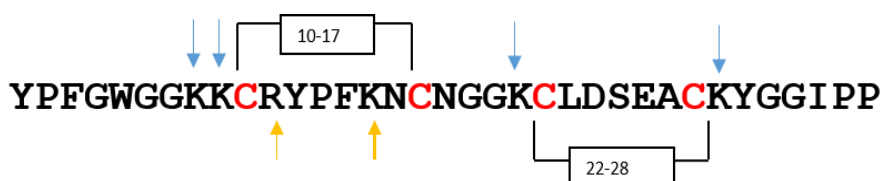


Figura 21. Possibilidade predominante de formação das pontes dissulfeto: combinação a: 10-17, 22-28. As setas indicam sítios de clivagem para tripsina. Em amarelo sítios de clivagem na ponte.

Em seguida, foi organizado uma tabela (tabela 1) para indicar a estrutura primaria dos íons liberados, a massa mono carregada $[M+H]^+$ e a dupla carga $[M+2H]^{+2}$.

Tabela 1 Sequência de íons liberados após digestão com tripsina

Sequencias fragmentos liberados	$[M+H]^+$	$[M+2H]^{+2}$
1- YPFGWGGK	911.44	456.22
2-YPFGWGGKK	1039.54	520.27
3-CRYPFKNCNGGK	-	692.81
4-CLDSEACK	866.33	433.67
5-YGGIPP	603.31	-

5.6 Análise dos componentes obtidos (MS)

Foi realizado a análise por LC-MS dos fragmentos obtidos após a digestão trípica. Para essa análise foram utilizados os métodos de ionização por eletrospray (ESI) e o analisador híbrido quadrupolo tempo de voo (Q-Q-TOF). A massa da série isotópica obtida para cada íon apresentava acurácia em relação a massa esperada (teórica) para determinar a massa teórica foi utilizado o programa *Compass isotopic pattern* (Bruker Daltonics, Alemanha). Ver figuras 22,23,24,25,26.

A análise dos componentes obtidos também foi determinada para os fragmentos encontrados na proteína aberta, que foi o controle positivo no ensaio da digestão trípica (figuras 27,28,29,30).

5.7 Verificação da identidade dos fragmentos peptídicos (MS/MS)

A identidade dos peptídeos da proteína fechada foi obtida a partir da fragmentação do íon precursor para a obtenção dos espectros de MS/MS. A interpretação dos espectros foi realizada de modo manual com o auxílio do programa computacional Compass Data Analysis (*Bruker Daltonics*, Alemanha). Para a determinação da identidade do precursor foi efetuada uma quinta digestão com 0,5mg da MTOXI nas mesmas condições das quadruplicatas. Essa análise foi executada por meio de LC-MS com o espectrômetro de massa TOF-QIII (Impact III, Bruker Daltonics, Germany), com ionização por electrospray (ESI), em modo positivo. O modo auto MS/MS foi ativado, tendo como precursor os peptídeos liberados na digestão.

Nas figuras 22 à 26, estão os espectros obtidos para cada fragmento liberado numerados de 1 a 5 com os respectivos espectros indicado por letras. Em A, indica o espectro com a série isotópica mono carregado $[M+H]^+$ para cada fragmento, em B o espectro com a serie isotópica com a dupla carga $[M+2H]^{2+}$, em C a representação da série isotópica teórica e em D, a fragmentação do íon precursor e obtenção do espectro de MS/MS para confirmar a identidade de cada fragmento.

1- YPFGWG GK

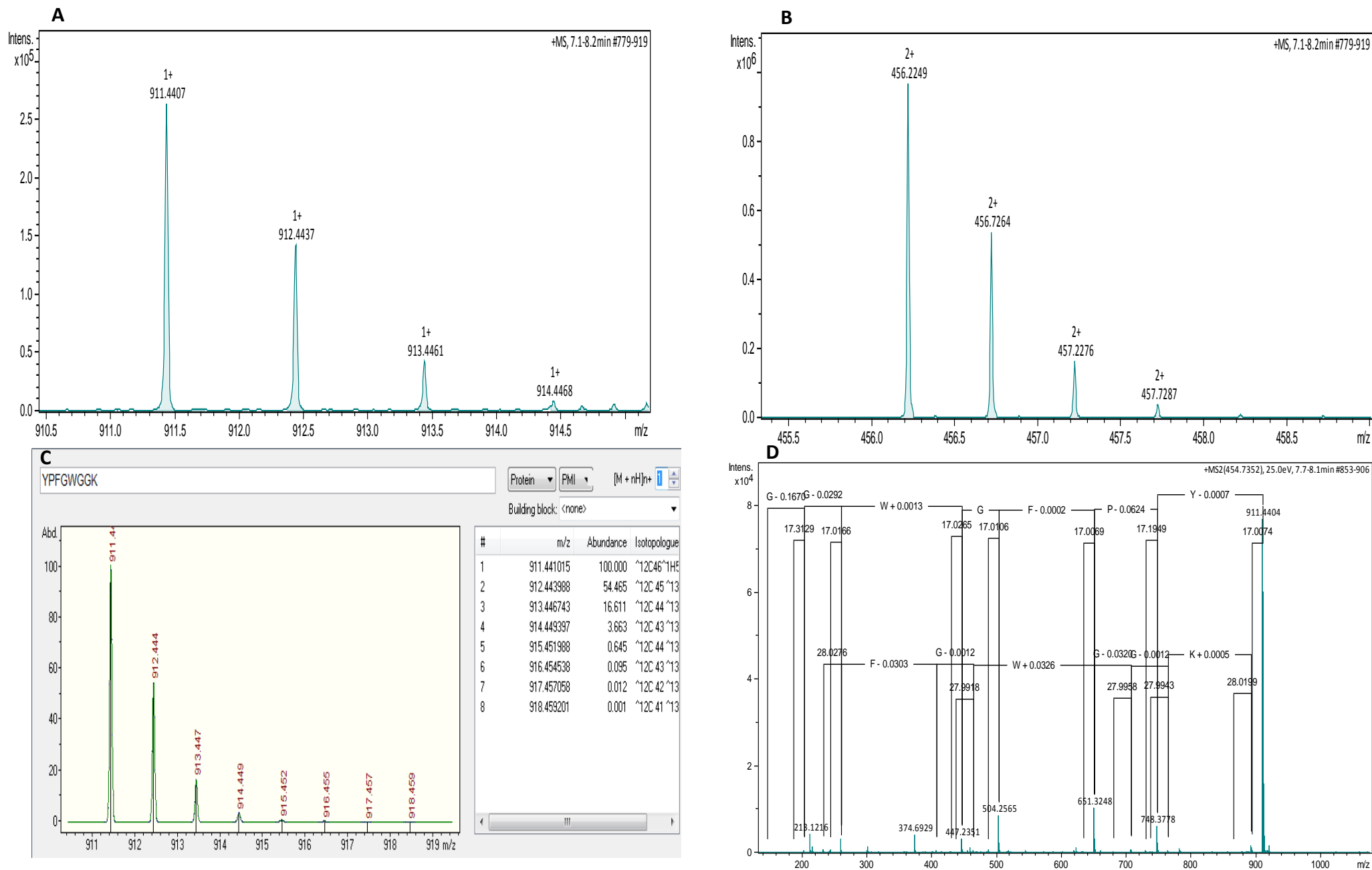


Figura 22. Em A, espectro indicando a série isotópica $[M+H]=911.4$ Da. Em B, a série isotópica com dupla carga $[M+2H]^{+2}=456.2$ Da. Em C, representação da série isotópica teórica. Em D, espectro de MS/MS confirmando a identidade do fragmento **YPFGWG GK**.

2- YPFGWGGKK

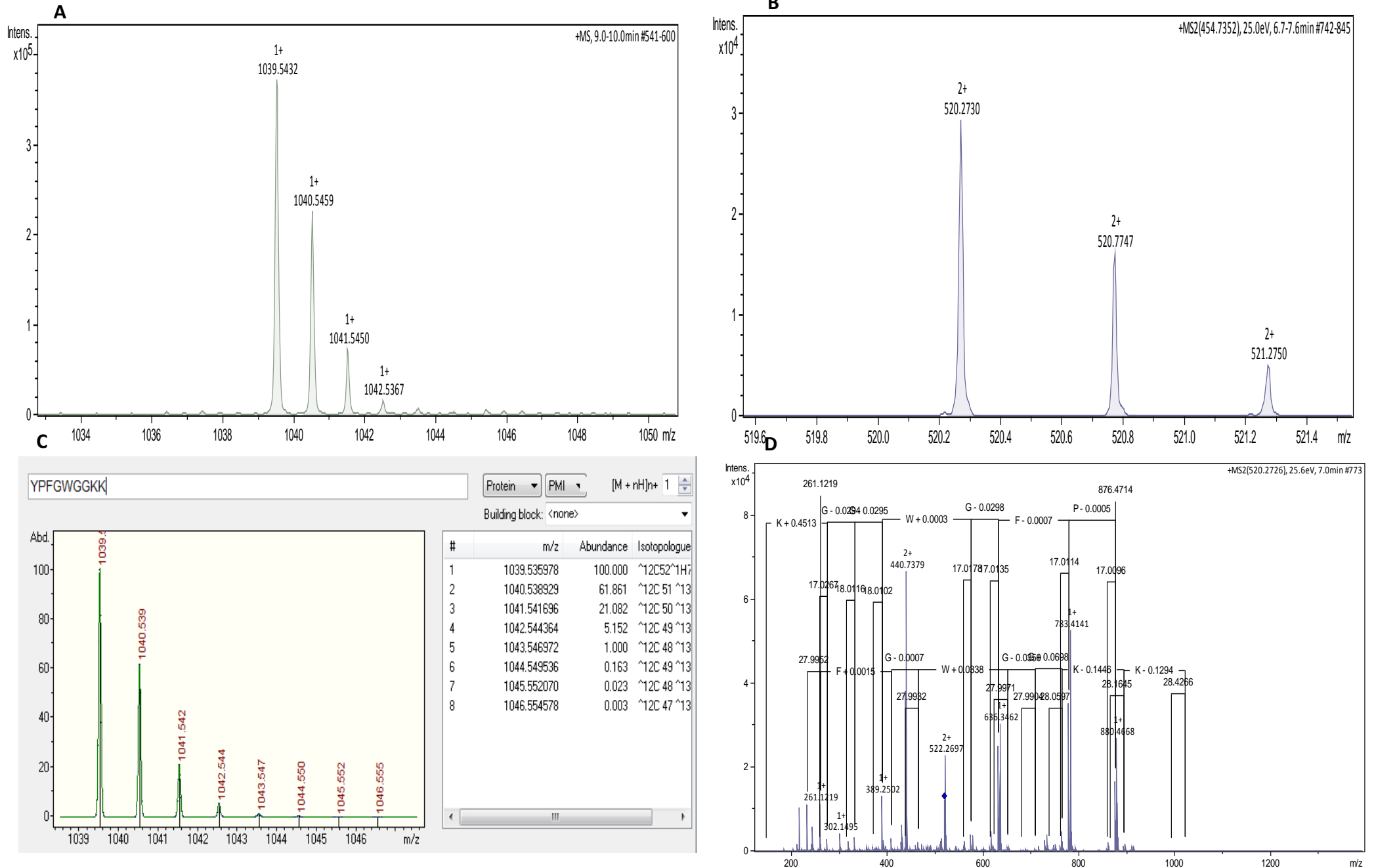


Figura 23. Em A, espectro indicando a série isotópica $[M+H]=1039.5$ Da. Em B, a série isotópica com dupla carga $[M+2H]^{+2} = 520.7$ Da. Em C, representação da série isotópica teórica. Em D, espectro de MS/MS confirmando a identidade do fragmento **YPFGWGGKK**.

3-CRYPFKNCNGGK = 693.82 - 2H = 692.81 Da

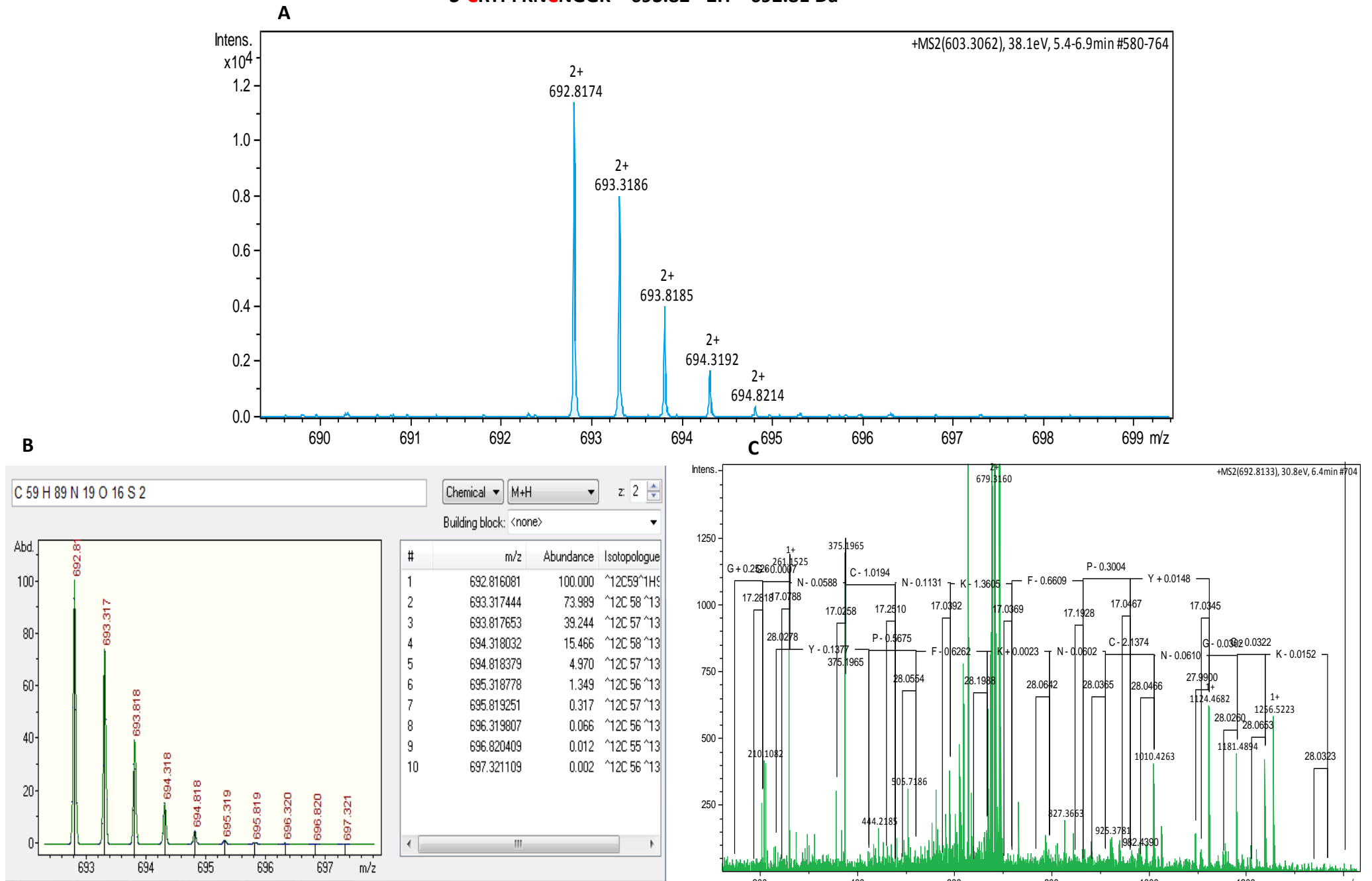


Figura 24. Em A, espectro indicando a série isotópica com dupla carga $[M+2H]^{+2} = 692.8$ Da. Em B, representação da série isotópica teórica. Em C, espectro de MS/MS confirmando a identidade do fragmento **CRYPFKNCNGGK**.

4-CLDSEACK = 868.3 - 2H = 866.3 Da

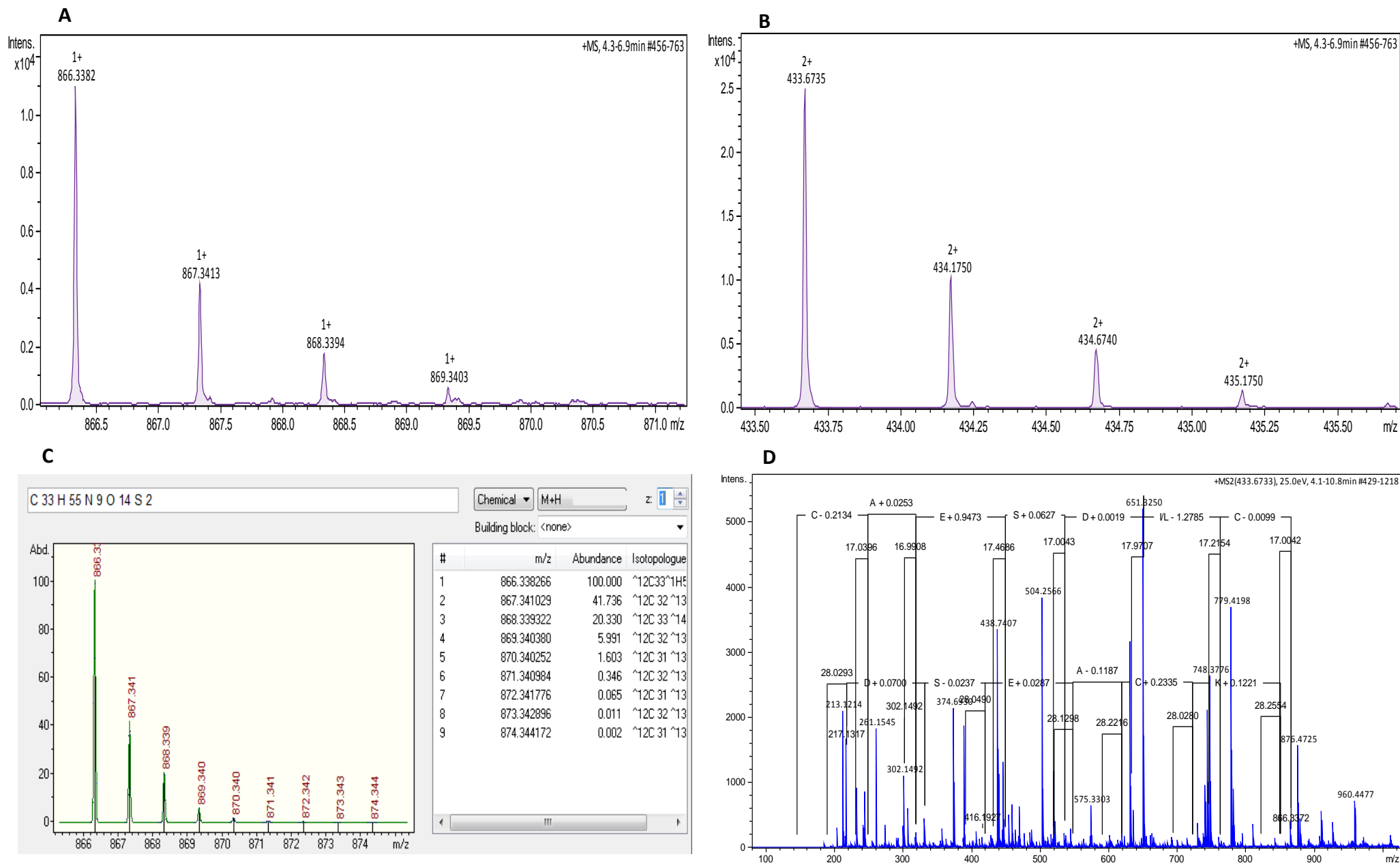


Figura 25. Em A, espectro indicando a série isotópica $[M+H]^+=866.3$ Da. Em B, a série isotópica com dupla carga $[M+2H]^{2+}=433.6$ Da. Em C, representação da série isotópica teórica. Em D, espectro de MS/MS confirmando a identidade do fragmento **CLDSEACK**.

5-YGGIPP

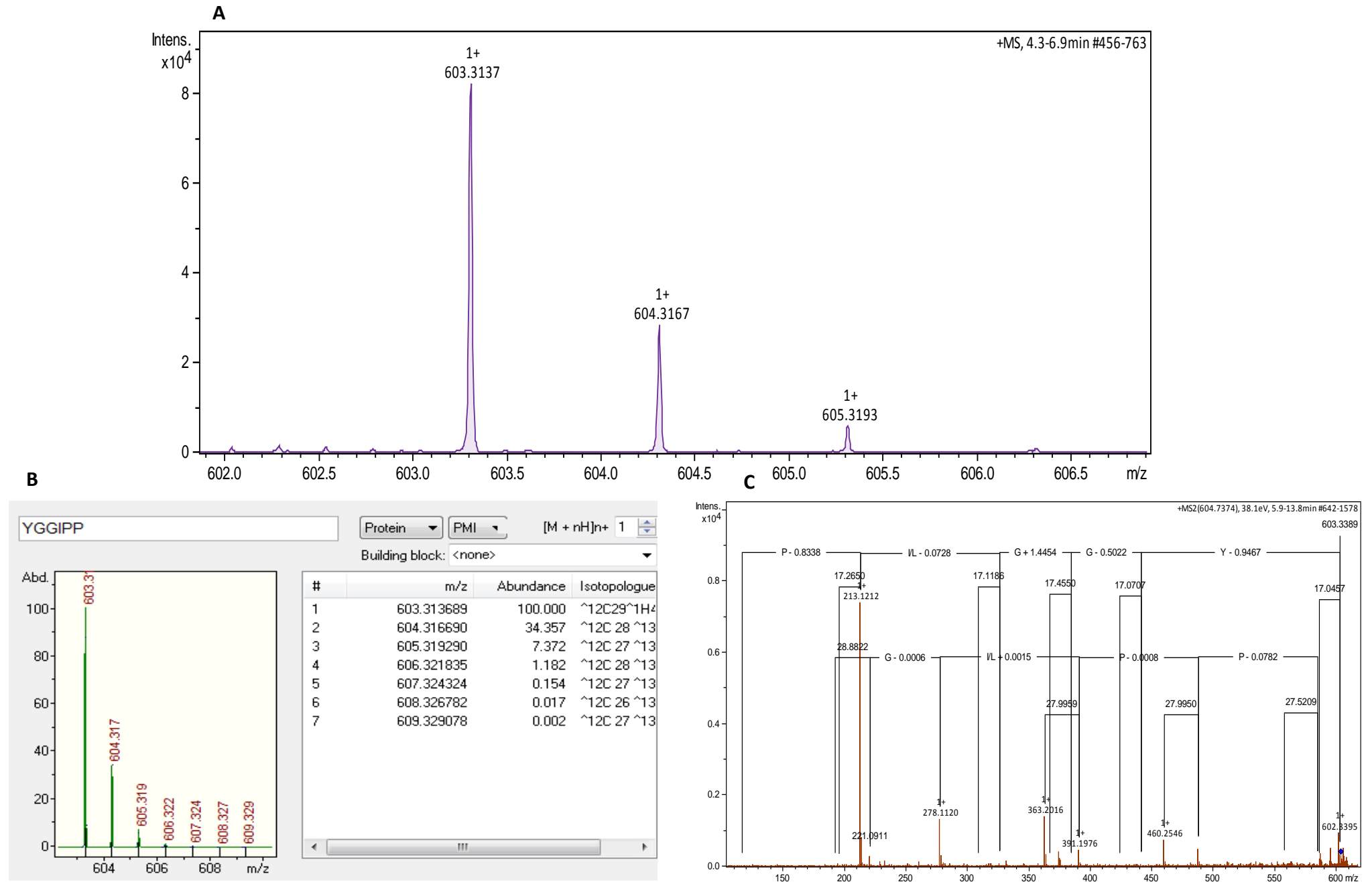
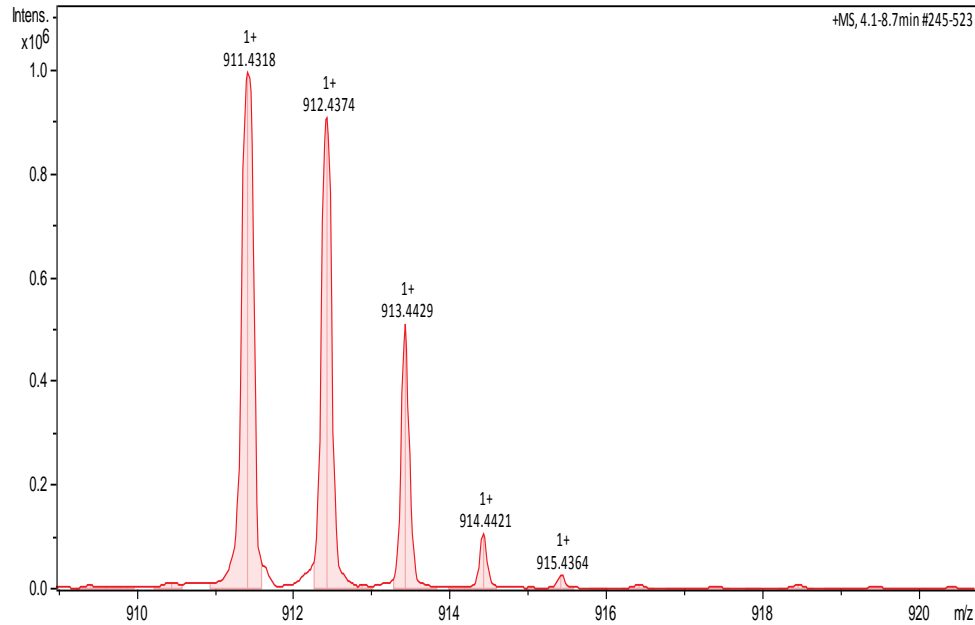


Figura 26. Em A, espectro indicando a série isotópica mono carregado $[M+H]^+ = 603.3$ Da. Em B, representação da série isotópica teórica. Em C, espectro de MS/MS confirmando a identidade do fragmento **YGGIPP**.

Análise dos componentes obtidos (MS) proteína aberta: Espectro obtido após digestão (indicado nas letras A,B,C,D,E,F,G,H) seguido da massa teórica

A- YPFGWGGK



B- YPFGWGGKK

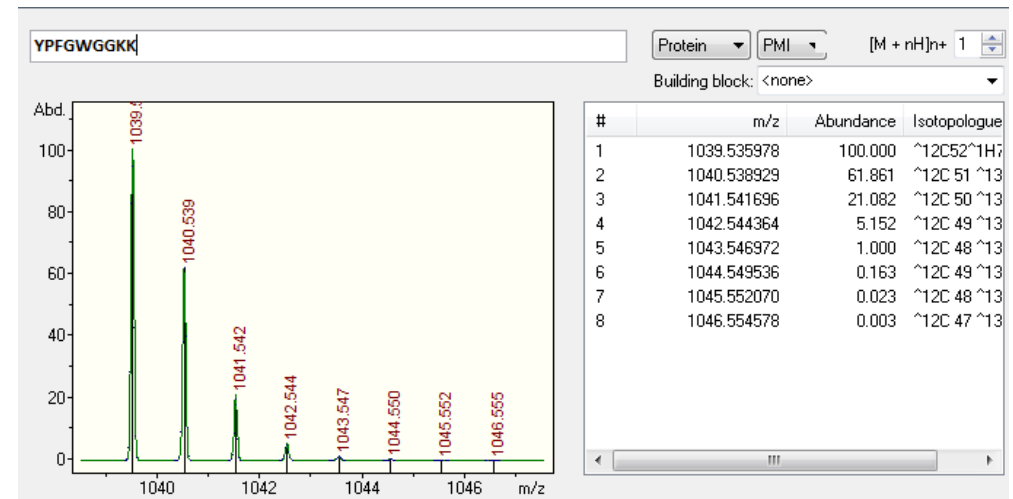
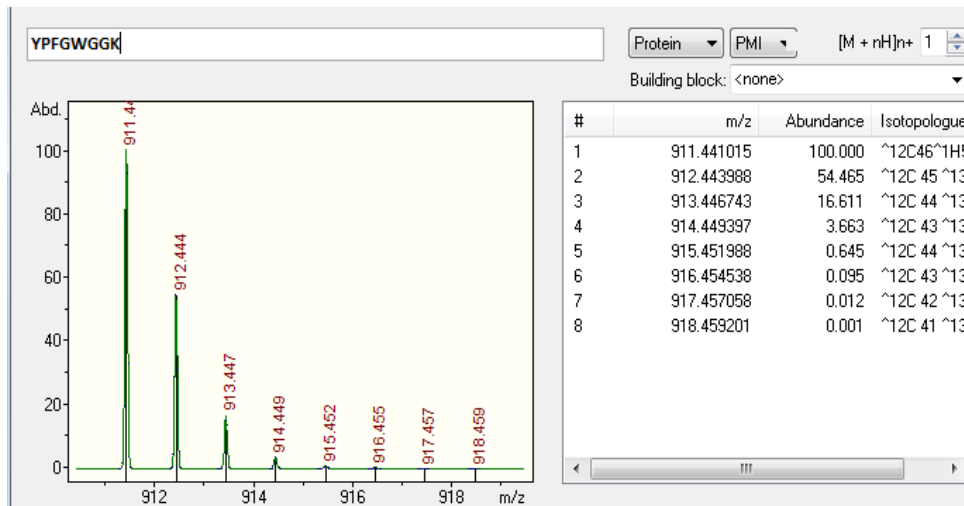
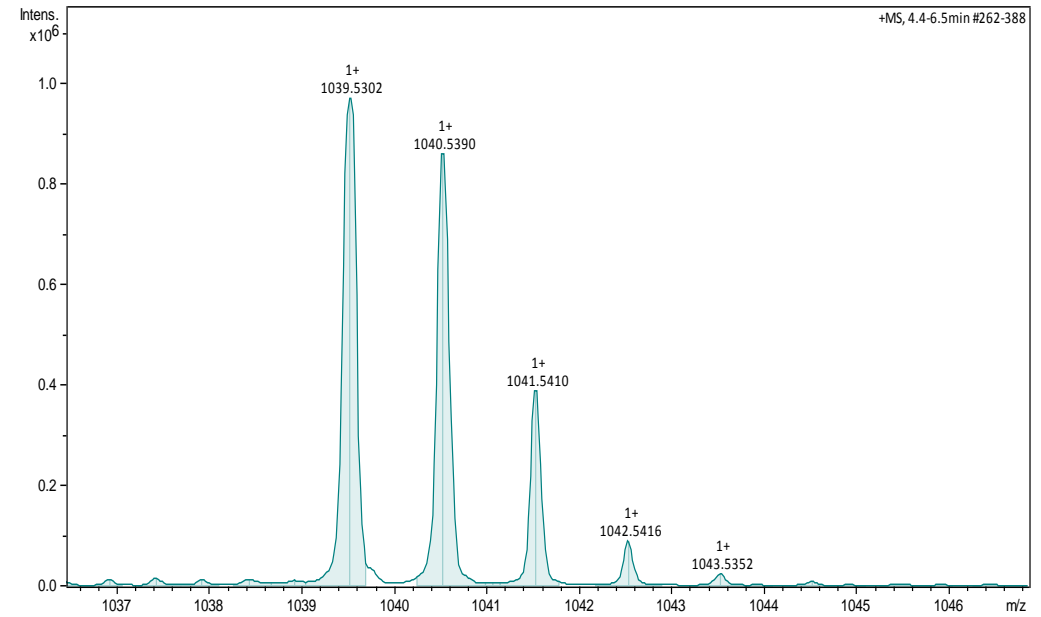
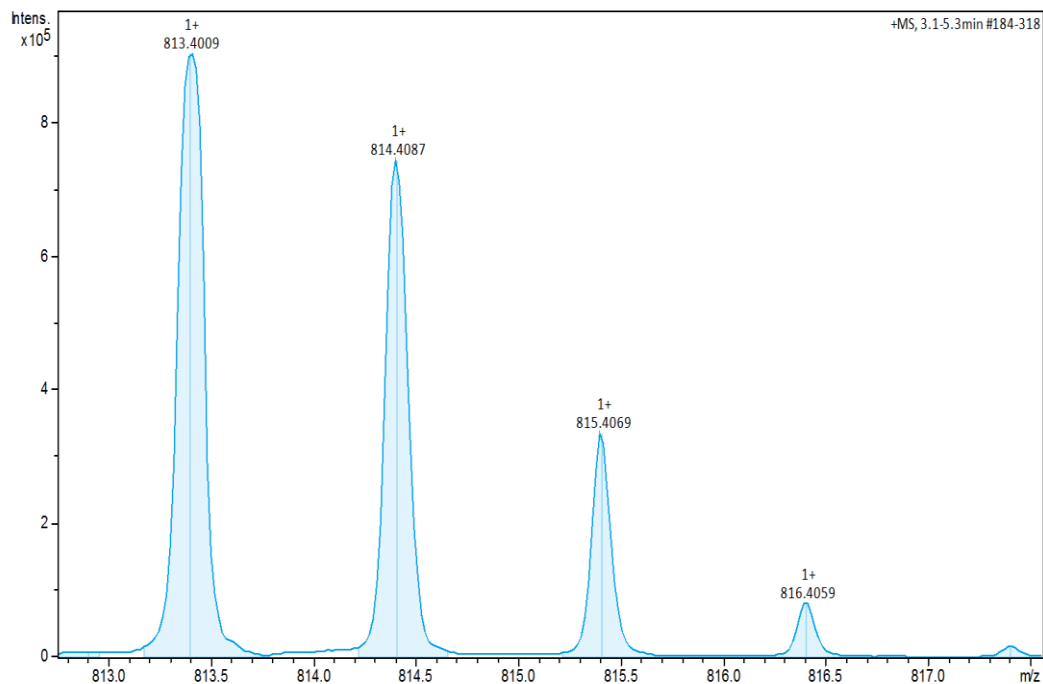


Figura 27. Em A $[M+H]^+ = 911.43\text{Da}$ e B $[M+H]^+ = 1039.53\text{Da}$ espectros indicando a série isotópica mono carregado para a proteína aberta. Abaixo, a representação da série isotópica teórica para os respectivos espectros (MS).

C- CRYPFK



D- YPFK

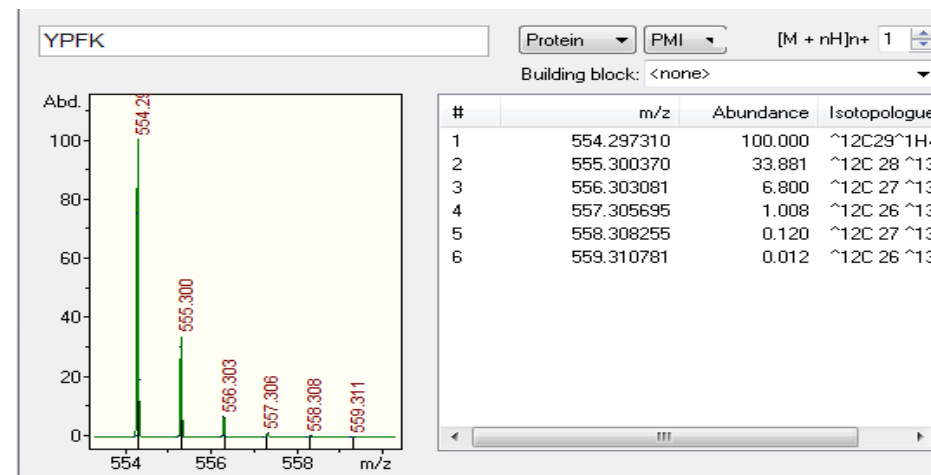
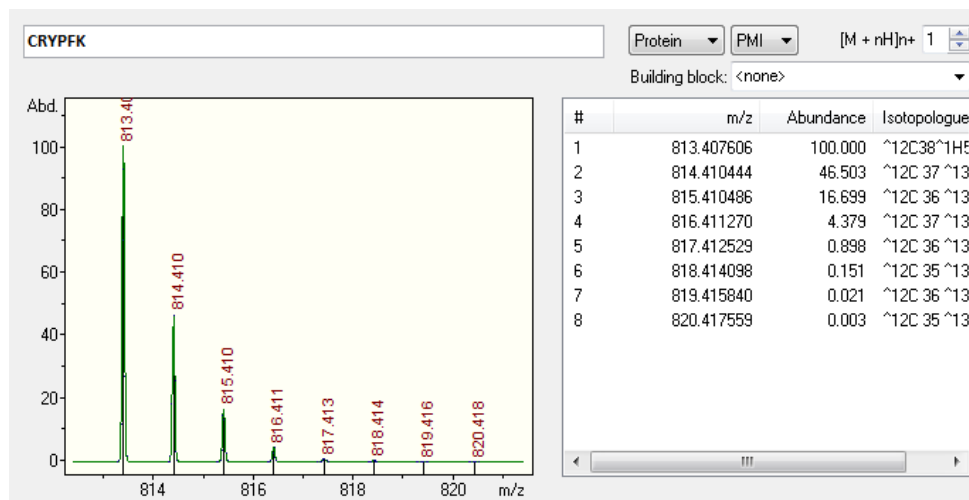
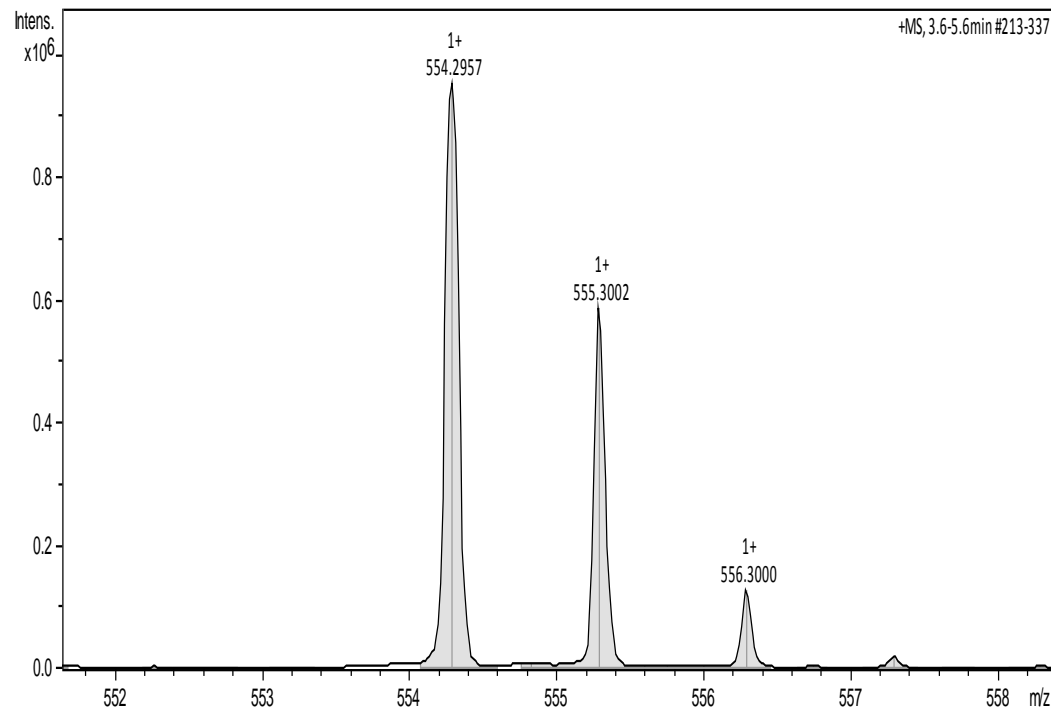


Figura 28. Em C $[M+H]^+ = 813.40\text{Da}$ e D $[M+H]^+ = 554.29\text{Da}$ espectro indicando a série isotópica mono carregado para a proteína aberta. Abaixo, a representação da série isotópica teórica para os respectivos espectros (MS).

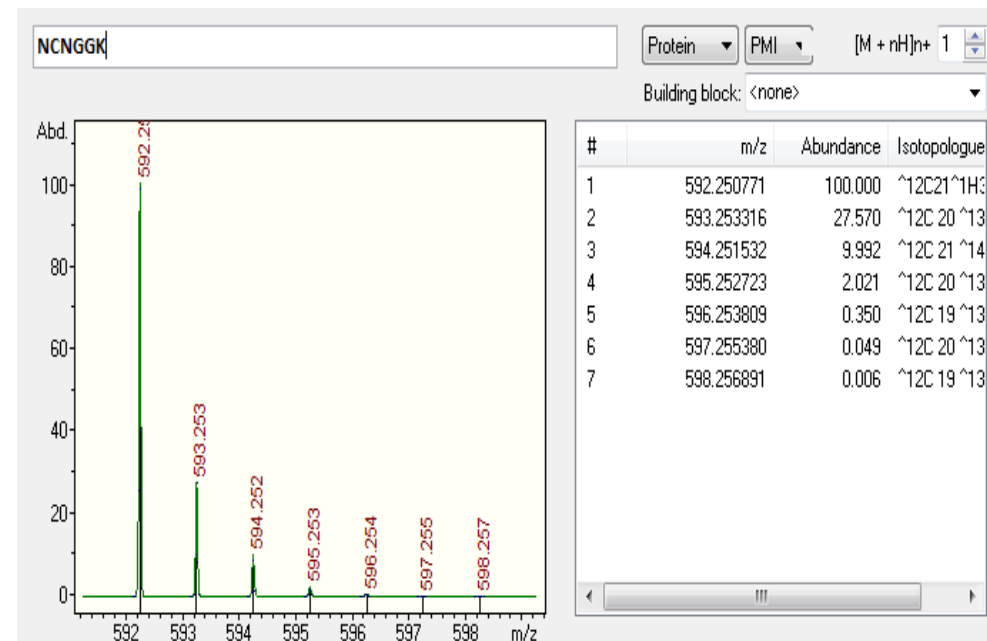
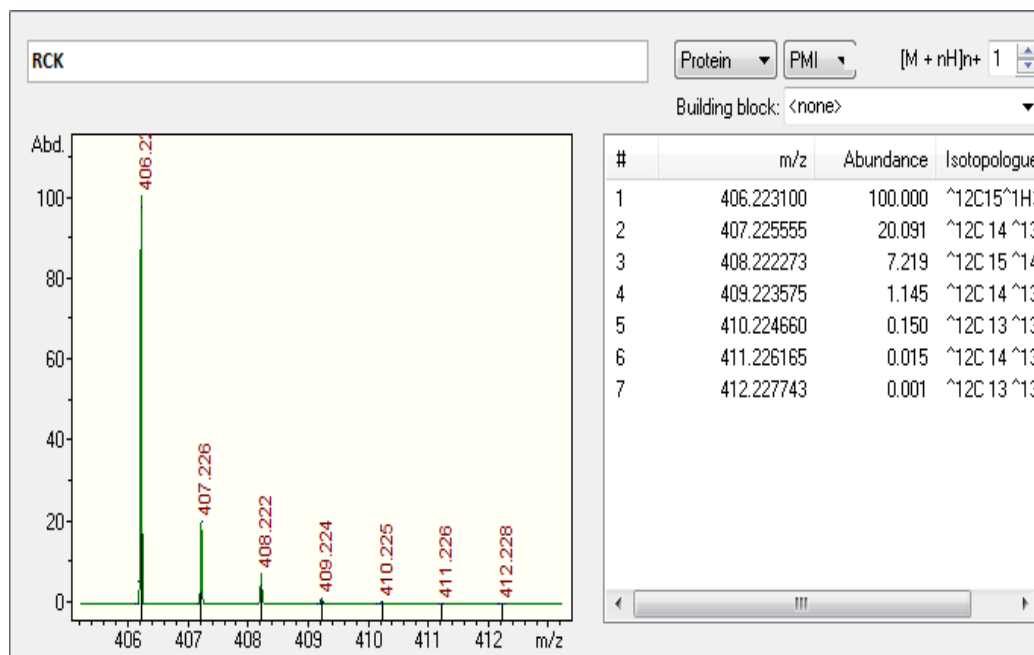
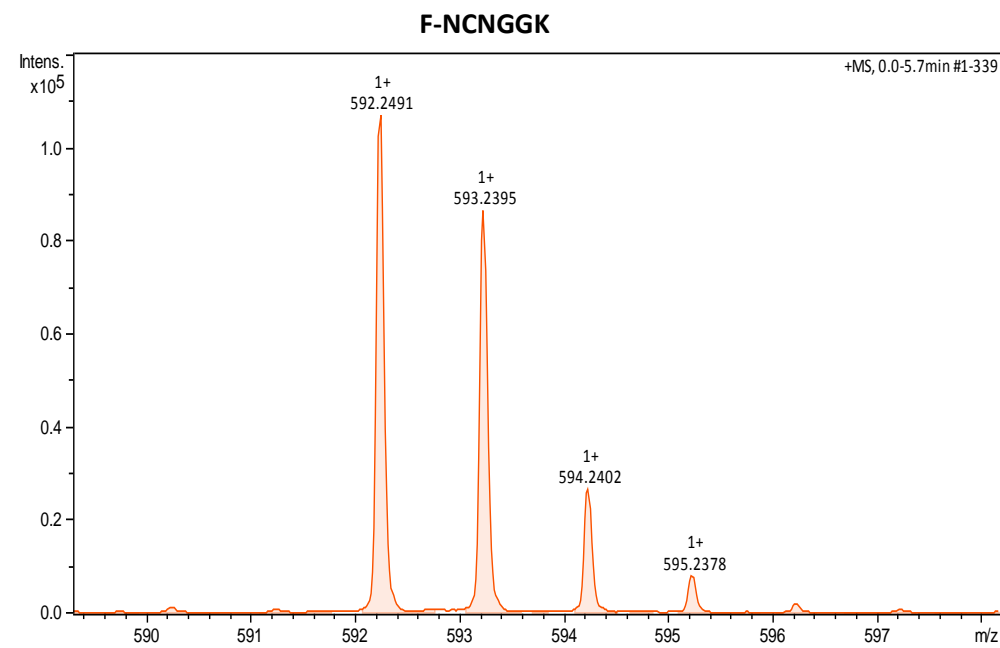
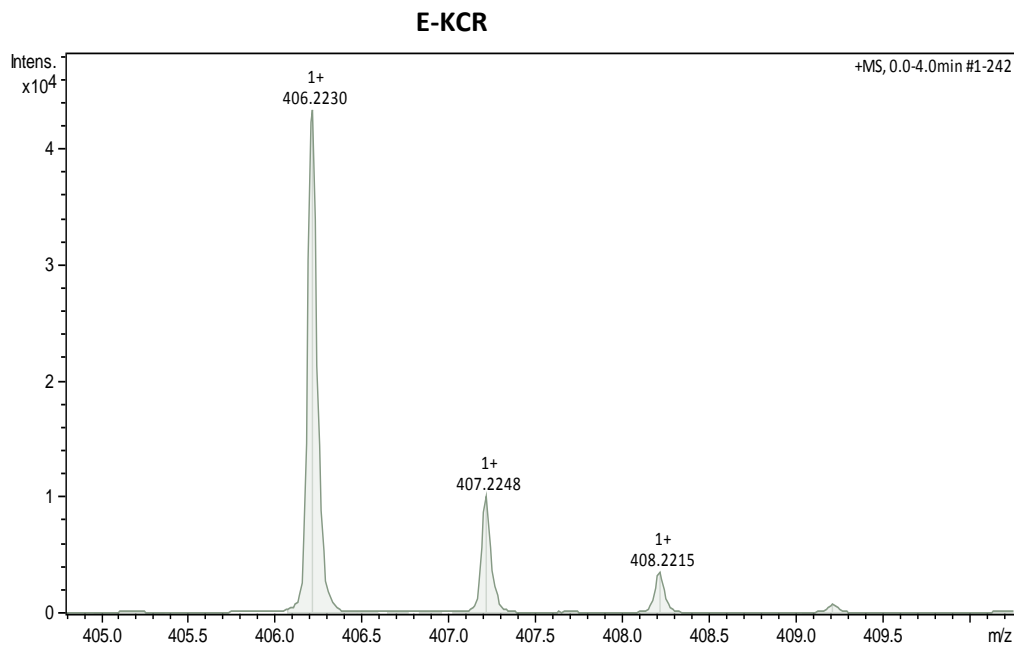
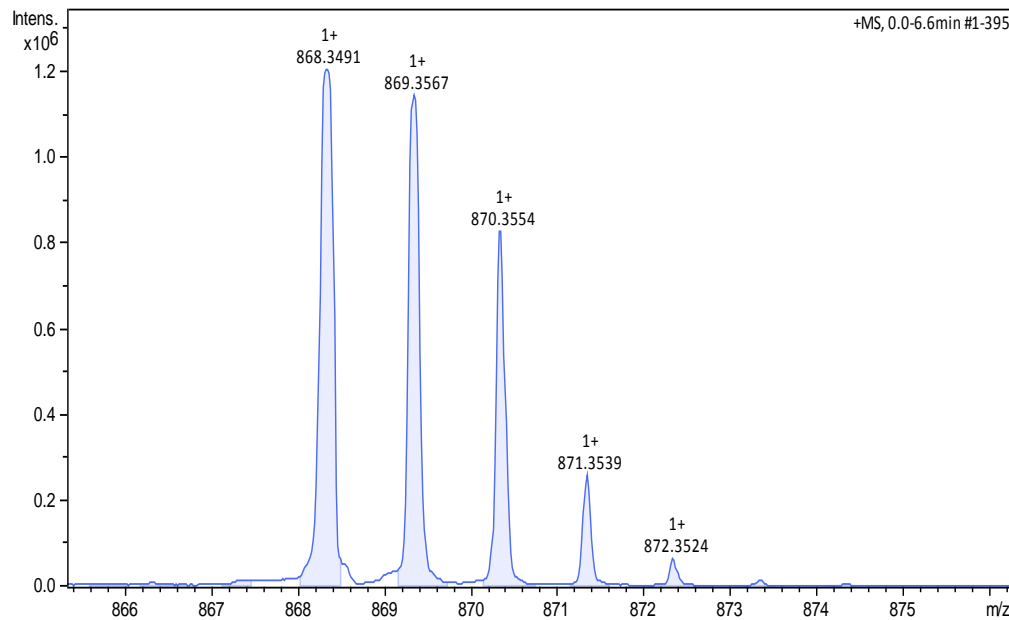


Figura 29. Em E $[M+H]^+ = 406.22\text{Da}$, em F $[M+H]^+ = 592.24\text{Da}$ espectros indicando a série isotópica mono carregado para a proteína aberta. Abaixo, a representação da série isotópica teórica para os respectivos espectros (MS).

G-CLDSEACK



H- YGGIPP

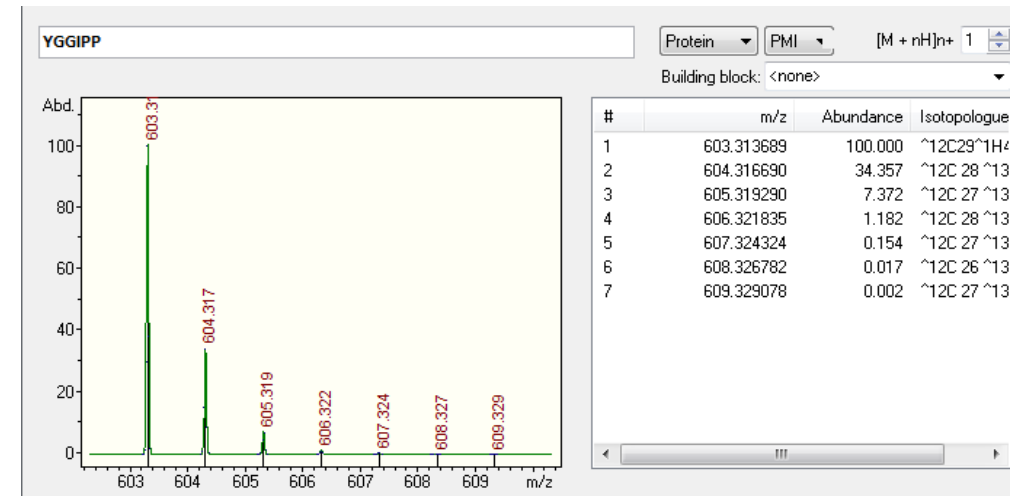
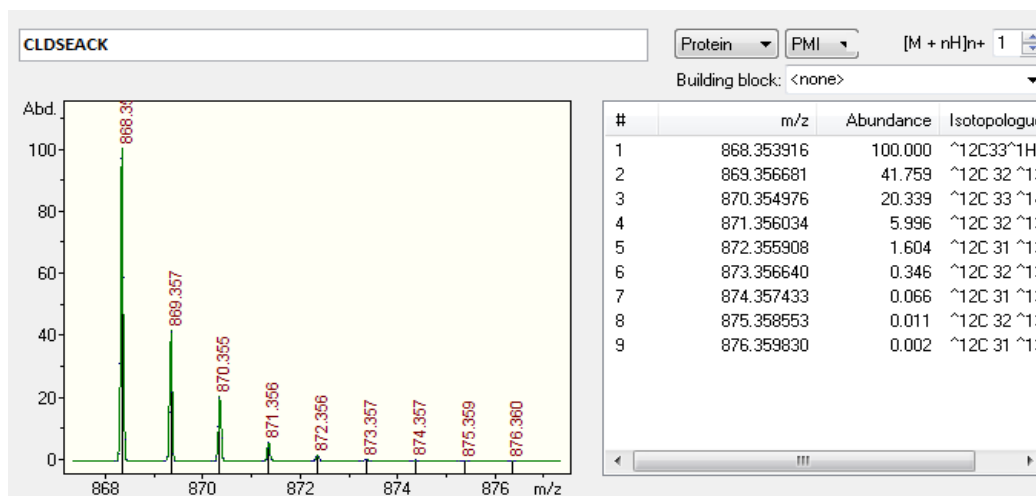
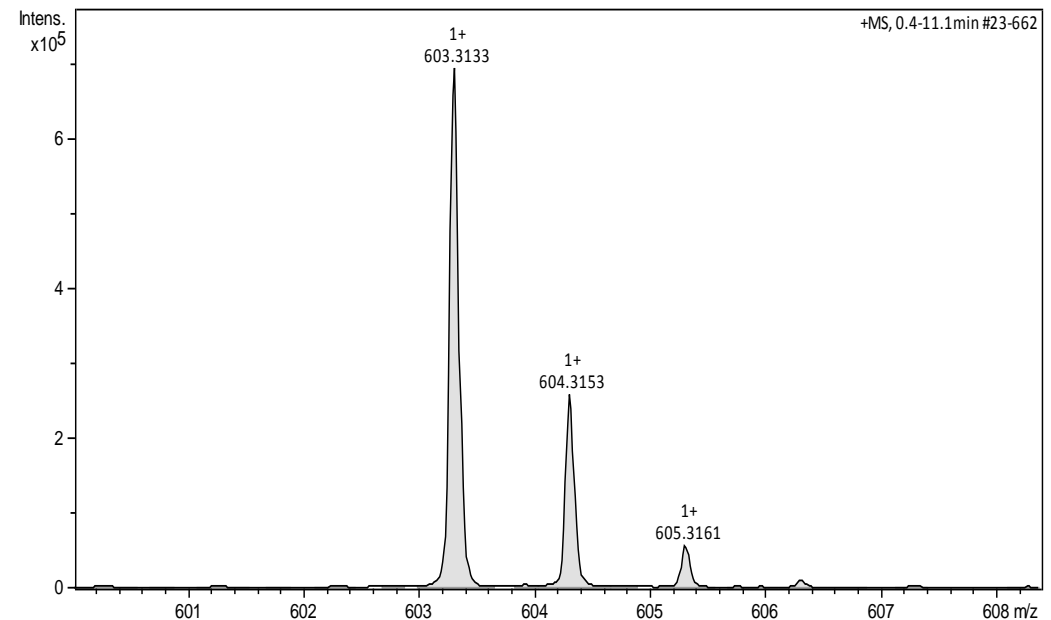


Figura 30. Em G $[M+H]^+ = 868.34\text{Da}$, em H $[M+H]^+ = 603.31\text{Da}$ espectros indicando a série isotópica mono carregado para a proteína aberta. Abaixo, a representação da série isotópica teórica para os respectivos espectros (MS).

5.8 Dicroísmo circular (dc)

A determinação da estrutura secundária da MTOXI foi elucidada por meio da análise na região do UV (ultravioleta) distante. A amostra foi ressuspendida em água ultrapura. A tendência de conformação predominante foi randômica (aleatório) em relação a formação de alfa hélices ou folha beta. Os resultados obtidos foram subtraídos do sinal de dicroísmo do solvente e a elipticidade obtida foi convertida em elipticidade molar (deg·cm²/dmol). Na figura 31 está o espectro obtido para a MT reduzida e na figura 32 após oxidação temperatura de 25°C. A concentração foi de 0,3 mM.

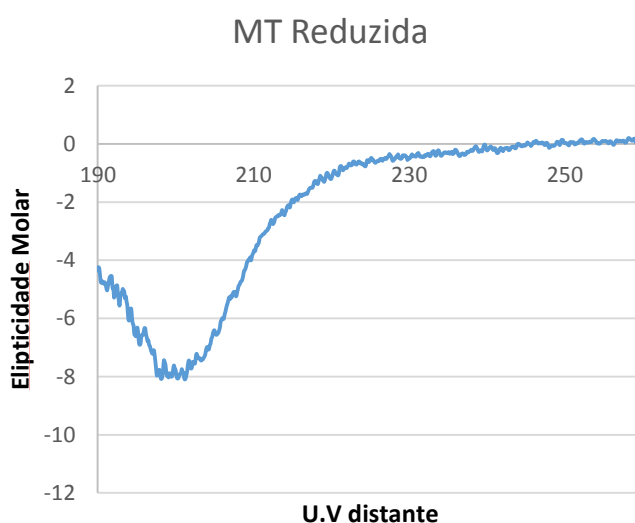


Figura 31. Espectro obtido na região do U.V distante, proteína reduzida, em água, à temperatura de 25°C.

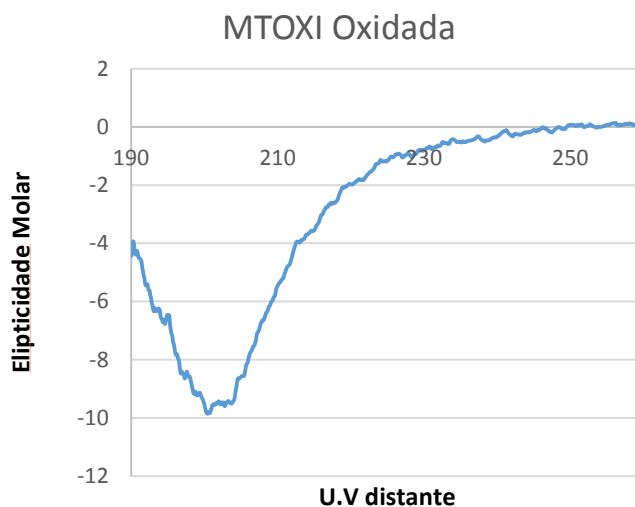


Figura 32. Espectro obtido na região do U.V distante para a MTOXI, em água, à temperatura de 25°C.

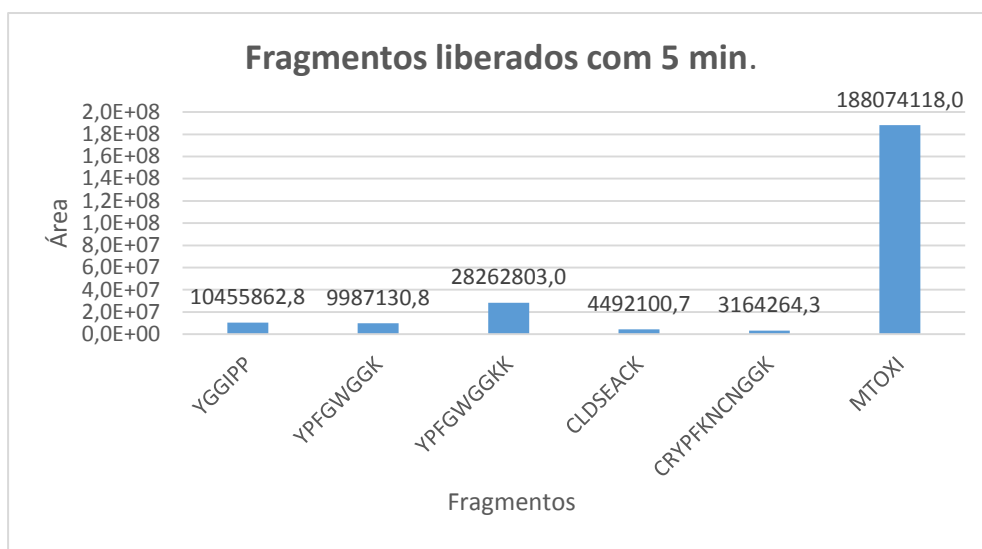
5.9 Análise dos fragmentos peptídicos digeridos da MTOXI por LC-MS

Foi realizado a análise por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa LC-MS dos fragmentos obtidos após a digestão com tripsina nos tempos, 5 (T5), 10 (T10), 15 (T15), 20 (T20), 30 (T30), 45 (T45), 60 (60) minutos. Nas figuras a seguir, está representado o gráfico de barras com a área de cada fragmento em seu respectivo tempo. Logo a baixo, tem um quadro com seis colunas que indicam: o fragmento com a sequência, a massa molecular, a razão massa carga (m/z), o tempo de retenção em minutos (R.T), área do pico do cromatograma, o tempo de digestão em minutos e o estado de carga. O controle negativo da digestão foi o tempo zero em que a amostra, na presença do TFA a 3%, foi acrescentada da solução enzimática com tampão bicarbonato de amônio (ver figuras 33 à 38). O controle positivo foi a digestão com a proteína aberta, sem formar os pares dissulfeto (será mostrado no próximo tópico).

O ensaio da digestão foi realizado em quadruplicatas, utilizando o mesmo equipamento, (MicroTOF-QII ESI, Bruker Daltonics, Alemanha). O método para todas as corridas cromatografadas foi o mesmo (5% ACN - 95%ACN em 32 min com fluxo 0,3 ml/min), assim como para a análise por espectrometria de massa. A análise foi executada de forma contínua, durante dois dias, à temperatura ambiente.

O programa *Data Analysis* (Bruker daltonics, Alemanha) foi executado e permitiu adquirir os dados necessários para análise da área de cada fragmento. Como também informações sobre: o tempo de retenção, estado de carga de cada íon, dentre outras. Para a determinação da área de cada fragmento, foi calculada a média aritmética das quadruplicatas de acordo com a sequência liberada em seu respectivo tempo. Os cálculos e gráficos foram obtidos utilizando o programa Excel (Microsoft Office, Estados Unidos). O critério para escolha da área de cada fragmento, foi de acordo com o estado de carga (mono, dupla, tripla..) que apresentou maior intensidade.

O gráfico de barras (figura 39) representa a análise da média da área de cada fragmentos em todos os tempos com a barra de erro padrão da média. O controle negativo também está indicado no tempo zero. Esses dados foram obtidos utilizando o programa *GraphPad Prism*, Estados Unidos.



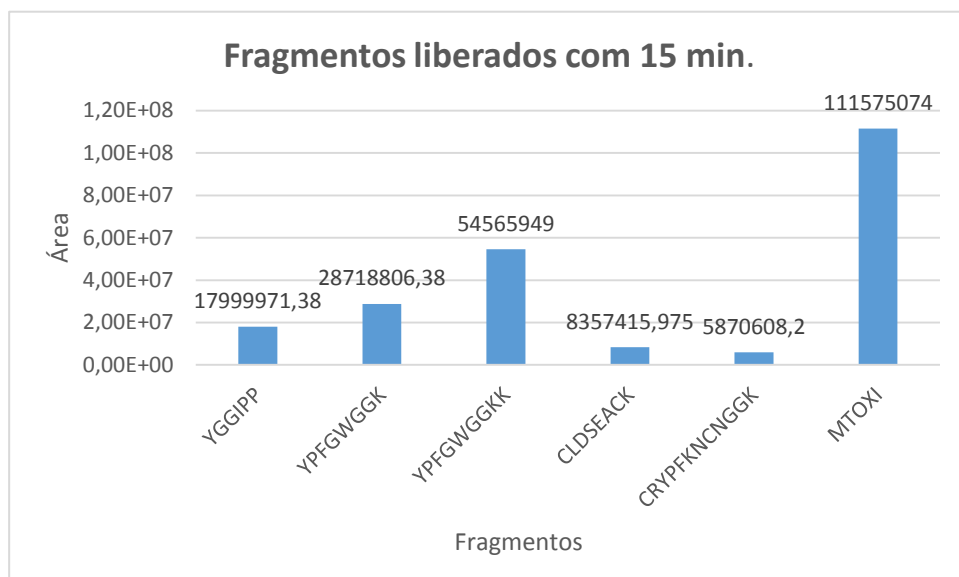
Fragmentos T5	[M+H] ⁺ m/z	Tempo retenção (min)	Área	Tempo digestão (min)	Carga
YGGIPP	603,3127	14,7	11511629	5	1
603,3100 Da	603,3145	14,8	12078453	5	1
	603,3126	14,9	10413702	5	1
	603,3125	15	7819667	5	1
YPFGWGGK	456,2260	15,3	3970452,7	5	2
911,4400Da	911,4369	15,4	18881150	5	1
[M+2H] ²⁺ 456.22Da	911,4375	17,5	16240762	5	1
	456,2255	17,8	856158,6	5	2
YPFGWGGKK	520,2744	13,6	31859254	5	2
1039.5359Da	520,2762	13,7	28272756	5	2
[M+2H] ²⁺ 520.2761Da	520,2736	15,7	27951580	5	2
	520,2770	16	24967622	5	2
CLDSEACK	866,3386	12,1	5643298,5	5	1
866,3300Da	866,3392	12,1	5775723,5	5	1
	866,3382	13,7	5974518	5	1
	866,3378	13,9	574862,8	5	1
CRYPFKNCNGGK	692,8189	12,1	4174806,7	5	2
[M+2H] ²⁺ 692,8100Da	692,8198	12,2	4039648,3	5	2
	692,8186	13,8	3968904	5	2
	692,8193	14	473698,3	5	2
MTOXI	768,5636	14,2	200190480	5	5
768,5588 Da [M.5H] ⁵⁺	768,5637	14,2	221085344	5	5
	768,5686	16,5	314423584	5	5
	768,5630	16,9	16597064	5	5

Figura 33. Em azul, gráfico de barras indicando a área de cada fragmento. A área foi calculada a partir da média aritmética das quadruplicatas. Em seguida, um quadro comparativo com os fragmentos com (sequência seguido da massa teórica), massa obtida, tempo de retenção, área do pico do cromatograma, tempo de digestão, o estado de carga predominante obtidos com 5 minutos de digestão.



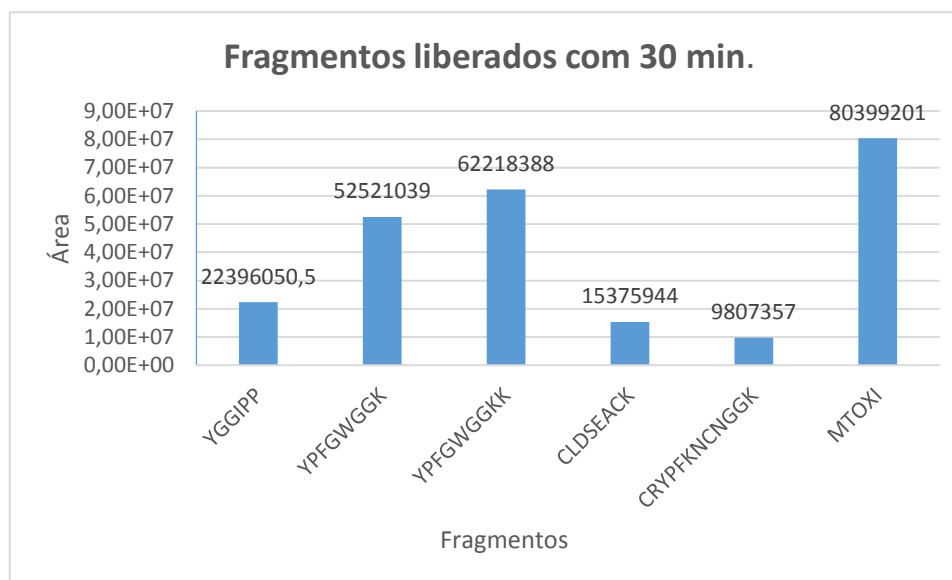
Fragmentos T10	[M+H] ⁺ m/z	Tempo retenção (min)	Area	Tempo digestão(min)	Carga
YGGIPP	603,3120	14,9	739490,3	10	1
603,3100 Da	603,3155	14,6	18676288	10	1
	603,3111	14,9	15419636	10	1
	603,3134	17,2	4488395	10	1
YPFGWGGK	911,4396	15,5	1891235,3	10	1
911,4400Da	911,4424	15,2	30235780	10	1
[M+2H] ²⁺ 456.2241Da	911,4352	17,5	26046428	10	1
	911,4227	17,9	2723888,3	10	1
YPFGWGGKK	520,2740	13,8	3037497	10	2
1039.5359Da	520,2771	13,5	43365176	10	2
[M+2H] ²⁺ 520.2716Da	520,2725	15,7	42834224	10	2
	1039,5338	16	1090688	10	1
CLDSEACK	866,3359	12,1	353552,4	10	1
866,3300Da	866,3422	12	9255198	10	1
	866,3382	13,7	9307467	10	1
	866,3372	13,9	442341,7	10	1
CRYPFKNCNGGK	692,8153	12,1	356418,6	10	2
[M+2H] ²⁺ 692,8160Da	692,8210	12,1	6090697	10	2
	692,8178	13,8	6517294,5	10	2
	692,8183	14,1	422859,1	10	2
MTOXI	768,5616	14,6	13963306	10	5
768,5588 Da [M.5H] ⁵⁺	768,5651	14,1	151254352	10	5
	768,5611	16,6	228074384	10	5
	768,5640	17	97407968	10	5

Figura 34. Em azul, gráfico de barras com a área de cada fragmento. A área foi calculada a partir da média aritmética das quadruplicatas. Em seguida, um quadro comparativo com os fragmentos (sequência seguido da massa teórica), massa obtida, tempo de retenção, área do pico do cromatograma, tempo de digestão, o estado de carga predominante obtidos com 10 minutos de digestão.



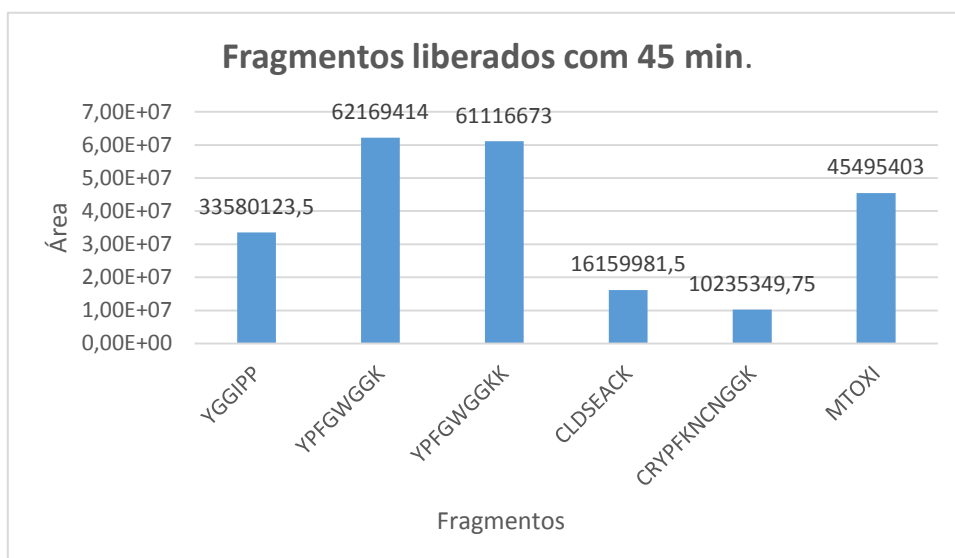
Fragmentos T15	[M+H] ⁺ m/z	Tempo retenção (min)	Area	Tempo digestão(min)	Carga
YGGIPP	603,3104	14,8	23688122	15	1
603,3100 Da	603,3154	14,5	22474132	15	1
	603,3133	17	19446466	15	1
	603,3126	17,2	6391165,5	15	1
YPFGWGGK	911,4376	15,4	40337244	15	1
911,4400Da	911,4405	15,2	38336536	15	1
[M+2H] ²⁺ 456.2241Da	911,4378	17,6	30993820	15	1
	911,4292	17,9	5207625,5	15	1
YPFGWGGKK	520,2775	13,6	67338880	15	2
1039.5359Da	520,2732	13,6	56546464	15	2
[M+2H] ²⁺ 520.2716Da	520,2782	13,4	47816920	15	2
	520,2760	15,7	46561532	15	2
CLDSEACK	866,3396	12,1	11560624	15	1
866,3300Da	866,3376	11,9	10905526	15	1
	866,3395	13,8	10062357	15	1
	866,3394	13,9	901156,9	15	1
CRYPFKNCNGGK	692,8179	12,2	8000621	15	2
[M+2H] ²⁺ 692,8160Da	692,8199	12	7453527	15	2
	692,8193	13,9	7400522	15	2
	692,8190	14	627762,8	15	2
MTOXI	768,5650	14,3	90781160	15	5
768,5588 Da [M.5H] ⁵⁺	768,5604	14,3	77246344	15	5
	768,5612	14,1	101027048	15	5
	768,5630	16,7	177245744	15	5

Figura 35. Em azul, gráfico de barras com a área de cada fragmento. A área foi calculada a partir da média aritmética das quadruplicatas. Em seguida, um quadro comparativo com os fragmentos (sequencia seguido da massa teórica), massa obtida, tempo de retenção, área do pico do cromatograma, tempo de digestão, o estado de carga predominante obtidos com 15 minutos de digestão.



Fragmentos T30	[M+H] ⁺ m/z	Tempo retenção (min)	Area	Tempo digestão(min)	Carga
YGGIPP	603,3145	14,8	28499994	30	1
603,3100 Da	603,3120	14,8	26795912	30	1
	603,3134	17	25271296	30	1
	603,3127	17,2	9017000	30	1
YPFGWGGK	911,4440	15,4	51628576	30	1
911,4400Da	911,4401	15,3	47668140	30	1
[M+2H] ²⁺ 456.2241Da	911,4466	17,1	68020104	30	1
	911,4411	17,6	42767336	30	1
YPFGWGGKK	520,2771	13,7	57964568	30	2
1039.5359Da	520,2745	13,6	57884744	30	2
[M+2H] ²⁺ 520.2716Da	520,2807	15,3	75811384	30	2
	520,2750	15,7	57212856	30	2
CLDSEACK	866,3406	12,1	13555821	30	1
866,3300Da	866,3399	12,1	14267030	30	1
	866,3480	13,5	20487858	30	1
	866,3413	13,8	13193067	30	1
CRYPFKNCNGGK	692,8203	12,2	9125527	30	2
[M+2H] ²⁺ 692,8160Da	692,8195	12,2	8898015	30	2
	692,8260	13,6	12741134	30	2
	692,8202	13,9	8464752	30	2
MTOXI	768,5642	14,4	51658396	30	5
768,5588 Da [M.5H] ⁵⁺	768,5616	14,3	48297176	30	5
	768,5692	16,3	108124664	30	5
	768,5637	16,8	113516568	30	5

Figura 36. Em azul, gráfico de barras com a área de cada fragmento. A área foi calculada a partir da média aritmética das quadruplicatas. Em seguida, um quadro comparativo com os fragmentos (sequencia seguido da massa teórica), massa obtida, tempo de retenção, área do pico do cromatograma, tempo de digestão, o estado de carga predominante obtidos com 30 minutos de digestão. 3



Fragmentos T45	[M+H] ⁺ m/z	Tempo retenção (min)	Area	Tempo digestão(min)	Carga
YGGIPP	603,3152	14,7	39493148	45	1
603,3100 Da	603,3118	14,7	21512198	45	1
	603,3180	16,5	43502496	45	1
	603,3148	17	29812652	45	1
YPGWGGK	911,4443	15,2	73879392	45	1
911,4400Da	911,4377	15,3	42177472	45	1
[M+2H] ²⁺ 456.2241Da	911,4471	17,1	79460856	45	1
	911,4429	17,6	53159936	45	1
YPGWGGKK	520,2773	13,6	68577296	45	2
1039.5359Da	520,2747	13,6	42590684	45	2
[M+2H] ²⁺ 520.2716Da	520,2804	15,3	75863832	45	2
	520,2773	15,7	57434880	45	2
CLDSEACK	866,3428	12,1	18458852	45	1
866,3300Da	866,3376	12,1	10491589	45	1
	866,3487	13,5	21097072	45	1
	866,3438	13,8	14592413	45	1
CRYPFKNCNGGK	692,8209	12,1	11350601	45	2
[M+2H] ²⁺ 692,8160Da	692,8177	12,1	7037439	45	2
	692,8262	13,6	12835420	45	2
	692,8222	13,9	9717939	45	2
MTOXI	768,5647	14,3	23938770	45	5
768,5588 Da [M.5H] ⁵⁺	768,5611	14,4	21581738	45	5
	768,5700	16,3	56729184	45	5
	768,5645	16,8	79731920	45	5

Figura 37. Em azul, gráfico de barras com a área de cada fragmento. A área foi calculada a partir da média aritmética das quadruplicatas. Em seguida, um quadro comparativo com os fragmentos (sequencia seguido da massa teórica), massa obtida, tempo de retenção, área do pico do cromatograma, tempo de digestão, o estado de carga predominante obtidos com 45 minutos de digestão.



Fragmentos T60	[M+H] ⁺ m/z	Tempo retenção (min)	Area	Tempo digestão(min)	Carga
YGGIPP	603,3146	14,7	44236528	60	1
603,3100 Da	603,3164	14,8	30439444	60	1
	603,3158	16,6	43791168	60	1
	603,3140	16,9	34468040	60	1
YPFGWGGK	911,4410	15,2	88360080	60	1
911,4400Da	911,4362	15,3	61927848	60	1
[M+2H] ²⁺ 456.2241Da	911,4458	17,2	86314384	60	1
	911,4402	17,5	66701820	60	1
YPFGWGGKK	520,2770	13,6	69817256	60	2
1039.5359Da	520,2732	13,6	54655424	60	2
[M+2H] ²⁺ 520.2716Da	520,2744	15,3	69180048	60	2
	520,2763	15,7	60532564	60	2
CLDSEACK	866,3427	12,1	19307088	60	1
866,3300Da	866,3379	12,1	14276874	60	1
	866,3456	13,5	21735274	60	1
	866,3400	13,8	17415328	60	1
CRYPFKNCNGGK	692,8204	12,2	12362122	60	2
[M+2H] ²⁺ 692,8160Da	692,8171	12,2	8986526	60	2
	692,8234	13,6	12878818	60	2
	692,8195	13,9	10632428	60	2
MTOXI	768,5634	14,3	15427032	60	5
768,5588 Da [M.5H] ⁵⁺	768,5598	14,4	14994902	60	5
	768,5620	15,5	3171217,8	60	5
	768,5607	17,5	11786267	60	5

Figura 38. Em azul, gráfico de barras com a área de cada fragmento. A área foi calculada a partir da média aritmética das quadruplicatas. Em seguida, um quadro comparativo com os fragmentos (sequencia seguido da massa teórica), massa obtida, tempo de retenção, área do pico do cromatograma, tempo de digestão, o estado de carga predominante obtidos com 60 minutos de digestão.

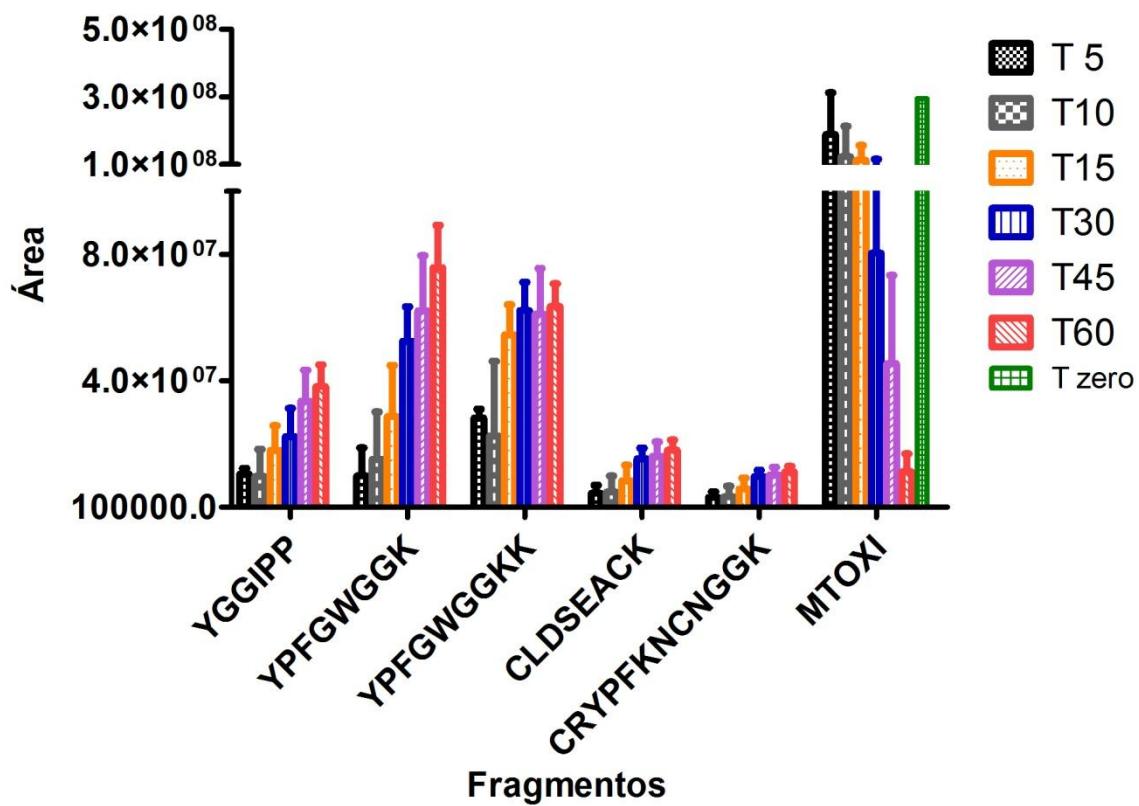


Figura 39. Gráfico de barras indicando para cada fragmento, a média com o desvio padrão. Controle negativo, Tzero. (Graphpad prism, Estado Unidos).

5. 10 Perfil comparativo de cinética entre a MTOXI e a proteína reduzida

Os dados adquiridos por meio da digestão da proteína MTOXI (reduzida e oxidada) permite uma análise comparativa de forma qualitativa em relação ao padrão da cinética enzimática. Esses dados estão demonstrados em gráficos no formato de pizza e cada parte representa a área do fragmento com seu respectivo percentual de área em relação ao todo, ver figuras 40 à 42.

A digestão da proteína reduzida (MT aberta), sem formar pares dissulfeto foi realizada como controle positivo da digestão, para validar o experimento. O controle positivo foi analisado nos mesmos tempos da MTOXI oxidada, sob as mesmas condições experimentais. A diferença é que o controle foi realizado uma única vez enquanto a MTOXI (reduzida) em quadruplicatas, sua área indica a média das quadruplicatas.

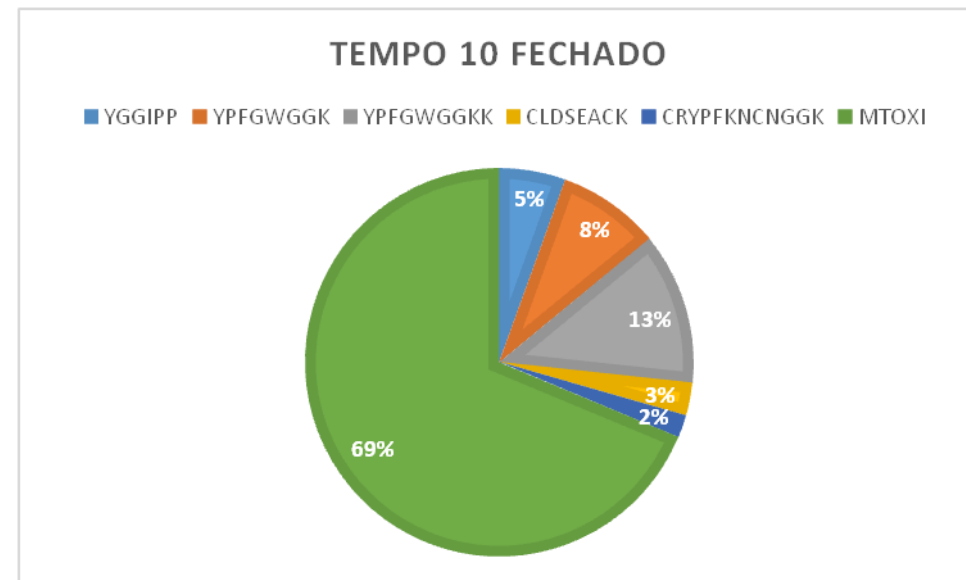
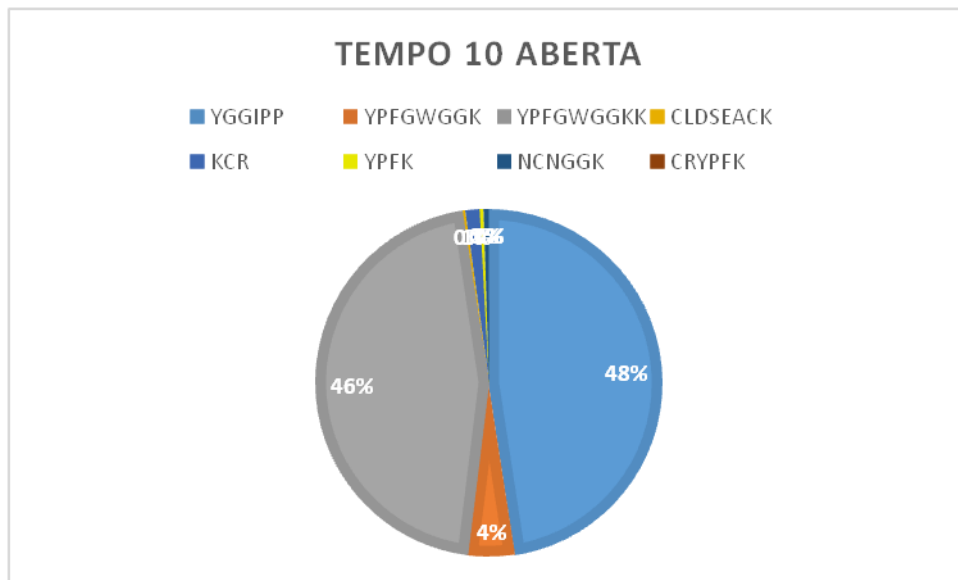
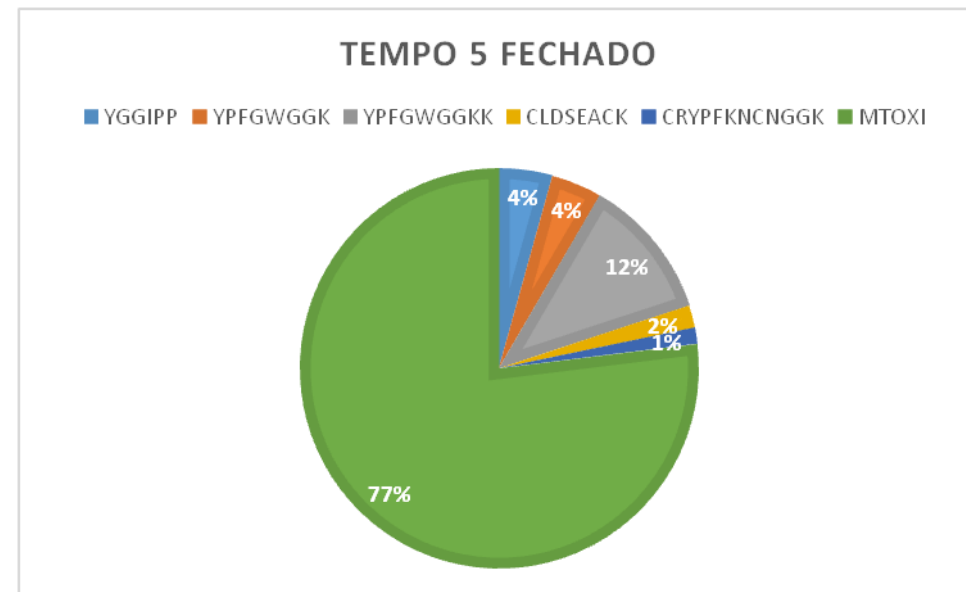
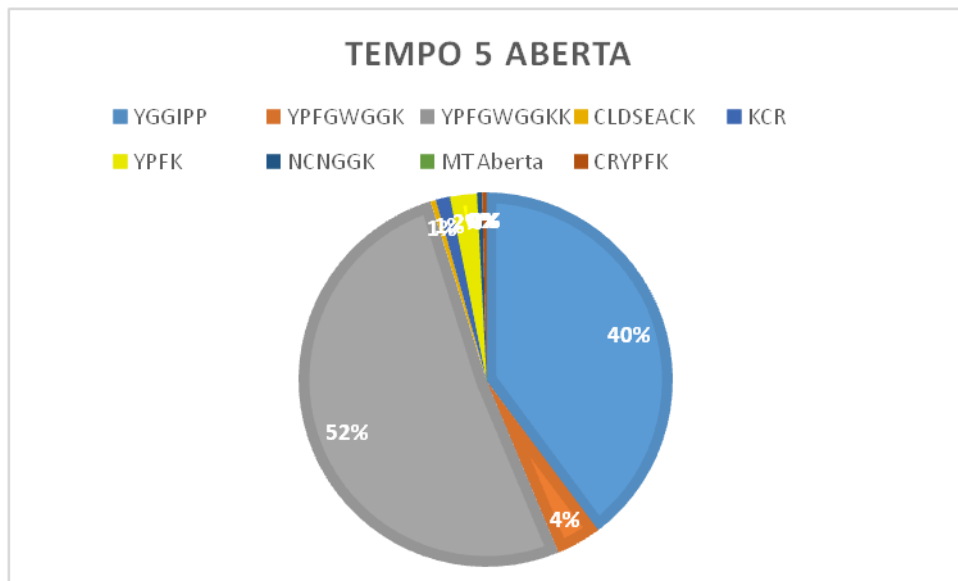


Figura 40. Gráfico de Pizza representando a cinética de proteólise nos tempos 5 e 10 minutos para a proteína aberta e fechada nos respectivos tempos. A área está representada para cada fragmento (Excel Microsoft Office, Estados Unidos).

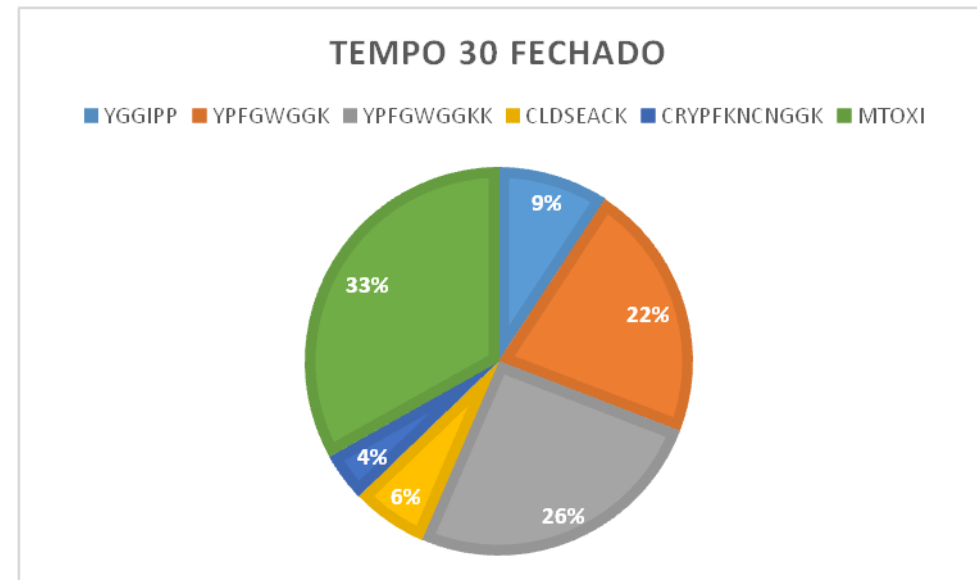
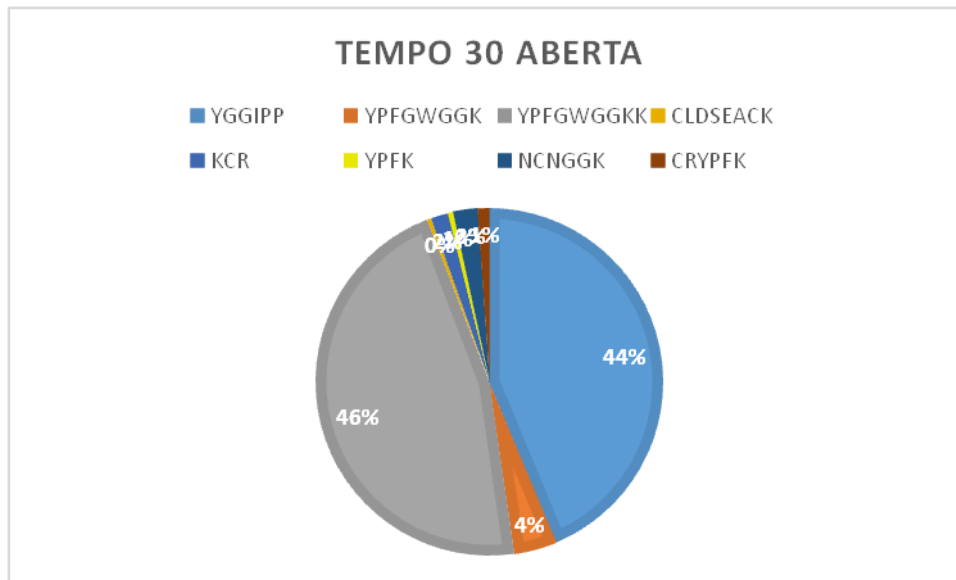
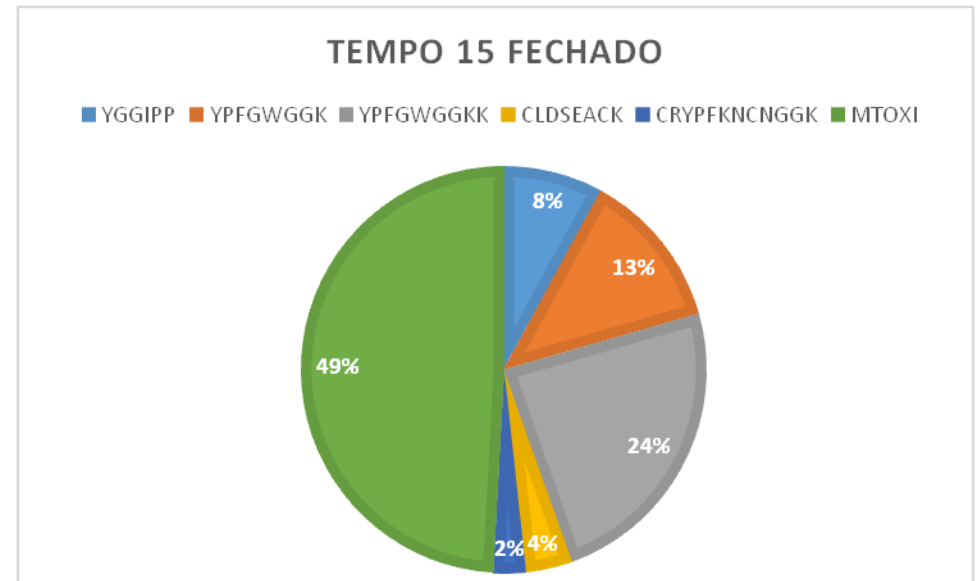
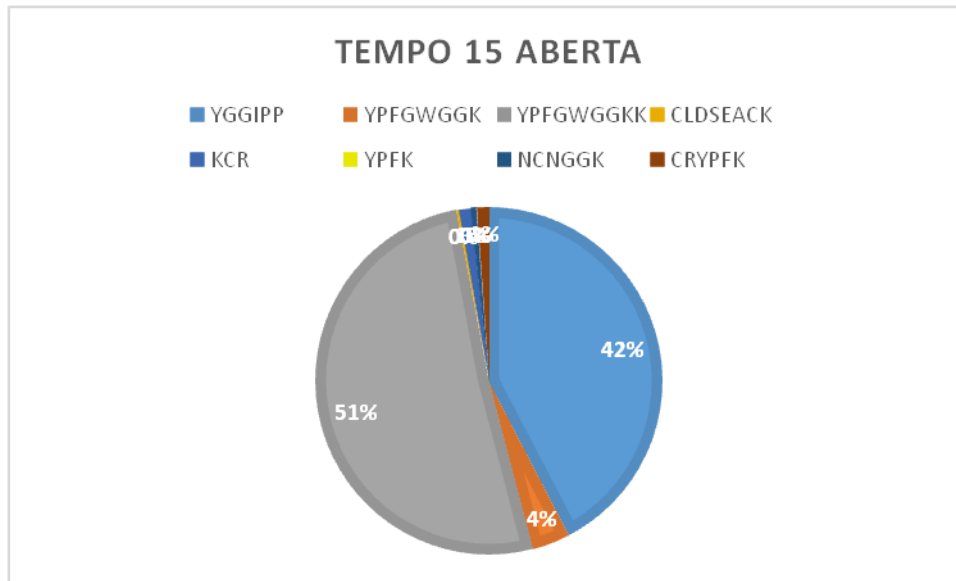


Figura 41. Gráfico de Pizza representando a cinética de proteólise nos tempos 15 e 30 minutos para a proteína aberta e fechada nos respectivos tempos. A área está representada para cada fragmento (Excel Microsoft Office, Estados Unidos).

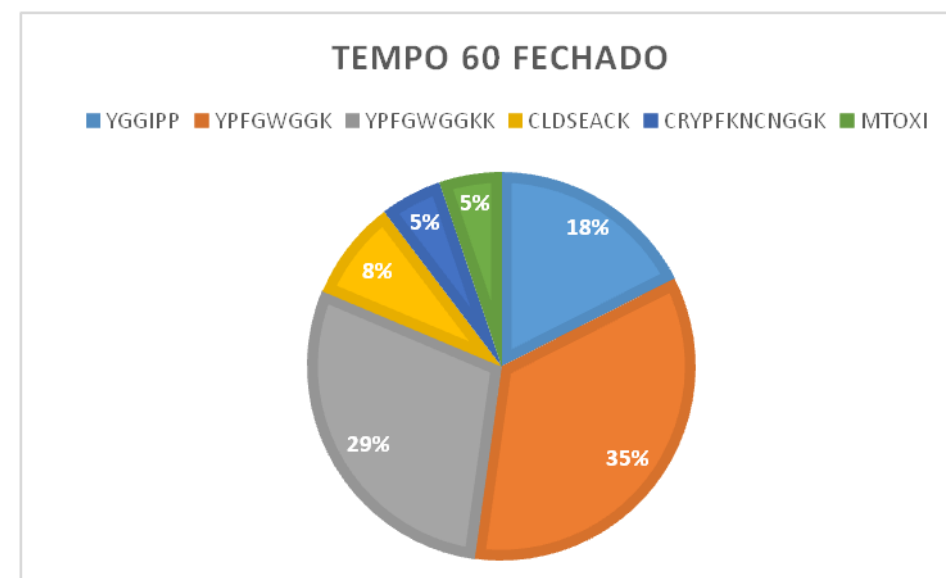
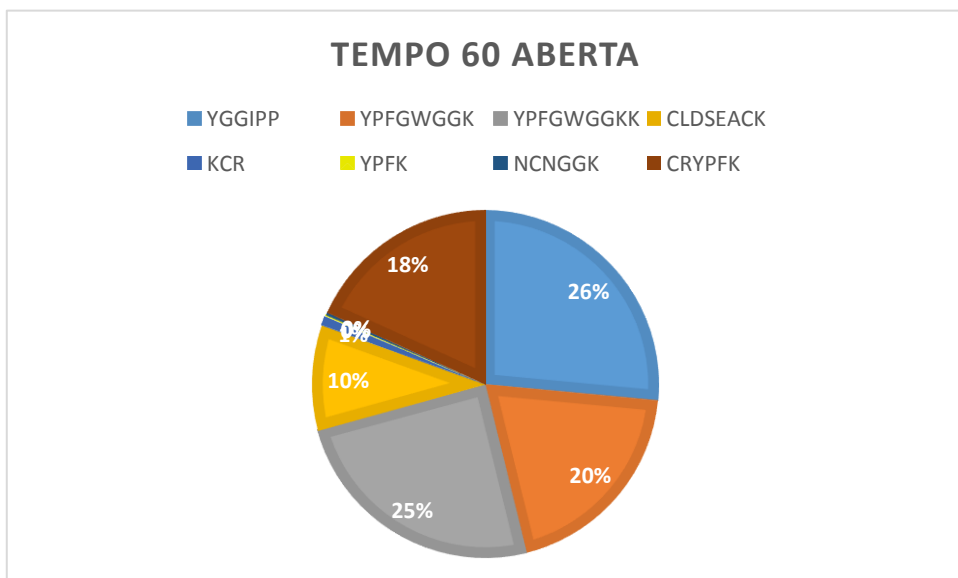
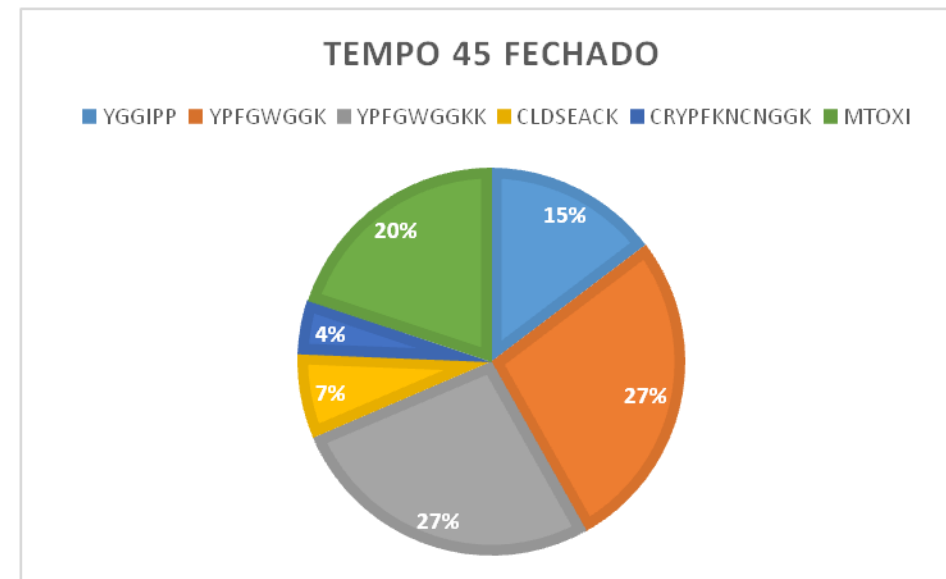
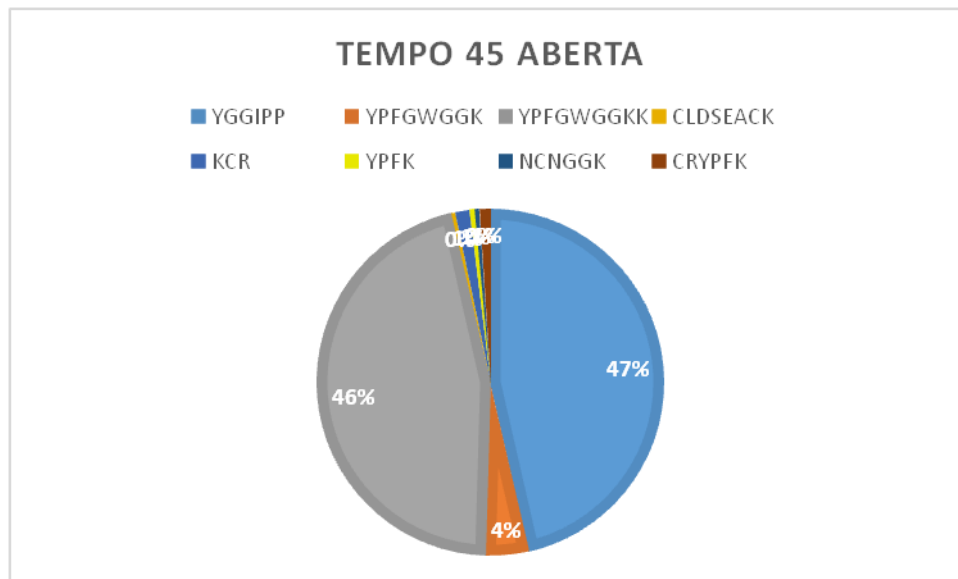


Figura 42. Gráfico de Pizza representando a cinética de proteólise nos tempos 45 e 60 minutos para a proteína aberta e fechada nos respectivos tempos. A área está representada para cada fragmento (Excel Microsoft Office, Estados Unidos).

6.0 DISCUSSÃO

Os peptídeos encriptados em proteínas precursoras contribuíram para o desenho dos dois peptídeos e da pequena proteína (MT OXI) objeto desse estudo. Todas essas moléculas desenhadas possuem sequências inéditas. Os dois peptídeos estão protegidos com depósito nacional no Instituto Nacional de Propriedade Industrial, INPI (ver anexo).

Ambos os peptídeos (PSLEM11011e PSLEM 11012) foram desenhados para apresentar atividade opioide e hipotensora, até o momento não foi possível avaliar atividade hipotensora. Investigou-se a participação dos receptores opioides utilizando dois modelos clássicos para o estudo da antinocicepção, a partir de um estímulo de natureza térmica, que foi no *Hot Plate* (placa quente) e *Tail Flick* (teste de retirada da cauda). Dentre os grupos avaliados (PSLEM 11011 e 11012) foi utilizado como controle negativo solução salina e a naloxona (que é antagonista dos receptores opioides). Os controles positivos foram a morfina (fármaco disponível comercialmente para o controle da dor crônica) e a Leu-encefalina (controle peptídico). Os peptídeos foram administrados por via sistêmica (i.p.) em dose equimolar a morfina.

Os resultados no *Tail Flick* para o PSLEM 11011, indica que o peptídeo tem um perfil de atividade semelhante a leu encefalina e mais duradoura do que a morfina, apresentando altos índices da antinocicepção ao final das três horas de realização do ensaio. Já a morfina apresentou altos índices de antinocicepção no início do teste e foi diminuindo ao longo do ensaio. Em relação ao PSLEM 11012, este também apresentou um perfil de atividade, com índices de antinocicepção, semelhante a Leu-encefalina a partir dos 60 minutos. Os grupos do controle negativo permaneceram sem atividade durante todo o experimento.

Os resultados no *Hot Plate* para o PSLEM 11011, mostra que a atividade do peptídeo oscilou ao longo do experimento, mas que a partir dos 60 min não existe diferenças estatisticamente significativa dele com a Leu- encefalina. Também foi analisado outro grupo experimental que foi a administração concomitante da naloxona com o peptídeo. Na presença da naloxona não houve atividade do peptídeo, a naloxona foi aplicada no tempo zero, na primeira hora e na segunda hora a administração foi interrompida e pode-se observar a atividade do peptídeo retornando aos mesmos índices de antinocicepção, de quando administrado sozinho. Devido a esse resultado, resolveu-se avaliar a administração concomitante da leu encefalina com a naloxona e pode-se verificar que após a interrupção da administração da naloxona a atividade da leu encefalina também retornou aos mesmos

índices. A análise da administração concomitante com a naloxona precisa ser melhor investigada, mas pode ser que o peptídeo não apresente uma rápida degradação enzimática. O perfil de atividade do PSLEM 11012 no *Hot Plate* foi semelhante ao do PSLEM 11011, a única diferença é que desde do início do teste o peptídeo (11012) apresentou atividade estatisticamente significativa. Também durante a administração conjunta do PSLEM 11012 com a Naloxona não houve atividade, mas após a interrupção da administração da Naloxona, a atividade dos peptídeos retornou aos mesmos índices de antinocicepção de quando administrado sozinho.

Após a realização desta prova de conceito, pode-se sugerir que os peptídeos possuem como alvo molecular, os receptores opioides, pois durante a administração concomitante com a naloxona não houve atividade registrada, em nenhum modelo de teste (*Tail Flick* e *Hot Plate*). Também foi possível observar que a atividade do peptídeo é retomada, após a interrupção da administração da Naloxona, o que sugere que os peptídeos não possuem uma rápida degradação enzimática. A rápida degradação enzimática influencia na meia vida dos fármacos e é umas das propriedades que pode desfavorecer o emprego de peptídeos como candidatos a novos fármacos (Di, 2015). Além disso, ao longo do ensaio, pode-se verificar que a morfina teve uma atividade menos duradoura quando comparada aos peptídeos.

Os resultados obtidos sugerem que os peptídeos podem ter atravessado a barreira hematoencefálica, que é uma barreira composta por células endoteliais, que atua protegendo o sistema nervoso central de eventuais substâncias tóxicas presentes na circulação sistêmica. A propriedade de atravessar a barreira hematoencefálica, também é uma das propriedades que dificultam o emprego de peptídeos como candidatos a novos fármacos (Olson *et al.*, 2017). Existem vários sistemas de transporte que permitem a passagem de peptídeos na barreira hematoencefálica. Um deles é o transporte ativo de efluxo (do cérebro para periferia) da beta endorfina via glicoproteína P. Segundo King e colaboradores, uma diminuição da expressão do gene que codifica a proteína glicoproteína P diminuía o efluxo da beta endorfina e outros peptídeos opioides (King *et al.*, 2001). Já a encefalina peptídeo endógeno com atividade opioide, de acordo com Polt e colaboradores, sugerem que ela atravessa a barreira hematoencefálica por meio do transportador de glicose, GLUT -1 (Polt *et al.*, 1994). Em relação sobre como os peptídeos PSLEM 11011 e 11012, atravessaram a barreira hematoencefálica, não é possível afirmar se todo o peptídeo de forma íntegra atravessa ou apenas uma pequena porção produto de clivagem enzimática.

A partir dos resultados alcançados sobre a caracterização da atividade *in vivo* de peptídeos bioativos e observando que os peptídeos 11011 e 11012 apresentaram propriedades que são essenciais para o emprego de peptídeos como candidatos a novos fármacos, foi proposto o desenho de uma nova estratégia utilizando sequência proteica como um possível carreador para otimizar o processo de entrega do peptídeo no alvo desejado e aprimorar o perfil de atividade.

A nova abordagem consiste em utilizar sequência proteica como carreador para a liberação controlada de peptídeos, parte do princípio em que peptídeos bioativos encontram-se encriptados em proteínas maiores em diversos genomas (Brand *et al.*, 2012). Assim, diversos organismos (animais e vegetais) podem conter um repertório genético exploratório para o desenvolvimento de novos peptídeos e proteínas de interesse biotecnológico, tanto na área farmacológica e nutracêutica, como no desenvolvimento de plantas transgênicas (Ma *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2013; Sieber, 2011).

Estes peptídeos encriptados podem ser liberados a partir da digestão enzimática que ocorre no trato gastro intestinal ou por processamento de alimentos. Por isso ao desenhar a proteína inédita objeto do nosso estudo, a MTOXI, foi proposto a ideia de inserir peptídeos os quais já caracterizamos a atividade, entre sítios de clivagem para a enzima tripsina, em uma proteína molde rica em resíduos de cisteínas (quatro) que podem formar duas pontes dissulfeto.

Os peptídeos opioides os quais caracterizamos a atividade *in vivo*, possuem tripeptídeos semelhantes ao da endomorfina que é um peptídeo opioide endógeno que interage apenas com o receptor opioide do tipo mu. Por causa dessa seletividade muitos agonistas para controle da dor vêm sendo elaborado com base nas endomorfina (Lazarus e Okada, 2012). Também podemos encontrar sequências semelhantes aos da endomorfina em proteínas de soja, a *soymorhin* que segundo Yamada e colaboradores também promove atividade antinociceptiva (Yamada *et al.*, 2012). Outra proteína, a *rubiscolin*, derivada da rubisco encontrada no espinafre, foi analisada em modelos *in vivo* para atividade ansiolítica e antinociceptiva (Hajime Hirata, 2007). Em diferentes espécies é possível encontrar sequências de peptídeos que estão encriptados em proteínas que exercem outras funções no organismo, mas que quando isolados possuem amplo espectro de aplicações biotecnológicas.

A proteína molde foi escolhida devido ao potencial de otimização da atividade que as pontes dissulfeto podem desempenhar, assim focamos em superfamílias, ricas em pontes dissulfeto, como as defensinas. Essas superfamílias despertam interesse devido a sua

expressão está presente em diversos organismos, incluindo plantas e animais. Além disso estudos recentes sugerem que possam existir um vínculo evolutivo entre as defensinas e neurotoxinas de insetos devido a semelhanças estruturais (Zhu *et al.*, 2014).

Após o desenho, iniciou-se a síntese da proteína, denominada de MTOXI, seguida da reação de oxidação com peróxido de hidrogênio, para formação dos pares dissulfeto. Foi possível constatar a formação dos pares utilizando diferentes técnicas de espectrometria de massa tanto por meio da ionização do tipo MALDI como por *eletrospray* (ESI). A massa obtida experimentalmente apresentava acurácia quando comparada com a massa teórica.

A proteína MTOXI foi purificada utilizando a técnica de cromatografia líquida em alta eficiência (CLAE). Com cerca de 35% da solução B, foi possível coletar em fração única após aprimorar o método com gradiente de acetonitrila. Após a purificação, a confirmação do grau de pureza foi realizada por *elestrospray* (ESI).

Em relação a estrutura secundária por dicroísmo circular percebe-se uma tendência de conformação predominante randômica tanto na estrutura reduzida quanto oxidada com a formação das pontes.

O experimento de digestão com a enzima tripsina foi realizado para avaliar o desenvolvimento de uma possível estratégia para o processo de entrega de peptídeos bioativos, a partir da utilização de proteínas como carreadores, vale ressaltar que essas proteínas possuem características estruturais que estão presentes e conservados em diferentes espécies. A determinação da combinação de formação dos pares dissulfeto foi identificada simultaneamente na mesma análise.

Diversos trabalhos sugerem utilizar protocolos que envolvem as reações de redução e alquilação de proteínas seguida de digestão enzimática para determinar a combinação dos pares dissulfeto. No nosso estudo foi viável a detecção dos fragmentos utilizando as técnicas analíticas de MALDI TOF/TOF, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, LC-MS, sem a necessidade de reduzir e alquilar o que se mostrou um método mais rápido e simples do que os protocolos tradicionais (Mormann *et al.*, 2008; Janecki e Nemeth, 2011; Lutz *et al.*, 2012).

A aplicação de técnicas analíticas, incluindo a cromatografia líquida e espectrometria de massa, são as ferramentas mais promissoras para a caracterização de modificações pós traducionais, determinação da estrutura e agregados proteicos em bio farmacêuticos. A avaliação dessas propriedades são imprescindíveis para a aprovação nas agências regulatórias

de medicamentos tanto americana (FDA) quanto europeia (EMA) (Berkowitz *et al.*, 2012). Essas diretrizes ressaltam a importância em estabelecer novos métodos de validação para a caracterização estrutural que sejam mais exatos, precisos e também menos laborioso.

A estratégia para o processo de entrega de peptídeos bioativos, foi avaliada com a digestão triptica seguida do experimento de LC-MS que possibilitou a determinação da área de cada fragmento liberado ao longo do tempo. Para a MTOXI (oxidada), no tempo inicial com cinco minutos de digestão pode-se observar que a área prevalente é da proteína MTOXI. Ao longo do tempo a área dos fragmentos vão aumentando e a da MTOXI diminuindo. Os fragmentos que contêm peptídeos bioativos são os fragmentos que mais apresentaram expansão no valor da área em todos os tempos quando comparado com os outros fragmentos (CLDSEACK e CRYPFKNCNGGK). Esses outros fragmentos contém a ligação dissulfeto em sua estrutura, por isso pode ser atribuído a ponte a sua baixa taxa de liberação, pois ela pode provocar um impedimento estérico o qual dificulta o acesso da enzima aos sítios de clivagem (K ou R) (Getz *et al.*, 2011; Liu, 2012).

O sítio ativo das serino proteases (tripsina, quimotripsina, elastase, dentre outras) é formado pelos resíduos de histidina, ácido aspártico e serina. Os três resíduos atuam de forma conjunta para facilitar o ataque nucleofílico da hidroxila (OH) da serina no carbono da carbonila da ligação peptídica a ser hidrolisada. No caso da tripsina, ela catalisa substrato com resíduos carregado positivamente (Lisina, K e Arginina, R) quando esses não estão seguidos de prolina. O ácido aspártico, é o resíduo responsável pela especificidade da tripsina, por ser carregado negativamente, promove a interação do tipo ion-ion com a K ou R porque são carregados positivamente. A histidina, fornece o ancoramento necessário para efetivação do ataque nucleofílico (Paul Carter, 1987; Lizbeth Hedstrom, 1992; Baird *et al.*, 2006; Dmitry O. Zharkov, 1997).

No controle negativo, não houve a digestão enzimática, o que permite a validação do ensaio executado. Para o controle negativo a MTOXI foi incubada na presença do TFA (ácido trifluoroacético) a 3% o ácido promove alteração no pH do meio, alterando o pH ótimo da enzima, assim não é possível ocorrer atividade enzimática.

Foi priorizado a análise por LC-MS, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com ionização por ESI, em relação a ionização do tipo MALDI, pois permite a quantificação da área de cada fragmento liberado ao longo do tempo o que permitiu validar nossa estratégia.

O perfil de cinética da proteína reduzida e oxidada demonstram a cinética diferencial de proteólise o que provavelmente reflete a capacidade de organização estrutural entre a proteína sem pontes dissulfeto (reduzida, aberta) comparada com a proteína com pontes dissulfeto (oxidada, fechada).

De forma qualitativa pode-se observar que a proteína aberta a partir dos cinco minutos até os 45 minutos, possui um predomínio de áreas dos fragmentos YPFGWGGKK e YGGIPP que são respectivamente os fragmentos localizados no N e C terminal da proteína. Aos 60 minutos os fragmentos que apresentam aumento na área são o YPFGWGGK, o CLDSEACK e CRYPFK ambos são os fragmentos subsequentes no N e C terminal, ou seja a proteína tem um perfil de clivagem que inicia na porção N e C terminal seguindo em direção ao meio da cadeia (de fora para dentro).

Em relação a cinética da proteína MTOXI oxidada, no tempo 5, apresentou área percentual insignificativa quando comparada ao todo (restante dos fragmentos), por isso não é possível determinar seu percentual. Provavelmente isso ocorre porque a proteína encontra-se na sua forma reduzida, o que facilita o acesso da enzima nos sítios de clivagem do substrato. Em sua forma reduzida, alguns fragmentos com massa inferior a 600Da foram encontrados: KCR, YPFK e NCNGGK, na oxidada eles formam um único fragmento que é o CRYPFKNCNGGK devido a presença da ponte dissulfeto entre esses resíduos de cisteína.

O outro fragmento que também possui ponte dissulfeto é o CLDSEACK na proteína oxidada apresenta massa de $[M+H]^+ = 866.3\text{Da}$ e na reduzida massa de $[M+H]^+ = 868.35\text{ Da}$. Na proteína oxidada pode-se observar a proteólise mais lenta, com liberação ao longo do tempo dos fragmentos que possuem peptídeos bioativos.

Com esses dados, sugere-se que a MTOXI (oxidada) pode ser utilizada como carreador para obter fragmentos peptídicos que sejam liberados de forma mais lenta, quando comparada com a proteólise da proteína reduzida. A capacidade de liberação desses peptídeos bioativos, de forma gradual ao longo do tempo, poderá ser uma ferramenta promissora para administrar peptídeos terapêuticos por via oral, otimizando assim, o perfil de atividade.

**CAPITULO 2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS
ENCRIPADOS NO GENOMA DE *Arabidopsis thaliana***

1.0 INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira apresenta destaque internacional devido aos altos índices de exportação de diversas culturas. À medida que a população aumenta, maiores são os desafios em expandir a produção agrícola para a produção de alimentos. Essa expansão demanda, principalmente, um maior controle da produção em relação a mudanças climáticas e uma maior resistência contra doenças nas plantas (Boyd *et al.*, 2013; Graeub *et al.*, 2016).

Os fitopatógenos, que infectam as plantas, desenvolvem mecanismos de resistência com o intuito de se perpetuar no hospedeiro (planta). Eles conseguem penetrar nas plantas por meio das raízes ou folhas, como também através de lesões expostas. O agente invasor consegue se manter e proliferar-se na planta utilizando os nutrientes dela como forma de nutrição (Zhang *et al.*, 2013).

O tratamento convencional para o combate de doenças em plantas ocorre principalmente por meio de defensivos agrícolas (agrotóxico), os quais podem apresentar algumas desvantagens para o meio ambiente, assim é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias que possam auxiliar o combate às pragas agrícolas (Aktar *et al.*, 2009).

A elucidação dos mecanismos moleculares é de fundamental importância no desenvolvimento de novas estratégias biotecnológicas que possam diminuir ou evitar o processo de infecção do fitopatógeno. No início dos anos 2000 foi realizado o primeiro sequenciamento do genoma do fitopatógeno de planta *Xylella fastidiosa*, que ataca laranjas. O sequenciamento genômico foi um avanço essencial para compreender a interação entre a planta e o micro-organismo. A partir daí muitas outras ferramentas moleculares começaram a emergir como o desenvolvimento de plantas transgênicas, silenciamento gênico por meio de RNA interferente, intragenia e mais recentemente, a técnica de CRISPR/Cas (Simpson *et al.*, 2000; Abdallah *et al.*, 2015; Schiml e Puchta, 2016).

O plantio de culturas transgênicas, desde que foi desenvolvido, expandiu-se rapidamente e, em 2013 possuía uma área de cultivo em torno de 160 milhões de hectares distribuídos em 29 países. Um dos maiores desafios no cultivo de transgênicos é superar as dificuldades de regulamentação do setor e buscar uma maior aceitação pública (Holme *et al.*, 2013; Lucht, 2015).

Uma alternativa à produção de plantas transgênicas, pode ser a intragenia. Diversos estudos mostram que culturas intragênicas apresentam uma maior aceitação pública do que as transgênicas. Atualmente já existem algumas culturas que estão em desenvolvimento por meio do processo de intragenia, como a alfafa, maçã, batata e milho (Hartung e Schiemann,

2014; Almeraya e Sánchez-De-Jiménez, 2016). A intragenia é o processo de transformação de plantas, no qual o gene a ser inserido e todos os outros elementos do cassete de expressão devem ser provenientes do repertório genético da própria planta. Já as plantas transgênicas utilizam material genético DNA exógeno que será inserido e expresso de forma estável no seu genoma (Kamthan *et al.*, 2016).

Os peptídeos antimicrobianos fazem parte do repertório imunológico dos seres vivos e possuem propriedades de defesa contra os micro-organismos, com isso muitos trabalhos foram desenvolvidos tendo como foco a expressão de peptídeos antimicrobianos de outras espécies em plantas, e algumas vezes esses genes exógenos podem ser tóxicos para a planta (Osusky *et al.*, 2000; Ponti *et al.*, 2003). Assim, uma alternativa pode ser, a expressão de peptídeos antimicrobianos encriptados no próprio genoma da planta, que possam ser reinsertos nela mesma.

2.0 JUSTIFICATIVA

A mesma abordagem utilizada no capítulo I, que utiliza como fonte exploratória peptídeos encriptados em proteínas para o desenho de novas moléculas bioativas, também foi empregada no estudo sobre a expressão de peptídeos antimicrobianos encriptados no genoma de *Arabidopsis thaliana*.

Recentemente, Brand e colaboradores (2012) desenvolveram uma estratégia para a prospecção de peptídeos antimicrobianos que estão encriptados em proteínas maiores presente no genoma da soja (*Glycine max*). Essa estratégia foi elaborada a partir da busca por peptídeos com base em características físico-químicas para peptídeos antimicrobianos. A aplicação dessa análise *in silico* pode representar uma alternativa à produção de plantas transgênicas, uma vez que a informação contida no repertório genético da própria planta poderá ser reinserida nela por meio da expressão de genes intragênicos e promover a proteção contra micro-organismos patogênicos (Brand *et al.*, 2012).

Os peptídeos que foram selecionados para serem expressos foram previamente selecionados e avaliados por outro membro integrante do grupo do Laboratório de Espectrometria de Massa, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, o Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada.

O processo de identificação e seleção de peptídeos encriptados presentes de *A. thaliana* foram realizados com o auxílio do programa kamal v1.0 que é um programa desenvolvido pelo grupo do Laboratório de Espectrometria de Massa, LEM (Brand *et al.*, 2012). Esse programa consegue filtrar sequências (depositadas em banco de dados) que possuem características de peptídeos antimicrobianos, de acordo com às propriedades físico química como: hidrofobicidade, massa molecular, carga líquida, ponto isoeletrico dentre outros. Os peptídeos identificados por meio dessa análise *in silico*, foram sintetizados, purificados, caracterizados por espectrometria de massa e avaliados contra diversos micro-organismos com o objetivo de analisar a susceptibilidade dos micro-organismos aos peptídeos intragênicos de *A. thaliana* (determinação da concentração inibitória mínima) (Ramada, 2016).

Apesar de todas essas análises *in silico* e determinação da inibição do crescimento de micro-organismos realizadas anteriormente, existe a necessidade de determinar se a estratégia de reinserção (dos peptídeos encriptados selecionados) no genoma da própria planta poderá ser eficaz contra fitopatógenos. Assim, foi proposto a transformação de *A. thaliana* com os peptídeos encriptados previamente selecionados.

O presente estudo foi iniciado (e está em andamento) em colaboração com o grupo liderado pelo Prof. Dr. Bruno Cammue na Universidade Católica de Leuven (*Centre of Microbial and Plant Genetics*), que possui uma vasta competência no estudo de interações planta-praga e sistemas de expressão em *A. thaliana*.

3.0 OBJETIVO

O objetivo dessa pesquisa é explorar as potencialidades inerentes à própria planta para a identificação de peptídeos antimicrobianos que possam contribuir com a diminuição da susceptibilidade da planta contra micro-organismos patogênicos. A estratégia empregada consiste em utilizar peptídeos com características de antimicrobianos que estão encriptados no genoma de *A. thaliana* e reinseri-los na planta para proporcionar uma melhora na defesa da planta contra patógenos.

3.1 Objetivos específicos

- Expressar as sequências de peptídeos antimicrobianos em *Arabidopsis thaliana*.
- Avaliar a susceptibilidade da planta contra o fungo *Botrytis cinerea*.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das sequências dos peptídeos

As sequências peptídicas abordadas ao longo desse trabalho foram previamente selecionadas com base em ensaios de atividade antimicrobiana e estão descritos na tese do Dr. Marcelo Henrique Soller Ramada (Ramada, 2016). No total foram selecionadas quatro sequências de peptídeos para construção de seis vetores de expressão. Plantas de *A. thaliana* foram transformadas por meio da técnica de submersão do botão floral em solução contendo *Agrobacterium tumefaciens*. As sequências foram denominadas de ATS1, ATS2, ATS3, ATS4, AT1, AT4. A letra S significa que o peptídeo contém uma sequência sinal de direcionamento para a região do apoplasto. Os outros serão endereçados para o citoplasma. Na figura a seguir estão descritas as sequências nucleotídicas dos peptídeos antimicrobianos, acrescentados da sequência sinal (ATGGCAAACAAGCTTTTCTTGGTGTGCGCTACCTTCGCTCTTTGCTTCCTTTTGACTAACGCT), códon de iniciação e de parada. Além disso, todas as sequências foram flanqueadas por sítios de recombinação AttB. As sequências foram sintetizadas pela *Integrated Dna Technologies*, IDT, (Bélgica).

Tabela 2- Sequências nucleotídicas dos peptídeos antimicrobianos.

AT1S ATGGCAAACAAGCTTTTCTTGGTGTGCGCTACCTTCGCTCTTTGCTTCCTTTTGACT AACGCTGGTTCATTACATGGTTTCATGTACAAGTACCTTAAAAACATGGTTTTGAC TCTCTTTTGA
AT2S ATGGCAAACAAGCTTTTCTTGGTGTGCGCTACCTTCGCTCTTTGCTTCCTTTTGACT AACGCTAAGGTTCTTTCTAAGGTTCACTCTTCTCAAGGCTGTTCTTGCTCTTTGA
AT3S ATGGCAAACAAGCTTTTCTTGGTGTGCGCTACCTTCGCTCTTTGCTTCCTTTTGACT AACGCTGGTGCCAAACTCGCAAAGAAGCAAGTCAGAGCATTGGGCAAGTTCTTCT CATTCTGA
AT4S ATGGCAAACAAGCTTTTCTTGGTGTGCGCTACCTTCGCTCTTTGCTTCCTTTTGACT AACGCTGGTCTCTACAACCTTCATCAAAGTCTTAGGCCGCACTGTCTTCGGTCTATA CAAGCAATTCTGA
AT1 ATGGGTTTCATTACATGGTTTCATGTACAAGTACCTTAAAAACATGGTTTTTGACTCT CTTTTGA
AT4 ATGGGTCTCTACAACCTTCATCAAAGTCTTAGGCCGCACTGTCTTCGGTCTATACAA GCAATTCTGA

4.2 Construção dos vetores de expressão

A sequência nucleotídica de interesse foi recombinada com um vetor denominado pDONR, Gateway® pDONR™ 221 (ThermoFisher Scientific, EUA) utilizando o kit Gateway® BP Clonase™ II enzyme mix (ThermoFisher Scientific, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A transformação de *E. coli* foi realizada por meio de eletroporação com o pDONR+DNA. Após a transformação, a *E. coli* foi cultivada em placas de Petri com meio LB ágar contendo o antibiótico canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e permaneceu incubada à 37°C durante 16 horas. Posteriormente, oito colônias de cada transformação foram selecionadas aleatoriamente e estriadas em uma nova placa contendo canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). As bactérias permaneceram incubadas por 8h à 37°C . Decorrido esse tempo, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmar se as colônias selecionadas continham o gene de interesse. De forma resumida, isolou-se uma pequena quantidade de células onde foram acrescentados $40 \mu\text{L}$ de água ultrapura autoclavada, seguida de aquecimento à 95°C por 10 minutos. A reação ocorreu utilizando os *primers* M13 universais, PFIN348 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') e PFIN349 (3'-CAGGAAACAGCTATGACC-5') para um volume final de reação de $20 \mu\text{L}$ de acordo com o seguinte protocolo: (i) 5 minutos à 95°C ; (ii) 32 ciclos de a) 95°C por 15 segundos; b) 48°C por 30 segundos; c) 72°C por 30 segundos; (iii) 72°C por 10 minutos; (iv) 4°C indefinidamente. Após a PCR, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) contendo brometo de etídio para analisar o produto da amplificação. Após visualização com luz ultravioleta e tendo como referência o marcador de peso molecular de 1kb, as colônias transformadas foram selecionadas (2 para cada gene) e incubadas durante 16 horas em meio LB líquido a 37°C com canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) para obtenção de massa celular. Em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial por meio de miniprep, utilizando o kit QIAprep® Spin Miniprep kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os vetores isolados foram então utilizados em uma segunda reação de recombinação para transferência do inserto para o vetor de destino (pB2GW7).

4.3 Recombinação vetor de destino (pB2GW7)

Os vetores extraídos foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop™ (ThermoFisher Technologies) e recombinados com o vetor de expressão pB2GW7 (Karimi *et al.*, 2002) utilizando o kit Gateway® LR Clonase™ II enzyme mix (ThermoFisher Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. Após recombinação, células de *E. coli* foram

transformadas com os clones de entrada, em seguida foram cultivadas em meio LB ágar contendo $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ do antibiótico espectinomicina e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina e incubadas durante a noite à 37°C . Oito colônias de cada transformação foram selecionadas aleatoriamente, estriadas em placas de Petri e incubadas por 8 h à 37°C . Para confirmar a presença da sequência de interesse foi realizada PCR, com os seguintes *primers*: PFIN187 (Promotor 35S) (5'-CCACTATCCTTCGCAAGACCC-3') e PFIN188 (Terminador 35S) (3'-TACGATCTCAGGCGTTTTAGTGG-5'), em um volume final de reação de $20 \mu\text{L}$, de acordo com o seguinte protocolo: (i) 5 minutos à 95°C ; (ii) 32 ciclos de a) 95°C por 15 segundos; b) 57°C por 30 segundos; c) 72°C por 30 segundos; (iii) 72°C por 10 minutos; (iv) 4°C indefinidamente. Os procedimentos de análise da PCR por meio de eletroforese em gel de agarose foi realizado de forma semelhante aos do tópico anterior. As colônias transformadas foram selecionadas (2 para cada gene) e incubadas durante 16 horas em LB líquido contendo $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ do antibiótico espectinomicina e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina à 37°C . Para a extração dos vetores transformados, o kit QIAprep® Spin Miniprep kit (Qiagen) foi utilizado seguindo as instruções do fabricante. Os vetores purificados, chamados de clones de expressão, foram então quantificados utilizando um espectrôfotômetro NanoDrop™ (Thermo-Fisher Technologies). Os clones de expressão foram sequenciados pela empresa GATC Biotech (Bélgica).

4.4 Preparação de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* e Transformação com o vetor de expressão

Uma colônia fresca de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 pMP90 foi inoculada em 2 mL de meio de cultura YEP (yeast peptone) contendo $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de gentamicina e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de rifampicina por 24 horas à 28°C . As colônias resultantes foram separadas do meio por centrifugação à $16100 \times g$, por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram lavadas quatro vezes com água ultrapura autoclavada gelada com os seguintes volumes 2 mL, 1 mL, 0,5 mL e 0,2 mL. Entre cada etapa de lavagem, as células foram ressuspensas sob agitação com auxílio de um vortex e posteriormente centrifugadas à $16.100 \times g$ por 2 minutos, seguidos de descarte do sobrenadante. Na última lavagem, as células foram ressuspensas e $40 \mu\text{L}$ foram transferidos para novos tubos, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e preservados em freezer -80°C . Para transformação, dezesseis tubos contendo células de *A. tumefaciens* foram incubadas por 30 minutos em gelo, seguido da adição de $3 \mu\text{L}$ da solução de cada um dos clones de expressão gerados na etapa anterior, e

incubados por 1 minuto em gelo. O conteúdo foi então transferido para uma cubeta de eletroporação gelada e as células foram eletroporadas à 2 kV, 25 mA e 200 Ω . Após a eletroporação, 960 μ L de meio YEP foram adicionados às cubetas, transferidos para novos tubos e incubados à 28 °C por 2 horas.

Após a transformação de células de *A. tumefaciens* C58C1 com cada um dos clones de expressão, diferentes concentrações de células (100 e 20 μ L) foram espalhadas em placas de Petri com meio YEP ágar, acrescido de 40 μ g mL⁻¹ Gentamicina + 100 μ g mL⁻¹ Rifampicina + 50 μ g mL⁻¹ Espectinomicina + 20 μ g mL⁻¹ de Estreptomicina. As placas foram incubadas à 28 °C por 48 h. Oito colônias crescidas de cada transformação foram selecionadas ao acaso, estriadas em uma nova placa contendo mesmo meio e incubadas por 24 h à 37 °C. Para avaliar se as colônias transformadas continham o gene de interesse, uma reação em cadeia da polimerase (PCR) de colônias foi realizada como descrito no tópico anterior.

A figura 43 mostra a representação esquemática do vetor que possui um promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, que resultará em uma expressão constitutiva dos peptídeos nas plantas (Karimi *et al.*, 2002). As sequências de DNA de interesse foram clonadas entre os sítios de recombinação AttR1 e AttR2.

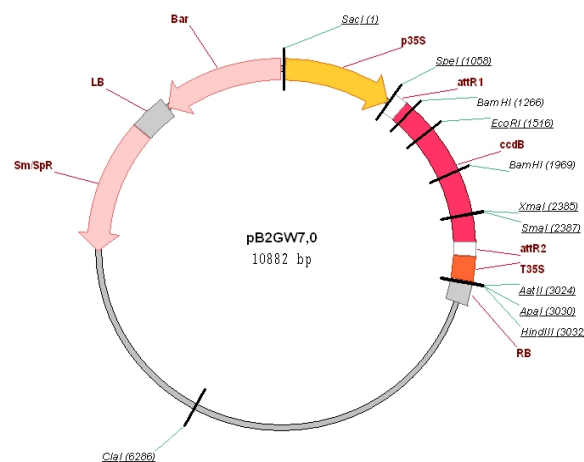


Figura 43. Representação esquemática do vetor pB2GW7 utilizado na transformação de plantas. RB e LB- são a *Right Border* e *Left Border*, respectivamente para a transformação mediada por *A. tumefaciens*; p35S- promotor 35S. attR1 e attR2-Sítios de recombinação. ccdB- gene que codifica uma proteína inibidora girase. T35S-terminador 35S. Bar- gene que confere resistência a glufosinato de amônio; Sm/SpR- Resistência a estreptomicina e espectinomicina.

4.5 Transformação de *A. thaliana*

A transformação das plantas *Arabidopsis thaliana* ecotipo columbia foi realizada a partir do método de submersão do botão floral. As plantas transformadas foram selecionadas com glufosinato de amônio (Clough e Bent, 1998).

4.6 Cultivo e Manutenção de *A. thaliana*

As plantas foram crescidas em solo e mantidas em câmara de crescimento com temperatura diurna a 22°C e temperatura noturna a 18°C com foto período de 12h/12h. A irrigação foi realizada com água uma vez por semana (Francois *et al.*, 2002; Aerts *et al.*, 2007).

4.7 Semeadura das sementes

Seis construções foram introduzidas em diferentes plantas de *A. thaliana*. Após um curto período, as sementes da transformação (T0) e as sementes controle (planta não transformada) foram semeadas para crescimento e seleção dos eventos positivos e para posterior obtenção do DNA genômico. As sementes foram adicionadas em caixas plásticas contendo uma camada de perlita, seguida de uma camada de areia. As caixas foram irrigadas com água contendo uma solução de herbicida contendo o agente ativo fosfotricina (5mg L⁻¹, Basta, Bayer, Alemanha), visando a seleção das plantas transformadas. Após o crescimento das plantas nesse meio, cerca de duas semanas, foi realizado a transferência para o solo. O controle utilizado foi a o ecotipo columbia (COL-0) de *A. thaliana* (Francois *et al.*, 2002).

4.8 Transferência para o solo

Aproximadamente 24 plantas de cada evento foram plantadas em caixas retangulares. Cada caixa foi irrigada semanalmente com água e permaneceram em câmara de crescimento. Essas 24 plantas foram utilizadas para o isolamento do RNA e cultivo das gerações seguintes.

4.9 Isolamento do RNA

Com quatro semanas de crescimento foi possível coletar as folhas das plantas para realizar a extração do RNA total. Foram coletadas três folhas de cada planta e inseridas em tubos de polipropileno do tipo Falcon de 15 ml e imediatamente congeladas em nitrogênio

líquido. Para cada evento de transformação tínhamos 24 plantas assim, o material de 168 folhas foram coletados e mantidos sobre refrigeração em freezer a - 80°. Para o isolamento do RNA, as folhas de 6 plantas (de cada evento de transformação) foram maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de cadinho e pistilo. Após o material ser macerado, foi executado o protocolo para isolamento do RNA. Esse protocolo consiste na utilização de reagente específico para isolar o RNA da planta (Purelink, plant RNA reagent, Life Technologies, Estado Unidos). Brevemente, o protocolo utiliza: clorofórmio, álcool isopropílico, etanol 75% e uma hora secando a 37°C (De Coninck *et al.*, 2010).

4.10 Quantificação RNA

O RNA foi quantificado por meio do espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, Estados Unidos). As razões de 260/280 e 260/230 foram utilizadas para verificação da pureza e qualidade da extração (Fleige e Pfaffl, 2006).

4.11 Tratamento com DNase e preparo do cDNA

Após a quantificação do RNA, é necessário tratá-lo com DNases para clivar moléculas de DNA (Ácido desoxirribonucleico) que possam estar presentes. Para isso foi utilizado o kit da enzima DNAase I (Invitrogen, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. Para obter o cDNA, foi utilizado o kit Superscript III (Invitrogen, Estados Unidos). O processo de obtenção do cDNA envolve duas etapas. A primeira consiste em misturar o dNTP (Desoxirribonucleotídeos fosfatados 10µM), o *primer* (50 µM) e água miliQ com a amostra tratada com DNase. Deixar a mistura à 65°C por 5 minutos no termociclador. Em seguida, adiciona-se a segunda mistura (segunda etapa do processo) que é composta por DTT (Dithiothreitol 0.1 M), tampão (5x), o inibidor de RNases out e a enzima Superscript III. A síntese do cDNA foi realizada à 50 °C por uma hora, seguida de inativação da enzima a 70°C por quinze minutos. Esse procedimento foi efetuado para todas as amostras (6 plantas para cada evento de transformação) (Aerts *et al.*, 2007).

4.12 Desenho de *primers*

Os *primers* foram desenhados a partir das sequências nucleotídicas que codificam os peptídeos com o auxílio da ferramenta virtual Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

No total foram desenhados 6 pares de *primers* (senso e antisenso). Os *primers* foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Bélgica).

4.13 qRT-PCR

Para determinação dos níveis de transcritos de cada construção contendo os intragenes foi realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real de forma quantitativa. Para isso, foi necessário preparar misturas que continham os pares de *primer*, água ultrapura e sensifast Syber Hi-rox kit (Bioline, Estados Unidos). Esse kit é composto pelo tampão, dNTPs, a enzima Taq DNA Polimerase e a sonda fluorescente. A proporção utilizada para cada amostra foi 10 µL do mix (mistura), 3,4 µL de água ultrapura, 0,8 µL de cada *primer* e 5 micro litros do cDNA. Primeiramente foram adicionados 15 µL do mix em cada poço da placa de 96 poços, e em seguida foram acrescentados os 5 µL de cDNA. Para o qRT-PCR, utilizamos como controle positivo, apenas um gene constitutivo que foi o fator de alongação para *A.thaliana* (EF-1) (Scheffe *et al.*, 2006; Neukermans *et al.*, 2015). O método utilizado foi (i) 10 minutos à 95 °C; (ii) 40 ciclos de a) 95 °C por 15 segundos; b) 60 °C por 10 segundos; c) 72 °C por 10 segundos; (iii) 95 °C por 15 segundos; O programa utilizado foi o *step one* da applied biosystem (Estados Unidos). O protocolo seguiu as recomendações sugeridas pelo fabricante da sensifast Syber Hi-rox kit.

4.14 Susceptibilidade da planta ao fungo *Botrytis cinerea*

A infecção foi realizada por meio da inoculação de esporos do fungo *B. cinerea* cepa 05.10 em 3 folhas dos grupos experimentais e controles. Foram aplicados 10 µL em cada uma das três folhas de uma solução de 5×10^5 esporos.mL⁻¹. Essa concentração foi obtida ao se diluir os esporos em caldo batata dextrose 50% (v/v) e distribuída com o auxílio de um pipetador automático. Cerca de 24h após a inoculação de esporos foi possível observar o aparecimento de lesões iniciais. Para analisar a progressão ou estabilidade no processo das lesões, foi utilizada uma régua para determinar o tamanho da mesma. A mensuração com a régua foi repetida durante os três dias seguintes (uma vez por dia) após a inoculação (DAI). Foi calculado a média aritmética para avaliação da doença (Brouwer *et al.*, 2003; Aerts *et al.*, 2007).

4.15 Segunda geração de plantas

As sementes provenientes da primeira geração foram plantadas em vasos plásticos contendo solo. Essas sementes foram selecionadas visualmente, após aplicação do herbicida Finale, que contém glufosinato de amônio (Bayer, Alemanha), na concentração de 250mg.L⁻¹, borrifados duas vezes por semana, durante 4 semanas (Zhang *et al.*, 2006). Posteriormente, as plantas resistentes ao herbicida foram isoladas em recipientes de plástico menores. A confirmação da seleção foi realizada por meio de testes rápidos com tiras de fluxo lateral que detectam a proteína Bar, por meio de um teste imunocromatográfico (Envirologix, Estado Unidos).

5.0 RESULTADOS

5.1 Desenho dos *primers*

Foram desenhados *primers* para as sequências de peptídeos. Na tabela 3 encontram-se as sequências dos iniciadores, seguido do nome do peptídeos. O *primer* reverso do peptídeo At1 é o mesmo do At1s.

Tabela 3. Tabela referente as sequências de *primers* utilizados no qRT-PCR

5'-TTCTTGGTGTGCGCTACCTT-3'	At1s	at1s primer Forward
5'-TCAAAGAGAGTCAAACCATGT-3'	At1s	at1s primer Reverse
5'-TTTTCTTGGTGTGCGCTACCT-3'	At2s	at2s primer Forward
5'-CAAAGAGCAAGAACAGCCTTG-3'	At2s	at2s primer Reverse
5'-GCAAACAAGCTTTTCTTGGTG-3'	At3s	at3s primer Forward
5'-ACTTGCCCAATGCTCTGACT-3'	At3s	at3s primer Reverse
5'-GCAAACAAGCTTTTCTTGGTG-3'	At4s	at4s primer Forward
5'-AAGACAGTGCGGCCTAAGAC-3'	At4s	at4s primer Reverse
5'-ATGGGTTCATTACATGGTTTCATG-3'	At1	at1 primer Forward
5'-ATGGGTCTCTACAACCTCATCAAAG-3'	At4	at4 primer Forward
5'-CAGAATTGCTTGTATAGACCGAAG-3'	At4	at4 primer Reverse

5.2 qRT-PCR

Por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qRT-PCR), foi possível verificar a integração dos genes (intragenes) e observar os diferentes níveis de expressão dos transcritos. Foram utilizados os programas *Step One* da Applied Biosystem e o Excel (Microsoft, Estados Unidos) para analisar os dados.

Para cada intragene foi calculado o número de vezes que esse gene é mais expresso do que o controle (planta não transformada) (Scheffe *et al.*, 2006). Os valores para cada gene foram determinados e representados nas figuras 44 à 49. Foi realizado apenas uma única réplica técnica para cada gene. Nas figuras estão os dados obtidos para a taxa de expressão relativa para cada peptídeo de interesse e a taxa relativa da média (em quintuplicatas) do controle (*A.thaliana* não transformada).

Em relação ao gene do peptídeo AT1S, pode-se observar que as plantas transformadas apresentam níveis de expressão relativa superior à média dos controles (planta não transformada). A expressão relativa determinada para cada planta transformada é referente a expressão do gene endógeno (controle, planta não transformada) acrescentado da expressão

do intragene. A expressão relativa indica que foi possível integrar a construção na planta e que está sendo expresso. No grupo controle também pode-se verificar a amplificação do material, em que foi utilizado os *primers* para genes (que codificam as proteínas precursoras a onde as sequências antimicrobiana estão encriptadas) que já existiam no genoma de *A. thaliana*. O mesmo padrão de expressão relativa também pode ser observados nos outros intragenes (AT2S, AT3S, AT4S, AT1 e AT4). A única que não teve altos índices de expressão relativa foi a amostra de número 11, na AT2S (figura 45). Uma vez que praticamente todas as plantas apresentaram expressão relativa maior do que o observado no controle, foi proposto então, avaliar a atividade antimicrobiana desses peptídeos na primeira geração (T1).

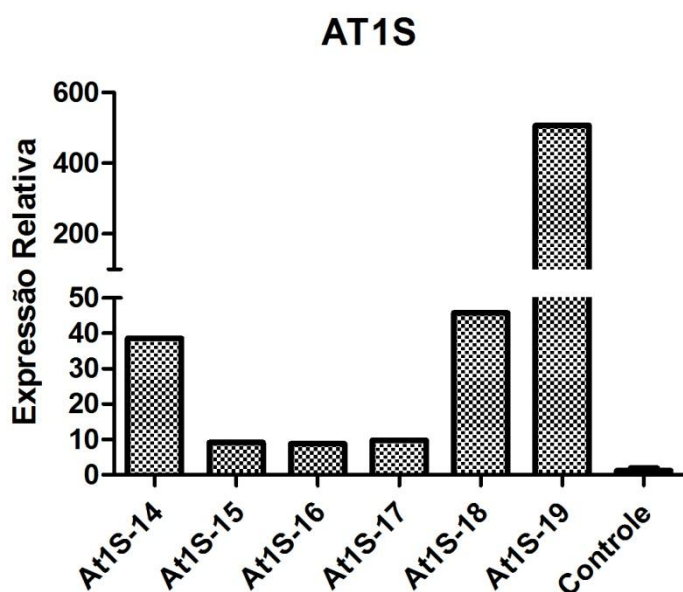


Figura 44. Gráfico em barras representando a taxa de expressão relativa para cada planta do gene AT1S. A média do controle também foi calculada. Os números 14,15,16,17,18,19 são referentes aos números das plantas utilizadas. A barra indica o desvio padrão entre as replicatas técnicas das amostras controle.

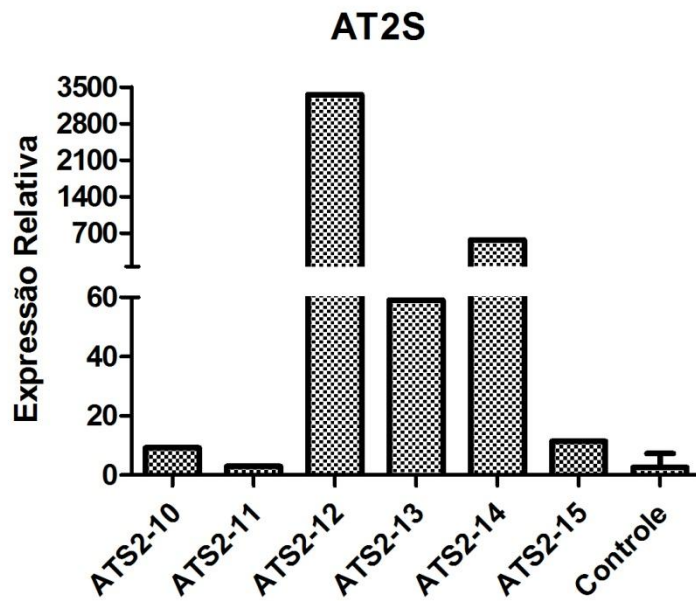


Figura 45. Gráfico em barras representando a taxa de expressão relativa para cada planta do gene AT2S. A média do controle também foi calculada. Os números 10,11,12,13,14,15 são referentes aos números das plantas utilizadas. A barra indica o desvio padrão entre as replicatas técnicas das amostras controle.

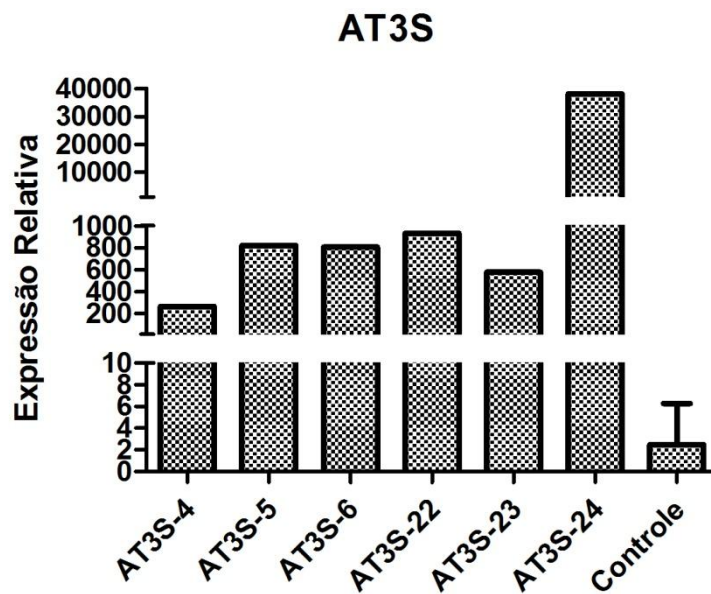


Figura 46. Gráfico em barras representando a taxa de expressão relativa para cada planta do gene AT3S. A média do controle também foi calculada. Os números 4,5,6,22,23,24 são referentes aos números das plantas utilizadas. A barra indica o desvio padrão entre as replicatas técnicas das amostras controle.

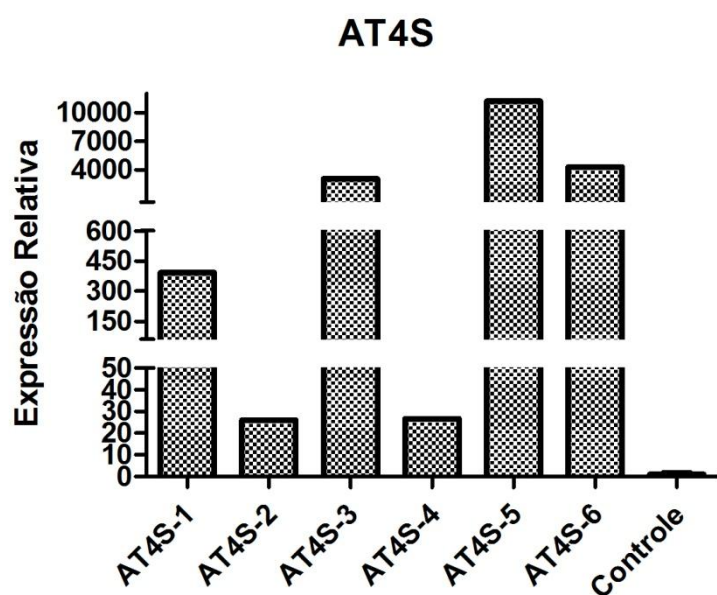


Figura 47. Gráfico em barras representando a taxa de expressão relativa para cada planta do gene AT4S. A média do controle também foi calculada. Os números 1,2,3,4,5,6 são referentes aos números das plantas utilizadas. A barra indica o desvio padrão entre as replicatas técnicas das amostras controle.

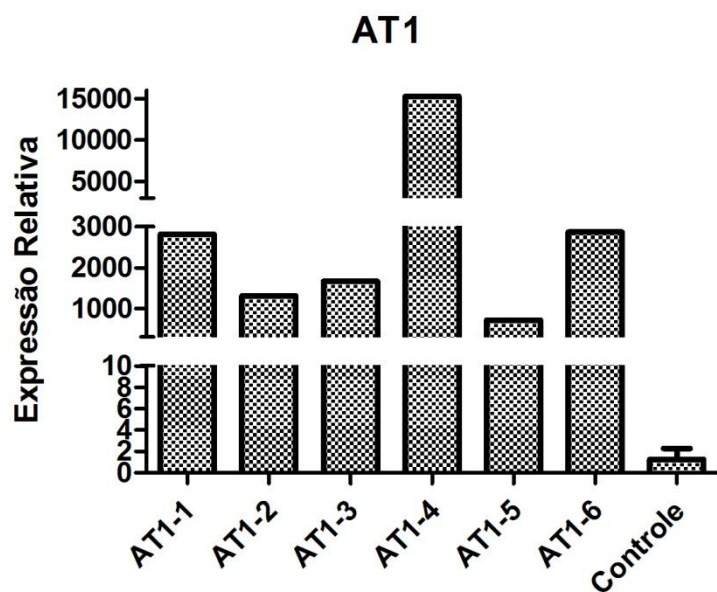


Figura 48. Gráfico em barras representando a taxa de expressão relativa para cada planta do gene AT1. A média do controle também foi calculada. Os números 1,2,3,4,5,6 são referentes aos números das plantas utilizadas. A barra indica o desvio padrão entre as replicatas técnicas das amostras controle.

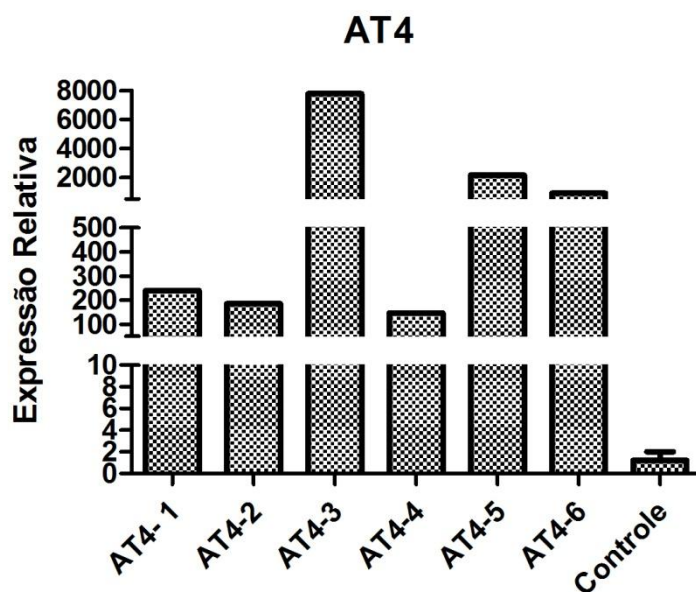


Figura 49. Gráfico em barras representando a taxa de expressão relativa para cada planta do gene AT4. A média do controle também foi calculada. Os números 1,2,3,4,5,6 são referentes aos números das plantas utilizadas. A barra indica o desvio padrão entre as replicatas técnicas das amostras controle.

5.3 Ensaio de infecção da planta pelo fungo *Botrytis cinerea*

As plantas transformadas com as construções para expressão dos peptídeos foram distribuídas aleatoriamente em caixas maiores de plástico contendo solo (Figura 50). A infecção com esporos do fungo *B. cinerea* foi realizada de acordo com o protocolo utilizado em trabalhos anteriores do grupo (Brouwer *et al.*, 2003; De Coninck *et al.*, 2010; De Coninck *et al.*, 2013). No total foram inoculadas 3 folhas por planta.

As lesões causadas pela infecção do fungo foram mensuradas todos os dias após a infecção até o 3º dia. Foi calculada a média do tamanho de cada lesão por folha.



Figura 50. Exemplo do ensaio de infecção. As setas em vermelho indicam as 3 folhas de cada planta que foram infectadas com esporo de *B. cinerea*.

Após infectar as plantas com os esporos de *B. cinerea*, foi preciso aguardar um pouco mais que 24 horas para poder observar o início do aparecimento de lesões. Uma vez decorrido esse tempo, foi possível iniciar a mensuração do diâmetro da lesão em milímetros (mm), durante os três próximos dias. Todas as mensurações foram realizadas no mesmo período do dia, sempre pelas manhãs entre 10-11 horas, com a mesma régua.

No ensaio de infecção com *B. cinerea*, em plantas da primeira geração, foi possível observar uma infecção que evoluiu ao longo dos três dias. Quando comparamos os valores do tamanho da lesão do grupo experimental com o controle pode-se observar que no primeiro dia não houve muita diferença. No segundo dia, pode-se observar que o grupo controle apresentou média para o diâmetro das lesões superior aos dos grupos experimentais. Esse mesmo perfil também se repete ao terceiro dia (ver tabela 4 com os valores das médias para cada dia).

O resultado do ensaio de infecção com plantas da primeira geração está descrito na tabela 4, seguido do respectivo gráfico em barras (figura 51). Para essa análise foi possível executar o ensaio com 24 plantas para cada intragene. Após os três dias de monitoramento da lesão, foi calculado a média para cada dia, com o respectivo desvio padrão. Os resultados de infecção com a primeira geração foram analisados estatisticamente com a *one way anova* seguida de teste de Tuckey's e mostraram que não existem diferenças estatisticamente significativas entre as plantas com seus respectivos intragenes, quando comparada com o controle (planta não transformada) (Ecotipo columbia) $P > 0.05$. Dessa forma é necessário repetir os testes de infecção nas gerações seguintes (T3).

Tabela 4. Planilha com o resultado da infecção por *B. cinerea* (T1).

Peptídeos	Média-1º dia	Desvpad	Média-2º dia	Desvpad	Média-3º dia	DesvPad
ATS1	2,652778	0,67013	6,111111	1,483131	8,138889	1,875127
AT2S	2,805556	0,449548	5,944444	0,651395	7,729167	0,835233
AT3S	2,777778	0,33574	6,069444	0,460824	8,597222	0,722176
AT4S	2,763889	0,286224	5,381944	1,876295	7,724638	2,041618
AT1.1	2,513889	0,629233	5,152174	1,685435	6,784722	2,759472
AT4.1	2,708333	0,344908	5,69697	1,348756	7,181818	1,753989
WT col-0	2,881944	0,388479	6,451389	1,57615	8,527778	2,014241

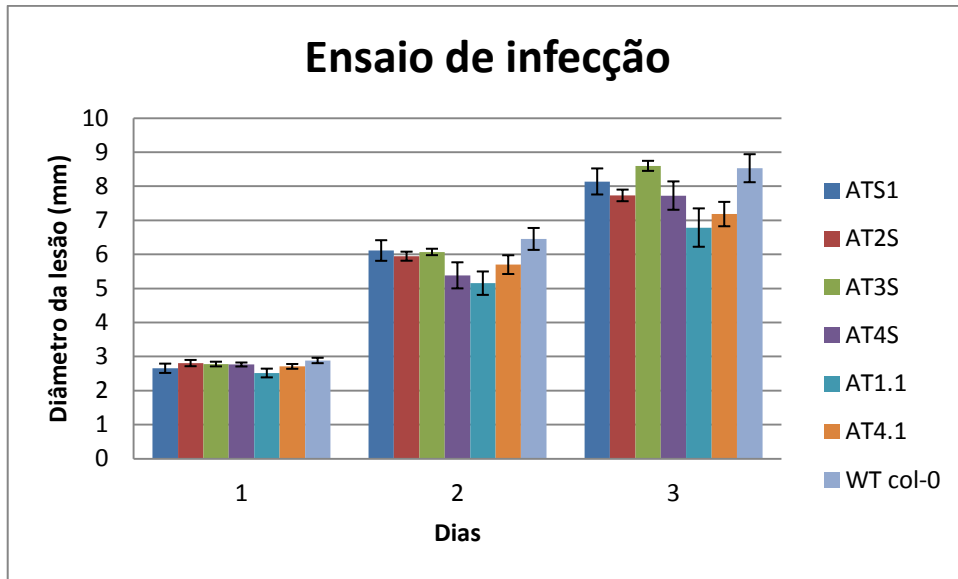


Figura 51. Gráfico em barras com os resultados obtidos para o ensaio de infecção em plantas (T1).

6.0 DISCUSSÃO

Quatro peptídeos antimicrobianos encriptados foram selecionados a partir do genoma de *A. thaliana* visando a sua reinserção em uma forma funcionalmente ativa no genoma da planta com o objetivo de poder contribuir para o controle de pragas agrícolas. Para isso, as sequências destes peptídeos foram sintetizadas para direcioná-los para o citoplasma ou para o apoplasto, vislumbrando a possibilidade de diferentes tipos de controle de acordo com o nível de invasão do fungo. Escolheu-se trabalhar com *A. thaliana* devido ao curto ciclo de vida que ela apresenta, como também às técnicas com protocolos estabelecidos para sua transformação. Inicialmente, está sendo avaliada a atividade desses peptídeos antimicrobianos contra a ação do fitopatógeno *B. cinerea*, que é um fungo necrotrófico, considerado agressivo devido ao rápido aparecimento de lesões necróticas e pode infectar cerca de 1400 espécies de plantas. Além disso, sua disseminação nas culturas causa perdas econômicas para o agricultor, ele ataca principalmente, as folhas, flores e os frutos da colheita (Shaw *et al.*, 2016).

As formas disponíveis para tentar controlar o *B. cinerea*, incluem evitar que infecções saprófitas ocorram no hospedeiro e o emprego de fungicida (Shaw *et al.*, 2016). Devido ao número limitado de medidas para tentar controlar o fungo é importante tentar desenvolver novas estratégias biotecnológicas que contribuam de forma efetiva e cause menos danos ao meio ambiente.

Recentemente, alguns estudos descreveram a obtenção de plantas geneticamente modificadas por meio da intragenia, um exemplo é a super expressão de genes de proteínas inibitórias (presentes na parede celular da planta) da enzima polygalacturonase (PG) em morangos, como uma forma de diminuir a suscetibilidade da planta ao *B. cinerea* (Krens *et al.*, 2012). De forma resumida, esse fungo inicia o processo de infecção no hospedeiro por meio da quebra da pectina componente da parede celular utilizando a enzima polygalacturonase (PG) para penetrar na célula (Delaunois *et al.*, 2014). Outro trabalho que também utilizou a intragenia, foi o descrito por Brand e colaboradores em 2012, que expressaram genes de peptídeos antimicrobianos que estavam encriptados no próprio genoma da soja, com o intuito de proporcionar à planta uma maior resistência à doença da ferrugem asiática causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*. As plantas transformadas apresentaram uma redução significativa de urédias, quando comparado a planta não transformada (Brand *et al.*, 2012).

A confirmação da integração e expressão dos quatro peptídeos em *A. thaliana* foi realizada por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real. Como esses eventos são

analisados preferencialmente na 3^o geração, foi feito apenas uma réplica na 1^o geração. Por isso, não é possível calcular a média do número de vezes que o gene está mais expresso do que no controle para cada amostra e nem determinar a significância da expressão diferencial observada. O controle utilizado foi a planta não transformada (em quintuplicadas) de *A. thaliana* ecótipo columbia (COL-0). Os níveis de expressão relativa para cada evento de transformação indicam que a expressão é maior nas plantas transformadas do que no controle.

Após realizar o PCR quantitativo em tempo real foi proposto então, fazer um ensaio para analisar se seria possível observar alguma diminuição da susceptibilidade da planta ao fungo *B. cinerea* na primeira geração. Com isso, esporos do fungo foram colocados nas folhas de *A. thaliana* transformada com os peptídeos antimicrobianos, o resultado obtido na primeira geração não apresentou diferenças significativas quando comparado ao grupo controle com valores de $P > 0.05$. O mesmo procedimento será realizado na terceira geração para observar se houve aumento ou não na susceptibilidade da planta em relação ao fungo. Dessa forma é necessário que ocorra uma estabilidade na expressão desses peptídeos em *A. thaliana* para que seja possível verificar a atividade desses peptídeos na geração seguinte (T3). O ensaio de infecção com o patógeno *B. cinerea* precisa ser repetido na terceira geração, pois é a geração em que existe maior probabilidade em obter a planta em homozigose para uma determinada característica.

Até o momento, as plantas estão na segunda geração, e as análises prosseguirão até a terceira geração. As perspectivas desse estudo, são a identificação e seleção de plantas homozigóticas na terceira geração que possam ser menos susceptíveis a infecção por *B. cinerea*. Assim, será necessário realizar nova qRT-PCR para avaliar os níveis de transcritos e detectar o peptídeo para observar a tradução. Caso o peptídeo seja transcrito e traduzido será possível fazer uma correlação entre o perfil de resposta da planta contra o fungo, com as propriedades físico químicas presentes na estrutura primária de cada peptídeo. Espera-se que os resultados desse estudo possam contribuir para o desenvolvimento de uma ferramenta biotecnologia eficaz e segura no controle de pragas agrícolas.

7.0 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS GERAIS

Os peptídeos PSLEM 11011 e 11012, possuem sequências inéditas, e apresentaram atividade antinociceptiva, quando expostos ao estímulo térmico.

Os peptídeos tiveram tempo de ação prolongada quando comparado a morfina e perfil de atividade semelhante à leu encefalina.

Na presença do antagonista naloxona não houve atividade, o que indica que os peptídeos ativam os receptores opioides localizados no SNC e podem atravessar a barreira hematoencefálica.

Após a interrupção da administração da naloxona por via intraperitoneal, a atividade do peptídeo foi retomada o que sugere que eles não possuem uma rápida degradação enzimática.

Os peptídeos PSLEM 11011 e 11012 possuem características que são essenciais ao emprego de peptídeos como candidatos a novos fármacos (tempo de ação prolongado, atravessa a barreira hematoencefálica, perfil indicativo de que não possuem meia vida curta).

O desenho de uma pequena proteína oxidada, a MTOXI, a partir da inserção de sequências do PSLEM 11011 e 11012 sugere que é possível utilizar proteínas para promover a liberação controlada de peptídeos.

A clivagem da proteína MTOXI foi avaliada *in vitro* com a enzima tripsina e pode-se observar que os fragmentos com os peptídeos bioativos permaneceram íntegros durante o processo da digestão, o que indica que os peptídeos apresentaram resistência a degradação enzimática que é uma característica importante para que eles possam interagir com os respectivos alvos moleculares e desencadear a resposta biológica.

A MTOXI apresentou um perfil de liberação dos fragmentos peptídicos mais lento ao longo do tempo do que a proteína aberta (não oxidada).

A estratégia em utilizar a inserção de peptídeos para construir uma pequena proteína (MTOXI) que possa atuar como carreador, promovendo uma liberação de peptídeos bioativos controlada, com alvos para enzimas digestivas, mostrou-se promissora para uma possível administração por via oral.

Assim é necessário continuar a caracterização da MTOXI. Como também realizar ensaios de inibição da ECA (atividade hipotensora) com os peptídeos.

Dessa forma, podemos desenhar uma única molécula que pode atuar como carreador para a liberação controlada de peptídeos, os quais potencialmente podem agir em alvos específicos distintos. Sendo, portanto, uma proteína terapêutica de interesse biotecnológico.

Em relação a expressão de peptídeos encriptados foi possível verificar a integração expressão de intragenes na primeira geração de plantas, esse estudo está em andamento com o intuito de realizar testes na 3^o geração e analisar a susceptibilidade da planta ao *B. cinerea*.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, N. A.; PRAKASH, C. S.; MCHUGHEN, A. G. Genome editing for crop improvement: Challenges and opportunities. **GM Crops & Food**, v. 6, n. 4, p. 183-205, 03/01 2015. ISSN 2164-5698/2164-5701. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5033222/> >.

AERTS, A. M. et al. Arabidopsis thaliana plants expressing human beta-defensin-2 are more resistant to fungal attack: functional homology between plant and human defensins. **Plant Cell Rep**, v. 26, n. 8, p. 1391-8, Aug 2007. ISSN 0721-7714 (Print)/0721-7714 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17340092> >.

AKTAR, M. W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2009. ISSN 1337-6853/1337-9569. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2984095/> >.

ALDRICH, J. V.; MCLAUGHLIN, J. P. Opioid Peptides: Potential for Drug Development. **Drug discovery today. Technologies**, v. 9, n. 1, p. e23-e31, 2012. ISSN 1740-6749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539827/> >.

ALMERAYA, E. V.; SÁNCHEZ-DE-JIMÉNEZ, E. Intragenic modification of maize. **Journal of Biotechnology**, v. 238, p. 35-41, 2016/11/20/ 2016. ISSN 0168-1656. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165616315085> >.

ANDREU, C. I. et al. Protein disulfide isomerases in neurodegeneration: from disease mechanisms to biomedical applications. **FEBS Lett**, v. 586, n. 18, p. 2826-34, Aug 31 2012. ISSN 1873-3468 (Electronic)/0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22828277> >.

ARGOS, D. F. P. Knowledge-Based Protein Secondary Structure Assignment. **PROTEINS: Structure, Function, and Genetics**, v. 23, p. 566-579, 1995.

BADIEYAN, S.; BEVAN, D. R.; ZHANG, C. Study and design of stability in GH5 cellulases. **Biotechnol Bioeng**, v. 109, n. 1, p. 31-44, Jan 2012. ISSN 1097-0290 (Electronic)/0006-3592 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21809329> >.

BAIRD, T. T., JR.; WRIGHT, W. D.; CRAIK, C. S. Conversion of trypsin to a functional threonine protease. **Protein Sci**, v. 15, n. 6, p. 1229-38, Jun 2006. ISSN 0961-8368 (Print)/0961-8368 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672242> >.

BAYMAN, E. O.; BRENNAN, T. J. Incidence and Severity of Chronic Pain at 3 and 6 Months After Thoracotomy: Meta-Analysis. **The Journal of Pain**, v. 15, n. 9, p. 887-897,

2014. ISSN 1526-5900. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2014.06.005> >. Acesso em: 2017/07/29.

BERGE, O.-G. Predictive validity of behavioural animal models for chronic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1195-1206, 2011. ISSN 0007-1188/1476-5381. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3229757/> >.

BERKOWITZ, S. A. et al. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 7, p. 527-40, Jul 2012. ISSN 1474-1784 (Electronic) 1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743980> >.

BORGES, C. R.; SHERMA, N. D. Techniques for the analysis of cysteine sulfhydryls and oxidative protein folding. **Antioxid Redox Signal**, v. 21, n. 3, p. 511-31, Jul 20 2014. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24383618> >.

BOYD, L. A. et al. Plant–pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 4, p. 233-240, 2013/04/01/ 2013. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168952512001709> >.

BRAND, G. D. et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. **J Biol Chem**, v. 277, n. 51, p. 49332-40, Dec 20 2002. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379643> >.

BRAND, G. D. et al. Probing protein sequences as sources for encrypted antimicrobial peptides. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45848, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23029273> >.

BROUWER, M. et al. Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, n. 2, p. 241-248, 2003. ISSN 03781097/15746968.

CAMARGO, A. C. M. et al. Bradykinin-potentiating peptides: Beyond captopril. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 516-523, 3/15/ 2012. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010111002443> >.

CAPURON, L. et al. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. **Molecular psychiatry**, v. 7, n. 5, p. 468, 2002. ISSN 1359-4184.

CHAN, W. C. P. D. W. **Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach.** . New York: Oxford University Press, 2000.

CHEEK, S. K., S. S. GRISHIN, N. V. Structural classification of small, disulfide-rich protein domains. **J Mol Biol**, v. 359, n. 1, p. 215-37, 2006. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618491> >.

CLOUGH, S. J.; BENT, A. F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 16, n. 6, p. 735-743, 1998. ISSN 1365-313X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x> >.

CRAGG, D. J. N. G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products.** , v. 70, p. 461-477, 2007.

CRAIK, D. J. et al. The future of peptide-based drugs. **Chem Biol Drug Des**, v. 81, n. 1, p. 136-47, Jan 2013. ISSN 1747-0285 (Electronic) 1747-0277 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23253135> >.

CRAIK, D. J. et al. Cyclotides as a basis for drug design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 3, p. 179-194, 2012/03/01 2012. ISSN 1746-0441. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2012.661554> >.

DALY, N. L. C., D. J. Bioactive cystine knot proteins. **Curr Opin Chem Biol**, v. 15, p. 362-8, 2011. ISSN 1879-0402 (Electronic) 1367-5931 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21362584> >.

DE CONINCK, B.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 109-120, 2013. ISSN 17494613.

DE CONINCK, B. M. et al. *Arabidopsis thaliana* plant defensin AtPDF1.1 is involved in the plant response to biotic stress. **New Phytol**, v. 187, n. 4, p. 1075-88, Sep 2010. ISSN 1469-8137 (Electronic) 0028-646X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20561213> >.

DELAUNOIS, B. et al. Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 249, 2014. ISSN 1664-462X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4042593/> >.

DI, L. Strategic Approaches to Optimizing Peptide ADME Properties. **The AAPS Journal**, Boston, v. 17, n. 1, p. 134-143, 2015. ISSN 1550-7416. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4287298/> >.

DMITRY O. ZHARKOV, R. A. R., CHARLES R. IDEN, AND ARTHUR P. GROLLMAN. NH₂ terminal proline acts as a Nucleophile in the Glycosylase Ap-Lyase reaction catalyzed by *Escherichia coli* formamidopyrimidine dna glycosylase FpG protein. **The Journal of Biological chemistry**, v. Vol. 272, p. pp. 5335–5341, 1997.

DOMBKOWSKI, A. A.; SULTANA, K. Z.; CRAIG, D. B. Protein disulfide engineering. **FEBS Lett**, v. 588, n. 2, p. 206-12, Jan 21 2014. ISSN 1873-3468 (Electronic) 0014-5793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24291258> >.

DOUGLAS. J, C. O. A. H. E. POLYPROTEIN GENE EXPRESSION: Generation of Diversity of Neuroendocrine Peptides. **Ann. Rev. Biochem**, v. 53, p. 665-715 1984.

DURAFFOURD, C. et al. Mu-opioid receptors and dietary protein stimulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 377-88, Jul 20 2012. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22771138> >.

ERNST. A, K. J., BERGMANNA. A. Proenkephalin A 119–159, a stable proenkephalin A precursor fragment identified in human circulation. **peptides**, v. 27, p. 1835–1840, 2006.

FAGYAS, M. et al. New Perspectives in the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) I: Endogenous Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibition. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e87843, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0087843> >.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of bothrops jararaca. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 163-169, 1965. ISSN 0366-0826. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1704050/> >.

FERREIRA, S. H.; SILVA, M. R. E. Liberation of a bradykinin-like substance in the circulating blood of dogs by trypsin, chymotrypsin and nagarse. **British Journal of Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 611-622, 1969. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1969.tb08016.x> >.

FIAT, A.-M.; JOLLÈS, P. Caseins of various origins and biologically active casein peptides and oligosaccharides: Structural and physiological aspects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 5-30, 1989/05/01 1989. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00421079> >.

FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 1, p. 37-51, Jan 2012. ISSN 1474-1784 (Electronic) 1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173434> >.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 126-139, 2006. ISSN 00982997.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122-128, 1// 2015. ISSN 1359-6446. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644614003997> >.

FRANCOIS, I. E. J. A. et al. Transgenic Expression in Arabidopsis of a Polyprotein Construct Leading to Production of Two Different Antimicrobial Proteins. **Plant Physiology**, v. 128, n. 4, p. 1346-1358, 2002.

FURMAN, J. L.; CHIU, M.; HUNTER, M. J. Early engineering approaches to improve peptide developability and manufacturability. **AAPS J**, v. 17, n. 1, p. 111-20, Jan 2015. ISSN 1550-7416 (Electronic) 1550-7416 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25338742> >.

GALLIGAN, J. J.; AKBARALI, H. I. Molecular Physiology of Enteric Opioid Receptors. **American journal of gastroenterology supplements (Print)**, v. 2, n. 1, p. 17-21, 2014. ISSN 1948-9498/1948-9501. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4426191/> >.

GARCIA, M. C. et al. Vegetable foods: a cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. **Talanta**, v. 106, p. 328-49, Mar 15 2013. ISSN 1873-3573 (Electronic) 0039-9140 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598136> >.

GETZ, J. A.; RICE, J. J.; DAUGHERTY, P. S. Protease-resistant peptide ligands from a knottin scaffold library. **ACS Chem Biol**, v. 6, n. 8, p. 837-44, Aug 19 2011. ISSN 1554-8937 (Electronic) 1554-8929 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21615106> >.

GILBERT, H. F. Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfidebond stability. **Methods in Enzymology**, v. 251, p. 8-28, 1995/01/01/ 1995. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687995511075> >.

GO SAITO, J. A. S., KYUNG-DALL LEE. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 199-215, 2003.

GOBBETTI, M.; MINERVINI, F.; RIZZELLO, C. G. Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2-3, p. 173-188, 2004. ISSN 1471-0307. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00139.x> >.

GOLDBERG, J. S. Stereochemical Basis for a Unified Structure Activity Theory of Aromatic and Heterocyclic Rings in Selected Opioids and Opioid Peptides. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 1-10, 2010.

GONGORA-BENITEZ, M.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F. Multifaceted roles of disulfide bonds. Peptides as therapeutics. **Chem Rev**, v. 114, n. 2, p. 901-26, Jan 22 2014. ISSN 1520-6890 (Electronic) 0009-2665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24446748> >.

GÖTHEL, S. F.; MARAHIEL, M. A. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 55, n. 3, p. 423-436, 1999/03/01 1999. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s000180050299> >.

GRAEUB, B. E. et al. The State of Family Farms in the World. **World Development**, v. 87, p. 1-15, 2016/11/01/ 2016. ISSN 0305-750X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305750X15001217> >.

HACHMANN, J.; LEBL, M. Alternative to Piperidine in Fmoc Solid-Phase Synthesis. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 149-149, 2006/03/01 2006. ISSN 1520-4766. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cc050123l> >.

HAJIME HIRATA, S. S., SHUN AGUI, MARIKO YOSHIDA, KOUSAKU OHINATA, MASA AKI YOSHIKAWA. Rubiscolin a opioid peptide derived from spinach rubisco has anxiolytic effect via activating and dopaminergic. **Peptides**, v. 28, p. 1998-2003, 2007.

HAO, S. et al. The Role of TNF α in the Periaqueductal Gray During Naloxone-Precipitated Morphine Withdrawal in Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 3, p. 664-676, 2011. ISSN 0893-133X/1740-634X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3055683/> >.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Curr Opin Biotechnol**, v. 18, n. 2, p. 163-9, Apr 2007. ISSN 0958-1669 (Print) 0958-1669 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17292602> >.

HARTUNG, F.; SCHIEMANN, J. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. **The Plant Journal**, v. 78, n. 5, p. 742-752, 2014. ISSN 1365-313X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12413> >.

HEMSHEKHAR, M.; ANAPARTI, V.; MOOKHERJEE, N. Functions of Cationic Host Defense Peptides in Immunity. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 3, p. 40, 2016. ISSN 1424-8247. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5039493/> >.

HENRY, S. G. et al. Dose Escalation during the First Year of Long-Term Opioid Therapy for Chronic Pain. **Pain medicine (Malden, Mass.)**, v. 16, n. 4, p. 733-744, 12/19 2015. ISSN 1526-2375/1526-4637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4390410/> >.

HILCHIE, A. L.; WUERTH, K.; HANCOCK, R. E. W. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Nat Chem Biol**, v. 9, n. 12, p. 761-768, 12//print 2013. ISSN 1552-4450. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1393> >.

HINTZ, T.; MATTHEWS, K. K.; DI, R. The Use of Plant Antimicrobial Compounds for Food Preservation. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 246264, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4619768/> >.

HOLME, I. B.; WENDT, T.; HOLM, P. B. Intrageneration and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 4, p. 395-407, 2013. ISSN 1467-7652. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12055> >.

HOOK, V. et al. Neuropeptidomic Components Generated by Proteomic Functions in Secretory Vesicles for Cell–Cell Communication. **The AAPS Journal**, Boston, v. 12, n. 4, p. 635-645, 2010. ISSN 1550-7416. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2976990/> >.

HOWL, J. **Peptide Synthesis and Applications**. New Jersey: Humana Press, 2005.

HUGHES, J. S. T. W. H. W. K. identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. **Nature**, v. 258, 1975.

ISIDRO-LLOBET, A.; ÁLVAREZ, M.; ALBERICIO, F. Amino Acid-Protecting Groups. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 6, p. 2455-2504, 2009/06/10 2009. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cr800323s> >.

JAN RIEMER, N. B., JOHANNES M. HERRMANN. Disulfide formation in the ER and Mitochondria: two solutions to a common process **science**, v. 324, 2009.

JANECKI, D. J.; NEMETH, J. F. Application of MALDI TOF/TOF mass spectrometry and collision-induced dissociation for the identification of disulfide-bonded peptides. **J Mass Spectrom**, v. 46, n. 7, p. 677-88, Jul 2011. ISSN 1096-9888 (Electronic) 1076-5174 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21744417> >.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 09/13/print 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35093019> >.

KAMTHAN, A. et al. Genetically modified (GM) crops: milestones and new advances in crop improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 9, p. 1639-1655, 2016//2016. ISSN 1432-2242. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-016-2747-6> >.

KANE, B. E.; SVENSSON, B.; FERGUSON, D. M. Molecular recognition of opioid receptor ligands. **The AAPS Journal**, New York, v. 8, n. 1, p. E126-E137, 2006. ISSN 1550-7416. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2751431/> >.

KARIMI, M.; INZÉ, D.; DEPICKER, A. GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 5, p. 193-195, 2002. ISSN 1360-1385. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3) >. Acesso em: 2017/06/03.

KELD FOSGERAU, T. H. Peptide therapeutics current status and future directions **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, 2015.

KERESZTES, A.; BORICS, A.; TÓTH, G. Recent Advances in Endomorphin Engineering. **ChemMedChem**, v. 5, n. 8, p. 1176-1196, 2010. ISSN 1860-7187. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201000077> >.

KING, M. et al. Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. **Nat Neurosci**, v. 4, n. 3, p. 268-274, 03//print 2001. ISSN 1097-6256. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/85115> >.

KOK, R. J. et al. Specific Delivery of Captopril to the Kidney with the Prodrug Captopril-Lysozyme. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 288, n. 1, p. 281-285, 1999.

KOSURI, P. et al. Protein folding drives disulfide formation. **Cell**, v. 151, n. 4, p. 794-806, Nov 9 2012. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23141538> >.

KRENS, F. A. et al. Current progress in trans- and cisgenic apple and strawberry Breeding. In: HVOSLEF-EIDE, A. K., **I International Symposium on Genetic Modifications - Challenges and Opportunities for Horticulture in the World**, Ski, Norway, 2012, Ski, Norway. ISHS. p.37-48.

LAZARUS, L. H.; OKADA, Y. Engineering endomorphin drugs: state of the art. **Expert Opin Ther Pat**, v. 22, n. 1, p. 1-14, Jan 2012. ISSN 1744-7674 (Electronic) 1354-3776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22214283> >.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEITE, J. R. S. A. et al. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the Phyllomedusa genus. **Peptides**, v. 26, n. 4, p. 565-573, 2005/04/01/ 2005. ISSN 0196-9781. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978104004887> >.

LI, Y. et al. Opioid glycopeptide analgesics derived from endogenous enkephalins and endorphins. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 205-226, 2012. ISSN 1756-8919/1756-8927. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3306179/> >.

LISKAMP, R. M. et al. Peptides and proteins as a continuing exciting source of inspiration for peptidomimetics. **Chembiochem**, v. 12, n. 11, p. 1626-53, Jul 25 2011. ISSN 1439-7633 (Electronic) 1439-4227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21751324> >.

LIU, W. O., M. KIM, C. XIANG, L. WELDON, J. E. LEE, B. PASTAN, I. A recombinant immunotoxin engineered for increased stability by adding a disulfide bond has decreased immunogenicity. **Protein Eng Des Sel**, v. 25, n. 1, p. 1-6, jan 2012. ISSN 1741-0134 (Electronic) 1741-0126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101015> >.

LIZBETH HEDSTROM, L. S., WILLIAM J. RUTLER. Converting Trypsin to Chymotrypsin the role of surface loops. **SCIENCE**, v. VOL. 255, p. 1249-1253, 1992.

LUCHT, J. M. Public Acceptance of Plant Biotechnology and GM Crops. **Viruses**, v. 7, n. 8, p. 4254-4281, 2015. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4576180/> >.

LUTZ, E.; WIESER, H.; KOEHLER, P. Identification of disulfide bonds in wheat gluten proteins by means of mass spectrometry/electron transfer dissociation. **J Agric Food Chem**,

v. 60, n. 14, p. 3708-16, Apr 11 2012. ISSN 1520-5118 (Electronic) 0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439977> >.

MA, J. K.; DRAKE, P. M.; CHRISTOU, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. **Nat Rev Genet**, v. 4, n. 10, p. 794-805, Oct 2003. ISSN 1471-0056 (Print) 1471-0056 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14526375> >.

MACHADO, A. et al. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, p. 781-789, 2004. ISSN 0100-4042. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500018&nrm=iso >.

MANSOUR, S. C.; PENA, O. M.; HANCOCK, R. E. W. Host defense peptides: front-line immunomodulators. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 9, p. 443-450, 2014. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.07.004> >. Acesso em: 2017/04/04.

MARTHA PHELAN A, A. A., RICHARD J. FITZGERALD B, NORA M. O'BRIEN. Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 11, p. Pages 643–654, 2009.

MASA CEMAZAR, S. K., TUNJUNG MAHATMANTO, ANJANEYA S. RAVIPATI AND DAVID J. CRAIK. Discovery and Applications of Disulfide-Rich Cyclic Peptides 2012. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1534-1545, 2012.

MASAZUMI MATSUMURA, G. S. B. W. M. Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds **Nature** v. 342, p. 291-293, 1989.

MASON, J. M. Design and development of peptides and peptide mimetics as antagonists for therapeutic intervention. **Future Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 12, p. 1813-1822, 2010/12/01 2010. ISSN 1756-8919. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4155/fmc.10.259> >. Acesso em: 2015/03/11.

MAULIK V. TRIVEDI, J. S. L., AND TERUNA J. SIAHAAN. The role of thiols and disulfides in protein chemical and physical stability **Curr Protein Pept Sci.**, 2009.

MCGIVERN, J. G. Ziconotide a review of its pharmacology and use in the pain **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 3, p. 69-85, 2007.

MEISEL, H.; BOCKELMANN, W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, n. 1, p. 207-215, 1999// 1999. ISSN 1572-9699. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A:1002063805780> >.

MENEZES, M. C. et al. Disintegrin-like/cysteine-rich domains of the reprotolysin HF3: Site-directed mutagenesis reveals essential role of specific residues. **Biochimie**, v. 93, n. 2, p. 345-51, Feb 2011. ISSN 1638-6183 (Electronic) 0300-9084 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20955756> >.

MOHANTY, D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 577-583, 2016. ISSN 1319-562X2213-7106. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4992109/> >.

MOREIRA, K. G. et al. Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. **Toxicon**, v. 56, n. 1, p. 55-63, 2010/08/01/ 2010. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010110001145> >.

MORMANN, M. et al. Fragmentation of intra-peptide and inter-peptide disulfide bonds of proteolytic peptides by nanoESI collision-induced dissociation. **Anal Bioanal Chem**, v. 392, n. 5, p. 831-8, Nov 2008. ISSN 1618-2650 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18663433> >.

NAEEM, A.; FAZILI, N. A. Defective protein folding and aggregation as the basis of neurodegenerative diseases: the darker aspect of proteins. **Cell Biochem Biophys**, v. 61, n. 2, p. 237-50, Nov 2011. ISSN 1559-0283 (Electronic) 1085-9195 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21573992> >.

NEUKERMANS, J. et al. ARACINs, Brassicaceae-Specific Peptides Exhibiting Antifungal Activities against Necrotrophic Pathogens in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 167, n. 3, p. 1017-1029, 2015.

NÓBREGA, M. M. **Síntese, purificação, caracterização e análise da atividade antinociceptiva de peptídeos opióides**. 2013. (Mestre). Departamento de biologia celular, Universidade de Brasília, UnB

NOVABIOCHEM. Novabiochem fmoc resin cleavage and desprotection. **Webbrochure fmoc cleavage www.novabiochem.com** p. 1-8, 2007.

OLSON, K. M. et al. Novel Molecular Strategies and Targets for Opioid Drug Discovery for the Treatment of Chronic Pain. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 90, n. 1, p. 97-110, 03/29 2017. ISSN 0044-00861551-4056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5369049/> >.

OPPENHEIM, J. et al. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. Suppl 2, p. ii17-ii21, 2003. ISSN 0003-4967/1468-2060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1766745/> >.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779-3787, 11/01 2010. ISSN 0021-9738/1558-8238. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2964993/> >.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Current opinion in supportive and palliative care**, v. 8, n. 2, p. 143-151, 2014. ISSN 1751-4258/1751-4266. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4301419/> >.

OSUSKY, M. et al. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. **Nat Biotech**, v. 18, n. 11, p. 1162-1166, 11/print 2000. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/81145> >.

PATHAN, H.; WILLIAMS, J. Basic opioid pharmacology: an update. **British Journal of Pain**, Sage UK: London, England, v. 6, n. 1, p. 11-16, 2012. ISSN 2049-4637/2049-4645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4590096/> >.

PATIL, N. A. et al. Cellular disulfide bond formation in bioactive peptides and proteins. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 1, p. 1791-805, 2015. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25594871> >.

PAUL CARTER, J. A. W. Engineering enzyme specificity by substrate assisted catalysis. **SCIENCE**, v. 237, p. 394-399, 1987.

PERTICAROLI, S. et al. Secondary structure and rigidity in model proteins. **Soft Matter**, v. 9, n. 40, p. 9548-9556, 2013. ISSN 1744-683X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C3SM50807B> >.

PESSIONE, E.; CIRRINCIONE, S. Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 876, 2016. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4899451/> >.

PFLUGER, P. T.; SCHRIEVER, S. C.; TSCHOP, M. H. Nutropioids, hedonism in the gut? **Cell Metab**, v. 16, n. 2, p. 137-9, Aug 8 2012. ISSN 1932-7420 (Electronic) 1550-4131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22883226> >.

PLOEGH, B. N. L. H. L. Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. **Immunological Reviews** v. 207, p. 126-144, 2005.

POLT, R. et al. Glycopeptide enkephalin analogues produce analgesia in mice: evidence for penetration of the blood-brain barrier. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 15, p. 7114-7118, 1994. ISSN 0027-8424/1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC44349/> >.

PONTI, D. et al. An amphibian antimicrobial peptide variant expressed in *Nicotiana tabacum* confers resistance to phytopathogens. **Biochemical Journal**, v. 370, n. Pt 1, p. 121-127, 2003. ISSN 0264-6021/1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1223161/> >.

RAMADA, M. H. S. **Explorando genomas : a busca por peptídeos antimicrobianos intragênicos**. 2016. (Doutor). Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília.

REN, G.; BARDWELL, J. C. Engineered pathways for correct disulfide bond oxidation. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 12, p. 2399-412, Jun 15 2011. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21250836> >.

RODRIGUEZ-MUNOZ, M. et al. The Mu-Opioid Receptor and the NMDA Receptor Associate in PAG Neurons: Implications in Pain Control. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 2, p. 338-349, 01/print 2012. ISSN 0893-133X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2011.155> >.

RUIZ-DURÁNTEZ, E. et al. Attenuation of acute and chronic effects of morphine by the imidazoline receptor ligand 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline in rat locus coeruleus neurons. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, n. 3, p. 494-500, 2003. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1573679/> >.

RUIZ-GIMENEZ, P. et al. Novel antihypertensive hexa- and heptapeptides with ACE-inhibiting properties: from the in vitro ACE assay to the spontaneously hypertensive rat. **Peptides**, v. 32, n. 7, p. 1431-8, Jul 2011. ISSN 1873-5169 (Electronic) 0196-9781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21605609> >.

SCHEFE, J. H. et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s C T difference” formula. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, n. 11, p. 901-910, 2006.

SCHIML, S.; PUCHTA, H. Revolutionizing plant biology: multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. **Plant Methods**, London, v. 12, p. 8, 2016. ISSN 1746-4811. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4730597/> >.

SHAW, M. W. et al. Analysis of Cryptic, Systemic Botrytis Infections in Symptomless Hosts. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 625, 2016. ISSN 1664-462X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4861902/> >.

SIEBER, B. W. A. R. Bioactive proteins and peptides in food **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v. 81, p. 181 – 191, 2011.

SIMÕES E SILVA, A. C.; TEIXEIRA, M. M. ACE inhibition, ACE2 and angiotensin-(1-7) axis in kidney and cardiac inflammation and fibrosis. **Pharmacological Research**, v. 107, p. 154-162, 2016. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661816301955> >.

SIMPSON, A. J. G. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, n. 6792, p. 151-157, 07/13/print 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35018003> >.

SPAHN, V. et al. A nontoxic pain killer designed by modeling of pathological receptor conformations. **Science**, v. 355, n. 6328, p. 966-969, 2017.

STEFFI RUDOLPH, D. L., SUSANNE KAISER, THOMAS HENLE. Identification and quantification of ACE-inhibiting peptides in enzymatic hydrolysates of plant proteins **Food Chemistry**, v. 224, 2016.

TAKASHI WATANABE, Y. K., TAKESHI MATSUMOTO, RYO-HEI YAMADA. Purification and kinetic properties of a D-amino-acid peptide hydrolyzing enzyme from pig kidney cortex and its tentative identification with renal membrane dipeptidase. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1298, p. 109-118 1996.

TAMANO, R. et al. Effect of spinal monoaminergic neuronal system dysfunction on pain threshold in rats, and the analgesic effect of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. **Neuroscience Letters**, v. 615, p. 78-82, 2016/02/26/ 2016. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394016300246> >.

TREEDE, R.-D. et al. A classification of chronic pain for ICD-11. **Pain**, Philadelphia, PA, v. 156, n. 6, p. 1003-1007, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4450869/> >.

UELI GLUBER, P. S., BETH J. HOFFMAN, L. PATRICK GAGE & SIDNEY UDENFRIEND. . Molecular cloning establishes proenkephalin as precursor of enkephalin-containing peptides. **Nature**, v. 295, 1982.

VLIEGHE, P. et al. Synthetic therapeutic peptides: science and market. **Drug Discov Today**, v. 15, n. 1-2, p. 40-56, Jan 2010. ISSN 1878-5832 (Electronic) 1359-6446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19879957> >.

WADA, Y.; LONNERDAL, B. Bioactive peptides derived from human milk proteins--mechanisms of action. **J Nutr Biochem**, v. 25, n. 5, p. 503-14, May 2014. ISSN 1873-4847 (Electronic) 0955-2863 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24411973> >.

YAMADA, Y. et al. Soymorphin-5, a soy-derived μ -opioid peptide, decreases glucose and triglyceride levels through activating adiponectin and PPAR α systems in diabetic KKA^y mice. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 302, n. 4, p. E433-E440, 2012.

YAMAMOTO, N.; MAENO, M.; TAKANO, T. Purification and Characterization of an Antihypertensive Peptide from a Yogurt-Like Product Fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 7, p. 1388-1393, 1999. ISSN 0022-0302. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75364-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75364-6) >. Acesso em: 2017/04/09.

YAMASAKI, K. et al. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. **Nat Med**, v. 13, n. 8, p. 975-980, 08//print 2007. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm1616> >.

YAMASAKI, K. et al. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 12, p. 2068-2080, October 1, 2006 2006. Disponível em: < <http://www.fasebj.org/content/20/12/2068.abstract> >.

YANG, D.; CHERTOV, O.; OPPENHEIM, J. J. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 58, n. 7, p. 978-989, 2001/06/01 2001. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/PL00000914> >.

ZAMAN, M. A.; OPARIL, S.; CALHOUN, D. A. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 8, p. 621-636, 08//print 2002. ISSN 1474-1776. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrd873> >.



ZASLOFF, M. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms. **Nature**, v. VOL 415 p. 389-395, 2002.

ZHANG, X. et al. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. **Nat. Protocols**, v. 1, n. 2, p. 641-646, 07//print 2006. ISSN 1754-2189. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.97> >.



ZHANG, Y.; LUBBERSTEDT, T.; XU, M. The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, n. 1, p. 23-35, 1/20/2013. ISSN 1673-8527. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S167385271200210X>>.

ZHU, S. et al. Experimental conversion of a defensin into a neurotoxin: implications for origin of toxic function. **Mol Biol Evol**, v. 31, n. 3, p. 546-59, Mar 2014. ISSN 1537-1719 (Electronic) 0737-4038 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24425781>>.

ANEXO-I


 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
 PROTOCOLO SERVI
 18/08/2014 15:51 DEDF
 012140000258

 ER 10 2014 020348 6

Espaço reservado para o protocolo
Espaço reservado para a etiqueta
Espaço reservado para o código QR

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo do Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento	Depósito de Pedido de Patente	Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA- PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
 O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. **Depositante (71):**
 - 1.1 Nome: **Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**
 - 1.2 Qualificação: **Empresa Pública**
 - 1.3 CNPJ/CPF: **00.348.003/0001-10**
 - 1.4 Endereço Completo: **PqEB Parque Estação Biológica - Edifício Sede - Final W/3 Norte - Brasília - DF**
 - 1.5 CEP: **70770-901**
 - 1.6 Telefone: (61) 3448.4545
 - 1.7 Fax: (61) 3348.4158
 - 1.8 E-Mail: **chefia.sne@embrapa.br**

continua em folha anexa

2. **Natureza**

Invenção
 Modelo de Utilidade
 Certificado de Adição

2. **Título da Invenção ou do Modelo de Utilidade (54): PEPTÍDEOS OPIOIDES**

continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão: do pedido Nº** **Data de Depósito:**

5. **Prioridade:**

Interna (66)
 Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

continua em folha anexa



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo do Documento:	Formulário	DIRPA	Página:
Tipo do Documento	Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	2/3
			Procedimento: DIRPA- PQ006	Versão: 2

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo

6.1 Nome: **Carlos Bloch Junior**

6.2 Qualificação: **Biólogo / Pesquisador**

6.3 CPF: **2626172872-53**

6.4 Endereço Completo: **SQN 203 Bloco K apto.103 - Brasília - DF**

6.5 CEP : **70833-110**

6.6 Telefone: **(61) 3448 4917** 6.7 Fax:

6.8 Email: bloch.carlos@gmail.com

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR 17/2013

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada

9. Procurador (74):

9.1 Nome: **Roberto Barbosa de Almeida**

9.2 CPF/CNPJ: **14183681804** 9.3 API/OAB

9.4 Endereço Completo: **PqEB Parque Estação Biológica - Edifício Sede - Final W/3 Norte - Brasília – DF**

9.5 CEP **70770-901**

9.6 Telefone: (61) **3448 4545** 9.7 Fax: (61) **3348 4890**

9.8 Email: roberto.barbosa@embrapa.br

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver



INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo do Documento:	Formulário	DIRPA	Página: 3/3	
Tipo do Documento	Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão 2	
			Procedimento: DIRPA- PQ006		

11. **Documentos anexados:**
(Assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento)

		Documentos Anexados	Folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU)	2
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2	Procuração	1
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documentos de contrato de trabalho	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório Descritivo	28
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações	5
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: n°, 1 por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI)	7
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo	1
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9	Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: 1 n° de CDs ou DVDS (original e cópia)	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagens de seqüências	1
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de seqüências em formato impresso	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à listagem de seqüências	1
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) Comprovante de Pagamento SIAF	2

12. **Total de folhas anexadas: 48 fis.**

13. **Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.**

Brasília-DF, 18 de agosto de 2014

Local e Data

Roberto Barbosa de Almeida
Matrícula: 359940
Secretaria de Negócios
Assinatura e Carimbo

ANEXO: DEPOSITANTE (71) 2/2:

1. Nome: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (FUB)
2. Qualificação: Universidade
3. CNPJ/CPF: 00.0038.174/0001-43
4. Endereço Completo: Campus Universitário Darcy Ribeiro – Asa Norte - Brasília – DF.
5. CEP: 70910-900
6. Telefone: (61) 3107-4128
7. E-mail: gildemar@cdt.unb.br

ANEXO: INVENTOR (72) 2/2:

1. Nome: Mariana Magalhães Nóbrega
2. Qualificação: Biomédica / Bolsista
3. CPF: 012851663-10
4. Endereço: SQS 303 Bloco G apto. 102 – Asa Sul - Brasília – DF.
5. CEP: 70336-070
6. Telefone: (61) 3321-7905
7. E-mail: marimnobrega@gmail.com

Brasília-DF, 18 de agosto de 2014.


ROBERTO BARBOSA DE ALMEIDA
Secretaria de Negócios
359940

9. (WO2016026016) OPIOID PEPTIDE

Datos bibliográficos PCT	Descripción	Reivindicaciones	Fase nacional	Notificaciones	Dibujos	Documentos
<p>Datos bibliográficos más recientes de la Oficina Internacional Enlace permanente </p>						
<p>Nº de publicación: WO/2016/026016</p>		<p>Nº de la solicitud internacional: PCT/BR2015/050120</p>				
<p>Fecha de publicación: 25.02.2016</p>		<p>Fecha de presentación de la solicitud internacional: 17.08.2015</p>				
<p>CIP: C07K 7/06 (2006.01), A61K 38/08 (2006.01), A23L 1/00 (2006.01), A61P 3/04 (2006.01), A61P 9/12 (2006.01), A61P 25/04 (2006.01), A61K 31/485 (2006.01)</p>						
<p>Solicitantes: EMBRAPA- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA [BR/BR]; PqEB Parque Estação Biológica, Edifício Sede, Final W/3 Norte 70770-901 Brasília - DF (BR). FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA (FUB) [BR/BR]; Campus Universitário Darcy Ribeiro - Asa Norte 70910-900 Brasília - DF (BR)</p>						
<p>Personas inventoras: BLOCH JUNIOR, Carlos; (BR). MAGALHÃES NÓBREGA, Mariana; (BR). MOREIRA, Karla Graziella; (BR). MORTARI, Márcia Renata; (BR)</p>						
<p>Mandatario/a: TRINDADE, Sydinéia de Souza; Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira Rua Marquês de Olinda, 70, 22251-040 Rio de Janeiro - RJ (BR)</p>						
<p>Datos de prioridad: BR1020140203486 18.08.2014 BR</p>						
<p>Título (EN) OPIOID PEPTIDE (FR) PEPTIDE OPIOÏDE (PT) PEPTÍDEO OPIOÏDE</p>						
<p>Resumen: (EN)The present invention relates to an opioid peptide represented by general formula TyrProPhe-X1-TrpGlyGly-X2-ProPro, where: X1 stands for Gly or Lys; X2 stands for Ile or Val. The invention also relates to pharmaceutical, nutritional and nutraceutical compositions comprising the peptide and to the use of the same for analgesic purposes, and/or for providing a feeling of satiety, and/or for lowering arterial blood</p>						

ANEXO-II



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 08 de janeiro de 2013.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO, IN SITU E IN VIVO DE COMPOSTOS BIOATIVOS LIVRES OU ENCAPSULADOS EM NANOSSISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA."**, UnBDOC n.º 131758/2012, sob responsabilidade do pesquisador Luciano Paulino da Silva foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.





Prof. Fernando Pacheco Rodrigues
Vice-Coordenador da CEUA