

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Explorando genomas: a busca por peptídeos antimicrobianos
intragênicos**

Marcelo Henrique Soller Ramada

Orientador: Carlos Bloch Jr.

Coorientador: Guilherme Dotto Brand

Brasília-DF, 2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**Explorando genomas: a busca por peptídeos antimicrobianos
intragênicos**

Marcelo Henrique Soller Ramada

Orientador: Carlos Bloch Jr.

Coorientador: Guilherme Dotto Brand

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade de Brasília como
requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Biologia Molecular.

Brasília-DF, 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

TITULARES:

Dr. Carlos Bloch Jr. – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Membro Externo vinculado ao Programa de Pós-Graduação e Presidente da banca.

Prof^a. Dr^a. Sonia Maria de Freitas – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade de Brasília.

Membro Interno vinculado ao Programa de Pós-Graduação.

Dr. Francisco José Lima Aragão – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Membro Externo vinculado ao Programa de Pós-Graduação.

Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta – Universidade Federal de Minas Gerais.

Membro Externo não vinculado ao Programa de Pós-Graduação.

Dr. André Melro Murad – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Membro Externo não vinculado ao Programa de Pós-Graduação.

SUPLENTE:

Dr. Andrei Stecca Steindorff – Embrapa Agroenergia

Membro Externo não vinculado ao Programa de Pós-Graduação.

Dedico esta tese aos meus 4 pontos cardeais:

Wilson da Silva Ramada (*in memoriam*)

Aparecida Soller

Mariana Soller Ramada

Lorena Ferreira Peixoto

“It is a capital mistake to theorize before one has data. Insensibly one begins to twist facts to suit theories, instead of theories to suit facts.” Sherlock Holmes, A Scandal in Bohemia

Sir Arthur Conan Doyle

AGRADECIMENTOS

A efemeridade da vida por si só já me basta como motivo de agradecimento. Agradeço por estar vivo e por poder compartilhar um pouco da minha pessoa com quem lê essas linhas. Não tenho o dom das palavras, nem a memória em sã condição para lembrar de todos, o que torna esse ato algo não tão simples. Deixo minhas desculpas previamente aqueles que eu não citar diretamente.

Agradeço aos meus pais, em primeiro lugar. Seja por vontade de Deus, destino, acaso, não poderia ter tido pais melhores. Agradeço infinitamente por ter tido a oportunidade de ser amado e amar a ambos. E pelo mais que eu ainda sinto um vazio enorme pela perda do meu pai, a combinação tempo e amor tem aos poucos me ajudado a continuar vivendo e querendo viver. E boa parte dessa força vem da minha mãe.

Agradeço a minha agora noiva Lorena por entender o quanto essa etapa é/foi importante para mim. O período longe um do outro, fosse no Brasil ou no exterior, não seria o mesmo sem a compreensão por parte dela. Não importa quantos linhas eu escreva de agradecimentos. Elas nunca parecerão suficientes.

Agradeço a minha irmã, Mariana, por todo o carinho e irmandade. Os dois últimos anos foram bem diferentes do que estávamos acostumados. E isso só evidenciou ainda mais o que já sabíamos e era claro. Novamente, não podia pedir por uma estrutura familiar melhor.

Não posso deixar de agradecer em especial duas pessoas que tive o grande prazer de conhecer melhor nos últimos 4 anos. Ao meu orientador Carlos Bloch, tenho que agradecer-lo por tudo. Não por estar à mercê de sua presidência. Mas, por ter me mostrado de várias maneiras o que é a vida. Agradeço e muito também ao meu co-orientador Guilherme. As palavras orientador e co-orientador são engraçadas. A sensação de distância criada não condiz com o sentimento de amizade que nutro por ambos, mas ao mesmo tempo, são perfeitas para explicar o respeito que tenho também.

Agradeço a todos os eternos companheiros do LEM e agregados, sejam eles cozinhas ou mortadelas: Maura, Bia, Mari, Giselle, Cinthia, Ivy, Lu, Thiago, Zé, Anga (vulgo Fofinho, a.k.a Eduardo), Eder, Lipe, Sifu, Jorge, André, Luciano, e certamente outros que por ventura esqueci. Adoro esse local. Afinal, onde posso ouvir, tocar violão, conversar, discutir, tomar café capixaba do Cerrado mineiro, estragar café, jogar futebol americano, correr, jogar tênis comer churrasco e bater nos meus patinhos Eder e Thiago? Só um adendo: não é necessário chamar o IBAMA.

Agradeço também ao restante da minha família que reside em São Paulo. Em especial, a minha Tia Magali e meu Tio Ronaldo. Eles foram muito importantes para que esse doutorado continuasse e eu pudesse chegar aqui hoje também. Meu muito obrigado!

Agradeço a todos os meus amigos de longa ou curta data. Tive o privilégio de poder trabalhar com um desses amigos durante esse doutorado, algo que nunca sonhei. Japa, (Fernando) além da amizade, agradeço você e a Mariana por todo o auxílio na realização de parte desse trabalho. Agradeço também ao Paibyano (Fabyano) e Salamandrei (Andrei) por terem topado a ideia de mitigarmos o custo Brasília para podermos ter um teto, além de serem parceiros de jogos! Agradeço também aos demais amigos como Pará (Danilo), Amãeda (Amanda), Jotinha, Ray, Markin, Wyll e Rafa (parabéns futuros papais!!), dentre vários outros por toda a amizade, saídas nos finais de semana que eu ia para Goiânia, etc.

I would like to thank Professor Bruno, Dr. Karin and Dr. Barbara for all the assistance that they gave me during my stay in Belgium. It was a wonderful experience. It was even better due to the lab people. I would also like to thanks Sara, Els, Tanne, Katy, Sofie, Jasper, Annelies, Jenny and all the others. I miss working at the PFI group. And I do miss Belgium waffles a lot!

E agradeço a você novamente, que teve paciência para vir até aqui e conhecer um pouco da minha pessoa. Espero que possa ter uma boa leitura!

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xiii |
| ÍNDICE DE TABELAS | xv |
| TABELA DE AMINOÁCIDOS | xvi |
| RESUMO | 01 |
| ABSTRACT | 02 |
| PREFÁCIO | 03 |
| | |
| CAPÍTULO 01 | 05 |
| 1.1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA | 06 |
| 1.1.1. O início da vida na Terra | 06 |
| 1.1.2. Mundo de DNA e ancestral comum | 09 |
| 1.1.3. Evolução de genomas e diversidade | 11 |
| 1.1.4. Peptídeos antimicrobianos e interesse econômico | 13 |
| 1.1.5. Potencial escondido nos genomas | 16 |
| 1.1.6. Peptídeos encriptados na agricultura | 17 |
| 1.2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS | 24 |
| 1.3. MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 1.3.1. Seleção de IAPs de <i>Theobroma cacao</i> e outras plantas | 25 |
| 1.3.2. Síntese química orgânica em fase sólida | 26 |
| 1.3.3. Caracterização dos peptídeos sintéticos por espectrometria de massa | 28 |
| 1.3.4. Purificação dos peptídeos e caracterização por espectrometria de massa | 29 |
| 1.3.5. Quantificação dos peptídeos sintéticos | 29 |
| 1.3.6. Avaliação da inibição de germinação de basidiósporos de <i>Moniliophthora perniciosa</i> pelos IAPs de <i>T. cacao</i> | 30 |
| 1.3.7. Avaliação da concentração inibitória mínima dos peptídeos sintéticos | 31 |
| 1.3.8. Avaliação da citotoxicidade dos PAIs | 32 |
| 1.3.9. Ensaio de atividade antibiofilme | 33 |
| 1.3.9.1. Inibição da formação de biofilme de <i>C. albicans</i> pelos PAIs de <i>A. thaliana</i> | 33 |
| 1.3.9.2. Ensaio de sinergismo (<i>checkerboard</i>) entre os PAIs de <i>A. thaliana</i> e antifúngicos | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4. RESULTADOS | 35 |
| 1.4.1. Genomas de plantas como fonte de PAIs | 35 |
| 1.4.2. Análise cromatográfica e espectrométrica dos PAIs sintéticos | 39 |
| 1.4.3. PAIs são agentes antimicrobianos potentes, de amplo espectro e com baixa atividade hemolítica | 47 |
| 1.4.4. Os PAIs de <i>T. cacao</i> são capazes de inibir a germinação dos basidiósporos do fungo <i>Moniliophthora perniciosa</i> | 53 |
| 1.4.5. Avaliação do potencial inibitório dos PAIs de <i>A. thaliana</i> contra <i>Candida spp.</i> e na formação de biofilmes dos mesmos. | 58 |
| 1.4.6. At01 e At02 aumentam a atividade inibitória de anfotericina B e caspofungina contra biofilmes de <i>C. albicans</i> | 59 |
| 1.5. DISCUSSÃO | 62 |
| 1.6. REFERÊNCIAS | 71 |
| | |
| CAPÍTULO 02 | 83 |
| 2.1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA | 84 |
| 2.1.1. Membranas e fosfolipídeos | 84 |
| 2.1.2. Transição de fase de fosfolipídeos | 85 |
| 2.1.3. Membranas de microrganismos | 86 |
| 2.1.4. Atividade antimicrobiana e interação com fosfolipídeos | 88 |
| 2.1.5. Modo de ação de peptídeos antimicrobianos e propriedades físico-químicas | 89 |
| 2.2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS | 94 |
| 2.3. MATERIAL E MÉTODO | 95 |
| 2.3.1. Síntese, purificação, análise por espectrometria de massa e quantificação de peptídeos | 95 |
| 2.3.2. Extrusão e quantificação de vesículas de fosfolipídios | 95 |
| 2.3.3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC) | 95 |
| 2.3.4. Dicroísmo circular (CD) | 96 |
| 2.4. RESULTADOS | 97 |
| 2.4.1. Os novos PAIs e AMPs induzem mudanças similares na transição de fase principal de vesículas fosfolídicas modelo | 97 |
| 2.4.2. Perturbações na transição de fase principal de LUVs está correlacionado com atividade antimicrobiana | 103 |

| | |
|---|------------|
| 2.4.3. Calorimetria de varredura diferencial como uma ferramenta para a classificação de peptídeos membranoativos | 104 |
| 2.4.4. Perturbação de membrana e helicoidização de peptídeos estão correlacionados | 108 |
| 2.4.5. Reavaliação das propriedades físico-químicas dos Grupos de peptídeos | 110 |
| 2.5. DISCUSSÃO | 112 |
| 2.6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS | 116 |
| 2.7. REFERÊNCIAS | 118 |
| ANEXO I | 123 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AmB – anfotericina B

AMP – Peptídeo antimicrobiano, do inglês, *antimicrobial peptide*

APD – Banco de dados de peptídeos antimicrobianos, do inglês, *Antimicrobial Peptide Database*

CAS - caspofungina

CD – Dicroísmo circular, do inglês, *circular dichroism*

CIB50 – Concentração inibitória mínima necessária para inibir a formação de biofilme em 50%

CIM – Concentração inibitória mínima

CIM50 – Concentração inibitória mínima necessária para inibir a germinação dos basidiósporos de *M. perniciososa* em, pelo menos, 50%

CIM90 – Concentração inibitória mínima necessária para inibir a germinação dos basidiósporos de *M. perniciososa* em, pelo menos, 90%

CLSI – Instituto de Padronizações Laboratoriais e Clínicas, do inglês, *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CMM – Concentração microbicida mínima

CPPs – peptídeos penetradores de membranas

CTB – Do inglês, *CellTiter blue*

DIPEA – N,N-Diisopropiletilamina

DMF – N,N-dimetilformamida

DMPC – 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina

DMPG – 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilglicerol

DSC – calorimetria diferencial exploratória, do inglês *differential scanning calorimetry*

HBTU – O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametil-uronio hexafluorofosfato

HLB - *Huanglongbing*

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance, do inglês, *high performance liquid chromatography*

H50 – Concentração de PAIs necessária para a lise de 50% de hemácias

ICIF – Índice de concentração inibitória fracionada

ITC – calorimetria de titulação isotérmica, do inglês *isothermal titration calorimetry*

LUCA – Último ancestral comum universal, do inglês, *last universal common ancestor*

LUVs – vesículas unilamelares grandes, do inglês *large unilamellar vesicles*

MALDI – Dessorção/ionização assistida por laser, do inglês, *Matrix assisted laser desorption/ionization*

PAIs – Peptídeos antimicrobianos intragênicos

PATs – peptídeos amiloides.

PBS – Tampão fosfato salino, do inglês, *Phosphate buffered saline*

PCA – Análise de componentes principais, do inglês, *principal component analysis*

RPMI – Instituto Roswell Memorial Park, do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*

TFA – Ácido trifluoroacético, do inglês, *trifluoroacetic acid*

TIS – triisopropilsilano, do inglês, *triisopropylsilane*

TOF – tempo de voo, do inglês, *Time of flight*

XTT - 2,3-bis(2-metil-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-hidróxido de tetrazólio

YPD – levedura peptona e dextrose, do inglês, *yeast peptone dextrose*

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 01

| | |
|--|----|
| Figura 1.01 – Processo de filtragem e seleção de fragmentos proteicos com potencial antimicrobiano. | 19 |
| Figura 1.02 – Plantas de soja transformadas com o peptídeo gb ABM17058.1 (213–231). | 20 |
| Figura 1.03. Esquema para as principais etapas da síntese em fase sólida | 28 |
| Figura 1.04 – Parâmetros físico-químicos e anfifilicidade teórica dos PAIs Tc02, Tc06 e Tc08. | 36 |
| Figura 1.05 – Espectro de fragmentação do peptídeo Tc01. | 40 |
| Figura 1.06 – Espectro de fragmentação do peptídeo Tc02. | 41 |
| Figura 1.07 – Espectro de fragmentação do peptídeo Tc03. | 42 |
| Figura 1.08 – Perfil cromatográfico dos peptídeos Tc01 e Tc02 e espectro de massa das frações coletadas. | 44 |
| Figura 1.09 – Perfil cromatográfico dos peptídeos Tc03 e Tc04 e espectro de massa das frações coletadas. | 45 |
| Figura 1.10 – Perfil cromatográfico dos peptídeos Tc05 e Tc06 e espectro de massa das frações coletadas. | 46 |
| Figura 1.11 – Basidiósporos de <i>M. pernicioso</i> após 4 horas de incubação à 24°C, em meio de cultura. | 53 |
| Figura 1.12 – Avaliação da germinação dos basidiósporos de <i>M. pernicioso</i> após 4 horas de incubação à 24 °C, na presença ou ausência dos peptídeos (controle). | 54 |
| Figura 1.13 – Avaliação da germinação dos basidiósporos de <i>M. pernicioso</i> após 4, 24 e 48 horas de incubação à 24 °C, na ausência e na presença dos peptídeos Tc02 e Tc05. | 55 |
| Figura 1.14 – Avaliação da germinação dos basidiósporos de <i>M. pernicioso</i> após 4, 24 e 48 horas de incubação à 24 °C, na presença dos peptídeos Tc06, Tc08 e Tc10. | 56 |
| Figura 1.15 – Avaliação da germinação dos basidiósporos de <i>M. pernicioso</i> após 4, 24 e 48 horas de incubação à 24 °C, dos peptídeos DS01 e Asc-8. | 54 |
| Figura 1.16 – Sinergismo entre PAIs e caspofungina ou anfotericina B na inibição de biofilmes de <i>C. albicans</i> . | 61 |
| Figura 1.17. Alinhamento dos PAIs oriundos da proteína citocromo P450 de diferentes plantas. | 65 |

CAPÍTULO 02

| | |
|--|-----|
| Figura 2.1. Esquema fundamental dos fosfolipídeos, usando como exemplo a molécula de 1-2-di-miristoil-sn-glicero-fosfatidilcolina (DMPC). | 85 |
| Figura 2.2. Transição de fase em membranas. | 86 |
| Figura 2.3. Arquitetura comparativa de membranas de microorganismos e membranas eritrocitárias humanas. | 87 |
| Figura 2.4. Esquema da formação de poros em membranas pelo modelo <i>barrel stave</i> . | 90 |
| Figura 2.5. Esquema do modo de ação de AMPs pelo modelo <i>carpet-like</i> . | 91 |
| Figura 2.6. Esquema do modo de ação de AMPs pela formação de poros toroidais. | 92 |
| Figura 2.07 – Termogramas da transição de fase principal de LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG na presença de PAIs de cada um dos Grupos formados após análise de PCA (Figura 2.08). | 99 |
| Figura 2.08. Análise de componentes principais dos dados obtidos da interação dos PAIs e AMPs com as LUVs modelo. | 102 |
| Figura 2.09 – Relação entre atividade antimicrobiana e perturbação da transição de fase principal de LUVs. | 103 |
| Figura 2.10. Análise de componentes principais do efeito causado na transição de fase principal das membranas modelo por 54 peptídeos. | 107 |
| Figura 2.11. Espectro de CD de peptídeos representantes de cada um dos Grupos. | 108 |
| Figura 2.12. Avaliação da helicidade dos Grupos de peptídeos na presença de LUVs modelo. | 109 |
| Figura 2.13. Quartis da análise das propriedades físico-químicas em função dos Grupos formados. | 111 |
| Figura 2.14. Representação da possível interação dos peptídeos PS-2 (Grupo 2) e DS01 (Grupo 3) com membranas compostas pelo fosfolipídeo zwitterônico DMPC. | 115 |

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 01

| | |
|---|----|
| Tabela 1.01. Parâmetros físico-químicos definidos pelo usuário para a busca por PAIs. | 25 |
| Tabela 1.02. Microrganismos utilizados para os testes de suscetibilidade aos peptídeos. | 32 |
| Tabela 1.03. Possíveis PAIs filtrados do genoma das diferentes plantas. | 35 |
| Tabela 1.04. Lista dos PAIs selecionados para síntese química. | 38 |
| Tabela 1.05. Caracterização dos PAIs e AMPs de anfíbio por espectrometria de massa. | 39 |
| Tabela 1.06. Concentração dos PAIs em solução para testes biológicos. | 43 |
| Tabela 1.07. Concentração inibitória mínima dos PAIs contra fungos. | 48 |
| Tabela 1.08. Concentração inibitória mínima dos PAIs contra bactérias. | 49 |
| Tabela 1.09. Concentração fungicida mínima dos PAIs. | 50 |
| Tabela 1.10. Concentração bactericida mínima dos PAIs. | 51 |
| Tabela 1.11. Avaliação da citotoxicidade dos PAIs com eritrócitos humanos. | 52 |
| Tabela 1.12. Concentração inibitória dos peptídeos de <i>T. cacao</i> na germinação dos basidiósporos. | 57 |
| Tabela 1.13. Atividade antifúngica dos PAIs de <i>A. thaliana</i> contra <i>Candida spp.</i> | 58 |
| Tabela 1.14. Atividade dos PAIs de <i>A. thaliana</i> na inibição da formação de biofilmes de <i>Candida spp.</i> | 58 |
| Tabela 1.15. Atividade sinérgica de At01 com AmB e CAS sob biofilmes de <i>C. albicans</i> SC5314, resultando na inibição da formação dos mesmos. | 59 |
| Tabela 1.16. Atividade sinérgica de At02 com AmB e CAS sob biofilmes de <i>C. albicans</i> SC5314, resultando na inibição da formação dos mesmos. | 60 |
| Tabela 1.17. Comparativo dos parâmetros físico-químicos utilizados neste trabalho e por Brand et al. (2012). | 64 |

CAPÍTULO 02

| | |
|---|----|
| Tabela 2.01. Lista dos peptídeos avaliados quanto ao seu potencial de perturbação de membranas e seus respectivos Grupos. | 98 |
|---|----|

| | |
|---|------------|
| Tabela 2.02. Dados obtidos da interação dos PAIs e AMPs com LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG. | 100 |
| Tabela 2.03. Atividades antimicrobianas em função dos Grupos de peptídeos. | 104 |
| Tabela 2.04. Peptídeos utilizados para a meta-análise e seus respectivos Grupos. | 105 |
| Tabela 2.05. Quartis da helicidade percentual em função dos Grupos. | 109 |

TABELA DE AMINOÁCIDOS

| Aminoácido | Símbolo de uma letra | Símbolo de três letras | Massa monoisotópica |
|-------------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Ácido aspártico | D | Asp | 115,026 |
| Ácido glutâmico | E | Glu | 129,042 |
| Alanina | A | Ala | 71,037 |
| Arginina | R | Arg | 156,101 |
| Asparagina | N | Asn | 114,042 |
| Cisteína | C | Cys | 103,009 |
| Fenilalanina | F | Phe | 147,068 |
| Glicina | G | Gly | 57,021 |
| Glutamina | Q | Gln | 128,058 |
| Histidina | H | His | 137,058 |
| Isoleucina | I | Iso | 113,084 |
| Leucina | L | Leu | 113,084 |
| Lisina | K | Lys | 128,094 |
| Metionina | M | Met | 131,04 |
| Prolina | P | Pro | 97,052 |
| Serina | S | Ser | 87,032 |
| Tirosina | Y | Tyr | 163,063 |
| Treonina | T | Thr | 101,047 |
| Triptofano | W | Trp | 186,079 |
| Valina | V | Val | 99,068 |

RESUMO

Há um número crescente de evidências demonstrando que a proteólise em matrizes biológicas pode gerar vários peptídeos bioativos de várias proteínas. Esses peptídeos, quando liberados, podem apresentar atividades diferentes daquela da proteína parental. Ex.: Atividades hipotensoras, opióides e antimicrobianas. Entretanto, vários outros peptídeos podem estar presos dentro de uma sequência polipeptídica, sem sítios de clivagem enzimática evidentes para sua liberação. Um recente aprofundamento na informação genômica de diferentes espécies realizados por nosso grupo demonstrou que há diversos peptídeos antimicrobianos encriptados em sequências proteicas maiores, evidenciando uma potencialidade pouco explorada. Nesta tese, abordamos a exploração desse potencial encriptado no genoma de plantas de interesse como *Theobroma cacao*, *Arabidopsis thaliana*, *Citrus sinensis* e *Gossypium raimondii*. Os possíveis peptídeos antimicrobianos intragênicos (PAIs), de cada uma das plantas de interesse, foram filtrados através do programa Kamal, utilizando diferentes parâmetros físico-químicos. No total, 21 PAIs foram selecionados, sintetizados quimicamente e avaliados quanto ao seu potencial de inibir o crescimento de fungos, leveduras e bactérias, patógenos de plantas ou humanos. Dezesesseis PAIs inibiram, pelo menos, um dos microrganismos testados, alguns com atividades similares ou superiores aos peptídeos antimicrobianos (AMPs) DS01 e Asc-8, utilizados como controle. De quatro peptídeos testados, dois apresentaram sinergismo com antibióticos comerciais na inibição do crescimento de biofilmes de *Candida albicans*. Análises biofísicas também foram realizadas para melhor entender as propriedades dos peptídeos gerados. A estrutura secundária dos 21 PAIs e de outros 6 AMPs sintetizados foi avaliada na presença e ausência de vesículas modelo de fosfolipídios. O efeito que esses peptídeos causam na transição de fase das vesículas fosfolipídica também foi avaliado. Uma análise de componentes principais permitiu a categorização dos peptídeos em quatro Grupos diferentes. Tal análise permitiu evidenciar a importância da hidrofobicidade e da possível formação em hélice e suas implicações na atividade dos peptídeos. Tais resultados permitiram um novo entendimento e evolução do nosso sistema de predição de moléculas antimicrobianas, que pode ser aplicado na busca de novos PAIs. A inserção da informação do(s) PAI(s) nos respectivos genomas na tentativa de controlar doenças causadas por microrganismos, é uma perspectiva promissora para o futuro próximo. Também podemos destacar como perspectiva, estudos mais profundos contra patógenos humanos, na busca por novos antibióticos ou potencializadores dos atuais.

ABSTRACT

There is an increasing number of evidences demonstrating that physiological proteolysis can yield many bioactive peptides encrypted in various proteins. These peptides, once released, may show different biological activities than their respective parent-protein e.g. hypotensive, opioid and antimicrobial actions. However, other bioactive peptides may be stuck on a polypeptide chain with no evident proteolytic cleavage sites for its release. A recent survey in the genomic information of different species performed by our group showed that there are many encrypted antimicrobial peptides in larger protein sequences highlighting an unexplored potential. In this thesis, we explored this encrypted potential in the genomes of plants such as *Theobroma cacao*, *Arabidopsis thaliana*, *Citrus sinensis* e *Gossypium raimondii*. The putative intragenic antimicrobial peptides (IAPs) of each plant were filtered using different physical-chemical parameters via Kamal software. A total of 21 IAPs were selected, chemically synthesized and tested for their potential to inhibit the growth of human and plant fungi, yeasts and bacteria. Sixteen IAPs inhibit, at least, one of the tested microorganisms showing similar or superior activities when compared to the antimicrobial peptides (AMPs) DS01 e Asc-8, used as controls. Two out of four peptides tested for their potential to act in synergy with commercial antibiotics were able to enhance the inhibition on *Candida albicans* biofilm formation. Biophysical analysis of the IAPs were performed to increase our knowledge about the peptides properties. The secondary structure of 21 IAPs and 6 AMPs were evaluated in the presence or absence of model phospholipid vesicles. The effect that these peptides have on the main phase transition of this phospholipid vesicles was also evaluated. A principal component analysis of the biophysical data clustered the peptides in four different groups. This analysis also highlighted the importance of hydrophobicity and propensity to helix formation and its implications in the activity of the IAPs. The results herein allowed a new understanding and evolution on our antimicrobial molecule prediction system that can be used in the search for new IAPs. The insertion of the IAPs information in its respective genome as an attempt to control infections caused by microorganisms is a promising perspective for the near future, as well as a deeper study with human pathogens in the search for new antibiotics or enhancers for the commercial ones.

PREFÁCIO

Desde a confirmação de que o DNA é a molécula hereditária dos seres celulares em 1944 por Avery, McLeod e McCarty, seguida pela descrição da estrutura em dupla hélice da mesma por Watson e Crick em 1953, a ciência da informação biológica tem avançado à passos largos. Parte desse avanço está diretamente relacionado ao sequenciamento do genoma do bacteriófago Phi-X174 por Sanger, Gilbert e Maxam, em 1977. Tal feito, juntamente com evoluções técnicas e químicas, permitiu o aumento de projetos genomas de procariotos e eucariotos, iniciados nos anos 1990 e que seguem até hoje.

É evidente o crescimento exponencial da quantidade de nucleotídeos/sequências com tais iniciativas ao longo do tempo. Já o real significado dessa informação, nem tanto. Peguemos como base o zigoto e um ser humano na fase adulta. Apesar das notáveis diferenças entre as células, a informação genética é a mesma, salvo algumas mutações e outros eventos que possam gerar variabilidade. As possíveis respostas para essas diferenças evidentes têm sido exploradas com outras abordagens amplas, tais como o transcriptoma e proteoma. O estudo funcional da informação genética tem permitido novos entendimentos sobre o ambiente celular, além de também contribuir para o aumento de informação em seus respectivos bancos de dados.

Mesmo com todo o avanço que temos nos dias de hoje, estamos longe de realmente entender o funcionamento celular e toda a potencialidade que existe nos genomas. A falta de estudos funcionais das proteínas/genes identificados em estudos *ômicos* é uma das razões. As funções de muitas proteínas/genes são atribuídas com base nos domínios conservados que as mesmas possuem, mas essas proteínas podem apresentar funções completamente distintas. Uma dessas proteínas pode ser fruto de um evento de duplicação gênica, tendo sofrido uma pressão de seleção diferente da cópia original, o que pode resultar em uma nova função. Não são poucos os exemplos, em diferentes organismos, visto que um dos principais eventos envolvidos na evolução de genomas é a duplicação gênica.

Podemos destacar também como parte da potencialidade, a presença de peptídeos encriptados em estruturas proteicas de alta massa molecular, que são liberados sob certas condições fisiológicas para exercerem sua função. Existem vários exemplos documentados de peptídeos bioativos encriptados. Em mamíferos, o nonapeptídeo hipotensor bradicinina é liberado da proteína cininogênio pela ação de calicreínas, atuando na regulação da pressão sanguínea, funções renais e cardíacas. A proteólise do cininogênio também libera peptídeos antimicrobianos e pode ser induzida por diversos patógenos. O mesmo é observado na proteína

proencefalina A que, ao sofrer proteólise, libera peptídeos opióides que interagem com receptores específicos, bem como dois peptídeos antimicrobianos.

A quantidade de “prisioneiros” bioativos identificados certamente continuará aumentando com a crescente disponibilidade de genomas/transcritos/proteínas em bancos de dados. Mas, da mesma forma, vários outros peptídeos podem continuar escondidos por não apresentarem sítios óbvios de clivagem, quiçá nenhum.

O acúmulo de evidências quanto a potencialidade dos genomas levou o grupo do Laboratório de Espectrometria de Massa, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a iniciar a busca por peptídeos antimicrobianos encriptados (PAIs) nos genomas de diversos organismos, dos mais diversos filos. Os resultados confirmaram que existe um potencial antimicrobiano não-óbvio encriptado em proteínas sem qualquer ação antimicrobiana nos diferentes indivíduos. Seis de quinze peptídeos selecionados apresentaram atividade contra, pelo menos, um dos microrganismos testados. Esse potencial logo despertou o interesse na busca por PAIs em plantas, vislumbrando a possibilidade da transformação das mesmas com sua própria informação visando a defesa contra patógenos. Essa tecnologia pode ser considerada uma alternativa à transgenia, no qual uma informação endógena, em vez de exógena, é utilizada para a defesa do organismo de interesse.

Esta tese apresenta a busca por possíveis PAIs no genoma de plantas de interesse, suas atividades, possíveis mecanismos de ação e contribuição que seus parâmetros físico-químicos têm para sua atividade. O capítulo 1 apresenta como a busca por esses peptídeos foi realizada, sua evolução quanto ao que havia sido proposto anteriormente pelo grupo, e a atividade biológica dos mesmos quando apresentados para diversos microrganismos. De forma complementar, alguns peptídeos foram avaliados quanto ao seu potencial sinérgico com alguns fármacos comerciais na inibição de biofilmes de *Candida albicans*, visando uma outra abordagem além daquela focada em plantas.

O capítulo 2 apresenta, sob aspectos estritos, a caracterização do comportamento dos PAIs selecionados quando na presença de vesículas fosfolípidicas, bem como dos efeitos por eles desencadeados nesses sistemas experimentais. O conjunto de resultados auferidos permitiu a categorização dos peptídeos em diferentes Grupos, em uma tentativa de evoluir o nosso modelo preditivo e contribuir para o melhor entendimento da tríplice predição/propriedades físico-químicas/atividade.

Capitulo 01
I prigionieri
(Os prisioneiros)

1.1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1. O início da vida na Terra

Nos dias atuais, acredita-se que o universo começou há aproximadamente 14 bilhões de anos, fruto de uma gigantesca explosão, chamada *Big Bang*. Essa ideia teve início com George Lemaître (Lemaître, 1927), e tem, desde então sofrido algumas mudanças e melhorias de acordo com o avanço do conhecimento e estudos sobre o cosmos. Cosmólogos estimam que 4 bilhões de anos após a explosão, as galáxias começaram a se fragmentar das nuvens de gases emitidas do *Big Bang*. Na nossa galáxia, a condensação da nebulosa solar levou à formação do nosso Sol e seus planetas há aproximadamente 4,6 bilhões de anos atrás.

A Terra primitiva era um ambiente hostil para a formação da vida como a concebemos. Contudo, essa realidade começou a mudar a partir da liquefação do vapor d'água, iniciado há 4,4 bilhões de anos (Wilde et al., 2001). Foi no vasto oceano formado, ou em pequenas poças, durante o resfriamento do planeta, que a vida teria surgido. Recentemente, cientistas descobriram na Groenlândia a evidência de vida mais antiga já reportada até hoje – estromatólitos de 3,7 bilhões de anos (Nutman et al., 2016). Os estromatólitos são definidos, de forma geral, como estruturas sedimentares que são produzidas através da atividade metabólica de comunidades de microrganismos, principalmente cianobactérias, através do aprisionamento e ligação de sedimentos, e/ou a precipitação de carbonato, podendo ou não conter microrganismos (Nutman et al., 2016). Essa descoberta acrescenta um novo fato aos estudos do relógio da genética molecular, na qual estima-se que a vida se originou no éon Hadeano, há mais de 4 milhões de anos. Contudo, apesar dos vestígios fossilizados indicando vida celular, a mesma é considerada um estágio avançado na evolução da origem da vida. Como então surgiu a vida na Terra àquela época, um ambiente abiótico?

Em torno de 1870, Charles Darwin, em uma carta para Joseph Dalton Hooker, sugeriu de forma informal, mas brilhante: “E se (e que grande se) nós pudéssemos conceber, em alguma pequena poça d'água quente, com todos os tipos de amônia e sais fosforados, na presença de luz, calor e eletricidade, que um composto proteico fosse quimicamente formado...”. Posteriormente, Oparin (1924) e Haldane (1929) propuseram, separadamente, uma teoria de que a vida na Terra teve início com a formação de moléculas orgânicas na atmosfera primitiva e nos oceanos, a partir de substâncias inorgânicas. Miller e Urey testaram experimentalmente a teoria de Oparin e Haldane, simulando o que acreditavam ser a atmosfera primitiva, rica em

metano, amônia, hidrogênio e vapor d'água e com constantes descargas elétricas. Após uma semana de ciclos de aquecimento, descargas elétricas, e resfriamento dos compostos da suposta atmosfera terrestre, o experimento foi interrompido e foi observado que 5 aminoácidos foram formados (Miller, 1953; Miller & Urey, 1959). Após o falecimento de Miller, os frascos lacrados dos experimentos foram analisados novamente, revelando que 25 diferentes tipos de aminoácidos haviam sido gerados, não apenas os 5 relatados inicialmente (Bada, 2013).

A confirmação da possibilidade de formar compostos orgânicos a partir de compostos inorgânicos revolucionou o pensamento sobre a origem da vida na Terra, diminuindo o número de adeptos à panspermia, teoria na qual precursores bioquímicos complexos ou microrganismos foram trazidos à Terra por meteoritos, apesar de não serem teorias totalmente excludentes. Mas, conceber que um processo de formação de compostos orgânicos foi o precursor de toda a vida atual, não é tarefa fácil. Ao observarmos as células, um conjunto de subsistemas químicos/bioquímicos (Ex.: DNA/RNA/proteínas) em pleno funcionamento e interdependentes, diversos questionamentos surgem: todos os subsistemas emergiram em conjunto? Ou eles surgiram um após o outro? Qual surgiu primeiro? A resposta definitiva sobre a origem da vida na Terra continua em aberto, mas há um consenso de que a vida que conhecemos hoje evoluiu de um dos bilhões de compostos que foram gerados, em diferentes pontos, apesar de haver discussões sobre qual surgiu primeiro.

A discussão da origem da vida, independente do ambiente no qual ele ocorreu, seja em situações gélidas, em ambientes quentes como nas ventas térmicas submarinas ou na presença de argila, está concentrada em duas principais ideias: I - “mundo de RNA”; II - primeiro metabolismo, também chamado de “mundo de proteínas”. No “mundo do RNA”, polinucleotídeos de ribose com capacidade de se auto-replicarem, seja em conjunto ou individualmente, e de realizarem outras funções catalíticas, foram as primeiras moléculas da vida, sendo também os ancestrais dos primeiros genomas. No “primeiro metabolismo”, enzimas foram as primeiras moléculas da vida, dando origem ao metabolismo, e depois ao surgimento de DNA e RNA, ou coevoluiram com o RNA, sendo que o metabolismo surgiu da interação de ambas as moléculas.

A ideia do RNA ser a molécula primordial data de aproximadamente 50 anos atrás, e foi proposta inicialmente por Oparin (1961), Haldane (1965), Woese (1967), Orgel (1968) e Crick (1968), ao discutirem sobre a origem do código genético. Com o passar das décadas, a hipótese do RNA ganhou mais adeptos, principalmente após a descoberta de que alguns RNAs podem catalisar reações, podendo atuar como enzimas, também chamadas de ribozimas (Kruger

et al., 1982; Zaug & Cech, 1985; Zaug & Cech, 1986). Mas, assim como várias descobertas durante os anos trouxeram novos entusiastas, diversos questionamentos sobre a plausibilidade do RNA ser a molécula primordial foram levantados. Dentre eles, temos: I - os nucleotídeos são moléculas mais complexas do que os aminoácidos, e seu aparecimento espontâneo parece ser improvável, tendo como base diversos experimentos falhos em provar isso em condições pré-bióticas; II – outro tipo de açúcar mais simples que a ribose, como a centro do nucleotídeo; III - o RNA é extremamente instável em ambientes de temperatura elevada; IV - a catálise realizada por RNAs é uma característica de RNAs longos; IV - o repertório catalítico dos RNAs é muito limitado (Bernhardt, 2012).

Recentemente, resultados interessantes foram publicados, no qual algumas das perguntas listadas acima começam a ser respondidas. Powner et al. (2009) demonstraram com sucesso uma via de síntese química de nucleotídeos pirimidínicos ativados a partir de moléculas precursoras pré-bióticas consideradas plausíveis (cianamida, cianoacetileno, glicolaldeído, gliceraldeído e fosfato inorgânico), na qual a formação desses nucleotídeos não passa por um estágio de ribose e nucleobase livre, e que a presença de luz UV é essencial para o processo.

A demonstração desse mecanismo, juntamente com a identificação de que sequências de RNA de apenas 7 nucleotídeos são capazes de se autoclivarem (Vlassov et al., 2005) tem servido como pilares para a sustentação da hipótese do “mundo de RNA”. Mas, por que não proteínas primeiro? É certamente possível que existiam peptídeos funcionais não-codificados antes do advento da síntese proteica codificada. Contudo, um dos maiores problemas dessa ideia, é a forma como as proteínas poderiam se replicar sem a presença de um ribozima, como um ancestral do tRNA (Carter Jr. & Wolfenden, 2015). Outro ponto contra, é que nós só conseguimos detectar a história proteica até o ponto em que as proteínas começaram a ser codificadas (Bernhardt, 2012), levando ao surgimento de uma linha que propõe a coevolução de peptídeo-RNA. Apesar de longe de ser perfeita, e muitas vezes criticada por ser o novo “mantra criacionista” (Kurland, 2010), a hipótese do “mundo de RNA” parece ser a melhor explicação que temos até o momento.

No entanto, mesmo que se chegue a um consenso sobre o RNA ser a molécula primordial da vida como conhecemos hoje, em que momento teve início a vida celular? A partir do momento que houvesse lipídeos suficientes, essas moléculas se arranjariam espontaneamente em membranas, possivelmente encapsulando um ou mais RNAs. Essa protocélula permitiria o aumento do potencial metabólico e evolutivo do sistema, uma vez que as reações ocorreriam em ambientes mais controlados. Strulson et al. (2012) observaram que a

catálise direcionada pode ser melhorada com a compartimentalização, uma vez que há uma maior quantidade de moléculas em um ambiente fechado, assim como de reagentes que podem auxiliar em outras funções, como Mg^{2+} , íon importante para a síntese de fitas de RNA de forma não-catalítica (Adamala et al., 2013).

E qual seria a composição da primeira protocélula? Diversos estudos foram capazes de criar células de diversas composições, sendo a maioria baseadas em lipídeos, mas também em componentes proteicos e outras em emulsões água e óleo (Higgs & Lehman, 2014). Um desenvolvimento interessante foi apresentado por Patel et al. (2015), no qual os autores propõem uma origem comum para RNA, proteína e precursores de lipídeos, a partir de intermediários pré-bióticos considerados plausíveis, como o cianeto de hidrogênio e sulfeto de hidrogênio. Os autores testaram a hipótese de que o surgimento concomitante das diferentes moléculas faz mais sentido do que imaginar diferentes cenários e processos químicos para a geração das mesmas moléculas, ou seja, o surgimento sequencial dos compostos. Em um sistema único, os autores não conseguiram observar todas as reações que levaram a síntese química de diversos aminoácidos, nucleotídeos e precursores de lipídeos simultaneamente, mas foram capazes de delinear as rotas de síntese quando cada grupo foi avaliado separadamente. A imagem que surge é a de uma rede de reações que podem ter se desenvolvido em diferentes poças através do tempo, que poderiam se encontrar devido a variações nos oceanos com o passar dos anos, juntando os diferentes compostos e dando origem à base para o surgimento do ancestral comum da vida atual.

Tal ideia é parcialmente contrastante com a ideia de um “mundo de RNA”, mas ela não a refuta, uma vez que a ideia do RNA ser a molécula primordial está intimamente ligada à sua capacidade de se autorreplicar e de catalisar reações químicas. A ideia de um sistema no qual precursores lipídicos poderiam ser sintetizados, concomitantemente a nucleotídeos e aminoácidos, utilizando os mesmos precursores químicos, simplifica a ideia para o surgimento da vida celular, no éon Hadeano.

1.1.2. Mundo de DNA e ancestral comum

É muito provável que diversos “focos de vida” tenham surgido nas diferentes poças/argila/ventas em mais de uma ocasião durante a evolução bioquímica, se considerarmos o RNA como a molécula primordial. Mesmo assim, toda a vida na Terra parece derivar de uma única origem, tendo como base as semelhanças nos mecanismos moleculares e bioquímicos de

todos os seres vivos, dentre eles, o código genético. Apesar de não ser universal, um triplete de nucleotídeos codifica para um aminoácido qualquer em todos os organismos já estudados. Se mais de uma origem existisse, era de se esperar códigos genéticos distintos entre os descendentes de cada ancestral.

Se múltiplas origens são possíveis, mas a vida moderna derivou de apenas uma, em que estágio que um sistema bioquímico começou a predominar? Novamente, não há uma resposta definitiva, mas é provável que o sistema predominante foi aquele que desenvolveu a capacidade de sintetizar proteínas e a adotar genomas com base em DNA.

Então, como que o mundo de RNA evoluiu para o mundo de DNA? A primeira grande mudança foi, provavelmente, o desenvolvimento de enzimas proteicas, as quais suplementaram e eventualmente substituíram a maioria das atividades catalisadas por ribozimas. Existem várias questões não respondidas relacionadas a essa fase da evolução bioquímica, incluindo a razão da transição RNA-proteína como catalisadores. Acredita-se que a catálise mediada por proteínas é mais eficiente por conta da flexibilidade inerente das cadeias polipeptídicas quando comparadas com as estruturas rígidas dos RNAs (Brown, 2006).

A transição para catálise por proteínas levou a uma mudança nas funções dos protogenomas de RNA. Em vez de serem diretamente responsáveis pelas reações bioquímicas ocorrendo nas protocélulas iniciais, os protogenomas se tornaram moléculas codificadoras, tendo como principal função especificar a construção de proteínas catalíticas. Teorias sobre a origem da síntese proteica e o código genético sugerem que as moléculas codificadoras podem ter sido sintetizadas por ribozimas. Mas, independentemente do mecanismo, o resultado foi uma situação paradoxal na qual os protogenomas de RNA abandonaram suas funções como enzimas, na qual eles eram bons, e assumiram a função de codificar, na qual eles não eram tão versáteis devido à instabilidade da ligação fosfodiéster do RNA (Brown, 2006).

A transferência da função codificadora para o DNA parecia evolutivamente inevitável. Especula-se que a redução de ribonucleotídeos em desoxiribonucleotídeos não seria difícil de ocorrer nas condições primitivas, e que os novos nucleotídeos poderiam ser polimerizados em cópias dos protogenomas de RNA, talvez pela ação de uma enzima similar à transcriptase reversa. A substituição da uracila pela timina, sua versão metilada, provavelmente conferiu ainda mais estabilidade ao polinucleotídeo DNA. A adoção da estrutura em dupla fita provavelmente foi facilitada pela possibilidade de reparar danos no DNA pela cópia da fita complementar, além de ser mais resistente a danos causados por radiação UV (Lazcano et al., 1998; Brown, 2006).

De acordo com esse cenário, o primeiro genoma de DNA possivelmente compreendia várias moléculas separadas, cada uma codificando para uma proteína, ou seja, um gene. A junção desses genes no primeiro cromossomo (o qual pode ter ocorrido antes da transição para DNA também) teria aumentado a eficiência da distribuição dos genes durante a divisão celular, já que é mais fácil organizar a separação de um grande cromossomo do que de diversos genes separados. Como na maioria dos casos na evolução inicial de genomas, diversos mecanismos diferentes para a junção de genes em cromossomos foram propostos. Assim como para a evolução dos genomas (Brown, 2006).

Esse sistema, de maior potencial catalítico e de maior acurácia na replicação, conferiu as células uma vantagem significativa aos sistemas contendo protogenomas de DNA. As células contendo DNA-RNA-proteínas se multiplicariam mais rápido, permitindo que elas competissem e captassem mais nutrientes do que as células baseadas em apenas RNA ou RNA-proteínas. Essa vantagem biológica, junto com o grande bombardeamento de asteroides que ocorria na Terra nesse período, podem ter contribuído para que o último ancestral comum universal (LUCA, *last universal common ancestor*) tenha sido selecionado.

1.1.3. Evolução de genomas e da diversidade

A descoberta da estrutura do DNA (Watson & Crick, 1953) há pouco mais de 60 anos permitiu diversos avanços no entendimento biológico e evolutivo. A possibilidade de sequenciar genomas inteiros em um curto período permitiu um acúmulo considerável de informação das mais diversas espécies. Esses dados têm permitido uma análise evolutiva mais profunda da árvore da vida.

Há pouco tempo, acreditava-se que a árvore da vida era composta por três domínios, descendentes do LUCA: Bacteria, Archaea e Eukarya. Apesar de serem procariotos, os indivíduos do domínio Archaea se assemelham mais aos membros do domínio Eukarya, do que daqueles do domínio Bacteria, sugerindo uma proximidade maior dos dois primeiros. Tal proximidade, têm sido alvo de intenso debate. Estudos filogenéticos recentes indicam que a árvore da vida, na verdade, é composta apenas por dois domínios, Bacteria e Archaea, e que o grupo Eukarya se originou do último, a partir da simbiose com o que hoje é a mitocôndria (Williams et al., 2013; Raymann et al., 2015). Os registros fósseis corroboram a ideia de apenas dois domínios iniciais, visto que o primeiro registro de eucariotos data de 1,7 bilhões de anos, uma diferença de 2 bilhões para os primeiros procariotos (Nutman et al., 2016).

Esse avanço no entendimento da árvore da vida permitiu que Weiss et al. (2016), ao analisarem mais de 6×10^6 genes de Archaea e Bacteria, chegassem a conclusão de que 355 desses genes são advindos do ancestral desses dois domínios. As famílias de genes indicam que o organismo era anaeróbico, fixador de N_2 e CO_2 , termofílico, e possivelmente, tinha as ventas térmicas submarinas como habitat.

Mesmo com o rastreamento de 355 genes do LUCA, a sequência de nucleotídeos completa do genoma provavelmente jamais será conhecida, uma vez que os dados utilizados para remontar essa história são compostos, principalmente, de indivíduos obtidos nos dias atuais. Mas, a análise dos dados em buscas de respostas do passado, também é extremamente útil para o entendimento da evolução até os dias atuais, a relação dos indivíduos com outros seres, e suas respostas ao seu ambiente.

Analisando o DNA dos diferentes domínios, junto com os registros fósseis, é possível observar que mudanças morfológicas ocorreram com o passar do tempo. Essa evolução morfológica está diretamente relacionada com a evolução dos genomas (Brown, 2006). É importante ressaltar que a evolução citada não significa superioridade. Apenas, que essas mudanças foram selecionadas pelas vantagens atribuídas a elas, naquele dado período, ao seu portador.

Ao caminharmos “para cima” na árvore evolutiva, é possível observar um aumento na complexidade dos genomas. Genomas de mamíferos, por exemplo, são compostos por vários cromossomos lineares, ao passo que as bactérias possuem apenas um, circular. Tal fato também implica em uma quantidade maior de nucleotídeos. A principal contribuição para essa superioridade numérica de nucleotídeos em eucariotos é atribuída às regiões não-codantes dos genomas. No entanto, ela também está diretamente relacionada ao maior número de genes que esses seres possuem, quando comparados com os procariotos, o que resulta em um maior número de funções no geral.

A aquisição de novos genes ocorre, principalmente, por duas vias: i - a duplicação de genes ou do genoma inteiro; ii – aquisição de genes de outras espécies. Existem vários mecanismos pelo qual a duplicação gênica pode ocorrer, como o *crossing-over* desigual, troca desigual entre cromátides irmãs, durante a replicação gênica, elementos transponíveis, dentre outros (Reams & Roth, 2015).

A duplicação de um gene começa como uma mutação em um único indivíduo e não existe um destino pré-determinado para ela. Ela pode ser perdida ou fixada na população, seja por seleção natural ou por deriva genética (Conant & Wolfe, 2008). A pressão de seleção sob

os genes, varia de acordo com a importância do mesmo para a sobrevivência do organismo em questão, da posição em um dado cromossomo, ou se o evento envolve a duplicação do genoma inteiro.

A perda da duplicação simples é o destino mais provável, assim como a ocorrência de mutações neutras, que possam levar esse gene a se tornar um pseudogene após sua fixação no genoma da população (Innan & Kondrashov, 2010). Os genes duplicados também podem manter a mesma função e atuarem em conjunto. Outro caminho possível, é a ocorrência de mutações que podem levar à geração de uma nova função, similar à anterior, como ocorre na diversificação de venenos do cnidário *Acropora digitifera* (Gacesa et al., 2015). Entretanto, a nova função não está muitas vezes relacionada à anterior. Os peptídeos anti-congelantes de alguns peixes da Antártida são um exemplo, uma vez que foram co-optados de sequências repetitivas do gene do tripsinogênio (Chen et al., 1997). A co-opção é definida como as características evolutivas que um gene possui, mas que normalmente, não são aparentes devido a sua função primária (Connant & Wolfe, 2008). Às vezes, as novas funções podem ser surpreendentes, como no caso dos peixes antárticos.

Os eventos que ocorreram na evolução dos genomas, desde o LUCA até os dias de hoje, ainda guardam muitos segredos. Explicar toda a diversidade gênica existente talvez nunca seja possível, mas a era genômica tem permitido uma análise mais ampla e profunda sobre qual o papel evolutivo de várias duplicações, principalmente de genomas inteiros, na especiação, adaptação de alguns indivíduos ao seu ambiente, assim como a sua interação com outros organismos (Connant & Wolfe, 2008; Hermansen et al., 2016).

1.1.4. Peptídeos antimicrobianos e interesse econômico

Dentre a diversidade gerada durante a evolução, podemos destacar uma classe de moléculas de suma importância, desde tempos ancestrais, para a sobrevivência de vários seres vivos: os peptídeos antimicrobianos.

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) são oligopeptídeos que variam de dois a cem resíduos de aminoácidos (Wang et al., 2016), em sua maioria catiônicos, e possuem amplo espectro de organismos alvo, desde vírus até parasitas (Bahar & Ren, 2013). São moléculas que possuem a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos, podendo levar a sua morte, seja pela permeabilização e lise de membranas ou por uma série de outros mecanismos (Brogden, 2005).

AMPs de praticamente todos os organismos, de procariotos até humanos, já foram isolados e caracterizados. Em procariotos, essas moléculas são ativas no controle do crescimento de outros procariotos que ocupam nichos semelhantes (Li et al., 2012). Em eucariotos, os AMPs representam uma parte antiga e universal do sistema imune inato dos organismos de diferentes reinos, constituindo a primeira barreira contra invasões de patógenos (Tossi et al., 2000). Tal atividade é importante para plantas e insetos que, ao contrário dos mamíferos, não possuem um sistema imune adaptativo (Phoenix et al., 2013).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser produzidos de forma canônica, através da expressão de genes e síntese ribossomal (Brand et al., 2002), sendo denominados por alguns como AMPs verdadeiros, ou através de processos não-ribossomais, envolvendo o metabolismo secundário dos organismos (Brito et al., 2014). A grande variedade de estruturas primárias dos vários AMPs descritos até hoje dificulta a categorização dos mesmos em grupos. Contudo, de forma geral, o agrupamento dos peptídeos de acordo com sua estrutura secundária é bem aceito. Os AMPs são divididos em quatro grandes famílias: i – α : peptídeos que se estruturam em α -hélice. Ex.: Dermaseptinas (Brand et al., 2002); ii – β : peptídeos que se estruturam em conformações β . Ex.: lactoferricina B (Hwang et al., 1998); iii – $\alpha\beta$: peptídeos que possuem α -hélice e conformações β , podendo ou não ser estabilizadas por pontes dissulfeto. Ex.: defensinas (Vriens et al., 2016); iv - não $\alpha\beta$: peptídeos que não possuem nenhuma das estruturas anteriores, normalmente aleatórios. Ex.: indolicina bovina (Rozek et al., 2000).

O número de AMPs identificados tem aumentado consideravelmente desde a descoberta e confirmação do potencial antimicrobiano da gramicidina, isolada de *Bacillus brevis*, em 1939 (Dubos, 1939a; Dubos, 1939b). Desde a descoberta da magainina, na secreção do anfíbio *Xenopus laevis* (Zaslhoff, 1987), tornou-se claro que a secreção de anfíbios inclui um espectro de vários peptídeos antimicrobianos, além de outros peptídeos bioativos, incluindo peptídeos hipotensores, neuropeptídios, dentre outros (Brand et al., 2006; Pukala et al., 2006). A partir desse ponto, o interesse na plethora de atividades da secreção de anfíbios para fins biotecnológicos resultou na descoberta de novos AMPs (Bulet et al., 2004; Thevissen et al., 2007; Barbosa et al., 2015).

Tais estudos também foram acompanhados por outros que exploravam o potencial antimicrobiano das defensinas, AMPs presentes em vertebrados, invertebrados, fungos e plantas (Bulet et al., 2004; Thevissen et al., 2007). A presença dessas defensinas em espécies tão distantes na árvore da vida, mas com sequências, estruturas e modos de ação similares, indicam que as defensinas evoluíram de um único precursor. A conservação do motivo γ desses

peptídeos, sugere que um ancestral comum procariótico, há aproximadamente 2,6 bilhões de anos atrás, deu origem as defensinas (Yount et al., 2006; Yeaman & Yount, 2007). Essas moléculas, juntamente com os AMPs oriundos de anfíbios, contribuem significativamente ao total de peptídeos descobertos até hoje. Atualmente, o banco de dados APD (*Antimicrobial Peptide Database*, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) possui 2749 peptídeos naturais depositados.

Há um crescente interesse nos peptídeos antimicrobianos pela sua habilidade de matar um amplo espectro de microrganismos, pelo seu potencial sinérgico com outras drogas, e pela rara aparição de indivíduos resistentes aos mesmos (Kang et al., 2014; Thevissen, 2016). O aumento da quantidade de patógenos resistentes a diversas drogas tem ocorrido em um ritmo superior aquele necessário para o desenvolvimento de novas drogas, evidenciando a necessidade de alternativas adequadas aos antibióticos atuais (Giuliani et al., 2007).

Defensinas de plantas, por exemplo, têm sido constantemente demonstradas como peptídeos com alto potencial terapêutico, principalmente por potencializar a atividade de caspofungina e anfotericina na inibição de biofilmes de *Candida albicans* (Vriens et al., 2015; Vriens et al., 2015). Apesar dessas vantagens, os AMPs apresentam algumas desvantagens como baixa estabilidade em ambiente rico em proteases, como o sangue, alto custo de produção, e toxicidade (Kang et al., 2014).

Além do interesse inerente por sua atividade antimicrobiana, os AMPs muitas vezes desempenham outras funções também. Eles podem atuar como mediadores de inflamação (Pazgier et al., 2006), auxiliar na cicatrização (Supp et al., 2004), dentre outras atividades. Tal fato, fez com que alguns peptídeos fossem descobertos, inicialmente, por uma outra função desempenhada, a qual depois foi verificada como antimicrobiana (Jensen & Hancock, 2009).

Existem vários genes/proteínas que possuem funções diferentes daquela inicialmente previstas aos mesmos. As abordagens ômicas dependem de informações confiáveis depositadas em bancos de dados, o que nem sempre é o caso. A falta de validação através de ensaios específicos para a confirmação da atividade/função de certos grupos de proteínas, é prática comum, e propõe-se que essa mentalidade seja modificada para o melhor entendimento da informação que vem sendo gerada (Ramada et al., 2016). Além disso, a dependência de bancos de dados muitas vezes esconde o que já se encontra naturalmente escondido. O número de relatos de casos de proteínas que carregam em sua estrutura peptídeos bioativos encriptados, têm aumentado consideravelmente nos últimos anos (Meisel & Bockelmann, 1999; Dores et al., 2002; Demidova-Rice et al., 2012).

1.1.5. Potencial escondido nos genomas

É sabido que proteólises parciais em matrizes biológicas geram uma gama de fragmentos proteicos, e entre os quais podem ser verificados, peptídeos bioativos. Em vertebrados, são vários os precursores proteicos de alta massa molecular que sofrem processamento enzimático liberando peptídeos, os quais se ligam a receptores dando continuidade ao processo de sinalização fisiológica.

As cininas são oligopeptídeos vasodilatadores que contém o nonapeptídeo bradicinina (BK) como parte de sua sequência. Estas possuem diferentes efeitos fisiológicos em mamíferos, incluindo a regulação da pressão sanguínea, funções renais e cardíacas, sendo também associadas a complicações hipertensivas e inflamatórias (Regoli & Barabe 1980). A proteólise do cininogênio também libera peptídeos antimicrobianos (AMPs) que atuam como uma primeira barreira na resposta imune à invasão de patógenos em humanos (Cagliani et al., 2013).

Outro exemplo são as encefalinas, pentapeptídeos com atividade analgésica derivados do precursor pró-encefalina A, uma proteína de 285 aminoácidos (Lewis & Stern, 1983; Dores et al., 2002). Assim como as cininas, a clivagem da proteína parental leva a liberação de dois peptídeos antimicrobianos aniônicos, sendo um deles uma versão truncada (encelitina) do outro (peptídeo B), que participam da resposta imune inata (Phoenix et al., 2013).

Sabe-se, também, que proteínas do leite, quando submetidas a um processo de fermentação bacteriana controlada, liberam peptídeos com atividades opióide, vasodilatadora e antimicrobiana (Meisel & Bockelmann, 1999). Esse processo de liberação de moléculas bioativas também ocorre no trato gastrointestinal dos jovens mamíferos durante a amamentação (López-Exposito & Recio, 2008). Proteínas do leite como caseínas e lactoferrinas apresentam vários peptídeos antimicrobianos em sua estrutura, que têm sido estudados e testados para seu potencial biotecnológico. Entretanto, a prospecção de fragmentos proteicos com atividade biológica tem sido feita tradicionalmente a partir de abordagens experimentais, como a digestão parcial das matrizes, seguida da descrição dos fragmentos gerados e realização de testes específicos (Meisel & Bockelmann, 1999; Demidova-Rice et al., 2012).

A mudança na forma de observar tais sequências pode abrir uma nova vertente de possibilidades a serem exploradas, em diferentes campos, como a agricultura e a obtenção de novos antibióticos.

1.1.6. Peptídeos encriptados na agricultura

A agricultura brasileira alcançou um forte crescimento nas últimas três décadas, sendo que as exportações agrícolas do Brasil desempenham um papel importante nos mercados internacionais. O Brasil é o segundo maior exportador agrícola mundial e o maior fornecedor de açúcar, suco de laranja e café. Em 2013, ultrapassou os Estados Unidos como o maior fornecedor de soja e ainda é um grande produtor de milho, algodão e arroz – cuja maior parte é consumida no mercado interno (OECD-FAO, 2015).

Apesar do crescimento na produção, a área atualmente cultivada de muitas culturas diminuiu desde o início dos anos 2000 devido a choques climáticos (como, por exemplo, geada e seca) bem como pelo dano causado por pestes e doenças, como é o caso do café (OECD-2015). Grande parte da perda em lavouras no Brasil e no mundo atribui-se aos fungos fitopatogênicos, sendo que anualmente um montante considerável é gasto para o seu controle. A cacauicultura brasileira, por exemplo, sofreu ao final da década de 1980 grandes perdas causadas pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, agente causador da vassoura-de-bruxa (Frias et al., 1991), e nunca mais recuperou sua posição como um dos maiores produtores do mundo.

O controle destes patógenos é realizado principalmente através da aplicação de fungicidas, um processo eficiente, mas oneroso para os produtores agrícolas, tóxico ao homem e poluente (Punja & Utkhede, 2003; Lorito et al., 2010). Devido aos fatores negativos associados a este método de controle, estudos de alternativas têm sido bastante explorados nas duas últimas décadas.

Dentre os estudos que visam diminuir esse impacto, temos o uso de microrganismos como agentes de controle biológico (Viterbo et al., 2002; Verma et al., 2007). Inclusive, diversos gêneros de bactérias e fungos já são utilizados comercialmente com essa finalidade, especialmente o gênero *Trichoderma*, que possui elevada capacidade antagonista de fitopatógenos (Benítez et al., 2004; Vinale et al., 2008; Brotman et al., 2012, Ramada et al., 2016).

Espécies do gênero *Trichoderma*, por exemplo, são capazes de produzir metabólitos economicamente importantes, tais como enzimas industriais (celulases e hemicelulases), antifúngicos e antibióticos. Estudos moleculares com espécies de *Trichoderma* utilizadas na agricultura demonstram que as enzimas mais frequentemente produzidas durante o micoparasitismo, evento característico desse gênero, são glucanases, quitinases e proteases. Estas enzimas estão relacionadas à degradação da parede celular do hospedeiro, constituída

principalmente de um complexo glucana-quitina ligado a outros polissacarídeos, além de proteínas (Almeida et al., 2007, Latgé 2010).

Nos últimos anos, o foco em estudos de genes de interesse foi ampliado com o avanço tecnológico das metodologias de sequenciamento e proteômica. Dessa forma, o estudo de um dado evento, como a interação de um organismo com outro, passou a ser abordado de forma mais ampla, gerando uma quantidade maior de informações e conhecimentos acerca dessa interação (Vieira et al., 2013; Steindorff et al., 2014; Ramada et al., 2016). O conjunto de informações obtidas a partir desses estudos também são úteis para uma outra alternativa ao uso de produtos químicos: a transgenia em plantas.

Plantas geneticamente modificadas são propostas úteis para reduzir as pragas que interferem na produção agrícola e aumentar a tolerância destas a estresses ambientais (Montero-Barrientos et al., 2008; Aragão & Faria, 2009; Cunha et al., 2010). A metodologia baseia-se na transferência de material genético exógeno (DNA de outro organismo) para uma célula vegetal-alvo, de tal forma que este é incorporado e expresso de forma estável no seu genoma. A posterior regeneração *in vitro* dessa célula inicialmente transformada irá gerar uma planta transgênica, na qual é possível detectar alterações morfológicas e fisiológicas, ou mesmo, observar a resistência ao confrontar a planta com o patógeno (Aragão & Brasileiro, 2002; Aragão et al., 2002). A transformação de plantas com genes de microrganismos (Dana et al., 2006; Kumar et al., 2010), assim como peptídeos antimicrobianos de anfíbios e humanos, por exemplo (Ponti et al. 2003; Rivero et al., 2012; Jung et al., 2012), resultaram no aumento da resistência das plantas a doenças fúngicas e bacterianas.

A importância dos transgênicos no controle de doenças é observado no campo também. No Brasil, por exemplo, mais de 90% da safra da soja de 2014/2015 era composta de grãos geneticamente modificados (Céleres, 2016). Apesar do alto número, diversos países da Europa e da Ásia, além de diversos ambientalistas ao redor do mundo, advogam contra o plantio de transgênicos por diversos motivos: são contra o uso de plantas que consideram não naturais; possíveis danos à saúde, apesar de não haver evidência científica para o mesmo (Fahlgren et al., 2016); a resistência das plantas a certos agrotóxicos; dentre outras razões. A resistência às cultivares transgênicas, muitas vezes sem infundadas em termos científicos, faz com que outras abordagens se tornem necessárias.

Partindo da premissa que existe um grande potencial biologicamente ativo dentro de diversas proteínas, Brand et al. (2012) deram início à um processo inovador de fragmentação teórica dessas matrizes, em busca de peptídeos antimicrobianos encriptados em proteínas

expressas. É essencial reconhecer que as proteínas parentais, as quais possuem tais fragmentos como parte constitutiva, não apresentam a atividade em questão quando íntegras. Com o objetivo de acelerar o processo de descoberta desses fragmentos, foi desenvolvido um programa de busca de moléculas encriptadas. O programa Kamal (nomeado em função do primeiro instrumento de navegação que se tem conhecimento, de origem árabe) realiza buscas por fragmentos proteicos, com propriedades físico-químicas similares a moléculas antimicrobianas, dentro do genoma de qualquer organismo (Figura 1.01). As sequências protéicas inseridas no programa são avaliadas por uma janela basculante, de acordo com o tamanho do fragmento desejado (Ex. 16 resíduos de aminoácidos). A cada possível fragmento, os parâmetros-físico químicos dessa sequência são avaliados e comparados com aquelas definidas pelo usuário. Caso a sequência passe por todos os filtros de avaliação, essa sequência é apresentada como um possível PAI (Figura 1.01).

Kamal atua como um filtro de fragmentos proteico, calculando suas propriedades físico-químicas específicas.

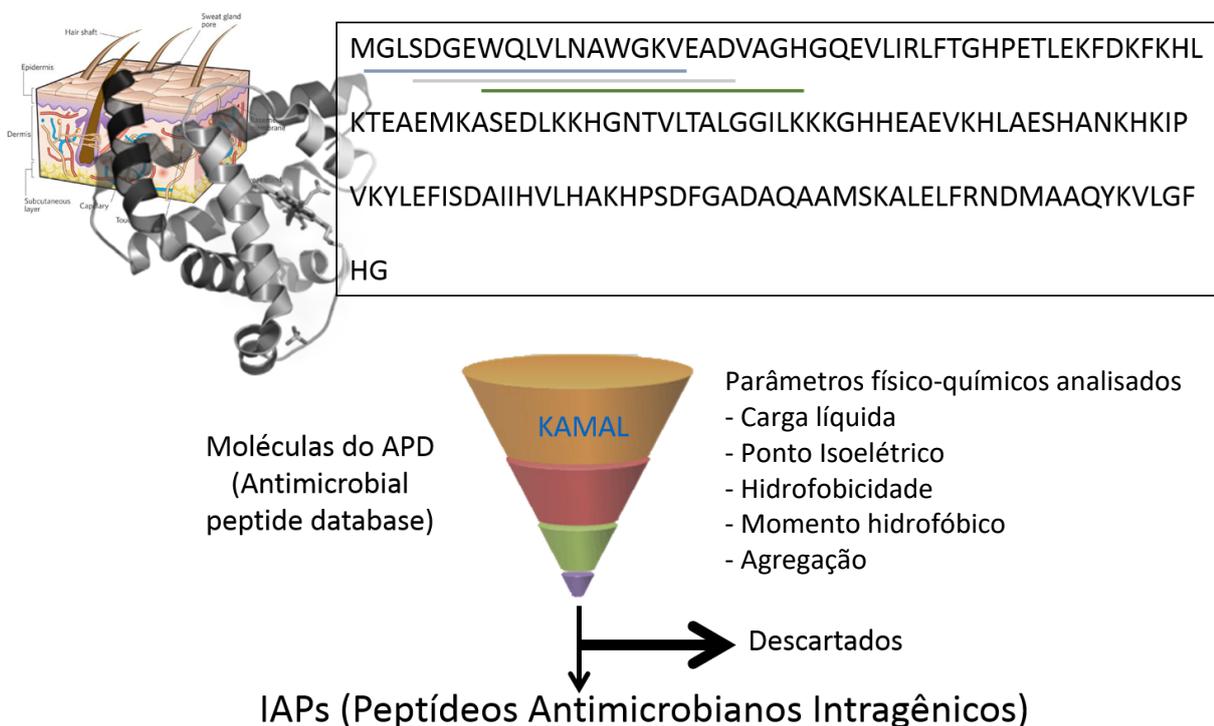


Figura 1.01 – Processo de filtragem e seleção de fragmentos proteicos com potencial antimicrobiano (Brand et al., 2012). Peptídeos que possuem todas as propriedades físico-químicas definidas pelo usuário, são filtrados e apresentados pelo software.

Quinze peptídeos, de organismos distantes como bactérias e mamíferos, foram selecionados de proteínas que não possuíam atividade antimicrobiana. Seis peptídeos (40%) apresentaram atividade antimicrobiana contra, pelo menos, um dos microrganismos testados, demonstrando um potencial escondido não explorado. Logo, a possibilidade de aplicação biotecnológica desta metodologia na agricultura se tornou evidente: geração de plantas resistentes à bactérias, fungos e insetos sem a introdução de material genético exógeno, representando uma promissora alternativa à transgenia convencional. A tal abordagem, cunhou-se o nome de intragenia (Brand et al., 2012).

Como prova de conceito, Brand et al. (2012) geraram plantas de soja (*Glycine max*) contendo o PAI gb|ABM17058.1|(213–231), e avaliaram o efeito da transformação na inibição do crescimento do fungo *Phakopsora pachyrhizi*, agente causador da ferrugem asiática (Figura 1.02). Foi possível observar que as plantas transformadas apresentaram uma redução significativa na formação de urédias quando comparada com as plantas controle. Com a atual e crescente massa de genomas de plantas disponíveis, a ideia da intragenia, juntamente com a melhoria no sucesso de predição de PAIs e consequente melhora na exploração do potencial encriptado, faz com que essa abordagem seja extremamente promissora.



Figura 1.02 – Plantas de soja transformadas com o peptídeo gb|ABM17058.1|(213–231). Plantas não transformadas e transformadas foram crescidas até o estágio V3 e borrifadas com uma suspensão de esporos de *P. pachyrhizi* (10^6 esporos.mL⁻¹). A - As plantas transformadas (72.14.5 e 72.14.9) foram co-cultivadas com as plantas controle (wt/+ e wt/-) por 15 dias. B – Linhagens controle designadas como wt/- e wt/+ correspondem as plantas selvagens sujeitas a borrição com água ou com a suspensão de esporos, respectivamente. As linhagens intragênicas apresentaram uma redução significativa no número de urédias por área foliar (Brand et al., 2012).

Com base no observado anteriormente, outras culturas de importância socioeconômica no Brasil, que sofrem severas perdas causadas por patógenos, podem ser exploradas. O cacauzeiro (*T. cacao*) é uma planta perene, de aproximadamente 4 a 8 metros, que produz o fruto cacau, principal matéria-prima para a fabricação de chocolate (Argout et al., 2011). Até o final da década de 1980, o Brasil era um dos 5 maiores produtores do mundo, sendo que 90% do material produzido era exportado.

Hoje, a situação é outra. Apesar de ocupar o 6º lugar como maior produtor mundial, o Brasil importa mais cacau do que produz (Santos et al., 2015). Desde a inserção do fungo hemibiotrófico *Moniliophthora perniciosa* (Basidiomycota, Agaricales), agente causador da vassoura-de-bruxa, em 1989, no sul da Bahia, a produção de cacau brasileira caiu. O clima úmido da região propiciou a rápida disseminação desse fungo, uma vez que o mesmo é originário da Amazônia brasileira, região rica em cacau, local no qual ambas as espécies coevoluíram (Frias et al., 1991; Purdy & Schmidt, 1996). O ciclo da doença tem início quando basidiocarpos formados em plantas infectadas, liberam basidiósporos que são dispersos pelo vento. Em locais com alta umidade, os basidiósporos têm a capacidade de infectar qualquer tecido meristemático de cacau (Evans, 1980; Frias et al., 1991). Ao atingir os tecidos meristemáticos, os basidiósporos formam o tubo germinativo para infectar a planta até 4 horas depois do primeiro contato (Sena et al., 2014). Geralmente, a infecção dos meristemas ocorre até 6 horas após o primeiro contato (Sena et al., 2014).

Após a infecção, a densidade de micélio do fungo dentro da planta é bem baixa (Orchard & Hardwick, 1988; Penman et al., 2000). Essa fase, denominada de biotrófica, é caracterizada pelo aparecimento dos sintomas clássicos da interação fungo/hospedeiro: hipertrofia de tecidos distais, perda de dominância apical, proliferação de ramos auxiliares e a formação de galhos anormais, resultando em uma estrutura chamada de vassoura-verde (Holliday, 1980; Meinhardt et al., 2006). Em linhagens suscetíveis, a formação da vassoura verde leva em torno de 60 dias e o micélio começa a se dispersar pelos ramos (Sena et al., 2014). Após 90 dias, as vassouras-verdes se tornam necróticas, chamadas, então de vassoura seca (Evans, 1980; Sena et al., 2014). Em linhagens resistentes, esse processo demora mais a ocorrer (Sena et al., 2014). As regiões necróticas não se destacam da planta. Dessa forma, sob condições ideais, os micélios que colonizaram as vassouras passam por mudanças morfológicas para a produção do basidiocarpo e, assim, iniciar novamente o ciclo do patógeno (Meinhardt et al., 2006).

Diversos métodos de controle têm sido estudados em busca do controle dessa doença. Estudos de possíveis marcadores genéticos, envolvidos na resistência de cacau à *M. perniciosa*,

têm sido realizados com focos em processos de melhoramentos (Santos et al., 2015). Atualmente, a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) comercializa um produto, composto de esporos de *Trichoderma stromaticum*, para o controle da doença vassoura-de-bruxa. *Trichoderma spp.* é conhecido como um agente de controle biológico capaz de inibir o crescimento de diversos fungos (Steindorff et al., 2014; Ramada et al., 2016). Há uma estimativa de controle de 56% quando o produto é aplicado na planta, mas a eficiência do processo está diretamente ligada as condições climáticas, época de aplicação, dentre outros fatores, o que pode diminuir ainda mais essa taxa de controle.

Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja do mundo, tendo ultrapassado os Estados Unidos (MAPA, 2016a). Tal posição, faz com que o setor citrícola represente um importante elemento para geração de impostos, empregos, investimento e consumo para o país. Outro fato decorrente dessa importância, é que os municípios produtores de laranja apresentam índice de desenvolvimento humano (IDH) superior à média do Brasil (Amaro et al., 2007).

Mesmo com toda a importância e alta produção, o impacto causado por diversos microrganismos, dentre eles bactérias como *Candidatus Liberibacter asiaticus* (HLB, *Huanglongbing*) e *Xanthomonas campestris* p.v. *citri* (cancro cítrico), afetam bastante a cultura dessa fruta, causando diversas perdas (Kishi, 2014). Dentre as doenças, HLB é a mais devastadora, sendo responsável pelo corte de mais de 25 milhões de árvores no Brasil, no período de 2004 a 2014 (Kishi, 2014). O termo *Candidatus* é atribuído para organismos que não são cultiváveis e tiveram sua identificação obtida por métodos moleculares.

O cancro cítrico tem aumentado, desde 2009, de forma alarmante na citricultura brasileira (Kishi, 2014). A infecção em citros ocorre com a entrada da bactéria por meio de aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, em tecidos jovens ou por ferimentos em tecidos maduros (Brown, 2001). A larva-minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) contribui para o aumento de incidência e severidade do cancro por causar ferimentos nas folhas da planta (Belasque Jr. et al., 2010).

Assim como as duas culturas anteriores, a cultura do algodoeiro desempenha um papel econômico importante no Brasil, sendo os Estados do Mato Grosso e da Bahia, os principais produtores (MAPA 2016b). O mercado nacional, através da indústria têxtil, consome cerca de 70% da produção total e, mesmo assim, o Brasil é o terceiro maior exportador do produto (MAPA 2016b). O avanço da tecnologia e o aumento da produtividade permitiram o Brasil passar de maior importador, em 1996, a posição atual. Mas, assim como em toda monocultura,

o aumento da incidência de doenças e o aparecimento de microrganismos resistentes aos compostos químicos utilizados para controle é uma questão de tempo.

Atualmente, a cotonicultura sofre grandes perdas causadas pelo inseto bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) (Gallo et al., 1988). Esse inseto possui elevado poder de destruição, devido a sua alta capacidade reprodutiva e as numerosas gerações que se produzem em um ciclo agrícola (Toledo et al., 2000). Todos os seus estágios se desenvolvem no interior das estruturas de frutificação de plantas hospedeiras e, desta forma, o bicudo está protegido de inúmeros inimigos naturais, das condições adversas do meio ambiente e da ação dos inseticidas (Busoli et al., 1991).

Além do bicudo, a cultura do algodoeiro sofre grandes perdas causadas pelos fungos *Ramularia areola* e *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, agentes causais das doenças mancha da ramulária e murcha de fusarium (Cia & Salgado, 1997; Mehta & Menten, 2006). No Brasil, até algum tempo atrás, a mancha de ramulária ocorria apenas no final do ciclo da cultura sem implicar em perdas, porém com o aumento da área plantada com algodão no cerrado, essa doença passou a surgir mais cedo, principalmente quando a copa da planta inicia o sombreamento intenso das folhas mais velhas, aliadas às condições de alta umidade (Araújo, 2003; Suassuna & Coutinho, 2007). Os sintomas se manifestam em ambas as faces da folha, principalmente na face inferior, consistindo de lesões angulosas entre as nervuras. As lesões multiplicam-se e ocupam quase todo limbo foliar, podendo necrosar após o período de esporulação do patógeno. Alta severidade da doença induz a desfolha precoce nas plantas. Em períodos chuvosos podem ocorrer manifestações precoces chegando a provocar queda de folhas e apodrecimento de maçãs dos ramos mais próximos do solo (Gondim et al., 1999; Mehta & Menten, 2006). Já os sintomas da murcha de fusarium podem aparecer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Em plântulas, os cotilédones e as folhas murcham, amarelecem e caem, e o sistema vascular torna-se descolorido. No caso das folhas, estas amarelecem, exibem crestamento do limbo e caem (Goulart, 1995; Cia & Salgado, 1997).

Além do estudo com plantas de interesse econômico, a busca no genoma de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* é uma estratégia interessante a ser explorada visando a melhoria da estratégia intragênica.

1.2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

A evolução e extinção de espécies, o aparecimento de novas funções, a perda de outras e as mudanças morfológicas são consequências de um dinamismo genético que ocorre desde que a vida surgiu na Terra. A observação de fragmentos bioativos tomando parte na estruturação em moléculas maiores nada mais é do que uma consequência evolutiva. Em um estudo recente, o desenvolvimento de uma ferramenta chamada Kamal permitiu a seus criadores observar e explorar essa consequência. Tal recurso é capaz de filtrar, dentro de sequências proteicas de qualquer organismo, peptídeos que possuam características físico-químicas em sua estrutura primária que se assemelhem aquelas de peptídeos antimicrobianos.

O presente estudo visa explorar essa potencialidade escondida no genoma de algumas plantas de interesse: *Theobroma cacao*, *A. thaliana*, *Citrus sinensis* e *Gossypium raimondii*. A escolha de plantas como fonte de peptídeos não é ao acaso. Dada a devida importância que a atividade agrícola tem para a balança comercial brasileira, obter moléculas de interesse para a possível proteção das mesmas contra doenças e perdas econômicas já seria por si só, razão suficiente. Este estudo também visa confirmar e expandir a observação desses potenciais para futuros estudos, além de explorar o potencial dessas moléculas contra patógenos humanos.

Dessa forma, temos como objetivos específicos deste estudo:

- Identificar em proteínas preditas dos genomas das plantas selecionadas sequências peptídicas internas que sejam potencialmente peptídeos antimicrobianos intragênicos conforme parâmetros de predição utilizados pelo Kamal.
- Selecionar possíveis PAIs, sintetizá-los quimicamente, e garantir sua pureza e fidedignidade a sua fonte de origem.
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos peptídeos sintetizados e o espectro de ação dos mesmos, bem como avaliar a capacidade de inibição do crescimento de patógenos causadores de doenças específicas nas plantas de interesse.
- Avaliar o potencial de sinergismo de alguns peptídeos antimicrobianos intragênicos com fármacos conhecidos, na inibição da formação de biofilme de patógenos importantes.

1.3. MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1. Seleção de IAPs de *Theobroma cacao* e outras plantas

O conjunto das proteínas preditas do genoma de cacau (*T. cacao*), *Arabidopsis thaliana*, algodoeiro (*Gossypium raimondii*) e laranja-doce (*Citrus sinensis*), foram obtidas em <http://phytozome.jgi.doe.gov>. As proteínas foram utilizadas como fonte de buscas por possíveis PAIs. Essa busca foi realizada através do programa Kamal v1.3 (Brand et al., 2012), desenvolvido pelo grupo do Laboratório de Espectrometria de Massa, utilizando parâmetros físico-químicos definidos após extensa busca na literatura (Wang et al., 2009). Brevemente, o conjunto de proteínas em um arquivo .fasta foi inserido no programa de busca, assim como uma lista de parâmetros físico-químicos, em arquivo .txt (Tabela 1.01). Após a análise e geração dos possíveis peptídeos antimicrobianos, os mesmos foram avaliados manualmente e alguns foram selecionados para a síntese química em fase sólida.

Tabela 1.01. Parâmetros físico-químicos definidos pelo usuário para a busca por PAIs.

| Parâmetros físico-químicos | Janela |
|---|--------------------------------|
| Número de resíduos | 16-22 aa |
| Filtro por resíduos | C e P* |
| Carga líquida | +1 até +5 |
| Massa Molecular (Da) | 1400 até 4000 |
| Hidrofobicidade escala TM (Zhao & London, 2006) | - 0,485 até 0,516 |
| Momento Hidrofóbico escala TM (Zhao & London, 2006) | 0,516 até 1,267 |
| Agregação (Conchillo-Sole et al., 2007) | -10 até +55 |
| Ponto Isoelétrico (Bjellqvist et al., 1993) | 9 até 13 |
| Janela de hidrofobicidade (Kyte & Doolittle, 1982) | Max 1 até 3 Min -2 até -0,5 |

*Exclui peptídeos com resíduos de cisteína (C) ou prolina (P). Tal filtro foi utilizado pela baixa representatividade desses resíduos nas sequências de AMP utilizadas como arquétipos para a obtenção dos parâmetros físico-químicos.

1.3.2. Síntese química orgânica em fase sólida

No total, 21 peptídeos de plantas (11 de *Theobroma cacao*, quatro de *Arabidopsis thaliana* e seis peptídeos de diferentes fontes, dentre elas *Zea mays*, *Citrus sinensis* e *Gossypium raimondii*) foram selecionados para realização da síntese química em fase sólida utilizando a estratégia Fmoc/t-butila (Chan & White, 2000). Foram sintetizados também, dois peptídeos conhecidamente antimicrobianos, oriundos de anfíbios, como controle positivo para os testes: DS01 (GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL-NH₂) (Brand et al., 2002) e Ascaphin-8 (Asc-8, GFKDLLKGAAKALVKTVLF-NH₂) (Conlon et al., 2004). O peptídeo Asc-8 é um AMP que possui as mesmas características físico-químicas dos peptídeos selecionados.

Cada uma das sínteses foi realizada dentro de uma seringa com auxílio de um filtro, ambos de polipropileno. A resina Rink Amide (MDHA) (NovaBiochem) foi utilizada como suporte para o alongamento da cadeia peptídica. A escala escolhida para a produção foi de 0,15 mmol de peptídeo. A síntese em tal resina resulta em peptídeos contendo um grupo amida no C-terminal do peptídeo. A resina foi lavada com 2-propanol (J.T. Baker) e DMF PA (Scharlau) (três vezes cada, alternadamente), para a retirada de eventuais impurezas. Tanto o 2-propanol como o DMF foram retirados da seringa com o auxílio de filtração a vácuo. Foram adicionados de 2,5 a 3,0 mL de 4-metilpiperidina (Sigma Aldrich)/DMF PA (1:4, v/v) e agitou-se por 15 minutos para a retirada do grupo protetor Fmoc da resina (Carpino & Han, 1972). Esse procedimento foi realizado duas vezes para a desproteção total da resina. Em seguida, realizou-se novamente a lavagem com 2-propanol e DMF (três vezes cada, alternadamente). Por fim, lavou-se com diclorometano (Vetec) para secar os grãos da resina. Para verificar se o grupo Fmoc foi retirado com sucesso, foi realizado o teste da ninhidrina com grãos da resina (Kaiser et al., 1970), o qual indica a presença do grupo –NH₂ livre (coloração marrom ou azul) ou não (sem coloração), conseqüentemente, a desproteção ou não da mesma.

Os aminoácidos utilizados na síntese dos peptídeos são derivados de aminoácidos (Fmoc-aminoácidos, todos da Peptides International). Esses derivados possuem C-terminal livre, N-terminal ligado a um grupo protetor Fmoc, além de um grupo protetor ligado a cadeia lateral, que varia de acordo com o aminoácido. Devido ao C-terminal ser a extremidade livre do derivado de aminoácido, o processo de alongação da cadeia peptídica é realizado no sentido do C-terminal para o N-terminal. Isso ocorre para evitar ligações inespecíficas, uma vez que

sempre que um aminoácido for acoplado na sequência, ele terá sua extremidade N-terminal protegida, além de não permitir interações indesejadas com as cadeias laterais da sequência.

Sendo assim, adicionou-se o primeiro derivado de aminoácido, que corresponde ao último resíduo da estrutura primária, em sua respectiva seringa de síntese para acoplá-lo à resina, já desprotegida do grupo Fmoc. Foi utilizado 0,6 mmol de derivado de aminoácido (o que equivale a um excesso molar de quatro vezes à escala da síntese). Adicionou-se também 0,6 mmol do ativador HBTU (NovaBiochem), 0,8 mmol de DIPEA (Sigma) e 2 mL de DMF seca (Scharlau). Deixou-se reagir por 1h sob agitação moderada e constante. Essa etapa é definida como etapa de acoplamento.

Após esse período, o produto foi filtrado a vácuo e novamente lavado com 2-propanol, DMF e diclorometano (mesmo procedimento de lavagem citado anteriormente). Realizou-se novamente o teste da ninhidrina para verificar se houve o acoplamento do derivado de aminoácido à resina. A ausência de mudança na coloração da amostra sugere o acoplamento, visto que houve a formação de uma ligação peptídica (ligação amídica), não havendo mais um grupo $-NH_2$ livre. (Kaiser et al., 1970). Para continuar o alongamento da sequência, é necessário realizar a desproteção do N-terminal do aminoácido acoplado, seguindo o mesmo processo descrito para a desproteção da resina (Carpino & Han, 1972). Após a desproteção e confirmação pelo teste da ninhidrina, adicionou-se o próximo derivado de aminoácido e os demais reagentes para a realização do acoplamento do aminoácido.

Após realizar o acoplamento de todos os Fmoc-aminoácidos da sequência, iniciou-se o processo de clivagem dos peptídeos sintéticos da resina, processo que também visa remover os grupos protetores das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (Chan & White, 2000). Adicionou-se em um tubo tipo *falcon* de 50 mL o peptídeo sintetizado acoplado à resina e 10 mL de uma solução contendo 81,5% (v/v) de TFA (Sigma), 5% (v/v) de tioanisol (Sigma), 5% (p/v) de fenol (Sigma), 2,5% (v/v) de EDT (Merck), 1% (v/v) de TIS (Sigma) e 5% (v/v) de água ultrapura. A mistura reagiu por 1h30min sob agitação. Após a reação, borbulhou-se nitrogênio gasoso na solução para evaporar o TFA e os demais solventes.

Com o auxílio de filtração a vácuo, lavou-se o peptídeo clivado com éter diisopropílico (Vetec) gelado. Nessas condições, o peptídeo precipita e fica retido no filtro, enquanto os demais solventes indesejados são filtrados juntamente com o éter diisopropílico. Em seguida, o peptídeo foi extraído do filtro com 100 mL de uma solução de água:acetona (J.T. Baker) 1:1 (v/v). As soluções contendo o peptídeo sintético foram recolhidas em tubos de 50 mL,

congeladas e liofilizadas. Um esquema para as principais etapas da síntese é mostrado na Figura 1.03.

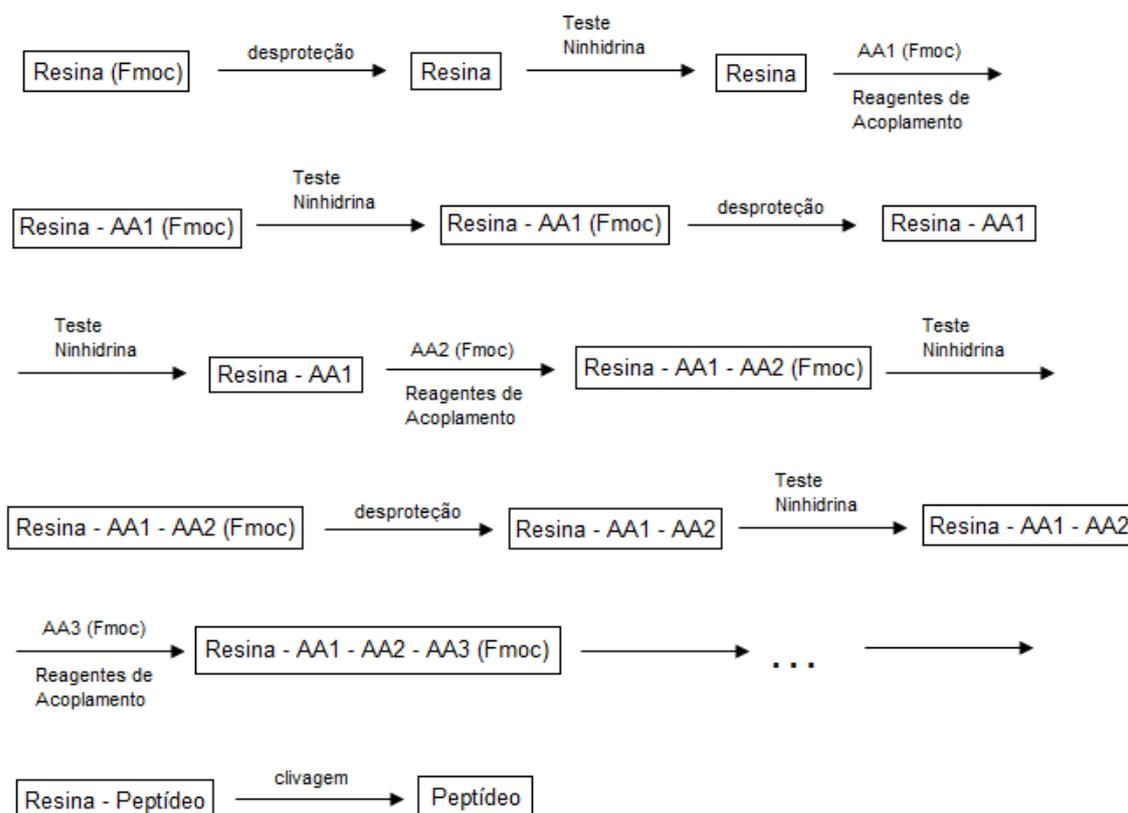


Figura 1.03. Esquema para as principais etapas da síntese em fase sólida, em que AA1, AA2, AA3, representam os aminoácidos 1, 2 e 3, respectivamente (Pires, 2012).

1.3.3. Caracterização dos peptídeos sintéticos por espectrometria de massa

Após a liofilização, uma pequena porção de cada peptídeo sintetizado foi ressuspensa em água ultrapura e caracterizado por espectrometria de massa, utilizando um espectrômetro do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraflExtreme, Bruker Daltonics). Brevemente, uma mistura de uma solução de matriz (10 mg.mL⁻¹ de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% (v/v) de acetonitrila e 0,3% (v/v) de TFA) com cada um dos peptídeos, em uma proporção de 3:1, foi aplicada em uma placa de MALDI, para cristalização do material. O mesmo procedimento foi realizado com uma solução de calibrantes externos (Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics). Após a calibração do equipamento, os peptídeos foram analisados e seus espectros de MS obtidos em modo positivo refletido, visando observar a razão massa/carga esperada de cada um dos peptídeos. Após confirmação da razão massa/carga, espectros de MS/MS foram

obtidos a partir da fragmentação dos íons precursores, via LIFT (Suckau et al., 2003), para verificação e confirmação da estrutura primária dos peptídeos sintetizados. Os espectros gerados foram analisados através do programa FlexAnalysis (Bruker Daltonics).

1.3.4. Purificação dos peptídeos e caracterização por espectrometria de massa.

Após confirmação por espectrometria de massa, os peptídeos foram purificados por HPLC (Shimadzu Co.) em fase reversa, com monitoramento espectrofotométrico à 216 e 280 nm. Inicialmente, utilizou-se uma coluna analítica C18 de 250 x 4,6 mm (Grace Vydac 218TP54) para observação do perfil de eluição de cada um dos peptídeos, separadamente. Para tal, 200 µg de cada um dos peptídeos foram ressuspensos em 500 µL de uma solução de água ultrapura contendo 0,1% (v/v) de TFA (solvente A), injetados no equipamento, e eluídos posteriormente em um gradiente de acetonitrila contendo 0,1% (v/v) de TFA (solvente B), em um fluxo de 1 mL.min⁻¹. O gradiente de eluição seguiu a seguinte estrutura: 1 - 5 minutos com 5% (v/v) de solvente B; 2 - gradiente de 5 a 95% (v/v) de solvente B em um período de 40 minutos; 3 - 5 minutos à 95% (v/v) de solvente B, totalizando 50 minutos de corrida cromatográfica. Cada peptídeo foi injetado individualmente. As frações observadas foram coletadas e analisadas por espectrometria de massa para confirmação da fração de interesse e seu nível de pureza.

Após verificação do perfil cromatográfico em escala analítica, os peptídeos foram purificados em escala preparativa, utilizando uma coluna preparativa C18 de 250 x 22 mm (Grace Vydac 218TP1022). Nessa escala, 20 mg de cada peptídeo foi ressuspensado em 1 mL de solvente A, injetado no equipamento, e eluído com um gradiente de solvente B, em um fluxo de 10 mL.min⁻¹, utilizando os mesmos parâmetros de corrida da escala analítica. A fração de interesse de cada um dos peptídeos foi coletada e analisada por espectrometria de massa para confirmar o grau de pureza. Esse processo foi repetido para obtenção de quantidade suficiente de material para os testes biológicos. Ao final das purificações, os peptídeos foram congelados e liofilizados.

1.3.5. Quantificação dos peptídeos sintéticos

Os peptídeos puros, liofilizados, foram ressuspensos em água ultrapura e quantificados com o auxílio de um espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu). Peptídeos contendo pelo

menos um triptofano, ou triptofano e tirosina, ou aqueles contendo pelo menos três tirosinas e nenhum triptofano, foram quantificados de acordo com seus coeficientes de extinção molar, através da fórmula:

$$CP \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = (A_{280} \times FD \times MM) / \epsilon \text{ (Kirschenbaum, 1975)}$$

CP, Concentração do peptídeo em mg.ml⁻¹;

A₂₈₀, Absorbância obtida no espectrofotômetro à 280 nm, em uma cubeta de 1 cm;

FD, Fator de diluição;

MM, Massa molecular do peptídeo, em mg mmol⁻¹;

ε, Coeficiente de extinção molar à 280 nm, em cubeta de 1 cm. Triptofano = 5550 M⁻¹.cm⁻¹; Tirosina = 1280 M⁻¹.cm⁻¹. As sequências contendo mais de um triptofano, tirosina, ou uma mistura de ambos, teve seus coeficientes de extinção molar somados.

Para os peptídeos que não contém nenhum dos dois resíduos citados acima, uma outra fórmula foi utilizada:

$$CP \text{ (}\mu\text{g.ml}^{-1}\text{)} = [(X+Y) \times FD] / 2$$

$$Z = A_{205} \times 31 \text{ (Scopes, 1974)}$$

$$Y = (A_{215} - A_{225}) \times 144 \text{ (Waddell, 1956)}$$

A₂₀₅, Absorbância obtida no espectrofotômetro à 205 nm, em uma cubeta de 1 cm;

A₂₁₅, Absorbância obtida no espectrofotômetro à 215 nm, em uma cubeta de 1 cm;

A₂₂₅, Absorbância obtida no espectrofotômetro à 225 nm, em uma cubeta de 1 cm.

Após a quantificação, os peptídeos foram mantidos em água, congelados e estocados a -80 °C até o momento de uso.

1.3.6. Avaliação da inibição de germinação de basidiósporos de *Moniliophthora perniciosa* pelos IAPs de *T. cacao*

O potencial antimicrobiano dos 11 peptídeos intragênicos de *T. cacao* foi testado com basidiósporos do fungo *Moniliophthora perniciosa*. Brevemente, diferentes concentrações de

peptídeos (256 – 0,5 μM , concentração final) foram incubados com basidiósporos de *M. perniciosa* (1×10^6 basidiósporos. mL^{-1}) por 1 hora, à 24 °C. Como controle positivo, foram utilizados os peptídeos DS01 e Asc-8. Como controle negativo, os basidiósporos de *M. perniciosa* foram incubados apenas em água pelo mesmo período. Todos as concentrações e controles foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação, 30 μL de cada mistura, divididas em três gotas de 10 μL , foram aplicadas em três pontos diferentes de um fino filme de meio de cultura (ágar 1,2% (p/v)), depositado sobre uma lâmina de vidro. As lâminas de vidro foram colocadas dentro de placas de Petri e incubadas à 24 °C, por 4, 24 e 48 horas para avaliar os basidiósporos. Após cada período de incubação, as lâminas foram visualizadas em um microscópio óptico (Carl Zeiss), em um aumento de 10x. A morfologia dos basidiósporos (germinação) incubados com a solução de peptídeos foram comparados com aqueles do controle negativo. Imagens dos testes foram capturadas com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio.

1.3.7. Avaliação da concentração inibitória mínima dos PAIs

O potencial antimicrobiano dos peptídeos intragênicos foi avaliado através do teste de suscetibilidade de microrganismos (Tabela 1.02) aos antimicrobianos, utilizando a microdiluição em caldo, seguindo os protocolos M7-A10, M27-A3 e M38-A2 do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI). Brevemente, diferentes concentrações de peptídeos (256 – 0,5 μM , concentração final) foram incubados com células (bactérias: 5×10^5 células. mL^{-1} ; leveduras: 1×10^3 células. mL^{-1} , concentração final) ou conídios (fungos: 1×10^3 células. mL^{-1} , concentração final) em meio de cultura líquido (caldo). O crescimento das bactérias foi avaliado em meio Mueller-Hinton (Himedia) enquanto os de fungos e leveduras em meio RPMI 1640 pH 7,0 (Sigma). As condições de cultivo foram realizadas de acordo com os protocolos citados, com pequenas modificações, quando necessárias, de acordo com o tempo e temperatura de crescimento do microrganismo. Os peptídeos DS01 e Asc-8 foram utilizados como controles positivos. Os antibióticos antifúngicos fluconazol (Sigma) e anfotericina B (Sigma), e os antibacterianos ampicilina (Sigma) e gentamicina (Sigma) também foram utilizados como controles positivos. Como controle negativo, os microrganismos foram inoculados em poços contendo apenas meio. Foi realizado um controle do meio de cultura, sem a presença de peptídeos e microrganismo, para verificar e garantir a esterilidade do mesmo.

Após o período de incubação, a concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos contra cada microrganismo foi avaliada. Foram considerados antimicrobianas, as concentrações no qual não se observou crescimento. Para verificar a concentração microbicida mínima (CMM), 10 µL da CIM, e duas concentrações acima foram espalhadas em diferentes placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud (Himedia) para fungos e leveduras, e meio ágar Mueller-Hinton (Himedia) para bactérias. As placas foram incubadas nas mesmas condições de crescimento utilizadas para o teste de suscetibilidade. Concomitantemente, as placas de suscetibilidade foram reincubadas pelo mesmo tempo, como forma de verificar, também, o potencial microbicida dos peptídeos. Todos os testes foram realizados, pelo menos, em triplicata biológica, com duas repetições técnicas cada.

Tabela 1.02. Microrganismos utilizados para os testes de suscetibilidade aos peptídeos.

| Microrganismos testados | |
|---|---|
| <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i> |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 28957 | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | <i>Fusarium oxysporum</i> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> |
| <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 | <i>Fusarium solani</i> |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23857 | <i>Rhizoctonia solani</i> |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>Ramularia areola</i> |
| <i>Erwinia carotovora</i> | <i>Trichoderma asperellum</i> |

1.3.8. Avaliação da citotoxicidade dos PAIs

A citotoxicidade dos PAIs selecionados foi avaliada usando hemácias humanas. Diferentes concentrações de PAIs (128 µM - 0,5 µM) foram incubadas com uma concentração final de $2,5 \times 10^5$ células.mL⁻¹. Brevemente, 100 µL de uma solução de hemácias foi incubada com 100 µL de diferentes concentrações de cada um dos PAIs em PBS pH 7,4 (PBS), por 30 minutos à 37 °C, com agitação constante à 120 rpm. PBS e Triton X-100 (Vetec) 0,1 % (v/v) foram utilizados como controles negativos e positivos, respectivamente. Após a incubação, a solução foi centrifugada à 900 x g por cinco minutos, seguido pela transferência de 50 µL do sobrenadante resultante para placas de 96 poços, de fundo chato. A cada poço, também foi adicionado 50 µL de PBS. A leitura das placas foi realizada à 540 nm em um multileitor de

placas (Synergy 2, Biotek). Todos os testes foram realizados em triplicata biológica, compostos de três réplicas técnicas cada. Os valores de absorvância foram subtraídos do controle negativo. A média da absorvância do controle positivo foi definida como 100% de lise de hemácias, e os resultados da interação peptídeo/hemácias foi expresso relativo a esse valor.

1.3.9. Ensaios de atividade antibiofilme

1.3.9.1. Inibição da formação de biofilme de *C. albicans* pelos PAIs de *A. thaliana*

O valor da CIB50 (concentração mínima necessária para reduzir a formação de biofilmes em 50% quando comparado com o tratamento controle) dos PAIs de *A. thaliana* foi determinado utilizando o seguinte protocolo. Culturas *overnight* de *C. albicans* SC5314 crescidas em YPD [1% (p/v) extrato de levedura (Becton Dickinson), 2% (p/v) peptona (Becton Dickinson) e 2% (p/v) glicose (Sigma)] foram diluídas para uma densidade óptica de 0,2 (600 nm) em meio RPMI 1640 e 50 µL dessa suspensão foi adicionada aos poços de uma placa de 96 poços para cultura de células (TPP), contendo 50 µL de uma diluição seriada de PAIs (128 – 0,25 µM), em meio RPMI 1640. Após uma hora de adesão à 37 °C, o meio de cultura foi aspirado e os biofilmes nos poços foram lavados com 100 µL de PBS para remover células não aderidas. Após a lavagem, 100 µL de meio RPMI 1640, contendo a mesma concentração de PAIs da etapa inicial, foi adicionado novamente aos biofilmes, seguido de incubação à 37 °C por 24 horas. Após o crescimento, os biofilmes foram lavados com PBS e quantificados com o ensaio de CTB (Promega) (O'Brien et al., 2000) para *C. albicans* e *C. dubliniensis*, e com o ensaio de 2,3-bis(2-metil-4-nitro-5-sulfo fenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-hidróxido de tetrazólio (XTT) (Tillier et al.,1992; Delattin et al., 2014a) para *C. krusei* e *C. glabrata*. Após uma hora de incubação no escuro, à 37 °C, a fluorescência foi mensurada em um leitor de placas multimodal (Synergy 2, BioTek) ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$: 535/590 nm) para o CTB, e a absorvância (λ : 405 nm) para o XTT. Os valores obtidos foram corrigidos subtraindo a média dos valores de fluorescência do CTB ou absorvância do XTT em poços não inoculados. A porcentagem de sobrevivência dos biofilmes foi calculada relativa ao tratamento controle (biofilmes crescidos na ausência de PAIs). Todos os testes foram realizados em triplicatas biológicas com duas repetições técnicas cada.

1.3.9.2. Ensaios de sinergismo (*checkerboard*) entre os PAIs de *A. thaliana* e antifúngicos

Biofilmes de *C. albicans* SC5314 foram crescidos, como descrito acima, só que na presença da combinação dos peptídeos At01 ou At02 com os compostos antifúngicos caspofungina ou anfotericina B. Os compostos foram diluídos de forma seriada através das colunas e linhas de uma placa de 96 poços. Após 1 hora de adesão, os biofilmes foram lavados e 100 µL da mesma concentração das combinações foram adicionadas aos poços. Após 24 horas de incubação à 37 °C, os biofilmes foram quantificados usando o método de CTB, como descrito acima (Odds, 2003; Delattin et al., 2014a). Sinergismo foi determinado pelo cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), usando a fórmula: $ICIF = ICI_A + ICI_B = \frac{C_A}{CIM_A} + \frac{C_B}{CIM_B}$, no qual CIM_A e CIM_B é a concentração inibitória das drogas A e B sozinhas, e C_A e C_B é a concentração das drogas A e B em concentração isoefetiva (Meletiadis et al., 2005; Vriens et al., 2016). É importante ressaltar que os valores de C_B são derivados da curva de dose resposta, enquanto os valores de C_A representam os valores exatos das concentrações da droga A (At01 e At02) nos experimentos. Todos os testes foram realizados em triplicatas biológicas.

1.4. RESULTADOS

1.4.1. Genomas de plantas como fonte de PAIs

A coleção de proteínas preditas de *T. cacao*, *A. thaliana*, *G. raimondii* e *C. sinensis* foram submetidas ao programa Kamal para filtragem por possíveis PAIs. O programa utiliza propriedades físico-químicas, derivadas da estrutura primária de proteínas, como descritores de atividade antimicrobiana (Brand et al., 2012). Nove filtros foram sequencialmente aplicados às proteínas das diferentes plantas, na busca pelos peptídeos encriptados. Os valores utilizados neste trabalho, para cada um dos filtros, foram definidos após busca no banco de dados *Antimicrobial Peptide Database* (APD, Wang et al., 2009). As propriedades físico-químicas de AMPs que possuíam entre 16-22 resíduos de aminoácidos, e que se estruturavam em α -hélice, foram utilizados como parâmetro para a busca por PAIs no genoma das plantas (Tabela 1.01, página 23).

A quantidade de proteínas preditas do genoma das plantas analisadas nesse trabalho continua em constante mudança. Avanços nas técnicas de sequenciamento, nos algoritmos de predição gênica e identificação de pseudogenes têm sido uma das principais causas dessa variação. Considerando o último conjunto de dados liberados de cada genoma, *T. cacao* possui 59.576 proteínas preditas, *A. thaliana* 35.386, *C. sinensis* 46.147 e *G. raimondii* 77267 (Tabela 1.03). Após a filtragem, o programa Kamal identificou que aproximadamente 42% das proteínas de *T. cacao* apresentaram, pelo menos, um possível PAI, *A. thaliana* e *C. sinensis* 41% e *G. raimondii* 37%. Quanto ao total de possível PAIs, *T. cacao* apresentou 403.243, *A. thaliana* 225.499, *C. sinensis* 300.127 e *G. raimondii* 435.057 (Tabela 1.03).

Tabela 1.03. Possíveis PAIs filtrados do genoma das diferentes plantas.

| Planta | Número de proteínas no genoma | Proteínas que possuem, pelo menos, um possível PAI | % de proteínas com, pelo menos, um PAI | Total de possíveis PAIs |
|---------------------|-------------------------------|--|--|-------------------------|
| <i>T. cacao</i> | 59.576 | 25.229 | 42,34% | 403.243 |
| <i>A. thaliana</i> | 35.386 | 14.654 | 41,41% | 225.499 |
| <i>C. sinensis</i> | 46.147 | 19.280 | 41,78% | 300.127 |
| <i>G. raimondii</i> | 77.267 | 28.497 | 36,88% | 435.057 |

A lista de peptídeos gerados pelo programa Kamal foi, então, curada para a seleção de peptídeos que apresentassem um maior potencial antimicrobiano. Essa avaliação é de extrema importância, pois peptídeos que não são antimicrobianos, mas possuem as mesmas propriedades físico-químicas, também são filtrados. No momento, não é possível afirmar qual é o real número de PAIs dentre todo o grupo amostral, uma vez que é inviável atualmente, sintetizar todos os fragmentos gerados.

A figura 1.04 apresenta a distribuição de resíduos de alguns possíveis PAIs (Tc02, Tc06 e Tc08) em uma projeção de anfipaticidade, assim como suas propriedades físico-químicas. A análise da distribuição dos resíduos em um segmento helicoidal teórico simula o caráter anfifílico observado em AMPs, e é utilizado como forma de inspecionar o potencial do peptídeo. É possível observar que o peptídeo Tc02 apresenta uma melhor separação entre resíduos polares e/ou carregados positivamente daqueles hidrofóbicos, do que o peptídeo Tc06, assim como o peptídeo Tc08.

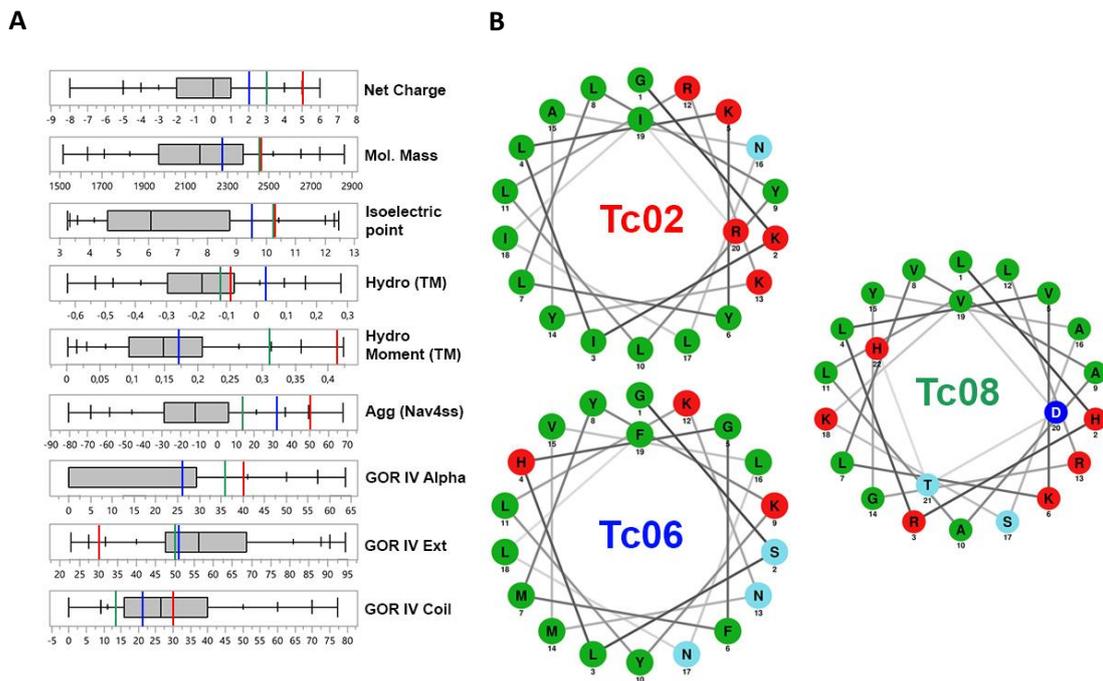


Figura 1.04 – Parâmetros físico-químicos e anfipaticidade teórica dos PAIs Tc02, Tc06 e Tc08. A - É possível observar que os peptídeos Tc02, Tc06 e Tc08 apresentam carga líquida e hidrofobicidade maiores do que peptídeos aleatórios filtrados do genoma de *T. cacao*, representados pelos retângulos cinzas e cortados por suas respectivas medianas em preto.. As barras coloridas representam os valores de cada peptídeo. Tc02 – vermelho; Tc06 – azul; Tc08 – verde. B – Anfipaticidade teórica dos peptídeos apresentando uma face com resíduos hidrofóbicos e uma face com resíduos hidrofílicos.

A figura 1.04 também apresenta as propriedades físico-químicas de 10000 peptídeos selecionados aleatoriamente, prospectados do genoma de *T. cacao*, que possuem entre 16-22 resíduos, e a comparação com as propriedades dos peptídeos Tc02, Tc06 e Tc08. Os possíveis PAIs apresentam, em média carga líquida, ponto isoelétrico e tendência de agregação maiores do que o 3º quartil obtido das mesmas propriedades das moléculas aleatórias. É possível observar que a hidrofobicidade e momento hidrofóbico estão presentes no 3º quartil. Os potenciais PAIs são, conseqüentemente, mais carregados positivamente e mais hidrofóbicos do que a média de fragmentos proteicos com o mesmo número de resíduos de aminoácidos, obtidos aleatoriamente de *T. cacao*.

No total, 21 possíveis PAIs foram avaliados e selecionados para síntese química em fase sólida (Tabela 1.04). A escolha dos peptídeos ocorreu em diferentes períodos, e obedeceu a seguinte ordem cronológica: 1º geração - *T. cacao* (11 peptídeos); 2º geração - *A. thaliana* (quatro peptídeos); 3º geração - *C. sinensis* (três peptídeos), *Zea mays* (um peptídeo) e *G. raimondii* (dois peptídeos). Dessa forma,

É importante destacar essa ordem, pois a inspeção manual e seleção de novos PAIs foi evoluindo de acordo com os resultados obtidos das seleções anteriores. Na primeira geração de peptídeos (*T. cacao*), a escolha das proteínas parentais não seguiu um padrão. Proteínas intracelulares, transmembrana e extracelulares foram utilizadas como possíveis fontes. O objetivo era verificar o fenômeno da encriptação de PAIs em proteínas diferentes, assim como, obter peptídeos com estruturas primárias variadas, utilizando um novo conjunto de parâmetros físico-químicos, quando comparado ao trabalho anterior (Brand et al., 2012). A partir da segunda geração de peptídeos, a conservação das proteínas entre espécies se tornou também um evento a ser explorado. Os peptídeos At01, Cs01 e Zm01 são oriundos da proteína citocromo P450 e foram selecionados após a identificação do peptídeo Tc06. As sequências desses quatro PAIs representam mais de 100 espécies de plantas diferentes observadas após uma análise de similaridade com outras outras sequências.

Tabela 1.04. Lista dos PAIs selecionados para síntese química.

| Peptídeo | Nº de acesso NCBI e posição na proteína | Proteína fonte | Organismo | Sequência peptídica (*) | N.r. |
|----------|---|--|-----------------------------|-------------------------------|------|
| Tc01 | EOX93337.1 (95-110) | Embryo defective 1381 isoform 2 | <i>Theobroma cacao</i> | VALRLAKEVIKVVQQGW | 16 |
| Tc02 | EOX91068.1 (202-221) | ARM repeat superfamily protein, putative isoform 1 | <i>Theobroma cacao</i> | GKILKYLLEYLLRKYANLIIR | 20 |
| Tc03 | Tc05_g014340 (12-32)** | - | <i>Theobroma cacao</i> | IKLRNVLKYLFRIDVIKEDIL | 21 |
| Tc04 | EOY21465.1 (193-214) | Purple acid phosphatase 3 | <i>Theobroma cacao</i> | RVLKDVESALRESVANWKIVIG | 22 |
| Tc05 | EOY07102.1 (47-66) | Gamma interferon responsive lysosomal thiol reductase family protein, putative | <i>Theobroma cacao</i> | IVNHLVKLFDKGLNSIVNLR | 20 |
| Tc06 | EOY24636.1 (117-135) | Cytochrome P450, family 87, subfamily A, polypeptide 2 | <i>Theobroma cacao</i> | GSLHGFMYKYLKKNMVLNLF | 19 |
| Tc07 | EOY07477.1 (79-98) | Laccase 17 | <i>Theobroma cacao</i> | LIKVVNHVQYNVTLHWHGIR | 20 |
| Tc08 | EOY11557.1 (289-310) | Uncharacterized protein TCM_026695 | <i>Theobroma cacao</i> | LHRLVKLVAALLRGYASKVDTH | 22 |
| Tc09 | EOY11242.1 (688-707) | NB-ARC domain-containing disease resistance protein, putative | <i>Theobroma cacao</i> | GIVLKDLFSEKLRRYKIVIG | 20 |
| Tc10 | EOY11257.1 (701-719) | NB-ARC domain-containing disease resistance protein, putative | <i>Theobroma cacao</i> | GLLFKELQKLIRYQIFIGK | 19 |
| Tc11 | EOY17584.1 (39-55) | LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein, putative | <i>Theobroma cacao</i> | LLDKLKRLLSIEAVLI | 17 |
| At01 | NP_001320968.1 (118-136) | Cytochrome P450, family 87, subfamily A, polypeptide 2 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | GSLHGFMYKYLKKNMVLTLF | 19 |
| At02 | SIP121-0-PQ4 (45-60)*** | - | <i>Arabidopsis thaliana</i> | KVLSKVHTLLKAVLAL | 16 |
| At03 | NP_1767850.1 (209-226) | YELLOW STRIPE like | <i>Arabidopsis thaliana</i> | GAKLAKKQVRALGKFFSF | 18 |
| At04 | NP_1767850.1 (334-353) | YELLOW STRIPE like | <i>Arabidopsis thaliana</i> | GLYNIKVLGRTVFGLYKQF | 20 |
| Cs01 | XP_006477592.1 (117-135) | PREDICTED: cytochrome P450 87A3 | <i>Citrus sinensis</i> | GSLHGFMYRYLKNMVLNLF | 19 |
| Zm01 | XP_008663476.1 (153-171) | PREDICTED: cytochrome P450 87A3-like | <i>Zea mays</i> | GSLHGFMYKYLKTLVLRLY | 19 |
| Cs02 | YP_740502.1 (463-480) | photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein (chloroplast) | <i>Citrus sinensis</i> | FFGHIWHGARTLFRDVFA | 18 |
| Cs03 | KDO49351.1 (129-146) | hypothetical protein CISIN_1g015590mg | <i>Citrus sinensis</i> | FFYNVIKIYGNMAGRISK | 18 |
| Gr01 | XP_012439503.1 (6-21) | PREDICTED: uncharacterized protein LOC105765114 | <i>Gossypium raimondii</i> | GFKLGRKLVKVKFVII | 16 |
| Gr02 | KJB26672.1 (254-272) | hypothetical protein B456_004G254100 | <i>Gossypium raimondii</i> | ANRLLEAYKMLLKFLGNLR | 19 |

(*) Peptídeos amidados em seu C-terminal

(**) Proteína não presentes no banco de dados do NCBI. Essa proteína foi obtida do conjunto de proteínas preditas do genoma de cacau depositado em cocoagendb.cirad.fr.

(***) Proteína não presentes no banco de dados do NCBI. Essa proteína foi obtida de uma lista de peptídeos expressos em *A. thaliana* (DeConinck et al., 2013).

1.4.2. Análise cromatográfica e espectrométrica dos PAIs sintéticos

Após a seleção, os 21 possíveis PAIs e os 2 AMPs de anfíbios (DS01 e Asc-8) foram sintetizados quimicamente utilizando a estratégia Fmoc/*t*-butila (Chan & White, 2000). A massa esperada, assim como a sequência dos resíduos de aminoácido de cada um dos peptídeos foi confirmada por espectrometria de massa (Tabela 1.05). Alguns exemplos de espectros de fragmentação, confirmando a sequência dos peptídeos, estão ilustrados nas figuras 1.05, 1.06 e 1.07.

Tabela 1.05. Caracterização dos PAIs e AMPs de anfíbio por espectrometria de massa.

| Peptídeos | [M+H ⁺]* Esperado | [M+H ⁺] Observado |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|
| Tc01 | 1837,09 | 1837,13 |
| Tc02 | 2463,54 | 2463,69 |
| Tc03 | 2600,58 | 2600,85 |
| Tc04 | 2481,41 | 2481,73 |
| Tc05 | 2291,34 | 2291,66 |
| Tc06 | 2274,17 | 2274,63 |
| Tc07 | 2425,35 | 2425,41 |
| Tc08 | 2461,45 | 2461,63 |
| Tc09 | 2348,41 | 2346,67 |
| Tc10 | 2306,39 | 2306,72 |
| Tc11 | 1937,23 | 1937,57 |
| At01 | 2261,17 | 2261,09 |
| At02 | 1732,13 | 1732,14 |
| At03 | 1995,18 | 1995,20 |
| At04 | 2362,32 | 2362,32 |
| Cs01 | 2302,17 | 2302,18 |
| Zm01 | 2301,27 | 2301,20 |
| Cs02 | 2176,11 | 2176,08 |
| Cs03 | 2120,12 | 2120,10 |
| Gr01 | 1931,22 | 1931,19 |
| Gr02 | 2262,30 | 2262,28 |
| Asc-8 | 2018,23 | 2018,55 |
| DS01 | 2793,58 | 2793,64 |

* Razão massa/carga. M = Massa molecular; H⁺ = carga;próton

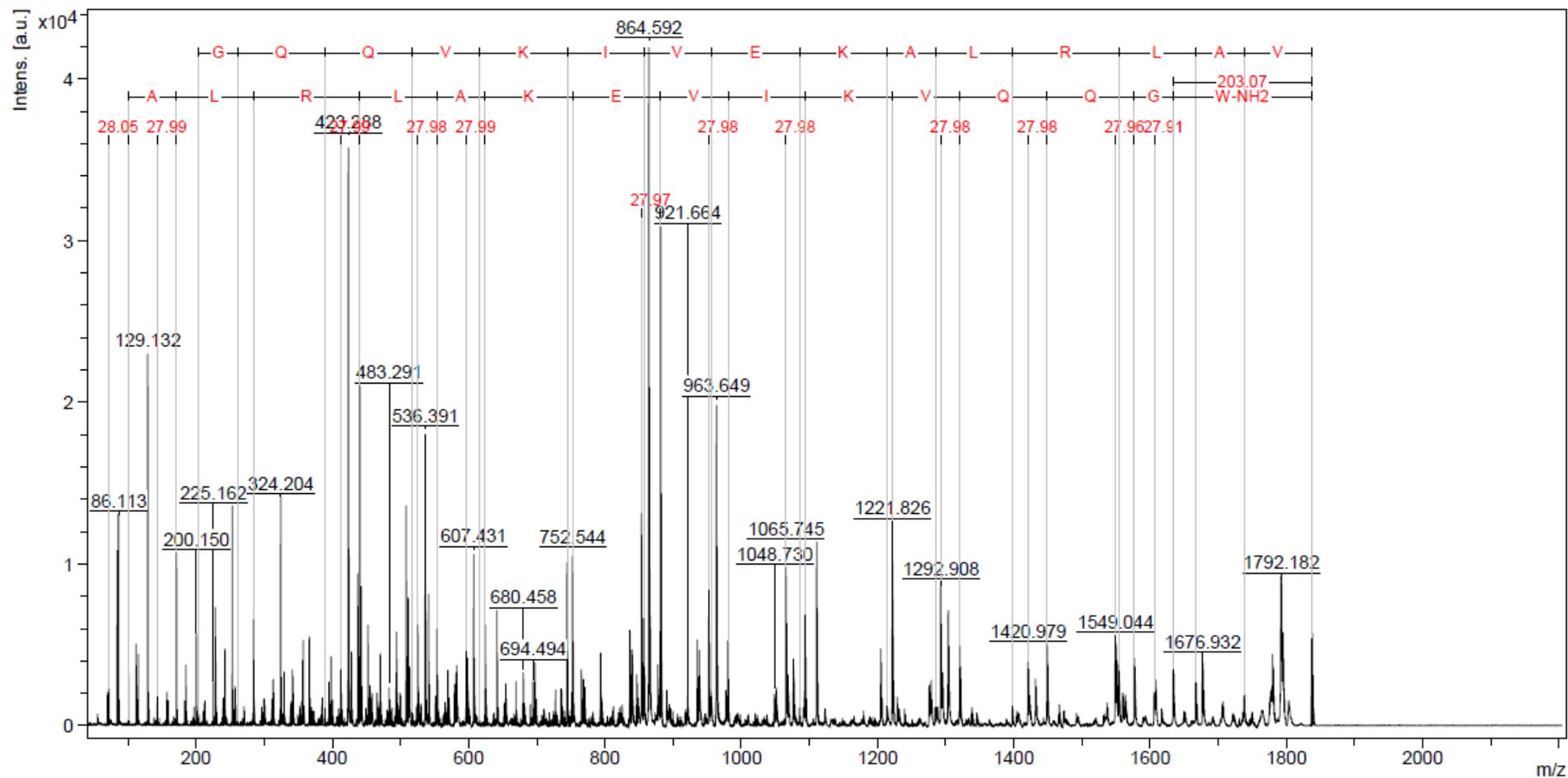


Figura 1.05 – Espectro de fragmentação do peptídeo Tc01. A sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo foi confirmada através da análise manual do espectro de fragmentação. A sequência do peptídeo em questão (**VALRLAKEVIKVVQQGW**) foi confirmada através da interpretação da série y (sequência superior, da direita para a esquerda) e série b (sequência inferior, da esquerda para direita) dos fragmentos gerados. O resíduo final da série b é apresentado junto com $-NH_2$, representando o C-terminal amidado.

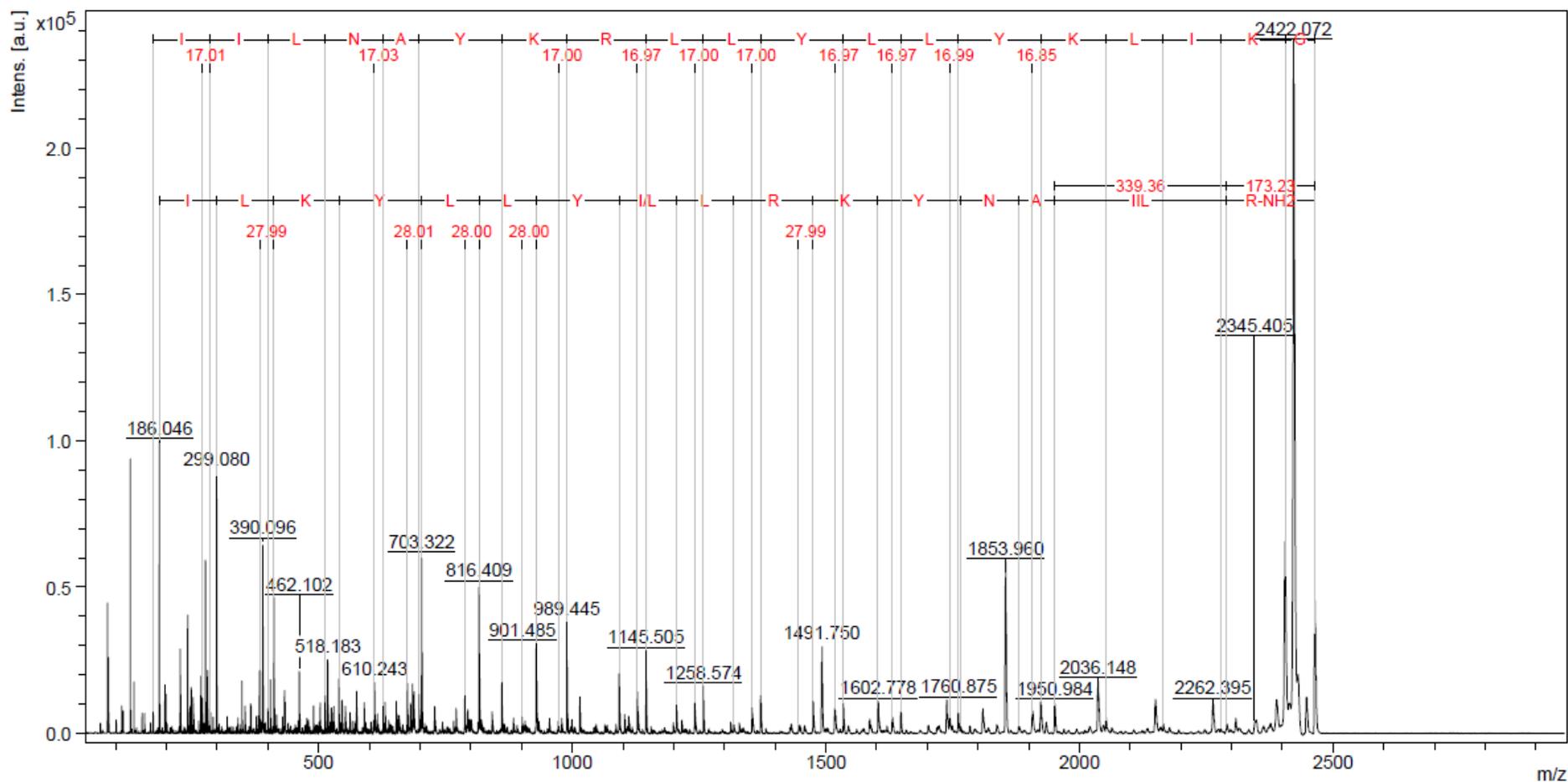


Figura 1.06 – Espectro de fragmentação do peptídeo Tc02. A sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo foi confirmada através da análise manual do espectro de fragmentação. A sequência do peptídeo em questão (**GKILKYLLYLLRKYANLIIR**) foi confirmada através da interpretação da série y (sequência superior, da direita para a esquerda) e série b (sequência inferior, da esquerda para direita) dos fragmentos gerados. O resíduo final da série b é apresentado junto com $-NH_2$, representando o C-terminal amidado.

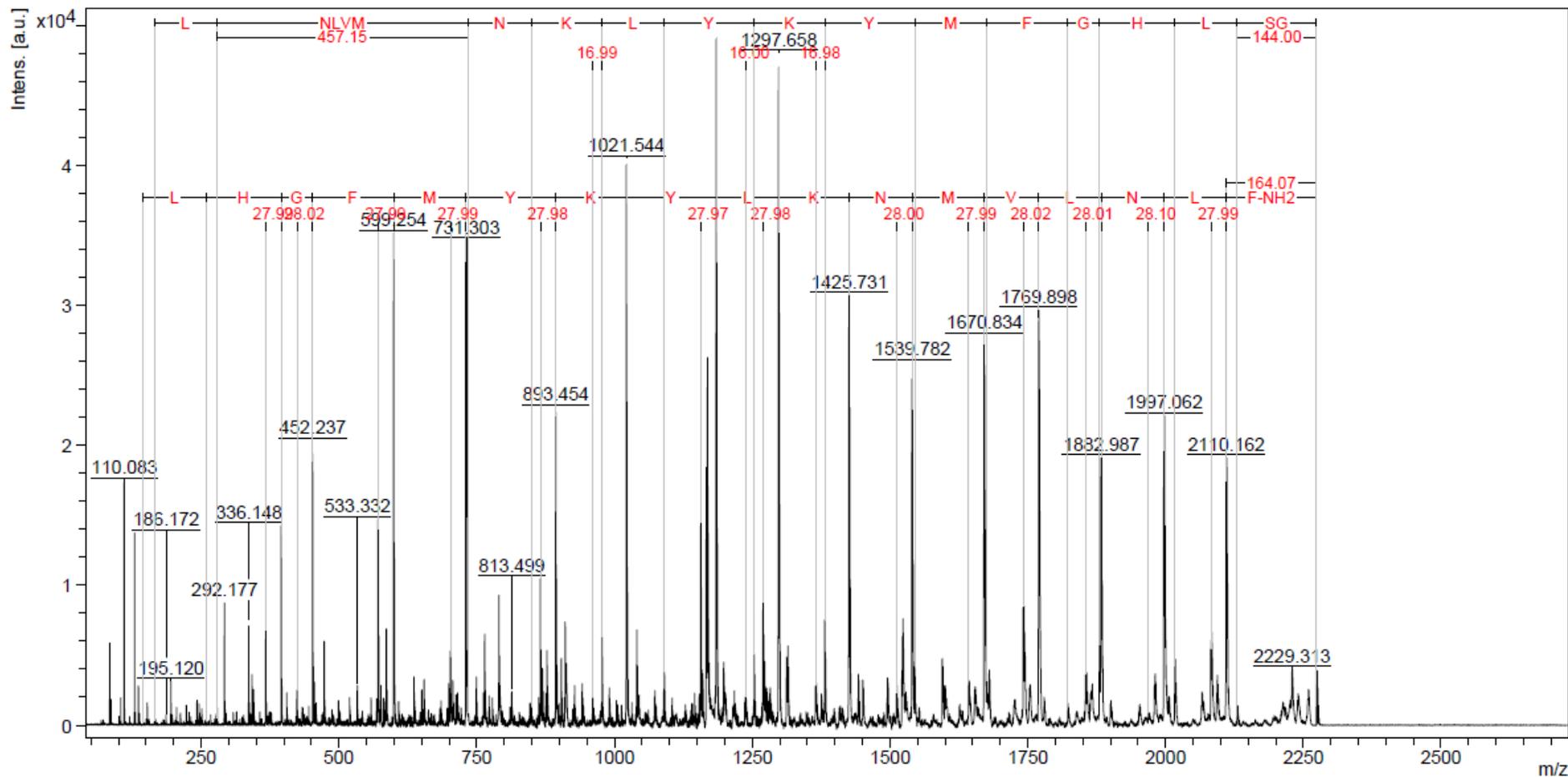


Figura 1.07 – Espectro de fragmentação do peptídeo Tc06. A sequência de resíduos de aminoácidos do peptídeo foi confirmada através da análise manual do espectro de fragmentação. A sequência do peptídeo em questão (**GSLHGFMYKYLKNMVLNLF**) foi confirmada através da interpretação da série y (sequência superior, da direita para a esquerda) e série b (sequência inferior, da esquerda para direita) dos fragmentos gerados. O resíduo final da série b é apresentado junto com $-NH_2$, representando o C-terminal amidado.

Após a confirmação da massa e sequência esperadas, os peptídeos foram purificados por HPLC de fase reversa, em escala analítica, para observação do perfil de eluição dos peptídeos. Após confirmação das frações de interesse por espectrometria de massa, os peptídeos foram purificados em escala preparativa, para obtenção de material suficiente para a realização dos testes biológicos. Os cromatogramas das purificações em escala preparativa de alguns peptídeos, assim como os espectros de MS referente às frações coletadas, evidenciando o grau de pureza obtido, estão representados nas figuras de 1.08-1.10. Após a confirmação da pureza, os peptídeos foram liofilizados, ressuspensos em água ultrapura e quantificados para os testes de atividade antimicrobiana (Tabela 1.06).

Tabela 1.06. Concentração dos PAIs em solução para testes biológicos.

| Peptídeos | Concentração em μM |
|-----------|-------------------------------|
| Tc01 | 1982 |
| Tc02 | 1159 |
| Tc03 | 1246 |
| Tc04 | 1333 |
| Tc05 | 1652 |
| Tc06 | 1814 |
| Tc07 | 1622 |
| Tc08 | 1777 |
| Tc09 | 1252 |
| Tc10 | 2406 |
| Tc11 | 1640 |
| At01 | 2657 |
| At02 | 2399 |
| At03 | 2974 |
| At04 | 1553 |
| Cs01 | 1021 |
| Zm01 | 1291 |
| Cs02 | 1829 |
| Cs03 | 889 |
| Gr01 | 2649 |
| Gr02 | 1712 |
| Asc-8 | 2892 |
| DS01 | 2198 |

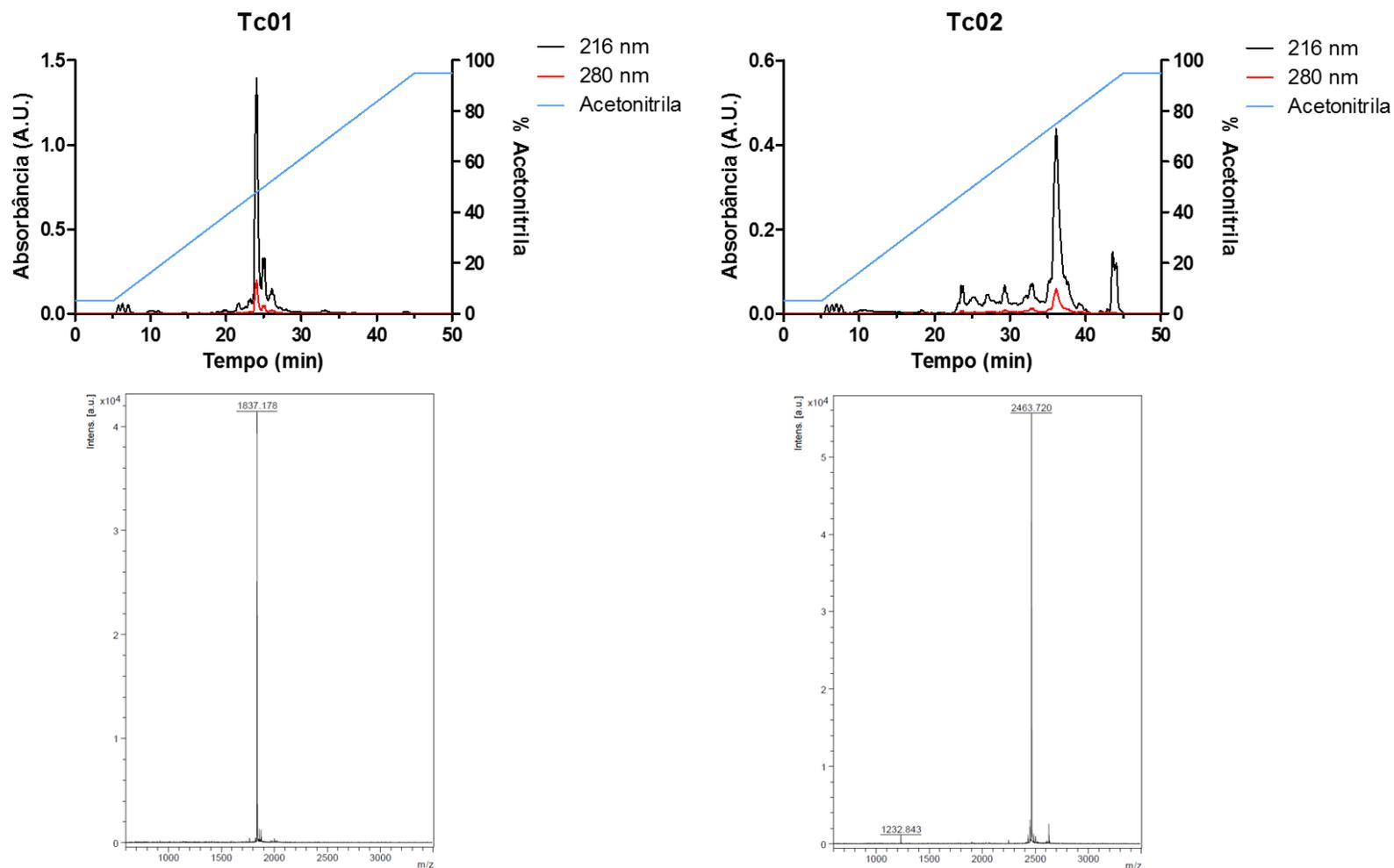


Figura 1.08 – Perfil cromatográfico dos peptídeos Tc01 e Tc02 e espectro de massa das frações coletadas. Os peptídeos foram eluídos em um gradiente de acetonitrila + 0,1% (v/v) TFA, em uma coluna preparativa C18. Espectro de massa obtido em um MALDI-TOF/TOF, evidenciando o alto grau de pureza do peptídeo.

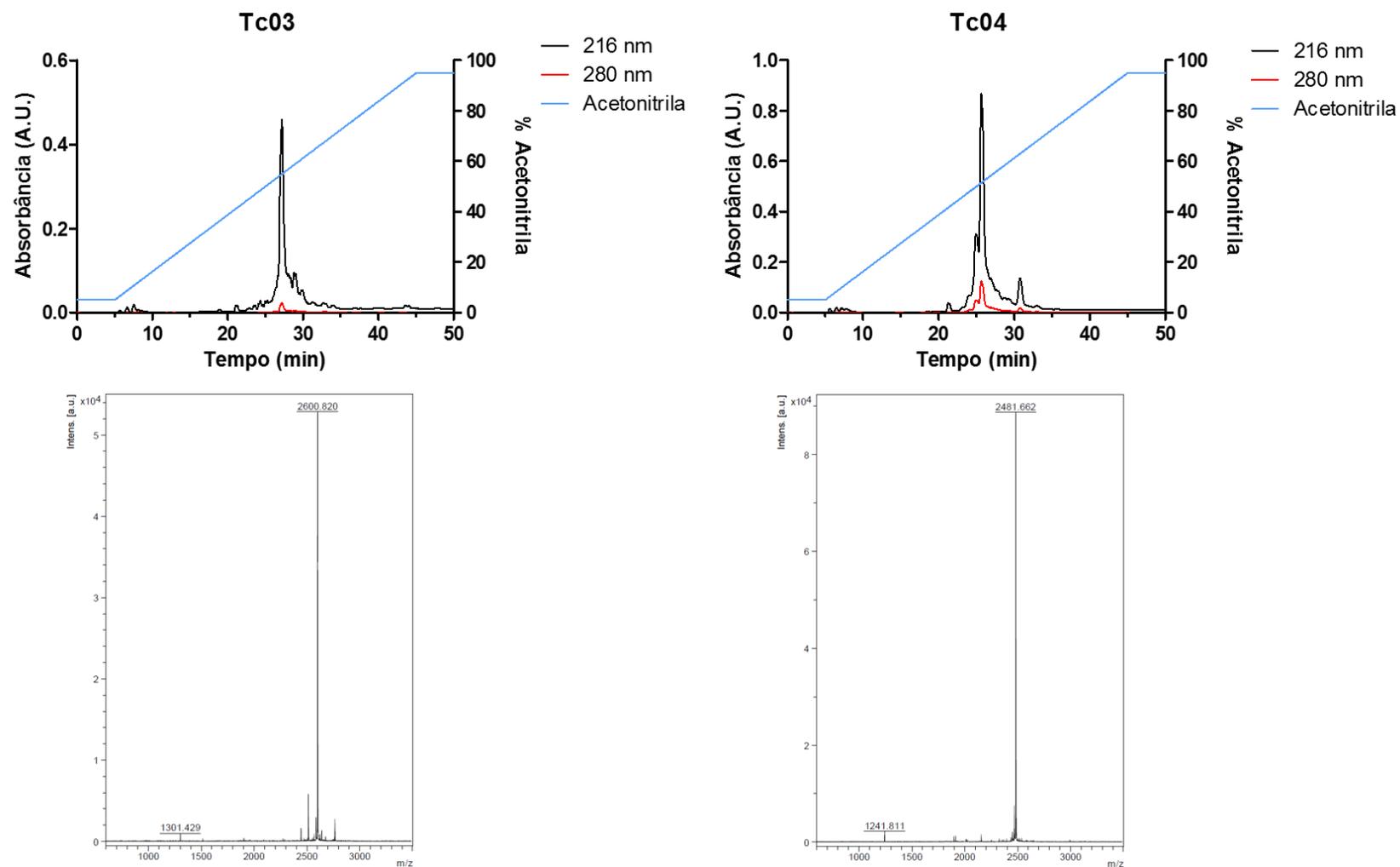


Figura 1.09 – Perfil cromatográfico dos peptídeos Tc03 e Tc04 e espectro de massa das frações coletadas. Os peptídeos foram eluídos em um gradiente de acetonitrila + 0,1% (v/v) TFA, em uma coluna preparativa C18. Espectro de massa obtido em um MALDI-TOF/TOF, evidenciando o alto grau de pureza do peptídeo.

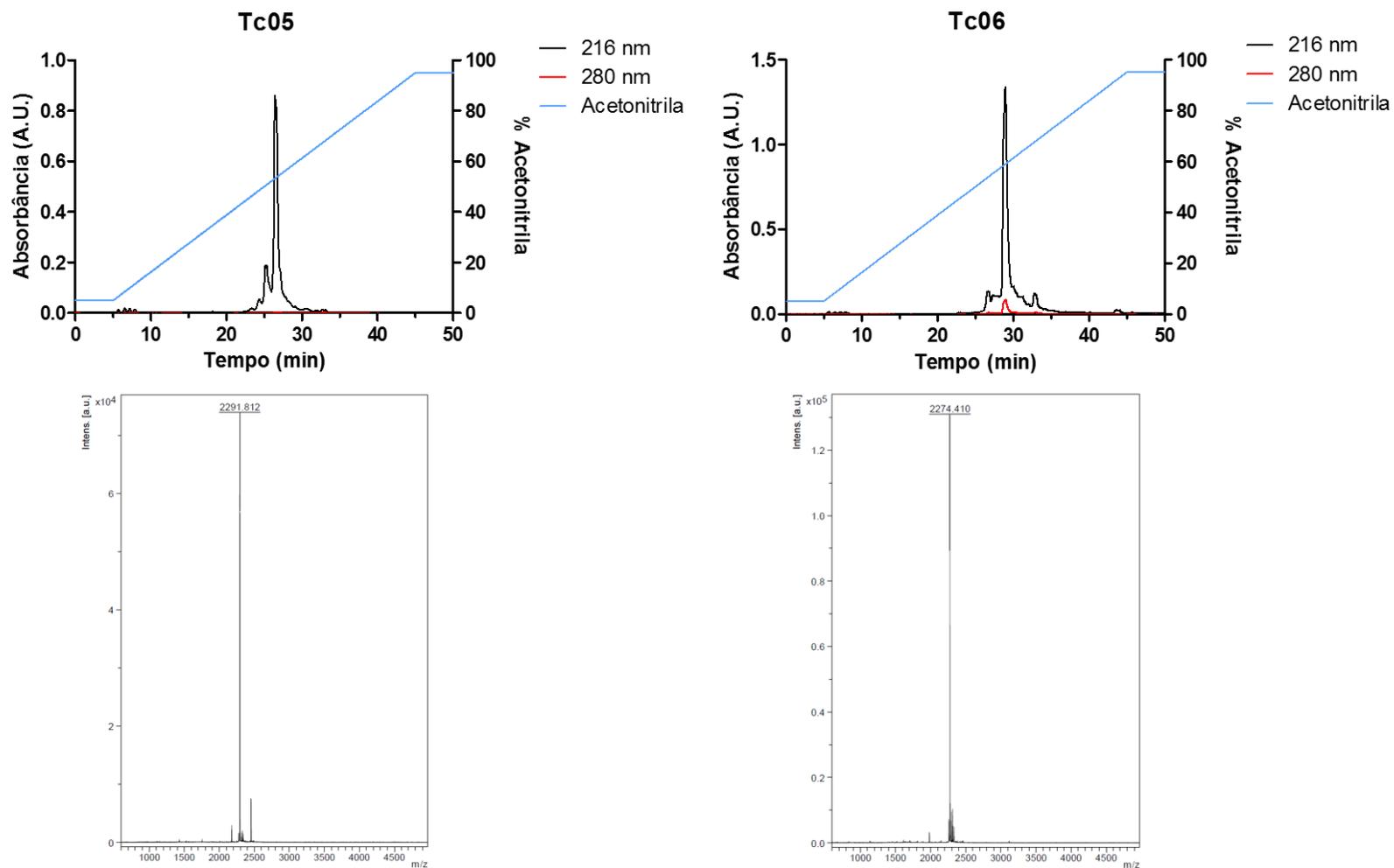


Figura 1.10 – Perfil cromatográfico dos peptídeos Tc05 e Tc06 e espectro de massa das frações coletadas. Os peptídeos foram eluídos em um gradiente de acetonitrila + 0,1% (v/v) TFA, em uma coluna preparativa C18. Espectro de massa obtido em um MALDI-TOF/TOF, evidenciando o alto grau de pureza do peptídeo.

1.4.3. PAIs são agentes antimicrobianos potentes, de amplo espectro e com baixa atividade hemolítica.

O potencial antimicrobiano dos 21 PAIs contra bactérias Gram +, Gram –, leveduras e fungos filamentosos, patógenos humanos e de plantas foram testados. Dezesesseis peptídeos, ou aproximadamente 76% dos PAIs sintetizados, apresentaram atividade inibitória contra, pelo menos, um dos microrganismos testados, em uma concentração de até 256 μM (Tabelas 1.07 e 1.08). Considerando a geração de peptídeos, a 1^o (cacau) apresentou 55% de acerto (6 de 11), enquanto as demais apresentaram 100% (10 de 10).

Oito peptídeos (Tc02, Tc06, Tc08, At02, Cs01, Cs02, Gr01 e Gr02) foram tão ou mais potentes do que os AMPs DS01 e Asc-8 (Tabela 1.07 e 1.08), com uma amplitude similar em termos de espectro de atividade. Foi possível observar, também, que alguns peptídeos apresentaram uma seletividade maior para alguns grupos de microrganismos. O peptídeo Tc02 inibiu o crescimento de leveduras e fungos filamentosos de forma mais eficiente que bactérias Gram + e Gram –, enquanto o peptídeo Tc08 apresentou um padrão oposto de atividade. Outros peptídeos como Gr01 e Gr02 inibiram o crescimento de microrganismos independente da composição de parede celular e membrana plasmática dos microrganismos.

A atividade microbicida desses PAIs também foi avaliada (Tabelas 1.09 e 1.10). Para os peptídeos mais ativos, a concentração inibitória e a concentração microbicida foram similares, exceto para o peptídeo Tc06. Esse peptídeo não apresentou atividade microbicida contra vários microrganismos, ao passo que ele inibiu o crescimento de vários fungos em concentrações inferiores a 32 μM . Este fato indica que esta molécula apresenta uma ação fungistática ao invés de fungicida.

Os PAIs sintéticos que apresentaram atividade antimicrobiana foram testados para sua citotoxicidade utilizando eritrócitos humanos como modelo. Apesar dos PAIs aqui descritos serem selecionados para atuar contra microrganismos, a lise de eritrócitos é usada como padrão para avaliar a seletividade dos peptídeos. Alguns PAIs induziram lise em uma faixa de concentrações intermediária ao dos AMPs utilizados como controle (Tabela 1.11). Os peptídeos Asc-8 e DS01 representam extremos em termos de seletividade. O primeiro, é uma molécula conhecida hemolítica (Conlon et al., 2004), enquanto o último não induz mudanças significativas nos eritrócitos (Brand et al., 2002). Os PAIs Tc02, Gr01 e Gr02, três dos peptídeos com as mais altas atividades antimicrobianas, induziram 50% de hemólise à 128 μM , uma concentração aproximadamente 64 vezes maior que a necessária para atividade antifúngica, indicando um ótimo índice terapêutico. Tal fato também foi verdade para os demais PAIs, que não induziram 50% de hemólise em nenhuma das concentrações testadas.

Tabela 1.07. Concentração inibitória mínima dos PAIs que apresentaram atividade antifúngica.

| Peptídeos | Concentração inibitória mínima ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) | | | | | | | |
|----------------|--|--------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | <i>Candida albicans</i> | <i>Cryptococcus neoformans</i> | <i>Fusarium solani</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Fusarium oxysporum vas</i> | <i>Ramularia areola</i> | <i>Rhizoctonia solani</i> | <i>Trichoderma asperellum</i> |
| Tc02 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 0,83 \pm 0,29 | 0,83 \pm 0,29 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| Tc05 | 128,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Tc06 | 4,0 \pm 0,0 | 10,67 \pm 4,61 | 32,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | N/A | 6,67 \pm 2,31 |
| Tc08 | 4,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 |
| Tc10 | 64,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | 64,0 \pm 0,0 | N/A | N/A |
| At01 | 16,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | N/A | 8,0 \pm 0,0 |
| At02 | 8,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 |
| At03 | 128,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | N/A | 256,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | N/A | 128,0 \pm 0,0 |
| At04 | N/A | 64,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Cs01 | 2,67 \pm 1,15 | 8,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | N/A | 32,0 \pm 0,0 |
| Zm01 | 6,67 \pm 2,31 | 4,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 10,67 \pm 4,61 | 2,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 |
| Cs02 | 32,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 13,33 \pm 4,61 | 16,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 |
| Cs03 | 128,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | N/A | 256,0 \pm 0,0 |
| Gr01 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 0,5 \pm 0,0 | 0,5 \pm 0,0 | 0,5 \pm 0,0 | 0,5 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| Gr02 | 4,0 \pm 0,0 | 2,67 \pm 1,15 | 2,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 1,67 \pm 0,57 | 2,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 |
| Asc-8 | 8,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 3,33 \pm 1,15 |
| DS01 | 4,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 |
| Fluconazol | 1,63 \pm 0,0 | 1,63 \pm 0,0 | N/A | N/A | 26,12 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A |
| Anfotericina B | 0,27 \pm 0,0 | 0,13 \pm 0,0 | 1,08 \pm 0,0 | 0,54 \pm 0,0 | 1,08 \pm 0,0 | 0,54 \pm 0,0 | 1,08 \pm 0,0 | 2,16 \pm 0,0 |

N/A – Sem atividade antifúngica para a faixa de concentrações testadas (256 – 0,5 μM)

Os peptídeos Tc01, Tc03, Tc04, Tc07, Tc09 e Tc11 não apresentaram atividade antifúngica

Tabela 1.08. Concentração inibitória mínima dos PAIs que apresentaram atividade antibacteriana.

| Peptídeos | Concentração inibitória mínima ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) | | | | | | | |
|-------------|--|-------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|---------------------------|---|--|
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Erwinia carotovora</i> | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i> |
| Tc02 | 10.67 \pm 4.61 | 16.0 \pm 0.0 | 4.0 \pm 0.0 | 13.33 \pm 4.61 | 8.0 \pm 0.0 | 16.0 \pm 0.0 | 4.0 \pm 0.0 | 16.0 \pm 0.0 |
| Tc03 | 64,0 \pm 0,0 | N/A | 16,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | N/A | 32,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 |
| Tc05 | N/A | N/A | 64,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Tc06 | 32,0 \pm 0,0 | 26,67 \pm 9,24 | 16,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 13,33 \pm 4,61 | 128,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 |
| Tc08 | 2,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 6,67 \pm 2,65 | 2,0 \pm 0,0 | 3,33 \pm 1,15 | 4,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 |
| Tc10 | 26,67 \pm 9,24 | 128,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | N/A | 128,0 \pm 0,0 |
| At01 | 64,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 256,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 |
| At02 | 2,0 \pm 0,0 | 5,33 \pm 2,31 | 1,0 \pm 0,0 | 3,33 \pm 1,15 | 4,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| At03 | 16,0 \pm 0,0 | N/A | 8,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | 32,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 |
| At04 | N/A | N/A | 256,0 \pm 0,0 | N/A | 16,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A |
| Cs01 | 32,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 |
| Zm01 | 13,33 \pm 4,61 | 16,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 16 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 |
| Cs02 | 8,0 \pm 0,0 | N/A | 3,33 \pm 1,15 | 64,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 |
| Cs03 | 128,0 \pm 0,0 | N/A | 64,0 \pm 0,0 | N/A | 128,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | N/A |
| Gr01 | 0,5 \pm 0,0 | 3,33 \pm 1,15 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 0,83 \pm 0,29 | 0,5 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| Gr02 | 4,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 |
| Asc-8 | 2,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 3,33 \pm 1,15 | 2,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 |
| DS01 | 1,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 0,5 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 0,5 \pm 0,0 |
| Ampicilina | 10,77 \pm 0,0 | N/A | 0,08 \pm 0,0 | N/A | 5,38 \pm 0,0 | 1,35 \pm 0,0 | 2,69 \pm 0,0 | 1,35 \pm 0,0 |
| Gentamicina | 0,52 \pm 0,0 | 0,13 \pm 0,0 | 0,033 \pm 0,0 | 8,37 \pm 0,0 | 0,26 \pm 0,0 | 0,53 \pm 0,0 | 0,52 \pm 0,0 | 0,53 \pm 0,0 |

N/A – Sem atividade antibacteriana para a faixa de concentrações testadas (256 – 0,5 μM).

Os peptídeos Tc01, Tc04, Tc07, Tc09 e Tc11 não apresentaram atividade antibacteriana.

Tabela 1.09. Concentração fungicida mínima dos PAIs.

| Peptídeos | Concentração fungicida mínima ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) | | | | | | | |
|----------------|---|--------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| | <i>Candida albicans</i> | <i>Cryptococcus neoformans</i> | <i>Fusarium solani</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Fusarium oxysporum vas</i> | <i>Ramularia areola</i> | <i>Rhizoctonia solani</i> | <i>Trichoderma asperellum</i> |
| Tc02 | 2,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 0,83 \pm 0,29 | 2,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 |
| Tc05 | 128,0 \pm 0,0 | 256,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Tc06 | 4,0 \pm 0,0 | 10,67 \pm 4,61 | N/A | N/A | 64,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | N/A | N/A |
| Tc08 | 4,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 |
| Tc10 | 128,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | 128,0 \pm 0,0 | N/A | N/A |
| At01 | 26,67 \pm 9,24 | 64 \pm 0,0 | N/A | N/A | 128,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | N/A | N/A |
| At02 | 8,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 |
| At03 | 128,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | 256,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | N/A | N/A |
| At04 | N/A | 256,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Cs01 | 4,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | 128,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | N/A | N/A |
| Zm01 | 6,67 \pm 2,31 | 8,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | N/A | N/A |
| Cs02 | 32,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | 128,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | N/A | N/A |
| Cs03 | 128,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | 64,0 \pm 0,0 | N/A | N/A |
| Gr01 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 0,5 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| Gr02 | 8,0 \pm 0,0 | 5,33 \pm 2,31 | 8,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 5,33 \pm 2,31 | 2,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 |
| Asc-8 | 10,67 \pm 4,61 | 4,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 3,33 \pm 1,15 | 4,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 |
| DS01 | 8,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 |
| Fluconazol | NA | 1,63 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Anfotericina B | 0,54 \pm 0,0 | 0,54 \pm 0,0 | 1,08 \pm 0,0 | 1,08 \pm 0,0 | 1,08 \pm 0,0 | 0,54 \pm 0,0 | 2,16 \pm 0,0 | 2,16 \pm 0,0 |

N/A – Sem atividade fungicida para a faixa de concentrações testadas (256 – 0,5 μM)

Tabela 1.10. Concentração bactericida mínima dos PAIs.

| Peptídeos | Concentração bactericida mínima ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) | | | | | | | |
|-------------|---|-------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|---------------------------|---|--|
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Erwinia carotovora</i> | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> | <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>citri</i> |
| Tc02 | 10,67 \pm 4,61 | 32,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 10,67 \pm 4,61 | 32,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 |
| Tc03 | 128,0 \pm 0,0 | N/A | 16,0 \pm 0,0 | 256,0 \pm 0,0 | N/A | 64,0 \pm 0,0 | N/A | 256,0 \pm 0,0 |
| Tc05 | N/A | N/A | 64,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Tc06 | 64,0 \pm 0,0 | N/A | 64,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 26,67 \pm 9,24 | 128,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | N/A |
| Tc08 | 6,67 \pm 2,65 | 8,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 6,67 \pm 2,65 | 4,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 |
| Tc10 | 64,0 \pm 0,0 | N/A | 16 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | N/A | 128,0 \pm 0,0 |
| At01 | N/A | N/A | 64,0 \pm 0,0 | 256,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | N/A |
| At02 | 3,33 \pm 1,15 | 8,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 6,67 \pm 2,31 |
| At03 | 32,0 \pm 0,0 | N/A | 8,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | 32,0 \pm 0,0 | N/A | 64,0 \pm 0,0 |
| At04 | N/A | N/A | 256,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Cs01 | 42,67 \pm 18,47 | N/A | 8,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 5,53 \pm 2,31 | 128,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | N/A |
| Zm01 | 16 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 16 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 256,0 \pm 0,0 |
| Cs02 | 16 \pm 0,0 | N/A | 4,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 16 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 |
| Cs03 | 128,0 \pm 0,0 | N/A | 128,0 \pm 0,0 | N/A | 256,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 256,0 \pm 0,0 | N/A |
| Gr01 | 0,67 \pm 0,29 | 3,33 \pm 1,15 | 1,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 0,83 \pm 0,29 | 2,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| Gr02 | 8,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 3,33 \pm 1,15 | 3,33 \pm 1,15 |
| Asc-8 | 2,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 |
| DS01 | 1,0 \pm 0,0 | 2,0 \pm 0,0 | 1,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 0,5 \pm 0,0 | 4,0 \pm 0,0 | 0,5 \pm 0,0 |
| Ampicilina | 10,77 \pm 0,0 | N/A | 0,08 \pm 0,0 | N/A | 10,77 \pm 0,0 | 2,70 \pm 0,0 | 10,77 \pm 0,0 | 5,38 \pm 0,0 |
| Gentamicina | 0,52 \pm 0,0 | 0,52 \pm 0,0 | 0,033 \pm 0,0 | 8,37 \pm 0,0 | 0,52 \pm 0,0 | 0,53 \pm 0,0 | 0,52 \pm 0,0 | 0,53 \pm 0,0 |

N/A – Sem atividade fungicida para a faixa de concentrações testadas (256 – 0,5 μM)

Tabela 1.11. Avaliação da citotoxicidade dos PAIs com eritrócitos humanos.

| Peptídeos | Atividade hemolítica (% ± SD) | | | | | | | | H50* |
|-----------|-------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| | 128 µM | 64 µM | 32 µM | 16 µM | 8 µM | 4 µM | 2 µM | 1 µM | |
| Tc02 | 50,15 ± 5,15 | 29,15 ± 2,57 | 17,39 ± 1,15 | 6,30 ± 1,59 | 2,89 ± 1,12 | 0,40 ± 0,26 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 128 µM |
| Tc03 | 7,89 ± 1,44 | 2,29 ± 1,18 | 0,67 ± 0,30 | 0,09 ± 0,01 | 0,17 ± 0,04 | 0,00 ± 0,00 | 0,04 ± 0,03 | 0,03 ± 0,00 | < 128µM |
| Tc05 | 3,37 ± 0,38 | 0,78 ± 0,47 | 0,21 ± 0,09 | 0,50 ± 0,10 | 0,07 ± 0,04 | 0,15 ± 0,05 | 0,07 ± 0,01 | 0,11 ± 0,02 | < 128µM |
| Tc06 | 7,67 ± 1,69 | 1,18 ± 0,23 | 0,77 ± 0,23 | 0,01 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | < 128µM |
| Tc08 | 44,15 ± 5,64 | 28,81 ± 2,67 | 15,47 ± 1,58 | 2,00 ± 1,13 | 0,30 ± 0,05 | 0,27 ± 0,10 | 0,11 ± 0,09 | 0,11 ± 0,04 | < 128µM |
| Tc10 | 4,56 ± 0,58 | 0,68 ± 0,17 | 0,23 ± 0,10 | 0,00 ± 0,00 | 0,06 ± 0,02 | 0,18 ± 0,04 | 0,00 ± 0,0 | 0,00 ± 0,0 | < 128µM |
| At01 | 14,6 ± 2,14 | 5,04 ± 2,39 | 1,05 ± 0,22 | 0,19 ± 0,01 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | < 128µM |
| At02 | 23,10 ± 3,41 | 10,28 ± 4,3 | 2,41 ± 0,98 | 0,30 ± 0,16 | 0,00 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | < 128µM |
| At03 | 0,34 ± 0,11 | 0,17 ± 0,08 | 0,03 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,04 ± 0,01 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | < 128µM |
| At04 | 13,8 ± 2,41 | 4,12 ± 1,41 | 0,91 ± 0,20 | 0,40 ± 0,10 | 0,09 ± 0,04 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | < 128µM |
| Cs01 | 8,01 ± 2,16 | 2,18 ± 1,62 | 0,31 ± 0,15 | 0,27 ± 0,09 | 0,09 ± 0,01 | 0,01 ± 0,00 | 0,05 ± 0,03 | 0,10 ± 0,04 | < 128µM |
| Zm01 | 15,72 ± 3,48 | 6,56 ± 1,87 | 2,45 ± 1,03 | 0,66 ± 0,14 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | < 128µM |
| Cs02 | 3,41 ± 0,84 | 1,27 ± 0,44 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | < 128µM |
| Cs03 | 14,51 ± 1,55 | 4,11 ± 1,22 | 0,99 ± 0,34 | 0,21 ± 0,05 | 0,00 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | < 128µM |
| Gr01 | 51,72 ± 7,33 | 33,99 ± 5,46 | 11,33 ± 1,66 | 3,82 ± 1,28 | 1,96 ± 0,89 | 0,30 ± 0,15 | 0,00 ± 0,00 | 0,09 ± 0,01 | 128µM |
| Gr02 | 68,42 ± 5,45 | 46,44 ± 7,63 | 28,33 ± 4,77 | 7,01 ± 3,48 | 4,19 ± 0,78 | 1,23 ± 0,05 | 0,38 ± 0,09 | 0,01 ± 0,01 | 128 µM |
| Asc-8 | 101,56 ± 9,52 | 91,90 ± 6,36 | 54,35 ± 4,5 | 28,10 ± 4,76 | 14,72 ± 0,79 | 0,26 ± 0,2 | 0,32 ± 0,1 | 0,00 ± 0,00 | 32 µM |
| DS01 | 14,61 ± 1,20 | 3,70 ± 1,34 | 0,79 ± 0,30 | 0,48 ± 0,12 | 0,03 ± 0,01 | 0,17 ± 0,04 | 0,19 ± 0,02 | 0,00 ± 0,00 | < 128 µM |

* H50 – Concentração necessária para causar 50% de hemólise.

Apenas os peptídeos que apresentaram atividade contra pelo menos um dos microrganismos testados foram avaliados para seu potencial hemolítico.

1.4.4. Os PAIs de *T. cacao* são capazes de inibir a germinação dos basidiósporos do fungo *Moniliophthora perniciosa*

Os PAIs de *T. cacao* foram avaliados quanto ao seu potencial de inibição dos basidiósporos do fungo *M. perniciosa*, agente causal da doença vassoura-de-bruxa, importante patógeno da cacauicultura brasileira. A germinação dos basidiósporos é a primeira etapa no processo de infecção dos meristemas do cacauero (Frias et al., 1991), levando ao desenvolvimento da doença. *In vitro*, essa germinação é observada 4 horas depois da aplicação de uma solução de basidiósporos sob um meio de cultura (Figura 1.11).



Figura 1.11 – Basidiósporos de *M. perniciosa* após 4 horas de incubação à 24°C, em meio de cultura. Imagem obtida em um aumento de 10x por microscopia óptica de luz.

O efeito dos peptídeos de *T. cacao* na germinação dos basidiósporos de *M. perniciosa* em meio de cultura foi avaliado em 4, 24 e 48 horas após incubação à 24 °C. Previamente, as diferentes concentrações dos peptídeos, em água, foram incubadas com uma solução de basidiósporos (1×10^6 esporos.mL⁻¹), por 1 hora, à 24 °C, antes da aplicação no meio cultura sólido. Após 4 horas, foi observado que 5 dos 11 peptídeos de *T. cacao* foram capazes de inibir a germinação dos basidiósporos, em diferentes concentrações, quando comparados com o controle, na ausência de peptídeos (Figura 1.12). Os peptídeos DS01 e Asc-8 também foram capazes de inibir a germinação (Figura 1.12).

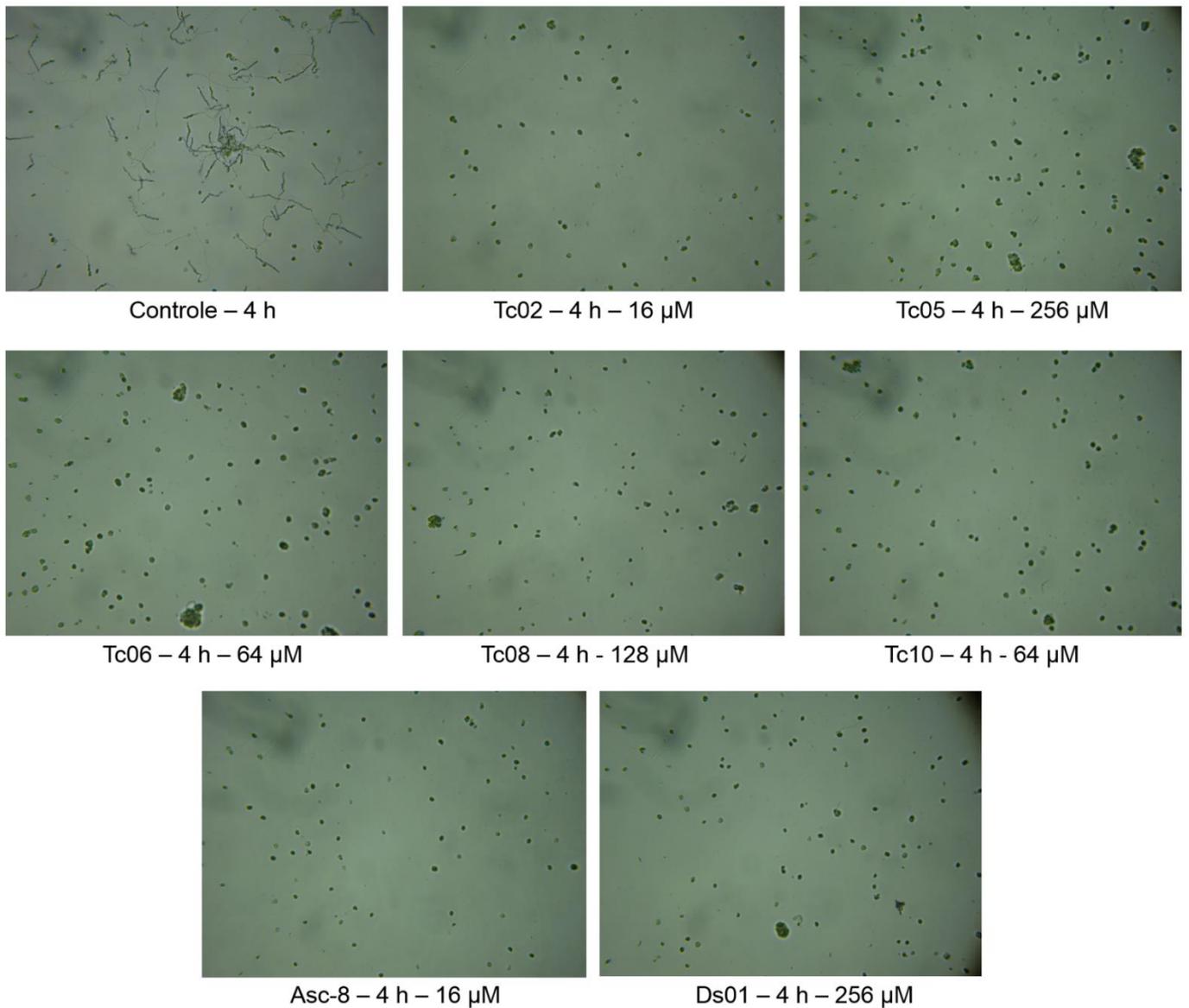


Figura 1.12 – Avaliação da germinação dos basidiósporos de *M. perniciosus* após 4 horas de incubação à 24 °C, na presença ou ausência dos peptídeos (controle). É possível observar o efeito inibitório dos peptídeos intragênicos, e dos controles positivos, na germinação dos basidiósporos.

Foi observado também que os peptídeos mantiveram seu poder inibitório após 24 e 48 horas de incubação (Figuras 1.13, 1.14 e 1.15). Na ausência de peptídeo, há um aumento significativo do tubo germinativo e do micélio, principalmente em 48 horas.

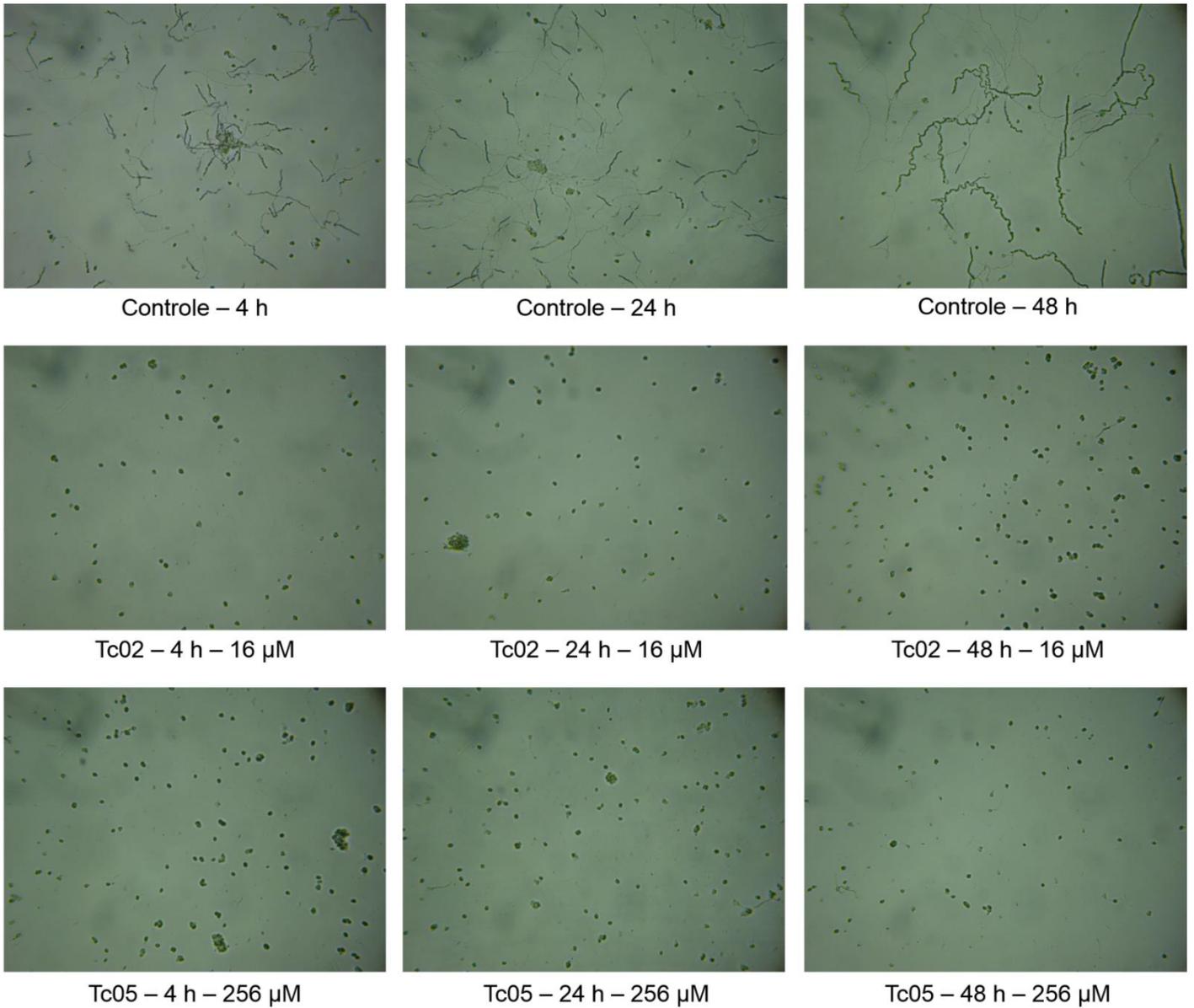


Figura 1.13 – Avaliação da germinação dos basidiósporos de *M. pernicioso* após 4, 24 e 48 horas de incubação à 24 °C, na ausência (controle) e na presença dos peptídeos Tc02 e Tc05. É possível observar que a inibição dos basidiósporos se mantém nos três tempos avaliados na presença dos peptídeos.

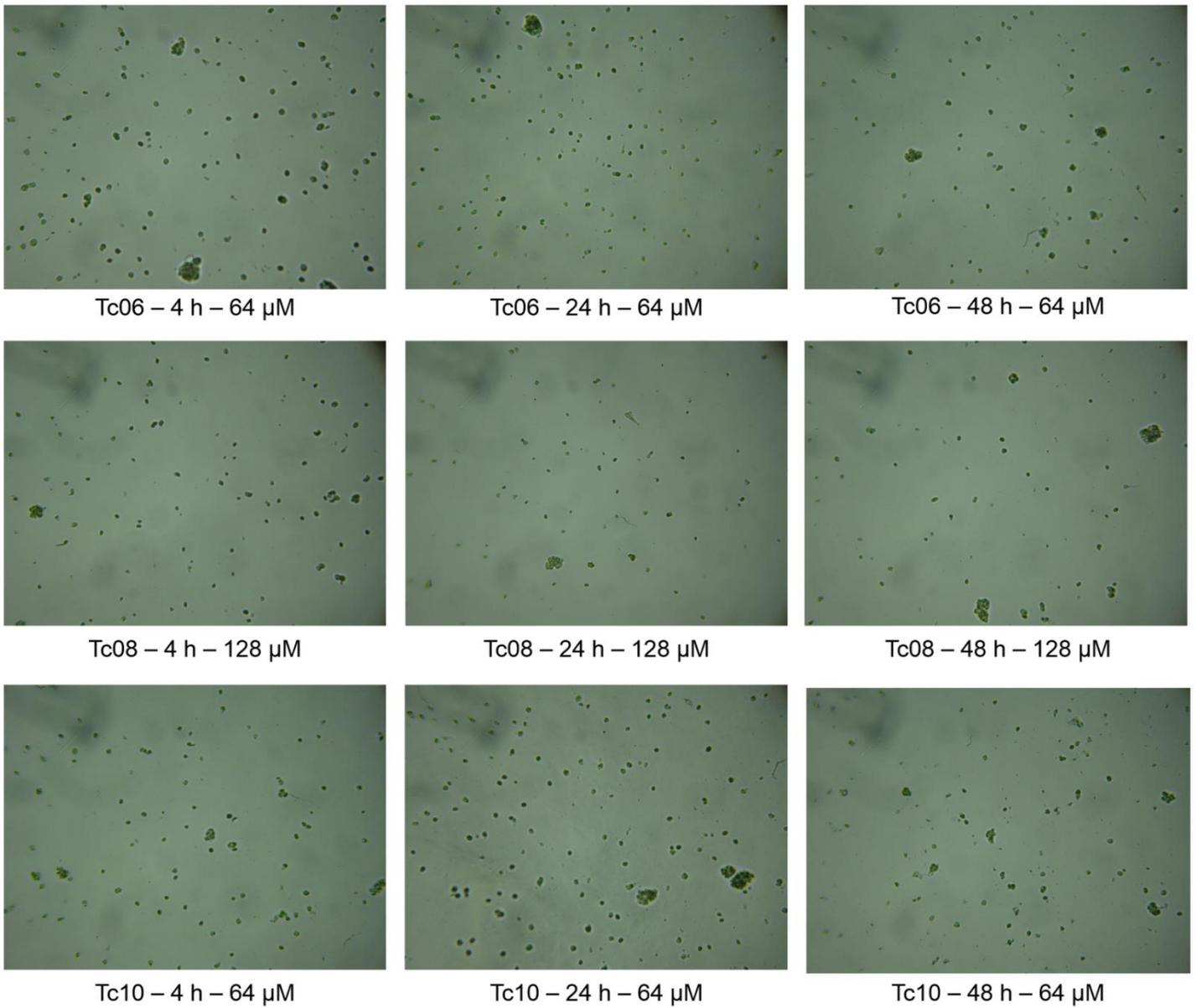


Figura 1.14 – Avaliação da germinação dos basidiósporos de *M. pernicioso* após 4, 24 e 48 horas de incubação à 24 °C, na presença dos peptídeos Tc06, Tc08 e Tc10. É possível observar que a inibição dos basidiósporos se mantém nos três tempos avaliados.

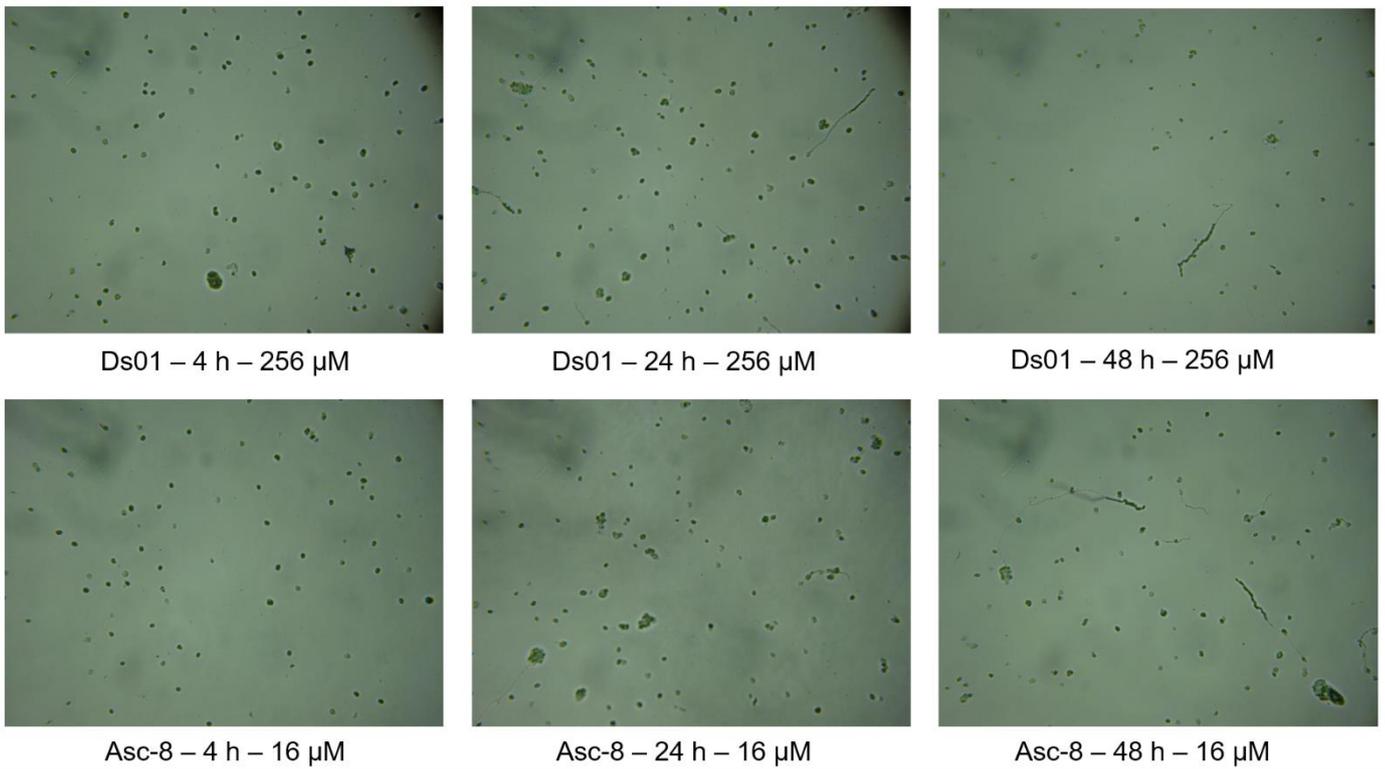


Figura 1.15 – Avaliação da germinação dos basidiósporos de *M. perniciosa* após 4, 24 e 48 horas de incubação à 24 °C, dos peptídeos DS01 e Asc-8. É possível observar que o efeito inibitório do peptídeo Asc-8 se mantém até 48 horas, quando alguns basidiósporos começaram a germinar. Para o DS01, foi possível observar germinação a partir de 24 horas.

Todos os peptídeos, em suas concentrações inibitórias mínimas, foram capazes de inibir, pelo menos, 90% dos basidiósporos observados, após o período de 48 horas (Tabela 1.12).

Tabela 1.12. Concentração inibitória dos peptídeos de *T. cacao* na germinação dos basidiósporos.

| Peptídeos | Concentração Inibitória mínima (CIM) (µM) | |
|-----------|---|-------|
| | CIM90 | CIM50 |
| Tc02 | 16 | 8 |
| Tc05 | 256 | 128 |
| Tc06 | 64 | 32 |
| Tc08 | 128 | 64 |
| Tc10 | 64 | 32 |
| Asc-8 | 16 | 8 |
| DS01 | 256 | 128 |

1.4.5. Avaliação do potencial inibitório dos PAIs de *A. thaliana* contra *Candida spp.* e na formação de biofilmes dos mesmos.

Os PAIs de *A. thaliana* foram avaliados quanto ao seu potencial de inibir o crescimento de *Candida spp.* (Tabela 1.13). O peptídeo At02 foi capaz de inibir todas as espécies testadas nas faixas de concentrações avaliadas (256 – 0,5 μM), incluindo *C. glabrata*, que apresentou resistência a todos os outros peptídeos. Apesar de não serem os peptídeos mais ativos contra *C. albicans*, como demonstrado na Tabela 1.07, os PAIs de *A. thaliana* foram selecionados para esses testes por não estarem envolvidos em nenhum pedido de proteção intelectual.

Tabela 1.13. Atividade antifúngica dos PAIs de *A. thaliana* contra *Candida spp.*

| Peptídeos | Concentração inibitória mínima ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) | | | | |
|-----------|--|-----------------------------------|---|------------------------------------|--------------------------------|
| | <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 | <i>Candida albicans</i> SC5314 | <i>Candida dubliniensis</i> IHEM 14280 | <i>Candida krusei</i> IHEM 6104 | <i>Candida glabrata</i> BG2 |
| At01 | 16,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 64,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | N/A |
| At02 | 8,0 \pm 0,0 | 8,0 \pm 0,0 | 32,0 \pm 0,0 | 16,0 \pm 0,0 | 128,0 \pm 0,0 |
| At03 | 128,0 \pm 0,0 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| At04 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |

Candida spp. são microrganismos conhecidos pelo seu potencial de produzir biofilmes, estrutura que aumentam a estabilidade da população de células e, conseqüentemente sua resistência a antibióticos (Ramage et al., 2005). Dessa forma, o potencial dos PAIs em inibir a formação de biofilmes também foi avaliado (Tabela 1.14). At01 e At02 foram capazes de inibir a formação de biofilmes de *C. albicans* SC5314, com uma CIB50 de 67,54 e 34,63 μM , respectivamente, mas não foram capazes de inibir a formação de biofilme das demais espécies testadas (Tabela 1.14).

Tabela 1.14. Atividade dos PAIs de *A. thaliana* na inibição da formação de biofilmes de *Candida spp.*

| Peptídeos | <i>C. albicans</i> SC5314 | <i>C. dubliniensis</i> IHEM 14280 | <i>C. krusei</i> IHEM 6104 | <i>C. glabrata</i> BG2 |
|-----------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | CIB50 ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) | | | |
| At01 | 67,54 | > 128 | > 128 | > 128 |
| At02 | 34,64 | > 128 | > 128 | > 128 |
| At03 | > 128 | > 128 | > 128 | > 128 |
| At04 | > 128 | > 128 | > 128 | > 128 |

1.4.6. At01 e At02 aumentam a atividade inibitória de anfotericina B e caspofungina contra biofilmes de *C. albicans*.

Devido ao seu potencial de inibição da formação de biofilmes, os peptídeos At01 e At02 foram avaliados quanto ao seu potencial de agir em sinergismo com os compostos anfotericina B (AmB) e caspofungina (CAS). Ambos compostos são conhecidos pela sua capacidade de inibir a formação de biofilmes e são utilizados como tratamento de candidíase sistêmica (Delattin et al., 2014a; Vriens et al., 2016).

A interação entre dois compostos é definida como sinérgica quando o efeito dos dois compostos em conjunto é superior que a soma dos efeitos quando separados, na mesma dosagem. De forma surpreendente, os PAIs At01 e At02 foram capazes de melhorar a atividade de AmB e CAS até em concentrações submicromolares (Tabelas 1.15, 1.16 e Figura 1.16). Em uma concentração de 8 μM , o peptídeo At01 foi capaz de aumentar a atividade de AmB e CAS em 14,18 e 28,08 vezes, respectivamente, quando comparado com o CIB50 dos compostos sozinhos. Já o peptídeo At02, na mesma concentração, aumenta as atividades em 27,34 e 44,06 vezes, respectivamente.

Tabela 1.15. Atividade sinérgica de At01 com AmB e CAS sob biofilmes de *C. albicans* SC5314, resultando na inibição da formação dos mesmos.

| Composto(s) | [At01] (μM) | CIB50 CAS ou AmB (μM) \pm SEM | Incremento da atividade | ICIF |
|-------------|-----------------------------|---|----------------------------|-------------|
| AmB apenas | 0 | 0,311 \pm 0,006 | NA | |
| AmB+At01 | 8 | 0,022 \pm 0,065 | 14,18 | 0,19 |
| | 4 | 0,027 \pm 0,026 | 11,46 | 0,15 |
| | 2 | 0,031 \pm 0,05 | 9,96 | 0,13 |
| | 1 | 0,032 \pm 0,012 | 9,71 | 0,12 |
| | 0,5 | 0,093 \pm 0,017 | 3,35 | 0,31 |
| | 0,25 | 0,099 \pm 0,044 | 3,12 | 0,32 |
| CAS apenas | 0 | 0,071 \pm 0,017 | NA | |
| CAS+At01 | 8 | 0,003 \pm 0,097 | 28,08 | 0,15 |
| | 4 | 0,004 \pm 0,031 | 18,66 | 0,11 |
| | 2 | 0,006 \pm 0,023 | 12,45 | 0,11 |
| | 1 | 0,012 \pm 0,043 | 5,89 | 0,18 |
| | 0,5 | 0,017 \pm 0,035 | 4,13 | 0,25 |

Tabela 1.16. Atividade sinérgica de At02 com AmB e CAS sob biofilmes de *C. albicans* SC5314, resultando na inibição da formação dos mesmos.

| Composto(s) | [At02] (μM) | CIB50 CAS ou AmB (μM) \pm SEM | Incremento da atividade | ICIF |
|-------------|-----------------------------|---|----------------------------|-------------|
| AmB apenas | 0 | 0,311 \pm 0,006 | NA | |
| AmB+At02 | 8 | 0,011 \pm 0,098 | 27,34 | 0,16 |
| | 4 | 0,016 \pm 0,025 | 19,00 | 0,11 |
| | 2 | 0,017 \pm 0,012 | 18,09 | 0,08 |
| | 1 | 0,024 \pm 0,013 | 13,06 | 0,09 |
| | 0,5 | 0,035 \pm 0,017 | 8,98 | 0,12 |
| | 0,25 | 0,089 \pm 0,014 | 4,48 | 0,23 |
| | | | | |
| CAS apenas | 0 | 0,071 \pm 0,017 | NA | |
| CAS+At02 | 8 | 0,002 \pm 0,012 | 44,06 | 0,14 |
| | 4 | 0,002 \pm 0,050 | 28,57 | 0,09 |
| | 2 | 0,003 \pm 0,081 | 21,77 | 0,08 |
| | 1 | 0,006 \pm 0,037 | 12,43 | 0,10 |
| | 0,5 | 0,012 \pm 0,17 | 6,06 | 0,17 |
| | 0,25 | 0,015 \pm 0,059 | 4,71 | 0,22 |

Valores de ICIF menores do que 0,5 indicam sinérgismo entre os compostos testados. Todos os valores em negrito nas Tabelas 1.15 e 1.16 indicam concentrações de sinérgismo entre os PAIs e os compostos antifúngicos. Na Figura 15, é possível observar claramente um deslocamento para a esquerda das curvas dose-resposta obtidas da combinação de peptídeos com compostos, quando comparada com os compostos, apenas.

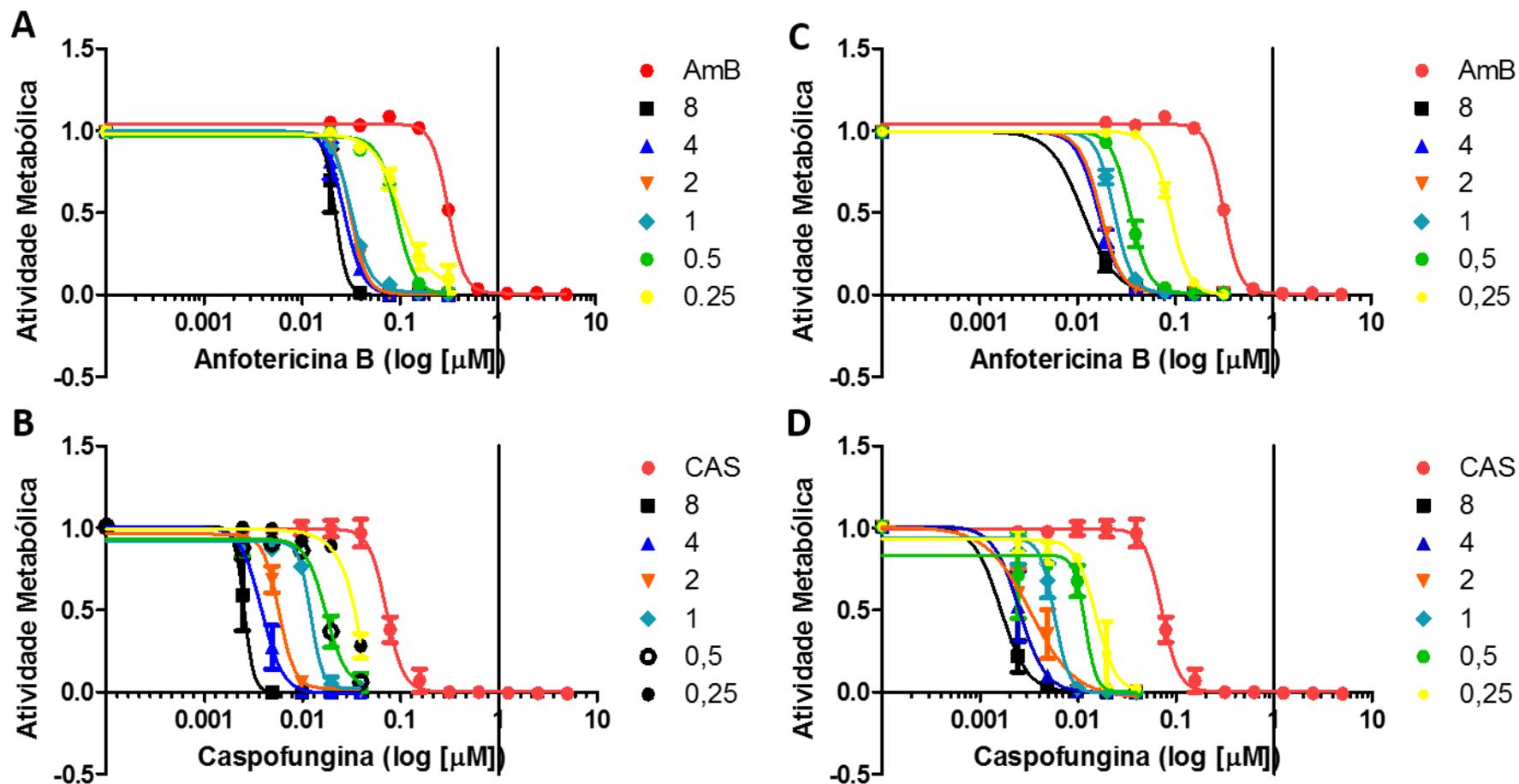


Figure 1.16 – Sinergismo entre PAIs e caspofungina ou anfotericina B na inibição de biofilmes de *C. albicans*. A e B – At01; C e D – At02. Atividade metabólica foi medida usando o ensaio de CTB. Curvas sigmoidais foram geradas usando dados de três experimentos independentes (n=3), usando o programa GraphPad Prism. Curvas dose-resposta de caspofungina e anfotericina B na presença de concentrações sinérgicas de At01 e At02 estão presentes no gráfico. O deslocamento para esquerda das curvas indica uma diminuição na quantidade necessária dos compostos para inibição a formação de biofilme. Números na legenda significam a concentração dos peptídeos em μM . Atividade metabólica de 1 significa 100% de crescimento.

1.5. DISCUSSÃO

Na Grécia antiga, Aristóteles introduziu o conceito de primeira causa, também referida como princípio movedor ou a primeira de todas as substâncias, o começo de tudo que existe na natureza. Segundo Aristóteles, os seres vivos não podem ser a causa única de si próprios, ou seja, não podem ser a origem nem a explicação de si mesmos. Tudo o que existe no universo se originou de algo anterior, essas de algo anterior a eles, e assim por diante.

Ao analisarmos o desenvolvimento de um zigoto até um ser adulto, a diversidade da vida na Terra a partir do LUCA (Theobald, 2010; Weiss et al., 2016), e o surgimento do universo como conhecemos a partir do Big Bang (Lemaître, 1927; Lemaître, 1931; Kragh & Lambert, 2007), todos esses eventos se encaixam na lógica aristotélica. Cada um desses eventos pode ser considerado como um ponto primordial, a qual revelará sua potencialidade de acordo com o ambiente e ao tempo no qual o mesmo for exposto.

Ao falarmos de vida, toda essa potencialidade está contida no genoma. E toda essa potencialidade advém de um processo evolutivo anterior que pode, no curso do tempo, ser modelado com a perda de potenciais em função de novos, assim como, a geração de novos potenciais após anos e anos de acúmulos aleatórios. A forma como essas potencialidades são expressas nem sempre são tão óbvias. Peptídeos bioativos encriptados com funções diferentes daquela da proteína parental são um exemplo (Meisel & Bockelmann, 1999).

A encriptação de PAIs nos genomas pode ser produto da mudança de função de uma molécula ancestral com essa função por algum mecanismo de duplicação gênica (Connan & Wolfe, 2008), ou, apenas um conjunto de aleatoriedades acumulados. Independente do mecanismo evolutivo por trás da encriptação dessas moléculas, a potencialidade encontra-se ali.

Brand et al. (2012) desenvolveram um meio analítico capaz de decifrar racionalmente essa potencialidade não-óbvia dentro de estruturas primárias de proteínas, na forma de peptídeos antimicrobianos. A metodologia se baseia em três passos complementares: a filtragem de genomas ou conjunto de proteínas utilizando o programa Kamal, o teste das moléculas, e um sistema de classificação para identificar PAIs que causam perturbações em vesículas de fosfolípeos modelo (Capítulo 02). As propriedades físico-químicas dos subgrupos de peptídeos, associados com os resultados de atividade antimicrobiana, são analisados e utilizados para otimização dos parâmetros físico-químicos para futuras filtragens.

Esta tese apresenta uma melhoria qualitativa e quantitativa da metodologia inicialmente proposta por Brand et al. (2012) para a busca de peptídeos bioativos, mostrando diversas gerações de PAIs com atividades antifúngicas e antibacterianas oriundos de diversas proteínas, de diversos organismos. A busca por tais peptídeos vislumbra, em um futuro, a possibilidade de transformação de plantas de interesse, como demonstrado para soja (Brand et al., 2012) e milho (Almeraya & Sánchez-de-Jiménez, 2016), como uma alternativa a transgenia convencional e ao uso excessivo de compostos químicos para o combate de patógenos (Punja & Utkhede, 2003; Lorito et al., 2010).

Podemos separar os PAIs gerados nesse trabalho e no anterior, em 4 diferentes gerações:

- Geração 0: PAIs obtidos por Brand et al., (2012);
- Geração 1: PAIs de *T. cacao*;
- Geração 2: PAIs de *A. thaliana*;
- Geração 3: PAIs de *C. sinensis*, *Z. mays* e *G. raimondii*.

Na Geração 0, seis peptídeos de 15 selecionados apresentaram atividade antimicrobiana contra, pelo menos, um dos microrganismos testados. Apesar do sucesso de 40% na predição dos peptídeos, nenhum deles apresentou atividade comparável as apresentadas pelos diferentes AMPs utilizados como controle (Brand et al., 2012).

Todos os PAIs descritos neste trabalho foram testados com 16 microrganismos diferentes (Tabela 1.07 e 1.08), sendo que alguns grupos de peptídeos foram testados para outros microrganismos específicos. Dentre os microrganismos comum a todos, encontram-se leveduras patogênicas humanas, fungos filamentosos, em sua maioria causadores de doenças em diversas plantas, assim como bactérias Gram + e Gram – patogênicas humanas e de plantas. Na Geração 1, seis peptídeos de 11 selecionados apresentaram atividade antimicrobiana. Para essa geração, o sucesso foi de 55% na predição. Além disso, três peptídeos (Tc02, Tc06 e Tc08) apresentaram resultados comparáveis ou melhores do que aqueles observados para os AMPs utilizados como controle, DS01 e Asc-8 (tabela 1.07 e 1.08) (Brand et al., 2002; Conlon et al., 2004). Outro dado interessante, é a seletividade apresentada pelo peptídeo Tc02 a fungos e leveduras, sinalizando uma possível preferência a composição de membranas desses organismos, com menos cargas (Ibeas et al., 2000), do que aquela encontrada em bactérias (Yeaman & Yount, 2003). O inverso foi verdade para o peptídeo Tc08.

Tais resultados evidenciam a evolução na filtragem de peptídeos, que foi atingida por dois motivos. A primeira, é relacionada a mudanças nos parâmetros físico-químicos quando comparados com o trabalho pioneiro (Brand et al., 2012), principalmente no que diz respeito a número de resíduos, hidrofobicidade e momento hidrofóbico (Tabela 1.17). Os peptídeos de *T. cacao* variaram de 16-22 e resíduos, com uma média de hidrofobicidade e momento hidrofóbico maior do que aqueles da Geração 0. A segunda, é que os peptídeos não ativos de *T. cacao* foram de suma importância para as demais gerações. Apesar da importância da anfifilicidade em hélices de AMPs ser conhecida (Zaslhoff, 2002), eles permitiram o entendimento, de forma prática, de certas nuances quanto a posição de certos resíduos de aminoácido, E e D em porções mais centrais da molécula em uma possível hélice (Segrest et al., 1974). Os parâmetros físico-químicos foram mantidos para as demais filtragens, mas a avaliação manual dos mesmos se tornou mais criteriosa.

Tabela 1.17. Comparativo dos parâmetros físico-químicos utilizados neste trabalho e por Brand et al. (2012).

| Parâmetros físico-químicos | Janela | Janela (Brand et al., 2012) |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Número de resíduos | 16-22 aa | 25-30 aa |
| Filtro por resíduos | C e P | C e P |
| Carga líquida | +1 até +5 | +1 até +6 |
| Massa Molecular (Da) | 1400 até 4000 | 2200 até 3200 |
| Hidrofobicidade escala TM (Zhao & London, 2006) | - 0,485 até 0,516 | -1,0 até 2,0 |
| Momento Hidrofóbico escala TM (Zhao & London, 2006) | 0,516 até 1,267 | 0,3 até 1,64 |
| Agregação (Conchillo-Sole et al., 2007) | -10 até +55 | 0 até +40 |
| Ponto Isoelétrico (Bjellqvist et al., 1993) | 9 até 13 | 8 até 11 |
| Janela de hidrofobicidade (Kyte & Doolittle, 1982) | Max 1,0 até 3,0 Min -2,0 até -0,5 | Max 0,5 até 3,0 Min -1,5 até +1,0 |

Tal aumento no critério ficou evidente nas Gerações 2 e 3. No total, 10 de 10 peptídeos apresentaram atividade antimicrobiana. Desses, os PAIs Cs01, Cs02, At02, Gr01 e Gr02 apresentaram resultados similares aos AMPs testados, sendo que os três últimos apresentaram atividade semelhante para todos os microrganismos, independente da composição da parede celular e membranas (tabela 01.18).

É interessante notar que a busca por PAIs segue um arquétipo de estrutura e propriedades, mas não de sequência. O objetivo com as filtragens foi buscar moléculas com potencial antimicrobiano com as mais variadas composições de aminoácidos, respeitando o que foi definido como parâmetro. Devido a isso, observamos um espectro de atividade tão amplo.

O peptídeo At04, por exemplo, é pouco ou nada ativo contra a maioria dos microrganismos testados, exceto *S. aureus*, inibindo seu crescimento a 16 µM (tabela 01.18). Não se trata do peptídeo mais potente contra esse microrganismo, mas essa especificidade certamente é algo interessante a ser explorada no futuro. A possibilidade de entender melhor o mecanismo pelo qual esse peptídeo inibe tal bactéria, assim como a capacidade de modular a busca por PAIs para patógenos específicos, são vertentes passíveis de exploração futura.

Apesar da busca por PAIs de diversas estruturas primárias ser o principal objetivo, a busca por peptídeos dentro de proteínas conservadas também é de interesse. Existem vários exemplos de proteínas conservadas nos mais diversos organismos, como as defensinas (Thevissen et al., 2004; Vriens et al., 2015). Proteínas conservadas entre diferentes organismos podem conter os mesmos PAIs, de acordo com o tempo de divergência das mesmas e da proximidade evolutiva entre espécies analisadas.

O peptídeo Tc06, por exemplo, é derivado da proteína citocromo P450 e pode ser encontrado com até 100% de identidade em várias dicotiledôneas como soja (*Glycine max*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) e com mais de 78% em monocotiledôneas, como arroz (*Oryza sativa*) e milho (*Zea mays*). Os peptídeos At01, Cs01 e Zm01 são oriundos da mesma proteína. É possível observar pequenas diferenças nos resíduos entre sequências (Figura 1.17), mas pouca diferença em termos de atividade biológica (Tabela 1.07 e 1.08), com exceção do peptídeo At01, que tem seu potencial diminuído com a substituição N17T, quando comparado com o PAI Tc06.

| | |
|-------------|----------------------------|
| Tc06 | GSLHGFMYKYLKNMVLNLF |
| At01 | GSLHGFMYKYLKNMVLTLF |
| Cs01 | GSLHGFMYRYLKNMVLNLF |
| Zm01 | GSLHGFMYKYLKTLVLRLY |
| | *****.***.:** *. |

Figura 1.17. Alinhamento dos PAIs oriundos da proteína citocromo P450 de diferentes plantas. É possível observar em vermelho os resíduos de aminoácidos que diferem da sequência do PAI Tc06. * - Identidade de resíduos; . – substituição por resíduos de aminoácidos da mesma classe; : - Substituição por resíduos de aminoácidos de classes diferentes; **Espaço em branco** - substituição de um resíduo em mais de uma sequência, sendo eles pertencentes a classes diferentes.

Outros exemplos de PAIs conservados em diferentes espécies são: Cs02, Gr01 e Gr02. Desses, o peptídeo Cs02 é um fragmento da apoproteína do fotossistema II CP47 sendo 100% conservada em espécies que possuem cloroplasto. De um ponto de vista aplicado, a descoberta de PAIs potentes dentro de domínios conservados de proteínas é algo desejável. A possibilidade de obter um peptídeo que possa ser utilizado para a transformação de várias plantas diminuiria o tempo de busca. Atualmente, os peptídeos Gr01 e Gr02 são os peptídeos mais promissores para futuras aplicações em mais de uma planta.

Independente da sua estrutura, os PAIs aqui descritos possuem algumas características físico-químicas em comum: eles são catiônicos e anfipáticos. A anfipaticidade permite que esses peptídeos, assim como os AMPs, interajam favoravelmente com membranas, as quais são compostas de lipídeos anfipáticos (Matsuzaki, 1999; Zasloff, 2002). Vários AMPs exercem sua toxicidade através da permeabilização da matriz lipídica das membranas celulares, enquanto outros utilizam alvos intracelulares para executar sua função (Park et al., 1998). Mesmo no último caso, a interação peptídeo-membrana é importante para a entrada desse peptídeo (Matsuzaki, 2009).

O potencial antimicrobiano dos PAIs descritos, principalmente daqueles mais ativos e de amplo espectro, levantam o questionamento quanto a possível seletividade dos mesmos para as membranas de microrganismos em detrimento aos outros seres vivos de interesse, como seres humanos e plantas. Em nossos testes, os PAIs apresentaram baixa toxicidade com eritrócitos humanos, inclusive os peptídeos Tc02, Tc08, At02, Gr01 e Gr02, apresentando uma H50 de 128 μ M ou mais. A maioria dos peptídeos induziram menos de 25% de lise em sua concentração mais alta.

O caráter catiônico dos peptídeos ativos certamente contribui para que os mesmos interajam com membranas de bactérias, uma vez que essas possuem uma maior quantidade de lipídeos carregados negativamente em pH fisiológico do que a de eucariotos, seja seu mecanismo de ação diretamente nessa estrutura, ou intracelular (Matsuzaki, 1999; Matsuzaki, 2009). Entretanto, essa característica, por si só, não definiria a seletividade dos peptídeos, uma vez que os mesmos também são capazes de inibir o crescimento de fungos e leveduras, e ser pouco ativo contra eritrócitos humanos (Tabela 1.11). A presença da parede celular em fungos e leveduras pode potencializar a toxicidade dos peptídeos nessas células em detrimento da de mamíferos, uma vez que os peptídeos podem interagir com os glicídeos da mesma, aumentando sua concentração superficial (Ibeas et al., 2000; Bahar & Ren, 2013). Em um teste piloto, não descrito nesse trabalho, três concentrações diferentes dos PAIs de *T. cacao* (CIM, 2x CIM e 4x

CIM) foram inoculados nos meristemas das folhas para avaliar seu efeito citotóxico. Após um período de 72 horas de incubação, nenhuma alteração macroscópica e fisiológica foi detectada. Tais testes precisam ser confirmados com novas repetições.

A escolha das plantas utilizadas nesse trabalho atendeu a alguns critérios, sendo um deles, a importância socioeconômica da cultura para o Brasil. A busca por métodos de controle da vassoura-de-bruxa continua. A predição e geração de peptídeos antimicrobianos, oriundos de *T. cacao*, capazes de inibir os basidiósporos do fungo, abrem o caminho para a intragenia como método de controle da vassoura-de-bruxa. Das 5 moléculas ativas, Tc02, Tc06 e TC10 se destacam como as melhores, inibindo o crescimento em uma concentração de 16, 64 e 64 μM , respectivamente (Tabela 1.12). Não há relatos na literatura de moléculas antimicrobianas, oriundas do próprio cacau, com tal potencial de inibição dos basidiósporos de *M. perniciosa*.

É importante ressaltar que o teste foi realizado com uma concentração final de 1×10^6 basidiósporos.mL⁻¹, devido a limitações metodológicas para visualização dos mesmos por microscopia. Essa concentração se mostrou a mais adequada para a observação de, pelo menos, 150 basidiósporos no campo de visão, por gota. Na natureza, é pouco provável que um meristema de cacau seja atingido por 1 milhão de basidiósporos de *M. perniciosa*, no mesmo local. Dessa forma, a concentração real de peptídeo, necessário para a inibição do patógeno, será menor do que o observado nos testes, o que torna os resultados ainda mais promissores. A avaliação dos peptídeos de *T. cacao* com outros patógenos causadores de doença no cacau, como a podridão-parda, causada por *Phytophthora spp.*, assim como a monilíase, causada pelo fungo *Moniliophthora roreri*, também são de interesse, principalmente pelos danos causados à cultura no mundo (Evans, 2007). Outro detalhe interessante a ser explorado no futuro é o potencial dos PAIs Gr01 e Gr02. Por uma questão temporal, ambos peptídeos não puderam ser testados quanto ao seu potencial de inibição da germinação de basidiósporos de *M. perniciosa*. Mas, com base no seu amplo espectro de ação, acreditamos que ambos PAIs seriam tão ou mais promissores do que o Tc02.

Apesar dos resultados promissores, é preciso ter em mente que a estratégia intragênica para o cacau levaria vários anos para ser validada, visto que se trata de uma árvore perene, que leva em torno de 3-5 anos para gerar os primeiros frutos (Argout et al., 2011). Como alternativa, tomates Micro-Tom poderiam ser transformados com os PAIs de *T. cacao* e infectados com o fungo *M. perniciosa*, como um modelo de teste *in vivo* do potencial dos peptídeos no controle da doença, antes de partir para a longa jornada com o cacau em si.

Os PAIs Cs01 e Cs02, de *C. sinensis* apresentaram resultados medianos (64 e 32 μM , respectivamente) contra a bactéria causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas campestris* p.v. *citri*, ao passo que outros peptídeos como Gr01, Gr02, At02, Tc08 apresentaram atividades entre 1 e 8 μM (Tabela 1.08). Como citado anteriormente, o peptídeo Gr02 é conservado em diversas espécies, incluindo *C. sinensis*. O mesmo é válido para o peptídeo Gr01, presente no genoma dessa planta com 88% de similaridade, sendo que os dois resíduos que diferem as sequências são uma alteração $\text{K} \rightarrow \text{R}$ e $\text{L} \rightarrow \text{I}$. É esperado que essa sequência apresente atividade antimicrobiana similar aquele do PAI Gr01.

As espécies de algodão mais cultivadas do mundo são os tetraplóides *G. hirsutum* e *G. bardabense*. Acredita-se que ambas as espécies tenham se formado a aproximadamente 1-2 milhões de anos atrás, fruto de poliploidização (Wang et al., 2012). À época do início desse estudo, a ausência do genoma anotado das espécies mais cultivadas, fez com que a escolha do diplóide *G. raimondii* como fonte de PAIs fosse óbvia, devido à sua proximidade com um dos progenitores das duas espécies (Wang et al., 2012; Li et al., 2015).

Além dos peptídeos selecionados do genoma de *G. raimondii* (Gr01 e Gr02), os PAIs Tc06, At03 e Cs02 também se encontram 100% conservados nessa planta. Todos esses peptídeos foram capazes de inibir o crescimento de *Ramularia areola*, em concentrações variando de 0,5-16 μM , sendo os peptídeos Gr01 e Gr02 os mais ativos (Tabela 1.07). O mesmo foi verdade para *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum*, mas com valores variando de 0,5 μM para Gr01 e 64 μM para At03.

Das plantas de interesse econômico, o algodoeiro é aquele que apresenta o maior potencial de transformação e obtenção de plantas transformantes em homozigose no tocante ao período de tempo para se obter tal evento. As plantas de algodão são normalmente crescidas até uma altura de 1-1,5 m anualmente e destruídas após a colheita do fruto para obtenção da fibra e semente. Assim como para *C. sinensis*, os peptídeos Gr01 e Gr02 são os mais promissores para futuros estudos.

Essa preocupação com os próximos passos da intragenia foi um dos motivos determinantes da escolha de *A. thaliana* como outra planta de interesse para a geração de PAIs. *A. thaliana* foi a primeira planta a ter seu genoma completo sequenciado (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) e é considerada uma planta modelo para diversos estudos (DeConinck et al., 2013). O curto ciclo de vida da planta (aproximadamente 3 meses entre plantio e colheita de sementes) e elevado número de estudos acerca de sua biologia faz com que essa planta seja um modelo, também para a intragenia. A possibilidade de infectar plantas dessa espécie com o

fungo *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum*, causador de necrose foliar e problemas vasculares, respectivamente, torna-se mais um favor favorável aos estudos com *A. thaliana* (Trusov et al., 2013; DeConinck et al., 2013).

Mesmo com todo o conhecimento existente acerca dessa planta, há muito ainda o que ser desvendado. DeConinck et al. (2013) detectaram 176 regiões transcricionalmente ativas não anotadas como resposta ao estresse oxidativo em *A. thaliana*. O peptídeo At02 é PAI de um dos peptídeos gerados por uma dessas regiões. Esse PAI se mostrou o mais ativo contra todas as espécies de fungos e bactérias testadas, quando comparados com os demais oriundos de *A. thaliana* (Tabelas 1.07 e 1.08).

Em um experimento preliminar, não apresentado nessa tese, todos os PAIs de *A. thaliana* foram capazes de inibir o crescimento de *B. cinerea* em uma concentração entre 4 e 64 μM , sendo os PAIs At01 e At02 os mais ativos. Esses resultados, em conjunto com os resultados positivos contra *F. oxysporum* direcionou a seleção dos peptídeos At01 e At02 para a transformação em *A. thaliana*. A avaliação da estratégia intragênica em *A. thaliana* está em andamento e sendo realizada em parceria com o laboratório *Plant Fungi Interaction*, coordenado pelo Professor Bruno P.A. Cammue, na Universidade Católica de Leuven (KU Leuven). O grupo em questão possui capacidade mundialmente conhecida no estudo de *A. thaliana*, de peptídeos antimicrobianos de plantas, principalmente defensinas, mecanismo de ação desses peptídeos e seu possível uso contra patógenos humanos.

Essa parceria permitiu explorar ainda mais o potencial dos PAIs de *A. thaliana* contra outros microrganismos. *Candida spp.* são patógenos humanos oportunistas que causam não apenas doenças superficiais, mas também, doenças sistêmicas perigosas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Delattin et al., 2014a; Delattin et al., 2014b). *C. albicans* é a quarta maior causa de infecções na corrente sanguínea nos Estados Unidos e tem uma alta taxa de mortalidade atrelada (Gudlaugsson et al., 2003; Wisplinghoff et al., 2004). Outras espécies têm emergido e causado sérios problemas também. *C. glabrata* por exemplo, possui uma resistência intrínseca contra os agentes antifúngicos normalmente utilizados (Pfaller, 2012). Isso também foi verdadeiro para o potencial antimicrobiano dos PAIs de *A. thaliana*, no qual apenas At02 foi capaz de inibir o crescimento dessa levedura, em uma concentração alta, de 128 μM (tabela 1.13).

Candida spp. possuem a capacidade de formar biofilmes. Biofilmes são comunidades de células bacterianas ou fúngicas que se aderem a uma superfície, biológica ou inerte, e se embebem em uma matriz polimérica produzida pelas células (Costerton et al., 1999). Esses

biofilmes apresentam um desafio para a saúde pública, uma vez que os mesmos são mais resistentes aos antibióticos convencionais, e contaminam instrumentos hospitalares como cateteres (Kojic & Darouiche, 2004). Atualmente, formulações lisossômicas de anfotericina B e equinocandinas, como a caspofungina, são algumas das poucas abordagens capazes de combater essa infecção (Kuhn et al., 2002). Dessa forma, alternativas para o combate desses patógenos e seus biofilmes são necessárias.

Vários estudos com peptídeos oriundos de plantas, dentre elas defensinas, têm sido realizados em busca de novas formas de tratamento ou de potencializar o efeito das drogas atuais (Delattin et al., 2014b; Vriens et al., 2015; Vriens et al., 2016). Inclusive, evidências de testes *in vivo* tem corroborado a ideia de que terapias conjuntas são mais eficazes e duradouras do que a monoterapia (Thevissen, 2016). De fato, os PAIs At01 e At02 não apresentaram resultados promissores na inibição de formação de biofilmes quando sozinhos (Tabela 1.14), mas surpreenderam quanto ao seu potencial de atuar sinergisticamente *in vitro* com os antibióticos AmB e CAS (Tabelas 1.15 e 1.16). Os valores de ICIF e as curvas dose respostas (Figura 1.16) indicam que concentrações ainda menores dos peptídeos podem apresentar sinergismo, com exceção da combinação At01+AmB (Tabela 1.15). Os resultados de sinergismo apresentado por ambos peptídeos, são superiores ao de defensinas como HsAFP01 (Vriens et al., 2015), RsAFP01 e RsAFP02 (Vriens et al., 2016), moléculas consideradas promissoras. O modo de ação promíscuo que é esperado desses peptídeos, ou seja, sem um componente de membrana alvo como ocorre com RsAFP01 e RsAFP02 (Vriens et al., 2016), pode ser um dos fatores determinantes para essa interação.

O conjunto de peptídeos gerados nesse trabalho permitiu uma análise mais profunda das nuances envolvidas na predição de moléculas, iniciada por Brand et al. (2012). A seleção com sucesso de 16 de 21 peptídeos, sendo os dez últimos com 100% de acerto, mostra a evolução do sistema. Nós exploramos apenas uma pequena parcela de toda a potencialidade disponível no genoma das plantas analisadas. Também mostramos que a busca por proteínas conservadas pode ser uma ferramenta importante na hora de selecionar PAIs. Uma análise sobre as consequências dessa evolução, e os próximos passos na predição de PAIs é apresentada e discutida no Capítulo 02.

1.6. REFERÊNCIAS

- ADAMALA, K.; SZOSTAK, J. W. (2013) Nonenzymatic template-directed RNA synthesis inside model protocells. *Science*, 342: 1098-1100.
- ALMEIDA, F. B. R.; CERQUEIRA, F. M.; SILVA, R. N.; ULHOA, C. J.; LIMA, A. L. (2007) Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: Evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 29: 1189-1193.
- ALMERAYA, E. V.; SÁNCHEZ-DE-JIMÉNEZ, E. (2016) Intragenic modification of maize. *Journal of Biotechnology*, 238: 35-41.
- AMARO, A. A.; NEVES, E. M.; LOPES, F. L.; NEVES, M. F.; JANK, M. S.; TROMBIM, V. S. (2007) Caminhos para a citricultura: uma agenda para manter a liderança mundial. São Paulo: Atlas, 114p.
- ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796-815.
- ARAGÃO, F. J. L.; BRASILEIRO, A. C. M. (2002) Positive, negative and marker-free strategies for transgenic plant selection. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14: 1-10.
- ARAGÃO, F. J. L.; FARIA, J. C. (2009) First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. *Nature Biotechnology*, 27: 1086-1088.
- ARAGÃO, F. J. L.; SANTOS, M. O.; MORAIS, L. S.; ROMANO, E. (2002) Metodologias para Transformação Genética de Plantas-Modelo. In: Circular técnica. 15: 1-5.
- ARAÚJO, A. E. (2003) Algodão em perigo. *Revista Cultivar – Grandes Culturas. Caderno Técnico*, n.54, 3-10.
- ARGOUT, X.; SALSE, J.; AURY, J. M.; GUILTINAN, M. J.; DROC, G.; et al. (2011) The genome of *Theobroma cacao*. *Nature Genetics*, 42: 101-108.
- BADA, J. L. (2013) New insights into prebiotic chemistry from Stanley Miller's spark discharge experiments. *Chemical Society Reviews*, 42: 2186-2196.
- BAHAR, A. A.; REN, D. (2013) Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6: 1543-1575.
- BARBOSA, E. A.; IEMBO, T.; MARTINS, G. R.; SILVA, L.P.; PRATES, M. V.; ANDRADE A. C.; BLOCH, C. (2015) Skin secretion peptides: the molecular facet of the deimatic behavior of the four-eyed frog, *Physalaemus nattereri* (Anura, Leptodactylidae). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29: 2061-2068
- BELASQUE JUNIOR, J. et al. (2010) Controle do Huanglobing no estado de São Paulo, Brasil. *Citrus Research & Technology*, 31: 53-64.
- BENÍTEZ, T.; RINCON, A. M.; LIMON, M. C.; CODON, A. C. (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.

- BERNHARDT, H. S. (2012) The RNA world hypothesis: the worst theory of the early life evolution of life (except for all the other). *Biology Direct*, 7: 23-31.
- BJELLQVIST, B.; HUGHES, G. J.; PASQUALI, C.; PAQUET, N.; RAVIER, F.; et al. (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*, 14: 1023-1031.
- BRAND, G. D.; KRAUSE, F. C.; SILVA, L. P.; LEITE, J. R. S. A.; MELO, J. A. T.; PRATES, M. V.; ET AL. (2006) Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides*, 27: 2137-2146.
- BRAND, G. D.; LEITE, J. R.; SILVA, L. P.; ALBUQUERQUE, S.; PRATES, M. V. et al. (2002) Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 49332-49340.
- BRAND, G. D.; MAGALHÃES, M. T. Q.; TINOCO, M. L. P.; ARAGÃO, F. J. L.; NICOLI, J.; KELLY, S. M.; et al. (2012) Probing protein sequences as sources for encrypted antimicrobial peptides. *PLoS One*, 7 :e45848.
- BRITO, J. P. C.; RAMADA, M. H. S.; MAGALHÃES, M. T. Q.; SILVA, L. P.; ULHOA, C. J. (2014) Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. *SpringerPlus*, 4: 600.
- BROGDEN, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3: 238-250.
- BROTMAN, Y.; KAPUNGATI, J. G.; VITERBO, A. (2012) *Trichoderma*. *Current Biology*, 20: 390-391.
- BROWN, K. (2001) Florida fights to stop citrus canker. *Science*, 292: 2275-2278.
- BROWN, T. A. (2006) *Genomes 3*. Garland Science Publishing. United States of America. 600 p.
- BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198: 169-184.
- BUSOLI, A. C. (1991) Práticas culturais, reguladores de crescimento, controle químico e feromônios no manejo integrado de pragas do algodoeiro. In: DEGRANDE, P.F. eds, *Bicudo do algodoeiro: Manejo Integrado*. Dourados, MS, EMBRAPA-UEPAE, 29-52.
- CAGLIANI, R.; FORNI, D.; RIVA, S.; POZZOLI, U.; COLLEONI, M.; BRESOLIN, N.; et al. (2013) Evolutionary analysis of the contact system indicates that kininogen evolved adaptively in mammals and in human populations. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 1397-1408.
- CARPINO, L. A.; HAN, G. Y. (1972) The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *The Journal of Organic Chemistry*, 37: 3404-3409.
- CARTER JR., C. W.; WOLFENDEN R. (2015) tRNA acceptor stem and anticodon bases form independent codes related to protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112: 7489-7494.

CÉLERES. (2016) <http://www.celeres.com.br/2o-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201516>.

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

CHEN, L.; DEVRIES, A. L.; CHENG, C. H. (1997) Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94: 3811-3816.

CIA, E.; SALGADO, C. L. (1997) Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M., ed. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2: 33-48.

CONANT, G. C.; WOLFE, K. H. (2008) Turning a hobby into a job: How duplicated genes find new functions. Nature Reviews Genetics, 9: 938-950.

CONCHILLO-SOLE, O.; DE GROOT, N. S.; AVILES, F. X.; VENDRELL, J.; DAURA, X.; et al. (2007) AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. BMC Bioinformatics, 8: 65.

CONLON, J. M.; SONNEVEND, A.; DAVIDSON, C.; SMITH, D. D.; NIELSEN, P. F. (2004) The ascaphins: a family of antimicrobial peptides from the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. Biochemical Biophysical Research Communication, 320: 170-175.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284: 1318-1322.

CRICK, F. H. (1968) The origin of the genetic code. Journal of Molecular Biology, 38: 367-379.

CUNHA, W. G.; TINOCO, M. L. P.; PANCOTI, H. L.; RIBEIRO, R. E.; ARAGÃO, F. J. L. (2010) High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene. Plant Pathology, 59: 654-660.

DANA, M.; PINTOR-TORO, J.; CUBERO, B. (2006) Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. Plant Physiology, 142: 722-730.

DE CONINCK, B.; CARRON, D.; TAVORMINA, P.; WILLEM, L.; CRAIK, D. J.; VOS, C.; et al. (2013) Mining the genome of *Arabidopsis thaliana* as a basis for the identification of novel bioactive peptides involved in oxidative stress tolerance. Journal of Experimental Botany, 64: 5297-5307.

DELATTIN, N.; DE BRUCKER, K.; VANDAMME, K.; MEERT, E.; MARCHAND, A.; et al. (2014a) Repurposing as a means to increase the activity of amphotericin B and caspofungin against *Candida albicans* biofilms. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 69: 1035-1044.

DELATTIN, N.; DE BRUCKER, K.; CRAIK, D. J.; CHENEVAL, O.; FRÖHLICH, M.; VEBER, M.; et al. (2014b) Plant-derived decapeptide OSIP108 interferes with *Candida albicans* biofilm formation without affecting cell viability. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58: 2647-2656.

- DEMIDOVA-RICE, T. N.; WOLF, L.; DECKENBACK, J.; HAMBLIN, M. R.; HERMAN, I. M. (2012) Human platelet-rich plasma- and extracellular matrix-derived peptides promote impaired cutaneous wound healing in vivo. *PLoS One*, 7: e32146.
- DORES, R. M.; LECAUDÉ, S.; BAUER, D.; DANIELSON, P. B. (2002) Analyzing the evolution of the opioid/orphanin gene family. *Mass Spectrometry Reviews*, 21: 220-43.
- DUBOS, R. J. (1939a) Studies on bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*: I. Preparation of the agent. Its activity *in vitro*. *The Journal of Experimental Medicine*, 70: 1-10.
- DUBOS, R. J. (1939b) Studies on bactericidal agent extracted from a soil *Bacillus*: II. Protective effect of the bactericidal agent against experimental *Pneumococcus* infections in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 70: 11-17.
- EVANS, H. C. (1980) Pleomorphism in *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' broom disease of cocoa. *Trans. The British Mycological Society*, 74: 515-526.
- EVANS, H. C. (2007). Cacao diseases – The trilogy revisited. *Phytopathology*, 97: 1640-1643.
- FAHLGREN, N.; BART, R.; HERRERA-ESTRELLA, L.; RELLÁN-ÁLVAREZ, R.; CHITWOOD, D. H.; DINNENY, J. R. (2016) Plant scientists: GM technology is safe. *Science*, 351: 824.
- FRIAS, G. A.; PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. (1991) Infection biology of *Crinipellis pernicioso* on vegetative flushes of cacao. *Plant Diseases*, 75: 552-556.
- GACESA, R.; CHUNG, R.; DUNN, S. R.; WESTON, A. J.; JAIMES-BECERRA, A.; MARQUES, A. C.; et al. (2015) Gene duplications are extensive and contribute significantly to the toxic proteome of nematocysts isolated from *Acropora digitifera* (Cnidaria: Anthozoa: Scleratinia). *BMC Genomics*, 16: 774.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D. (1988) *Manual de entomologia agrícola*. 2 ed. São Paulo: Ceres, 486p.
- GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S. F. (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*, 2: 1-33.
- GONDIM, D. M. C.; BELOT, J. L.; SILVIE, P.; PETIT, N. (1999) *Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil*. 3a ed. Cascavel, PR, COODETEC/CIRAD-CA. Boletim Técnico nº 33, 120p.
- GOULART, A. C. P. (1995) Principais fungos transmitidos pelas sementes de soja, feijão, milho e algodão. *Correio Agrícola*, São Paulo, n.2, 18-21.
- GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; et al. (2003) Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clinical Infectious Diseases*, 37: 1172-1177.
- HALDANE, J. B. S. (1929) The origin of life. *Rationalist Annual*, 148: 3-10.

HALDANE, J. B. S. (1965) Data needed for a blueprint of the first organism. In: Fox, S. W. (ed) The origin of prebiological systems and their molecular matrices. Academic Press, New York, 11-15.

HERMANSEN, R. A.; HVIDSTEN, T. R.; SANDVE, S. R.; LIBERLES, D. A. (2016) Extracting functional trends from whole genome duplication events using comparative genomics. *Biological Procedures Online*, 18:11.

HIGGS, P. G.; LEHMAN, N. (2014) The RNA World: molecular cooperation at the origins of life. *Nature Reviews Genetics*, 16: 7-17.

HOLLIDAY, P. (1980) *Fungus Diseases of Tropical Crops*. New York: Dover Pub. Inc., 607p.

HWANG, P. M.; ZHOU, N.; SHAN, X.; ARROWSMITH, C. H.; VOGEL, H. J. (1998) Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptides derived from bovine lactoferrin. *Biochemistry*, 37: 4288-4298.

IBEAS, J. I.; LEE, H.; DAMSZ, B.; PRASAD, D. T.; PARDO, J. M.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; NARASIMHAN, M. L. (2000) Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. *Plant Journal*, 23: 375-383.

INNAN, H.; KONDRASHOV, F. (2010) The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nature Reviews Genetics*, 11: 97-108.

JENSSEN, H.; HANCOCK, R. E. W. (2009) Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, 91: 19-29.

JUNG, Y. J.; LEE, S. Y.; MOON, Y. S.; KANG, K. K. (2012) Enhanced resistance to bacterial and fungal pathogens by overexpression of a human cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18/LL-37) in Chinese cabbage. *Plant Biotechnology Reports*, 6: 39-46.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*, 34: 595.

KANG, S. J.; PARK, S. J.; MISHIG-OCHIR, T.; LEE, B. J. (2014) Antimicrobial peptides: therapeutic potentials. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12: 1477-1486.

KIRSCHENBAUM, D. M. (1975) Molar absorptivity and $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. *Analytical Biochemistry*, 68: 465-484.

KISHI, R. N. I. (2014) Avaliação da atividade de peptídeos antimicrobianos sobre o crescimento de patógenos bacterianos de citros. Tese de Doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 123p.

KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. (2004) Candida infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 255-267.

KRAGH, H. S.; LAMBERT, D. (2007) The context of discovery: Lemaître and the prigin of the Primeval-Atom Universe. *Annals of Science*, 64: 445-470.

- KRUGER, K.; GRABOWSKI, P. J.; ZAUG, A. J.; SANDS, J.; GOTTSEHLIN, D. E.; CECH, T. R. (1982) Self-splicing RNA autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, 31: 147-157.
- KUHN, D. M.; GEORGE, T.; CHANDRA, J. et al. (2002) Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1773-1780.
- KUMAR, A.; SCHER, K.; MUKHERJEE, M.; PARDOVITZ-KEDMI, E.; SIBLE, G.V.; SINGH, U.S.; KALE, S.P.; MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A. (2010) Overlapping and distinct functions of two *Trichoderma virens* MAP kinases in cell-wall integrity, antagonistic properties and repression of conidiation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 398: 765-770.
- KURLAND, C. G. (2010) The RNA dreamtime: modern cells feature proteins that might have supported a prebiotic polypeptide world but nothing indicates that RNA world ever was. *Bioessays*, 32: 866-871.
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157: 105-132.
- LATGÉ, J. P. (2010) Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiology*, 12: 863-887.
- LAZCANO, A.; GUERRERO, R.; MARGULIS, L.; OR, J. (1998) The Evolutionary Transition from RNA to DNA in Early Cells. *Journal of Molecular Evolution*, 27: 283-290.
- LEMAÎTRE, G. (1927) Un Univers homogène de masse constante et de rayon croissant rendant compte de la vitesse radiale des nébuleuses extra-galactiques. *Annales de la Société Scientifique de Bruxelles*, A47: 49-59.
- LEMAÎTRE, G. (1931) The beginning of the world from the point of view of quantum theory. *Nature*, 127: 706.
- LEWIS, R. V.; STERN A. S. (1983) Biosynthesis of the enkephalins and enkephalin-containing polypeptides. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 23: 353-372.
- LI, F.; FAN, G.; LU, C.; XIAO, G.; ZOU, C.; KOHEL, R. J.; MA, Z.; et al. (2015) Genome sequence of cultivated Upland cotton (*Gossypium hirsutum* TM-1) provides insights into genome evolution. *Nature Biotechnology*, 33: 524-530.
- LI, Y.; XIANG, Q.; ZHANG, Q.; HUANG, Y.; SU, Z. (2012) Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37: 207-215.
- LÓPEZ-EXPÓSITO, I.; RECIO I. (2008) Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumor properties. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 6006, 271-293.
- LORITO, M.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E.; MONTE, E. (2010) Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 395-417.

MAPA (2016a) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>

MAPA (2016b) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/algodao>

MATSUZAKI, K. (1999) Why and how are peptide–lipid interactions utilized for selfdefence? Magainins and tachyplesins as archetypes, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1462: 1-10.

MATSUZAKI, K. (2009) Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788: 1687-1692.

MEHTA, Y. R.; MENTEN, J. O. M. (2006) Doenças e seu Controle In: Fundo de Apoio a Pesquisa do Algodão. Algodão – Pesquisas e Resultados para o Campo. Cuiabá: FACUAL, 392p.

MEINHARDT, L. W.; BELLATO, C. M.; RINCONES, J.; AZEVEDO, R. A.; CASCARDO, J. C. M.; PEREIRA, G. A. G. (2006) In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Current Microbiology*, 52: 191-196.

MEISEL, H.; BOCKELMANN, W. (1999) Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76: 207-215.

MELETIADIS, J.; VERWEIJ, P. E.; TEDORSTHORST, D. T.; MEIS, J. F.; MOUTON, J. W. (2005) Assessing in vitro combinations of antifungal drugs against yeasts and filamentous fungi: comparison of different drug interaction models, *Medical Mycology*, 43: 133-152.

MILLER, S. L. (1953) Production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science*, 117: 528-529.

MILLER, S. L.; UREY, H. C. (1959) Organic compound synthesis on the primitive Earth. *Science*, 130: 245-251.

MONTERO-BARRIENTOS, M.; HERMOSA, R.; NICOLAS, C.; CARDOZA, R. E.; GUTIERREZA, S.; MONTE, E. (2008) Overexpression of a *Trichoderma* HSP70 gene increases fungal resistance to heat and other abiotic stresses. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 1506-1513.

NUTMAN, A. P.; BENNETT, V. C.; FRIEND, C. R. L.; KRANENDONK, M. J. V.; CHIVAS, A. R. (2016) Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. *Nature*, 537: 535-538.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267: 5421-5426.

ODDS, F.C. (2003) Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 1.

OECD/Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2015) OECD-FAO Agricultural Outlook 2015, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2015-en.

OPARIN, A. I. (1924) Proiskhozhedenie Zhizni Mosckovskii Rabochii, Moscow. Reprinted and translated in J. D. Bernal (1967) The Origin of Life London: Weidenfeld and Nicolson.

OPARIN, A. I. (1961) Life: its nature, origin and development. Oliver and Boyd, Edinburgh. Academic Press, New York, 136: 207p.

ORCHARD, J. E.; HARDWICK, K. (1988) Photosynthesis, Carbohydrate Translocation and Metabolism of Host and Fungal Tissues in Cocoa Seedlings Infected with *Crinipellis Perniciosa*. International Cocoa Research Conference, 10, 1987. Santo Domingo, República Dominicana. Proceedings, 325-329.

ORGEL, L. E. (1968). Evolution of the genetic apparatus. *Journal of Molecular Biology*, 38: 381-393.

PARK, C. B.; KIM, H. S.; KIM, S. C. (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244: 253-257.

PATEL, B. H.; PERCIVALLE, C.; RITSON, D. J.; DUFFY, C. D.; SUTHERLAND, J. D. (2015) Common origins of RNA, protein and lipid precursors in a cyanosulfidic protometabolism. *Nature Chemistry*, 7: 301-307.

PAZGIER, M.; HOOVER, D. M.; YANG, D.; LU, W.; LUBKOWSKI, J. (2006) Human beta-defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 1294-1313.

PENMAN, D.; BRITTON, G.; HARDWICK, K.; COLLIN, H. A.; ISAAC, S. (2000) Chitin as a measure of biomass of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycological Research*, 104: 671-675.

PFALLER, M. A. (2012) Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*, 125: S3-S13.

PHOENIX, D. A.; DENNISON, S. R.; HARRIS, F. (2013) *Antimicrobial Peptides*. Wiley-VCH, Alemanha.

PIRES, D. A. T. (2012) Síntese, purificação e determinação estrutural de peptídeos como ferramenta exploratória de atividades biologicamente relevantes. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília-DF. 208p.

PONTI, D.; MANGONI, M.L.; MIGNOGNA, G.; SIMMACO, M.; BARRA, D. (2003) Na amphibian antimicrobial peptide variant expressed in *Nicotiana tabacum* confers resistance to phytopathogens. *Biochemical Journal*, 370: 121-127.

PUKALA, T. L.; BOWIE, J. H.; MASELLI, V. M.; MUSGRAVE, I. F.; TYLER, M. J. (2006) Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. *Natural Product Reports*, 23: 368-393.

- PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. (2003) Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnology*, 21: 400-407.
- PURDY, L. H.; SCHMIDT, R. A. (1996) Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 573-594.
- RAMADA, M. H. S.; STEINDORFF, A. S.; BLOCH JR., C.; ULHOA, C. J. (2016) Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell walls. *Proteomics*, 16: 477-490.
- RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. (2005) *Candida* Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell*, 4: 633-638.
- RAYMANN, K.; BROCHIER-ARMANET, C.; GRIBALDO, S. (2015) The two-domains tree of life is linked to a new root for the Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112: 6670-6675
- REAMS, A. B.; ROTH, J. R. (2015) Mechanisms of gene duplication and amplification. *Cold Spring Harbour Perspective Biology*, 7: a016592.
- REGOLI, D.; BARABE J. (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacological Reviews*, 32: 1-46.
- RIVERO, M.; FURMAN, N.; MENCACCI, N.; PICCA, P.; TOUM, L.; LENTZ, E.; et al. (2012) Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *Journal of Biotechnology*, 157: 334-343.
- ROZEK, A.; FRIEDRICH, C. L.; HANCOCK, R. E. (2000) Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*, 39: 15765-15774.
- SANTOS, E. S.; CERQUEIRA-SILVA, C. B.; MORI, G. M.; AHNERT, D.; MELLO, D. L.; PIRES, J. L.; CORRÊA, R. X.; DE SOUZA, A. P. (2015) Genetic Structure and Molecular Diversity of Cacao Plants Established as Local Varieties for More than Two Centuries: The Genetic History of Cacao Plantations in Bahia, Brazil. *PLoS One*, 10: e0145276.
- SCOPES, R. K. (1974) Measurement of protein by spectrometry at 205 nm. *Analytical Biochemistry*, 59: 277-282.
- SEGREST, J. P.; JACKSON, R. L.; MORRISETT, J. D. Jr. (1974) A molecular theory of lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *Febs Letters*, 38: 247-258.
- SENA, K.; ALEMANNI, L.; GRAMACHO, K. P. (2014) The infection process of *Moniliophthora perniciosa* in cacao. *Plant Pathology*, 63: 1272-1281.
- STEINDORFF, A. S.; RAMADA, M. H. S.; COELHO, A. S. G.; MILLER, R. N. G.; PAPPAS JR., G. J.; ULHOA, C. J.; et al. (2014) Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expressions profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics*, 15: 204.

STRULSON, C. A.; MOLDEN, R. C.; KEATING, C. D.; BEVILACQUA, P. C. (2012) RNA catalysis through compartmentalization. *Nature Chemistry*, 4: 941-946.

SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M. (2007) Manejo das Principais Doenças do Algodoeiro no Cerrado Brasileiro. In: FREIRE, E. C. Algodão - No Cerrado do Brasil. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 918p.

SUCKAU, D.; RESEMANN, A.; SCHUERENBERG, M.; HUFNAGEL, P.; FRANZEN, J.; HOLLE, A. (2003) A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376: 952-965.

SUPP, D. M.; KARPINSKI, A. C.; BOYCE, S. T. (2004) Expression of human beta-defensins HBD-1, HBD-2, and HBD-3, in cultured keratinocytes and skin substitutes. *Burns*, 30: 643-648.

TELLIER, R.; KRAJDEN, M.; GRIGORIEW, G. A.; CAMPBELL, I. (1992) Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36: 1619-1625.

THEOBALD, D. L. (2010) A formal test of the theory of universal common ancestor. *Nature*, 465: 219-222.

THEVISSSEN, K. (2016) How promising are combinatorial drug strategies in combating *Candida albicans* biofilms? *Future Medicinal Chemistry*, 8: 1383-1385.

THEVISSSEN, K.; KRISTENSEN, H. H.; THOMMA, B. P. H. J.; CAMMUE, P. A.; FRANÇOIS, I. E. J. A. (2007) Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discovery Today*, 12: 966-971.

THEVISSSEN, K.; WARNECKE, D. C.; FRANÇOIS, I. E.; LEIPELT, M.; HEINZ, E.; OTT, C.; ZÄHRINGER, U.; THOMMA, B.P.; FERKET, K. K.; CAMMUE, B. P. (2004) Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 3900-3905.

TOLEDO, D. M.; BRODSKY, H. A.; PARDO, G. E.; CONCI, O. C.; BRAGA SOBRINHO, R. (2000) Monitoreo del Picudo del Algodonero (*Anthonomus grandis* Bh.) em el Noreste Argentino. Universidad Nacional Del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55: 4-30.

TRUSOV, Y; CHAKRAVORTY, D; BOTELLA, J. R. (2013) *Fusarium oxysporum* infection assays in Arabidopsis. *Methods in Molecular Biology*, 1043: 67-72.

VIEIRA, P. M.; COELHO, A. S. G.; STEINDORFF, A. S.; SIQUEIRA, S. J. L.; SILVA, R. N.; ULHOA, C. J. (2013) Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. *BMC Genomics*, 14: 177.

- VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LOREITO, M. (2008) Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1-10.
- VLASSOV, A. V.; KAZAKOV, S. A.; JOHNSTON, B. H.; LANDWEBER, L. F. (2005) The RNA world on ice: a new scenario for the emergence of RNA information. *Journal of Molecular Evolution*, 61: 264-273.
- VRIENS, K.; COOLS, T. L. ; HARVEY, P. J.; CRAIK, D. J.; SPINCEMAILLE, P.; CASSIMAN, D.; et al. (2015) Synergistic activity of the plant defensin HsAFP1 and caspofungin against *Candida albicans* biofilms and planktonic cultures. *PLOS One*, 75: 71-79.
- VRIENS, K.; COOLS, T. L.; HARVEY, P. J.; CRAIK, D. J.; BRAEM, A.; VLEUGELS, J.; et al. (2016) The radish defensins RsAFP1 and RsAFP2 act synergistically with caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Peptides*, 75: 71-79.
- WADDELL, W. J. (1956) A simple UV spectrophotometric method for the determination of protein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 48: 311-314.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. (2009) APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res*, 37: D933-D937.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. (2016) APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44: D1087-D1093.
- WANG, K.; WANG, Z.; LI, F.; YE, W.; WANG, J.; SONG, G.; YUE, Z.; CONG, L.; SHANG, H.; ZHU, S.; ZOU, C.; LI, Q.; et al. (2012) The draft genome of a diploid cotton *Gossypium raimondii*. *Nature Genetics*, 44: 1098-1103.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. (1953) A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171: 737-738.
- WEISS, M. C.; SOUSA, F. L.; MRNJAVAC, N.; NEUKIRCHEN, S.; ROETTGER, M.; NELSON-SATHI, S.; MARTIN, W. F. (2016) The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nature Microbiology*, n.16116.
- WILDE, S. A.; VALLEY, J. W.; PECK, W. H.; GRAHAM, C. M. (2001) Evidence from detrital zircons for the existence of continental crust and oceans on the Earth 4.4.Gyr ago. *Nature*, 409: 175-178.
- WILLIAMS, T. A.; FOSTER, P. G.; COX, C. J.; EMBLEY, T. M. (2013) An archael origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature*, 504: 231-236.
- WISPLINGHOFF, H.; BISCHOFF, T.; TALLENT, S. M.; et al. (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*, 39: 309-317.
- WOESE, C. R. (1967) The genetic code: The molecular basis for genetic expression. p. 186. *Journal of Medical Genetics*, 5: 159.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. (2007) Unifying themes in host defense effector polypeptides. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 727-740.

YOUNT, N. Y.; YEAMAN, M. R. (2006) Structural congruence among membrane-active host defense polypeptides of diverse phylogeny. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1758: 1373-1386.

ZASLOFF, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 5449-5453.

ZASLOFF, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395.

ZAUG, A. J.; CECH, T. R. (1985) Oligomerization of intervening sequence RNA molecules in the absence of proteins. *Science*, 229: 1060-1064.

ZAUG, A. J.; CECH, T. R. (1986) The intervening sequence of *tetrahyrmena* is an enzyme. *Science*, 231: 470-475.

ZHAO, G.; LONDON, E. (2006) An amino acid “transmembrane tendency” scale that approaches the theoretical limit to accuracy for prediction of transmembrane helices: relationship to biological hydrophobicity. *Protein Science*, 15: 1987-2001.

CAPÍTULO 02

Diga com quem interages que lhe direi de que grupo és

2.1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Genomas codificam uma miríade de proteínas, muitas com solubilidade limítrofe em solventes aquosos, as quais se particionam em meios hidrofóbicos ou em membranas fosfolipídicas assim que os encontra (Zhao & London, 2006). De forma correspondente, proteínas possuem segmentos que são capazes de se adsorverem em membranas, como partes integrais transmembrana, ou como fragmentos capazes de nuclear como placas amiloides (PATs), translocar- membranas (CPPs) ou mesmo causar a disrupção de membranas (AMPs), quando hidrolisados de proteínas parentais (Brand et al., 2012; Schramm et al., 2012; Last et al., 2013).

Os peptídeos antimicrobianos, sendo eles produtos gênicos diretos ou fruto da hidrólise de uma proteína parental, são diversos em suas estruturas primarias, o que resulta também em diferentes modos de ação e alvos de interação (Brogden, 2005). A maioria dos peptídeos estudados até hoje desestabilizam estruturas de membrana como modo de exercer o seu efeito tóxico nos microrganismos. Mesmo os peptídeos com alvos intracelulares precisam interagir primeiro com os componentes da membrana, para depois poder exercer suas funções.

2.1.1. Membranas e fosfolipídeos.

Todas as células são delimitadas por membranas, conferindo a elas uma identidade espacial, assim como a definição de um espaço intra e extracelular. As membranas são compostas principalmente de lipídios e proteínas. A tendência das regiões hidrofóbicas dos lipídeos de se auto associarem, e a tendência das regiões hidrofílicas de interagir com ambientes aquosos e uns com os outros, é o princípio físico da formação espontânea da bicamada lipídica das membranas celulares. Esse princípio da anfipaticidade dos lipídeos é a propriedade química que permite as células separar seus constituintes internos do ambiente externo (Simons & Sampaio, 2011).

Aproximadamente 5% dos genes do genoma de eucariotos codificam para proteínas relacionadas a síntese de vários tipos de lipídios. Esses lipídeos podem desempenhar papéis de estoque de energia, formação de membranas e como mensageiros em processos de sinalização celular (Meer et al., 2008). As membranas são compostas fundamentalmente por fosfolipídeos, principalmente os glicerídicos, os quais possuem como estrutura geral um grupamento “cabeça”, um corpo de glicerol e duas caudas de ácidos graxos (figura 2.1) (New, 1990). Os

ácidos graxos estão ligados aos carbonos 1 e 2 do glicerol, enquanto o terceiro carbono liga-se ao fosfato, formando ácido fosfatídico (New, 1990). O grupamento fosfato está frequentemente ligado a álcoois também polares, de fundamental importância nas propriedades físico-químicas destas moléculas. As caudas de ácidos graxos compõem a parte apolar dos fosfolipídios, conferindo a estas moléculas uma natureza anfifílica (Brand, 2007).

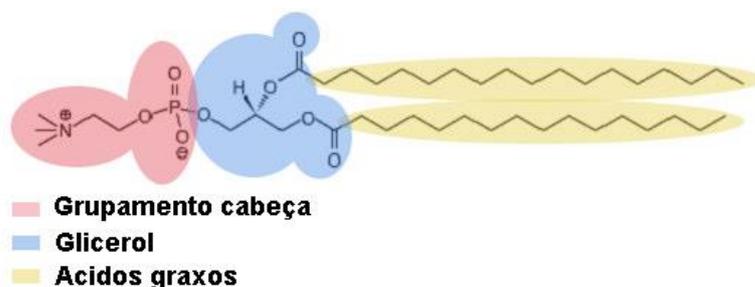


Figura 2.1. Esquema fundamental dos fosfolipídeos, usando como exemplo a molécula de 1-2-di-miristoil-sn-glicero-fosfatidilcolina (DMPC).

Diferentes fosfolipídeos conferem às membranas diversas características, principalmente de acordo com o grupamento químico ligado ao fosfato, o comprimento e grau de insaturação de ácidos graxos (Huang e Li, 1999). Os fosfolipídeos mais comuns na natureza são a fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG) e fosfatidiletanolamina (PE). Grupamentos cabeça variam em seu estado de protonação de acordo com o pH. Em pH fisiológico, fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilglicerol (PG), dois fosfolipídeos relevantes para esse trabalho, apresentam-se neutro e com carga -1, respectivamente.

O modelo de Singer e Nicolson, proposto em 1972, trata a bicamada lipídica como um solvente neutro de duas dimensões onde proteínas e lipídeos difundem-se livremente no plano da membrana (Singer e Nicolson, 1972). Atualmente, este modelo foi expandido. Sabe-se hoje que a difusibilidade dos fosfolipídeos é limitada, e as células são como mosaicos de domínios fosfolipídicos, conhecidos como 'lipid rafts' (Simons e Ikonen, 1997). Estas diferenças locais de composições lipídicas são mantidas ativamente pelo citoesqueleto e apresentam diferentes características e funcionalidades (Jacobson e Dietrich, 1999).

2.1.2. Transição de fase de fosfolipídeos

Uma das consequências do empacotamento dos ácidos graxos no centro da bicamada lipídica é a mudança abrupta de suas propriedades físicas em uma pequena amplitude de

temperatura (Brand, 2007). Bicamadas ou lamelas (L) possuem estruturas ordenadas a baixas temperaturas, com consistência de gel (β) e cadeias de ácidos graxos principalmente em conformação *trans*, estabilizadas por forças de van der Waals (Huang e Li, 1999). Quando se adiciona energia suficiente para sobrepor a barreira composta pelas interações de baixa distância entre as cadeias de hidrocarbonetos, ocorre um aumento de mobilidade rotacional entre ligações carbono-carbono e aumento da fluidez (Huang e Li, 1999). Esta transição permite conformações mais desordenadas, aumentando assim a fluidez da membrana (Huang e Li, 1999). A esse estado, atribui-se o nome de líquido-cristalino (α). Esta transição, referida como $P'_{\beta} \rightarrow L\alpha$, ocorre de forma cooperativa, com temperatura de transição (T_m) e variação de entalpia (ΔH) específicas para cada fosfolípídeo (Figura 2.2) (Brand, 2007). Estes parâmetros podem ser estimados por meio da calorimetria exploratória diferencial (DSC) (Huang e Li, 1999).

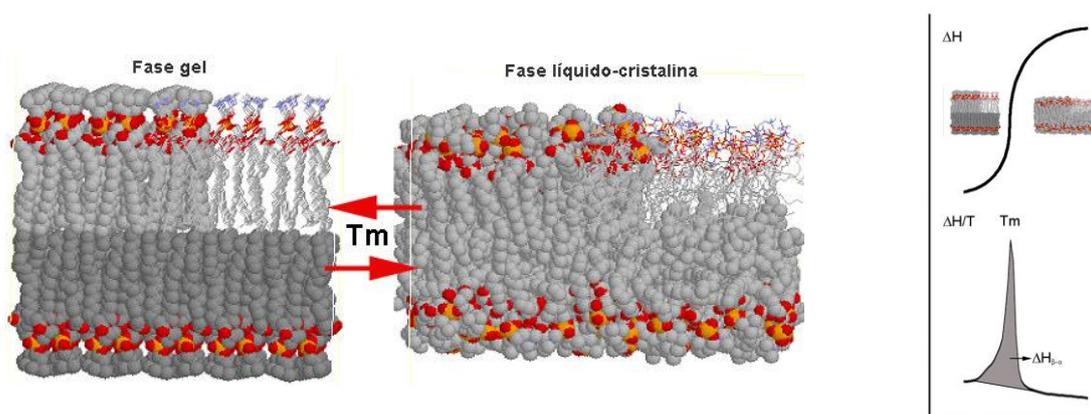


Figura 2.2. Transição de fase em membranas. Detalhe da diferença de organização entre o estado de gel (β), mais ordenado, para o estado líquido-cristalino (α), menos ordenado. Também o esquema de transição de fase $P'_{\beta} \rightarrow L\alpha$ mostrando a temperatura (T_m) e a entalpia de transição (ΔH) característicos para cada fosfolípídeo (Brand, 2007).

A composição da membrana, o solvente e o pH afetam a energia, a cooperatividade e a temperatura de transição de vesículas fosfolipídicas (Huang e Li, 1999; Epand, 2007). A incorporação de moléculas membranoativas também influencia a transição de fase $P'_{\beta} \rightarrow L\alpha$ de forma particular, fornecendo informações sobre seu modo de interação (Jain e Wu, 1977).

2.1.3. Membranas de microrganismos

Organismos variam em relação à sua composição de membrana. Na natureza, estas são constituídas não somente pelos fosfolípídeos previamente apresentados, mas também por outras

moléculas como esteróides, proteínas, glicoproteínas, entre outras (Figura 2.3) (Gennis, 1989; Brand, 2007). A porcentagem relativa de biomoléculas pode variar em cada organismo de acordo com seu estágio de desenvolvimento e acesso a recursos, sendo mantida ativamente dentro de limites (Blom et al., 2001).

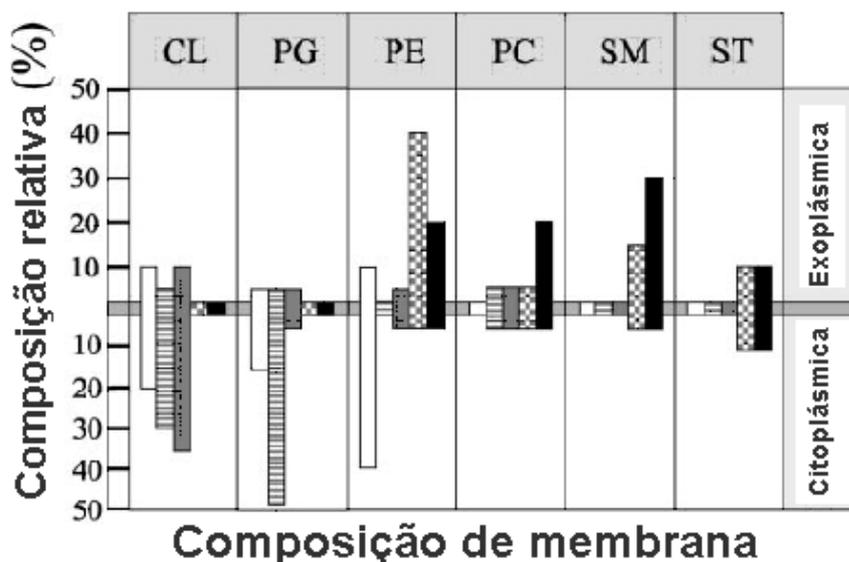


Figura 2.2. Arquitetura comparativa de membranas de microorganismos e membranas eritrocitárias humanas. As barras representam cada um dos tipos celulares, sendo a aberta de *Escherichia coli*, a de linhas horizontais *Staphylococcus aureus*, a sombreada de *Bacillus subtilis*, xadrez de *Candida albicans* e a sólida de eritrócitos humanos. CL= cardiolipina, PG=fosfatidilglicerol, PE=fosfatidiletanolamina, PC= fosfatidilcolina, SM=sfingomiéline e ST=esteróides (colesterol ou ergosterol) (Brand et al., 2007).

De modo geral, membranas de microrganismos procarióticos possuem alto conteúdo de fosfatidilglicerol, cardiolipina (CL) e fosfatidilserina e tendem a ser eletronegativas. Já membranas compostas de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esteróis são geralmente eletrostaticamente neutras, e são comuns em células eucarióticas (Yeaman e Yount, 2003). Além da membrana plasmática, os microrganismos possuem paredes celulares que funcionam também como uma barreira físico-química contra a atuação de moléculas exógenas. A diferença de composição da parede de bactérias Gram +, Gram – e fungos é reconhecida como uma das razões de alguns peptídeos serem ativos contra apenas um dos grupos (Allende e McIntosh, 2003). Entretanto, a composição rica em glicídeos ou outros compostos negativos dessas paredes pode auxiliar a atividade de alguns AMPs (Bahar & Ren, 2013). No geral, essas diferenças na composição de membranas e parede celular são reconhecidas como uma das bases

da seletividade de peptídeos antimicrobianos (Tossi et al., 2000; Brand et al., 2002; Yeaman e Yount, 2003; Bahar & Ren, 2013).

2.1.4. Atividade antimicrobiana e interação com fosfolipídeos

A maioria dos peptídeos antimicrobianos exercem a sua toxicidade ao interagir com a membrana dos microrganismos. Mesmo assim, a forma como essa interação ocorre não é trivial e muitos estudos buscam entender o(s) mecanismo(s) envolvido(s). A complexidade da membrana de microrganismos dificulta a interpretação da interação destas com moléculas membranoativas. A confecção de vesículas compatíveis com aquelas dos microrganismos de interesse, sem proteínas e outros compostos, é uma abordagem que permite um ambiente mais controlado (Brand, 2007; Rathinakumar & Wimley, 2008; Brand et al., 2012).

Lipossomos podem ser confeccionados em diferentes tamanhos e diferentes maneiras de acordo com a metodologia utilizada. A confecção de lipossomos por extrusão permite maior controle no tamanho das vesículas, e menor dispersão em torno da média. A extrusão de vesículas se dá pela passagem forçada de fosfolipídeos hidratados por membranas de policarbonato com poros de tamanho uniforme (New, 1990). As estruturas mais comumente estudadas são conhecidas por vesículas unilamelares grandes (LUVs), as quais são obtidas a partir de extrusão em membranas de policarbonato de 100 nm (Brand, 2007).

Membranas são alvo de uma série de compostos de interação específica ou inespecífica. A incorporação de tais compostos pode ser estudada de várias formas, e uma delas é pelo efeito da adsorção de moléculas na transição de fase entre os estados de gel e líquido cristalino ($P'_{\beta} \rightarrow L\alpha$) de membranas (Sturtevant, 1982). A adsorção de moléculas é capaz de alterar as propriedades da transição de fase de membranas fosfolipídicas de forma particular ao modo de interação (Jain e Wu, 1977).

Existem diversos trabalhos que apresentam uma correlação entre dados obtidos com membranas biomiméticas e testes antimicrobianos em cultura, apesar do papel complexo desempenhado pelas camadas externas de células bacterianas e fúngicas (Hristova et al., 1997; Prenner et al., 1999; Rausch et al., 2005). Peptídeos mais capazes de ligar-se e permeabilizar membranas *in vitro* também têm atividade antimicrobiana mais pronunciada (Papo & Shai, 2003). Peptídeos não-hemolíticos interagem com membranas negativamente carregadas mais pronunciadamente do que com membranas neutras. Já peptídeos não-seletivos apresentam o mesmo grau de interação com ambos os tipos de membranas. Dessa forma, dados obtidos com

membranas biomiméticas correlacionam-se com a atividade bactericida de peptídeos antimicrobianos em algum grau (Brand, 2007). Entretanto, não é possível dizer o quanto que o mecanismo de ação utilizado pelos peptídeos para ambas as abordagens se sobrepõe.

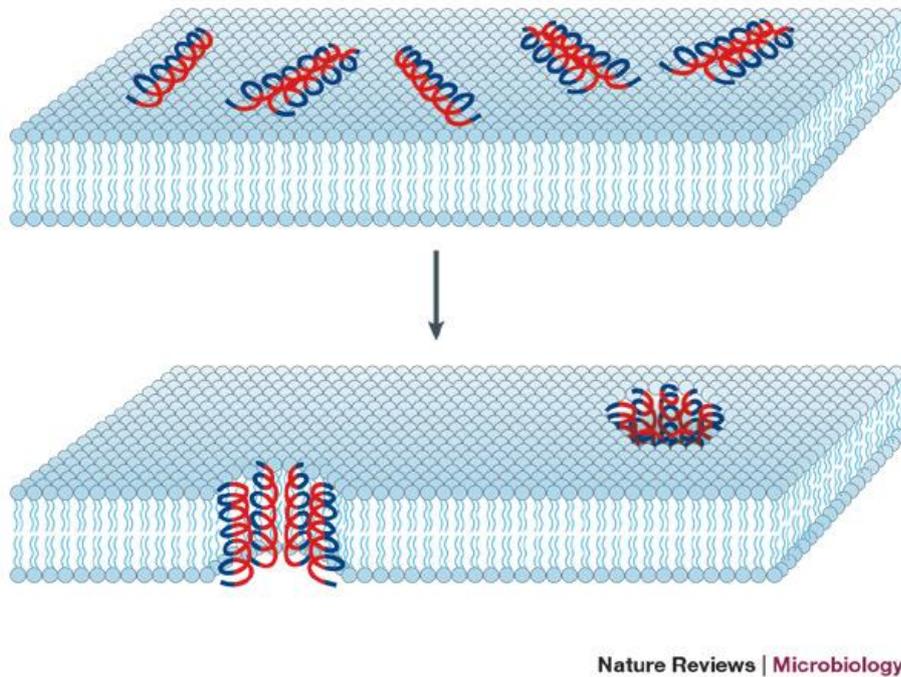
2.1.5. Modo de ação de peptídeos antimicrobianos e propriedades físico-químicas

Estudos mostram que a atividade antimicrobiana dos AMPs não está ligada a uma sequência de aminoácidos ou a uma dada estrutura (Jin et al., 2005; Rausch et al., 2007). A atividade parece depender mais da composição de aminoácidos e suas propriedades físico-químicas (Wimley, 2010). Os AMPs, em sua maioria, são moléculas com carga líquida positiva. Os aminoácidos Arg e Lys são aproximadamente 50% mais abundantes em AMPs do que nos genomas em geral, enquanto os aminoácidos Glu e Asp são aproximadamente 75% menos abundantes do que o esperado (Wimley, 2010). Os aminoácidos hidrofóbicos também são mais abundantes em AMPs, enquanto resíduos polares (principalmente Gln), são menos abundantes que o normal (Wimley, 2010).

A interação inicial entre peptídeos antimicrobianos e a membrana plasmática é decorrente de atração eletrostática. Esta atração é devido ao caráter catiônico dos peptídeos e a maior frequência de fosfolipídeos aniônicos em membranas de microorganismos. O resultado dela é o aumento da concentração local de peptídeo em uma camada imediatamente superior às vesículas (Brand, 2007). O restante do mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos, que diz respeito à inserção em membranas e ao recrutamento de novas moléculas, é mais heterogêneo. Existem alguns modelos que buscam explicar como é o mecanismo de ação dos peptídeos.

No modelo *barrel stave*, hélices anfifílicas formariam canais transmembranas/poro (Figura 2.4) (Brogden, 2005). As regiões hidrofóbicas dos peptídeos permanecem em contato com a membrana enquanto as regiões hidrofílicas formam um poro aquoso, que permite o fluxo de solvente e pequenas moléculas (Shai, 2002). Após a atração eletrostática dos peptídeos, acredita-se que a permeabilização proceda da seguinte forma: i – Monômeros ligam-se à membrana e estruturam-se em α -hélice; ii – Os monômeros reconhecem-se na superfície da membrana mesmo em baixas densidades; iii – As hélices inserem-se na porção hidrofóbica da membrana e; iv – Há um recrutamento adicional de monômeros que aumentam o diâmetro do poro (Brand, 2007). A etapa crucial para que peptídeos antimicrobianos permeabilizem membranas de acordo com este modelo é a interação entre monômeros na superfície da

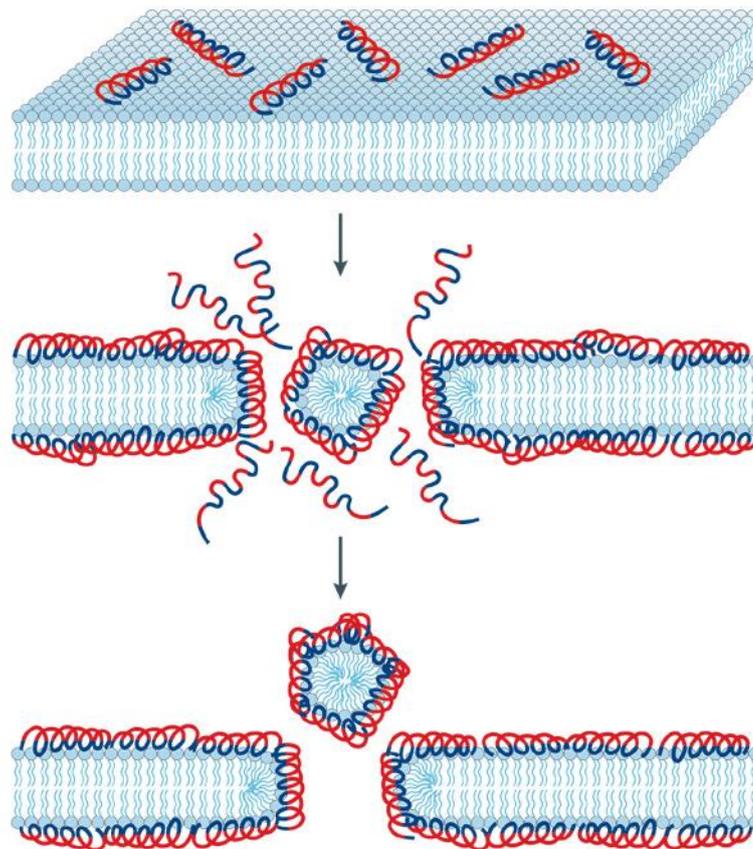
membrana e sua inserção, já que a adoção de uma conformação transmembrana para um monômero é quase sempre desfavorável (Shai, 2002).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 2.4. Esquema da formação de poros em membranas pelo modelo *barrel stave*. Obtido em Brogden (2005).

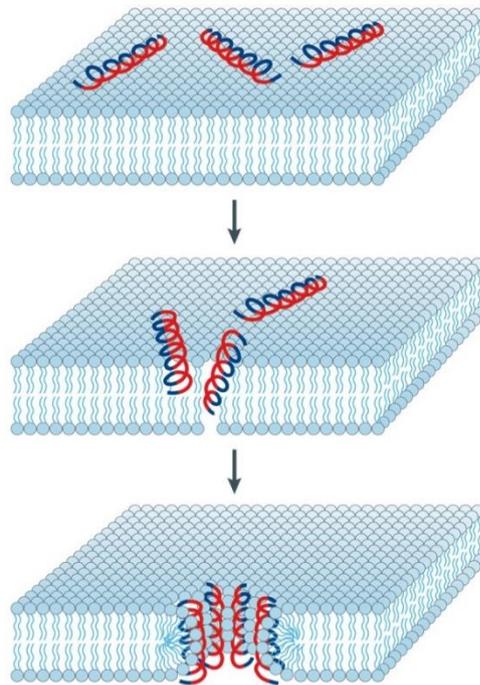
No modelo *carpet-like*, os peptídeos antimicrobianos estão em contato com o grupamento cabeça dos fosfolípidos durante todo o processo de permeabilização. Os peptídeos são adsorvidos na superfície da membrana recobrimo-a à maneira de um carpete. A permeabilização ocorre somente quando monômeros atingem alta concentração em toda a superfície celular (Figura 2.5). Os peptídeos permanecem na região de interface das membranas, em conformação perpendicular, não entrando em contato com as caudas dos fosfolípidos. Os quatro passos propostos são: i – Ligação dos monômeros aos grupamentos cabeça dos fosfolípidos; ii – Alinhamento dos monômeros na superfície da membrana de forma que sua face hidrofílica fique em contato com os grupamentos cabeça dos fosfolípidos; iii – Reorientação dos resíduos hidrofóbicos em direção a região hidrofóbica da membrana; iv – Desintegração da membrana pelo rompimento de sua curvatura, etapa a qual pode ser precedida da formação de poros transientes (Shai, 2002).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 2.5. Esquema do modo de ação de AMPs pelo modelo *carpet-like*. Obtido em Brogden (2005).

No modelo do poro toroidal, é proposto que a interação de peptídeos com membranas causa deslocamento dos fosfolipídeos e, assim, uma alteração da estrutura da membrana (Figura 2.6). Decorrem destas alterações estruturais nas membranas a entrada de peptídeos para o interior das células (Zasloff, 2002). O diferencial deste modelo com relação aos anteriores está no reconhecimento de membranas como porções ativas na interação, responsivas à adsorção de peptídeos. Huang demonstrou que a ligação de moléculas na face externa de membranas gera sua expansão relativa à face interna, criando tensões (Huang, 2006). A adsorção assimétrica de moléculas na membrana gera aproximação dos grupamentos fosfato de fosfolipídeos em faces opostas, fenômeno conhecido como achatamento de membrana (Chen et al., 2002; Chen & Shaw, 2003; Huang, 2006). O fenômeno de achatamento de membrana prossegue com a adsorção de moléculas em conformação perpendicular à membrana até um limite, onde não é mais energeticamente favorável acomodá-las desta maneira. A partir deste ponto, ocorre uma transição de conformação com a formação de poros (Lee et al., 2004).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 2.6. Esquema do modo de ação de AMPs pela formação de poros toroidais. Obtido em Brogden (2005)

Os peptídeos antimicrobianos também podem atuar como os peptídeos penetradores de células (CPPs) quando presentes em condições sub-líticas (Wimley, 2010). O limite de definição entre AMPs e CPPs é nebuloso, pois ambas as classes possuem características físico-químicas em comum. Postula-se que todo CPP é um antimicrobiano em potencial e que todo antimicrobiano é um CPP em potencial (Henriques et al., 2006). Acredita-se que uma das diferenças cruciais entre CPPs e peptídeos antimicrobianos esteja na ausência de formação de poros por parte dos primeiros (Fischer et al., 2005; Henriques et al., 2006). Contudo, com o aumento da identificação de peptídeos permeabilizadores de membranas, que também atuam em alvos intracelulares, essa definição tem ficado cada vez mais difícil (Wimley, 2010).

Apesar de bem serem muito referenciados, os modos de ação acima descritos muitas vezes não são observados em experimentos com microrganismos ou membranas modelo (Wimley, 2010). Em termos de mecanismos moleculares, provavelmente existem múltiplos mecanismos que se sobrepõem na atividade de um AMP, não sendo possível definir uma única descrição possível.

Postula-se que o impacto físico causado as membranas dependem da atividade interfacial, a qual é definida como a capacidade de peptídeos de se ligarem a membrana,

particionar na interface membrana-água e alterar a organização dos lipídeos (Rathinakumar & Wimley, 2008; Wimley, 2010). A atividade interfacial é derivada do balanço apropriado entre e dentre os peptídeos, água e lipídeos de membrana. Essa interação depende mais da composição de aminoácidos de um peptídeo e suas propriedades físico-químicas do que de uma sequência exata, ou do que uma estrutura secundária/terciária (Rathinakumar & Wimley, 2008; Wimley,).

2.2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Apesar da grande variabilidade nas estruturas primárias, vários peptídeos membranoativos compartilham um conjunto de parâmetros físico-químicos que são parcialmente comuns e que se sobrepõe. A identificação de 16 PAIs dentre 21 peptídeos selecionados do genoma de plantas, utilizando algumas dessas características como princípios norteadores da busca, corrobora o exposto acima. Atividades similares a de peptídeos conhecidos antimicrobianos contra um amplo espectro de patógenos, sugere que as moléculas preditas são membranoativas e que podem, muito provavelmente, atuar como os AMPs.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo investigar como os PAIs interagem com membranas miméticas e comparar os resultados com aqueles dos AMPs. Também visa analisar o efeito que os parâmetros físico-químicos tiveram na predição dos PAIs com foco na melhoria do processo de filtragem. Com base nos dados contidos no Capítulo 01, hipotetiza-se que a anfifilicidade (que pode se traduzir em estrutura helicoidal no nosso caso) é um fator determinante na escolha de PAIs potentes. Se a sua importância for de fato confirmada, o incremento do mesmo como parâmetro seria uma das consequências mais diretas deste trabalho para o modelo de predição.

Mais especificamente, temos:

- Avaliar o efeito termotrópico de vesículas de fosfolipídeos (LUVs) na presença dos PAIs gerados nesse trabalho, bem como na presença de AMPs.
- Avaliar se há similaridades entre PAIs e AMPs com base nos efeitos causados as LUVs.
- Avaliar a variação de estrutura secundária dos PAIs e AMPs na presença dessas vesículas.
- Avaliar a relação dos parâmetros físico-químicos com os efeitos causados as LUVs.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. Síntese, purificação, análise por espectrometria de massa e quantificação de peptídeos

As etapas destacadas no subtítulo desta seção foram realizadas de acordo com o descrito no Capítulo 01, nas seções 1.3.2, 1.3.3, 1.3.4 e 1.3.5.

2.3.2. Extrusão e quantificação de vesículas de fosfolipídios

Os fosfolipídeos DMPC e (DMPC/DMPG) (2:1, p/p) foram quantificados gravimetricamente e dissolvidos em clorofórmio grau HPLC (Scharlau), e clofórmio grau HPLC e metanol (Sigma) (3:1, v/v), respectivamente, em uma concentração de 10 mg mL⁻¹. As misturas foram secas em um rota-evaporador, até a formação de um filme lipídico, em um balão de fundo redondo. O filme foi deixado sob vácuo para a evaporação do solvente remanescente. O filme fosfolipídico foi dissolvido em 2 mL de tampão (fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, força iônica de 150 mM, corrigida com NaCl) e agitado manualmente até a formação de uma solução turva, composta de vesículas multi lamelares (MLVs). As MLVs foram reduzidas e transformadas em vesículas grandes e unilamelares (LUVs) ao passá-las 23 vezes por uma membrana de 100 nm de policarbonato com o auxílio de um mini-extrusor (Avanti). A concentração dos fosfolipídeos foi estimada pelo ensaio colorimétrico que envolve a complexação de fosfolipídeos e ferrotiocianeto de amônio (Stewart 1980).

2.3.3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os termogramas foram obtidos em um VP-DSC (MicroCal, GE Healthcare) em um intervalo de 10 a 40 °C à uma taxa de varredura de 30°C h⁻¹. Termogramas controle (linha de base do tampão) e de LUVs de DMPC e 2:1 (p/p) DMPC:DMPG a 0,5 mM foram adquiridos como referência. Os peptídeos foram adicionados a soluções novas de LUVs a 0,5 mM, a uma concentração de 20 μM (0,04 mol/mol peptídeo/fosfolipídeo) a temperatura ambiente, seguido imediatamente da varredura pelo DSC. Novas varreduras foram feitas até que a capacidade térmica do sistema não mudasse entre os ciclos de aquecimento. A entalpia molar foi obtida

pela subtração do termograma controle, normalização dos sensogramas pela concentração de fosfolípido, determinação da linha de base (‘linear connect’) e integração da área sob o pico de transição. O ajuste foi feito considerando uma transição diferente de dois estados (non-two state transition) com dois picos a partir do programa MicroCal Origin™. Os dados foram compilados e submetidos a uma análise de componentes principais (PCA) utilizando o programa JMP (SAS Institute). Os dados foram tratados e utilizados como uma variância da média de todos os resultados para cada um dos parâmetros obtidos dos termogramas (Tabela 2.02). Os dados obtidos neste trabalho também foram analisados em conjunto com os já publicados por Brand et al. (2012).

2.3.4. Dicroísmo circular (CD)

Experimentos de dicroísmo circular foram conduzidos em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co., Japão). Os peptídeos foram dissolvidos a 40 µM em tampão (fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, força iônica de 150 mM, corrigida com NaCl). A adição de LUVs foi feita para uma concentração final de 2 mM. As aferições de dicroísmo circular foram feitas no alcance espectral de 200-260 nm e os resultados foram a média de quatro varreduras à temperatura de 25 °C em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm. Após a subtração do sinal de dicroísmo circular do solvente, os espectros foram convertidos em elipticidade residual média (MRE) e as leituras a $[\theta]_{222}$ foram utilizadas para estimar a porcentagem de um segmento de α -hélice de acordo com as metodologias de Chen et al. (1974).

$$\text{MRE} = \frac{\theta \times 100 \times \text{M.M}}{C \times l \times n} \qquad [\theta]_{222} = \frac{\theta \times 100 \times \text{M.M}}{C \times l \times n}$$

Onde,

θ , elipticidade em graus;

M.M., massa molecular

C, concentração em mg.mL⁻¹

l, caminho ótico da cuveta

n, número de resíduos

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Os novos PAIs e AMPs induzem mudanças similares na transição de fase principal de vesículas fosfolídicas modelo

Os termogramas das LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG contendo peptídeos foram realizados em um DSC seguindo a metodologia descrita por Brand et al. (2012). A transição de fase principal ($P_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$) da mistura fosfolípeos-peptídeos foi ajustada para um modelo de transição de dois estados (*non-two state transition*), com duas gaussianas, sendo uma larga e uma fina (Brand et al., 2012). Todos os 21 peptídeos selecionados de plantas do capítulo 01, juntamente com seis AMPs mais um PAI humano foram avaliados (Tabela 2.01). Os PAIs apresentaram graus variados de perturbação de membranas (Figura 2.07). A aplicação de uma análise de componentes principais (PCA) aos dados ajustados do DSC (Tabela 2.02) resultou em um gráfico tridimensional que colocaliza moléculas, com base nas similaridades das variações termotrópicas induzidas pelos peptídeos às LUVs (PCA1, Figura 2.08).

Quatro Grupos de moléculas foram definidos. O Grupo 0 compreende peptídeos que induzem mudanças mínimas na transição de fase principal das LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG. Temos como modelo o peptídeo At03 (Figura 02.07 a1 e a2). Esse Grupo possui cinco dos possíveis PAIs (Tabela 2.01). O Grupo 1 é formado por peptídeos que praticamente não interagem com LUVs de DMPC, mas com efeitos notáveis na transição de fase das LUVs negativamente carregadas de 2:1 DMPC:DMPG, como representado pelo peptídeo Tc10 (Figura 2.07 b1 e b2). Outros quatro peptídeos também fazem parte desse Grupo (Tabela 2.01).

Os Grupos 2 e 3 são compostos por peptídeos que induzem alterações na transição de fase principal de ambas as LUVs. At02 e Cs02 são exemplos representativos dos Grupos 2 e 3, respectivamente (Figura 2.07, c1, c2 e d1 e d2). O comportamento termotrópico das LUVs, na presença de peptídeos de ambos os Grupos, é qualitativamente similar. Mesmo assim, as moléculas do Grupo 3 induziram alterações mais marcantes, como diminuição da entalpia de transição e cooperatividade, características de inserções mais profundas no núcleo de hidrocarbonetos das LUVs (Seto et al., 2007; Brand et al., 2012). Sete PAIs constituem o Grupo 2, junto com os AMPs PS-2 e Magainina-2, enquanto o Grupo 3 é composto pelo AMPs DS01, Nattererina-1, HSP-4, Asc-8 e por oito PAIs. O peptídeo BAQ56009.1 (21-38), representado como um ponto preto, alterou a transição de fase principal das membranas de fosfolípeos de maneira única, e não foi classificada em nenhum Grupo (Figura 2.08).

Tabela 2.01. Lista dos peptídeos avaliados quanto ao seu potencial de perturbação de membranas e seus respectivos Grupos

| Peptídeo | N° de acesso NCBI nr e posição na proteína | Organismo | Sequência peptídica (*) | N.r. | Grupo |
|-----------------|---|------------------------------------|---------------------------------------|-------------|--------------|
| Tc01 | EOX93337.1 (95-110) | <i>Theobroma cacao</i> | VALRLAKEVIKVVQQGW | 16 | 1 |
| Tc02 | EOX91068.1 (202-221) | <i>Theobroma cacao</i> | GKILKYLLYLLRKYANLIIR | 20 | 3 |
| Tc03 | Tc05_g014340 (12-32) | <i>Theobroma cacao</i> | IKLRNVLKYLFRIDVIKEDIL | 21 | 3 |
| Tc04 | EOY21465.1 (193-214) | <i>Theobroma cacao</i> | RVLKDVESALRESVANWKIVIG | 22 | 0 |
| Tc05 | EOY07102.1 (47-66) | <i>Theobroma cacao</i> | IVNHLVKLFDKGLNSIVNLR | 20 | 1 |
| Tc06 | EOY24636.1 (117-135) | <i>Theobroma cacao</i> | GSLHGFMYKYLKKNMVLNLF | 19 | 2 |
| Tc07 | EOY07477.1 (79-98) | <i>Theobroma cacao</i> | LIKVVNHVQYNTLHWHGIR | 20 | 0 |
| Tc08 | EOY11557.1 (289-310) | <i>Theobroma cacao</i> | LHRLVKLVAAALLRGYASKVDTH | 22 | 3 |
| Tc09 | EOY11242.1 (688-707) | <i>Theobroma cacao</i> | GIVLKDLFSEKLRRYKIVIG | 20 | 1 |
| Tc10 | EOY11257.1 (701-719) | <i>Theobroma cacao</i> | GLLFKELQKLIRYQIFIGK | 19 | 1 |
| Tc11 | EOY17584.1 (39-55) | <i>Theobroma cacao</i> | LLDKLKRLLSIEAVLI | 17 | 1 |
| At01 | NP_001320968.1 (118-136) | <i>Arabidopsis thaliana</i> | GSLHGFMYKYLKKNMVLTLF | 19 | 2 |
| At02 | SIP121-0-PQ4 (45-60) | <i>Arabidopsis thaliana</i> | KVLSKVHTLLKAVLAL | 16 | 2 |
| At03 | NP_1767850.1 (209-226) | <i>Arabidopsis thaliana</i> | GAKLAKKQVRALGKFFSF | 18 | 0 |
| At04 | NP_1767850.1 (334-353) | <i>Arabidopsis thaliana</i> | GLYNFIKVLGRTVFGLYKQF | 20 | 0 |
| Cs01 | XP_006477592.1 (117-135) | <i>Citrus sinensis</i> | GSLHGFMYRYLKNMVLNLF | 19 | 2 |
| Zm01 | XP_008663476.1 (153-171) | <i>Zea mays</i> | GSLHGFMYKYLKTLVLRLY | 19 | 2 |
| Cs02 | YP_740502.1 (463-480) | <i>Citrus sinensis</i> | FFGHIWHGARTLFRDVFA | 18 | 3 |
| Cs03 | KDO49351.1 (129-146) | <i>Citrus sinensis</i> | FFYNVIKIYGNMAGRISK | 18 | 0 |
| Gr01 | XP_012439503.1 (6-21) | <i>Gossypium raimondii</i> | GFKLGRKLVKVFkWII | 16 | 2 |
| Gr02 | KJB26672.1 (254-272) | <i>Gossypium raimondii</i> | ANRLLEAYKMLLKFLGNLR | 19 | 3 |
| DS01 | P83637.1 | <i>Phyllomedusa oreades</i> | GLWSTIKQKGKEAAIAAQAALGAL | 29 | 3 |
| Asc-8 | P0CJ32.1 | <i>Ascaphus truei</i> | GFKDLLKGAAKALVKTVLF | 19 | 3 |
| PS-2 | 2JPY_A | <i>Phyllomedusa hypocondrialis</i> | FLSLIPHAINAVSTLVHFF | 19 | 2 |
| HSP-4 | AEH28162.1 | <i>Hypsibosas punctatus</i> | GIGDILKNLAKAAGKAALHAVGESL | 25 | 3 |
| Nattererina-1 | - | <i>Eupemphix nattereri</i> | GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINKFSPQPQ | 30 | 3 |
| Magainina-2 | 2LSA_A | <i>Xenopus laevis</i> | GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS | 23 | 2 |
| SAA | BAQ56009.1 (21-38) | <i>Homo sapiens</i> | FFSFLGEAFDGARDMWRA | 18 | - |

(*) Peptídeos amidados em seu C-terminal

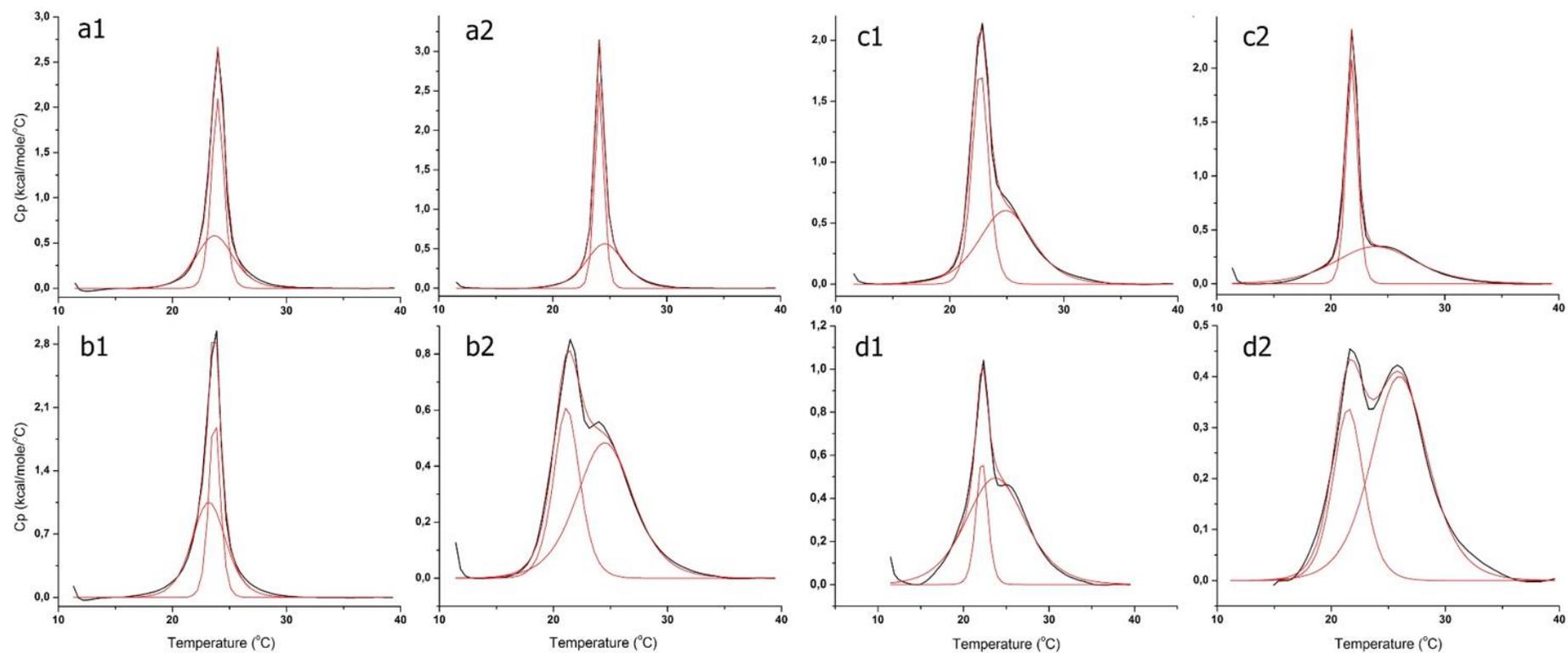


Figura 2.07 – Termogramas da transição de fase principal de LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG na presença de PAIs de cada um dos Grupos formados após análise de PCA (Figura 2.08). 1 – LUVs de DMPC; 2 – LUVs 2:1 DMPC:DMPG; a – At03, PAI pertencente ao Grupo 0; b – Tc10, PAI pertencente ao Grupo 1; c – At02, PAI pertencente ao Grupo 2; d – Cs02, PAI pertencente ao Grupo 3. O ajuste dos termogramas foi realizado para um modelo de transição de dois estados, composto de uma gaussiana larga, e uma gaussiana fina.

Tabela 2.02. Dados obtidos da interação dos PAIs e AMPs com LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG.

| Peptídeos | DMPC | | | | | | | 2:1 DMPC:DMPG | | | | | | |
|-------------------|----------|------------------|-----------------------|---------|-----------------|----------------------|------|---------------|------------------|-----------------------|---------|-----------------|----------------------|------|
| | Tm larga | ΔH larga | ΔH_{vh} larga | Tm fina | ΔH fina | ΔH_{vh} fina | Área | Tm larga | ΔH larga | ΔH_{vh} larga | Tm fina | ΔH fina | ΔH_{vh} fina | Area |
| C - DMPC | 23,54 | 2743 | 236400 | 24,13 | 2634 | 664900 | 5452 | - | - | - | - | - | - | - |
| C - 2:1 DMPC:DMPG | - | - | - | - | - | - | - | 23,85 | 2246 | 202700 | 24,25 | 3290 | 624300 | 5656 |
| Tc01 | 23,32 | 3988 | 202000 | 23,94 | 2392 | 649000 | 6485 | 24,5 | 3820 | 112700 | 22,81 | 2091 | 397900 | 5835 |
| Tc02 | 23,55 | 5200 | 84750 | 21,94 | 1461 | 272000 | 6495 | 24,09 | 2107 | 72360 | 19,05 | 2018 | 210300 | 4039 |
| Tc03 | 24,18 | 4023 | 113500 | 23,06 | 1674 | 349000 | 5571 | 24,86 | 2096 | 115200 | 20,02 | 820,2 | 129200 | 2862 |
| Tc04 | 23,29 | 3780 | 190000 | 23,93 | 2686 | 607000 | 6621 | 24,62 | 1946 | 169900 | 23,9 | 2384 | 690400 | 4297 |
| Tc05 | 24,3 | 4550 | 154000 | 23,43 | 2585 | 658000 | 7243 | 26,3 | 2100 | 122400 | 23,41 | 3387 | 390200 | 5546 |
| Tc06 | 24,76 | 3173 | 103500 | 21,91 | 2862 | 599700 | 5978 | 24,91 | 2727 | 113800 | 23,43 | 2599 | 563300 | 5288 |
| Tc07 | 23,28 | 4043 | 199800 | 23,94 | 2363 | 664100 | 6604 | 24,35 | 2360 | 150100 | 24,28 | 2345 | 602900 | 4701 |
| Tc08 | 24,25 | 4441 | 102000 | 23,03 | 2192 | 425000 | 6578 | 25,65 | 1774 | 112800 | 21,24 | 1164 | 124000 | 2930 |
| Tc09 | 23,11 | 4203 | 175800 | 23,74 | 2429 | 599000 | 6859 | 26,54 | 1560 | 110900 | 24,29 | 1083 | 261400 | 2650 |
| Tc10 | 23,2 | 4147 | 177000 | 23,68 | 2638 | 539000 | 6998 | 25,07 | 2444 | 110100 | 20,96 | 2520 | 165200 | 4963 |
| Tc11 | 23,59 | 3818 | 109500 | 23,68 | 2201 | 514800 | 6088 | 24,89 | 2151 | 118200 | 24,51 | 2118 | 632200 | 4306 |
| At01 | 24,92 | 3023 | 110400 | 22,96 | 3139 | 695400 | 6079 | 25,32 | 2794 | 106700 | 24,17 | 2978 | 571400 | 5748 |
| At02 | 25,1 | 2915 | 125000 | 23,35 | 3114 | 500300 | 6052 | 24,29 | 3475 | 77010 | 21,87 | 2296 | 576300 | 5670 |
| At03 | 23,71 | 2536 | 161200 | 23,97 | 2975 | 495000 | 5545 | 24,57 | 2508 | 159100 | 24,08 | 2672 | 683400 | 5195 |
| At04 | 23,78 | 3819 | 257000 | 24,11 | 1297 | 799000 | 5476 | 23,93 | 2896 | 154200 | 24,14 | 2201 | 602000 | 5217 |
| Cs01 | 24,98 | 2988 | 109900 | 22,35 | 2806 | 658800 | 5764 | 25,27 | 2667 | 112900 | 23,72 | 2835 | 575500 | 5452 |
| Zm01 | 24,92 | 3067 | 102700 | 22,58 | 2477 | 529900 | 5530 | 25,36 | 2502 | 101400 | 24,59 | 2181 | 491200 | 4624 |
| Cs02 | 23,78 | 4605 | 75410 | 22,15 | 1040 | 386100 | 5433 | 26 | 2655 | 107000 | 21,49 | 1205 | 193300 | 3905 |
| Cs03 | 23,68 | 3160 | 223000 | 24,08 | 2199 | 643900 | 5550 | 24,83 | 2195 | 114500 | 23,92 | 2233 | 483100 | 4405 |
| Gr01 | 25,19 | 2530 | 137600 | 23,13 | 3206 | 604000 | 5763 | 25,18 | 3178 | 111500 | 25,21 | 2839 | 612300 | 6082 |
| Gr02 | 25,09 | 3574 | 91960 | 22,06 | 772 | 310200 | 4271 | 24,93 | 2987 | 105100 | 21,34 | 2606 | 313200 | 5518 |
| Asc-8 | 24,79 | 2456 | 120800 | 20,84 | 3254 | 152300 | 5626 | 24,98 | 1825 | 110900 | 19,62 | 1332 | 219000 | 3136 |
| DS01 | 24,99 | 1654 | 154000 | 21,59 | 318,7 | 204000 | 1860 | 25,93 | 1979 | 89700 | 20,05 | 321,3 | 172400 | 2233 |

Continuação

| ID | DMPC | | | | | | | 2:1 DMPC:DMPG | | | | | | |
|---------------|----------|------------------|-----------------------|---------|-----------------|----------------------|------|---------------|------------------|-----------------------|---------|-----------------|----------------------|------|
| | Tm larga | ΔH larga | ΔH_{vh} larga | Tm fina | ΔH fina | ΔH_{vh} fina | Área | Tm larga | ΔH larga | ΔH_{vh} larga | Tm fina | ΔH fina | ΔH_{vh} fina | Area |
| PS-2 | 24,37 | 3608 | 100900 | 23,03 | 1988 | 442600 | 5536 | 24,65 | 2898 | 125000 | 24,01 | 2606 | 587500 | 5522 |
| Magainina | 23,58 | 2759 | 191700 | 23,93 | 2773 | 555900 | 5649 | 24,06 | 4600 | 96010 | 22,87 | 1100 | 449100 | 5620 |
| HSP-4 | 25,87 | 2339 | 112300 | 22,28 | 1010 | 160800 | 3318 | 26,31 | 2230 | 104500 | 21,8 | 899 | 116600 | 3112 |
| Nattererina-1 | 24,86 | 4197 | 90360 | 22,57 | 893,6 | 320300 | 5024 | 26,05 | 2164 | 105900 | 21,26 | 271,2 | 144500 | 2421 |

C – Controle composto apenas por LUVs.

Tm larga – Temperatura de transição para a gaussiana larga.

ΔH larga – Variação da entalpia da gaussiana larga.

ΔH_{vh} larga – Variação da entalpia de Van't Hoff da gaussiana larga.

Tm fina – Temperatura de transição para a gaussiana fina.

ΔH fina – Variação da entalpia da gaussiana fina.

ΔH_{vh} fina – Variação da entalpia de Van't Hoff da gaussiana fina.

Área – Área embaixo da curva da transição de fase principal das LUVs

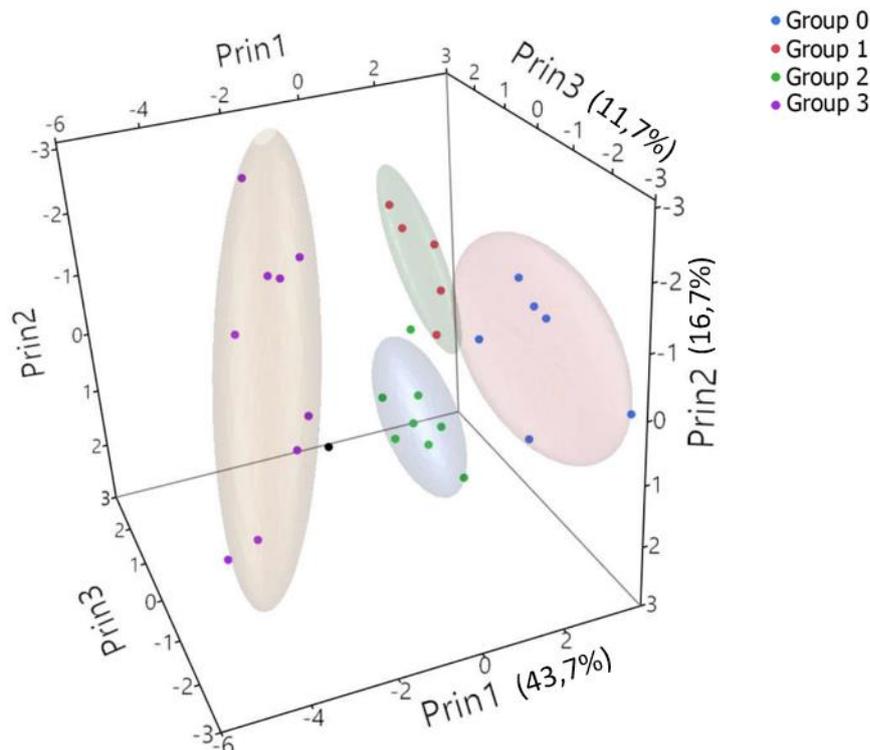


Figura 2.08. Análise de componentes principais dos dados obtidos da interação dos PAIs e AMPs com as LUVs modelo. Cada ponto representa um peptídeo. As cores dos pontos determinam os Grupos a qual cada um pertence. Grupo 0 – azul; Grupo 1 – vermelho; Grupo 2 – verde; Grupo 3 – roxo. As áreas demarcadas representam o volume de confiança definido pelos integrantes de cada Grupo. Um peptídeo sem atividade antimicrobiana, utilizado como referência (SAA, BAQ56009.1 (21-38)), representado por um ponto preto, apresentou um padrão único de interação com as vesículas e não foi classificado em nenhum dos Grupos. Prin1 contém 43,7% da variação da amostra sendo explicado pelos parâmetros T_m larga e ΔH_{vh} larga da interação com ambas LUVs como as principais razões de variância. Prin2 contém 16,7% da variância, sendo explicado pelos parâmetros T_m larga e ΔH larga para DMPC, ao passo que Prin3 contém 11,7% da variância, explicado pelos parâmetros Área de DMPC e ΔH_{vh} larga para ambas LUVs. Os três componentes totalizam 72,1% de toda a variância observada.

2.4.2. Perturbações na transição de fase principal de LUVs está correlacionado com atividade antimicrobiana

Os Grupos obtidos, pelas alterações similares induzidas pelos peptídeos às LUVs, são correlacionadas a atividade antimicrobiana. A atividade foi transformada para $-\log(\text{CIM}/512)$ (Figura 2.09). Essa transformação garante que peptídeos que não possuem atividade antimicrobiana (valores iguais ou superiores a 512 μM), apresentem o valor zero para os devidos fins. A maior de atividade nessa escala é 3.

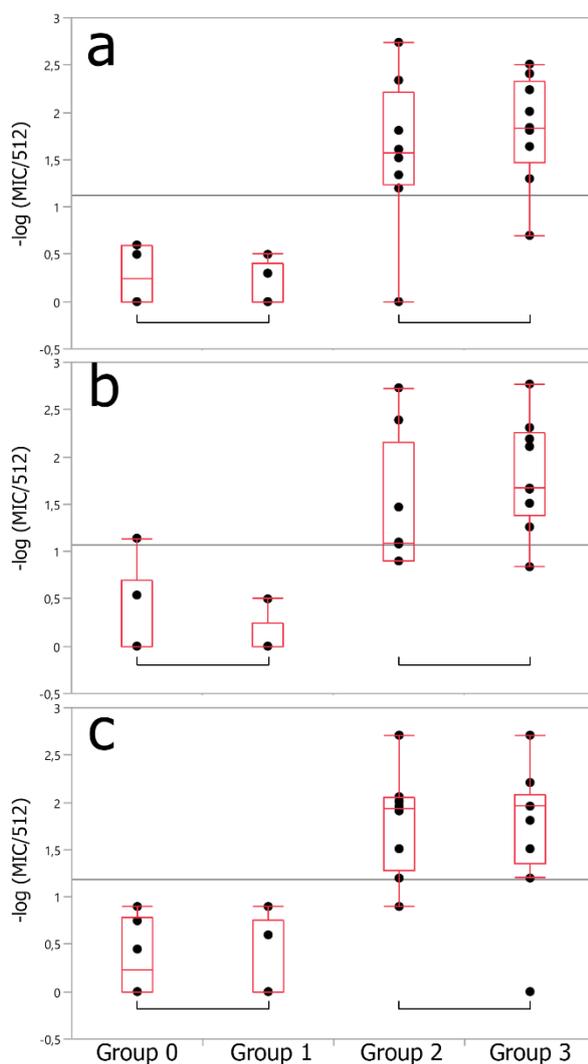


Figura 2.09 – Relação entre atividade antimicrobiana e perturbação da transição de fase principal de LUVs. É possível observar que os Grupos 0 e 1 possuem atividade antimicrobiana próximo de 0 para todas as classes, ao passo que os Grupos 2 e 3 apresentam atividades significativamente maiores. a – bactérias Gram +; b – bactérias Gram -; c – leveduras.

Três categorias de microrganismos patogênicos humanos e de plantas foram consideradas: Gram + (*B. subtilis*, *B. cereus* e *S. aureus*), Gram – (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. carotovora*, *P. tabaci* e *X. campestris*) e leveduras (*C. albicans* e *C. neoformans*) para o cálculo. A mediana da atividade dos Grupos de peptídeos para as três classes de microrganismos, apresentado na Figura 2.09, está presente na Tabela 2.03.

Tabela 2.03. Atividades antimicrobianas em função dos Grupos de peptídeos.

| Classificação | n | Bactérias Gram + | | | Bactérias Gram - | | | Leveduras | | |
|---------------|---|------------------|---------|-----|------------------|---------|-----|-----------|---------|-----|
| | | 10% | Mediana | 90% | 10% | Mediana | 90% | 10% | Mediana | 90% |
| Grupo 0 | 5 | 0 | 0,2 | 0,6 | 0 | 0 | 1,1 | 0 | 0,2 | 0,9 |
| Grupo 1 | 5 | 0 | 0 | 0,5 | 0 | 0 | 0,5 | 0 | 0 | 0,9 |
| Grupo 2 | 8 | 0 | 1,6 | 2,7 | 0,9 | 1,1 | 2,7 | 0,9 | 1,9 | 2,7 |
| Grupo 3 | 9 | 0,7 | 1,8 | 2,5 | 0,8 | 1,7 | 2,8 | 0 | 2,0 | 2,7 |

Grupo 0 e 1 possuem moléculas com atividade antimicrobiana residual (Tabela 2.03). Já os Grupos 2 e 3 apresentam uma mediana de atividade antimicrobiana significativamente maior (teste não paramétrico de Wilcoxon pareado, $\alpha = 0.05$) que os Grupos 0 e 1, para todas as classes de microrganismos avaliados. Oito PAIs distribuídos nos Grupos 2 e 3 apresentaram CIMs comparáveis ou menores do que AMPs. São eles, Tc02, Tc06, Tc08, At02, Cs01, Zm01, Gr01, Gr02. A estruturas primárias desses peptídeos podem ser verificadas na Tabela2.01.

2.4.3. Calorimetria de varredura diferencial como uma ferramenta para a classificação de peptídeos membranoativos

Os termogramas obtidos da interação dos PAIs e AMPS com LUVs obtidos de um trabalho anterior (Brand et al., 2012), foram adicionados aos dados obtidos nesse trabalho para a realização de uma meta-análise. A tabela 2.04 apresenta todos os peptídeos utilizados para essa análise. Os dois conjuntos de dados foram normalizados de forma independente para corrigir possíveis variações analíticas e submetidos a uma nova análise de PCA (PCA2, Figura2.10).

Tabela 2.04. Peptídeos utilizados para a meta-análise e seus respectivos Grupos.

| Peptídeo | Proteína fonte | Organismo | Seqüência peptídica (*) | N.r. | Grupo |
|-------------|--|------------------------------------|--------------------------------|------|-------|
| Tc01 | Embryo defective 1381 isoform 2 | <i>Theobroma cacao</i> | VALRLAKEVIKVVQGW | 16 | 1 |
| Tc02 | ARM repeat superfamily protein, putative isoform 1 | <i>Theobroma cacao</i> | GKILKYLLYLLRKYANLIIR | 20 | 3 |
| Tc03 | Tc05_g014340 (12-32) | <i>Theobroma cacao</i> | IKLRNVLKYLFRIDVIKEDIL | 21 | 3 |
| Tc04 | Purple acid phosphatase 3 | <i>Theobroma cacao</i> | RVLKDVESALRESVANWKIVIG | 22 | 0 |
| Tc05 | Gamma interferon responsive lysosomal thiol reductase family protein, putative | <i>Theobroma cacao</i> | IVNHLVKLFDKGLNSIVNLR | 20 | 1 |
| Tc06 | Cytochrome P450, family 87, subfamily A, polypeptide 2 | <i>Theobroma cacao</i> | GSLHGFMYKYLLKMNVLNLF | 19 | 2 |
| Tc07 | Laccase 17 | <i>Theobroma cacao</i> | LIKVVNHVQYNVTLHWHGIR | 20 | 0 |
| Tc08 | Uncharacterized protein TCM_026695 | <i>Theobroma cacao</i> | LHRLVKLVAAALLRGYASKVDTH | 22 | 3 |
| Tc09 | NB-ARC domain-containing disease resistance protein, putative | <i>Theobroma cacao</i> | GIVLKDLFSEKLRRYKIVIG | 20 | 1 |
| Tc10 | NB-ARC domain-containing disease resistance protein, putative | <i>Theobroma cacao</i> | GLLFKELQKLIRYQIFIGK | 19 | 1 |
| Tc11 | LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein, putative | <i>Theobroma cacao</i> | LLDKLKRRTLLSIEAVLI | 17 | 1 |
| At01 | Cytochrome P450, family 87, subfamily A, polypeptide 2 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | GSLHGFMYKYLLKMNVLTLF | 19 | 2 |
| At02 | SIP121-0-PQ4 (45-60) | <i>Arabidopsis thaliana</i> | KVLSKVHTLLKAVLAL | 16 | 2 |
| At03 | YELLOW STRIPE like | <i>Arabidopsis thaliana</i> | GAKLAKKQVRALGKFFSF | 18 | 0 |
| At04 | YELLOW STRIPE like | <i>Arabidopsis thaliana</i> | GLYNFIKVLGRTVFGLYKQF | 20 | 0 |
| Cs01 | PREDICTED: cytochrome P450 87A3 | <i>Citrus sinensis</i> | GSLHGFMYRYLLKMNVLNLF | 19 | 2 |
| Zm01 | PREDICTED: cytochrome P450 87A3-like | <i>Zea mays</i> | GSLHGFMYKYLLKTLVLRLY | 19 | 2 |
| Cs02 | photosystem II CP47 chlorophyll apoprotein (chloroplast) | <i>Citrus sinensis</i> | FFGHIWHGARTLFRDVFA | 18 | 3 |
| Cs03 | hypothetical protein CISIN_1g015590mg | <i>Citrus sinensis</i> | FFYNVIKIYGNMAGRISK | 18 | 0 |
| Gr01 | PREDICTED: uncharacterized protein LOC105765114 | <i>Gossypium raimondii</i> | GFKLGRKLVKVKWII | 16 | 2 |
| Gr02 | hypothetical protein B456_004G254100 | <i>Gossypium raimondii</i> | ANRLEAYKMLLKFLGNLR | 19 | 3 |
| Asc-8 | - | <i>Ascaphus truei</i> | GFKDLLKGAALKVKTVLF | 19 | 3 |
| DS01 | - | <i>Phyllomedusa oreades</i> | GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL | 29 | 3 |
| PS-2 | - | <i>Phyllomedusa hypocondrialis</i> | FLSLIPHAINAVSTLVHFF | 19 | 2 |
| HSP-4 | - | <i>Hypsibos punctatus</i> | GIGDILKNLAKAAGKAALHAVGESL | 25 | 3 |
| Nattererina | - | <i>Eupemphix nattereri</i> | GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINKFSPQPQ | 30 | 3 |

| | | | | | |
|-------------------------|------------------------------------|--|--|----|---|
| Magainina-2 | - | <i>Xenopus laevis</i> | GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS | 23 | 2 |
| BAQ56009.1V (21-38) | Serum amyloid A protein | <i>Homo sapiens</i> | FFSFLGEAFDGARDMWRA | 18 | - |
| P61458(35–60) | Pterin-4-alpha-carbinolamine | <i>Mus musculus</i> | FKQFHFKDFNRAFGFMTRVALQAEKL | 26 | 1 |
| B0CZJ3(104–130) | Histone deacetylase complex | <i>Laccaria bicolor</i> | IAAAQRITSGAADIINWAGGLHHAKK | 27 | 0 |
| A4HW34(187–217) | Glutathione synthetase | <i>Leishmania infantum</i> | LVQRFHAYLHKFREAFMNVGAAAAVEGTKAA | 31 | 2 |
| Q8RW88(70–95) | Alpha-amylase | <i>Citrus reticulata</i> | GHRGALKDWVQAAGGAVAAFDFTTKG | 26 | 0 |
| Q6TV81(25–52) | ORF107 virion morphogenesis | <i>Bovine papular stomatitis virus</i> | AAAAAAAIAKMLMDLVNERIMALNKKAKK | 28 | 3 |
| O43312(33–62) | Metastasis suppressor protein 1 | <i>Homo sapiens</i> | FINKAGKLSQLRRTTVVAAAFLDAFQKVA | 30 | 3 |
| Q8KG25(327–351) | Enolase 2 | <i>Chlorobium tepidum</i> | FVTNSKRLAEGIEKGVGNSILIKVN | 25 | 0 |
| P94692(929–955) | Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase | <i>Desulfovibrio africanus</i> | KLKKLLAGQKDGLLGQIAAMSDLYTKK | 27 | 1 |
| B4FGE3(22–37) | Histone H2A | <i>Zea mays</i> | KAGLQFPVGRIARFLK | 16 | 1 |
| A3KLW0(117–136) | Rubisco large chain | <i>Anisophyllea pomifera</i> | FKALRALRLEDLRIPTSYIK | 20 | 1 |
| Q7YRI0(9–28) | Interferon alpha | <i>Bos taurus</i> | LAKRRVLTLLRQLRRVSPSS | 20 | 1 |
| gb ACU24018.1 (73–101) | Unknown protein | <i>Glycine max</i> | GLWQIFSSKEEGKDNSQQKSKGDQAKEL | 28 | 0 |
| gb AAD22970.1 (120–148) | Trehalase 1 GMTRE1 | <i>Glycine max</i> | VWTTAMEKSSAANFMSRNQRRSSLHSL | 28 | 1 |
| Q9XEY7(120–148) | Trehalase 1 GMTRE1 | <i>Glycine max</i> | SLWKNLSRKISGAVKAQPDLTLLPLPGS | 29 | 1 |
| A5LDU0(184–211) | Pseudouridine synthase | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | GKFFHQIKKMFLSVGVKVTSLKRIQFGDF | 28 | 1 |
| Penetratina | Antennapedia complex | <i>Drosophila melanogaster</i> | RQIKIWFQNRMMKWKK | 16 | 1 |
| DS 01 (1–12) | DS01** | <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i> | GLWSTIKQKGKE** | 12 | 0 |
| Hyposin HA-6 | - | <i>Phyllomedusa oreades</i> | RQIKIWFQNRMMKWKK | 16 | 0 |
| Syphaxin | - | <i>Leptodactylus syphax</i> | GVL DILKGA AKDLAGHVATKVINKI | 25 | 3 |
| Pseudin B | - | <i>Pseudis bolbodactyla</i> | GLNTLKKVIQGLHEVIKLVNNHA | 23 | 3 |
| Phes | - | <i>Hypsiboas punctatus</i> | FFFDLTKNLAGKVIGALT | 18 | |

(*) Peptídeos amidados em seu C-terminal

(**) Peptídeo com C-terminal carboxilado

Cores indicam origem dos peptídeos. Os peptídeos descritos neste trabalho encontram-se em branco. Peptídeos em cinza são oriundos do trabalho de Brand et al. (2012). Peptídeos em verde foram utilizados em ambos os trabalhos, portanto, foram analisados duas vezes. Peptídeo em azul representa um PAI humano sem atividade antimicrobiana.

No total, 54 análises são agora consideradas, incluindo réplicas de LUVs sem peptídeos e 5 AMPs (DS01, Nattererina-1, HSP-4, OS-2 e Magainina-2). A distribuição dos peptídeos nos três primeiros componentes principais é similar aquele apresentado na Figura 2.08, com quatro Grupos de peptídeos. Peptídeos com amplo espectro e atividade antimicrobiana significativa estão agrupados nos Grupos 2 e 3. Isso indica que existe um comportamento termal classe-específico para os peptídeos perturbadores de membrana, e que novas moléculas podem ser adicionadas gradualmente ao sistema de predição. Além disso, as moléculas que estão confinadas dentro do volume de confiança de cada Grupo devem compartilhar a atividade biológica dos outros membros.

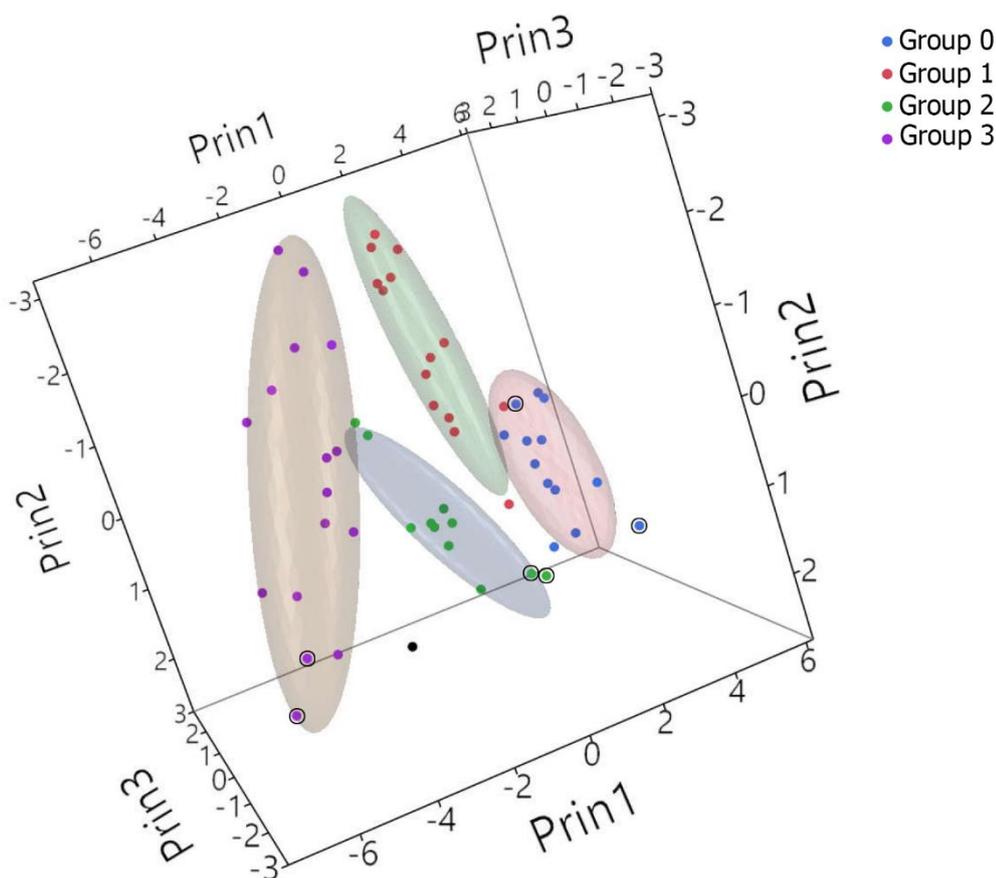


Figura 2.10. Análise de componentes principais do efeito causado na transição de fase principal das membranas modelo por 54 peptídeos. A distribuição dos Grupos é similar a obtida anteriormente, sendo explicado pelos mesmos parâmetros (Figura 2.08). Os Grupos 2 e 3 continuam sendo aqueles que contém os peptídeos mais ativos. É possível observar que com o aumento do número de dados, certas sobreposições começam a aparecer.

2.4.4. Perturbação de membrana e helicoidização de peptídeos estão correlacionados

Varreduras do UV distante foram adquiridas para os PAIs e AMPS apenas em tampão e na presença de 2 mM de LUVs de DMPC ou 2:1 DMPC:DMPG (2 mol% peptídeo/fosfolipídeo). Novamente, dados de CD adquiridos anteriormente foram adicionados aos dados atuais e todos os 54 casos foram considerados. O espectro de CD dos peptídeos em tampão foram compatíveis com estruturas randômicas, com a exceção de quatro peptídeos, A5LDU0(184–211), gb|AAD22970.1|(120–148), At04, Cs03 os quais estavam estruturados em folha β , antes da adição de LUVs, e foram retirados das análise seguintes (Figura 2.11).

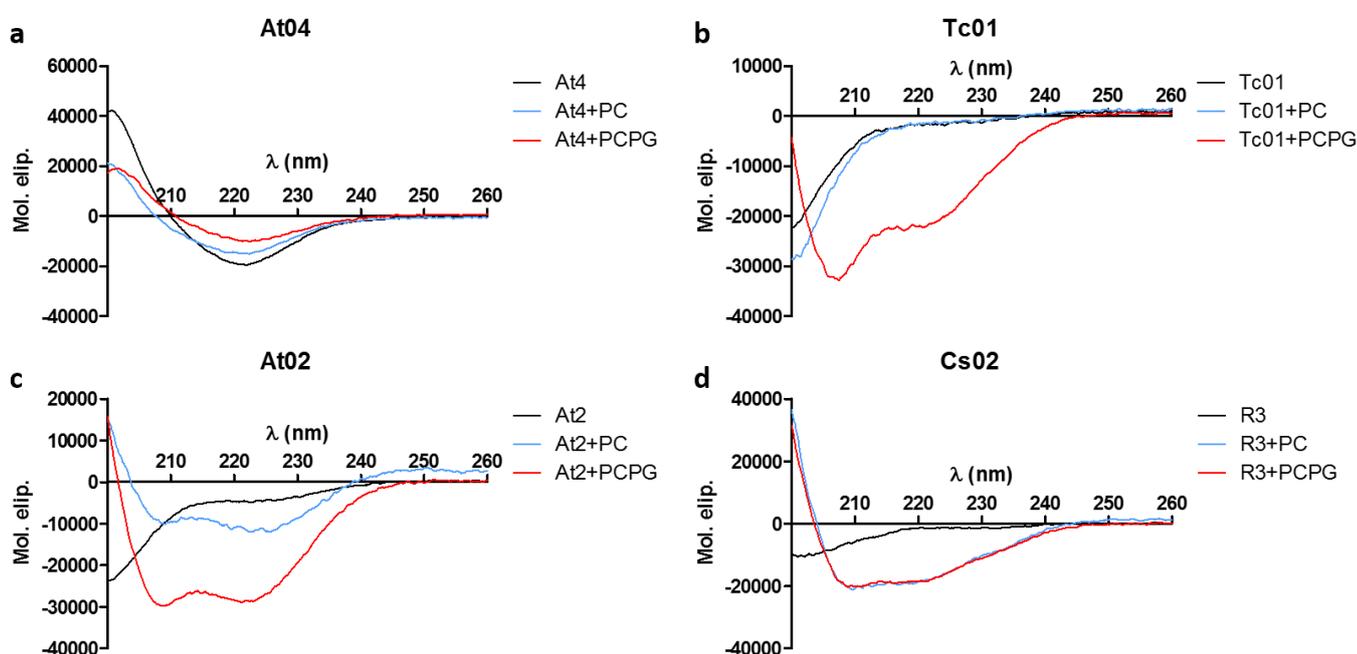


Figura 2.11. Espectro de CD de peptídeos representantes de cada um dos Grupos. a – At04 (Grupo 0); b – Tc01 (Grupo 1); c – At02 (Grupo 2); d – Cs02 (Grupo 3). As estruturas em folha β são caracterizadas por bandas dicróicas negativa a 218 nm e positivas a partir de 208 nm, enquanto as estruturas em α -hélice são caracterizados pelas bandas dicróicas negativas em 208 e 222 nm. As bandas dicróicas de estruturas aleatórias apresentam um valor próximo a zero, seguido de valores negativos a partir de 220 nm.

Com a adição de LUVs, o espectro de CD de alguns peptídeos apresentou características compatíveis com estruturas em α -hélice (Figura 2.11). A elipticidade residual média de cada peptídeo foi calculada e transformada em helicidade percentual (Tabela 2.05) (Chen et al., 1974). É possível observar uma clara correlação entre o percentual de helicidade médio dos

peptídeos na presença da LUVs de DMPC e 2:1 DMPG:DMPC e os Grupos de peptídeos obtidos a partir dos dados de DSC (Figura 2.12).

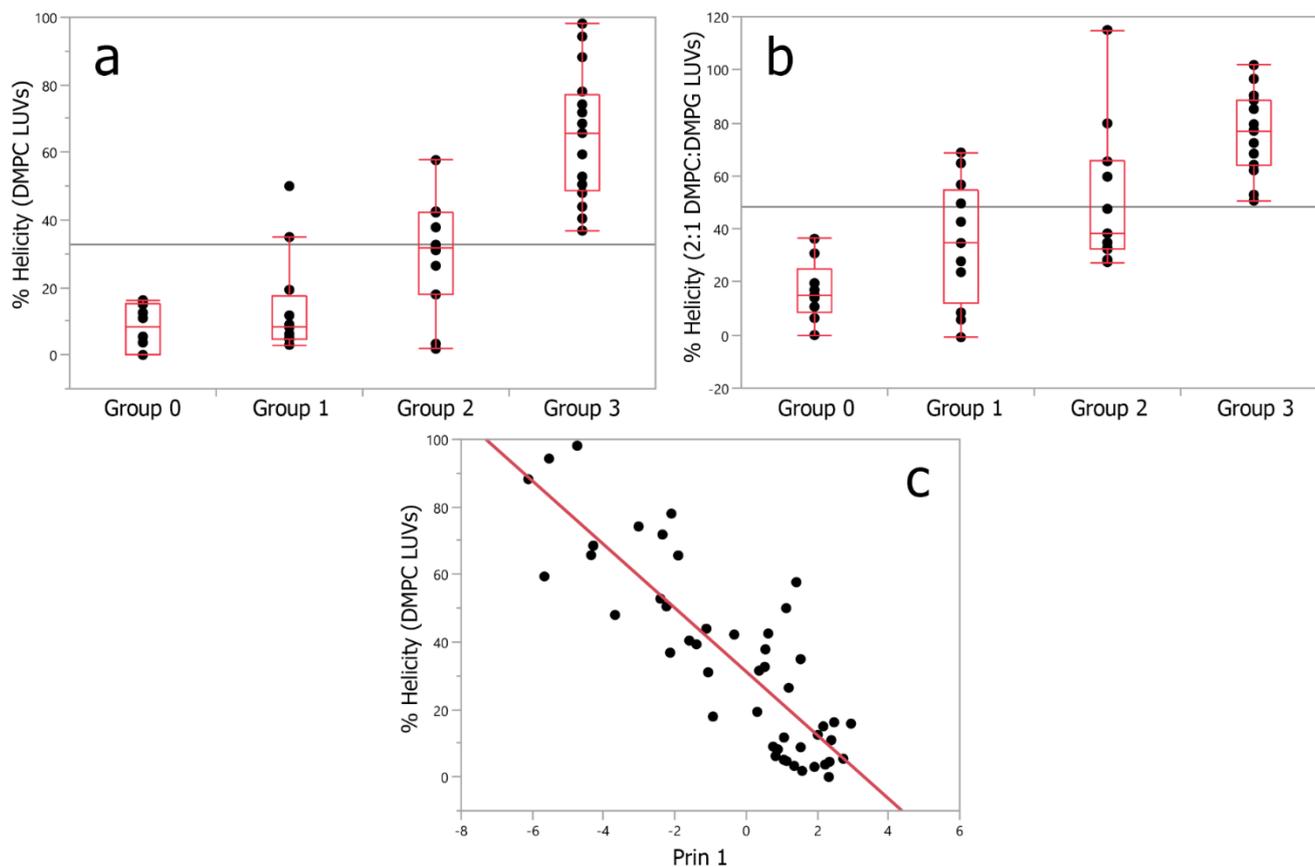


Figura 2.12. Avaliação da helicidade dos Grupos de peptídeos na presença de LUVs modelo. a – helicidade percentual em membranas de DMPC; b – helicidade percentual em membranas de 2:1 DMPC:DMPG; c – correlação ($R^2 = 0,65$) entre componente principal 1 e helicidade percentual dos peptídeos.

Tabela 2.05. Quartis da helicidade percentual em função dos Grupos.

| Classificação | n | DMPC | | | 2:1 DMPC:DMPG | | |
|---------------|----|------|---------|-----|---------------|---------|-----|
| | | 10% | Mediana | 90% | 10% | Mediana | 90% |
| Grupo 0 | 11 | 0 | 8 | 16 | 0 | 15 | 36 |
| Grupo 1 | 14 | 3 | 8 | 45 | 1 | 35 | 68 |
| Grupo 2 | 12 | 2 | 32 | 55 | 28 | 38 | 108 |
| Grupo 3 | 16 | 40 | 66 | 95 | 52 | 77 | 99 |

A helicidade percentual média de peptídeos dos Grupos 0 e 1 praticamente não sofreu alterações após a adição de LUVs de DMPC (Tabela 2.05). Por outro lado, as LUVs de 2:1 DMPG:DMPG induziram uma estruturação helicoidal dos peptídeos de ambos os Grupos, principalmente aqueles do Grupo 1 (Tabela 2.05). Peptídeos dos Grupos 2 e 3 possuem uma helicidade percentual média maior que a dos outros dois Grupos. Além disso, em acordo com os dados de DSC, peptídeos do Grupo 3 apresentaram maior estruturação do que peptídeos do Grupo 2, independente da composição das LUVs (Tabela 2.05). Como demonstrado na Figura 2.12, o primeiro componente principal está linearmente correlacionado ao conteúdo helicoidal dos peptídeos em LUVs de DMPC ($R^2 = 0.65$, ANOVA $p < 0.0001$ for DMPC), o que confirma as observações obtidas anteriormente com um conjunto de dados menores (Brand et al., 2012).

2.4.5. Reavaliação das propriedades físico-químicas dos Grupos de peptídeos

Similaridades no perfil termotrópico das membranas modelos, induzidas por peptídeos, implicam em um conjunto semelhante de propriedades físico-químicas com relevância para a atividade interfacial. A mediana das propriedades de cada Grupo descrito aqui foi avaliada. Dados duplicados foram removidos para evitar algum possível viés. O número de resíduos, massa molecular, carga líquida, potencial de agregação (parâmetro Nav4ass do algoritmo Aggrescan) (Conchillo-Sole et al., 2007), hidrofobicidade (Zhao & London, 2006), momento hidrofóbico e estrutura secundária de acordo com o algoritmo GOR IV (Garnier et al., 1996), o qual considera estruturas helicoidais, estendidas e randômicas, foram avaliados em função dos Grupos de peptídeos (Figura 2.13).

Como esperado, há uma justaposição das propriedades dos Grupos de peptídeos membranoativos, resultando em sua maioria em diferenças não-significativas nas medianas (teste não paramétrico de Wilcoxon pareado, $\alpha = 0.05$). Mesmo assim, algumas diferenças significativas de medianas entre Grupos foram observadas. Moléculas do Grupo 2 são mais hidrofóbicas e, também, mais suscetíveis a agregação do que aquelas dos demais Grupos (Figura 2.13). Além disso, elas também são mais curtas do que os peptídeos do Grupo 3. Por outro lado, a helicidade média de acordo com o algoritmo GOR IV é significativamente maior para os peptídeos do Grupo 3 do que nos demais Grupos, enquanto o mesmo algoritmo prediz uma mediana de conformação estendida mais baixa também (Figura 2.13.).

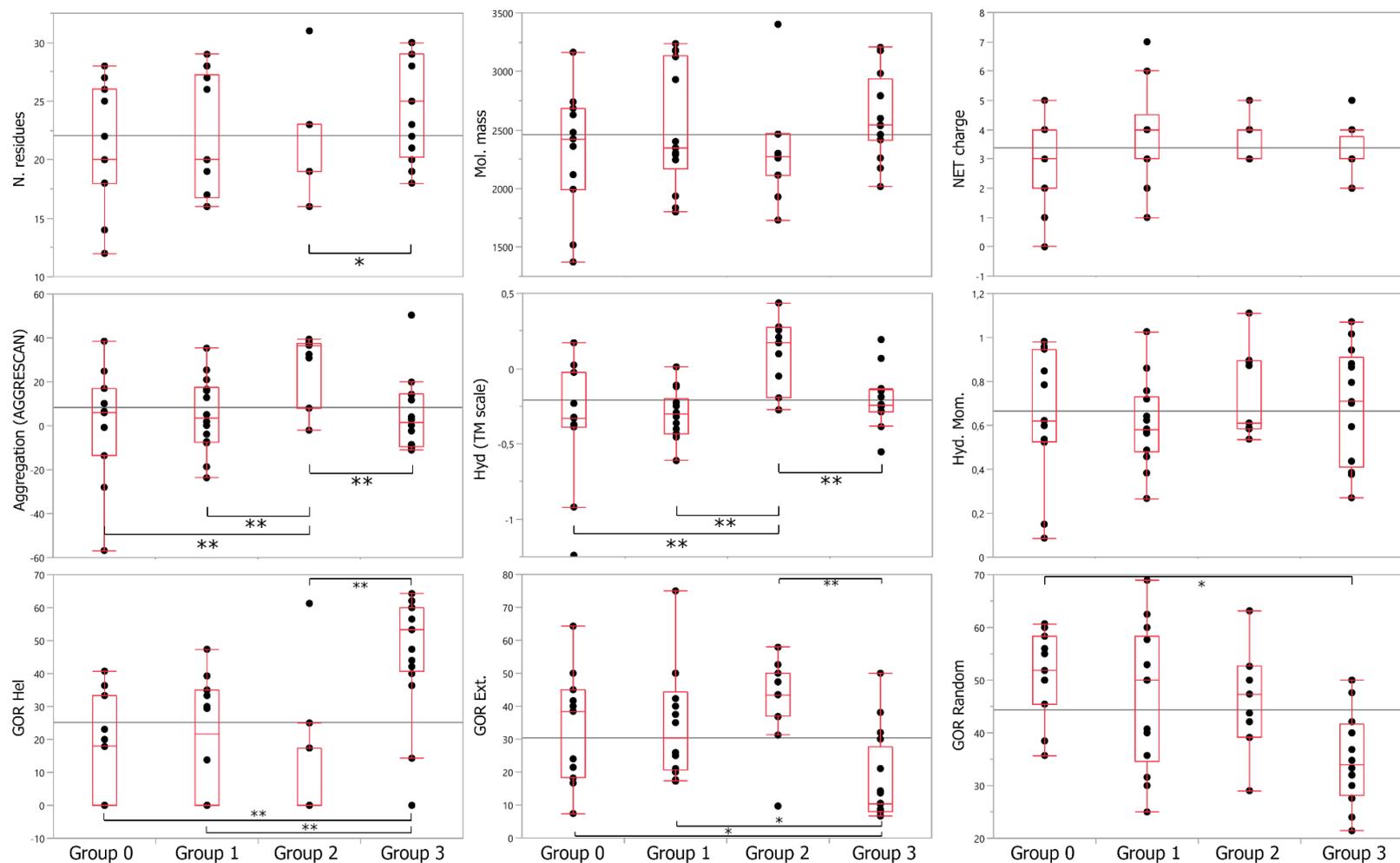


Figura 2.13. Quartis da análise das propriedades físico-químicas em função dos Grupos formados. A mediana de hidrofobicidade do Grupo 2 (Hyd), assim como a propensão a se agregar (Aggregation) é significante superior aos demais Grupos. O mesmo é válido para a predição de helicidade dos peptídeos do Grupo 3.

2.5. DISCUSSÃO

Peptídeos bioativos encriptados em sequências proteicas são ubíquos na natureza, e nós estamos apenas começando a entender a sua importância como reguladores fisiológicos endógenos e/ou seu potencial biotecnológico (Meisel & Bockelman, 1999; Dores et al., 2002; Brand et al., 2012). Não seria exagero conceituar proteínas como uma quimera de peptídeos unidos de uma extremidade a outra, na qual a liberação de moléculas encriptadas ative uma resposta fisiológica em um cenário natural ou manipulado pelo homem. (Brand et al., 2012; Demidova-Rice et al., 2012).

A criação do Kamal e sua busca dirigida com base no cálculo das propriedades físico-químicas de fragmentos de proteínas, permitiu a descoberta de novas moléculas possivelmente antimicrobianas encriptadas. Entretanto, discriminar peptídeos antimicrobianos de não-antimicrobianos com base apenas nos descritores físico-químicos é desafiador (Torrent et al., 2011).

Estudos recentes têm evidenciado uma sobreposição estrutural e funcional em peptídeos membranoativos, e que as diferenças dentro e entre os AMPs, CPPs e PATs são devidos a variações na capacidade de cada proteína de ligar, desorver, oligomerizar, permeabilizar e translocar-se através de uma dada membrana (Henriques et al., 2006; Last et al., 2013). Considerando que a metodologia do Kamal se baseia na filtragem de peptídeos usando descritores físico-químicos, espera-se que os possíveis PAIs apresentem atividades de membrana variáveis, bem como diferentes níveis de interação. Portanto, faz-se necessário a identificação, caracterização e refinamento das classes de peptídeos membranoativos. No entanto, os membros de grupos de peptídeos não podem ser considerados como fixos. O espaço das possíveis interações peptídeo-membrana é contínuo e não discreto, sendo que o número de Grupos pode aumentar, e os seus membros variarem para outro grupo de acordo com a expansão gradual do modelo.

Similaridades nos modos de interação entre peptídeos-membrana podem ser avaliados pela aplicação de uma análise de componentes principais às varreduras termais, obtidas de LUVs modelo na presença de peptídeos (Brand et al., 2012). Nossos dados reforçam que os peptídeos membranolíticos produzem um perfil termal característico em vesículas modelo, e que esse perfil pode ser usado para discriminar possíveis PAIs de outras classes de peptídeos bioativos (Figuras 2.07 e Figuras 2.08). Além disso, propõe-se que tal sistema de classificação possa ser gradualmente expandido pela incorporação de dados de DSC de novos possíveis PAIs,

realizados sob as mesmas condições, como demonstrado pela PCA2 (Figura 2.10). Contudo, é necessário cuidado para seguir as condições experimentais usadas, uma vez que a transição de fase principal de fosfolípidos é sensível a pequenas variações em concentração de tampão, dispersão de tamanho de vesícula, dentre outros (Koynova et al., 1998).

No trabalho de Brand et al., (2012), seis de quinze PAIs filtrados apresentaram atividade antimicrobiana contra algum dos microrganismos testados, mas nenhum era comparável aos AMPs utilizados em termos de potência. Além disso, as alterações induzidas por esses PAIs no comportamento termotrópico das membranas foram diferentes daquela dos AMPs.

Na atual geração de PAIs, 11 moléculas induziram alterações marcantes na transição de fase nas LUVs de DMPC e/ou 2:1 DMPC:DMPG e foram localizadas com os AMPs (Figura 2.08, Grupos 2 e 3). De fato, peptídeos dos Grupos 2 e 3 do presente trabalho compreendem moléculas com potente e amplo espectro de atividade antimicrobiana, como observado na Figura 2.09 e na Tabela 2.03. Peptídeos desses Grupos foram ativos, em média, contra todos os microrganismos testados, independente da composição de membranas e parede celular, o que varia muito dentre as classes de microrganismos avaliados (Yeaman & Yount, 2003). Isso indica que a interação dos peptídeos com as LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG são representações válidas de sistemas mais complexos de membrana. Além disso, indica que a atividade antimicrobiana é mais uma propriedade do peptídeo do que a de membranas alvo, em acordo com modelo de atividade interfacial (Wimley, 2010). Os PAIs desses Grupos são então ativos contra um amplo espectro de microrganismos, assim como os AMPs, e podem também compartilhar outras atividades biológicas comumente atribuídas aos AMPs (Popovic et al., 2012; Di Grazia et al., 2015).

Os demais PAIs preditos pelo programa Kamal alteraram em menor grau a transição de fase principal das membranas modelo nas concentrações avaliadas. Mesmo assim, alguns peptídeos foram capazes de induzir microdefeitos e influenciar no movimento dos fosfolípidos, indicando que os mesmos são membranoativos e possuem atividade interfacial (Wimley, 2010). A atividade antimicrobiana dos PAIs Cs03, At03 e At04 do Grupo 0, e Tc05 e Tc10 do Grupo 1 são relativamente menores, e podem ser consideradas como uma consequência de uma ação de interação peptídeo-membrana menos disruptiva. É importante lembrar que, apesar de ser parte do Grupo 0, o PAI At04 apresentou seletividade para *S. aureus*, o que pode indicar uma preferência por algum composto ou um outro modo de ação em condições sub-líticas, como ação intracelular (Patrzykat et al., 2002).

O PAI humano BAQ56009.1 (21-38), desenvolvido para outros fins, é uma exceção. Apesar de induzir um comportamento termotrópico nas membranas modelo que visualmente lembra outros PAIs, o mesmo não é classificado com outras moléculas (Figura 2.08, ponto preto). Esse peptídeo, ao contrário dos demais, é aniônico, com carga líquida de -1 e não apresenta atividade antimicrobiana, apesar de ser claramente anfifílico e se estruturar em α -hélice na presença de membranas. Esse peptídeo pode fazer parte de um novo e desconhecido Grupo no contínuo do espaço dos possíveis modos de interação peptídeo-membrana.

Existe uma clara correlação entre efeito termotrópico que os peptídeos causam nas membranas e o grau de helicoidização induzida aos peptídeos, pelas membranas, como demonstrado na Figura 2.12. Peptídeos dos Grupos 0 e 1 se mantêm, em sua maioria, sem estrutura definida quando LUVs são adicionadas, ao passo que peptídeos dos Grupos 2 e 3 se estruturam em α -hélice, tanto com LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG. De fato, o primeiro componente principal, Prin 1, é linearmente correlacionado à porcentagem de helicoididade dos peptídeos na presença de LUVs de DMPC. Apesar da relação entre helicoididade e profundidade de inserção na membrana ser conhecida há bastante tempo, essa é a primeira vez que observamos uma ligação quantitativa entre esses dois parâmetros.

Após todas as análises anteriores, podemos avaliar os Grupos de peptídeos para extrair protótipos de propriedade físico-químicas que irão retroalimentar o programa Kamal para a predição de novas gerações de PAIs. A Figura 2.13 apresenta algumas propriedades físico-químicas dos peptídeos em função dos seus respectivos Grupos.

Existe uma sobreposição considerável das propriedades físico-químicas dos peptídeos antimicrobianos, representados pelos Grupos 2 e 3, com os peptídeos dos demais grupos que também se mostraram antimicrobianos. Mesmo assim, é possível observar algumas características distintas dos Grupos 2 e 3. Peptídeos do Grupo 2 são mais hidrofóbicos, e conseqüentemente, mais suscetíveis a agregação que os demais peptídeos (Figura 2.13, *Hyd* e *Aggregation*). Eles também são menores em tamanho (*Nr. Residue*) que os peptídeos do Grupo 3.

Considerando essas características teóricas e os dados experimentais aqui apresentados, é possível hipotetizar que o Grupo 2 é composto por peptídeos com sequências hidrofóbicas que se posicionam na superfície das membranas, e apresentam não mais de 50% de helicoididade na presença de membranas compostas apenas pelo fosfolipídeo zwitterônico DMPC (Figura 2.14). O peptídeo PS-2, isolado da secreção da pele do anfíbio *Phyllomedusa hypochondrialis*, é um AMP representativo desse Grupo.

Os peptídeos do Grupo 3 possuem cadeias polipeptídicas maiores (AMPs de 30 resíduos) que podem ser separados dos demais pela helicidade percentual predita pelo algoritmo GOR IV (Garnier et al., 1996). Peptídeos do Grupo 3 são moléculas capazes de perturbar a cadeia de hidrocarbonetos da face interna das membranas, se estruturam quase que em sua totalidade em segmentos de α -hélice em DMPC (Figura 2.14). O peptídeo DS01, isolado do anfíbio *Phyllomedusa oreades* (Brand et al., 2002) representa este Grupo.

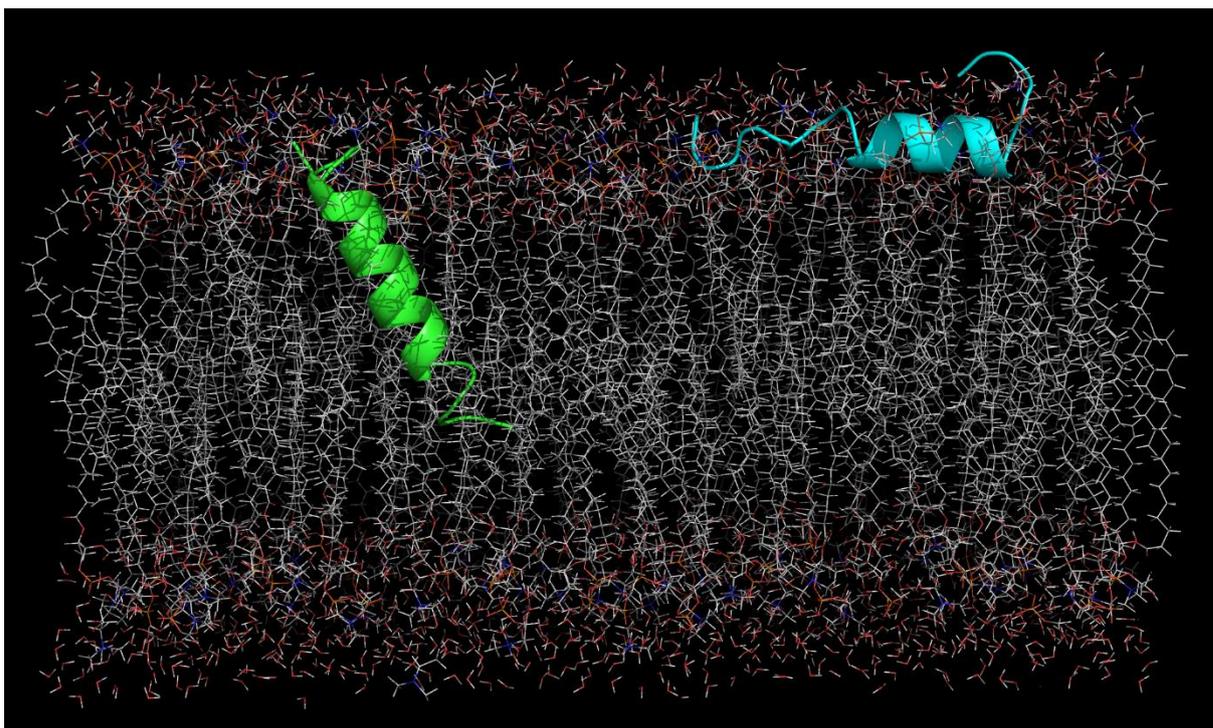


Figura 2.14. Representação da possível interação dos peptídeos PS-2 (Grupo 2, azul) e DS01 (Grupo 3, verde) com membranas compostas pelo fosfolípídeo zwitterônico DMPC. Hipotetiza-se que PS-2 apresente uma interação mais superficial com esse tipo de fosfolípídeo, e uma helicidade máxima em torno de 50%, ao passo que DS01 é capaz de penetrar mais profundamente na bicamada,

A geração dos novos PAIs e suas respectivas interações com membranas modelo permitiu a ampliação de um sistema de classificação promissor. Apesar dos avanços alcançados, não é possível apresentar uma relação direta entre nosso sistema de classificação e os mecanismos conhecidos de ação dos peptídeos antimicrobianos.

2.6. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O conjunto de atividades demonstrado pelos PAIs, logo em seu início, apresentou dois caminhos que pareciam óbvios: a aplicação agrícola e a possível aplicação na medicina humana. A intragenia, como demonstrada anteriormente (Brand et al., 2012), é uma tecnologia real e inventiva a transgenia. A possibilidade do uso de tais fragmentos para defesa da planta contra patógenos é algo desejável. A expressão constitutiva ou regulada desses PAIs pode ser pensada como forma de modular um sistema imune em plantas, complementar aquele naturalmente selecionado, o inato. Mas, ao discutirmos sobre a tecnologia intragênica, temos que levar em consideração também que a planta possui diversos microrganismos benéficos para seu desenvolvimento e biologia. A inibição do fungo *T. asperellum* (Tabela 1.07) pode ser indesejada devido ao benefício que indivíduos desse gênero podem trazer para diversas plantas, como promoção de crescimento, além do já destacado potencial como controle biológico (Vinale et al. 2008; Lorito et al., 2010). Devido à baixa seletividade de alguns PAIs, o estudo da inibição de microrganismos benéficos as plantas de interesse, é importante para o direcionamento da expressão dessas moléculas, evitando assim a expressão das mesmas em locais de interação com esses microrganismos.

Quanto à possível aplicação na medicina, os resultados apresentados pelos PAIs de *A. thaliana* são promissores e surpreendentes quando comparados com outros dados publicados (Vriens et al., 2015; Vriens et al., 2016). E suscitam a pergunta: Como os peptídeos mais ativos contra *C. albicans* (Tc02, Gr01 e Gr02) se comportariam com as demais espécies testadas? E com relação à inibição de biofilmes? Certamente questões para o futuro. Mas, também, não podemos deixar de ressaltar que a aplicação desses peptídeos seja algo fácil. Várias tentativas de utilizar AMPs como novos antibióticos já foram realizadas, visto que os mesmos apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana e não induzem facilmente resistência quando comparado com antibióticos convencionais (Perron et al., 2006). Entretanto, todos os testes são limitados a aplicações tópicas, pois os peptídeos que aparentam ter efeitos de toxicidade quase nulos *in vitro*, se mostram tóxicos quando aplicados na corrente sanguínea, apesar desse tema não ser bem documentado (Hancock & Sahl, 2006).

A segunda parte desse estudo permitiu demonstrar que os PAIs podem ser distinguidos de peptídeos com outras atividades interfaciais de membrana ao medir o efeito da transição de fase das vesículas de fosfolipídeos, criando uma ponte entre a atividade biofísica e a atividade biológica (Wimley, 2010). A expansão do modelo iniciado por Brand et al. (2012) permitirá a

avaliação da inclusão de novos parâmetros de filtragem, como uma análise de anfifilicidade, ou a propensão a formar hélice, de forma a obter um grupo cada vez mais seletivo e conciso de PAIs. O aumento do número de moléculas provavelmente permitirá expandir, aparecendo novos grupos de interação, gerando um modelo unificado que possa ser utilizado no futuro.

O potencial no genoma das plantas é enorme. Assim como a potencialidade do genoma de qualquer outro organismo. A ideia de gerar PAIs utilizando o genoma humano para o combate de infecções, sejam elas tóxicas ou sistêmicas, assim como buscar por PAIs no genoma do próprio patógeno, para que ele se apresentasse como antígeno e combatesse sua própria fonte, são possibilidades a serem exploradas. E elas parecem ser infinitas.

2.7. REFERÊNCIAS

- ALLENDE, D.; MCINTOSH, T. J. (2003) Lipopolysaccharides in bacterial membranes act like cholesterol in eukaryotic plasma membranes in providing protection against melittin-induced bilayer lysis. *Biochemistry*, 42: 1101-1108.
- BAHAR, A. A.; REN, D. (2013) Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6: 1543-1575.
- BLOM, T. S.; KOIVUSALO, M.; KUISMANEN, E.; KOSTIAINEN, R.; SOMERHARJU, P.; IKONEN, E. (2001) Mass spectrometric analysis reveals an increase in plasma membranepolyunsaturated phospholipid species upon cellular cholesterol loading. *Biochemistry*, 40: 14635-14644.
- BRAND, G. D. (2007) Estratégias para prospecção e predição de peptídeos bioativos. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília-DF. 217p.
- BRAND, G. D.; LEITE, J. R.; SILVA, L. P.; ALBUQUERQUE, S.; PRATES, M. V. et al. (2002) Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 49332-49340.
- BRAND, G. D.; MAGALHÃES, M. T. Q.; TINOCO, M. L. P.; ARAGÃO, F. J. L.; NICOLI, J.; KELLY, S. M.; et al. (2012) Probing protein sequences as sources for encrypted antimicrobial peptides. *PLoS One*, 7 :e45848.
- BRAND, G. D.; MAGALHÃES, M.T.Q.; TINOCO, M. L. P.; ARAGÃO, F. J. L.; NICOLI, J.; KELLY, S. M.; et al. (2012) Probing protein sequences as sources for encrypted antimicrobial peptides. *PLoS One*, 7: e45848.
- BROGDEN, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3: 238-250.
- CHEN, T.; ORR, D. F.; BJOURSON, A. J.; MCCLEAN, S.; O'ROURKE, M.; HIRST, D. G., RAO P.; SHAW, C. (2002) Novel bradykinins and their precursor cDNAs from European yellow-bellied toad (*Bombina variegata*) skin. *European Journal of Biochemistry*, 269: 4693-4700.
- CHEN, T.; SHAW, C. (2003) Cloning of the (Thr6)-phyllokinin precursor from *Phyllomedusa sauvagei* skin confirms a non-consensus tyrosine O-sulfation motif. *Peptides*, 24: 1123-1130.
- CHEN, Y. H.; YANG, J. T.; CHAU, K. H. (1974) Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry*, 13: 3350-3359.
- CONCHILLO-SOLÉ, O.; GROOT, N. S. DE; AVILÉS, F. X.; VENDRELL, J.; DAURA, X.; VENTURA, S. (2007) AGGREGSCAN: a server for the prediction and evaluation of “hot spots” of aggregation in polypeptides. *BMC – Bioinformatics*, 8: 65.
- DEMIDOVA-RICE, T. N.; GEEVARGHESE, A.; HERMAN, I. M. (2010) Bioactive peptides derived from vascular endothelial cell extracellular matrices promote microvascular

morphogenesis and wound healing in vitro. *Wound Repair Regen*, 19: 59-70.

DEMIDOVA-RICE, T. N.; WOLF, L.; DECKENBACK, J.; HAMBLIN, M. R.; HERMAN, I. M. (2012) Human platelet-rich plasma- and extracellular matrix-derived peptides promote impaired cutaneous wound healing in vivo. *PLoS One*, 7: e32146.

DI GRAZIA, A.; CAPPIELLO, F.; IMANISHI, A.; MASTROFRANCESCO, A.; PICARDO, M.; PAUS, R.; et al. (2015) The Frog Skin-Derived Antimicrobial Peptide Esculentin-1a(1-21)NH₂ Promotes the Migration of Human HaCaT Keratinocytes in an EGF Receptor-Dependent Manner: A Novel Promoter of Human Skin Wound Healing? *PLoS One*, 10: e0128663.

DORES, R. M.; LECAUDÉ, S.; BAUER, D.; DANIELSON, P. B. (2002) Analyzing the evolution of the opioid/orphanin gene family. *Mass Spectrometry Reviews*, 21: 220-43.

EPAND, R. M. (2007) Detecting the presence of membrane domains using DSC. *Biophysical Chemistry*, 126: 197-200.

EPAND, R. M.; STURTEVANT, J. M. (1981) A calorimetric study of peptide-phospholipid interactions: the glucagon-dimyristoylphosphatidylcholine complex. *Biochemistry*, 20: 4603-4606.

FISCHER, R.; FOTIN-MLECZEK, M.; HUFNAGEL, H.; BROCK, R. (2005) Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides. *Chembiochem*, 6: 2126-2142.

GARNIER, J.; GIBRAT, J. F.; ROBSON, B. (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymology*, 266: 540-553.

GENNIS, R. B. (1989) *Biomembranes: molecular structure and function*. Springer Verlag, New York.

HENRIQUES, S. T.; MELO, M. N.; CASTANHO, M. A. R. B. (2006) Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochemical Journal*, 399: 1-7.

HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24: 1551-1557.

HRISTOVA, K.; SELSTED, M. E.; WHITE, S. H. (1997) Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 24224-24233.

HUANG, C.; LI, S. (1999) Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1422: 273-307.

HUANG, H. W. (2006) Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758: 1292-1302.

JACOBSON, K.; DIETRICH, C. (1999) Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biology*, 9: 87-91.

JAIN, M. K.; WU, N. M. (1977) Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithinliposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer. *Journal Membrane Biology*, 34:157-201.

JARRETT, J. T.; BERGER, E. P.; LANSBURY, P. T. (1993) The carboxy terminus of the .beta. amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *American Chemical Society - Biochemistry*, 32: 4693-4697.

JIN, Y.; HAMMER, J.; PATE, M.; ZHANG, Y.; ZHU, F.; ZMUDA, E.; BLAZYK, J. (2005) Antimicrobial activities and structures of two linear cationic peptide families with various amphipathic beta-sheet and alpha-helical potentials. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49: 4957-4964.

KOYNOVA, R.; CAFFREY, M. (1998) Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376: 91-145.

LAST, N. B.; SCHLAMADINGER, D. E.; MIRANKER, A. D. (2013) A common landscape for membraneactive peptides. *Protein Science.*, 22: 870-882.

LEE, M. T.; CHEN F. Y.; HUANG, H. W. (2004) Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry*, 43: 3590-3599.

LORITO, M.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E.; MONTE, E. (2010) Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 395-417.

MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 112-124.

MEISEL, H.; BOCKELMANN, W. (1999) Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76: 207-215.

NEW, R. R. C. (1990) *Liposomes: a practical approach*. IRL press, Oxford.

PAPO, N.; SHAI, Y. (2003) Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides*, 24: 1693-1703.

PÄRN, K.; ERISTE, E.; LANGEL, Ü. (2015) The Antimicrobial and Antiviral Applications of Cell-Penetrating Peptides. *Methods Molecular Biology*, 1324: 223-245.

PATRYKAT, A.; FRIEDRICH, C. L.; ZHANG, L.; MENDOZA, V.; HANCOCK, R. E. (2002) Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 46: 605-614.

PERRON, G. G.; ZASLOFF, M.; BELL, G. (2006) Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc Biol Sci.*, 273: 251-256.

POPOVIC, S.; URBÁN, E.; LUKIC, M.; CONLON, J. M. (2012) Peptides with antimicrobial and anti-inflammatory activities that have therapeutic potential for treatment of acne vulgaris. *Peptides*, 34: 275-282.

PRENNER, E. J.; LEWIS, R. N.; KONDEJEWSKI, L. H.; HODGES R. S.; MCELHANEY, R. N. (1999). Differential scanning calorimetric study of the effect of the antimicrobial peptide gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine,

phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1417: 211-223.

RATHINAKUMAR, R.; WIMLEY, W. C. (2008) Biomolecular engineering by combinatorial design and highthroughput screening: small, soluble peptides that permeabilize membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 130: 9849-9858.

RAUSCH, J. M.; MARKS, J. R.; RATHINAKUMAR, R.; WIMLEY, W. C. (2007) Beta-sheet pore-forming peptides selected from a rational combinatorial library: mechanism of pore formation in lipid vesicles and activity in biological membranes. *Biochemistry*, 46: 12124-12139.

RAUSCH, J. M.; MARKS, J. R.; WIMLEY, W. C. (2005) Rational combinatorial design of pore-forming beta-sheet peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 10511-10515.

SCHRAMM, C. A.; HANNIGAN, B. T.; DONALD, J. E.; KEASAR, C.; SAVEN, J. G.; DEGRADO, W. F.; et al. (2012) Knowledge-based potential for positioning membrane-associated structures and assessing residue-specific energetic contributions. *Structure*, 20: 924-935.

SETO, G. W. J.; MARWAHA, S.; KOBEWKA, D. M.; LEWIS, R. N. A. H.; SEPAROVIC, F.; MCELHANEY, R. N. (2007) Interactions of the Australian tree frog antimicrobial peptides aurein 1.2, citropin 1.1 and maculatin 1.1 with lipid model membranes: differential scanning calorimetric and Fourier transform infrared spectroscopic studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768: 2787-2800.

SHAI, Y. (2002) Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 66: 236-48.

SIMONS, K.; IKONEN, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387: 569-572.

SIMONS, K.; SAMPAIO, J. L. (2011) Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3: a004697

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-731.

STEWART, J. C. (1980) Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 104:10-14.

STURTEVANT, J. M. (1982) A scanning calorimetric study of small molecule-lipid bilayer mixtures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79: 3963-3967.

TORRENT, M.; ANDREU, D.; NOGUÉS, V. M.; BOIX, E. (2011) Connecting peptide physicochemical and antimicrobial properties by a rational prediction model. *PLoS One*, 6: e16968.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55: 4-30.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LOREITO, M. (2008) Trichoderma–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1-10.

WADDELL, W. J. (1956) A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 48: 311-314.

WIMLEY, W. C. (2010) Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *American Chemical Society - Chemical Biology*, 5: 905-917.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance." *Pharmacological Reviews*, 55: 27-55.

ZASLOFF, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395.

ZHAO, G.; LONDON, E. (2006) An amino acid “transmembrane tendency” scale that approaches the theoretical limit to accuracy for prediction of transmembrane helices: relationship to biological hydrophobicity. *Protein Science*, 15: 1987-2001.

ANEXO I

Trabalhos publicados durante o período do doutoramento (2012-2016)

1. **Ramada, Marcelo Henrique Soller**; Steindorff, Andrei Stecca ; BLOCH, CARLOS ; Ulhoa, Cirano José . Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. *Proteomics (Weinheim. Print)*, v. 16, p. 477-490, 2016.
2. SOUZA, AMANDA ARAÚJO ; LEITÃO, VANESSA OLIVEIRA ; **Ramada, Marcelo Henrique** ; MEHDAD, AZADEH ; GEORG, RAPHAELA DE CASTRO ; ULHÔA, CIRANO JOSÉ ; FREITAS, SONIA MARIA DE . *Trichoderma harzianum* Produces a New Thermally Stable Acid Phosphatase, with Potential for Biotechnological Application. *Plos One*, v. 11, p. e0150455, 2016.
3. ALMEIDA, RICHARDSON A. ; GORDO, MARCELO ; SILVA, FELIPE M. A. DA ; ARAÚJO, RAFAEL C. DE ; **RAMADA, MARCELO H. S.** ; ABRÃO, FERNANDO Y. ; COSTA, TÚLIO O. G. ; KOOLEN, HECTOR H. F. ; SOUZA, AFONSO D. L. DE ; BLOCH JR., CARLOS . Cinerascetins, New Peptides from *Hypsiboas cinerascens* : MALDI LIFT-TOF-MS/MS *de novo* Sequence and Imaging Analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*, v. 26, p. 2290-2297, 2015.
4. Steindorff, Andrei Stecca ; **Ramada, Marcelo Henrique** ; COELHO, ALEXANDRE SIQUEIRA ; MILLER, ROBERT NEIL ; PAPPAS, GEORGIOS JOANNIS ; Ulhoa, Cirano José ; NORONHA, ELIANE FERREIRA . Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics*, v. 15, p. 204, 2014.
5. TROIAN, ROGÉRIO FRAGA ; Steindorff, Andrei Stecca ; **Ramada, Marcelo Henrique Soller** ; ARRUDA, WALQUIRIA ; Ulhoa, Cirano José . Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: evaluation of antagonism and expression of cell wall-degrading enzymes genes. *Biotechnology Letters*, v. 36, p. 2095-2101, 2014.
6. BRITO, JOÃO PC ; **RAMADA, MARCELO HS** ; DE MAGALHÃES, MARIANA TQ ; SILVA, LUCIANO P ; ULHOA, CIRANO J . Peptaibols from *Trichoderma asperellum* TR356 strain isolated from Brazilian soil. *SpringerPlus*, v. 3, p. 600, 2014.
7. FREITAS, RACHEL SILVEIRA ; Steindorff, Andrei Stecca ; **Ramada, Marcelo Henrique Soller** ; SIQUEIRA, SAULO JOSÉ LINHARES ; NORONHA, ELIANE FERREIRA ; Ulhoa, Cirano José . Cloning and characterization of a protein elicitor Sm1 gene from *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Letters*, p. 783-788, 2013.
8. da Silva Aires, Raquel ; Steindorff, Andrei Stecca ; **Ramada, Marcelo Henrique Soller** ; de Siqueira, Saulo José Linhares ; Ulhoa, Cirano José . Biochemical characterization of a 27kDa 1,3-β-d-glucanase from *Trichoderma asperellum* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 1219-1223, 2012.