



UnB

**Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química**

TESE DE DOUTORADO

**Síntese e determinação da estrutura de peptídeos
antimicrobianos intragênicos de proteínas humanas**

MICHELE AVILA DOS SANTOS

Orientadora: Prof. Dra. ALINE LIMA DE OLIVEIRA PATERNO

Coorientador: Prof. Dr. GUILHERME DOTTO BRAND

Brasília, DF

2022

**À minha família por todo amor, carinho,
apoio e incentivo que dedicaram
incondicionalmente a mim.**

Agradecimento

A Deus por me conceder oportunidades de superar minhas limitações e de alcançar meus sonhos.

À minha família pelo amor e carinho incondicionais, em especial, ao meu esposo por me incentivar e acreditar na minha capacidade. Aos meus pais e a minha irmã por me apoiarem em todos os momentos. A rede de apoio deles foi fundamental nessa jornada.

À minha orientadora profa. Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno pela amizade, compreensão, paciência, dedicação e por tudo que me ensinou durante este período.

Ao meu coorientador prof. Dr. Guilherme Dotto Brand pela disponibilidade, paciência e pela fundamental colaboração científica no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório pelos momentos de descontração, pelas discussões e pelos incentivos: Thaíssa, Felipe, Júlia, Fernanda, Gisele, Gabi, Verônica, Kadu, Thiago. Aos meus amigos Jéssica, Wanessa e Nilton pela amizade e pelo apoio ao longo dos anos. Aos amigos que fiz na UnB durante esse período, aos amigos e colegas de trabalho por toda a motivação e pela fé depositada em mim.

Aos prof. Doutores Maria José e Leonardo Paterno que me deram base durante o mestrado para percorrer essa jornada.

Ao colega Luís de Sá por me ensinar a síntese na prática, ao colega Luiz Eduardo pela ajuda nos momentos difíceis com o RMN, ao colega Éder pelos espectros de EM.

Ao prof. Dr. José Roberto Leite e aos colegas de laboratório do NUPMIA, em especial, a Andreanne e a Wanessa que colaboraram com os experimentos de MTT e CLAE.

Ao prof. Dr. Marcelo Ramada da Universidade Católica de Brasília, e a sua aluna MSC Bianca pela colaboração nos testes antimicrobianos.

Ao prof. Dr. Carlos Bloch da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por permitir o uso das instalações, e, em especial, ao Dr. José Cardoso pelo auxílio nos experimentos de CD realizados na Embrapa.

Aos prof. Doutores Aisel e Sônia Freitas pela colaboração nos ensaios de DLS e ITC.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, UFPI, em especial a Aline pela colaboração nas análises de AFM.

Ao IQ-UnB pela infraestrutura e suporte proporcionados.

À CAPES, uma vez que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001. E a outros órgãos de fomento à pesquisa como o CNPq e FAPDF que também forneceram auxílio financeiro.

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

Sumário

Índice de Figura	VIII
Índice de tabelas	XI
Lista de Abreviatura	XII
Resumo.....	XIII
Abstract	XIV
Introdução.....	1
1. Referencial Teórico	3
1.1. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)	3
1.2. Classes estruturais de PAMs.....	5
1.3. Peptídeos Curtos	6
1.4. Peptídeos intragênicos antimicrobianos (IAPs).....	8
1.5. Prospecção de Novos IAPs	8
1.6. Peptídeo Intragênico Antimicrobiano Hs02	11
1.7. Mecanismo de ação dos PAMs.....	11
1.8. Interação de peptídeos com meios miméticos de membrana.....	15
1.9. Estrutura de peptídeos <i>versus</i> atividade antimicrobiana	18
1.10. O uso do RMN na determinação de estruturas peptídicas	21
2. Objetivos	23
3. Metodologia	23
3.1. Determinação da estrutura do peptídeo Hs02 em DPC- <i>d</i> ₃₈ por RMN	23
3.2. Seleção de potenciais peptídeos antimicrobianos intragênicos (IAP)	24
3.2.1. Seleção de potenciais IAPs com estrutura do tipo α -hélice.....	24
3.2.2. Seleção de potencial IAP com estrutura do tipo folha- β	25
3.3. Síntese dos peptídeos	25
3.4. Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	28
3.5. Confirmação do peptídeo por Espectrometria de Massa	29
3.6. Quantificação dos peptídeos.....	29
3.7. Avaliação da concentração mínima inibitória dos peptídeos	30
3.8. Ensaio de Viabilidade celular – MTT.....	31
3.9. Teste de sinergismo.....	32
3.10. Dicroísmo Circular (CD)	33
3.11. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	34
3.12. Espalhamento de Luz (DLS)	34
3.13. Microscopia de Força Atômica (AFM)	35
3.14. Determinação da estrutura por RMN em LPS.....	36

4.	Resultados e Discussão	37
4.1.	Estrutura do peptídeo Hs02 por RMN.....	37
4.2.	Seleção de potenciais IAPs	46
4.2.1.	Seleção de potenciais IAPs com estrutura do tipo α -hélice.....	46
4.2.2.	Seleção de um potencial IAP curto do tipo folha- β	50
4.3.	Síntese, purificação e confirmação dos peptídeos sintetizados	51
4.4.	Avaliação da concentração inibitória mínima dos IAPs.....	56
4.5.	Ensaio de viabilidade celular – MTT	60
4.6.	Teste de sinergismo.....	61
4.7.	Dicroísmo Circular (CD)	62
4.8.	Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	69
4.9.	Espalhamento de Luz (DLS)	71
4.10.	Avaliação da morfologia de células de <i>E.coli</i> tratadas com Hs10 por microscopia de força atômica (AFM).....	73
4.11.	Determinação da estrutura do Hs10 por RMN	74
5.	Conclusões.....	79
6.	Referências bibliográficas	82
	Anexo A	89
	Anexo B	91
	Anexo C	94
	Anexo D	95
	Anexo E.....	98
	Anexo F.....	101
	Anexo G	102
	Anexo H	103

Índice de Figura

- Figura 1. Peptídeos representando as principais estruturas secundárias: α -hélice (LL-37 e Lactoferrina Humana), folha- β (β -defensina Humana), desordenada (Indolicidina). Adaptada de Mahlapuu *et al.*¹ 5
- Figura 2. Parede celular de bactérias. (a,b) diagramas das paredes celulares de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. A foto ao centro mostra células de *S. aureus* (roxas, Gram-positiva) e *E. coli* (rosa, Gram-negativa). (c,d) Micrografias eletrônica de transmissão mostrando a parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (e,f) micrografias eletrônica de varredura de Gram-positiva e Gram-negativas. Adaptado da referência 40.⁴⁰ 12
- Figura 3. Ilustração esquemática dos modelos de permeabilização de membrana por PAMs. Adaptada de Mahlapuu *et al.*¹ 13
- Figura 4. Ilustração de mecanismos de ação: em (a) modelo eletroporação, no qual forma-se um poro quando a diferença de potencial entre a membrana e o peptídeo atinge 0,2 V; em (b) modelo *sinking raft*, no qual há a formação de um poro transitório induzido por um desequilíbrio de massa decorrente da interação preferencial do peptídeo com certos domínios lipídicos; e em (c) modelo de segregação lipídica em que há um agrupamento de lipídios aniônicos (vermelho) em domínios peptídeo-lipídio separados e a segregação de lipídios zwitteriônicos (amarelo) ocorrem como consequência da ligação do peptídeo antimicrobiano, causando um rearranjo de lipídios na membrana. Adaptado de Teixeira *et al.*⁴¹ 14
- Figura 5. Representação da em (a) da estrutura da geral de LPS de enterobactérias Gram-negativas, que consistem no lipídeo A, uma região nuclear de oligossacarídeo e antígeno O (Abreviaturas de resíduos de monossacarídeos: GlcN, glucosamina; Kdo, '2-ceto-3-ácido desoxioctulosônico' (ácido 3-desoxi-D-mano-octulosônico), adaptado da referência 46; Hep, D-glicero-D-mano-heptose); em (b) Estrutura do LPS gerada a partir da estrutura de cocristal de LPS e FhuA (código de acesso pdb: 1QFG) adaptado de Ghosh *et al.*⁴⁷ 17
- Figura 6. Ilustração dos fatores que podem afetar a estrutura helicoidal de peptídeos. Adaptado de Tossi *et al.*¹⁸ 19
- Figura 7. A proporção de lipídios aniônicos nas vesículas é aumentada de cima para baixo. O comportamento do peptídeo original SB056-lin é representado no lado esquerdo e o β -SB056-lin com sequência otimizada no lado direito. Setas pretas de comprimento diferente e espessura é usada para indicar os diferentes equilíbrios de ligação. O SB056-lin se liga apenas a bicamadas aniônicas e em uma conformação em cadeia β não tão bem ordenada. A sequência β -SB056-lin otimizada, por outro lado, forma cordões β regulares que se auto-montam em folhas- β estendidas quando a carga negativa da bicamada excede a eletro-neutralidade do sistema peptídeo-lipídeo. (adaptado de Manzo *et al.*⁴⁹) 20
- Figura 8. Desenho esquematizado da placa com a combinações de peptídeos testadas no ensaio de sinergismo. 33
- Figura 9. Esquema do experimento para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do peptídeo. CT – Concentração teórica do peptídeo, CEP – Controle de esterilidade do peptídeo, TEC - Teste em triplicata contra *Escherichia coli*, CCEC – Controle de crescimento de *Escherichia coli*, CEM – controle de esterilidade do meio de cultura. 35
- Figura 10. Região NH-H α do espectro de ¹H-¹H TOCSY do IAP Hs02 (2 mM) na presença de 50 mM de DPC-*d*₃₈ a 25 ° C e pH 7. 38

Figura 11. Região NH-H α dos espectros de ^1H - ^1H TOCSY (azul) e ^1H - ^1H NOESY (roxo) sobrepostos, obtidos para 2 mM do peptídeo Hs02 na presença de 50 mM de DPC- d_{38} a 25 ° C e pH 7.....	39
Figura 12. Região NH-NH do espectro de ^1H - ^1H NOESY, obtido para 2 mM do peptídeo Hs02 na presença de 50 mM de DPC- d_{38} a 25 ° C e pH 7.....	40
Figura 13. Padrão de conectividades NOE de ^1H sequenciais e de médias distância e padrão de CSI de H α para 2 mM do peptídeo Hs02 na presença de 50 mM de DPC- d_{38} a 25 ° C e pH 7. A espessura da barra indica as intensidades dos NOEs.	43
Figura 14. a) Representação em fita da estrutura de menor energia (esquerda) e sobreposição da cadeia principal das 10 estruturas de menor energia do peptídeo HS02 (direita) na presença de micelas DPC-d38. b) Superfície hidrofóbica característica do peptídeo HS02. As propriedades dos aminoácidos da cadeia lateral são mostradas de acordo com o seguinte código de cores: vermelho para os resíduos carregados positivamente, ciano para os resíduos polares e verde para os resíduos hidrofóbicos. A estrutura do lado direito mostra a molécula girada 180 ° em torno do eixo vertical (PDB: 6MBM).....	44
Figura 15. Representação da roda helicoidal dos H05, H06, H07, H08 e H09, sugerindo uma possível estrutura anfifílica. Em verde os resíduos apolares, em azul claro polares, em azul escuro carregados negativamente e em vermelho carregados positivamente.	49
Figura 16. Propriedades físico-químicas fornecidas pelo Kamal do Hs10 em (a), e a estrutura desse fragmento em sua proteína fonte.	50
Figura 17. Espectro EM da fragmentação do íon (a) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 2409,514$ Da do peptídeo H05 e (b) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1867,194$ Da do peptídeo H06 obtidos por MALDI-TOF/TOF.	53
Figura 18. Espectro EM da fragmentação do íon (a) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1761,174$ Da do peptídeo H07 e (b) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1919,165$ Da do peptídeo H08 obtidos por MALDI-TOF/TOF.	54
Figura 19. Espectro EM da fragmentação do íon (a) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1643,003$ Da do peptídeo H09 e (b) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1090,789$ Da do peptídeo Hs10 obtidos por MALDI-TOF/TOF.....	55
Figura 20. Redução do MTT para formação dos cristais de formazan. ⁸⁰	60
Figura 21. Efeito do peptídeo Hs10 em células do tipo fibroblasto humano (Detroit 551) após exposição por (A) 24 e (B) 48 horas. Os valores foram expressos como médias \pm EPM . ** $p < 0.01$ e **** $p < 0.0001$ versus grupo de controle (DMEM).	61
Figura 22. Espectro de CD do peptídeo Hs10 (40 μM) (a) em diferentes concentrações de DMPC e (b) em diferentes concentrações de 2:1 DMPC:DMPG em tampão PBS pH 7,4.....	64
Figura 23. Espectro de CD do peptídeo Hs10 (40 μM) em (a) na presença de SDS (2000 μM) em diferentes pH e em (b) em diferentes concentrações de LPS em tampão PBS pH 7,4.....	66
Figura 24. Espectro CD em (a) dos peptídeos projetados por Ong et al ¹⁴ na presença de SDS e em (b) do PaDBS1R6F10 estudado de Cândido et. al ³⁰ em ambientes hidrofóbicos e hidrofílicos. 68	
Figura 25. Perfil Calorimétrico de titulação isotérmica (ITC) para Hs10. O painel superior mostra o calor exotérmico de reação vs. tempo (minuto), a primeira titulação corresponde ao ensaio controle e a segunda a interação de Hs10 com LPS. O painel inferior mostra a mudança de entalpia por mol de injeção de LPS (1,96 mg/mL) em solução Hs10 (4 μM) em tampão PBS.	70
Figura 26. Gráfico do tamanho médio dos agregados de LPS na presença de diferentes quantidades de HS 10 (razão mol: mol), em que * corresponde a $p < 0.05$ e *** a $p < 0.001$	72

Figura 27. Imagens AFM de *Escherichia coli* ATCC 25922 (10 μm x 10 μm). (A) *E. coli* não tratada (controle); (B) *E. coli* após tratamento com peptídeo Hs10 em concentração sub-MIC (14,3 μM); (C) Perfil ao longo da linha pontilhada branca de *E. coli* não tratada (acima) e tratada (abaixo); (D) *E. coli* agregada após tratamento com Hs10 em concentração sub-MIC (14,3 μM). A seta branca mostra o vazamento de fluido citoplasmático da bactéria 73

Figura 28. Região NH-H α do TOCSY 1H-1H de 1 mM de Hs10 puro (ciano) sobrepondo-se ao TOCSY 1H-1H de Hs10 com LPS 10 μM (azul), a 25 ° C..... 74

Figura 29. Região NH-H α do 1H-1H NOESY de 1 mM de Hs10 com 10 μM de LPS a 25 °C. 75

Figura 30. Representação em fita de (a) alinhamento do backbone e (b) estrutura de menor energia e (c) característica anfifílica da superfície das 10 estruturas de menor energia de Hs10 na presença de LPS. As propriedades dos aminoácidos são mostradas no seguinte código de cores: vermelho para os carregados positivamente, azul claro para os carregados negativamente, marinho para os resíduos polares e verde para os resíduos hidrofóbicos. 77

Índice de tabelas

Tabela 1. Exemplos de PAMs e suas respectivas fontes. ²³	3
Tabela 2. Microrganismos utilizados para o teste inicial de concentração inibitória mínima.....	30
Tabela 3. Microrganismos utilizados para testar os peptídeos que apresentassem atividade no teste preliminar de concentração inibitória mínima.....	31
Tabela 4. Concentrações e razão molar de lipídeos e de peptídeo utilizada nos experimentos de CD.	34
Tabela 5. Valores de deslocamento químico de ¹ H (ppm) dos resíduos de aminoácido do peptídeo Hs02 (2 mM) em solução com DPC-d ₃₈ (50 mM) a 25 °C e pH 7.	41
Tabela 6. Estatística estrutural par as 10 melhores estruturas de RMN do peptídeo Hs02 na presença de DPC-d ₃₈ a 25 ° C e pH 7.....	45
Tabela 7. Relação de potenciais IAPs selecionados nesse trabalho utilizando-se o software Kamal.	47
Tabela 8. Dados de propriedades físico-químicas fornecidos pelo KAMAL.....	47
Tabela 9. Comparação da massa calculada com a massa obtida por EM.....	52
Tabela 10. Resultado do teste Concentração Inibitória Mínima em bactérias.	56
Tabela 11. Resultado do teste de Concentração Inibitória Mínima em fungos.....	57
Tabela 12. Resultado do teste de Concentração Inibitória Mínima do peptídeo Hs10 frente a diversas cepas de Bactérias.	58
Tabela 13. Dados de CIM para os PAMs projetados por Ong <i>et al.</i> ¹⁴	59
Tabela 14. Dados obtidos por ITC para os PAMs Esc(1–21), Esc(1–21)1C e Hs10.	71
Tabela 15. Valores de deslocamento químico de ¹ H (ppm) dos resíduos de aminoácido do peptídeo Hs10 (1 mM) em solução com LPS (10 μM) a 25 °C.	75
Tabela 16. Estatística estrutural para as 10 estruturas de menor energia do IAP Hs10 na presença de LPS a 25 ° C.	78

Lista de Abreviatura

ACN: Acetonitrila
APD: *Antimicrobial Peptide Database*
BMRB: *Biological Magnetic Data Bank*
CD: Dicroísmo circular
CIM: Concentração Mínima Inibitória
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
CSI: *Chemical Shift Index*
DCM: Diclorometano
DIC: *N,N'*-diisopropilcarbodiimina
DIPEA: *N,N'*-diisopropiletilamina
DMF: *N,N*-dimetilformamida
DMPC: 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DMPG: 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-glicerol
DMSO: Dimetilsulfóxido
DPC-*d*₃₈: Dodecilfosfocolina
EM: Espectrometria de Massa
EPM: Erro padrão da média
FICI: Índice de Concentração Inibitória Fracionada
Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonil
HBTU: 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofatato
IAPs: Peptídeos Antimicrobianos Intragênicos
IC50: Metade do efeito inibitório máximo
ITC: Calorimetria de titulação isotérmica
LDL: *Low Density Lipoprotein*
LPS: Lipopolissacarídeo
LUVs: vesículas grandes unilamelares
M_H: momento hidrofóbico
MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NOE: *Nuclear Overhauser Effect*
NOESY: *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
Oxyma: acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino)
PAMs: Peptídeos antimicrobianos
PBS: Tampão Fosfato
PC: Fosfatidilcolina
PG: Fosfatidilglicerol
PMB: polimixina B
POPC: 1-Palmitoil-2-oleoil-glicerol-3-fosfocolina
POPE: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina
POPG: 1-Palmitoil-2-Oleoil-*sn*-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)]
RMN: Ressonância Magnética Nuclear
RMSD: Root Mean Square deviation
SPFS: Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
TFA: ácido trifluoroacético
TMSP-*d*₄: 2,2,3,3-*d*₄-3-trimetilsililpropionato de sódio
TOCL: 1',3'-bis[1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo]-glicerol.
TOCSY: Total Correlation Spectroscopy
TrNOE: *transferred nuclear Overhauser effect*

Resumo

O aumento da resistência aos antibióticos tem motivado a busca por novos fármacos com atividade antimicrobiana. Peptídeos são considerados uma alternativa promissora em virtude das vantagens inerentes a eles, como ação contra diversos microrganismos e a possibilidade de sinergismo com outros compostos. Estudos recentes mostram que determinadas sequências de aminoácidos encriptadas em proteínas, quando isoladas, podem apresentar atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, que não manifestavam enquanto parte estrutural das proteínas precursoras. Assim, este trabalho tem como objetivo prospectar, caracterizar e determinar a estrutura tridimensional (3D) de peptídeos intragênicos com ação antimicrobiana e baixa citotoxicidade. Inicialmente, o peptídeo Hs02, oriundo de uma proteína humana, que teve sua atividade antimicrobiana comprovada em estudos anteriores, foi submetido à Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a determinação da sua estrutura 3D. Por meio dos experimentos 2D ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^1H NOESY foi possível verificar que, na presença de micelas de DPC- d_{38} , o peptídeo Hs02 adquire uma estrutura helicoidal anfipática bem definida entre os resíduos 3 e 14, com uma face polar composta por resíduos carregados positivamente. Foi observada ainda flexibilidade estrutural na porção *N*-terminal, especialmente na cadeia lateral do Triptofano 2, que pode estar interagindo com a membrana microbiana por meio de interações do tipo cátion- π . Como proteínas humanas demonstraram ser uma boa fonte de fragmentos bioativos, cerca de 80 proteínas superexpressas no organismo humano durante infecções foram analisadas com o auxílio do programa Kamal - desenvolvido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - com o intuito de encontrar sequências de aminoácidos com características físico-químicas semelhantes as observadas em peptídeos antimicrobianos (PAMs). Foram selecionados 5 peptídeos, com possível estrutura em α -hélice (H05, H06, H07, H08 e H09) para síntese em fase sólida e purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Esses peptídeos tiveram sua identidade confirmada por Espectrometria de Massa (EM) e foram submetidos a ensaios antimicrobianos. Entretanto, não apresentaram atividade antimicrobiana na faixa de concentração avaliada. Em seguida, a metodologia de prospecção foi adaptada para buscar peptídeos curtos similares a estruturas folha- β . O fragmento encontrado, denominado Hs10, demonstrou ser uma alternativa promissora, visto que apresenta atividade antimicrobiana, baixa citotoxicidade e é composto por apenas 9 resíduos de aminoácidos. Além disso, ensaios de Dicroísmo Circular (CD), Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC), Espalhamento de Luz (DLS) indicaram que o lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas está intimamente ligado ao mecanismo de ação do Hs10, e que a interação entre essas moléculas se dá principalmente por interações eletrostáticas. Estudos conformacionais por CD sugerem ainda que na presença de membranas biomiméticas aniônicas, as moléculas de Hs10 se organizam de maneira a formar uma estrutura anfipática similar a uma folha- β . Por fim, estudos realizados por meio da técnica de RMN indicam que o Hs10 tende a se estruturar na presença de uma pequena concentração de LPS, resultando em uma família de estruturas convergentes.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos intragênicos, Kamal, lipopolissacarídeo, estrutura, RMN.

Abstract

The increase of the antibiotic resistance has motivated the exploration of new drugs with antimicrobial activity. Peptides have been considered as a promising alternative for that because of their inherent advantages, such as action against various microorganisms and possibility of synergism with other compounds. Recent studies have shown that certain amino acid sequences encoded in proteins can exhibit new properties, such as antimicrobial activity, which is not displayed by the precursor protein. Thus, this work aims to prospect, characterize and determine the 3D structure of intragenic peptides with antimicrobial action and low toxicity. Initially, the Hs02, a peptide from human protein, which had its antimicrobial activity proven in previous studies, was evaluated by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) with the aim to determine its structure. The 2D ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^1H NOESY experiments verified that Hs02 forms a well-defined amphiphilic helical structure between residues 3 and 14 in the presence of DPC- d_{38} biomimetic membranes. Moreover, its polar face is composed predominantly by positively charged residues. The structural flexibility was also observed in the *N*-terminal portion, especially in the Tryptophan 2 sidechain residue, which may provide a cation- π interaction between this peptide and the microbial membrane. As human proteins proved to be a good source of bioactive fragments, nearby 80 proteins overexpressed in human body during viral infections were analyzed by the Kamal software - developed at Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- in an attempt to find amino acid sequences with physicochemical characteristics similar to those observed in antimicrobial peptides (AMPs). Five peptides (H05, H06, H07, H08 and H09), with possible α -helix structure, were selected to solid phase synthesis and HPLC purification. These peptides were subjected to antibacterial and antifungal tests. However, they did not show antimicrobial activity. Then, the prospecting methodology was adapted to search for short IAPs similar to β -sheet structures. The peptide found, called Hs10, proved to be a promising alternative, since it has antimicrobial activity, low cytotoxicity and is composed of only 9 amino acid residues. Furthermore, assays of Circular Dichroism (CD), Isothermal Titration Calorimetry (ITC), Light Scattering (DLS) indicated that lipopolysaccharide (LPS) present in the outer membrane of Gram-negative bacteria is closely linked to the mechanism of action of this IAP. Structural studies by CD also suggest that in the presence of anionic biomimetic membranes, Hs10 molecules organize themselves to form an amphipathic structure similar to a β -sheet. Finally, studies carried out using the NMR technique indicate that Hs10 tends to structure itself in the presence of small concentrations of LPS, resulting in a family of convergent structures.

Keywords: antimicrobial intragenic peptides, lipopolysaccharide, Kamal, NMR, structure.

Introdução

Nos últimos anos, diversos patógenos tem desenvolvido resistência a antibióticos, o que reforça a necessidade pela busca por novos compostos para o tratamento de microrganismos resistentes. Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm sido considerados uma alternativa promissora aos antibióticos convencionais por apresentarem atuação contra bactérias, leveduras, fungos e/ou vírus, alta eficácia, potencial sinérgico com outras drogas.¹⁻⁴ Com isso, pesquisas têm sido desenvolvidas para identificar PAMs potentes e menos tóxicos.²

Alguns destes estudos têm demonstrado que determinadas sequências de aminoácidos encriptadas em proteínas, quando isoladas, podem apresentar alguma propriedade que não exibiam quando integravam a proteína precursora. Esses fragmentos internos bioativos que apresentam atividade antimicrobiana foram denominados Peptídeos Antimicrobianos Intragênicos (IAPs) e podem ser encontrados em diversas proteínas independentemente de sua estrutura e função nos organismos hospedeiros.⁵⁻⁸

A estratégia desenvolvida para localizar novos IAPs baseia-se na busca por sequências de aminoácidos encriptadas que apresentem propriedade físico-químicas semelhante às propriedades observadas em PAMs conhecidos.⁵⁻⁸ As propriedades físico-químicas norteiam essa metodologia de prospecção de IAPs por estarem intimamente ligadas aos mecanismos de ação dos PAMs.⁵⁻⁸ Ademais, modulando essas características, é possível potencializar a atividade dessas biomoléculas.²

Essa busca por fragmentos potencialmente ativos em grandes bancos de dados de proteínas pode ser feita com o auxílio do *software* Kamal, desenvolvido no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia.⁵⁻⁹ A varredura realizada por esse programa resulta em uma lista de possíveis IAPs, os quais podem ser sintetizados em laboratório por meio da síntese química de peptídeos em fase sólida (SPFS),¹⁰ e posteriormente testados para confirmar sua atividade. Essa metodologia tem se mostrado eficiente na descoberta de IAPs do tipo α -hélices, uma vez que tem permitido encontrar biocompostos com potência e seletividade similar e até mesmo superior aos PAMs convencionais conhecidos.⁷ Cabe ressaltar que os trabalhos nessa área tem focado na busca por peptídeos catiônicos que apresentem estruturas de α -hélices anfipáticas bem definidas na presença de membranas microbianas. Um exemplo disto, é o peptídeo Hs02, fragmento prospectado *in silico* da proteína humana miosina

não convencional- β , que demonstrou apresentar atividade antimicrobiana.¹¹ Outro fragmento do tipo α -hélice identificado *in silico* que apresentou atividade antimicrobiana foi o Hs05, oriundo da proteína humana RNA citidina acetiltransferase.¹²

Entretanto, a bioatividade não é uma característica exclusiva de estruturas α -hélices. Peptídeos do tipo folhas- β e até mesmo peptídeos compostos por cerca de 12 resíduos de aminoácidos com uma estrutura diferente do padrão esperado para folha- β ou α -hélices, também podem se organizar para formar uma conformação anfipática bem definida e, então, interagir efetivamente com membranas microbianas.^{2,13,14} Alguns autores têm evidenciado a eficiência de peptídeos que adotam conformações diferente de α -hélices regulares no combate de vários patógenos, inclusive contra microrganismos multirresistentes.¹⁵⁻¹⁷ Desse modo, a atividade antimicrobiana de peptídeos tem sido intimamente relacionada a formação de uma estrutura anfipática bem definida na presença de membranas microbianas. Portanto, conhecer a estrutura de IAPs é essencial para compreender seu mecanismo de ação.¹⁸

Uma técnica que é amplamente utilizada para a elucidação estrutural de peptídeos em ambientes de membranas miméticas é a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Para isso, são empregados essencialmente experimentos bidimensionais como TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) e NOESY (*Nuclear Overhauser Spectroscopy*). O emprego em conjunto desses experimentos permite obter detalhes estruturais destas biomoléculas por meio de interações via ligação química, através de acoplamentos escalares, e pelo espaço, através de acoplamentos dipolares.¹⁹

Este trabalho tem o intuito de auxiliar na consolidação e no aprofundamento da busca de peptídeos intragênicos com atividade antimicrobiana, estudo que tem sido desenvolvido ao longo dos últimos anos em nosso grupo de pesquisa. Para isso, foram realizadas contribuições a trabalhos em andamento e foram propostas novas perspectivas ao projeto. Inicialmente, foi realizado o estudo da estrutura 3D do peptídeo Hs02, IAP prospectado *in silico* de uma proteína humana, por RMN com o intuito de colaborar com uma prova de conceito, que demonstrou que proteínas humanas são uma fonte potencial de biocompostos com atividade antimicrobiana. Em seguida, foi proposto explorar o potencial de proteínas humanas na busca por novas biomoléculas com estrutura do tipo α -hélice. Por fim, foi adaptada a metodologia utilizada na prospecção *in silico* de IAPs

α -hélice, para prospectar IAPs curtos, de no máximo 11 resíduos, similar a estruturas folha- β .

1. Referencial Teórico

1.1. Peptídeos antimicrobianos (PAMs)

Peptídeos são biomoléculas pequenas formadas pela união de aminoácidos por meio de ligações covalentes denominadas ligações peptídicas. Eles podem ser produzidos naturalmente por diversos organismos vivos ou sintetizados artificialmente em laboratório. Os peptídeos de ocorrência natural podem apresentar importantes efeitos biológicos em decorrência da sua atuação em funções fisiológicas e bioquímicas. Um exemplo disto é a bradicinina, um peptídeo de nove resíduos, que possui atividade vasodilatadora e é mediadora do processo inflamatório.²⁰ Dentre as inúmeras atividades desempenhadas por essas biomoléculas, há um crescente interesse nos peptídeos que desempenham atividade antimicrobiana.¹

Os PAMs são oligopeptídeos com atividades contra bactérias, leveduras, fungos e/ou vírus. Além disso, alguns podem apresentar ainda atividade citotóxica em células cancerígenas, atividades anti-inflamatórias e imunomoduladoras.^{1,3,21} Eles podem ser encontrados em todas as formas de vida.²² Em geral, eles são expressos pelo hospedeiro para combater diretamente patógenos invasores ou estimular a resposta imune, modulando o sistema de defesa.²² A Tabela 1 relaciona alguns PAMs com suas fontes naturais.²³

Tabela 1. Exemplos de PAMs e suas respectivas fontes.²³

Fontes de PAM	PAM
Mamíferos	Defensina, Histadina, Indolicina, lactoferricina, LL-37
Anfíbios	Brevinina-20 ^a , Distinctina, Nigrocina 1 & 2, Tigerin
Peixes	Pardaxinas, Pleurocidinas; Parasina
Plantas	Defensinas de plantas, Thioninas
Insetos	Abaecin, Cecropina A, Coleoptericina, Defensina A
Crustáceos	Arasina, astacidina 2, crustina
Fungos	Aculeacinas, Aureobasidina, Equinocandinas
Bactérias	Bacillomycin, Iturin, Nikkomycins

Atualmente, no banco de dados *Antimicrobial Peptide Database (APD)*,^{21,24} existem cerca de 3.324 PAMs catalogados, dos quais 84,06% tem atividade antibacteriana; 36,9% antifúngica; 7,79% anticâncer; 5,86% antiviral; 3,28% anti-HIV; 2,11% antibiofilme; e os demais se dividem entre outras atividades como antiprotista, anti-inflamatória, promoção de cicatrização de feridas. Ainda, de acordo com as estatísticas do APD, esses PAMs são compostos em média por cerca de 33 resíduos de aminoácidos. Apesar da composição de resíduos de aminoácidos e do número dos resíduos variarem, estas biomoléculas possuem algumas características semelhantes.^{21,24} Em geral, PAMs são catiônicos em pH fisiológico, possuem certa hidrofobicidade e natureza anfipática.^{1,3,22} Estas propriedades são consideradas essenciais para sua atuação e seletividade.

Uma carga líquida positiva, por exemplo, permite interação eletrostática com a membrana celular do patógeno, geralmente, rica em grupos aniônicos. Além disso, promove uma certa seletividade com relação a membranas celulares de mamíferos, uma vez que estas são neutras. A hidrofobicidade, por sua vez, contribui para a penetração celular e, conseqüentemente, indução da lise da membrana.^{1,3,22} Enquanto que, a anfifilicidade pode ser relacionada a estrutura secundária adotada pelo peptídeo, que é capaz de influenciar diretamente no mecanismo e na citotoxicidade dos PAMs.³

Assim, os PAMs podem atuar contra diversas cepas de bactérias e outros microorganismos, além de apresentarem alta eficiência, potencial sinérgico com outras drogas.^{3,22,25} Esses fatores, associados com o rápido desenvolvimento de resistência aos antibióticos convencionais em todo o mundo, torna estas biomoléculas promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos. Cabe destacar que nos últimos anos, o número de PAMs isolados e caracterizados tem aumentado e alguns medicamentos de uso clínico já são produzidos a partir de PAMs como é o caso dos antibióticos bacitracina, colistina, polimixina B, daptomicina, vancomicina, gramicidina e o antiviral enfuvirtide.^{26,27}

No entanto, PAMs também apresentam algumas desvantagens como suscetibilidade à proteólise, o alto custo de produção e a toxicidade.²⁸ Por isso, pesquisas têm sido desenvolvidas para mitigar esses problemas. Uma alternativa para reduzir a proteólise, por exemplo, é a amidação da porção C-terminal, entre outras modificações químicas. Já a redução dos custos de produção pode ser feita pela busca por novos PAMs

menores e, portanto, mais baratos.²⁷ Apesar destas desvantagens, os PAMs são uma alternativa promissora aos antibióticos convencionais, o que pode ser enfatizado pelo fato de alguns peptídeos bioativos já fazerem parte do sistema imune inato de diversas formas de vida.²³ Assim, estudos que busquem identificar PAMs potentes, menores e menos tóxicos são de grande relevância para a sociedade.

1.2. Classes estruturais de PAMs

Os PAMs podem ser categorizados de diversas maneiras, inclusive de acordo com a sua estrutura secundária. As estruturas secundárias são padrões estruturais recorrentes, que resultam da adoção de conformações estáveis pelos resíduos de aminoácidos.²⁰ Em geral, os PAMs podem apresentar estruturas secundárias classificadas como: α -hélice, folha- β , desenovelada (aleatória), ou uma mistura das conformações anteriores (Figura 1).

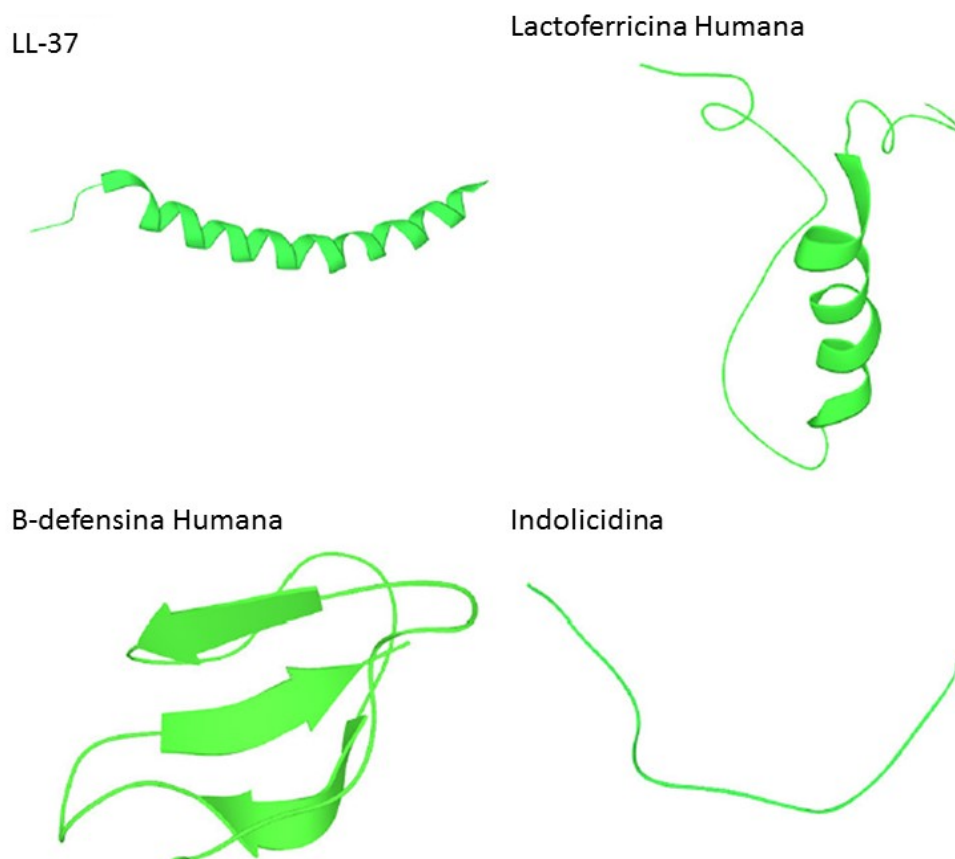


Figura 1. Peptídeos representando as principais estruturas secundárias: α -hélice (LL-37 e Lactoferricina Humana), folha- β (β -defensina Humana), desordenada (Indolicidina). Adaptada de Mahlapuu *et al.*¹

Os peptídeos que podem adotar estrutura em α -hélice, em geral, não apresentam estrutura definida em soluções aquosas e adotam a conformação de uma hélice anfipática na presença de membranas biológicas.¹ Por outro lado, os peptídeos estruturados em folha- β , por possuírem uma estrutura mais rígida, costumam apresentar conformação definida em soluções aquosas.¹ Geralmente, os folha- β apresentam essa conformação mais restrita devido à presença de ligações dissulfeto, às ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais que ajudam a estabilizar a molécula.² Desta forma, esta estrutura mais rígida, com maior estabilidade, em alguns casos, como o das defensinas, contribui para minimizar a degradação pela ação de proteases.²⁹ Vale lembrar que evitar os efeitos das enzimas nos PAMs é um ponto importante para a utilização dessas biomoléculas como medicamentos e que existem modificações químicas que podem ser feitas para diminuir a proteólise. Com relação aos peptídeos desenovelados, apesar de não possuírem estrutura bem definida, podem se dobrar em estruturas anfipáticas após o contato com a membrana.¹

De acordo com as estatísticas estruturais do APD, a maioria dos PAMs catalogados nesse banco de dados não tem a sua estrutura 3D conhecida. Entretanto, cerca de 14,99 % dos 3.324 PAMs catalogados possuem estrutura α -hélice, enquanto que, 2,65 % dos peptídeos apresentam estrutura em folha- β .^{21,24} Nesse contexto, é possível observar que a bioatividade não é uma característica exclusiva dos peptídeos α -helicoidais.

De um modo geral, observa-se que peptídeos catiônicos que se organizam, na presença de membranas microbianas, em uma estrutura anfipática bem definida tendem a apresentar atividade antimicrobiana. Inclusive peptídeos como a indolicidina, que não se estruturam como uma α -hélice ou folha- β , isto é, que apresentam uma estrutura mais linear.

1.3. Peptídeos Curtos

Pesquisas têm demonstrado inclusive que peptídeos catiônicos compostos por até 12 resíduos de aminoácidos também podem exibir atividade antimicrobiana, mesmo não apresentando estruturas secundárias regulares do tipo α -hélice ou folha- β .^{17,25,30} Esses peptídeos menores são considerados agentes antimicrobianos atraentes, pois reduzem os custos de produção. Em virtude disto, trabalhos buscando identificar ou projetar novos PAMs curtos e potentes estão cada vez mais frequentes.

Um conhecido peptídeo curto que apresenta atividade moderada contra bactérias e fungos é a temporina-SHf (FFFLSRIF), que é encontrado na pele da rã *Pelophylax saharica*. Ensaio de calorimetria diferencial exploratória e de permeabilização de membranas indicaram que este peptídeo atua de maneira similar a um detergente, isto é, ele desestabiliza o empacotamento da bicamada lipídica, provocando assim o rompimento da membrana microbiana.³¹

Por ser um modelo promissor, Mishra et. al utilizou a temporina-SHf como base para desenvolver um novo PAM com maior potência. Para isto, as 4 fenilalaninas da temporina-SHf foram substituídos por triptofanos, devido à interação preferencial deste resíduo com interfaces de membrana. Além disso, os autores testaram algumas substituições dos resíduos 5 e 6 visando aumentar sua solubilidade em água e seu potencial antimicrobiano. Com isso, foi identificado que o peptídeo contendo os 4 triptofanos e um par de argininas (WWLRRIW) apresentavam maior atividade que seus análogos e que a temporina-SHf.³²

O potencial terapêutico de peptídeos curtos tem sido constatado inclusive para inibir a formação de biofilme bacteriano de cepas multirresistentes. É importante lembrar que os biofilmes bacterianos são considerados um problema de saúde pública, uma vez que aumentam a resistência das bactérias a ação dos antibióticos convencionais.

Cardoso e colaboradores, por exemplo, avaliaram diferentes formas de reduzir o peptídeo PcDBS1R5 de 19 resíduos, com atividade anti-biofilme, para uma sequência de 10 resíduos que apresentassem um efeito igual ou superior ao observado no peptídeo precursor.³³ Dessa forma, encontraram o PAM denominado R5F5 (IKLLCRVHKK), com atividade anti-biofilme contra *Pseudomonas aeruginosa* e cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC), que não apresentou efeito hemolítico e tóxico significativo para células de mamíferos.

Em outro estudo recente, Cândido et.al³⁰ também analisou fragmentos de 10 resíduos de aminoácido de um PAM de 19 resíduos, denominado PaDBS1R6,³⁴ ativo contra bactérias Gram-negativas. O peptídeo curto selecionado pelos autores (PaDBS1R6F10 - KKLRLKIAFK) apresentou atividade antibacteriana, anti-biofilme e não foi observada ação tóxica significativa em células humanas.

Assim, estes trabalhos ilustram o crescente interesse científico em obter PAMs cada vez mais curtos.

1.4. Peptídeos intragênicos antimicrobianos (IAPs)

Muitos PAMs atuantes do sistema imune inato são produzidos naturalmente, em diversos organismos, como um precursor inativo, sendo necessário uma clivagem proteolítica para ativá-los.^{1,5-7} Um exemplo de peptídeos naturais bioativos derivado de sequências internas de proteínas é o C3a, peptídeo de 77 resíduos de aminoácidos oriundo da ação da protease C1s no fator complemento C4, que possui atividade antimicrobiana comprovada.³⁵ Outro exemplo clássico natural é a liberação da bradicinina, um vasoativo, pela clivagem do cininogênio.³⁵

Diversas proteínas podem atuar como fontes potenciais de peptídeos bioativos encriptados, independentemente da sua estrutura e da sua função no organismo de origem. Estudos recentes têm demonstrado que determinadas sequências de aminoácidos, com propriedades físico-químicas específicas, estão encriptadas em proteínas e quando isoladas podem apresentar atividade antimicrobiana, ou seja, uma atividade que não exibiam quando integravam a proteína precursora.⁵⁻⁷ Esses segmentos de aminoácidos derivados da proteólise que apresentam atividade antimicrobiana são denominados Peptídeos Antimicrobianos Intragênicos (IAPs).^{5-7,36}

Independentemente de as proteínas precursoras apresentarem relação direta com o sistema imune, os IAPs têm demonstrado serem tão ativos quanto os PAMs conhecidos, com seletividade semelhante e boa amplitude no espectro antimicrobiano. Como, por exemplo, os IAPs Hs05, fragmento da proteína Acetiltransferase 10, e Hs02, fragmento da proteína miosina não convencional-1h, que foram sintetizados artificialmente.^{11,12,37} Esses IAPs apresentaram um amplo espectro de atuação e CIMs (Concentração inibitória mínima) na faixa de 1 a 16 µM para microrganismos como *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Isto se deve ao fato de que a ação dos PAMs está relacionada a sua interação com a membrana do patógeno, que é influenciada pelas características físico-químicas destas biomoléculas.

1.5. Prospecção de Novos IAPs

Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para encontrar novos PAMs que sejam mais potentes e menos tóxicos.² A prospecção *in silico* de novos IAPs tem se mostrado uma alternativa promissora.^{7,37} Ramada *et.al*⁷ demonstrou que peptídeos antimicrobianos intragênicos podem ser tão ativos quanto os PAMs conhecidos, além de apresentar amplo

espectro de ação e baixa atividade hemolítica. Setenta e seis por cento dos peptídeos prospectados de proteínas vegetais testados apresentaram atividade antimicrobiana contra patógenos humanos e/ou vegetais.⁷ Isto ressalta o potencial interno de estruturas proteicas.

A metodologia utilizada por esses autores para prospectar novos IAPs se baseia na busca, dentro de bancos de dados de proteínas em formato FASTA, por segmentos com propriedades físico-químicas similares as observadas em PAMs naturais.⁵⁻⁸ Para automatizar esta busca, foi criado um *software*, denominado Kamal, no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia. Este foi desenvolvido a partir de quase duas décadas de trabalho e utilizado em publicações visando a prova de conceito até sua recente publicação e distribuição à comunidade científica.^{9,38} A varredura realizada por esta ferramenta exploratória resulta em uma lista de peptídeos com maior possibilidade de apresentar ação antimicrobiana.⁵⁻⁸ Após essa triagem realizada pelo programa, compete ao usuário avaliar e selecionar os peptídeos mais propensos a serem bioativos dentre os listados e testá-los.

O *software* orienta as buscas primariamente pela detecção de fragmentos anfifílicos, em seguida, são aplicados filtros conforme as características específicas de PAMs, como a carga líquida, a estrutura secundária, ângulo polar, a hidrofobicidade média e o momento hidrofóbico. Ele permite que usuário possa configurar a interface de forma a refinar as suas buscas, restringindo-as por IAPs com as propriedades de interesse.

Cada uma dessas característica possui uma relação direta com a atividade antimicrobiana, uma vez que o modo de ação dos PAMs está fundamentado na sua interação com membrana do patógeno, que é governada por estas propriedades.⁵⁻⁸ Assim, para uma triagem bem-sucedida o conjunto formado por esses parâmetros devem ser levados em consideração.

Neste contexto, a carga líquida dos peptídeos a serem prospectados é um fator importante a ser observado por contribuir para a atração entre os peptídeos e as membranas de bactérias. Além disso, a carga líquida dos peptídeos pode conferir certa seletividade para esta biomolécula e, em alguns casos, o aumento da carga pode potencializar a sua ação antimicrobiana.² Em PAMs naturais, a carga líquida varia de 0 a + 20, sendo que a maioria está dentro da faixa intermediária de carga de +3 a +6. ² De acordo com o banco de dados APD,²⁴ a média observada é cerca de +3,3. Assim, a busca

por peptídeos dentro da faixa intermediária citada aumenta a probabilidade de apresentar atividade. No entanto, este fator não deve ser observado isoladamente.

Avaliar a hidrofobicidade também é necessário, uma vez que a interação com a parte apolar da membrana é essencial para a atuação dos PAMs. Em geral, os PAMs naturais são constituídos por 40% a 60% de resíduos hidrofóbicos.² O que permite que eles sejam solúveis e sejam capazes de interagir com a parte hidrofóbica da membrana. Ademais, a escolha de novos possíveis IAPs deve ser baseada em valores intermediários de hidrofobicidade média, dado que peptídeos com alta hidrofobicidade podem apresentar atividade hemolítica mais pronunciada e peptídeos com baixa hidrofobicidade tendem a não apresentar atividade antimicrobiana.^{2,8,37}

Nos PAMs naturais, esses resíduos hidrofóbicos estão dispostos de forma a contribuir para uma estruturação anfipática da molécula. Peptídeos em α -hélice, por exemplo, apresentam uma periodicidade característica na disposição sequencial dos resíduos de forma que os resíduos polares (ou apolares) estão frequentemente dispostos a cada 3 ou 4 resíduos. Isto confere a eles um particionamento da face hidrofílica e da hidrofóbica que propicia sua inserção parcial na membrana. Todavia, estruturas anfifílicas não se restringem a moléculas helicoidais, pois peptídeos que adotam outras estruturas secundárias também podem apresentar anfipaticidade dependendo da sua sequência de resíduos de aminoácidos.^{2,8,37}

A anfipaticidade está diretamente relacionada com a estrutura secundária adotada pelo peptídeo e determinante para o momento hidrofóbico (M_H),² o qual pode ser definido como a soma dos vetores de hidrofobicidade de cada resíduo normalizada para uma hélice perfeita.⁸ Como o M_H pode ser calculado *in silico*, este parâmetro serve de base para nortear as buscas por peptídeos que apresentem anfifilicidade. Embora, os PAMs tenham ampla distribuição nestes parâmetros, eles costumam apresentar alto momento hidrofóbico e hidrofobicidade moderada. Assim, a busca por novos IAPs também deve levar em consideração esses princípios.

Portanto, utilizar todos esses parâmetros em conjunto aumenta a probabilidade de encontrar novos IAPs potentes e com amplo espectro de atuação, isto é, atividade contra diversas cepas de bactérias, fungos e vírus. Esses peptídeos podem então ser sintetizados em laboratório e, posteriormente, caracterizados e testados para verificar se apresentam a atividade esperada.

1.6. Peptídeo Intragênico Antimicrobiano Hs02

Recentemente, em nosso grupo de pesquisa, proteínas humanas foram investigadas como potenciais fontes de peptídeos com atividade antimicrobiana. Nesta bem-sucedida prova de conceito, foi verificado que alguns fragmentos anfífilicos α -helicoidais de proteínas codificadas pelo genoma humano podem ser utilizados como agentes antimicrobianos e anti-inflamatórios. Esses fragmentos prospectados utilizando o software Kamal³⁸ demonstraram ser capazes interagir com membranas modelo e inibir o crescimento de microrganismos.¹¹

Dentre estes IAPs, o peptídeo denominado Hs02 exibiu um maior potencial antimicrobiano quando comparado aos outros peptídeos avaliados por Brand e colaboradores.¹¹ Ele é um fragmento de 16 resíduos de aminoácidos (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂) da proteína humana não convencional miosina 1h. O peptídeo Hs02 apresentou atividade contra bactérias e leveduras na faixa de concentração de 1 a 8 μ M. Ademais, demonstrou atividade anti-inflamatória, inibindo, em macrófagos de camundongo tratados com LPS, a liberação de TNF- α , uma citocina pro-inflamatória produzida na fase aguda da infecção.¹¹

1.7. Mecanismo de ação dos PAMs

A ação dos PAMs está intimamente ligada a forma como essas biomoléculas interagem com as membranas microbianas. E para entender a ação dos PAMs é preciso conhecer a composição das membranas biológicas, que varia de acordo com o organismo em estudo. Em geral, células eucariotas são eletricamente neutras por terem membranas plasmáticas constituídas majoritariamente de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e colesterol. Enquanto, as membranas de microorganismos são compostas por uma estrutura fluida de fosfolípidos com a presença significativa de fosfatidilglicerol, cardiolipina e fosfatidilserina que conferem a membrana uma carga líquida negativa.^{8,39}

Bactérias Gram-negativas, por exemplo, possuem ainda uma segunda membrana, denominada membrana externa, que é composta por uma dupla camada lipoprotéica rica em lipopolissacarídeos (LPS). Esta membrana constitui uma barreira de permeabilidade para muitas macromoléculas, devido aos cátions Ca²⁺ e Mg²⁺ que se ligam aos grupos fosfato do núcleo interno dos LPS e provêm a estabilização do folheto externo. Já as Gram-positivas não apresentam esta segunda membrana, entretanto, possuem a camada

de peptideoglicano ao redor da membrana citoplasmática mais espessa que as negativas.^{1,8,39} A Figura 2 ilustra as principais diferenças observadas nas paredes celulares desses grupos de bactérias.⁴⁰

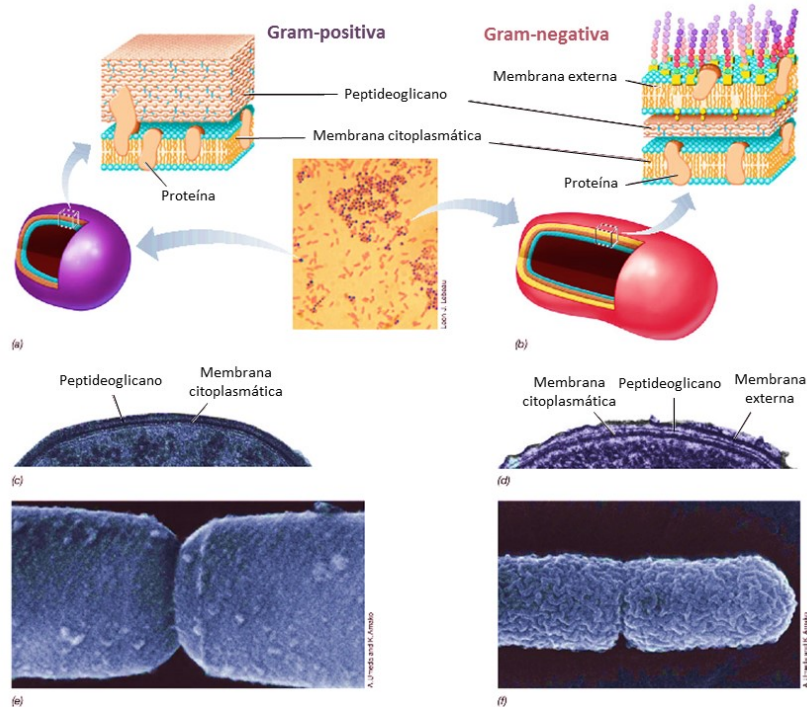


Figura 2. Parede celular de bactérias. (a,b) diagramas das paredes celulares de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. A foto ao centro mostra células de *S. aureus* (roxas, Gram-positiva) e *E. coli* (rosa, Gram-negativa). (c,d) Micrografias eletrônica de transmissão mostrando a parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (e,f) micrografias eletrônica de varredura de Gram-positiva e Gram-negativas. Adaptado da referência 40.⁴⁰

Essa variação da composição da membrana irá influenciar diretamente na forma inicial de interação com o peptídeo. Um exemplo disto é que PAMs catiônicos têm como sítio de interação em bactérias Gram-positivas os ácidos teicóico e lipoteicóico e os grupos carboxílicos dos resíduos de aminoácidos da camada de peptideoglicano. Em bactérias Gram-negativas, para permear a membrana externa, os PAMs se ligam aos lipopolissacarídeos deslocando os cátions divalentes, Ca^{2+} e Mg^{2+} , desestabilizando assim sua estrutura. Essa diferença de atuação de acordo com o tipo da membrana pode impactar na potência e na seletividade do peptídeo.^{8,18} Em ambos os casos, após ultrapassar a camada de peptideoglicano, a estrutura secundária anfipática dos PAMs que se agregam na superfície da membrana microbiana permite que os domínios carregados dos peptídeos interajam com a parte hidrofílica da membrana citoplasmática, enquanto, a parte hidrofóbica destas biomoléculas interage com o núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica, promovendo assim a permeabilização.⁸

Existem alguns modelos teóricos que buscam explicar a permeabilização de membranas plasmáticas por PAMs catiônicos anfifílicos do tipo α -hélice. Os modelos *Barrel stave*, *carpete* e *poro toroidal* são considerados modelos clássicos, que buscam explicar a ação membranolítica de PAMs, e estão ilustrados de forma esquemática na Figura 3.^{1,18}

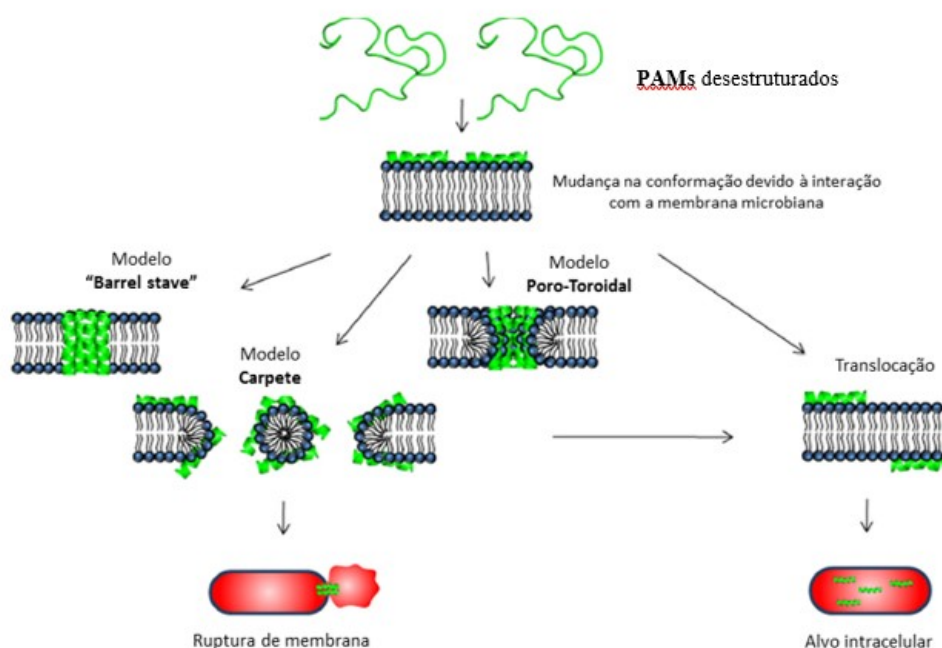


Figura 3. Ilustração esquemática dos modelos de permeabilização de membrana por PAMs. Adaptada de Mahlapuu *et al.*¹

No modelo “Barrel stave” as regiões hidrofílicas dos PAMs interagem com a membrana formando poros, isto é, canais transmembrânicos revestidos de peptídeos. Inicialmente, um PAM se insere perpendicularmente à bicamada, enquanto, outras moléculas de PAMs são recrutadas, resultando na formação de poro hidrofílico. Já no modelo *carpete*, os peptídeos se acumulam na superfície da membrana, atraídos eletrostaticamente pelas cargas negativas dos fosfolipídios. Este acúmulo superficial de PAMs provoca tensão na bicamada, levando à ruptura da membrana e formação de micelas (efeito detergente). No modelo *poro toroidal*, o PAM interage eletrostaticamente com a membrana se inserindo nela. Esta inserção do PAM induz o fosfolipídio da monocamada lipídica superior a dobrar-se. Com isso, o poro é formado pela intercalação de moléculas de PAM com as cabeças polares dos fosfolipídios.^{1,18,27}

A permeabilização da membrana por PAMs também é importante para a translocação e internalização de certos peptídeos que possuem alvos intracelulares e, portanto, apresentam uma ação não membranolítica, como os modelos de canal agregado, eletroporação, segregação lipídica e *sinking raft*.⁴¹

No modelo canal agregado, aglomerados transmembrânicos de curta duração são formados e permitem que os peptídeos atravessem a membrana sem romper a sua estrutura, alcançando seus alvos intracelulares.⁴¹ No modelo de eletroporação, a permeabilização dos PAMs ocorre por meio da formação de pequenos poros nas membranas sob a influência de um campo elétrico externo gerado pelos PAMs. Já no modelo de segregação lipídica, a ação dos peptídeos decorre formação de domínios lipídico-peptídeo específicos com consequente promoção da segregação lateral de fosfolípidios zwitteriônicos de fosfolípidios aniônicos na membrana microbiana.⁴¹ Por fim, o mecanismo exposto no modelo *sinking raft* é proveniente do desequilíbrio de massa provocado pelo peptídeo ao interagir preferencialmente com um domínio lipídico particular. Isto gera um gradiente de curvatura ao longo da membrana e por auto-associação, os peptídeos afundam na membrana, formando poros transitórios.⁴¹ A Figura 4 ilustra estes modelos.

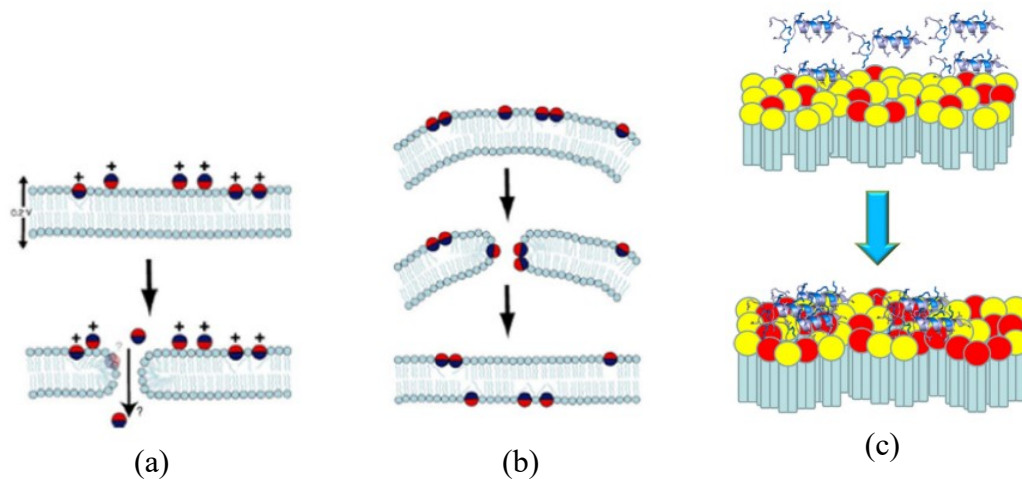


Figura 4. Ilustração de mecanismos de ação: em (a) modelo eletroporação, no qual forma-se um poro quando a diferença de potencial entre a membrana e o peptídeo atinge 0,2 V; em (b) modelo *sinking raft*, no qual há a formação de um poro transitório induzido por um desequilíbrio de massa decorrente da interação preferencial do peptídeo com certos domínios lipídicos; e em (c) modelo de segregação lipídica em que há um agrupamento de lipídios aniônicos (vermelho) em domínios peptídeo-lipídio separados e a segregação de lipídios zwitteriônicos (amarelo) ocorrem como consequência da ligação do peptídeo antimicrobiano, causando um rearranjo de lipídios na membrana. Adaptado de Teixeira *et al.*⁴¹

1.8. Interação de peptídeos com meios miméticos de membrana

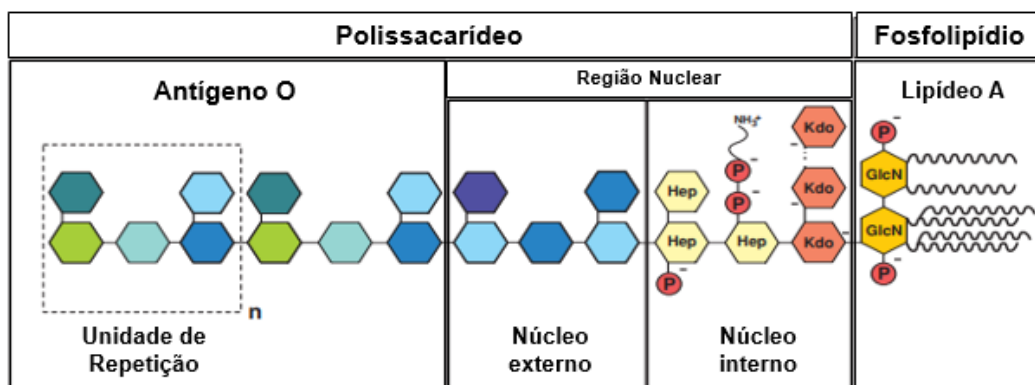
Conhecer a estrutura que PAMs adquirem ao interagir com a membrana pode auxiliar na compreensão do seu mecanismo de ação e até mesmo na racionalização de modificações estruturais que visem aumentar sua atividade. Por isso, diversos trabalhos estudam essas interações utilizando modelos que mimetizam membranas microbianas. Em geral, micelas constituídas de surfactantes aniônicos ou zwitteriônicos como dodecilsulfato de sódio (SDS) e dodecilmfosfolina (DPC), respectivamente, podem ser utilizadas nesses estudos. Além disso, vesículas unilamelares grandes (LUV) constituídas por moléculas como o 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina (DMPC) e/ou o 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-glicerol (DMPG) também são utilizadas como modelos de membrana. Importante destacar que as LUVs tendem a ser estruturalmente mais similares as membranas microbianas visto que apresentam tamanho e curvatura semelhante à da membrana celular. A escolha do modelo está relacionada com o experimento a ser realizado e ao tipo de membrana que se deseja estudar.⁴²

Bozelli e colaboradores⁴³ fizeram um estudo biofísico de interação de dois peptídeos curtos e ricos em triptofano, horine (WWWLRRRW) e verine-L (RRRWWWWL), com membranas miméticas de bactérias Gram-positiva (*S. aureus*) e Gram-negativa (*E. coli*). A composição lipídica utilizada visando mimetizar a *E. coli* foi POPE:POPG:TOCL (80:15:5, razão molar) e a *S. aureus* foi POPG:TOCL (58:42, razão molar). Os peptídeos estudados, apesar de serem compostos pelos mesmos resíduos de aminoácidos, apresentam uma estrutura primária diferente. Os dados obtidos indicam que a diferença no posicionamento dos resíduos de aminoácidos resulta em diferentes conformações ao interagirem com os modelos miméticos de membranas, o que impactou no comportamento desses PAMs, em especial com relação ao modelo mimético para bactérias Gram-negativas. Os resultados mostram que ambos os peptídeos apresentam um comportamento similar para bactérias Gram-positivas, com o mesmo valor de CIM para a bactéria *S. aureus*, enquanto a atividade difere em relação a bactérias Gram-negativas. O peptídeo verine-L, por exemplo, demonstrou ser 4 a 8 vezes mais potente contra duas diferentes cepas de *E. coli*. Por fim, os autores atribuíram essa diferença observada às diferentes conformações adotadas pelos peptídeos em função da variação na disposição dos aminoácidos e à diferença de composição das membranas bacterianas.

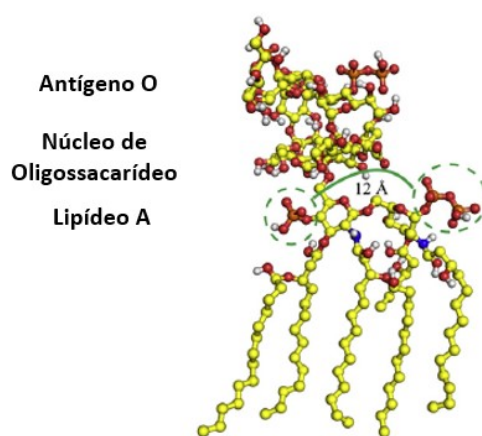
Além dos modelos miméticos já citados, no caso de estudos voltados para as bactérias Gram-negativas, alguns trabalhos têm empregado lipopolissacarídeos (LPS) para simular ambientes de membrana, uma vez que o LPS é o principal componente da membrana externa destas bactérias. Pesquisas têm demonstrado que o LPS é relevante no estudo do mecanismo de ação dos PAMs, dado que esta membrana atua como uma barreira de permeabilidade. Além disso, ele é considerado uma endotoxina e pode causar choque séptico quando liberado no organismo do hospedeiro. A polimixina B (PMB), por exemplo, um antibiótico peptídico muito utilizado clinicamente, tem como alvo inicial o LPS da membrana.⁴⁴ Entretanto, os estudos utilizando essas moléculas ainda são poucos.

O LPS é composto basicamente pelo lipídeo A, por um oligossacarídeo central (Região nuclear) e por uma cadeia polissacarídica lateral chamada de "antígeno O", conforme ilustrado Figura 5.⁴⁵ Essas subunidades possuem um papel importante contra defesa humoral do hospedeiro e na virulência desses patógenos.

A porção do lipídeo A, por exemplo, é considerada um potente ativador do processo de inflamação e em algumas cepas ela sofre modificações para diminuir a resposta imunológica do organismo ou para resistir a ação de PAMs catiônicos.⁴⁵ De acordo com a literatura, é nessa subunidade que as polimixinas interagem diretamente, e a redução da carga líquida negativa nessa porção observada em algumas cepas tem as tornado mais resistentes.⁴⁴ Conhecer esses dados auxiliam no desenvolvimento de novos compostos mais eficientes contra essas cepas.



(a)



(b)

Figura 5. Representação da em (a) da estrutura da geral de LPS de enterobactérias Gram-negativas, que consistem no lípido A, uma região nuclear de oligossacarídeo e antígeno O (Abreviaturas de resíduos de monossacarídeos: GlcN, glucosamina; Kdo, '2-ceto-3-ácido desoxioctulosônico' (ácido 3-desoxi-D-mano-octulosônico), adaptado da referência 46; Hep, D-glicero-D-mano-heptose); em (b) Estrutura do LPS gerada a partir da estrutura de cocristal de LPS e FhuA (código de acesso pdb: 1QFG) adaptado de Ghosh et al⁴⁷.

Ghosh e colaboradores obtiveram importantes achados mecanísticos da ação de peptídeos derivados da esculentina por meio do estudo da estrutura tridimensional dos peptídeos Esc(1-21) e seu diastereômero Esc(1-21)-1c em complexo com LPS.⁴⁷ Cabe destacar que o peptídeo denominado esculentin-1a(1-21)NH₂ [Esc(1-21), GIFSKLAGKKIKNLLISGLKG-NH₂] teve os aminoácidos nas posições 14 e 17 substituídos por enantiômeros D correspondentes, dando origem ao peptídeo Esculentin-1a(1-21)-1c NH₂ [Esc (1-21) 1C, GIFSKLAGKKIKN^dLLI^dSGLKG- NH₂], com o intuito de impedir a formação de uma volta de hélice nessa região. Em virtude disto, foi observado que o peptídeo Esc (1-21) 1C, apresenta uma porção C-terminal mais flexível e uma distância maior entre os resíduos catiônicos. Enquanto, o Esc(1-21) apresenta uma

estrutura mais definida e a distância entre os resíduos carregados positivamente é similar geometricamente a distância entre os grupos fosfatos do LPS. Ademais, os ensaios biofísicos evidenciaram que Esc (1-21) apresenta uma maior afinidade de ligação, bem como maior capacidade para desagregar a estrutura do LPS e neutralizar seu efeito tóxico. Assim, os autores concluíram que o Esc (1-21) possui uma maior atividade anti-endotoxina por apresentar uma distância entre os resíduos catiônicos similar a distância entre os grupos fosfatos do LPS, tornando mais propícias as interações com o LPS.

Shang e colaboradores⁴⁸ também propuseram um mecanismo molecular para as interações peptídeo-LPS. Para isto, foi investigada a interação do LPS com cinco peptídeos (I1W, I4W, L5W, L11W e L12W) com sequências de aminoácidos semelhantes e com a mesma carga positiva líquida e hidrofobicidade. De acordo com os autores, os peptídeos I1W e I4W se aproximam por meio de forças eletrostáticas e penetram na camada de LPS promovendo a desorganização do folheto. Assim, eles conseguem cruzar a membrana externa para a membrana interna e romper a membrana citoplasmática, matando as bactérias Gram-negativas. Enquanto o L5W, L11W e L12W são incapazes de desestabilizar agregados de LPS e atravessar a membrana externa, apesar de se ligarem fortemente às bicamadas de LPS e despolarizar as membranas citoplasmáticas bacterianas. Cabe destacar que estes 3 peptídeos demonstraram ser inativos contra bactérias Gram-negativas, mas ativos contra as Gram-positivas.

1.9. Estrutura de peptídeos *versus* atividade antimicrobiana

A estrutura adotada por PAMs na presença de membranas tem demonstrado influência na atividade dessas biomoléculas. De acordo com a literatura, as interações eletrostáticas entre o peptídeo e a membrana promovem o contato inicial entre eles. Após isto, há uma reorganização estrutural em que interações coulômbicas são substituídas por ligações de hidrogênio, o que colabora para a estabilização da molécula.

No caso de peptídeos que adotam estrutura helicoidal, fatores como interações entre os resíduos carregados e o dipolo de hélice, interações entre resíduos de aminoácidos com carga oposta separados $i+3$ ou $i+4$ posições contribuem para a estabilização da estrutura helicoidal como ilustra a Figura 6. Além disso, nos peptídeos amidados no C-terminal, há uma ligação de hidrogênio extra que também contribui para a estabilização.¹⁸

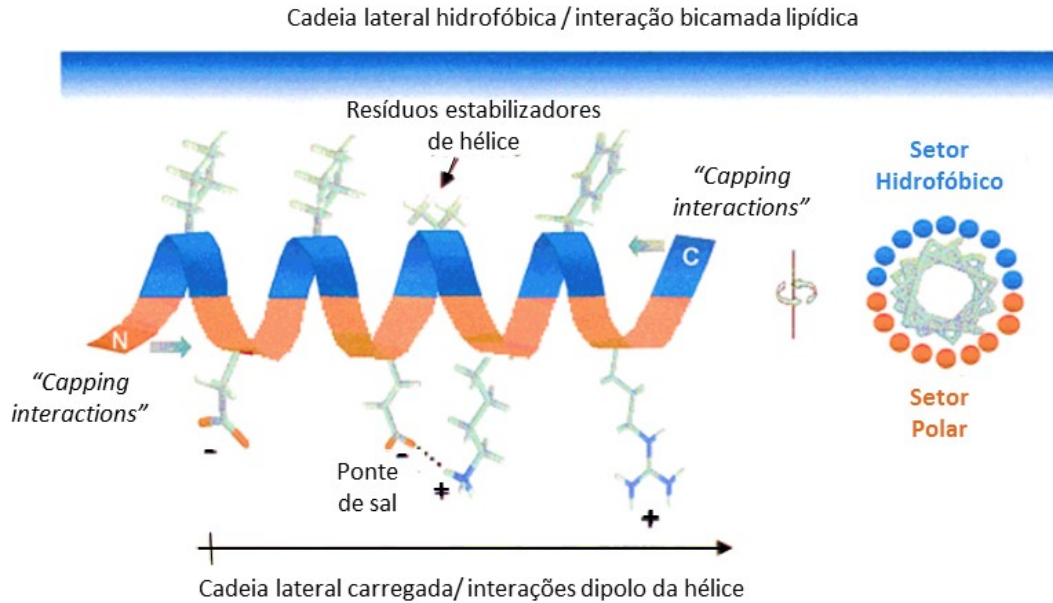


Figura 6. Ilustração dos fatores que podem afetar a estrutura helicoidal de peptídeos. Adaptado de Tossi *et al.*¹⁸

A inserção desses peptídeos helicoidais em membranas é considerada um processo decorrente da estabilização da hélice, por meio de interações do tipo Van der Waals entre cadeias laterais não polares com a bicamada lipídica e da reorganização da própria bicamada lipídica. Para estes peptídeos, a capacidade de formar uma estrutura helicoidal anfipática bem definida na presença de membranas tem sido considerada um pré-requisito importante para uma potente atividade antimicrobiana.¹⁸

A relação estrutura vs atividade também tem sido estudada frente a peptídeos que adotam estruturas anfipáticas diferentes de uma α -hélice. Um estudo que mostra o impacto da relação estrutura vs atividade nesses PAMs foi o desenvolvido por Manzo e colaboradores. Neste trabalho, um PAM curto teve sua sequência primária alterada o que consequentemente modificou sua estrutura secundária. Neste caso, o peptídeo SB056-lin (WKKIRVRLSA-NH₂), que é ativo contra bactérias Gram-negativas, com uma potência comparável à da Colistina e Polimixina B, foi modificado com o intuito de otimizar sua atividade. Para isto, os dois primeiros resíduos do SB056-lin foram invertidos, o que resultou no peptídeo β -SB056-lin (KWKIRVRLSA-NH₂) que possui um perfil mais anfipático. De acordo com os autores, ambos os peptídeos adotam uma conformação fita- β na presença de vesículas de POPC (fosfolípídeo não carregado). Entretanto, o β -SB056-lin se agrega em folhas- β mais estendidas com a adição de POPG (fosfolípídeo

aniônico) na matriz de POPC, o que reflete diretamente no aumento da sua bioatividade (Figura 7).⁴⁹

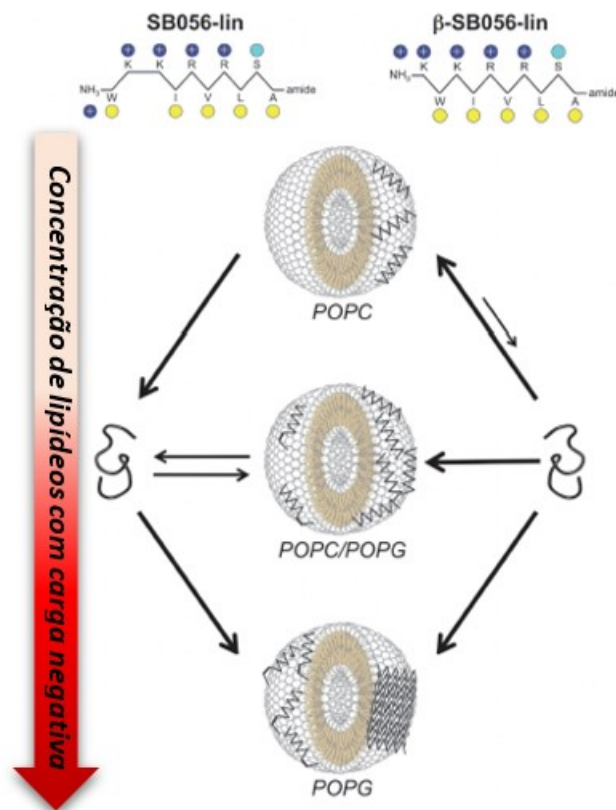


Figura 7. A proporção de lipídios aniônicos nas vesículas é aumentada de cima para baixo. O comportamento do peptídeo original SB056-lin é representado no lado esquerdo e o β -SB056-lin com sequência otimizada no lado direito. Setas pretas de comprimento diferente e espessura é usada para indicar os diferentes equilíbrios de ligação. O SB056-lin se liga apenas a bicamadas aniônicas e em uma conformação em cadeia β não tão bem ordenada. A sequência β -SB056-lin otimizada, por outro lado, forma cordões β regulares que se auto-montam em folhas- β estendidas quando a carga negativa da bicamada excede a eletro-neutralidade do sistema peptídeo-lipídeo. (adaptado de Manzo *et al.*⁴⁹)

Outro estudo que demonstrou que peptídeos curtos lineares (compostos por 8 ou 12 resíduos de aminoácidos) podem formar uma estrutura anfipática similar a folha- β sem a necessidade de ligações dissulfeto para a estabilização foi o conduzido por Ong *et al.* Os peptídeos projetados pelos autores possuem os resíduos catiônicos e hidrofóbicos dispostos alternadamente e orientados em faces opostas. A estruturação em folha- β ocorre via atração eletrostática entre os aminoácidos carregados positivamente e a membrana fosfolipídica carregada negativamente. A atividade antimicrobiana desse peptídeo decorre da inserção de resíduos hidrofóbicos na bicamada lipídica da membrana microbiana.¹⁴

Desse modo, observa-se que estudar essa estruturação anfipática é essencial para compreender a atividade dos PAMs. Uma técnica muito utilizada para avaliar a conformação preferencial de peptídeos em ambientes miméticos ao de membranas fosfolipídicas é o Dicroísmo Circular (CD). Entretanto, as informações obtidas por meio dos espectros de CD são dados globais da biomolécula. Para obter os detalhes estruturais em nível molecular e atômico de biomoléculas outras técnicas como cristalografia de raios-X e RMN podem ser aplicadas.

1.10. O uso do RMN na determinação de estruturas peptídicas

A RMN tem sido amplamente empregada na determinação de estruturas tridimensionais de peptídeos, devido a sua capacidade de fornecer dados estruturais em resolução atômica em solução. Com isso, é possível avaliar a estrutura destas biomoléculas em ambientes de membranas miméticas e estudar as interações ligante-alvo.⁵⁰

O uso desta técnica permite definir relações estereoquímicas dentro de uma molécula e, portanto, abordar questões de configuração e conformação por meio das proximidades espaciais entre os núcleos, em especial entre os prótons.⁵¹ Como os aminoácidos são ricos em hidrogênios, então, a RMN de ^1H é uma alternativa pertinente para o estudo das estruturas de peptídeos.

A metodologia utilizada para a elucidação estrutural de proteínas por RMN foi consolidada pelo químico Kurt Wüthrich, que foi agraciado com o Nobel de Química em 2002 por seus estudos neste campo. Esta metodologia se baseia na identificação de sistemas únicos de *spin* em cadeias polipeptídicas utilizando experimentos bidimensionais (2D) de RMN. Portanto, a estrutura de biomacromoléculas é obtida por meio de informações das interações entre núcleos específicos dentro de uma mesma molécula ou entre moléculas.¹⁹

Dentre os experimentos bidimensionais geralmente utilizados para a resolução de estruturas tridimensionais (3D), destacam-se a *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY) e a *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (NOESY). No experimento ^1H - ^1H TOCSY é possível observar o sistema de *spins* de cada resíduo de aminoácido, que pode ser definido como um grupo de spins conectados via acoplamento escalar de um mesmo resíduo de aminoácido. Assim, é possível observar as interações intraresiduais entre

átomos de hidrogênio, que pertencem a um mesmo resíduo de aminoácido. Já nos experimentos de ^1H - ^1H NOESY são observadas interações entre *spins* via acoplamento dipolar através do espaço, quando a distância entre dois núcleos é inferior a 5Å, em virtude do Efeito Nuclear *Overhauser* (*nuclear Overhauser effect* ou NOE). O espectro de NOESY apresenta tanto interações intraresiduais quanto interresiduais, o que auxilia na determinação da disposição geométrica dos átomos da estrutura, ou seja, ele é base para informação geométrica.^{19,52,53}

O emprego em conjunto desses experimentos bidimensionais permite obter mapas de conectividade intra e interresidual de hidrogênios, para, então, convertê-los em restrições geométricas de distância e ângulos diedros. Em geral, as restrições de distâncias são baseadas na intensidade do NOE, que é considerada proporcional a r^{-6} , em que r é a distância entre os dois *spins* que estão interagindo. Já as restrições angulares são provenientes dos valores de deslocamento químico dos átomos pertencentes à cadeia principal do peptídeo. Esses dados podem ser calculados a partir dos espectros obtidos com o auxílio de *softwares*, e, assim, é possível ter uma predição da estrutura.^{19,52,54}

Mercurio *et. al* caracterizaram por RMN em solução a estrutura detalhada dos peptídeos antimicrobianos casocidina I e II, encriptados na proteína $\alpha\text{s}2$ -caseína do leite bovino, que são liberados após clivagem proteolítica natural. Neste estudo, os autores determinaram a estrutura desses peptídeos em H_2O e em diferentes ambientes miméticos de membrana e, com base nas informações estruturais obtidas por RMN, construíram modelos especulativos para explicar a atividade antimicrobiana das casocidinas.⁵⁵ Isso evidencia aplicabilidade desta técnica no contexto de peptídeos antimicrobianos, em especial no conhecimento das relações entre estrutura e atividade.

Como a estrutura de um peptídeo está intimamente ligada à sua bioatividade, neste trabalho, foi determinada a estrutura 3D do IAP Hs02 por RMN. E assim, entender um pouco mais sobre a relação estrutura x atividade. Além disso, foi proposto buscar *in silico* em proteínas humanas superexpressas no corpo humano, quando exposto a uma infecção, novos possíveis IAPs com estrutura helicoidal. Por fim, a metodologia de busca foi adaptada para prospectar um potencial IAP com uma estrutura similar a uma folha- β com no máximo 11 resíduos de aminoácidos.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral prospectar *in silico*, caracterizar e determinar a estrutura de peptídeos intragênicos com ação antimicrobiana e que apresentem baixa toxicidade.

Dessa forma, temos como objetivos específicos deste estudo:

- Determinar a estrutura 3D do IAP Hs02 por RMN, em virtude da sua atividade antimicrobiana relatada em estudos anteriores;
- Identificar em proteínas superexpressas no sangue humano durante infecções sequências peptídicas que sejam potencialmente peptídeos antimicrobianos intragênicos;
- Sintetizar em fase sólida e purificar os peptídeos selecionados e confirmar a estrutura primária por Espectrometria de Massa (EM);
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos peptídeos sintetizados;
- Para os peptídeos que apresentarem atividade antimicrobiana, avaliar:
 - O espectro de ação e o potencial citotóxico,
 - O potencial sinérgico,
 - A estrutura secundária desses peptídeos por meio da técnica de CD em diferentes ambientes,
 - As interações com LPS por meio de ensaios de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) e Espalhamento de Luz (DLS),
 - As potenciais alterações morfológicas na superfície da bactéria *E. Coli* após o tratamento com o IAP,
 - A estrutura 3D por RMN na presença de LPS.

3. Metodologia

3.1. Determinação da estrutura do peptídeo Hs02 em DPC-*d*₃₈ por RMN

A amostra do Hs02 puro liofilizada foi solubilizada em 50 mM de Dodecilfosfocolina deuterada (DPC-*d*₃₈) em tampão PBS (pH 7,0) e H₂O / D₂O (90:10, v/v) a uma concentração final de 2 mM. Adicionalmente, 0,5% de 2,2,3,3-d₄-3-trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-*d*₄) foi utilizado como padrão interno para referência de deslocamento químico.

Todos os experimentos de RMN de ^1H foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III HD 600 operando a 600 MHz (14 T) para ^1H , a 25 °C, e que está instalado na Central Analítica do Instituto de Química (CAIQ) da UnB. A atribuição dos sinais de ressonância do peptídeo foi realizada por meio de experimentos bidimensionais (2D): ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^1H NOESY. Os espectros 2D foram adquiridos com 4096 pontos complexos e 512 incrementos τ_1 . O sinal da água foi atenuado com a sequência de pulso denominada *excitation sculpting*. Os espectros de ^1H - ^1H TOCSY foram obtidos com um tempo de mistura (*mixing time*) de 80 ms, janela espectral (SW) de aproximadamente 12 ppm, número de varreduras (NS) 64 e *dummy scans* (DS) 32. Os espectros de ^1H - ^1H NOESY foram registados com um tempo de mistura (*mixing time*) de 200 ms, SW de aproximadamente 12 ppm, NS 64 e DS 16. Os espectros foram processados usando o *software* NMRFX⁵⁶ processor e os mapas de contorno foram visualizados usando o *software* CCPNMR⁵⁴ (versão 2.4). Os deslocamentos químicos de ^1H foram atribuídos de acordo com os procedimentos padrões, utilizando o método desenvolvido por Wutrich.¹⁹ Os NOEs foram caracterizados com base na intensidade dos picos cruzados. Os limites superiores para as restrições NOE foram calibrados com base na dependência da distância r^{-6} do NOE em três classes: forte ($\leq 1,72 \text{ \AA}$), médio ($\leq 3,2 \text{ \AA}$) e fraco ($\leq 8,0 \text{ \AA}$).⁵⁴ As estruturas foram calculadas com o auxílio do *software* CNS⁵⁷ (versão 1.2) e do *software* de assinalamento automático ARIA⁵⁸ (versão 2.3.1). Vários ciclos de cálculos foram realizados utilizando protocolos padrão e, após cada ciclo, restrições rejeitadas, violações e atribuições foram analisadas. O conjunto de 10 estruturas de menor energia escolhidos para representar a estrutura 3D do peptídeo em solução foram visualizadas usando o *software* PyMol (*The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LL*). As estruturas de RMN foram depositadas no PDB (*Protein Data Base, www.rcsb.org*) com o código 6MBM.

3.2. Seleção de potenciais peptídeos antimicrobianos intragênicos (IAP)

3.2.1. Seleção de potenciais IAPs com estrutura do tipo α -hélice

Em minuciosa revisão bibliográfica, foram encontradas 80 proteínas superexpressas no plasma humano quando este é exposto a uma infecção viral, em especial quando contaminado com o vírus HIV⁵⁹⁻⁶⁵. A estrutura primária destas proteínas - que estão listadas no Anexo B - foram submetidas ao *software* Kamal 2.0 visando identificar peptídeos encriptados que apresentem propriedades físico-químicas que os

predisponham a ter atividade antimicrobiana. Para serem inseridas no programa, suas respectivas estruturas primárias foram obtidas no formato .fasta por meio do banco de dados UniProt (www.uniprot.org). O programa Kamal foi configurado para limitar a busca a peptídeos de 16 a 24 resíduos de aminoácidos. Essas buscas foram feitas considerando o ângulo polar de 160° e de 192°. Inicialmente, nos campos destinados a aminoácidos polares, resíduos fortemente apolares como F, I, L, V, W foram retirados. Assim, nos campos destinados a resíduos polares foram permitidos os resíduos A, D, E, G, H, K, M, N, Q, R, S, T e Y, enquanto, nos campos apolares foram permitidos A, F, I, L, M, V e W. Além disso, a cisteína (C) e a prolina (P) foram excluídas dos campos destinados a aminoácidos por contribuírem para a desestabilização de estruturas do tipo α -hélice. Posteriormente, foi feita uma nova busca mais permissiva, em que nos campos destinados a resíduos polares foram permitidos os resíduos: A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W e Y.

3.2.2. Seleção de potencial IAP com estrutura do tipo folha- β

A mesma lista utilizada na seleção anterior, contendo 80 proteínas superexpressas no plasma humano quando este é exposto a uma infecção viral (listadas no Anexo B), foi submetida ao software Kamal 2.0 visando identificar peptídeos encriptados curtos que possam se estruturar em folha- β e que apresentem propriedades físico-químicas que os predisponham a ter atividade antimicrobiana. Para serem inseridas no programa, suas respectivas estruturas primárias foram obtidas no formato .fasta por meio do banco de dados UniProt (www.uniprot.org). Para isso, o software Kamal foi configurado para identificar, dentro desta lista de proteínas, sequências peptídicas com carga maior ou igual a 2 e com no máximo 11 resíduos de aminoácidos alternados entre polares e apolares. Ou seja, foram buscadas sequências com periodicidade do tipo $X_1Y_1X_2Y_2X_3Y_3$, em que X representa resíduos polares e Y resíduos apolares.

3.3. Síntese dos peptídeos

Os peptídeos deste trabalho foram sintetizados em Fase Sólida (SPFS) de acordo com o protocolo organizado por W. C. Chan e P.D. White em uma escala de 0,15 mmol.¹⁰ Nesse método, o peptídeo é sintetizado ancorado a uma resina e o protocolo apresenta 4 etapas, que serão detalhadas abaixo:

Etapa 1: Solvatar a resina

Foi utilizada uma seringa com um filtro sinterizado no fundo na qual foram adicionados 215 mg de resina (Rink Amide AM resin – 0,7 mmol/g) e aproximadamente 2 mL de diclorometano (DCM) que foram agitados a 200 rpm por 30 min com o objetivo de solvatar a resina. Em seguida, o solvente foi removido com o auxílio de uma bomba de vácuo, ficando retido na seringa apenas a resina solvatada.

Etapa 2: Desproteção

Esta segunda etapa é necessária antes de cada acoplamento de aminoácido, para a remoção do grupo de proteção 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) presente na resina e nos derivados de aminoácidos. Para esta desproteção, são adicionados 2 mL de 4-metilpiperidina em *N,N*-dimetilformamida (DMF) 1:4 (V:V) na seringa contendo a resina. Esta suspensão é agitada a 200 rpm por 15 min. Esse processo é realizado em duplicata para garantir uma melhor eficiência da desproteção. Em seguida, é feita em triplicata a lavagem alternada da resina (ou peptidil-resina) contidos na seringa com cerca de 4 mL de DMF, seguido de 4 mL DCM em triplicata. Para a confirmação da desproteção, é feito o teste de Kaiser¹⁰ em uma pequena alíquota desse material, conforme será descrito posteriormente.

Etapa 3: Acoplamento de aminoácido

O acoplamento pode ser feito por meio de duas rotas sintéticas diferentes: rota DIC/Oxyma ou rota HBTU/DIPEA. Na rota DIC/Oxyma, o acoplamento é realizado utilizando *N,N'*-diisopropilcarbodiimina (DIC) e acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino) (oxyma Pure). Na seringa contendo o material desprotegido, são adicionados 4 equivalentes (0,6 mmol) da quantidade de resina utilizada do aminoácido com o *N*-terminal protegido, conforme os valores de massa listados no Anexo C. Em seguida, são acrescentados 4 equivalentes de oxyma Pure (85,3mg), 2 mL de DMF e 93 µL de DIC (que também correspondem a 4 equivalentes da quantidade de resina). Depois, esta suspensão é colocada sob agitação a 200 rpm por 1 hora e 30 min. Após este tempo, o solvente é retirado e é feita em triplicata a lavagem do sólido retido na seringa com cerca de 4 mL de DMF, seguido de 4 mL DCM.

Na rota HBTU/DIPEA, na seringa contendo o material desprotegido, são adicionados 4 equivalentes (0,6 mmol) da quantidade de resina utilizada do aminoácido com o *N*-terminal protegido, conforme os valores de massa listado no Anexo C. Em seguida, adiciona-se 227,6 mg (4 equivalentes) de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-

tetrametilurôniohexafluorofosfato (HBTU) e 139 μL de *N,N'*-diisopropiletilamina (DIPEA). Nesta rota, a suspensão permanece em agitação por 1h. Após este tempo, como na rota anterior, o solvente é retirado e é feita, em triplicata, a lavagem. Além disso, em ambas as rotas a confirmação do acoplamento ocorre por meio do teste de Kaiser.¹⁰

Neste trabalho, a rota DIC/Oxyma foi utilizada preferencialmente. Vale ressaltar que esta síntese se inicia pelo aminoácido C-terminal e que a cada novo aminoácido a ser acoplado, a etapa 2 deve ser realizada.

Etapa 4: Clivagem

Após o acoplamento do último derivado de aminoácido (aminoácido N-terminal), para separar o peptídeo da resina, foi realizado o processo de clivagem. Para isto, inicialmente, foi feita a desproteção (etapa 2) do fmoc da peptidil-resina. Em seguida, em um tubo falcon, foi preparado um “coquetel” de clivagem composto pelos seguintes reagentes: TFA/tioanisol/água/fenol/etanoditiol na proporção 82,5:5:5:2,5 (v/v).¹⁰ Em seguida, foi adicionado a este tubo o sólido seco do peptídeo desprotegido preso a resina, e esta mistura permaneceu em agitação a 200 rpm por 1h e 30 min. Após este intervalo, o TFA foi evaporado em fluxo de argônio, e éter diisopropílico foi utilizado para precipitar o peptídeo e a resina, com posterior filtração e descarte da fase etérea, já que o peptídeo e a resina ficam retidos no filtro. Em seguida, o peptídeo foi solubilizado com uma mistura de acetonitrila/água 1:1 (v/v), ficando retido no filtro apenas a resina. Posteriormente, o peptídeo solubilizado em acetonitrila/água foi liofilizado no Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Teste de Kaiser:

É um teste de caráter qualitativo que indica a presença de aminas livres quando a coloração da resina fica azul escura.¹⁰ Ou seja, após a desproteção, a resina assume uma coloração azul escura e depois de um acoplamento efetivo não ocorre mudança de coloração na resina, em virtude da ausência de aminas livres.

Para a realização deste teste, uma pequena alíquota da resina foi retirada da seringa e colocada em um tubo de ensaio. Em seguida, foi adicionado ao tubo de ensaio 1 gota de cada uma das soluções abaixo:

- 5% de ninidrina em etanol (m/v);
- 80% de fenol em etanol (m/v); e
- Cianeto de Potássio em piridina (2 mL 0,001 mM KCN em 98 mL de piridina).

Após isto, o tubo de ensaio foi aquecido a 120°C por aproximadamente 2 min e foi verificado se houve mudança na coloração da resina.¹⁰ É importante ressaltar que, neste trabalho, este teste foi realizado após todas as desproteções e acoplamentos a fim de confirmar a efetividade dessas etapas.

3.4. Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Com o intuito de eliminar possíveis resíduos de síntese, os peptídeos sintetizados foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NUPMIA) da Universidade de Brasília. A purificação foi realizada em cromatógrafo Shimadzu (Japão) equipado com um sistema binário de bombeamento (LC-20AR), detector de arranjo de diodo (DAD, SPD-M20A), injetor manual e sistema de análise e processamento de dados LabSolutions versão 5.92. Na coluna preparativa de fase reversa Jupiter C18 (250 x 21,2 mm, 10 µm, 300 Å) da phenomenex foram injetados 20 mg/mL do produto. A fase móvel utilizada foi um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA /água +0,1% TFA (ACN + TFA/água + TFA) a 10 mL/min. O gradiente utilizado apresenta o seguinte perfil:

- 0 – 5min: 5% de ACN + TFA;
- 5 – 45 min: 5 - 95% de ACN + TFA;
- 45 – 55 min: 95 % de ACN + TFA;
- 55 – 60 min: 5% ACN + TFA.

Para a detecção, foram monitorados os comprimentos de onda de 216 nm e 280 nm que correspondem respectivamente ao comprimento de onda da absorção da ligação peptídica e da absorção de cadeias laterais com moléculas aromáticas. Por fim, frações contendo o peptídeo puro foram coletadas e posteriormente liofilizadas no Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3.5. Confirmação do peptídeo por Espectrometria de Massa

Os produtos da purificação foram submetidos a EM para comprovar a identidade dos peptídeos sintetizados com base na razão massa/carga. Para isto, foi utilizado o Espectrômetro de Massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex 3, Bruker Daltonics) disponibilizado pelo Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. O peptídeo foi misturado, na proporção 3:1, a uma solução matriz de 10 mg.mL⁻¹ de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% (v/v) de acetonitrila e 0,3% (v/v) de TFA. Em seguida, a mistura foi aplicada na placa de MALDI que, então, foi seca a atmosfera ambiente. Para a calibração do equipamento, foi depositado também na placa uma mistura de calibrantes externos (peptide calibration standard II Bruker) com a matriz. Então, os produtos foram analisados em modo refletor positivo e íon de massa/carga de cada peptídeo foi então fragmentado, via LIFT⁶⁶ para a confirmação da sequência.

3.6. Quantificação dos peptídeos

A quantificação dos peptídeos sintetizados foi realizada por espectroscopia UV-Vis com o auxílio do espectrofotômetro UV-1280 da SHIMADZU no Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NUPMIA) da Universidade de Brasília. Para isto, uma alíquota do peptídeo puro e liofilizado (cerca de 4 mg) foi solubilizada em 500 µL de água ultrapura. Após solubilização, 2 µL desta suspensão foram adicionados a 998 µL de água ultrapura, e a suspensão diluída teve os valores de absorbâncias nos comprimentos 205, 215 e 225 nm medidos. Esta diluição foi feita com o intuito de manter os valores de absorbância medidos abaixo do limite superior da Lei de Beer-Lambert (0,7 u.a.). Para o cálculo da concentração, foi utilizada a fórmula abaixo^{67,68}:

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

$$X = A_{205} \times 31$$

$$Y = (A_{215} - A_{225}) \times 144$$

Em que:

FD = Fator de diluição;

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.

3.7. Avaliação da concentração mínima inibitória dos peptídeos

Para avaliar o potencial antimicrobiano dos peptídeos foi utilizado o teste de suscetibilidade de microrganismo em diluição em caldo, conforme os protocolos M7-A10, M27-A3 e M38-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).⁶⁹ Para isto, inicialmente foram selecionados 5 microrganismos listados na Tabela 2. Em seguida, os peptídeos que apresentassem atividade contra algum destes microrganismos seriam avaliados frente as bactérias relacionadas na Tabela 3. Todos os microrganismos testados foram obtidos a partir da biblioteca de microrganismos da Universidade Católica de Brasília (UCB) e os testes foram realizados no Laboratório de Análise de Biomoléculas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da UCB. Os peptídeos na faixa de concentração de 128 μM a 0,5 μM foram incubados por 24 h a 37 $^{\circ}\text{C}$, em meio de cultura líquido, com bactérias ou fungos nas concentrações finais 5×10^5 células. mL^{-1} e $2,5 \times 10^3$ células. mL^{-1} , respectivamente. Este procedimento foi realizado em meio Mueller-Hinton (Himedia) para bactérias e em meio RPMI 1640 pH 7,0 (Sigma) para fungos. Como controle positivo foi utilizado o peptídeo Hs02 ou Gentamicina. Como controle negativo foram utilizados os microrganismos em seus respectivos meios de crescimento. Além disso, para garantir a esterilidade do meio de cultura, foi feito um controle deste na ausência de peptídeos e microrganismos. Após o período de incubação, a concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos contra cada microrganismo foi avaliada visualmente, sendo o meio turvo considerado como resultado sem inibição e meio límpido como resultado com inibição.

Tabela 2. Microrganismos utilizados para o teste inicial de concentração inibitória mínima.

Microrganismos		
Gram-positiva	Bactérias Gram-negativa	Fungos
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028
-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Cryptococcus neoformans</i> B-3501A

Tabela 3. Microrganismos utilizados para testar os peptídeos que apresentassem atividade no teste preliminar de concentração inibitória mínima.

Bactérias	
Gram-positiva	Gram-negativa
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli enterohemorrágica</i> O157: H7 (EHEC)
<i>S. aureus Multiresistente</i> 3730520 (HRAN)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883
<i>E. faecalis</i> ATCC 10181	<i>K. pneumoniae Carbapenemase</i> (KPC) 001450421 (Lacen)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>Acinetobacter baumannii</i> 003324845 (HRAN)
Isolados de Mastite <i>S. aureus</i> 111 <i>S. aureus</i> 117 <i>S. aureus</i> 118	-

3.8. Ensaio de Viabilidade celular – MTT

O peptídeo que apresentou atividade antimicrobiana foi nomeado de Hs10 e teve a sua viabilidade celular testada em células do tipo Fibroblasto Humano (Detroit 551), no Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NUPMIA) da Universidade de Brasília. Essas células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco BRL, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, EUA) e 1% de solução de antibiótico (penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10 mg/mL, Sigma-Aldrich, EUA), em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂.

Para este ensaio, os fibroblastos foram distribuídos em placa de cultura de 96 poços a uma densidade de 3×10^3 e mantidos por 24 h em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após este tempo, as células foram tratadas com o Hs10 nas concentrações 16, 32, 64, 128, 256 e 512 uM e, em seguida, incubadas por 48 horas a 37°C e 5% de CO₂ em atmosfera úmida. Para o controle de morte celular, foi utilizado dimetilsulfóxido 30% (DMSO). Para o controle de viabilidade, foram utilizados fibroblastos em meio de cultura DMEM. Além disso, poços contendo meio (DMEM) sem células foram usados como branco. Após o período de incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do corante brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich, EUA). Para isto, o meio foi removido e foi adicionado um novo meio contendo 5 mg.mL⁻¹ de MTT em PBS, pH 7,0. Depois, as placas foram incubadas

novamente a 37 °C por 2 h, para a redução do MTT. Em seguida, DMSO P.A. (100 µL) foi adicionado para dissolver os sais de formazan produzido pelas células vivas e a absorbância foi medida a 595 e 570 nm em leitor de microplacas SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices, EUA). Os valores da viabilidade celular foram analisados usando o teste de Kolmogorov-Smirnov, usando GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Softwares, EUA). Foi empregado análise de variância (ANOVA) seguida por teste de comparações múltiplas de Bonferroni para verificar as diferenças estatísticas entre os grupos. Diferenças entre médias com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. A concentração correspondente à metade do efeito inibitório máximo (IC50) foi determinada por regressão não-linear com intervalo de confiança de 95%. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

3.9. Teste de sinergismo

O peptídeo Hs10 foi submetido a testes de sinergismo (*checkerboard*) com o peptídeo Hs02. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Análise de Biomoléculas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da UCB. Para isto, foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922) e o teste de suscetibilidade de microrganismo em diluição em caldo, conforme os protocolos do CLSI. Combinações de concentrações do Hs10 com o Hs02 (Figura 8) foram incubadas em uma placa de 96 poços, em meio de cultura líquido com a bactéria na concentração final 5×10^5 células.mL⁻¹. Este procedimento foi realizado em meio Mueller-Hinton (Himedia). Como controle positivo, foram utilizados o Hs02 e o Hs10 sozinhos na concentração do CIM, enquanto como controle negativo foi utilizado a *Escherichia coli* em seu meio de crescimento. Além disso, para garantir a esterilidade do meio de cultura, foi feito um controle deste na ausência de peptídeos e microrganismos. A CIM das combinações dos peptídeos contra o microrganismo foi verificada após o período de incubação. Para avaliar um possível efeito sinérgico entre esses peptídeos, foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (FICI) destas combinações com a equação abaixo⁷⁰:

$$FICI = ICI_A + ICI_B = \frac{CA}{CIMA} + \frac{CB}{CIMB}$$

Em que, CIMA e CIMB são os valores dos peptídeos testados independentemente, enquanto CA e CB são as concentrações dos peptídeos em concentração isofetiva.

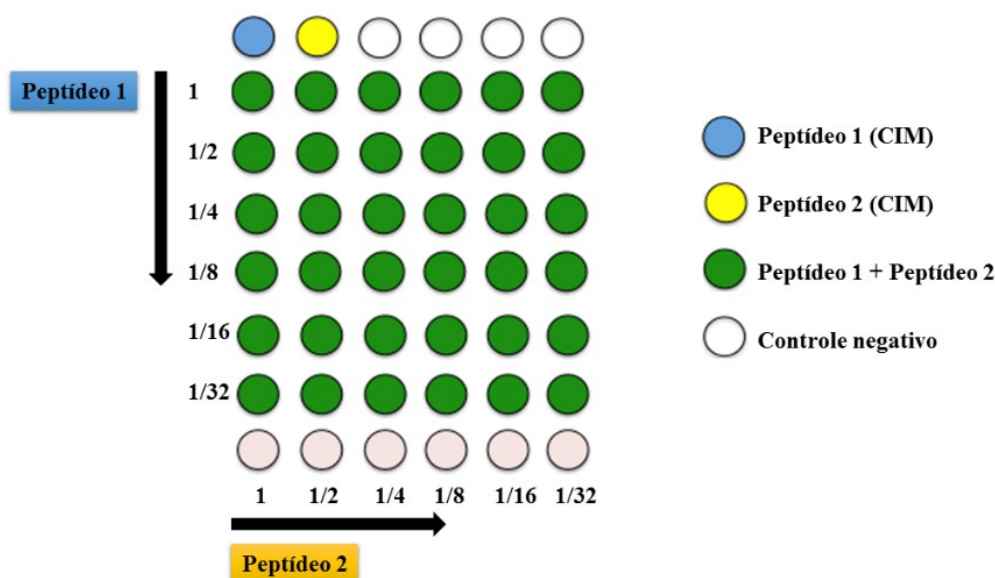


Figura 8. Desenho esquematizado da placa com a combinações de peptídeos testadas no ensaio de sinergismo.

3.10. Dicroísmo Circular (CD)

Para o estudo da estrutura secundária do peptídeo Hs10 em meios miméticos, LUVs compostas de 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DMPC) e 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-glicerol (DMPG) e o lipopolissacarídeo (LPS) foram utilizados. Para isto, várias suspensões contendo 40 μ M do peptídeo e diferentes concentrações de LUVs e LPS em tampão PBS (fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4) foram preparadas (Tabela 4). Essas suspensões foram analisadas em espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco International Co., Japão) no Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para a avaliação da estrutura. Os espectros foram obtidos a temperatura ambiente (25 °C), em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, com janela espectral de 200 a 260 nm, com um intervalo de 0,2 nm e tempo de resposta de 0,5 s. Os espectros finais foram obtidos pelo acúmulo de 4 varreduras.

Tabela 4. Concentrações e razão molar de lipídeos e de peptídeo utilizada nos experimentos de CD.

Peptídeo (μM)	LUVs		[Hs10] / [LPS]
	DMPC (μM)	2:1 DMPC:DMPG (μM)	
40	0	0	0
40	40	40	1
40	80	80	2.5
40	160	160	5
40	320	320	7,5
40	640	640	10
40	1280	1280	20
40	2000	2000	-

3.11. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Para avaliar as interações intermoleculares entre o IAP Hs10 e o LPS, ensaios de microcalorimetria foram realizados no Laboratório de Biofísica molecular da UnB. Inicialmente, as soluções de Hs10 ($4\mu\text{M}$) e LPS ($88\mu\text{M}$) em PBS pH 7,4 foram degaseificadas sob vácuo. Em seguida, com o auxílio do microcalorímetro Microcal VP-ITC (Malvern), foram feitas adições sucessivas de 10 μL de LPS na célula experimental contendo 2 mL de Hs10. Além disso, um experimento de controle foi realizado para determinar o calor de diluição do LPS. Para isso, adições sucessivas de 10 μL de LPS foram feitas na célula experimental contendo 2 mL de PBS. Todos os experimentos foram realizados a 25°C , com potência de referência ajustada em $8\ \mu\text{cal} / \text{s}$ e velocidade de agitação da seringa de 350 rpm.

3.12. Espalhamento de Luz (DLS)

O raio hidrodinâmico (RH) de diferentes proporções de HS10 em LPS ($19\mu\text{g}/\text{mL}$) (10:1; 20:1; 40:1 e 80:1) foram determinados em suspensão por espalhamento dinâmico de luz (DLS) no Laboratório de Biofísica molecular da UnB. Estas experiências foram realizadas num Zeta Sizer Nano-ZS, Malvern Instruments, a 25°C . Para isso, as amostras foram centrifugadas (a 130 rpm por 5min), degaseificadas (com o auxílio de uma bomba de vácuo por 5min) e mantidas em repouso por 15 min. Em seguida, utilizou-se o laser He-Ne com comprimento de onda de $633\ \text{nm}$ para medições, em ângulo de 173° , com

detecção de retroespalhamento. Os dados dos resultados das proporções de Hs10 em LPS vs. RH correspondem à média das triplicatas realizadas. A análise estatística foi realizada utilizando o GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Softwares, EUA).

3.13. Microscopia de Força Atômica (AFM)

Dados de AFM foram obtidos pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, UFPI. Para isto, a determinação da CIM do peptídeo foi realizada a partir de uma diluição seriada de razão 2 com concentração variando de 458 - 0,9 μM . O experimento foi conduzido de acordo com a CLSI (2015) em microplacas de 96 poços, em caldo Mueller-Hinton (Difco TM) contra bactéria Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Para execução do experimento, as bactérias foram cultivadas previamente em ágar Mueller-Hinton (Difco TM) por 24 h a 35 ± 2 °C, em condições aeróbicas. O inóculo bacteriano utilizado no experimento foi realizado a partir das colônias isoladas. Inicialmente, a concentração bacteriana foi padronizada em solução salina estéril (0,85% *m/v*) no 0,5 da escala de McFarland, ou seja, 10^8 UFC/mL (0,08 a 0,13 de absorbância em 625 nm). A partir desta suspensão bacteriana o inóculo para o experimento foi confeccionado em caldo Mueller-Hinton em uma concentração bacteriana final de 5×10^5 UFC/mL. A Figura 9 mostra o esquema da placa para o experimento.

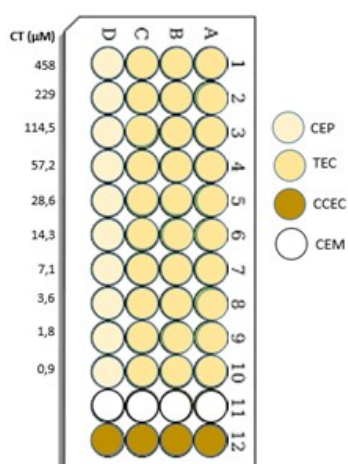


Figura 9. Esquema do experimento para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do peptídeo. CT – Concentração teórica do peptídeo, CEP – Controle de esterilidade do peptídeo, TEC - Teste em triplicata contra *Escherichia coli*, CCEC – Controle de crescimento de *Escherichia coli*, CEM – controle de esterilidade do meio de cultura.

Após 24 h de incubação em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C, o resultado foi observado visualmente para determinação da menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano (CIM). Em seguida, foram retirados 20 µL do poço equivalente à sub-CIM do peptídeo (14,3 µM) contra *Escherichia coli* (tratada) e do poço do controle de crescimento da mesma bactéria (não-tratada), em seguida esta alíquota foi depositada em uma superfície de vidro limpa. As amostras foram lavadas duas vezes com água destilada para retirada de sais do meio de cultura e, após a secagem das amostras, realizou-se a análise morfológica das bactérias tratadas e não tratadas em um equipamento TT-AFM (AFM Workshop, EUA) em modo contato intermitente (*tapping mode* ou *vibrating*) com 512 x 512 pixels (10 µm x 10 µm).⁷¹ As imagens foram obtidas utilizando-se sondas (*cantilevers*) TAP300-G-10 (TED PELLA, INC) de silício, com frequência de ressonância de, aproximadamente, 237 kHz. O programa Gwyddion 2.47 foi usado para analisar as imagens obtidas.

3.14. Determinação da estrutura por RMN em LPS

O peptídeo Hs10 liofilizado foi solubilizado em 550 µL de H₂O / D₂O (90:10, v/v), pH 4, resultando em uma concentração final de 1 mM. Adicionalmente, 0,5% de 2,2,3,3-*d*₄-3-trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-*d*₄) foi utilizado como padrão interno para referência de deslocamento químico (0 ppm). Para a determinação da estrutura foram obtidos espectros do peptídeo puro em solução aquosa e após a adição de 10 µM de LPS a 25 °C.

Todos os experimentos de RMN de ¹H foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III HD 600 operando a 600 MHz (14 T) para ¹H, a 25 °C. A atribuição dos sinais de ressonância do peptídeo foi realizada por meio de experimentos bidimensionais (2D): ¹H-¹H TOCSY e ¹H-¹H NOESY. Os espectros 2D foram adquiridos com 4096 pontos complexos e 512 incrementos τ₁. O sinal da água foi atenuado com a sequência de pulso denominada *excitation sculpting*. Os espectros de ¹H-¹H TOCSY foram obtidos com um tempo de mistura (*mixing time*) de 80 ms, SW de aproximadamente 10 ppm, NS 64 e DS 32. Os espectros de ¹H-¹H NOESY foram registrados com um tempo de mistura (*mixing time*) de 200 ms, SW de aproximadamente 10 ppm, NS 64 e DS 16. Os espectros foram processados usando o software TOPSPIN e os mapas de contorno foram visualizados usando o software CCPNMR⁵⁴ (versão 2.4). A atribuição dos deslocamentos

químicos de ^1H e os cálculos de estrutura foram realizados conforme mencionado no item 3.1.

4. Resultados e Discussão

4.1. Estrutura do peptídeo Hs02 por RMN

Em estudos anteriores pelo nosso grupo de pesquisa, o IAP Hs02 (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂) foi encontrado em sua proteína parental (miosina não convencional-Ih) com o auxílio do *software* Kamal. Estudos preliminares demonstraram que o peptídeo Hs02 possui uma potente atividade antimicrobiana.¹¹ Como descrito anteriormente, para compreender a ação antimicrobiana de um peptídeo, é importante conhecer sua estrutura. Assim, neste trabalho, a estrutura 3D do Hs02 foi investigada por espectroscopia de RMN em solução na presença de micelas DPC-*d*₃₈, que são um modelo mimético de membrana adequado para estudos estruturais por RMN.

Para isso, espectros de ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^1H NOESY do peptídeo Hs02 (Figuras 10 a 12 e Anexo A) foram obtidos e analisados de acordo com a metodologia desenvolvida por Wüthrich.¹⁹ Os experimentos de ^1H - ^1H TOCSY apresentam sinais de correlações cruzadas de um mesmo sistema de spin, enquanto experimentos de NOESY, por meio do NOE, apresenta informações sobre a vizinhança espacial dos núcleos (inter e intraresidual).¹⁹ As figuras 10 a 12 destacam a ampliação do espectro de ^1H - ^1H TOCSY e NOESY da região de impressão digital (NH-H α) do IAP Hs02 e da região de interação NH-NH que são essenciais para a determinação estrutural. Assim, a análise conjunta desses experimentos de RMN permite que os sinais referentes aos hidrogênios de cada resíduo de aminoácido deste peptídeo sejam atribuídos aos seus respectivos deslocamentos químicos. Esses resultados estão apresentados na Tabela 5 e depositados no banco de dados BMRB (*Biological Magnetic Data Bank*) com número de acesso 30509. O Anexo G apresenta uma lista com as estruturas e a identificação padrão dos átomos hidrogênios dos resíduos de aminoácido, conforme o BMRB.

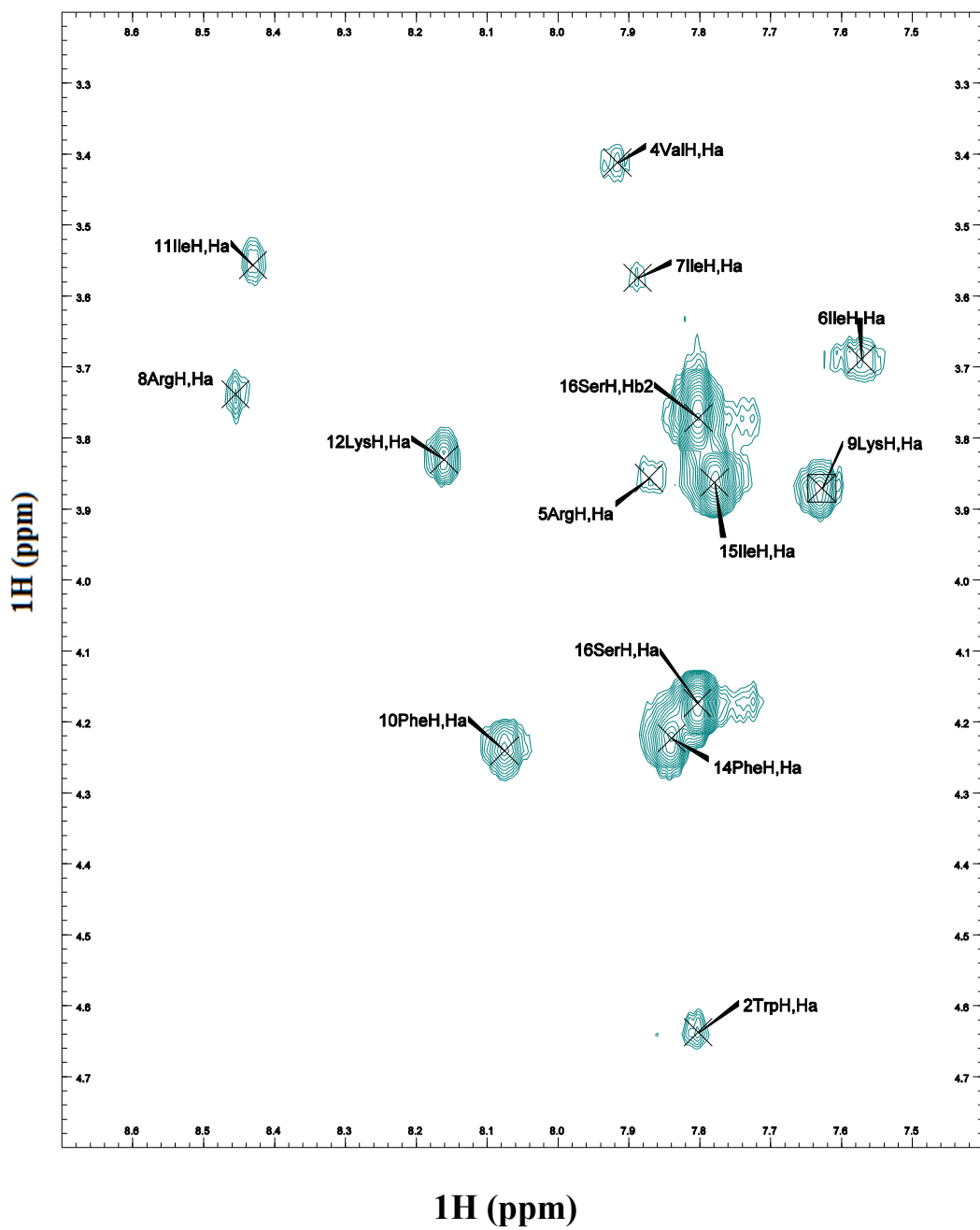


Figura 10. Região NH-H α do espectro de ^1H - ^1H TOCSY do IAP Hs02 (2 mM) na presença de 50 mM de DPC- d_{38} a 25 ° C e pH 7.

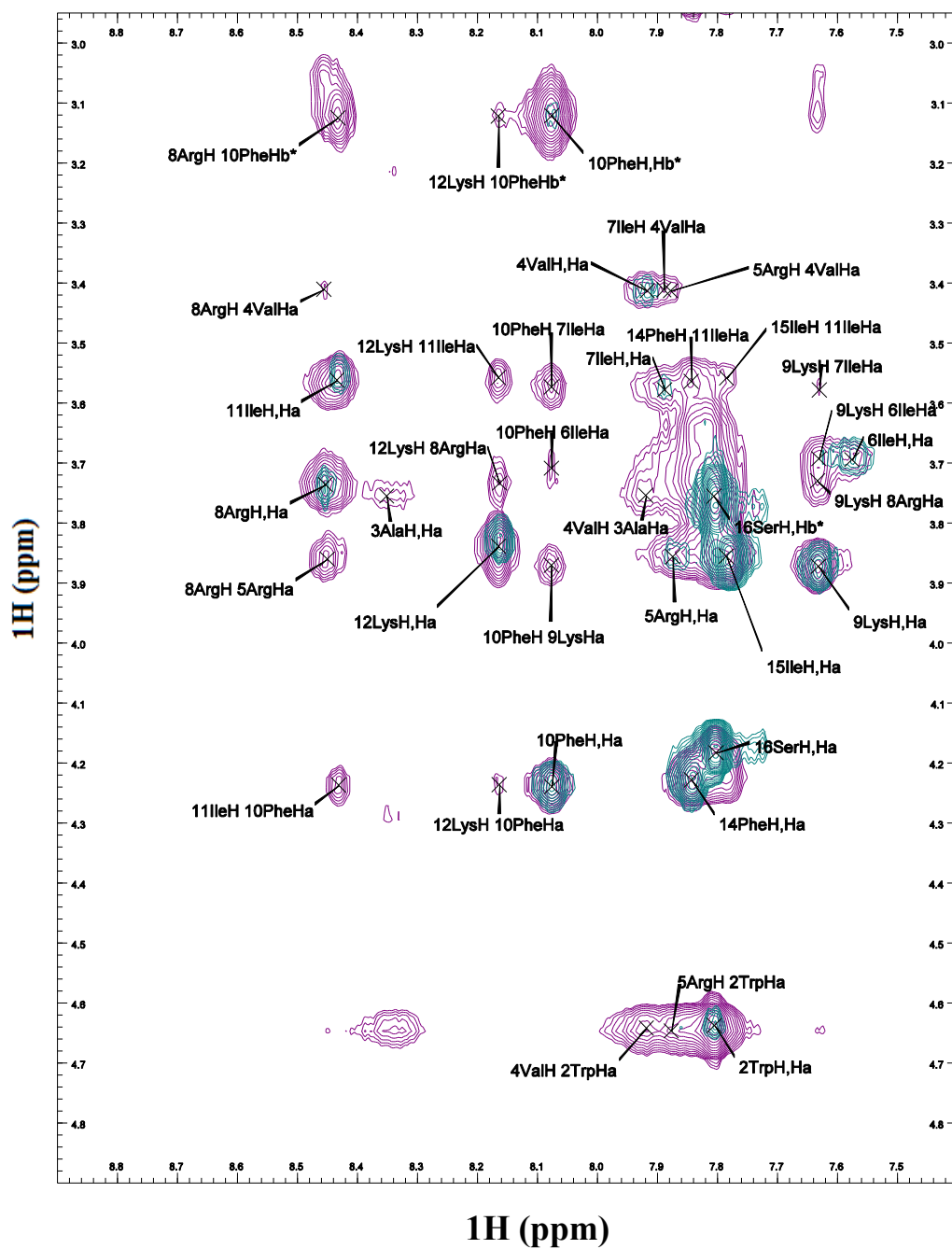


Figura 11. Região NH-Ha dos espectros de ^1H - ^1H TOCSY (azul) e ^1H - ^1H NOESY (roxo) sobrepostos, obtidos para 2 mM do peptídeo Hs02 na presença de 50 mM de DPC- d_{38} a 25 ° C e pH 7.

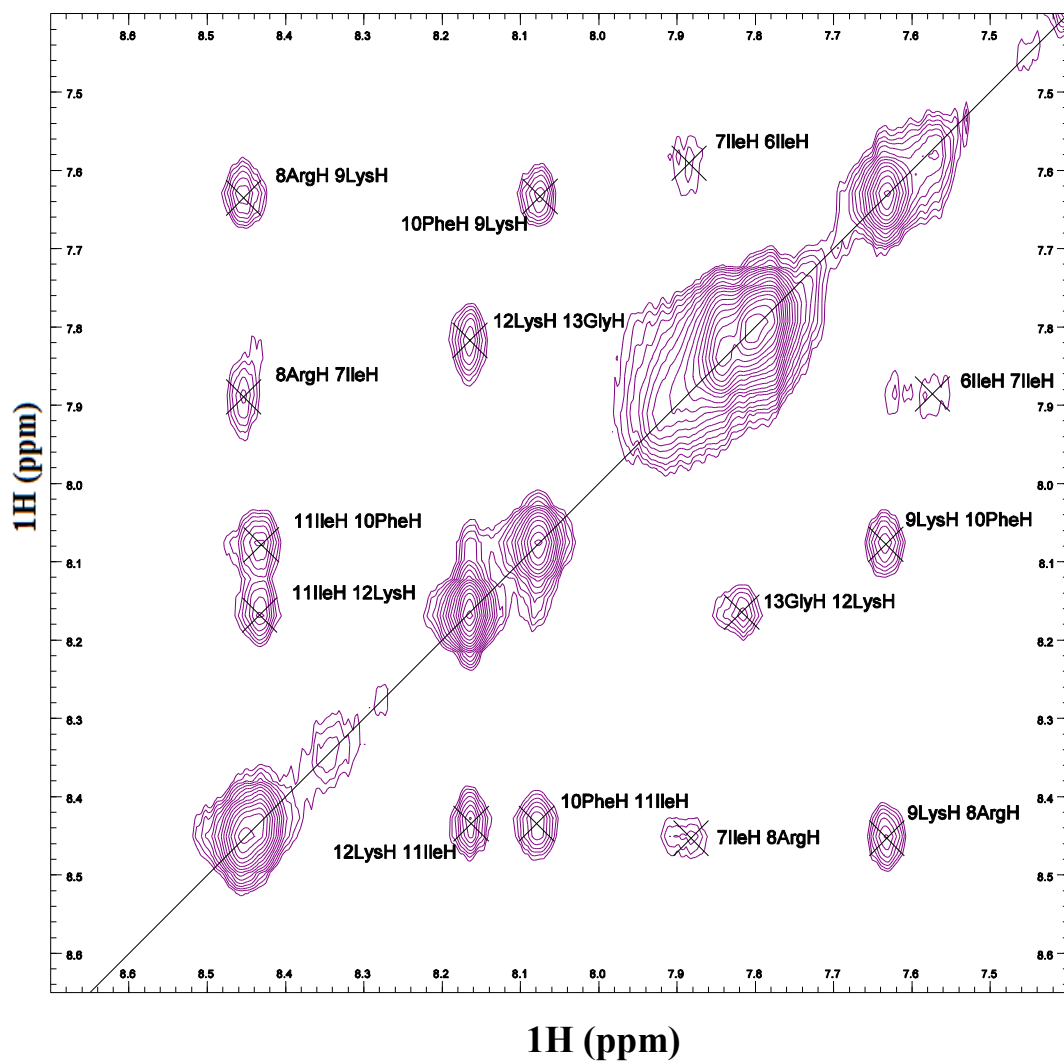


Figura 12. Região NH-NH do espectro de ^1H - ^1H NOESY, obtido para 2 mM do peptídeo Hs02 na presença de 50 mM de DPC- d_{38} a 25 ° C e pH 7.

Tabela 5. Valores de deslocamento químico de ^1H (ppm) dos resíduos de aminoácido do peptídeo Hs02 (2 mM) em solução com DPC-d38 (50 mM) a 25 °C e pH 7.

Resíduo	δ_{NH}	$\delta_{\text{H}\alpha}$	$\delta_{\text{H}\beta}$	δ_{outros}
Lys1	-	-	-	-
Trp 2	7,81	4,64	-	δ 7,31; ϵ 10,62; ζ 7,35 / 6,82; η 6,93
Ala 3	8,35	3,75	1,07	-
Val 4	7,92	3,41	1,97	γ 0,91 / 0,84
Arg 5	7,88	3,86	1,80	γ 1,61; δ 3,04
Ile 6	7,58	3,69	1,81	γ 1,35 / 0,74; δ 0,66
Ile 7	7,89	3,57	1,82	γ 1,14 / 0,81; δ 0,68
Arg 8	8,45	3,74	1,79	γ 1,46 / 1,64; δ 3,05
Lys 9	7,63	3,87	1,82	γ 1,40 / 1,27; δ 1,53; ϵ 2,80
Phe 10	8,08	4,24	3,12	γ 7,09
Ile 11	8,43	3,56	1,90	γ 1,24 / 0,83; δ 0,74
Lys 12	8,16	3,84	1,78	γ 1,43 / 1,30; δ 1,66; ϵ 2,81
Gly 13	7,82	3,73 / 3,94	-	-
Phe 14	7,84	4,23	2,91 / 2,74	δ 7,03
Ile 15	7,79	3,86	1,91	γ 1,19 / 0,83; δ 0,73
Ser 16	7,80	4,18	3,76	-

Com exceção do primeiro resíduo (Lys1), os sistemas de spin dos outros 15 resíduos de aminoácidos foram identificados e atribuídos inequivocamente. Vale ressaltar que o sinal característico do H ϵ 1 (em aproximadamente 10,61 ppm) do Trp permitiu a correta identificação do H α do Trp2, que se encontra próximo a ressonância do hidrogênio da água, por meio do sinal de correlação H ϵ 1- H α . Ademais, a identificação do H α da Ala3 foi feita com base nos sinais de correlação H α -H β exibidos nos espectros de ^1H - ^1H TOCSY, nos sinais de interação interespaial e na correlação NH- H α observados no espectro de ^1H - ^1H NOESY, visto que, este sinal NH- H α da Ala3 não aparece no espectro de ^1H - ^1H TOCSY. Por fim, como não foi possível localizar o sinal de correlação NH-H α da Gly13 no espectro de ^1H - ^1H TOCSY devido à grande sobreposição de sinais, a identificação do sistema de spin deste resíduo de aminoácido foi possível por meio dos

sinais de correlação entre o hidrogênio do grupo NH da Lys12 e o hidrogênio do grupo NH da Gly 13 obtido no espectro de ^1H - ^1H NOESY, além do sinal de correlação $\text{H}\alpha_a$ - $\text{H}\alpha_b$ exibido nos espectros de ^1H - ^1H TOCSY. Os demais resíduos foram atribuídos sem maiores dificuldades.

Uma análise preliminar da estrutura secundária pode ser realizada por meio do índice de deslocamento químico (CSI – *Chemical Shift Index*)⁷² dos átomos $\text{H}\alpha$ da cadeia principal do peptídeo e pelo padrão de conectividade fornecido pelos mapas de contorno dos espectros de ^1H - ^1H NOESY e ^1H - ^1H TOCSY.

O padrão de conectividade (Figura 13) e as restrições de NOE (Tabela 6) mostraram a presença de NOEs de médio alcance, especialmente referente à $\text{H}\alpha$ -HN ($i, i + 3$), $\text{H}\alpha$ -HN ($i, i + 4$), que são típicos de peptídeos estruturados helicoidalmente.

Além disso, os resultados de CSI corroboram o observado nos padrões de conectividade obtidos a partir dos espectros de ^1H - ^1H NOESY. Este índice é calculado com base na diferença observada entre o valor de deslocamento químico médio do $\text{H}\alpha$ em conformação randômica e o valor obtido experimentalmente. O resultado do CSI (calculado pelo programa CCPNMR) indicou que há uma propensão do peptídeo Hs02 a se estruturar de forma helicoidal entre os resíduos Ala3-Phe14 (Figura 13), visto que, nesta região, o CSI apresenta valor negativo. Isto indica que estes núcleos $\text{H}\alpha$ possuem deslocamentos químicos menores do que os valores esperados para o respectivo aminoácido em conformação randômica, o que caracteriza uma tendência a estrutura helicoidal nesta região.

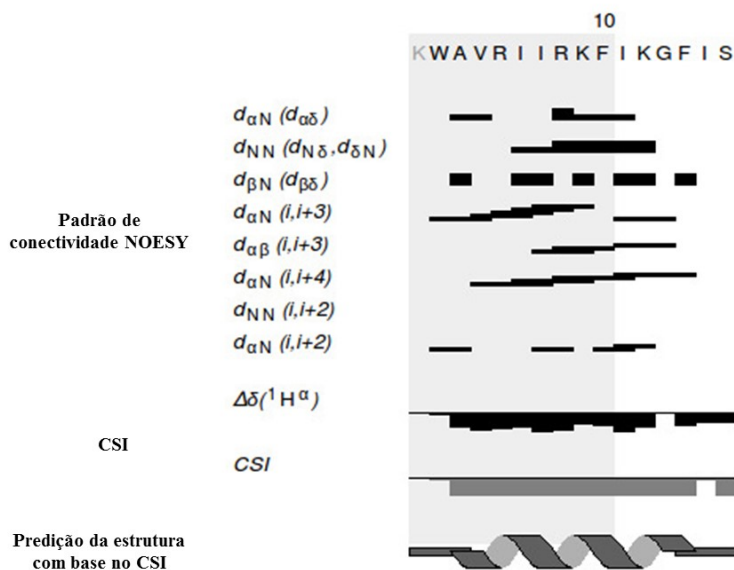


Figura 13. Padrão de conectividades NOE de ^1H sequenciais e de médias distância e padrão de CSI de $\text{H}\alpha$ para 2 mM do peptídeo Hs02 na presença de 50 mM de DPC- d_{38} a 25 ° C e pH 7. A espessura da barra indica as intensidades dos NOEs.

A partir dos dados de 291 restrições de distâncias obtidas pela conversão das informações de volume de NOEs e 24 ângulos diédricos, um conjunto de estruturas foi calculado utilizando-se os programas ARIA/CNS. As restrições angulares foram obtidas pelo programa CCPNMR/DANGLE que faz a predição de ângulos PHI e PSI (ϕ e ψ) com base na sequência de aminoácidos, nos deslocamentos químicos ^1H experimentais e em um banco de dados de estruturas de proteínas conhecidas com seus deslocamentos associados.⁷³ Além disso, as restrições de distância foram reavaliadas diversas vezes, após vários ciclos de cálculos, com o intuito de identificar e corrigir possíveis violações de distância. Ao final desses ciclos, foram selecionadas 10 estruturas de menor energia sem violações de distância que estão apresentadas na Figura 14 . A Figura 14 evidencia a estrutura helicoidal do IAP Hs02 e destaca a sua superfície hidrofóbica/polar, mostrando a natureza anfipática pronunciada deste peptídeo.

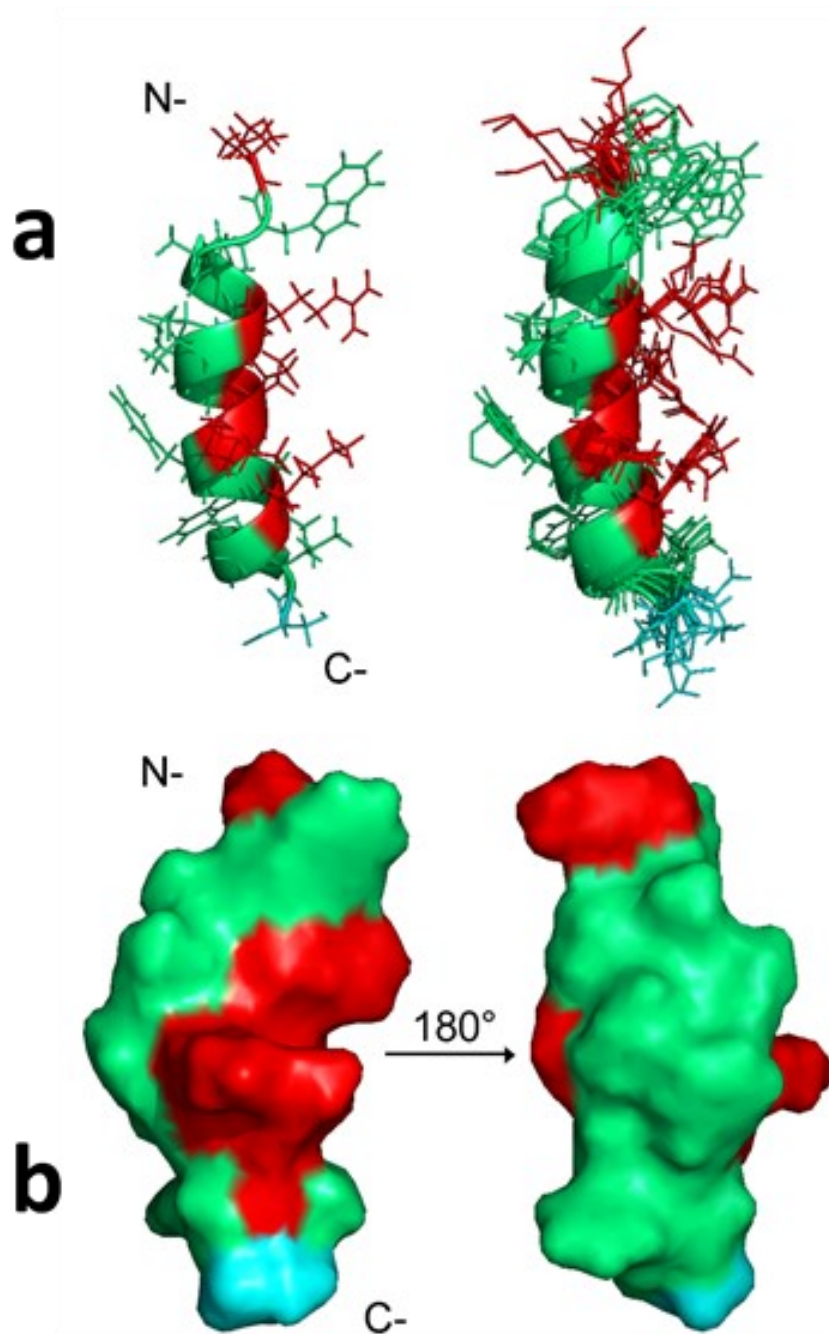


Figura 14. a) Representação em fita da estrutura de menor energia (esquerda) e sobreposição da cadeia principal das 10 estruturas de menor energia do peptídeo HS02 (direita) na presença de micelas DPC-d38. b) Superfície hidrofóbica característica do peptídeo HS02. As propriedades dos aminoácidos da cadeia lateral são mostradas de acordo com o seguinte código de cores: vermelho para os resíduos carregados positivamente, ciano para os resíduos polares e verde para os resíduos hidrofóbicos. A estrutura do lado direito mostra a molécula girada 180° em torno do eixo vertical (PDB: 6MBM).

A análise estatística das estruturas obtidas, que são indicativos da qualidade da estrutura, está relacionada na Tabela 6. Como pode ser observado, os valores de RMSD obtidos são baixos, o que sugere que a família de estruturas obtida é convergente. Além

disso, o valor de RMSD diminui significativamente quando a sobreposição é realizada entre os resíduos Ala3-Phe14. Esse resultado indica que a estrutura do peptídeo Hs02 é bem definida e que as regiões *N*-terminal e *C*-terminal apresentam uma estrutura desenovelada. Somado a isto, a análise do gráfico Ramachandran mostrou que 96,4% dos resíduos de aminoácidos estão nas regiões mais favorecidas do diagrama e 2,9% nas regiões permitidas, indicando uma alta qualidade estereoquímica dos modelos de RMN obtidos para o peptídeo Hs02. Apenas, 0,7% dos resíduos estão localizados em regiões não permitidas. Entretanto, este pequeno número está relacionado a resíduos de aminoácidos localizados na região *N*-terminal do peptídeo que estruturalmente não é bem definida.

Tabela 6. Estatística estrutural par as 10 melhores estruturas de RMN do peptídeo Hs02 na presença de DPC-*d*₃₈ a 25 ° C e pH 7.

Restrições de NOE	
Número total de restrições de distância	291
Número de restrições intraresiduais	207
Número de restrições sequenciais (<i>i</i> , <i>i</i> +1)	40
Número de restrições de alcance médio (<i>i</i> , <i>i</i> + <i>j</i>) _{<i>j</i>=2,3,4}	44
Ângulo Diedro	24
RMSD (Å)^a de todos os resíduos	
Cadeia principal	0,51 ± 0,74
Cadeia principal e lateral	1,27 ± 1,09
RMSD (Å)^{a,b} do segmento em Hélice (Ala3-Phe14)	
Cadeia Principal	0,18 ± 0,11
Cadeia principal e lateral	0,72 ± 0,36
Análise do gráfico Ramachandran^a	
Resíduos em regiões mais favorecidas	96,4%
Resíduos em regiões permitidas	2,9%
Resíduos em regiões não permitidas	0,7%

^aDados fornecidos pelo CCPNMR usando as 10 estruturas de menor energia;

^bRegião entre os resíduos 3 e 14.

Esse estudo estrutural por meio da técnica de RMN demonstrou que, na presença de micelas de 50 mM de DPC-*d*₃₈, o peptídeo Hs02 possui uma estrutura secundária bem definida, apresentando uma α -hélice que se estende entre os resíduos Ala3-Phe14 (Figura 14). Além disso, a estrutura do peptídeo Hs02 apresenta um padrão anfifílico proeminente, com uma face polar enriquecida por resíduos carregados positivamente

(Arg5, Arg8, Lys9, Lys12). Essa estrutura secundária anfifílica com a parte hidrofílica rica em resíduos catiônicos pode ser considerada uma característica essencial para ação do Hs02, uma vez que permite uma interação com a parte hidrofílica da membrana citoplasmática, enquanto sua parte hidrofóbica interage com o núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica, o que contribui para ruptura e a permeabilização da membrana.

Também é possível observar que a região *N*-terminal do peptídeo Hs02 exibiu uma estrutura mais flexível, com o resíduo Trp2 apresentando flexibilidade na cadeia lateral e, com isso, a posição do seu anel aromático não é bem definida. Este resultado pode ter uma influência significativa na atividade da Hs02. O efeito dos resíduos de triptofano em diferentes padrões de ruptura de membrana é bem documentado e, embora Trp seja considerado um resíduo hidrofóbico, sua cadeia lateral não carregada pode se associar aos grupos cabeça positivamente carregadas da bicamada lipídica, como a colina, por interações cátion- π , permitindo que Trp interaja com regiões interfaciais de bicamadas lipídicas.^{74,75}

Este resultado reforça a potencialidade do software Kamal para avaliar fragmentos internos de proteínas que compartilham estruturas α -hélices anfifílicas com características físico-químicas semelhantes aos PAMs conhecidos.

4.2. Seleção de potenciais IAPs

4.2.1. Seleção de potenciais IAPs com estrutura do tipo α -hélice

Estudos realizados com outros peptídeos, em nosso grupo de pesquisa, entre eles o peptídeo Hs02, têm demonstrado que as proteínas humanas são uma fonte rica de material para a bioprospecção de fragmentos encriptados com potencial atividade antimicrobiana.¹¹ Portanto, neste trabalho 80 proteínas humanas (Anexo B) foram selecionadas com o objetivo de identificar novos IAPs. Essas proteínas foram relacionadas por serem superexpressas no plasma humano quando exposto a uma infecção viral, em especial quando contaminado com HIV. De acordo com Toivonen et al.,⁵⁹ a infecção induz uma resposta de fase aguda que é marcada por alterações nas concentrações plasmáticas de várias proteínas. Então, procurou-se nessa resposta preliminar do organismo um fragmento de proteína com possível atividade antimicrobiana.

O resultado da varredura feita pelo *software* Kamal nas proteínas selecionadas gerou diversos fragmentos com características físico-químicas compatíveis com PAMs.^{2,8} Dentre esses fragmentos gerados pelo software Kamal, foram analisadas as propriedades de cationicidade; momento hidrofóbico; hidrofobicidade e uma possível tendência a estruturação em alfa hélice anfifílica na presença de membranas microbianas e foram escolhidos cinco potenciais IAPs que estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Relação de potenciais IAPs selecionados nesse trabalho utilizando-se o software Kamal.

Nome do peptídeo	Sequência primária	Proteína de origem
H05	KTFIEDVnkFLDMLIKKLKS-NH ₂	Apolipoproteína B-100 (P04114)
H06	LLQAAKGLAGAVSELLRSA-NH ₂	Talina-1 (Q9Y490)
H07	KKLVQRLEHAAKQAAA-NH ₂	Talina-1 (Q9Y490)
H08	KKLVQRLEHAAKQAAASA-NH ₂	Talina-1 (Q9Y490)
H09	LNKVARAAA EVAGQFV-NH ₂	Proteína 1 do receptor de transferrina (P02786)

Pra fins de comparação, a Tabela 8 destaca as propriedades dos peptídeos selecionados e apresenta dados de outros peptídeos que, em estudos anteriores, demonstraram eficácia antimicrobiana.

Tabela 8. Dados de propriedades físico-químicas fornecidos pelo KAMAL.

Peptídeo	Nº resíduos	Massa Molecular	Carga líquida	M _H	Hidrofobicidade	Estrutura Esperada**	PI
H05	20	2409,37	+ 2	1,29	-0,65	α -hélice	9,4
H06	19	1867,09	+ 1	0,93	0,01	α -hélice	8,74
H07	16	1761,04	+ 3	1,03	-0,87	α -hélice	10,29
H08	18	1919,11	+ 3	0,93	-0,78	α -hélice	10,29
H09	16	1642,92	+ 1	1,01	-0,16	α -hélice	8,74
Hs02*	16	1961,21	+ 5	1,2	-0,06	α -hélice	12,02
Hs05*	17	2060,24	+ 4	1,24	0,13	α -hélice	12,01

*dados retirados de estudos anteriores^{11,12,37}

Como pode ser observado, o peptídeo H05 apresenta uma carga líquida intermediária e um maior momento hidrofóbico, entretanto, uma baixa hidrofobicidade

quando comparada ao IAP Hs05. Ele faz parte da proteína Apolipoproteína B-100 que atua como um sinal de reconhecimento para a internalização celular de partículas de LDL.⁷⁶

Os peptídeos H06 e H09 apresentam uma baixa cationicidade e os valores de M_H e de hidrofobicidade próximos aos do IAP Hs02. O primeiro faz parte da proteína Talina-1, uma proteína citoesquelética envolvida em conexões células-células, e o segundo da proteína 1 do receptor de transferrina, a qual é necessária para o desenvolvimento dos eritrócitos e do sistema nervoso.⁷⁶

Os peptídeos H07 e H08 foram escolhidos por apresentarem estruturas primárias muito semelhantes e com o intuito de verificar se essas pequenas variações podem interferir de alguma forma em sua atividade. Eles possuem a maior cationicidade entre os peptídeos escolhidos, no entanto, uma hidrofobicidade relativamente baixa, quando comparado com os IAPS Hs02 e Hs05. Ambos são fragmentos da proteína Talina-1.

Essas 5 sequências peptídicas foram consideradas as melhores opções dentre as listadas. Não foram encontradas, dentro das proteínas listadas, sequências com carga líquida positiva alta, fator considerado por alguns autores como um potencializador da atividade.² Entretanto, de acordo com a literatura, existem PAMs com cargas que variam de 0 a +20.² Logo, esse fator não deve ser considerado o único norteador para a seleção. Além disso, para os peptídeos escolhidos, visando à formação de uma estrutura em α -hélice, procurou-se selecionar aqueles que tivessem um maior momento hidrofóbico ou valor próximo ao observado para os IAPs Hs02 e Hs05. Ademais, eles possuem, em sua sequência, resíduos como Ala, Leu e Lys considerados capazes de induzir α -hélice¹⁸ com possível caráter anfifílico, devido à disposição dos resíduos, como ilustrado na Figura 15.

Com relação a hidrofobicidade média, os valores calculados pelo programa para os peptídeos selecionados, em geral, são mais baixos que os observados para Hs02 e o Hs05. No entanto, os peptídeos selecionados, em sua maioria, apresentam em sua estrutura a presença de cerca de 40 a 60% de resíduos hidrofóbicos (Figura 15) como observado em PAMs. Portanto, esses peptídeos foram selecionados para serem sintetizados e testados quanto ao seu potencial antimicrobiano.

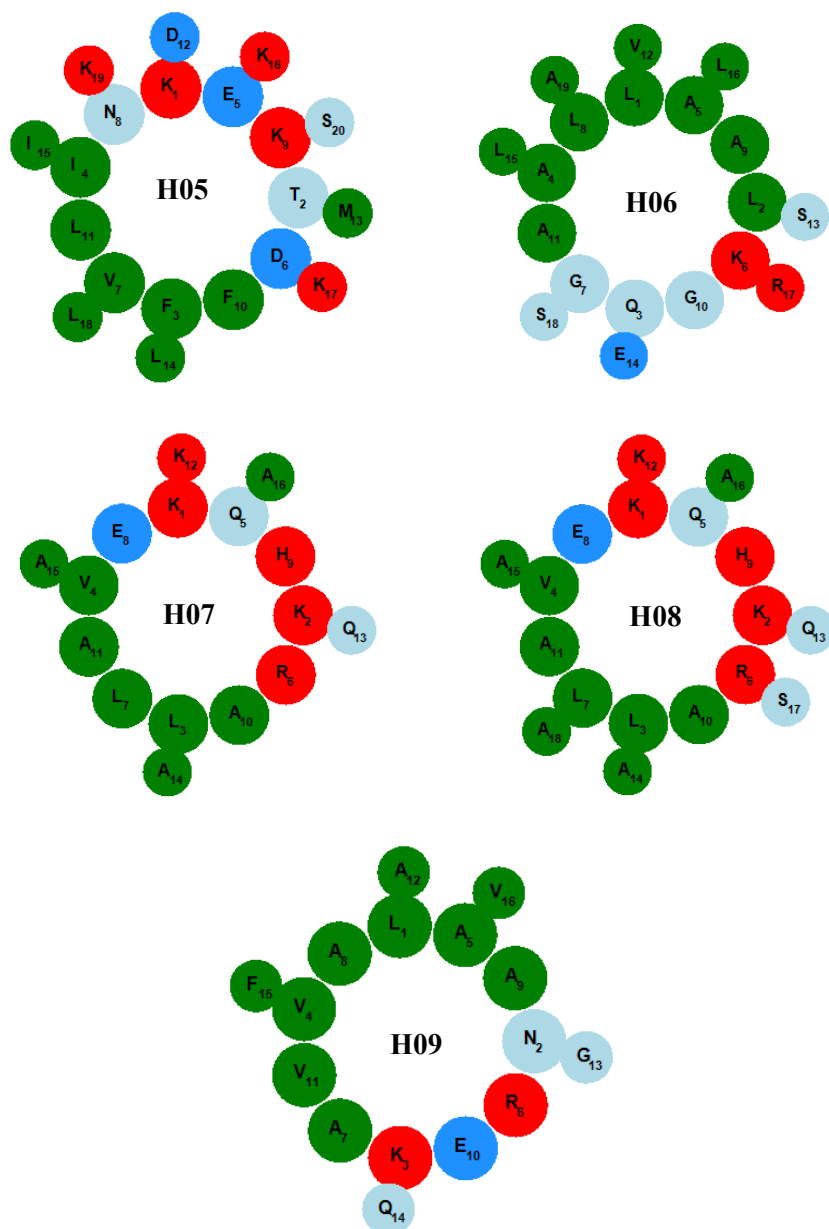


Figura 15. Representação da roda helicoidal dos H05, H06, H07, H08 e H09, sugerindo uma possível estruturação anfifílica. Em verde os resíduos apolares, em azul claro polares, em azul escuro carregados negativamente e em vermelho carregados positivamente.

Cabe ressaltar que é necessário uso de bibliotecas maiores para aumentar a probabilidade de encontrar peptídeos com maior similaridade aos parâmetros selecionados. Pois, neste estudo inicial, o número limitado de proteínas utilizadas para a varredura resultou em peptídeos com propriedades físico-químicas aproximadas as desejadas.

4.2.2. Seleção de um potencial IAP curto do tipo folha- β

Com o intuito de encontrar um fragmento de proteína com possível atividade antimicrobiana na resposta preliminar do corpo humano a uma infecção viral, as proteínas listadas no Anexo B foram submetidas a uma nova varredura no software Kamal. Entretanto, nesta nova busca, parâmetros como o tamanho do fragmento e a disposição permitida de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos foram ajustados para encontrar um possível IAP com organização estrutural em folha- β anfílica na presença de membranas microbianas. O padrão de busca escolhido foi: fragmentos internos de proteínas variando de 7 a 11 resíduos de aminoácidos com alternância de caráter hidrofóbico e hidrofílico e carga líquida $\geq + 2$.

Nesse contexto, o peptídeo Hs10 (KFDLKVTIK-NH₂) foi selecionado de maneira exploratória, uma vez que apresenta características como cationicidade, hidrofobicidade e uma provável estrutura anfílica dada a distribuição dos resíduos compatível com peptídeos antimicrobianos curtos com potencial para romper as membranas. Este fragmento faz parte da proteína C3 complemento, que atua na ativação do sistema complemento que participa do sistema de defesa do organismo.⁷⁶ As propriedades físico-químicas deste fragmento e sua estrutura na proteína fonte (PDB ID 2A73, 1338-1346) são mostradas na Figura 16.

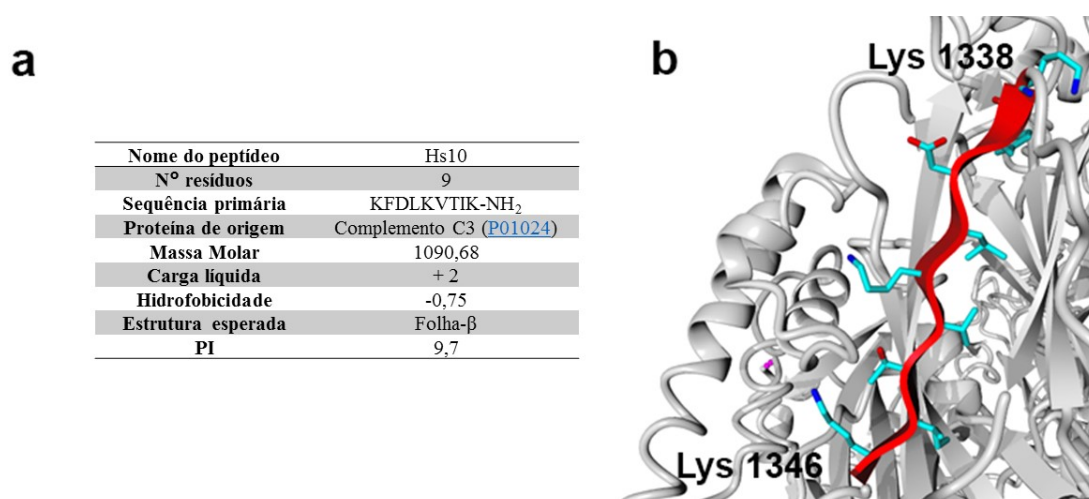


Figura 16. Propriedades físico-químicas fornecidas pelo Kamal do Hs10 em (a), e a estrutura desse fragmento em sua proteína fonte.

4.3. Síntese, purificação e confirmação dos peptídeos sintetizados

Para a síntese em fase sólida dos peptídeos selecionados, a principal rota utilizada foi a DIC/Oxima devido a sua alta eficiência nos acoplamentos. Esporadicamente, foi utilizada a rota HBTU/DIPEA com o intuito de otimizar o tempo de síntese, já que essa rota sintética é mais rápida, entretanto, menos eficiente. Além disso, foi observado que alguns aminoácidos de cadeias laterais volumosas e os últimos resíduos das sequências apresentaram certa dificuldade de acoplamento nas duas rotas. Isso pode ser resultado de impedimento estérico. Nestes casos, para adicionar efetivamente esses resíduos a etapa de acoplamento teve que ser refeita. Este fato não interferiu no resultado, dado que a identidade dos peptídeos pôde ser confirmada por EM, conforme mostra os resultados que serão apresentados posteriormente.

Após a etapa de síntese, os peptídeos foram liofilizados e purificados por CLAE. O Anexo D apresenta os cromatogramas obtidos para cada um dos peptídeos sintetizados. Os tempos de retenção para os peptídeos H05, H06, H07, H08, H09 e Hs10 foram: 32,30; 30,15; 22,02; 31,25; 25,18 e 22,03 min, respectivamente. Dentre os seis peptídeos sintetizados, apenas o H09 não foi apropriadamente purificado pelo perfil de gradiente utilizado, sendo observado a co-eluição de um subproduto (Anexo D, Figura D3).

Após a etapa de purificação, os peptídeos foram analisados por Espectrometria de Massa (Anexo E). Os resultados revelam que as massas obtidas para cada um dos peptídeos estão de acordo com o valor esperado, confirmando assim que a síntese foi bem-sucedida (Tabela 9). No caso do peptídeo H09, a fração eluída em 25,18 min apresenta uma mistura do H09 com um subproduto, provavelmente, um peptídeo com um resíduo de Lys ou Glu a menos, resultado de um acoplamento ineficiente. O Anexo F apresenta a relação da massa isotópica para cada aminoácido, evidenciando a proximidade da massa desses dois resíduos.

Tabela 9. Comparação da massa calculada com a massa obtida por EM.

Peptídeo	Massa calculada* [M+H] ⁺ (Da)	Massa experimental [M+H] ⁺ (Da)
H05	2409,4	2409,5
H06	1867,1	1867,1
H07	1761,1	1761,2
H08	1919,1	1919,2
H09	1642,9	1643,0
Hs10	1090,7	1090,8

*calculado por <http://rna.rega.kuleuven.be/masspec/pepcalc.htm>.

O perfil de fragmentação dos íons [M+H]⁺ de cada peptídeo permitiu a confirmação de suas estruturas primárias. Esta confirmação foi feita com base nos fragmentos de íons das séries complementares y e b encontrados. Esses fragmentos são os mais frequentes de serem observados em espectros de fragmentação de peptídeos, pois resultam da quebra da ligação peptídica que, em geral, são as menos energéticas. A série b é gerada por íons que retêm o próton na região *N*-terminal, enquanto que a sua série complementar y provem de íons que retêm a carga residual no lado *C*-terminal.⁷⁷ A identificação dos resíduos foi obtida pela diferença de valores de *m/z* entre dois íons consecutivos de uma mesma série.

As figuras a seguir mostram os espectros da fragmentação dos íons [M+H]⁺ de cada peptídeo, confirmando a sua respectiva identidade (Figura 17 a Figura 19). Nesses espectros, é possível observar a perda neutra de aproximadamente 17 Da na série b, devido à amidação dos peptídeos. Cabe ressaltar que é comum que alguns íons fragmento não sejam observados, ou não fiquem muito evidentes. Entretanto, nos peptídeos analisados foi possível encontrar o conjunto de íons fragmentos em sua íntegra em pelo menos em uma das séries.

Após a confirmação da identidade dos peptídeos sintetizados pela técnica de EM, uma pequena alíquota do material purificado foi quantificada por UV-Vis para realização de testes biológicos.

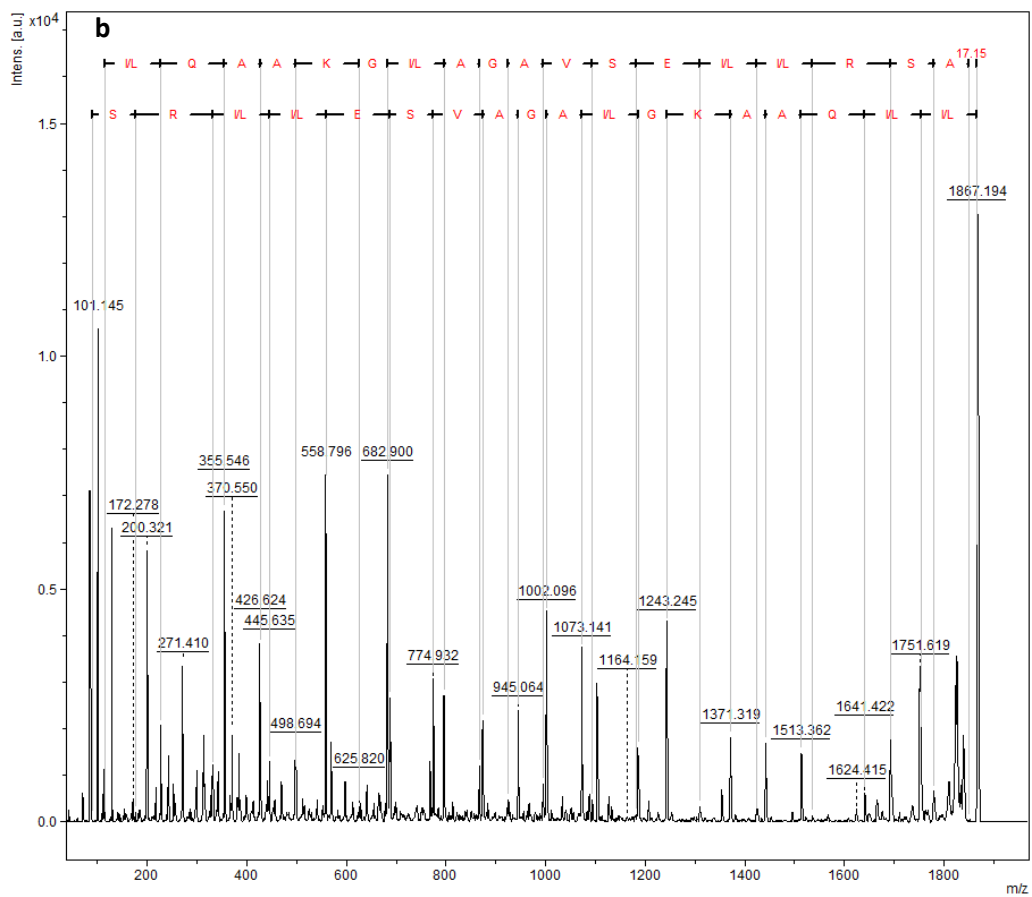
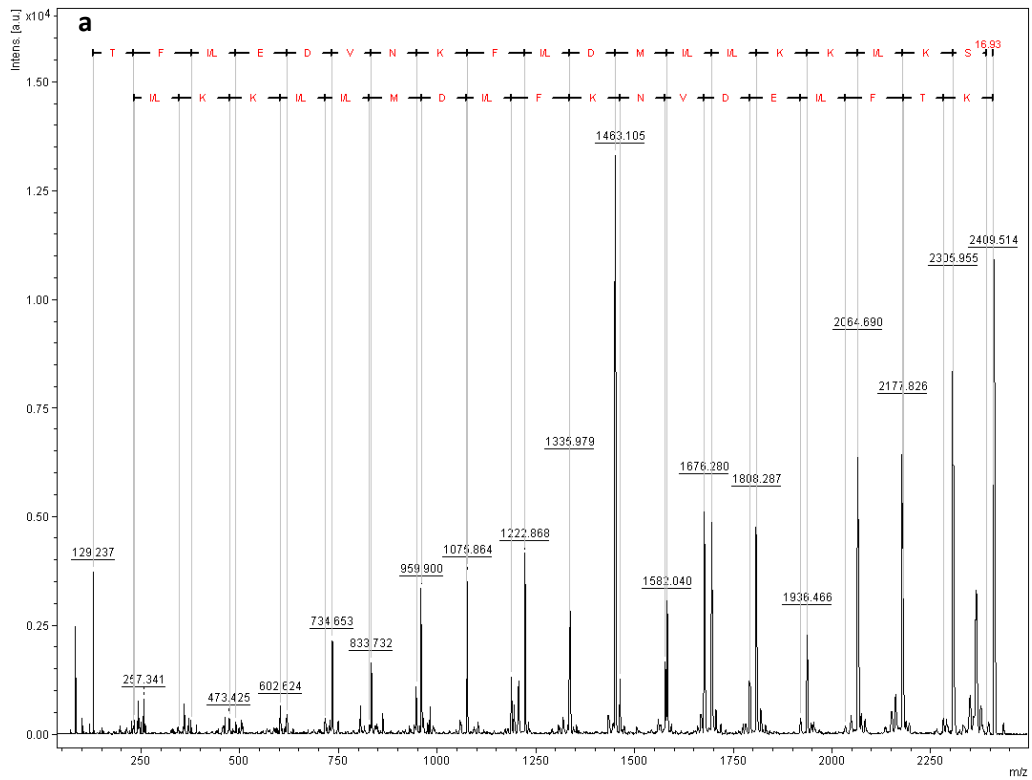


Figura 17. Espectro EM da fragmentação do íon (a) $[M+H]^+ = 2409,514$ Da do peptídeo H05 e (b) $[M+H]^+ = 1867,194$ Da do peptídeo H06 obtidos por MALDI-TOF/TOF.

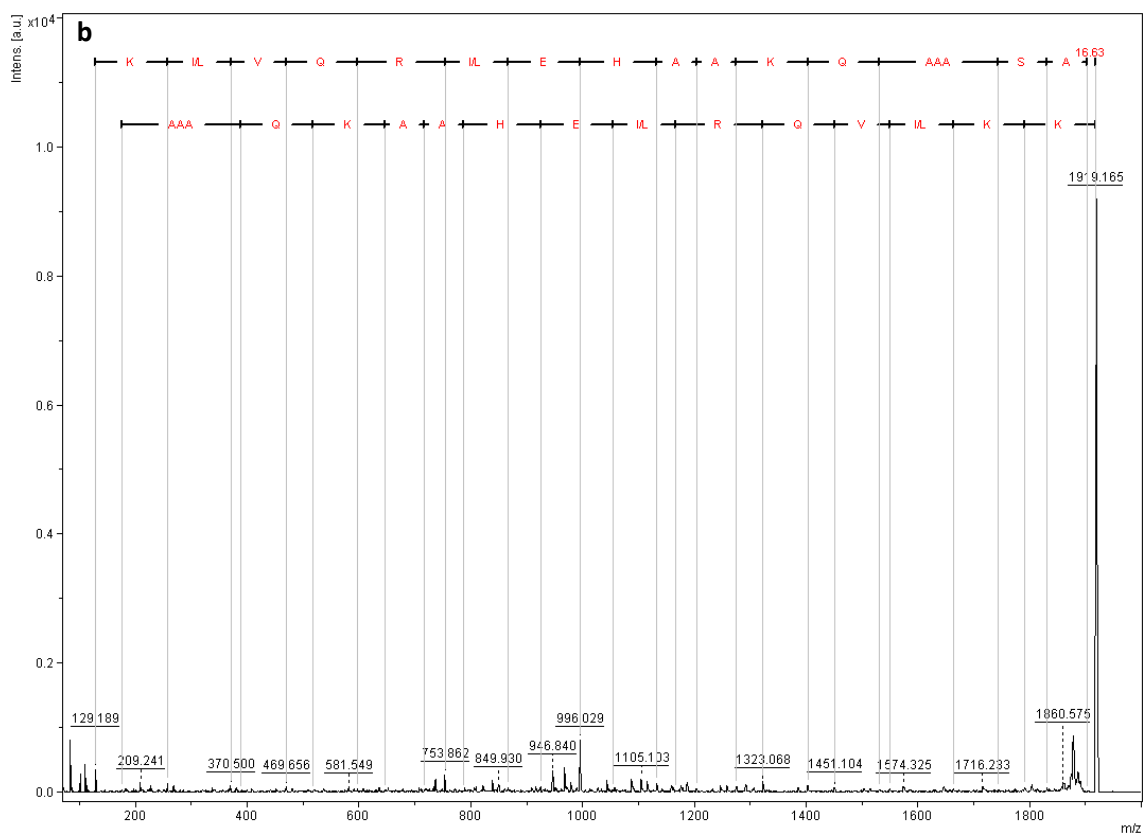
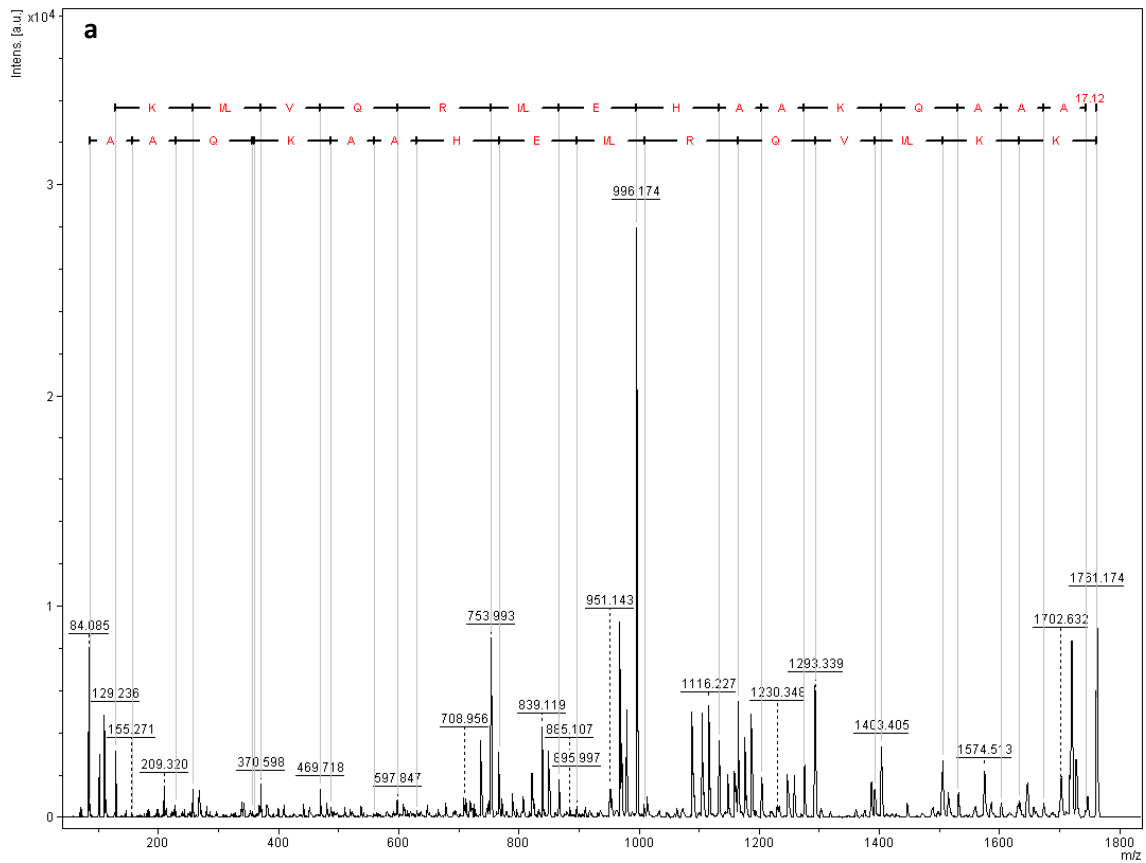


Figura 18. Espectro EM da fragmentação do íon **(a)** $[M+H]^+ = 1761,174$ Da do peptídeo H07 e **(b)** $[M+H]^+ = 1919,165$ Da do peptídeo H08 obtidos por MALDI-TOF/TOF.

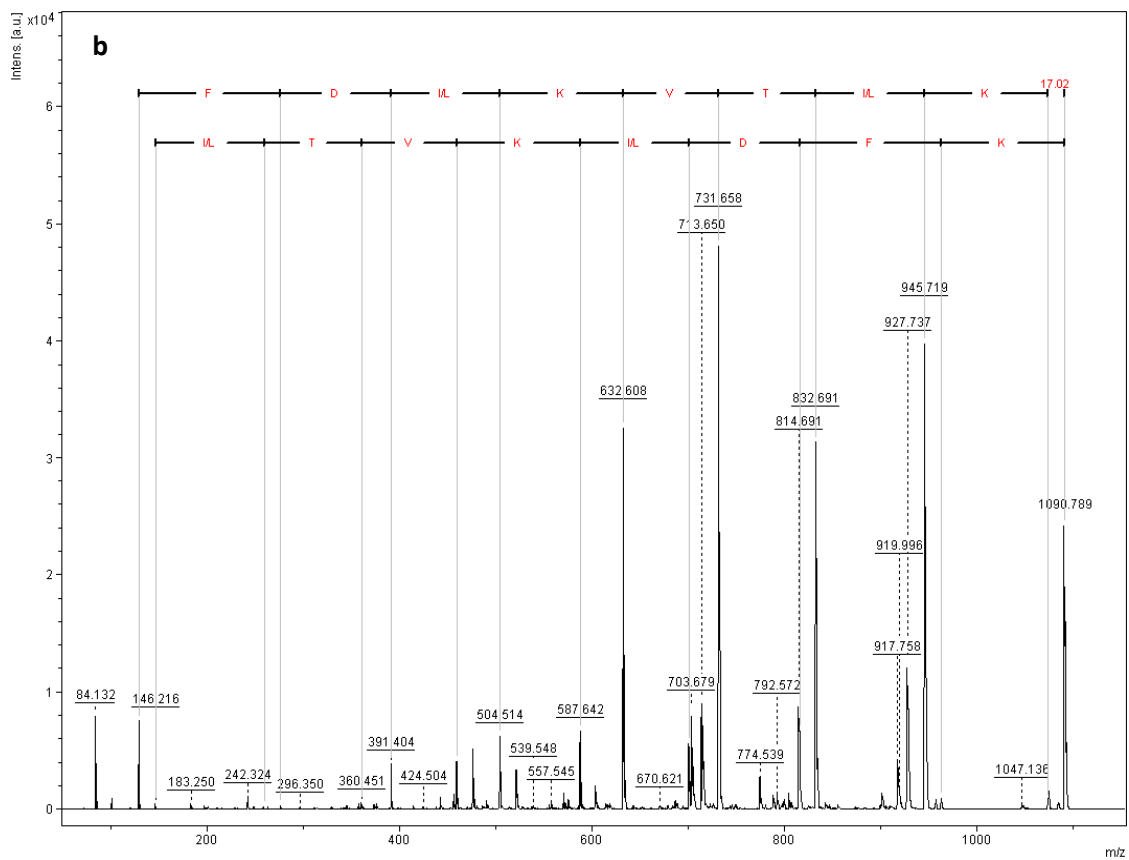
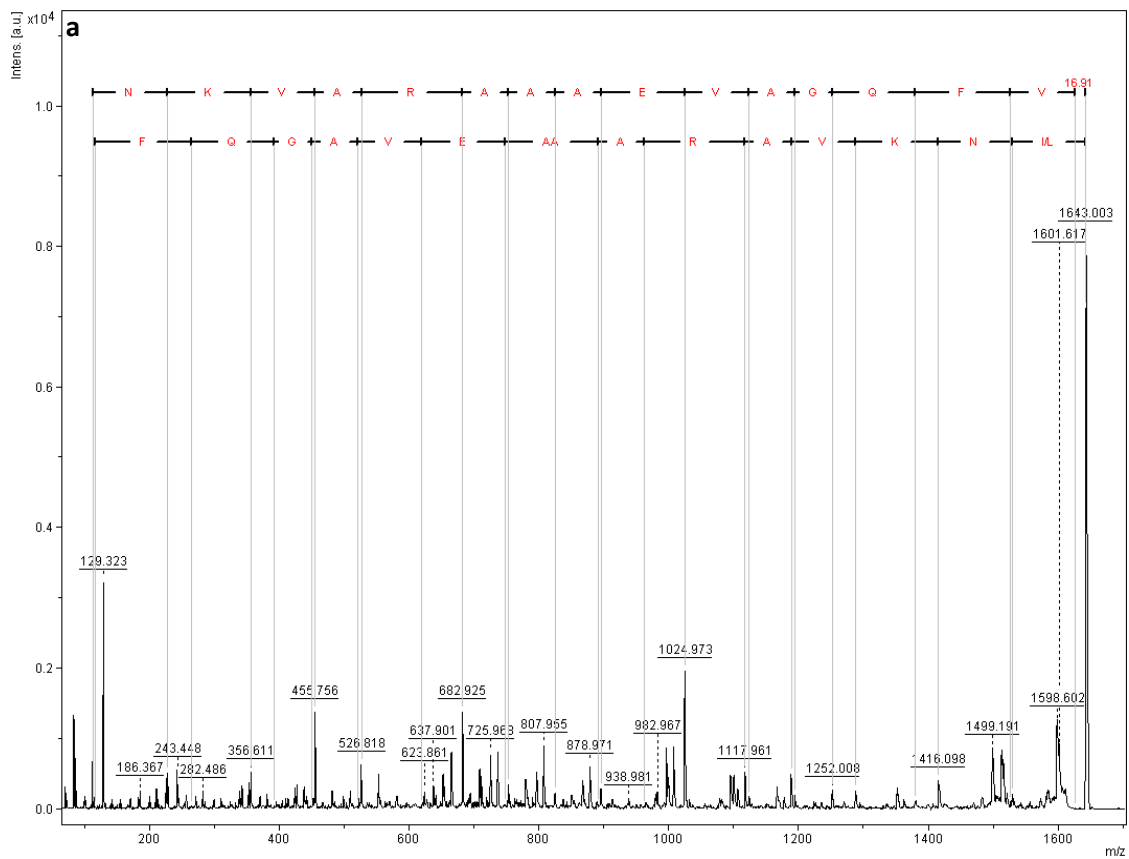


Figura 19. Espectro EM da fragmentação do íon (a) $[M+H]^+ = 1643,003$ Da do peptídeo H09 e (b) $[M+H]^+ = 1090,789$ Da do peptídeo Hs10 obtidos por MALDI-TOF/TOF.

4.4. Avaliação da concentração inibitória mínima dos IAPs

A atividade antimicrobiana dos peptídeos H05, H06, H07 e Hs10 foi testada em relação a bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) e Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) em testes de microdiluição em placa. A síntese dos peptídeos H08 e H09 foi finalizada posteriormente, portanto, não foram testados junto com os demais.

Dentre os peptídeos testados, verificou-se que apenas o peptídeo Hs10 apresenta atividade dentro da faixa de concentração de 128 – 0,5 μM (Tabela 10). Para este peptídeo, o CIM médio obtido para a inibição total do crescimento das bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* foram, respectivamente, 32 μM e 42,67 μM . O fato de apresentar apenas atividade para estes microrganismos sugere uma certa seletividade para bactérias gram-negativas. Apesar do CIM determinado para a inibição do crescimento da *E. coli* ser superior ao obtido para o peptídeo Hs02, ele é inferior aos observados para antibióticos convencionais como Imipinem (35 μM), Ceftazidima (40 μM) e Trimetopin (80 μM).⁸

Tabela 10. Resultado do teste Concentração Inibitória Mínima em bactérias.

Peptídeos	Organismos														
	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>								
	Concentração (μM)			Concentração (μM)			Concentração (μM)								
			Média (uM)	SD				Média (uM)	SD				Média (uM)	SD	
Hs02	1	1	1	1,00	0,00	2	2	2	2,00	0,00	2	2	1	1,67	0,58
H05	>128	>128	>128	>128	0,00	>128	>128	>128	>128	0,00	>128	>128	>128	>128	0,00
H06	>128	>128	>128	>128	0,00	>128	>128	>128	>128	0,00	>128	>128	>128	>128	0,00
H07	>128	>128	>128	>128	0,00	>128	>128	>128	>128	0,00	>128	>128	>128	>128	0,00
Hs10	>128	>128	>128	>128	0,00	32	32	32	32,00	0,00	32	32	64	42,67	18,48

>128 significa sem atividade na faixa avaliada: 128-0,25 μM

Os peptídeos deste estudo também tiveram sua atividade antifúngica avaliada. Novamente, apenas o peptídeo Hs10 apresentou atividade (Tabela 11) contra a levedura *C. neoformans*, causadora da criptococose, doença que acomete principalmente indivíduos imunocompetentes, como indivíduos portadores do HIV, indivíduos leucêmicos e indivíduos transplantados.

Tabela 11. Resultado do teste de Concentração Inibitória Mínima em fungos.

Peptídeos	Organismos									
	<i>C.albicans</i>					<i>C. neoformans</i>				
	Concentração (μM)			Média (μM)	SD	Concentração (μM)			Média (μM)	SD
Hs02	8	8	8	8,00	0,00	1	1	1	1,00	0,00
H05	>128	>128	>128	>128	0,00	>128	>128	>128	>128	0,00
H06	>128	>128	>128	>128	0,00	>128	>128	>128	>128	0,00
H07	>128	>128	>128	>128	0,00	>128	>128	>128	>128	0,00
Hs10	>128	>128	>128	>128	0,00	128	128	128	128,00	0,00

>128 significa sem atividade na faixa avaliada: 128-0,25 μM

Esses resultados ressaltam a necessidade de um trabalho conjunto entre a busca *in silico* por fragmentos e os testes *in vitro*, para considerar um peptídeo prospectado como IAP. Demonstram também a imprescindibilidade de encontrar fragmentos com o conjunto de propriedades físico-químicas mais similares aos PAMs conhecidos. Além disso, é válido dizer que não é possível afirmar se de fato os peptídeos H05, H06 e H07 não interagem com membranas, pois podem (ou não) interagir em concentrações maiores, interagir com outros microrganismos ou ter alguma outra aplicação diferente da lise.

Outros testes podem apontar um potencial ainda não constatado. Por exemplo, a pandemia do Covid-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, trouxe à tona a necessidade de uma busca rápida por novas drogas com potencial atividade contra este vírus, dado que no início do surto se desconheciam medicamentos eficientes para o tratamento. Nesse contexto, diversas pesquisas se voltaram para o desenvolvimento de agentes antivirais. Como os peptídeos sintetizados neste trabalho foram escolhidos visando uma potencial atividade antiviral, eles foram submetidos a testes iniciais para avaliar sua ação frente ao SARS-CoV-2. Os resultados desse teste serão citados aqui de forma preliminar, uma vez que ainda não foram obtidos resultados definitivos. Em um ensaio preliminar, a atividade dos peptídeos H05, H06 e H07 foram avaliadas na concentração de 10 μM . Resumidamente, os testes consistiram no plaqueamento de células Vero E6 por 24 horas com subsequente incubação com peptídeos e adição do vírus. Após 36 horas de incubação, foi observado que destes 3 peptídeos, o H05 apresentou uma atividade inibitória de 31%, dessa forma, não sendo nessa concentração de fato efetivo na inibição de SARS-CoV-2. Entretanto, esse ensaio instiga uma investigação utilizando outras concentrações como na escala de 10 a 100 μM de peptídeo, uma vez que ele demonstrou baixa citotoxicidade, isto é, ao final do experimento foi constatado uma sobrevivência

celular de 93%. Portanto, tem-se como perspectiva futuros ensaios com esses fragmentos para verificar se tem potencial antiviral em outras concentrações.

Como o Hs10 apresentou no ensaio anterior atividade antimicrobiana (Tabela 10), ele foi submetido a novos testes frente a diversas cepas de bactérias Gram-negativas e positivas (Tabela 12).

Tabela 12. Resultado do teste de Concentração Inibitória Mínima do peptídeo Hs10 frente a diversas cepas de Bactérias.

	Organismos	Hs10 ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$)	Gentamicina* ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$)
Bactérias Gram-positivas	<i>S. aureus Multiressistente</i>	N/A	0,10 \pm 0,04
	<i>E. faecalis</i>	N/A	0,31 \pm 0
	<i>Isolados de Mastite</i>		0,52 \pm 0,15
	<i>S. aureus 111</i>	N/A	0,41 \pm 0,15
	<i>S. aureus117</i>		0,83 \pm 0,30
Bactérias Gram-negativas	<i>EHEC O157:H7</i>	32 \pm 0,00	16 \pm 0,00
	<i>K. pneumoniae</i>	64 \pm 0,00	0,52 \pm 0,00
	<i>K. pneumoniae KPC</i>	128 \pm 0,00	33 \pm 0,00
	<i>A. baumannii</i>	128 \pm 0,00	8,3 \pm 0,00

N/A – Não foi observada atividade antimicrobiana.

*Controle utilizado.

Assim, foi constatado que o Hs10 apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas como *E.coli*, *EHEC O157: H7*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae KPC*, *A. baumannii*, que causam enfermidades em seres humanos. Cabe destacar que uma delas, a bactéria *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima carbapenemase KPC possui uma grande capacidade de disseminação e de desenvolver resistência a antimicrobianos. Além disso, ela afeta principalmente as unidades de tratamento intensivo de ambientes hospitalares.

O fato do peptídeo Hs10 ser ativo contra essas bactérias é relevante, uma vez que a estrutura da membrana de bactérias Gram-negativas é uma barreira de proteção significativa a ação de muitos antibióticos, o que dificulta o desenvolvimento de novos PAMs potentes e mais seletivos. De acordo com Barreto-Santamaría et al⁷⁸ a maioria dos

PAMs em desenvolvimento clínico não são potentes contra esse tipo de bactéria. Os autores destacam ainda que dos 7 PAMs aprovados pela FDA (*United State Food and Drug administration*) apenas 1 é ativo contra bactérias Gram-negativas.⁷⁸

É válido lembrar que as bactérias Gram-negativas resistentes que lideram a lista de patógenos prioritários para pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos antibióticos da Organização mundial de Saúde (OMS) são da família das *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Enterobacteriaceae* (incluindo *Klebsiella*, *E. coli*).⁷⁹ Portanto, estudos que visem obter novos PAMs contra bactérias dessas famílias são de suma importância.

Foi observado ainda a ausência de atividade contra as diversas bactérias Gram-positivas testadas, o que indica uma seletividade para bactérias Gram-negativas. Importante destacar que outros peptídeos com estrutura similar ao Hs10 já foram estudados e não apresentam essa seletividade. Por exemplo, peptídeos projetados por Ong *et al.* possuem estrutura primária semelhante ao Hs10, isto é, alternância de resíduos hidrofóbicos (F, I, V e/ou W) e hidrofílicos (R e/ou K), com comprimento de 8 ou 12 resíduos, mas não apresentaram essa seletividade.¹⁴ Nesse estudo, foi apresentado que peptídeos como IRVKIRVK-NH₂ e IRVKIRVK-NH₂ foram ativos contra as bactérias *S. aureus* (Gram-positiva) e *E. coli* (Gram-negativa). A Tabela 13 apresenta os valores de CIM desses peptídeos para os microrganismos citados.¹⁴ Observando estes dados é possível verificar que o Hs10 além de apresentar essa certa seletividade, ainda é mais potente contra *E. coli* que estes PAMs.

Tabela 13. Dados de CIM para os PAMs projetados por Ong *et. al.* ¹⁴

Peptídeo	Massa Molar teórica (Da)	CIM (mg/L)	
		<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>
IRVKIRVK-NH ₂	1010,34	250,0	62,5
IRIKIRIKIRIK-NH ₂	1549,07	62,5	125,0

Essa possível seletividade também aponta a relevância no estudo do Hs10, visto que antibióticos de estreito espectro contribuem para diminuir o surgimento de resistência e podem não afetar microbiota normal de um hospedeiro. Deste modo, o peptídeo Hs10 é considerado promissor, uma vez que apresenta atividade antimicrobiana e uma possível seletividade para bactérias Gram-negativas, com um reduzido custo de produção por ser um peptídeo sintético de 9 resíduos de aminoácidos.

4.5. Ensaio de viabilidade celular – MTT

Compostos com potencial ação terapêutica, como o Hs10, devem ser estudados com relação a sua viabilidade celular. Testes *in vitro* que avaliam a citotoxicidade de substâncias são de grande importância por fornecerem dados iniciais sobre a resposta biológica de células a estes produtos.

Um ensaio muito utilizado para avaliar a viabilidade celular de compostos é o ensaio quantitativo colorimétrico MTT. Neste teste, o composto MTT é reduzido a cristais de formazan por meio da quebra do anel tetrazólio por células metabolicamente ativas (Figura 20). Estes cristais apresentam coloração intensa que pode ser avaliada por espectrofotometria e, assim, refletir a porcentagem de células ainda metabolicamente ativas após o tratamento com a substância testada.⁸⁰

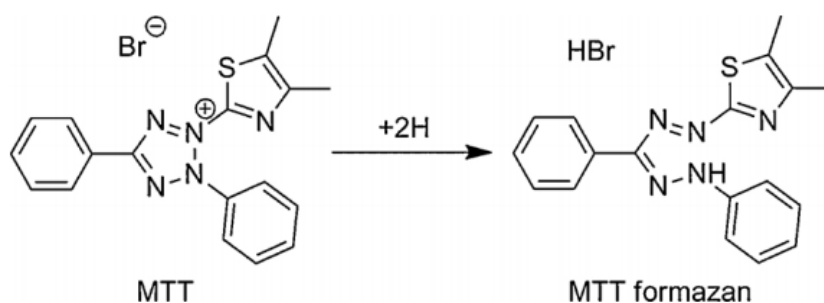


Figura 20. Redução do MTT para formação dos cristais de formazan.⁸⁰

Neste trabalho, o ensaio de MTT indicou que o IAP Hs10 possui baixa citotoxicidade contra fibroblastos humanos. Como pode ser visto na Figura 21, após 48h de tratamento com Hs10 a 512 μ M, mais de 70% das células humanas do tipo fibroblasto ainda estavam vivas. Esta concentração é muito maior do que MIC para bactérias Gram-negativas testadas. Isso indica que, embora este peptídeo seja antimicrobiano na faixa de 32 a 128 μ M, principalmente para bactérias Gram-negativas, ele não apresenta citotoxicidade significativa para fibroblastos na mesma faixa. É válido lembrar que em geral os peptídeos podem apresentar alta toxicidade. PAMs em desenvolvimento clínico, por exemplo, como o pexiganan e o LL-37 tiveram sua via de administração limitada ao uso tópico por apresentar toxicidade na mesma faixa de concentração do seu CIM.⁷⁸

Encontrar PAMs com baixa citotoxicidade é um dos desafios no desenvolvimento de tratamentos à base dessas biomoléculas.

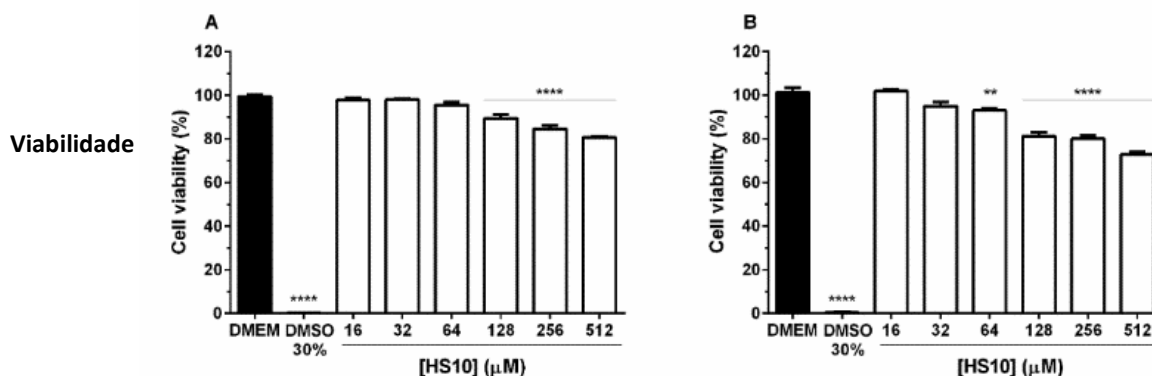


Figura 21. Efeito do peptídeo Hs10 em células do tipo fibroblasto humano (Detroit 551) após exposição por (A) 24 e (B) 48 horas. Os valores foram expressos como médias \pm EPM. ** $p < 0.01$ e **** $p < 0.0001$ versus grupo de controle (DMEM).

4.6. Teste de sinergismo

Outra característica dos PAMs que tem chamado a atenção de muitos pesquisadores é a sua capacidade de atuar de forma sinérgica com outros compostos, uma vez que o uso simultâneo de diferentes agentes antimicrobianos para tratar infecções por bactérias pode apresentar grandes vantagens. Dentre elas destacam-se a prevenção do surgimento de subpopulações resistentes e o efeito bactericida sinérgico.⁷⁰

O sinergismo promove um efeito superior ao referente à soma dos efeitos individuais de cada fármaco. Isto propicia a diminuição da toxicidade como resultado da redução da dose de cada fármaco. No entanto, a combinação de dois agentes antimicrobianos não resulta obrigatoriamente em um efeito sinérgico. Essas combinações podem ter um efeito positivo mais sutil, como o efeito de adição. Neste caso, o efeito observado corresponde à soma dos efeitos separados dos compostos, gerando, também, uma certa redução nas dosagens utilizadas. O resultado combinado das drogas pode ainda apresentar um efeito denominado autonomia (ou indiferença), isto é, o resultado observado provém apenas o efeito da droga mais ativa sozinha. Isto indica que os compostos não interagem entre si. Além disso, a interação entre os fármacos pode ser antagônica, ou seja, negativa, quando o efeito resultante da combinação é menor que o efeito independente dos agentes.⁷⁰

Uma forma de avaliar a interação entre agentes é a determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI), por meio da técnica *Checkerboard*. Esta técnica *in vitro* mede a atividade antimicrobiana de combinações de diferentes concentrações dos compostos testados, ou seja, são avaliadas as combinações de múltiplas diluições a partir da CIM de cada substância. A partir dos resultados deste ensaio pode ser calculado o valor de FICI para a menor combinação de CIM para ambos os compostos testados. Valores de FICI menores que 0,5 indicam sinergismo, enquanto valores entre 0,5 e 1,0 sugerem efeito aditivo. FICI com valores entre 1,0 e 4,0 indicam autonomia e valores maiores que 4,0 apontam efeito antagonista.⁷⁰

Como o Hs10 apresenta baixa citotoxicidade, foi avaliada sua interação com o IAP Hs02, que apresenta uma potente atividade antimicrobiana e citotoxicidade mais elevada. O valor de FICI obtido no ensaio de sinergismo entre Hs10 e o Hs02 pelo método de *Checkerboard* foi de 0,625. Esse resultado indica que a associação entre eles resultou em um efeito aditivo, ou seja, um efeito correspondente à soma dos efeitos separados dos IAPs, com uma redução na dosagem de ambos. Nesta combinação, o CIM do Hs02 foi de 1 mM, enquanto o do Hs10 foi de 4 mM. Esta redução na dosagem do Hs10 aumenta ainda mais sua viabilidade celular, dado que após 48h de tratamento com Hs10 a 512 µM, mais de 70% das células humanas do tipo fibroblasto ainda estavam vivas. Isto sugere ainda que ele tem potencial para ser um candidato para estudos de terapias combinada.

Terapias antimicrobianas combinando PAMs ou PAM com antibióticos convencionais, são relevantes, uma vez que podem desacelerar o desenvolvimento de resistência. No caso de bactérias Gram-negativas, pode ser combinado ainda uma substância antibiótica potente com um PAM capaz de neutralizar os efeitos da liberação do LPS na corrente sanguínea, e, assim evitar a sepse.

4.7. Dicroísmo Circular (CD)

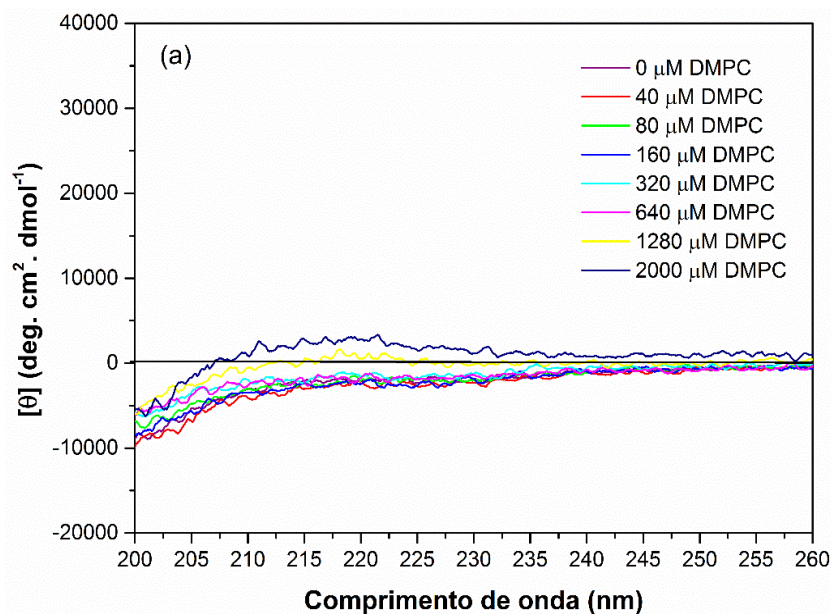
Ensaio biofísicos foram conduzidos para investigar possíveis parceiros de ligação para Hs10 e potenciais alterações estruturais produzidas na ligação molecular. Inicialmente, o IAP Hs10 foi submetido a ensaios de CD de titulação LUVs. Os demais peptídeos não foram submetidos a estes ensaios por não terem apresentado atividade contra as bactérias testadas.

Inicialmente, foram realizados ensaios de CD do peptídeo Hs10 na presença de diferentes concentrações das LUVs DMPC e DMPC/DMPG (Figura 22). Esses modelos

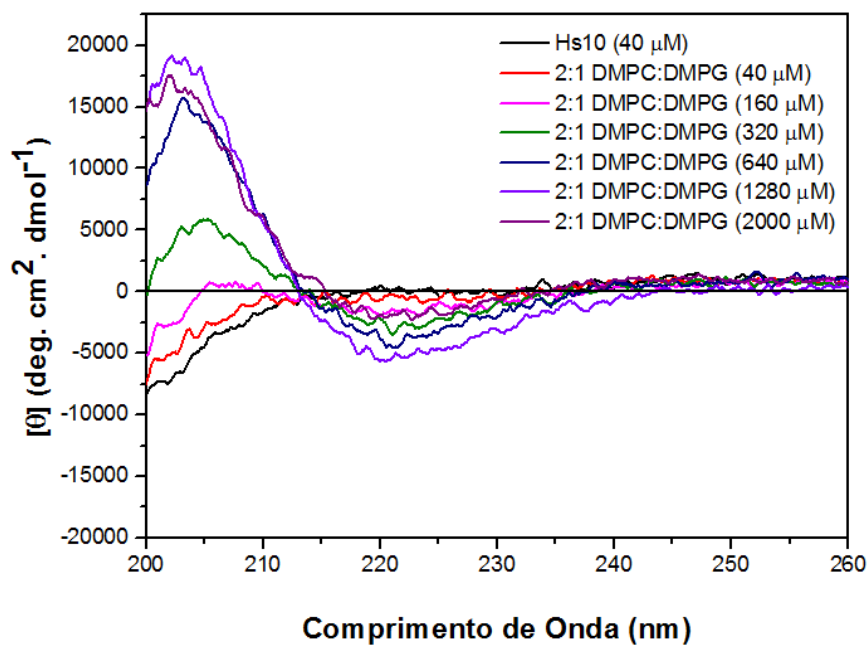
de vesículas fosfolipídicas tendem a ser mais estáveis que micelas formadas a partir de moléculas detergentes e estruturalmente mais similares as membranas microbianas, devido a sua estruturação em bicamadas lipídicas.

O peptídeo Hs10 em solução aquosa na ausência de vesículas (Figura 22) não possui estrutura definida, uma vez que o espectro de CD apresenta sinal negativo próximo a 200 nm, ou seja, apresenta um perfil similar ao observado em estruturas randômicas.^{81,82} Interessante observar que o peptídeo Hs10 na presença de vesículas de DMPC não adquire estrutura definida, mesmo com o aumento da concentração de DMPC, uma vez que o perfil do espectro CD do peptídeo Hs10 na presença de 2000 μM de DMPC permanece similar ao observado para moléculas com estrutura desenovelada (Figura 22a), indicando que este peptídeo não interage com vesículas de DMPC.

Já na presença de vesículas de 2:1 DMPC:DMPG, o Hs10 tende a se estruturar, isto é, as curvas de CD passam a exibir um perfil diferente para o esperado para estruturas desenoveladas. Isso indica que há uma interação do Hs10 com essas vesículas. Essa interação pode estar relacionada ao fato de que, em pH fisiológico, o fosfatidilglicerol (PG) apresenta carga negativa (-1) enquanto que a fosfatidilcolina (PC) possui carga neutra.⁸ Isso sugere que a interação entre o Hs10 e a bicamada lipídica tenha um caráter eletrostático relevante.



(a)



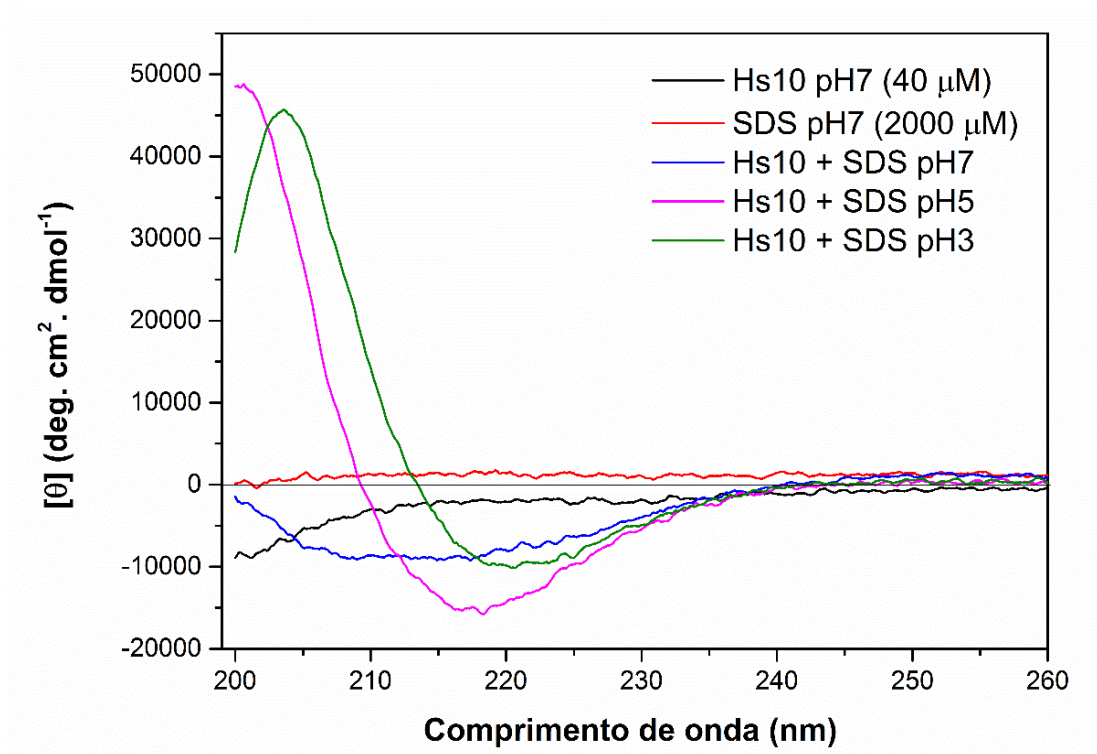
(b)

Figura 22. Espectro de CD do peptídeo Hs10 (40 μM) (a) em diferentes concentrações de DMPC e (b) em diferentes concentrações de 2:1 DMPC:DMPG em tampão PBS pH 7,4.

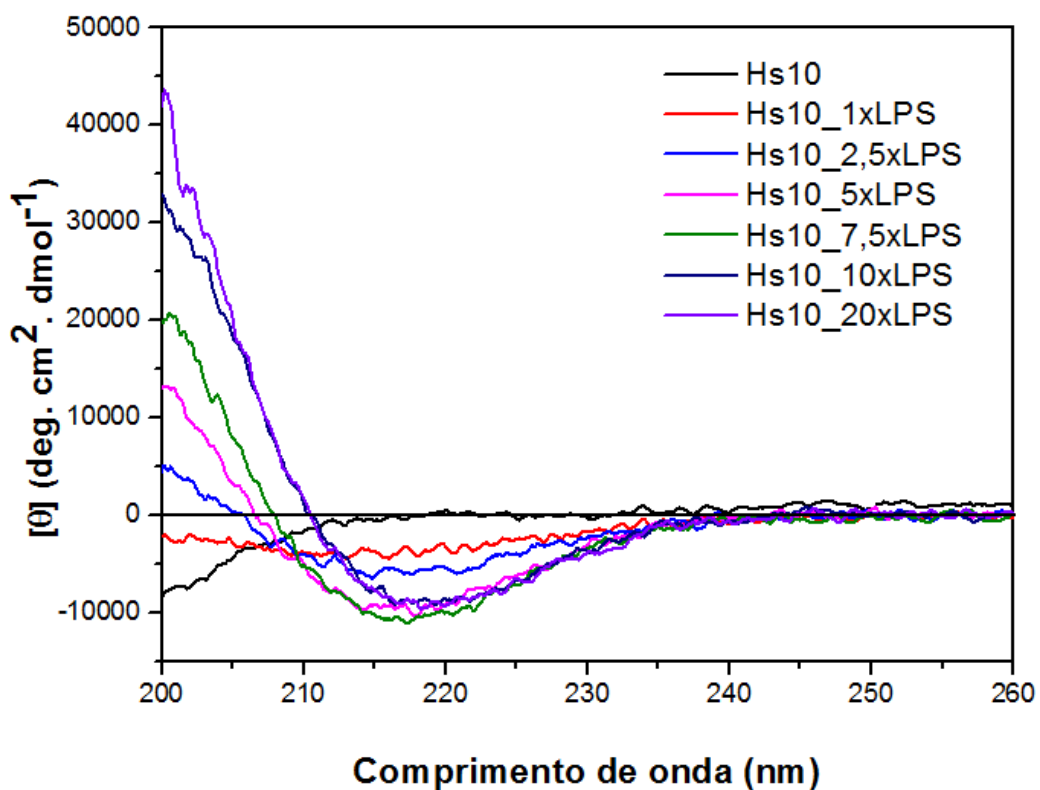
Com o intuito de verificar se essa estruturação tem um caráter eletrostático, isto é, que o Hs10 se estruturou nas vesículas contendo DMPG devido à carga líquida negativa, foram feitos experimentos de CD na presença de SDS, um tenso ativo aniônico (Figura 23a). Com isso, foi possível verificar que na presença de 2000 μM (2 mM) de SDS, o peptídeo Hs10 também tende a se organizar em uma estrutura semelhante a observada na

presença de vesículas de 2:1 DMPC:DMPG. Interessante observar que em pH7 o peptídeo Hs10 não apresenta uma estrutura tão evidente como nos outros pHs, provavelmente devido à Concentração Micelar Crítica (CMC) do SDS, que em pH7 é aproximadamente 5 mM.⁸³ Na condição testada em pH7, apenas uma pequena parte das moléculas forma micelas. De acordo com a literatura, a CMC do SDS diminui em pH baixo.⁸⁴ Portanto, a diferença entre as curvas de CD em diferentes pHs pode ser atribuída à redução da CMC em pHs baixos e, conseqüentemente, ao diferente número de micelas presentes nessas soluções. Assim, pode se dizer que a condição SDS a 2000 µM em pH 7 não há uma completa estruturação, como ocorre nas outras condições. Outro ponto a se destacar é que no espectro em pH 3, a contribuição eletrostática para a estruturação do Hs10 pode estar sendo favorecida pela protonação do grupo lateral do resíduo D3 (Asp), uma vez que seu pKa é aproximadamente 3,6. Dessa forma, o resíduo que antes apresentava uma carga negativa, nesta condição (pH 3) não tem mais essa contribuição negativa e o peptídeo passa a ter uma carga líquida +3. De uma maneira geral, essas mudanças no perfil da curva devido a presença do tenso ativo aniônico, o SDS, reforçam a hipótese de que a interação do Hs10 tem caráter eletrostático.

Como o Hs10 apresenta atividade antibiótica apenas contra as bactérias Gram-negativas e um dos principais componentes da membrana externa dessas bactérias é o LPS, então, neste trabalho, buscou-se investigar se Hs10 de fato interage com LPS. Um dos primeiros ensaios realizados com este o intuito, foi a obtenção de espectros de CD do Hs10 em diferentes concentrações de LPS. A Figura 23b apresenta esses espectros já subtraída a contribuição do LPS nas respectivas concentrações. Nestas curvas é possível visualizar que o Hs10 adota uma estrutura semelhante a observada nos experimentos do peptídeo com vesículas de 2:1 DMPC:DMPG e SDS em pH 5 e 3. Isso confirma que o peptídeo interage com LPS.



(a)



(b)

Figura 23. Espectro de CD do peptídeo Hs10 (40 μM) em (a) na presença de SDS (2000 μM) em diferentes pH e em (b) em diferentes concentrações de LPS em tampão PBS pH 7,4.

Além disso, ao se avaliar os resultados de CD tanto na presença de vesículas de 2:1 DMPC:DMPG quanto na presença de micelas de SDS em pH 5 e 3 e LPS, é possível observar o aparecimento da banda positiva próxima em 200 nm e uma negativa entre 215 e 220 nm (Figura 22b e Figura 23). O perfil obtido nesses casos não é semelhante aos padrões regulares de absorção da ligação peptídica referente as estruturas secundárias puras do tipo α -hélice ou folha- β . De acordo com a literatura, estruturas α -helicoidais apresentam uma banda positiva em 191-193 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e bandas negativas em 208 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e 222 nm ($n \rightarrow \pi^*$). Enquanto as estruturas do tipo folha- β exibem uma banda positiva em 198 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e uma negativa em 215 nm ($n \rightarrow \pi^*$).⁸⁵ Desse modo, observa-se que o Hs10 na presença dessas vesículas apresenta um perfil que se aproxima mais de uma estrutura tipo folha- β .

Quando comparado com dados da literatura, o perfil das curvas de CD obtido em nosso trabalho é semelhante ao perfil dos peptídeos curtos projetados por Ong *et al.* na presença de micelas de SDS.¹⁴ Esses peptídeos apresentam estrutura primária semelhante ao Hs10, isto é, alternância de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos, com comprimento de 8 a 12 resíduos. Segundo os autores, esse perfil se deve aos peptídeos testados prontamente se auto-montarem em estruturas secundárias de folha- β , apresentando nos espectros de CD pontos máximos próximos a 200 nm e mínimos próximos a 218 nm.¹⁴

Já o peptídeo estudado por Cândido *et al.*³⁰ denominado PaDBS1R6F10 (KKLRLKIAFK) adotou uma estrutura helicoidal na presença de TFE (2,2,2-trifluoroetanol), ou seja, em um ambiente hidrofóbico. Por outro lado, na presença de micelas de SDS, um ambiente mais hidrofílico, o mesmo peptídeo exibiu uma conformação em folha- β bem definida. Por isso, o PaDBS1R6F10 foi considerado pelos autores como um peptídeo de alta plasticidade estrutural, ou seja, que a sua estrutura tende a variar de acordo com o ambiente ao seu redor.³⁰

A Figura 24 apresenta os espectros dos peptídeos projetados por Ong *et al.*¹⁴ na presença de SDS e do PaDBS1R6F10 (KKLRLKIAFK) estudado por Cândido *et al.*³⁰ em ambientes hidrofóbicos e hidrofílicos. Observando essa figura é possível verificar que o Hs10 tem um perfil muito similar a esses peptídeos quando estes estão em ambientes aniônicos, como o SDS. O que sugere que, em ambientes aniônicos, esse pode ser o perfil característico de PAMs curto que a maior parte da sua estrutura primária apresenta alternância entre resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos. É válido dizer que a atividade

antibiótica dos peptídeos com estrutura primária e curva CD em ambiente aniônico similares ao Hs10 tem sido atribuída a sua capacidade de se agregar e formar estruturas folha- β estendidas ao interagirem com membranas microbianas.^{14,25,30,33,49}

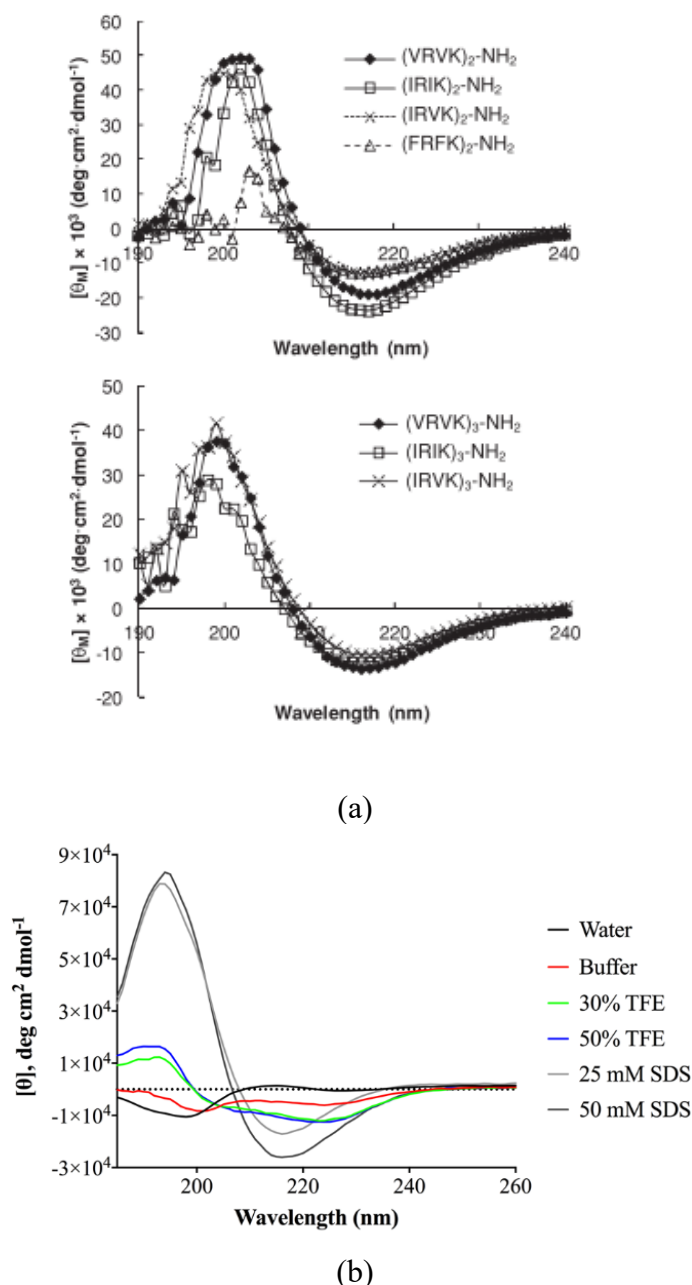


Figura 24. Espectro CD em (a) dos peptídeos projetados por Ong et al¹⁴ na presença de SDS e em (b) do PaDBS1R6F10 estudado de Cândido et. al³⁰ em ambientes hidrofóbicos e hidrofílicos.

De forma geral, os dados de CD mostram que o Hs10 estrutura na presença de LPS e na presença de compostos com carga líquida negativa, como DMPG, SDS. Quando analisado em conjunto com os resultados da atividade antibiótica, que demonstraram que

o Hs10 não tem atividade contra bactérias Gram-positivas (bactérias que não possuem membrana externa rica em LPS), isto sugere que a atividade do Hs10 pode estar relacionada à sua interação com o LPS. A interação preferencial com compostos carregados negativamente e em especial com o LPS dá ao peptídeo uma certa seletividade, e o torna menos tóxico para as células humanas que, em geral, possuem uma carga líquida neutra e não tem LPS na sua composição.

4.8. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Outra análise realizada com o intuito de investigar a interação entre o Hs10 e o LPS foi a calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Por meio deste experimento, foi possível observar o perfil calorimétrico desta interação (Figura 25). Inicialmente, foi realizado um experimento controle, em que os agregados de LPS de *E. coli* foram injetados na célula de amostra contendo apenas tampão PBS. O experimento controle evidencia um pico endotérmico na injeção do LPS, que diminui com o progresso da titulação. Este efeito endotérmico é consistente com a dissolução dos agregados de LPS, que é mais significativo nas primeiras injeções, quando ainda não há LPS na célula do calorímetro. Quando o Hs10 está presente na célula do calorímetro, o perfil muda para exotérmico, o que pode ser observado até a nona injeção, quando o perfil volta para endotérmico, semelhante ao experimento controle. Essa inversão do efeito exotérmico para o endotérmico ocorre provavelmente por ter sido consumido todo Hs10.

As informações fornecidas por ITC são baseadas nas equações termodinâmica $\Delta G = -RT \ln Ka$ e $T\Delta S = (\Delta H - \Delta G)$. Com isso, é possível avaliar variação de entalpia (ΔH), variação de entropia (ΔS) e variação de energia livre de Gibbs (ΔG), o número de sítios de ligação (N) e constante de afinidade (ka) para uma dada interação.⁴⁷ No caso do Hs10 com o LPS, foram observados valores negativos de ΔH e ΔS , indicando que a 25°C a interação é impulsionada por um termo entálpico. Isso reflete uma predominância de interações eletrostáticas.⁴⁷ O que sugere que a interação do LPS com o Hs10 é conduzida principalmente pela interação eletrostática provavelmente entre as cadeias laterais carregadas positivamente do IAP e grupos fosfato carregados negativamente do LPS. Cabe destacar ainda que o comportamento do Hs10 observado nos ensaios CD, isto é, estruturação apenas na presença de compostos aniônicos, corrobora com o resultado de ITC que indica interação com caráter eletrostático.

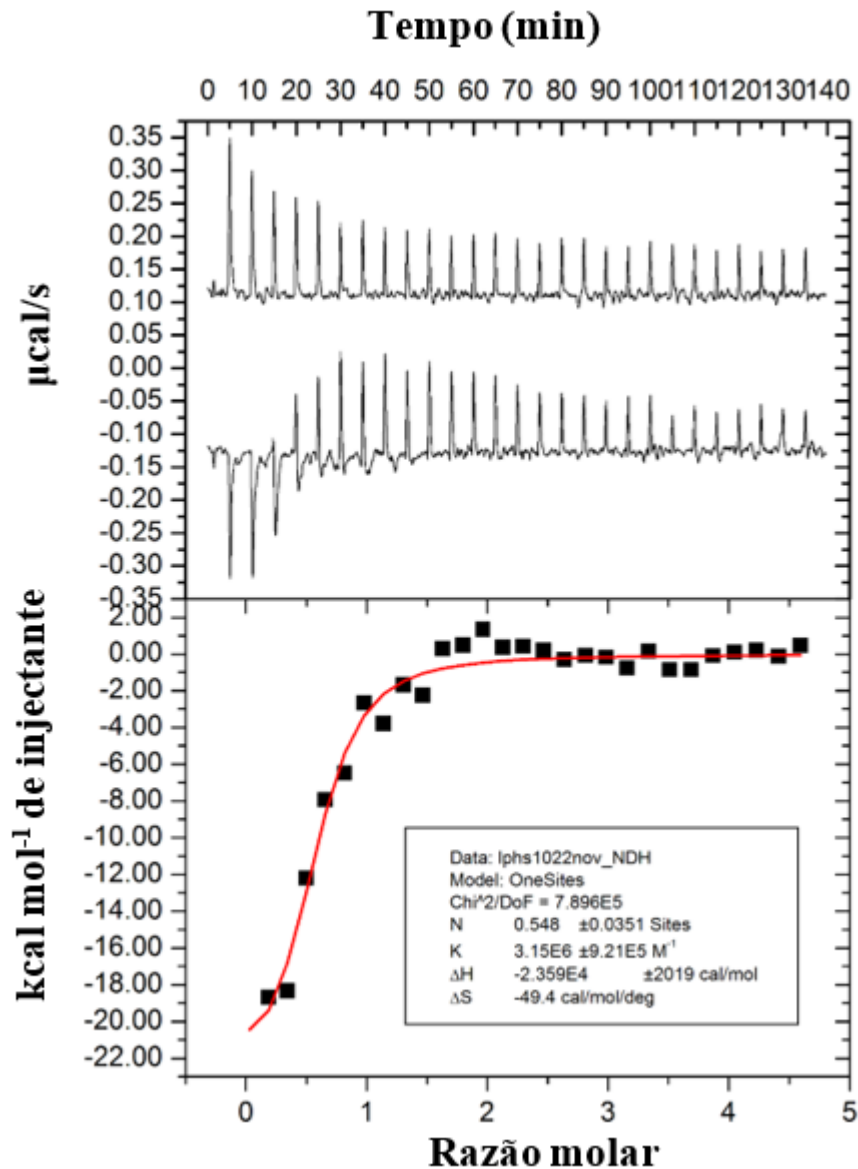


Figura 25. Perfil Calorimétrico de titulação isotérmica (ITC) para Hs10. O painel superior mostra o calor exotérmico de reação vs. tempo (minuto), a primeira titulação corresponde ao ensaio controle e a segunda a interação de Hs10 com LPS. O painel inferior mostra a mudança de entalpia por mol de injeção de LPS (1,96 mg/mL) em solução Hs10 (4µM) em tampão PBS.

Os dados obtidos por ITC também sugerem que o peptídeo Hs10 possui afinidade de ligação moderada, devido ao valor k_a e k_d (constante de dissociação), quando comparado a outros peptídeos como o escultion-1a(1-21)NH₂ [Esc(1-21), GIFSKLAGKKIKNLLISGLKG-NH₂] e o seu isômero Escultin-1a(1-21)-1cNH₂ [Esc(1-21) 1C, GIFSKLAGKKIKN^dLLI^dSGLKG-NH₂], estudado por Ghosh e colaboradores.⁴⁷ A Tabela 14 apresenta os dados desses PAMs e do Hs10. É possível observar que Esc(1-21)1C e o Hs10 apresentam valores similares para ΔH e ΔS , que sugerem maior contribuição do termo entálpico. Além disso, esses peptídeos possuem um

valor muito próximo de *kd*, ou seja, ambos possuem uma afinidade apreciável na faixa de micromolar ao LPS, entretanto, mais fraca que a afinidade do Esc(1–21), já que possuem uma *kd* maior que este último.

Considerando a predominância de interações eletrostáticas e a afinidade moderada constatados por este ensaio de ITC, pode se dizer que provavelmente o mecanismo de ação do Hs10 está intimamente ligado à sua interação com o LPS, que ocorre principalmente por meio de interações eletrostáticas.

Tabela 14. Dados obtidos por ITC para os PAMs Esc(1–21), Esc(1–21)1C e Hs10.

Parâmetros	Peptídeos		
	Esc(1–21)*	Esc(1–21)1C*	Hs10
ka (M⁻¹)	(2,48 ± 0,91) x 10 ⁵	3,25x10 ⁴	3,15x10 ⁶ ± 9,21 10 ⁵
ΔH (cal.mol⁻¹)	-2976 ± 189,6	-25.420	-23.590 ± 2019
ΔS (cal.mol⁻¹.deg⁻¹)	14,7	-64,6	-49,4
kd (μM)	4,03	30,76	31,7

*valores retirados da referência 47.

4.9. Espalhamento de Luz (DLS)

Foi estudado o efeito do Hs10 nos agregados de LPS por meio de ensaios de DLS, cujos resultados estão apresentados na Figura 26. Inicialmente, foi observado que o LPS em solução de tampão PBS apresentava duas populações de agregados, ou seja, uma distribuição bimodal, com tamanhos médios de Raio hidrodinâmico (Rh) de 67,2 e 256,3 nm (Figura 26). Com adição de Hs10, há um aparente aumento do Rh dos agregados de LPS de maior tamanho, que se torna estatisticamente relevante na razão molar de 80:1 (peptídeo:lipídeo). Este estudo mostra que o IAP Hs10 induz um aumento no tamanho dos agregados de LPS, que pode estar relacionado a uma possível redução da repulsão eletrostática nessas partículas.

Cabe destacar que o efeito dos PAMs no LPS varia, isto é, eles podem promover a agregação ou a desagregação. Ryder et. al⁸⁶ estudou o efeito dos PAMs polimixina B e WLBU2 (RRWVRRRRRWVRRVVRVRRWVRR) nos agregados de LPS. Neste trabalho, também foi observada uma distribuição bimodal dos agregados. Os autores notaram que enquanto o WLBU2 induzia agregação, gerando um aumento no Rh nas duas populações, a polimixina B promovia a desagregação. Segundo eles, a diminuição no tamanho médio das partículas induzida pela polimixina B era consistente com a ruptura das vesículas.⁸⁶ A análise em conjunto deste ensaio com os demais experimentos

conduzidos pelos autores, suportaram a hipótese que o WLBU2 provavelmente se insere na membrana sem causar sua ruptura, enquanto a polimixina B atua desestabilizando a membrana e conseqüentemente promovendo sua ruptura. Assim, observa-se que os dados de DLS podem auxiliar na compreensão do mecanismo de ação de um PAM. No caso do Hs10 pode ser que sua ação não induza a completa ruptura da membrana, dado que não foi observado uma diminuição no tamanho dos agregados.

Um ponto relevante na agregação de LPS induzida por peptídeos, é que este fenômeno pode reduzir toxicidade do LPS.⁸⁷ É importante lembrar que o LPS quando liberado na corrente sanguínea em pequenas concentrações estimula o sistema imune inato, mas em altas concentrações ele promove uma super produção de citocinas que podem resultar em um choque séptico. De acordo com a literatura,⁸⁷ a interação do peptídeo com o LPS pode inibir a interação do LPS com receptores celulares, evitando assim super produção de citocinas, além de facilitar sua fagocitose por macrófagos. Portanto, substâncias com potencial de neutralização da endotoxina LPS são de grande importância no combate as bactérias Gram-negativas. Assim, esses dados sugerem que o IAP Hs10 pode ter esse potencial por induzir a agregação, entretanto, são necessários outros ensaios para confirma esta hipótese.

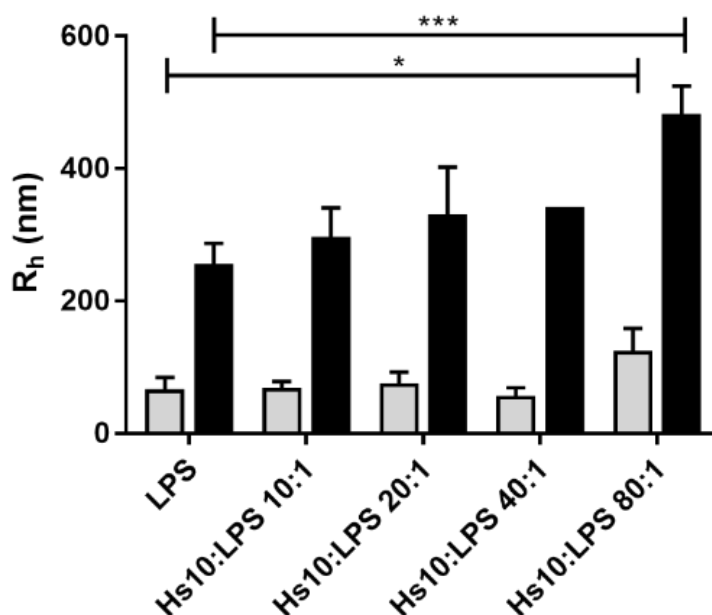


Figura 26. Gráfico do tamanho médio dos agregados de LPS na presença de diferentes quantidades de HS 10 (razão mol: mol), em que * corresponde a $p < 0.05$ e *** a $p < 0.001$.

4.10. Avaliação da morfologia de células de *E.coli* tratadas com Hs10 por microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) foi utilizada para elucidar potenciais alterações morfológicas na superfície da bactéria *E.coli* após o tratamento com o peptídeo Hs10. Imagens representativas das bactérias tratadas e não tratadas (controle) são apresentadas na Figura 27. A imagem das bactérias não tratadas (controle) mostra *E. coli* com morfologia de bacilo em forma de bastonete característica, em contraste, as bactérias tratadas com o peptídeo Hs10 mostraram alterações morfológicas, como a diminuição do tamanho do bacilo (comprimento do controle igual a 4,08 μm e comprimento da bactéria tratada igual a 2,33 μm), bem como da altura da célula bacteriana, que variou de 490 μm a 360 μm (exibida no eixo Z). Essa alteração morfológica reforça a hipótese de que alguns achados nas imagens, como o indicado na Figura 27 B, podem ser referentes a um vazamento de conteúdo citoplasmático. Além disso, foram observados agregados de bactérias, que podem ser decorrentes da redução da repulsão eletrostática nas membranas bacterianas devido à interação do IAP Hs10 com o LPS presente na membrana externa.

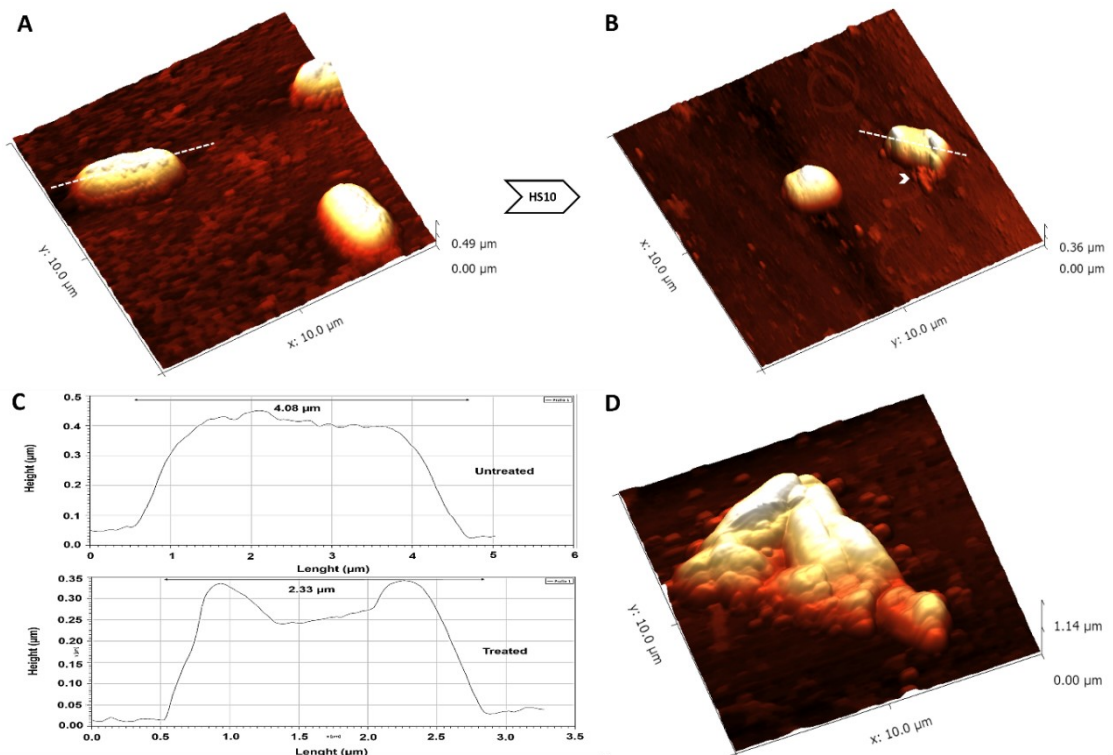


Figura 27. Imagens AFM de *Escherichia coli* ATCC 25922 (10 μm x 10 μm). (A) *E. coli* não tratada (controle); (B) *E. coli* após tratamento com peptídeo Hs10 em concentração sub-MIC (14,3 μM); (C) Perfil ao longo da linha pontilhada branca de *E. coli* não tratada (acima) e tratada (abaixo); (D) *E. coli* agregada após tratamento com Hs10 em concentração sub-MIC (14,3 μM). A seta branca mostra o vazamento de fluido citoplasmático da bactéria

4.11. Determinação da estrutura do Hs10 por RMN

Por fim, a estrutura 3D do peptídeo Hs10 na presença de LPS foi investigada por espectroscopia de RMN. A análise conjunta dos experimentos de ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^1H NOESY do peptídeo Hs10 puro e na presença de LPS permitiu que os sinais referentes aos hidrogênios de cada resíduo de aminoácido deste peptídeo fossem atribuídos aos seus respectivos deslocamentos químicos. As Figura 28 e Figura 29 destacam a região de impressão digital (NH-H α) do IAP Hs10 na presença de LPS a 10 μM .

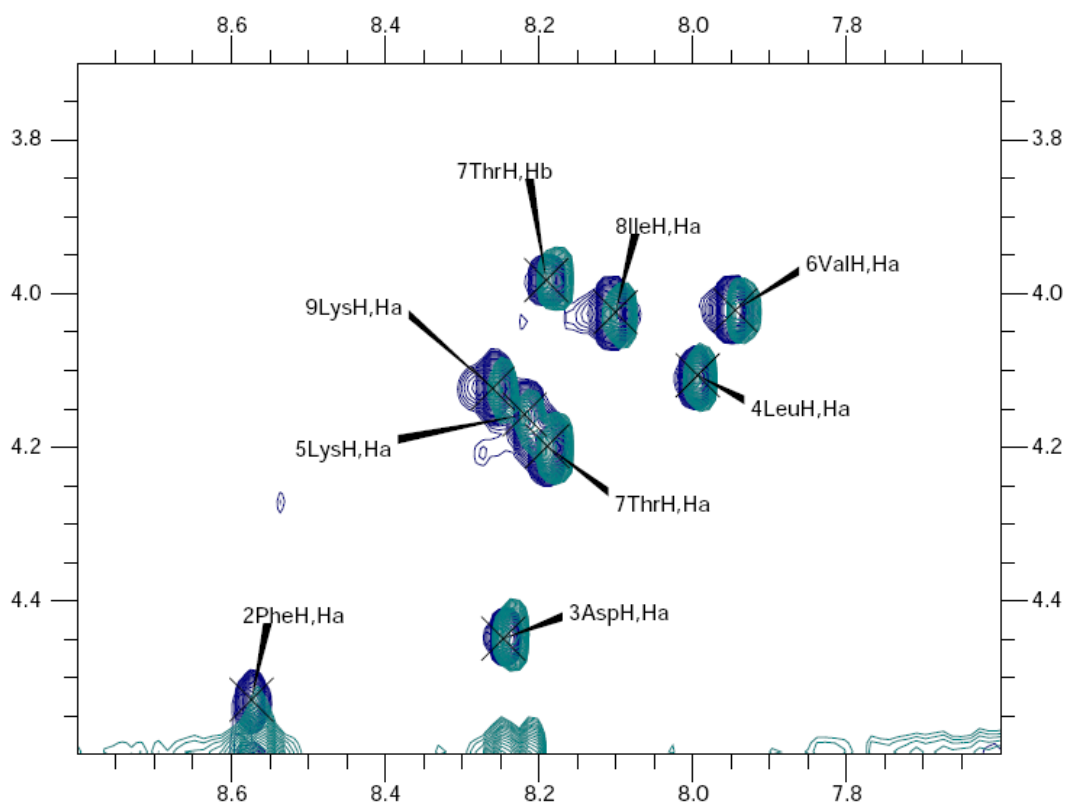


Figura 28. Região NH-H α do TOCSY 1H-1H de 1 mM de Hs10 puro (ciano) sobrepondo-se ao TOCSY 1H-1H de Hs10 com LPS 10 μM (azul), a 25 ° C.

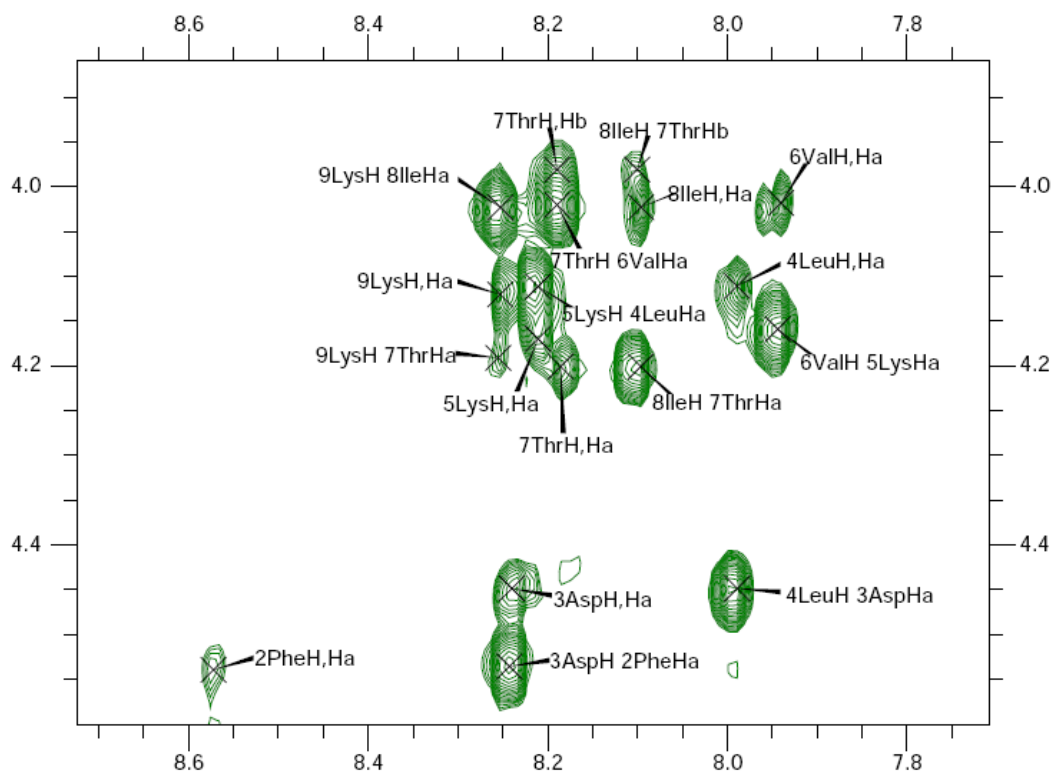


Figura 29. Região NH-H α do 1H-1H NOESY de 1 mM de Hs10 com 10 μ M de LPS a 25 $^{\circ}$ C.

Os deslocamentos químicos de cada hidrogênio foram listados na Tabela 15.

Tabela 15. Valores de deslocamento químico de 1 H (ppm) dos resíduos de aminoácido do peptídeo Hs10 (1 mM) em solução com LPS (10 μ M) a 25 $^{\circ}$ C.

Resíduo	δ_{NH}	$\delta_{\text{H}\alpha}$	$\delta_{\text{H}\beta}$	δ_{outros}
Lys1	-	3,80	1,7	γ 1,21; δ 1,53; ϵ 2,83
Phe 2	8,57	4,54	2,97/2,90	-
Asp 3	8,24	4,45	2,51/2,38	-
Leu 4	7,99	4,11	1,46	δ 0,80 / 0,75
Lys 5	8,21	4,16	1,62	γ 1,24; δ 1,52
Val 6	7,94	4,02	1,91	γ 0,78
Thr 7	8,19	4,20	3,98/1,72	γ 1,02
Ile 8	8,10	4,02	-	γ 1,03 / 0,76; δ 0,7
Lys 9	8,26	4,12	1,68	γ 1,29; δ 1,52; ϵ 2,84

Assim como os resultados de CD, os experimentos de RMN indicaram que o Hs10 puro em solução aquosa não apresenta uma estrutura definida, uma vez que os espectros de NOESY para o Hs10 puro (dado não apresentado) não apresentaram sinais de correlação interresidual bem definidos. Foi observado ainda que estas interações interresiduais ficaram evidentes com a adição de uma pequena quantidade de LPS (10 μ M), sugerindo uma estruturação do Hs10.

Com a identificação e atribuição dos sistemas de spin dos 9 resíduos de aminoácidos, foram obtidas 103 restrições de distância pela conversão das informações de volume de NOEs e 8 ângulos diédricos. Em seguida, para o cálculo da estrutura foi utilizado o mesmo procedimento empregado no cálculo da estrutura do IAP Hs02 (Capítulo 1). Ou seja, a partir desses dados um conjunto de estruturas foi calculado. As restrições angulares foram obtidas pelo programa CCPNMR/DANGLE que faz a predição de ângulos PHI e PSI (ϕ e ψ) com base na sequência de aminoácidos, nos deslocamentos químicos ^1H experimentais e em um banco de dados de estruturas de proteínas conhecidas com seus deslocamentos associados.⁷³ Além disso, as restrições de distância foram reavaliadas diversas vezes, após vários ciclos de cálculos, com o intuito de identificar e corrigir possíveis violações de distância. Ao final desses ciclos, foram selecionadas 10 estruturas de menor energia sem violações de distância que estão apresentadas Figura 30. Assim, esses cálculos revelaram que o Hs10 converge para uma estrutura anfifílica após a adição de LPS.

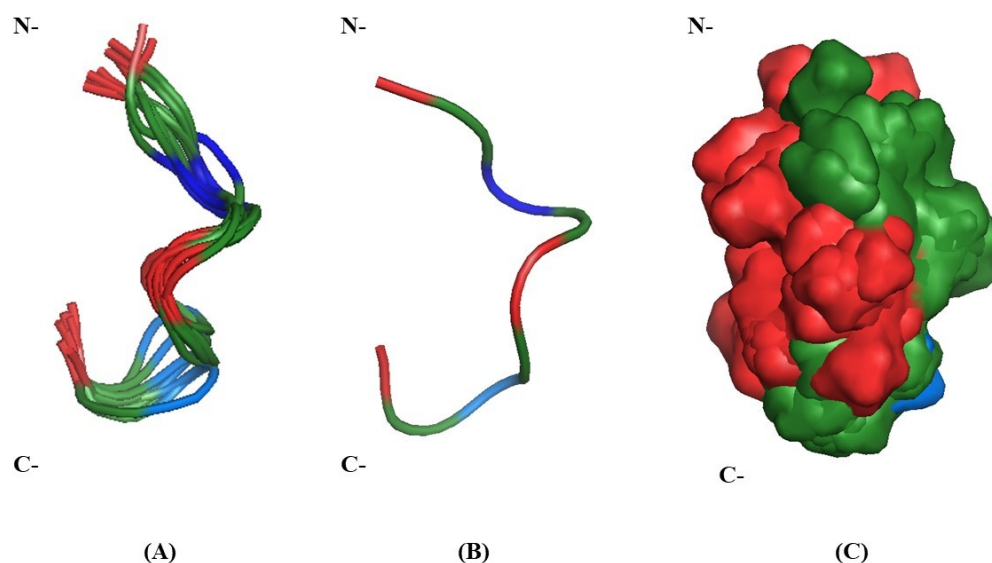


Figura 30. Representação em fita de (a) alinhamento do backbone e (b) estrutura de menor energia e (c) característica anfifílica da superfície das 10 estruturas de menor energia de Hs10 na presença de LPS. As propriedades dos aminoácidos são mostradas no seguinte código de cores: vermelho para os carregados positivamente, azul claro para os carregados negativamente, marinho para os resíduos polares e verde para os resíduos hidrofóbicos.

A família de 10 estruturas de menor energia calculadas apresentam uma face polar e outra apolar evidenciando a natureza anfifílica do IAP Hs10. Além disso, foi observado que a região *N*-terminal deste peptídeo exibe uma maior flexibilidade.

Os dados estatísticos das estruturas obtidas estão relacionados na Tabela 16 e sugerem que a família das estruturas é convergente, uma vez que os valores de RMSD são baixos. A análise do gráfico Ramachandran mostrou que mais de 70% de todos os resíduos estão nas regiões mais favorecidas do diagrama. Além disso, os resíduos localizados em regiões não permitidas do diagrama correspondem a 2.9% e estão localizados na região *N*-terminal do peptídeo que estruturalmente não é bem definida, possuindo uma maior flexibilidade.

Tabela 16. Estatística estrutural para as 10 estruturas de menor energia do IAP Hs10 na presença de LPS a 25 ° C.

Restrições de NOE	
Número total de restrições de distância	103
Número de restrições intraresiduais	72
Número de restrições sequenciais ($i, i+1$)	28
Número de restrições de alcance médio ($(i, i+j)_{j=2,3,4}$)	3
Ângulo Diedro	8
RMSD (Å)^a	
Cadeia principal	0,917
Todos os resíduos	2,04
Análise do gráfico Ramachandran^a	
Resíduos em regiões mais favorecidas	70%
Resíduos em regiões permitidas	27,1%
Resíduos em regiões não permitidas	2,9 %

^a Dados do CCPNMR usando 10 estruturas de menor energia.

As informações estruturais do Hs10 no estado ativo ligado ao LPS foram obtidas por meio do fenômeno chamado de Efeito Nuclear Overhauser transferido (transferred nuclear Overhauser effect ou trNOE). Esse efeito pode ser observado quando pequenos ligantes, como o Hs10, em grandes quantidades estão em contato com macromoléculas em quantidades menores, como o LPS, acima da Concentração Micelar Crítica (CMC ~ 14 µg/mL ou 1,6 µM).⁴⁷ Nesses casos, ocorrem pequenas mudanças químicas que são detectadas e permitem a atribuição dos sinais de ¹H. Cabe destacar que devido a pequena quantidade de LPS, alguns picos referentes a interações intermoleculares podem não ser observados e o aumento significativo da concentração de LPS pode sobrepor ou suprimir alguns sinais atrapalhando a atribuição.

Como visto anteriormente no ensaio de ITC, o Hs10 tem afinidade moderada com o LPS. Desta forma, era esperado que a adição de uma pequena quantidade do LPS induzisse alguma estruturação no Hs10, com base no trNOE. De fato, foi observado o aparecimento de NOEs que o espectro do Hs10 puro em solução aquosa não apresenta. A maior parte destes sinais são referentes a NOEs H α -HN ($i, i + 1$) e não foram observados padrões de conectividade típicos de estruturais helicoidais como H α -HN ($i, i + 3$) e H α -HN ($i, i + 4$). Assim, era esperado obter por RMN uma estrutura um arcabouço similar a uma folha- β , como indicado nos experimentos de CD, com algumas ressalvas em virtude do tamanho do peptídeo e da ausência de pontes de dissulfeto (característica desse

tipo de estrutura). Entretanto, os cálculos de estrutura resultaram no perfil observado na Figura 30, uma família de estrutura convergente, mas que não se enquadra no padrão regular de uma α -hélice ou folha- β e apresenta um perfil intermediário.

Assim, a partir desses resultados, pode-se propor que a velocidade de equilíbrio da interação do LPS com o peptídeo Hs10 não seja rápida o suficiente para que as informações estruturais de trNOEs do peptídeo Hs10 na presença de LPS sejam completamente detectados. Dessa forma, a família de estruturas obtida corresponde a estrutura do peptídeo na condição utilizada para os ensaios de RMN, que pode ser considerada uma estrutura intermediária. Possivelmente, se a afinidade Hs10/LPS fosse um pouco maior ou se a velocidade de equilíbrio entre os estados ligado e livre do peptídeo com o LPS fosse mais rápida, a condição utilizada poderia ter sido suficiente para a análise estrutural por meio do efeito trNOE. Cabe destacar que o ajuste para a obtenção da condição ideal pode não ser uma tarefa simples, uma vez que maiores quantidades de LPS podem sobrepor ou suprimir os sinais do IAP. Por fim, é importante lembrar que a atividade antimicrobiana não é adstrita a estruturas do tipo α -hélice ou folha- β , a formação de uma estrutura anfifílica tem se mostrado um dos fatores determinantes na atividade antimicrobiana, e a estrutura obtida nas condições deste experimento que se supõe ser intermediária apresenta tal característica.

5. Conclusões

O estudo estrutural do IAP Hs02, composto por 16 resíduos de aminoácidos e oriundo da proteína miosina não convencional-Ih, foi realizado por meio da técnica de RMN em solução e na presença de micelas de DPC-*d*₃₈. As informações intra- e interresiduais fornecidas pelos experimentos bidimensionais ¹H-¹H TOCSY e ¹H-¹H NOESY permitiram identificar que o peptídeo Hs02 apresenta uma estrutura helicoidal anfifílica bem definida que se estende entre os resíduos Ala3-Phe14, com sua face polar enriquecida com resíduos carregados positivamente. Ademais, foi observada certa flexibilidade na cadeia lateral do Trp2, em sua região *N*-terminal, que pode estar interagindo com a membrana microbiana por meio de interações do tipo cátion-pi. Assim, a potente atividade antimicrobiana do Hs02 pode estar relacionada a sua estrutura anfifílica helicoidal bem definida que permite que este IAP interaja tanto com a região hidrofílica quanto com a região hidrofóbica desestabilizando a membrana microbiana.

Seis novos potenciais IAPs, também oriundos de proteínas humanas, foram selecionados com o auxílio do programa Kamal. Dentre os quatro peptídeos testados (Hs05, Hs06, Hs07 e Hs10), apenas o Hs10 apresentou atividade antimicrobiana. Em geral, a metodologia utilizada para localizar fragmentos internos de proteínas com atividade antimicrobiana apresenta grande potencial. Entretanto, por se tratar de moléculas complexas, ainda, são necessários testes biológicos para constatar se apresentam atividade antimicrobiana. Outro ponto observado neste estudo é que o número limitado de proteínas utilizadas para a varredura resultou em peptídeos com propriedades físico-químicas aproximadas as desejadas. Assim, é necessário o uso de bibliotecas maiores para aumentar a probabilidade de encontrar peptídeos com atividade antimicrobiana. Entretanto, mesmo com o número restrito de proteínas utilizado neste trabalho, foi possível encontrar o IAP Hs10.

O IAP Hs10 é um peptídeo curto, com apenas 9 resíduos de aminoácido, encriptado na proteína humana Complemento C3. Nesse trabalho, o peptídeo Hs10 foi sintetizado e purificado com sucesso. Por meio de testes *in vitro*, foi possível verificar que ele apresenta atividade antimicrobiana apenas contra bactérias Gram-negativas e baixa citotoxicidade em fibroblastos humanos. Cabe destacar que esta seletividade na sua ação antibiótica não é uma característica inerente a PAMs com estrutura similar. Este peptídeo apresenta ainda efeito aditivo ao ser utilizado em associação com o IAP Hs02, ou seja, um efeito correspondente à soma dos efeitos separados dos IAPs, com uma redução na dosagem de ambos, o que pode resultar em uma menor citotoxicidade e demonstra seu potencial para ser um candidato para estudos de terapias combinada

Ensaio de CD indicaram que apenas na presença de membranas biomiméticas aniônicas e de LPS, as moléculas de Hs10 se estruturam. Os resultados de ITC apontaram que a interação com o LPS ocorre principalmente por meio de interações eletrostáticas. Dessa forma, a análise em conjunto destes dados sugere que o LPS, principal componente da membrana externa da bactérias Gram-negativas, está relacionada de alguma forma ao mecanismo de ação deste IAP. Isso confere certa seletividade ao Hs10, uma vez que bactérias Gram-positivas não possuem uma membrana externa composta por LPS. Além disso, foi observado ainda nos experimentos de DLS que o IAP Hs10 induz um aumento no tamanho dos agregados de LPS, que pode estar relacionado a uma possível redução da repulsão eletrostática nessas partículas, o que pode contribuir para neutralização do LPS que quando liberado em grandes quantidades na corrente sanguínea pode resultar em

sepe. Essa redução na repulsão eletrostática pode explicar os agregados de bacilos observados nas imagens realizadas por AFM, que também evidenciaram uma redução no tamanho dos bacilos e extravasamento de conteúdo citoplasmático.

Por fim, apesar dos resultados de CD indicarem que o peptídeo apresenta um arcabouço similar a uma folha- β na presença de LPS, os cálculos da estrutura 3D deste IAP na presença de pequenas quantidades LPS revelaram uma estrutura que não se enquadra no padrão regular de uma α -hélice ou folha- β . Supõe-se que o perfil apresentado corresponda a uma estruturação intermediária devido a velocidade de equilíbrio da interação do LPS com o peptídeo Hs10 não ser rápida o suficiente para que as informações estruturais de trNOEs sejam completamente detectadas.

Desse modo, o peptídeo Hs10 é um IAP promissor, uma vez que apresenta atividade antimicrobiana e uma possível seletividade para bactérias Gram-negativas, com um reduzido custo de produção por ser um peptídeo sintético de 9 resíduos de aminoácidos. Por fim, este trabalho traz como perspectiva a possibilidade de aplicar a metodologia aqui empregada em uma maior base de dados (estrutura primária de proteínas), bem como de uma maior diversidade de organismos de origem para se obter IAPs com similar ou maior potência.

6. Referências bibliográficas

- (1) Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>.
- (2) Torres, M. D. T.; Sothiselvam, S.; Lu, T. K.; de la Fuente-Nunez, C. Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *J. Mol. Biol.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.015>.
- (3) Kang, H.; Kim, C.; Seo, C. H.; Park, Y. The Therapeutic Applications of Antimicrobial Peptides (AMPs): A Patent Review. *J. Microbiol.* **2017**, *55* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6452-1>.
- (4) Patel, S.; Akhtar, N. Antimicrobial Peptides (AMPs): The Quintessential ‘Offense and Defense’ Molecules Are More than Antimicrobials. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *95*, 1276–1283. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.042>.
- (5) Brand, G. D.; Magalhães, M. T. Q.; Tinoco, M. L. P.; Aragão, F. J. L.; Nicoli, J.; Kelly, S. M.; Cooper, A.; Bloch, C. Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. *PLoS One* **2012**, *7* (9), e45848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045848>.
- (6) Brand, G. D.; Ramada, M. H. S.; Genaro-Mattos, T. C.; Bloch, C. Towards an Experimental Classification System for Membrane Active Peptides. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1194. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19566-w>.
- (7) Ramada, M. H. S.; Brand, G. D.; Abrão, F. Y.; Oliveira, M.; Filho, J. L. C.; Galbieri, R.; Gramacho, K. P.; Prates, M. V.; Bloch, C. Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 13263. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13685-6>.
- (8) Brand, G. D. Estratégias Para Prospecção e Predição de Peptídeos Bioativos, Universidade de Brasília, 2007.
- (9) Bloch JR, C. ; Silva, L. P. ;; Magalhaes, B. S. Peptides and Polypeptides Identification Comprises Detection of Potential Functions DNA Fragments, for Genetic Engineering in Organisms. BR200506317, 2005.
- (10) Chan, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, 1st ed.; Oxford University Press: New York, 2000.
- (11) Brand, G. D.; Ramada, M. H. S.; Correa, R.; Ribeiro, D. J. S.; Santos, M. A.; Vasconcelos, A. G.; Murad, M.; Fh, L. C.; Abr, F. Y.; Prates, M. V. Intragenic Antimicrobial Peptides (IAPs) from Human Proteins with Potent Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activity. *PLoS One* **2019**, *14*, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220656>.
- (12) Mariano, G. H.; Sá, L. G. G. De; Carmo, E. M.; Santos, M. A.; Fh, J. L. C.; Lira, B. O. V; Barbosa, E. A.; Araujo, A. R.; Leite, J. R. S. A.; Ramada, M. H. S.; et al. Characterization of Novel Human Intragenic Antimicrobial Peptides , Incorporation and Release Studies from Ureasil-Polyether Hybrid Matrix. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *119* (July 2020), 111581. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111581>.
- (13) Blazyk, J.; Wiegand, R.; Klein, J.; Hammer, J.; Epanand, R. M.; Epanand, R. F.; Maloy, W. L.; Kari, U. P. A Novel Linear Amphipathic β -Sheet Cationic Antimicrobial

- Peptide with Enhanced Selectivity for Bacterial Lipids. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (30), 27899–27906. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102865200>.
- (14) Ong, Z. Y.; Gao, S. J.; Yang, Y. Y. Short Synthetic β -Sheet Forming Peptide Amphiphiles as Broad Spectrum Antimicrobials with Antibiofilm and Endotoxin Neutralizing Capabilities. *Adv. Funct. Mater.* **2013**, 23 (29), 3682–3692. <https://doi.org/10.1002/adfm.201202850>.
 - (15) Ma, Z.; Zhang, R.; Hai, D.; Lu, Z.; Lv, F.; Zhao, H.; Zhang, C.; Mcallister, T. A.; Stanford, K.; Bie, X. Antibiofilm Activity and Modes of Action of a Novel β -Sheet Peptide against Multidrug-Resistant Salmonella Enterica. *Food Res. Int.* **2019**, 125 (June), 108520. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108520>.
 - (16) Wu, H.; Ong, Z. Y.; Liu, S.; Li, Y.; Wiradharma, N.; Yang, Y. Y.; Ying, J. Y. Synthetic β -Sheet Forming Peptide Amphiphiles for Treatment of Fungal Keratitis. *Biomaterials* **2015**, 43, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.052>.
 - (17) Samantha Ng, S. M.; Yap, J. M.; Lau, Q. Y.; Ng, F. M.; Qian Ong, E. H.; Barkham, T.; Pei Teo, J. W.; Alfatah, M.; Kong, K. W.; Hoon, S.; et al. Structure-Activity Relationship Studies of Ultra-Short Peptides with Potent Activities against Fluconazole-Resistant Candida Albicans. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 150, 479–490. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.027>.
 - (18) Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A. Amphipathic, α -Helical Antimicrobial Peptides. *Biopolymers* **2000**, 55 (1), 4–30. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M).
 - (19) Wuthrich, K. *Nmr Of Proteins And Nucleic Acids*, 1st ed.; John Wiley & Sons Inc., 1986.
 - (20) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd ed.; Worth Publishers, 2000.
 - (21) Wang, G.; Li, X.; Wang, Z. APD3: The Antimicrobial Peptide Database as a Tool for Research and Education. *Nucleic Acids Res.* **2016**, 44 (D1), D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>.
 - (22) Mishra, B.; Reiling, S.; Zarena, D.; Wang, G. Host Defense Antimicrobial Peptides as Antibiotics: Design and Application Strategies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, 38, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.014>.
 - (23) Moravej, H.; Moravej, Z.; Yazdanparast, M.; Heiat, M.; Mirhosseini, A.; Moosazadeh Moghaddam, M.; Mirnejad, R. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microb. Drug Resist.* **2018**, 24 (6), 747–767. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>.
 - (24) The Antimicrobial Peptide Database <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> (accessed Mar 10, 2022).
 - (25) Zhong, G.; Cheng, J.; Liang, Z. C.; Xu, L.; Lou, W.; Bao, C.; Ong, Z. Y.; Dong, H.; Yang, Y. Y.; Fan, W. Short Synthetic β -Sheet Antimicrobial Peptides for the Treatment of Multidrug-Resistant Pseudomonas Aeruginosa Burn Wound Infections. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, 6 (7), 1601134. <https://doi.org/10.1002/adhm.201601134>.
 - (26) Lau, J. L.; Dunn, M. K. Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 26 (10),

- 2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>.
- (27) Carvalho, L. A. C.; Machini, M. T. Hemocidinas Derivadas Da Hemoglobina: Estruturas, Propriedades e Perspectivas. *Quim. Nova* **2013**, *36* (7), 1021–1029. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000700017>.
- (28) Kang, S.-J.; Park, S. J.; Mishig-Ochir, T.; Lee, B.-J. Antimicrobial Peptides: Therapeutic Potentials. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2014**, *12* (12), 1477–1486. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.976613>.
- (29) Kumar, P.; Kizhakkedathu, J. N.; Straus, S. K. Antimicrobial Peptides : Diversity , Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. **2018**. <https://doi.org/10.3390/biom8010004>.
- (30) Cândido, E. S.; Cardoso, M. H.; Chan, L. Y.; Torres, M. D. T.; Oshiro, K. G. N.; Porto, W. F.; Ribeiro, S. M.; Haney, E. F.; Hancock, R. E. W.; Lu, T. K.; et al. Short Cationic Peptide Derived from Archaea with Dual Antibacterial Properties and Anti-Infective Potential. **2019**, *5*, 1081–1086. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00073>.
- (31) Abbassi, F.; Lequin, O.; Piesse, C.; Goasdoué, N.; Foulon, T.; Nicolas, P.; Ladram, A.; Inge, P. Temporin-SHF, a New Type of Phe-Rich and Hydrophobic Ultrashort Antimicrobial Peptide *. **2010**, *285* (22), 16880–16892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.097204>.
- (32) Mishra, B.; Lushnikova, T.; Golla, R. M.; Wang, X.; Wang, G. Design and Surface Immobilization of Short Anti-Biofilm Peptides Biswajit. *Acta Biomater.* **2016**, *49*, 316–328. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.061>.
- (33) Cardoso, M. H.; Santos, V. P. M.; Costa, B. O.; Buccini, D. F.; Rezende, S. B.; Porto, W. F.; Santos, M. J.; Silva, O. N.; Ribeiro, S. M.; Franco, O. L.; et al. Microbial Pathogenesis A Short Peptide with Selective Anti-Biofilm Activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Bacteria. *Microb. Pathogenesis.* **2019**, *135* (June), 103605. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103605>.
- (34) Fensterseifer, I. C. M.; Felício, M. R.; Alves, E. S. F.; Cardoso, M. H.; Torres, M. D. T.; Matos, C. O.; Silva, O. N.; Lu, T. K.; Freire, M. V.; Neves, N. C.; et al. Selective Antibacterial Activity of the Cationic Peptide PaDBS1R6 against Gram-Negative Bacteria. *BBA - Biomembr.* **2019**, *1861* (7), 1375–1387. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.03.016>.
- (35) Pasupuleti, M.; Schmidtchen, A.; Malmsten, M. Antimicrobial Peptides: Key Components of the Innate Immune System. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2012**, *32* (2), 143–171. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>.
- (36) Pane, K.; Durante, L.; Crescenzi, O.; Cafaro, V.; Pizzo, E.; Varcamonti, M.; Zanfardino, A.; Izzo, V.; Di Donato, A.; Notomista, E. Antimicrobial Potency of Cationic Antimicrobial Peptides Can Be Predicted from Their Amino Acid Composition: Application to the Detection of “Cryptic” Antimicrobial Peptides. *J. Theor. Biol.* **2017**, *419*, 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.012>.
- (37) Sá, L. G. G. de. Prospecção, Síntese e Aplicação de Peptídeos Intragênicos Antimicrobianos Na Conservação de Alimentos, Universidade de Brasília, 2018.
- (38) Murad, A. M.; Cardozo FH, J. L.; Brand, G. D.; Bloch JR, C. KAMAL. BR512020000256-0, 2020.

- (39) Ciumac, D.; Gong, H.; Hu, X.; Lu, J. R. Journal of Colloid and Interface Science Membrane Targeting Cationic Antimicrobial Peptides. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *537*, 163–185. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103>.
- (40) Michael T. Madigan, John M. Martinko, Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley, D. A. S. *Microbiologia de Brock*, 14th ed.; Artmed Editora: Porto Alegre, 2016.
- (41) Teixeira, V.; Feio, M. J.; Bastos, M. Role of Lipids in the Interaction of Antimicrobial Peptides with Membranes. *Prog. Lipid Res.* **2012**, *51* (2), 149–177. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>.
- (42) Souza, K. R. de. Análise Conformacional e Estudos Do Modo de Interação Do Peptídeo Bioativo EcPis-4S Em Meios Miméticos de Membrana, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2019.
- (43) Bozelli, J. C.; Yune, J.; Dang, X.; Lakshmaiah, J.; Wang, G.; Epan, R. M. Membrane Activity of Two Short Trp-Rich Amphipathic Peptides. *BBA - Biomembr.* **2020**, *1862* (7), 183280. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183280>.
- (44) Velkov, T.; Thompson, P. E.; Nation, R. L.; Li, J. Structure - Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. **2010**, 1898–1916. <https://doi.org/10.1021/jm900999h>.
- (45) Paczosa, M. K. Klebsiella Pneumoniae : Going on the Offense with a Strong Defense. **2016**, *80* (3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15.Address>.
- (46) Alexander, C.; Rietschel, E. T. Invited Review Bacterial Lipopolysaccharides and Innate Immunity. **2001**.
- (47) Ghosh, A.; Bera, S.; Shai, Y.; Luisa, M.; Bhunia, A. NMR Structure and Binding of Esculentin-1a (1 – 21) NH 2 and Its Diastereomer to Lipopolysaccharide : Correlation with Biological Functions. *BBA - Biomembr.* **2016**, *1858* (4), 800–812. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.027>.
- (48) Shang, D.; Zhang, Q.; Dong, W.; Liang, H.; Bi, X. The Effects of LPS on the Activity of Trp-Containing Antimicrobial Peptides against Gram-Negative Bacteria and Endotoxin Neutralization. *Acta Biomater.* **2016**, *33*, 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.01.019>.
- (49) Manzo, G.; Scorciapino, M. A.; Wadhvani, P.; Bürck, J.; Montaldo, P.; Pintus, M.; Sanna, R.; Casu, M.; Giuliani, A. Enhanced Amphiphilic Profile of a Short β -Stranded Peptide Improves Its Antimicrobial Activity. **2015**, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116379>.
- (50) Alves, E. S. F. Estudo Por Ressonância Magnética Nuclear Da Estrutura e Interação de Novos Protótipos de Biofármacos Antimicrobianos, Universidade Federal de Goiás, 2016.
- (51) Claridge, T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 2nd ed.; Backvall, J. E., Baldwin, J. E., Williams, R. M., Eds.; Elsevier, 2009.
- (52) Huenges, M.; Kessler, H. Structural Chemistry Using NMR Spectroscopy, Peptides. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; Elsevier, 2016; pp 293–305. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00295-8>.
- (53) Haney, E. F.; Vogel, H. J. Chapter 1 NMR of Antimicrobial Peptides. In *Annual*

- Reports on NMR Spectroscopy*; Elsevier Ltd, 2009; Vol. 65, pp 1–51. [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(08\)00201-9](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(08)00201-9).
- (54) Skinner, S. P.; Goult, B. T.; Fogh, R. H.; Boucher, W.; Stevens, T. J.; Laue, E. D.; Vuister, G. W. Structure Calculation, Refinement and Validation Using CcpNmr Analysis. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2015**, *71* (1), 154–161. <https://doi.org/10.1107/S1399004714026662>.
- (55) Mercurio, F. A.; Scaloni, A.; Caira, S.; Leone, M. The Antimicrobial Peptides Casocidins I and II: Solution Structural Studies in Water and Different Membrane-Mimetic Environments. *Peptides* **2019**, *114*, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.09.004>.
- (56) Norris, M.; Fetler, B.; Marchant, J.; Johnson, B. A. NMRFX Processor: A Cross-Platform NMR Data Processing Program. *J. Biomol. NMR* **2016**, *65* (3–4), 205–216. <https://doi.org/10.1007/s10858-016-0049-6>.
- (57) Brünger, A. T. Version 1.2 of the Crystallography and NMR System. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (11), 2728–2733. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.406>.
- (58) Rieping, W.; Habeck, M.; Bardiaux, B.; Bernard, A.; Malliavin, T. E.; Nilges, M. ARIA2: Automated NOE Assignment and Data Integration in NMR Structure Calculation. *Bioinformatics* **2007**, *23* (3), 381–382. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl589>.
- (59) Toivonen, L.; Schuez-Havupalo, L.; Rulli, M.; Ilonen, J.; Pelkonen, J.; Melen, K.; Julkunen, I.; Peltola, V.; Waris, M. Blood MxA Protein as a Marker for Respiratory Virus Infections in Young Children. *J. Clin. Virol.* **2015**, *62*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.11.018>.
- (60) Treitinger, A.; Spada, C.; Silva, L. M. D. da; Hermes, E. M.; Amaral, J. A.; Abdalla, D. S. P. Lipid and Acute-Phase Protein Alterations in HIV-1 Infected Patients in the Early Stages of Infection: Correlation with CD4+ Lymphocytes. *Brazilian J. Infect. Dis.* **2001**, *5* (4), 192–199. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702001000400005>.
- (61) Jahoor, F.; Gazzard, B.; Phillips, G.; Sharpstone, D.; Delrosario, M.; Frazer, M. E.; Heird, W.; Smith, R.; Jackson, A. The Acute-Phase Protein Response to Human Immunodeficiency Virus Infection in Human Subjects. *Am. J. Physiol. Metab.* **1999**, *276* (6), E1092–E1098. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.276.6.E1092>.
- (62) Chieux, V.; Chehadeh, W.; Hautecoeur, P.; Harvey, J.; Wattré, P.; Hober, D. Increased Levels of Antiviral MxA Protein in Peripheral Blood of Patients with A Chronic Disease of Unknown Etiology*. *J. Med. Virol.* **2001**, *65* (2), 301–308. <https://doi.org/10.1002/jmv.2034>.
- (63) Shetty, V.; Jain, P.; Nickens, Z.; Sinnathamby, G.; Mehta, A.; Philip, R. Investigation of Plasma Biomarkers in HIV-1/HCV Mono- and Coinfected Individuals by Multiplex ITRAQ Quantitative Proteomics. *Omi. A J. Integr. Biol.* **2011**, *15* (10), 705–717. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0004>.
- (64) Luo, Y.; Muesing, M. A. Mass Spectrometry-Based Proteomic Approaches for Discovery of HIV–Host Interactions. *Future Virol.* **2014**, *9* (11), 979–992. <https://doi.org/10.2217/fvl.14.86>.
- (65) Zhang, L.; Jia, X.; Zhang, X.; Sun, J.; Peng, X.; Qi, T.; Ma, F.; Yin, L.; Yao, Y.; Qiu, C.; et al. Proteomic Analysis of PBMCs: Characterization of Potential HIV-

- Associated Proteins. *Proteome Sci.* **2010**, 8 (1), 12. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-8-12>.
- (66) Suckau, D.; Resemann, A.; Schuerenberg, M.; Hufnagel, P.; Franzen, J.; Holle, A. A Novel MALDI LIFT-TOF/TOF Mass Spectrometer for Proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 376 (7), 952–965. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2057-0>.
- (67) Scopes, R. K. Measurement of Protein by Spectrophotometry at 205 Nm. *Anal. Biochem.* **1974**, 59 (1), 277–282. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(74\)90034-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90034-7).
- (68) Waddell, W. J. A Simple Ultraviolet Spectrophotometric Method for the Determination of Protein. *J. Lab. Clin. Med.* **1956**, 48 (2), 311–314.
- (69) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition*, 9th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012; Vol. 32. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.91790>.
- (70) Hausler, W. J. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th ed.; Lippincott Williams & Wilkin, 2005; Vol. 29. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(97\)00063-1](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(97)00063-1).
- (71) Araujo, A. R.; Ramos-Jesus, J.; Oliveira, T. M.; Carvalho, A. dressa M. A.; Nunes, P. H. M.; Daboit, T. C.; Carvalho, A. P.; Barroso, M. F.; Almeida, M. P.; Plácido, A.; et al. Industrial Crops & Products Identi Fi Cation of Eschweilenol C in Derivative of Terminalia Fagifolia Mart . and Green Synthesis of Bioactive and Biocompatible Silver Nanoparticles. *Ind. Crop. Prod.* **2019**, 137 (November 2018), 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.012>.
- (72) Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M. The Chemical Shift Index: A Fast and Simple Method for the Assignment of Protein Secondary Structure through NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **1992**, 31 (6), 1647–1651. <https://doi.org/10.1021/bi00121a010>.
- (73) Cheung, M.-S.; Maguire, M. L.; Stevens, T. J.; Broadhurst, R. W. DANGLE: A Bayesian Inferential Method for Predicting Protein Backbone Dihedral Angles and Secondary Structure. *J. Magn. Reson.* **2010**, 202 (2), 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2009.11.008>.
- (74) Chan, D. I.; Prenner, E. J.; Vogel, H. J. Tryptophan- and Arginine-Rich Antimicrobial Peptides: Structures and Mechanisms of Action. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2006**, 1758 (9), 1184–1202. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.04.006>.
- (75) Zhu, X.; Dong, N.; Wang, Z.; Ma, Z.; Zhang, L.; Ma, Q.; Shan, A. Design of Imperfectly Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Cell Selectivity. *Acta Biomater.* **2014**, 10 (1), 244–257. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.043>.
- (76) Uniprot <https://www.uniprot.org/uniprot/> (accessed May 22, 2019).
- (77) Cantú, M. D.; Carrilho, E.; Wulff, N. A.; Palma, M. S. Sequenciamento de Peptídeos Usando Espectrometria de Massas: Um Guia Prático. *Quim. Nova* **2008**, 31 (3), 669–675. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300034>.
- (78) Barreto-santamar, A.; Ar, G.; Patarroyo, M. A.; Patarroyo, M. E. How to Combat Gram-Negative Bacteria Using Antimicrobial Peptides: A Challenge or an Unattainable Goal ? **2021**, 1–17.

- (79) WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed Mar 20, 2022).
- (80) Grela, E.; Kozłowska, J.; Grabowiecka, A. Current Methodology of MTT Assay in Bacteria – A Review. *Acta Histochem.* **2018**, *120* (4), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>.
- (81) Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. How to Study Proteins by Circular Dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2005**, *1751* (2), 119–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>.
- (82) Kelly, S. M.; Price, N. C. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2000**, *1* (4), 349–384.
- (83) Leite, S.; Moraes, D.; Olímpia, M.; Rezende, O.; Química, I. De; Carlos, D. S.; Paulo, U. D. S.; Sãocarlense, A. T.; Sp, S. C. Determinação Da Concentração Micelar Crítica de Ácidos Húmicos Por Medidas de Condutividade e Espectroscopia. **2004**, *27* (5), 701–705.
- (84) Rahman, A.; Brown, C. W. Effect of PH on the Critical Micelle Concentration of Sodium Dodecyl Sulphate. *28* (1983), 1331–1334.
- (85) Corrêa, D. H. A.; Ramos, C. H. I. The Use of Circular Dichroism Spectroscopy to Study Protein Folding , Form and Function. *African J. Biochem. Redsearch* **2009**, *3* (5), 164–173.
- (86) Ryder, M. P.; Wu, X.; McKelvey, G. R.; Mcguire, J.; Schilke, K. F. Binding Interactions of Bacterial Lipopolysaccharide and the Cationic Amphiphilic Peptides Polymyxin B and WLBU2. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2014**. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.004>.
- (87) Domingues, M. M.; Castanho, M. A. R. B.; Santos, N. C. RBPI 21 Promotes Lipopolysaccharide Aggregation and Exerts Its Antimicrobial Effects by (Hemi) Fusion of PG-Containing Membranes. **2009**, *4* (12), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008385>.

Anexo A

Espectro de TOCSY e NOESY do IAP HS02

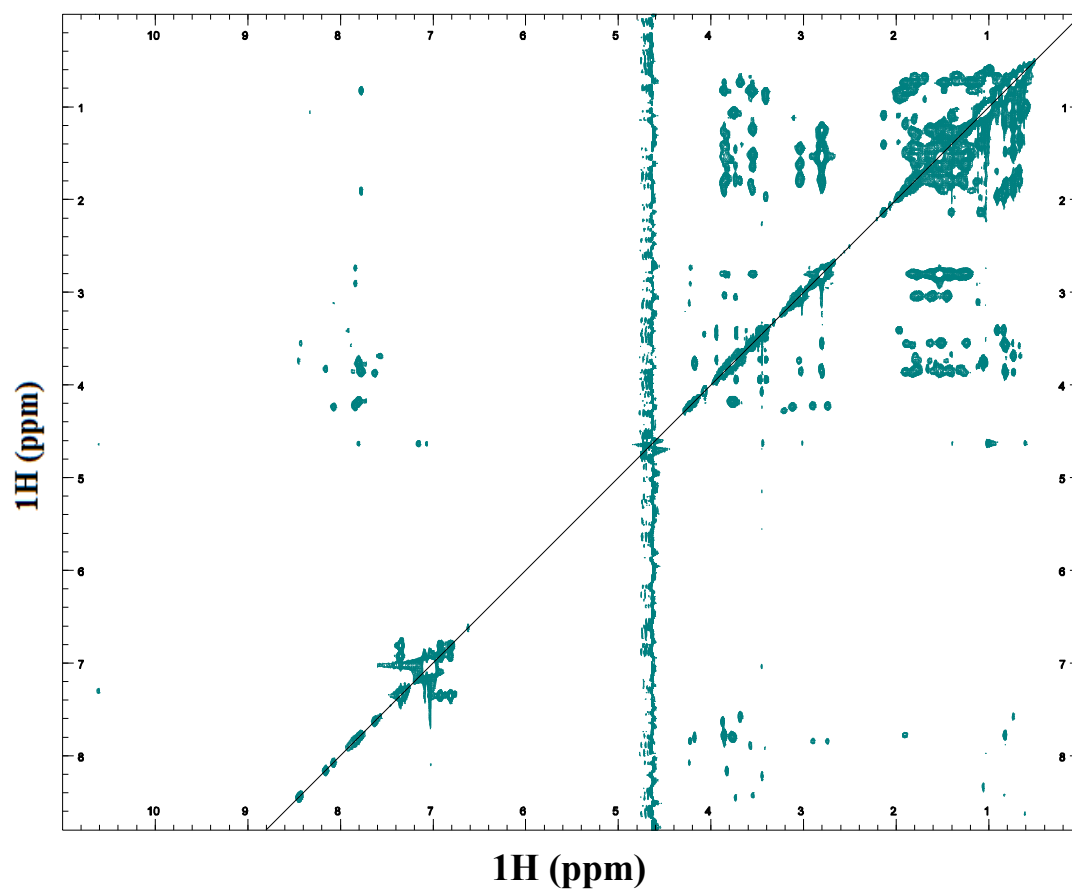


Figura C1. Espectro de ^1H - ^1H TOCSY do Hs02 (2 mM) na presença de 50 mM de DPC- d_{38} a 25 ° C e pH 7.

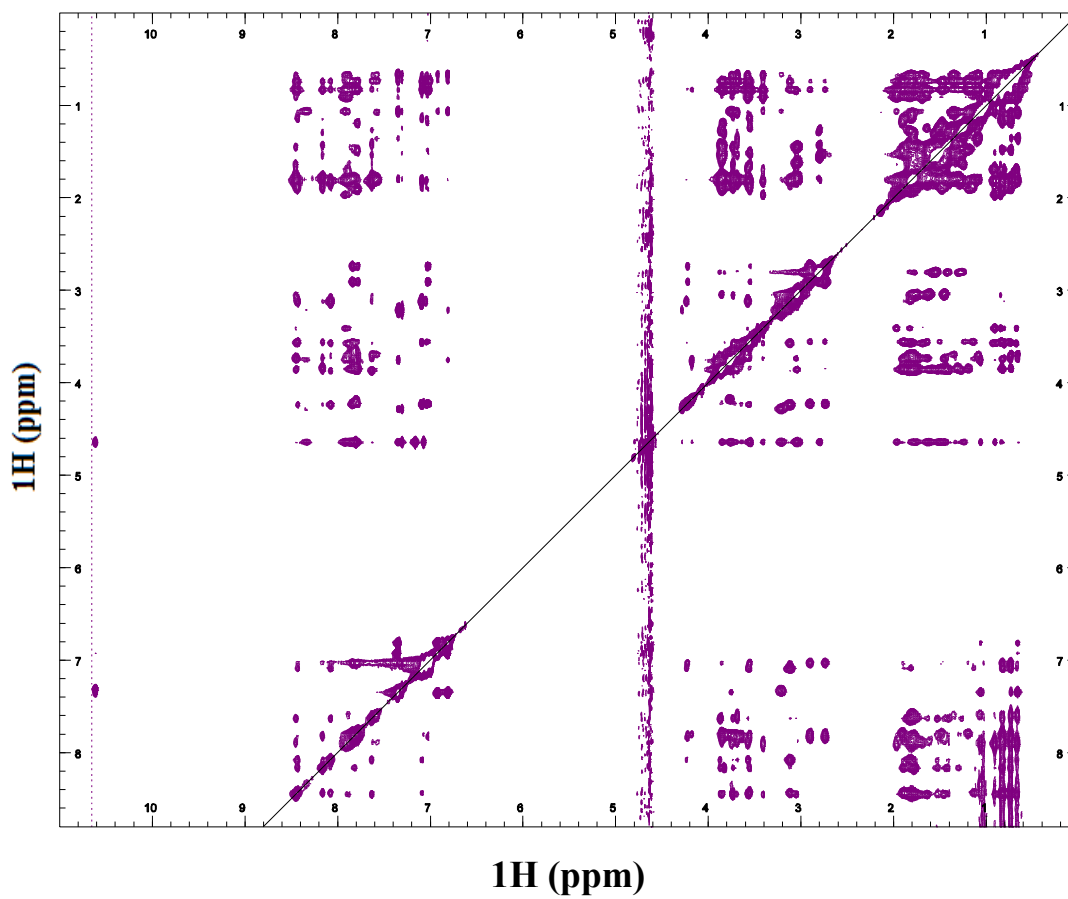


Figura C2. Espectro de ^1H - ^1H NOESY do Hs02 (2 mM) na presença de 50 mM de DPC- d_{38} a 25 ° C e pH 7.

Anexo B

Lista de proteínas superexpressas no sangue humano durante infecções virais.

Proteína	código
2-5A synthetase	P00973
Haptoglobin	P00738
IgA	P11912
APOA2 Apolipoprotein A-II	P02652
APOC2 Apolipoprotein C-II	P02655
APOE Apolipoprotein E	P02649
C3 Complement C3	P01024
HRG Histidine-rich glycoprotein	P04196
IGHG1 Ig gamma-1 chain C region	P01857
IGKC Ig kappa chain C region	P01834
IGHM Ig mu chain C region	P01871
APOC3 Apolipoprotein C-III (HIV eHCV)	P02656
POTEE POTE ankyrin domain family member E (HIV eHCV)	Q6S8J3
Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	P04433
TTR Transthyretin	P02766
IGLC1 Ig lambda chain C regions	P01842
IGJ Immunoglobulin J chain	P01591
Ig kappa chain V-III region NG9 (Fragment)	P01621
APOB Apolipoprotein B-100 (HCV)	P04114
Alpha-1-antitrypsin	P01009
Alpha-1- antichymotrypsin	P01011
Complement component C9	P02748
Serum albumin	P02768
Coagulation factor XI	P03951
Plasma kallikrein	P03952
Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	Q86VB7
Tyrosine-protein kinase Mer	Q12866
Intercellular adhesion molecule 1	P05362
Neogenin	Q92859
Intercellular adhesion molecule 2	P13598
IgGFc-binding protein	Q9Y6R7
Noelin	Q99784
Polymeric immunoglobulin receptor	P01833
Cathepsin D	P07339
Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta	Q12913
Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1	Q9Y5Y7
Probable G-protein coupled receptor	Q99527
Cell adhesion molecule 1	Q9BY67
CD166 antigen	Q13740

Interleukin-6 receptor subunit beta	P40189
Adenosine deaminase CECR1	Q9NZK5
Galectin-3-binding protein	Q08380
L-selectin	P14151
Phospholipid transfer protein	P55058
Vascular cell adhesion protein 1	P19320
Alpha-2-macroglobulin	P01023
Protein HEG homolog 1	Q9ULI3
Fibulin 1	P23142
Von Willebrand factor	P04275
Ig mu chain C region	P01871
Lumican	P51884
ICOS ligand	O75144
Transferrin receptor protein 1	P02786
Ig gamma-3 chain C region	P01860
Macrophage receptor MARCO	Q9UEW3
Complement factor H-related protein 1	Q03591
Complement component C8 alpha chain	P07357
Heparin cofactor 2	P05546
Serum paraoxonase/lactonase 3	Q15166
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	Q06033
Apolipoprotein F	Q13790
Complement factor H-related protein 3	Q02985
KPYM_HUMAN Pyruvate kinase isozymes M1/M2 - Homo sapiens (Human)	P14618
TLN1_HUMAN Talin-1 - Homo sapiens (Human)	Q9Y490
LDHB_HUMAN L-lactate dehydrogenase B chain - Homo sapiens (Human)	P07195
CAP1_HUMAN Adenylyl cyclase-associated protein 1 - Homo sapiens (Human)	Q01518
ENOA_HUMAN Alpha-enolase - Homo sapiens (Human)	P06733
EHD3_HUMAN EH domain-containing protein 3 - Homo sapiens (Human)	Q9NZN3
COR1C_HUMAN Coronin-1C - Homo sapiens (Human)	Q9ULV4
ST1A3_HUMAN Sulfotransferase 1A3/1A4 - Homo sapiens (Human)	P0DMM9
FLNA_HUMAN Filamin-A - Homo sapiens (Human)	P21333
VINC_HUMAN Vinculin - Homo sapiens (Human)	P18206
IGKC_HUMAN Ig kappa chain C region - Homo sapiens (Human)	P01834
GNB1_HUMAN Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1 - Homo sapiens (Human)	P62873
ACTB_HUMAN Actin, cytoplasmic 1	P60709
Apo E	P02649
Apo AI	P02647
Apo AII	P02652
Apo AIV	P06727
Complement C4a	P0C0L4

Complement C4b	P0C0L5
Serum amyloid protein A (SAA) ^d	P02735
Ceruloplasmin	P00450

Anexo C

Tabela A1. Valores de massa dos aminoácidos utilizados na SPFS para a escala de 0,15mmol.

Aminoácido	Reagente	4 equivalentes (mg)
A	Fmoc-Ala-OH	186,8
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH	351,4
D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	246,9
E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	255,3
F	Fmoc-Phe-OH	232,5
G	Fmoc-Gly-OH	178,4
H	Fmoc-His(Trt)-OH	371,8
I	Fmoc-Ile-OH	212,1
K	Fmoc-Lys(Boc)-OH	281,1
M	Fmoc-Met-OH	222,9
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH	358,0
P	Fmoc-Pro-OH	202,42
Q	Fmoc-Gln(trt)-OH	366,4
R	Fmoc-Arg(Pbf)-OH	389,3
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH	230,1
T	Fmoc-Thr(tBu)-OH	238,5
V	Fmoc-Val-OH	203,6
W	Fmoc-Trp(Boc)-OH	316,0
Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	275,7
L	Fmoc-Leu-OH	212,0

Anexo D

Cromatogramas da purificação dos peptídeos.

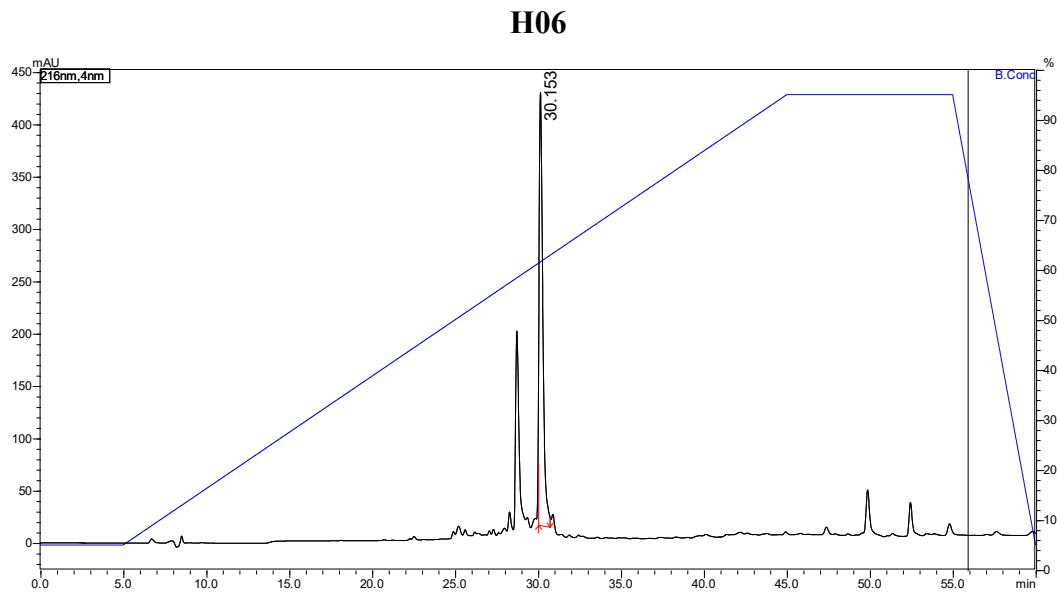
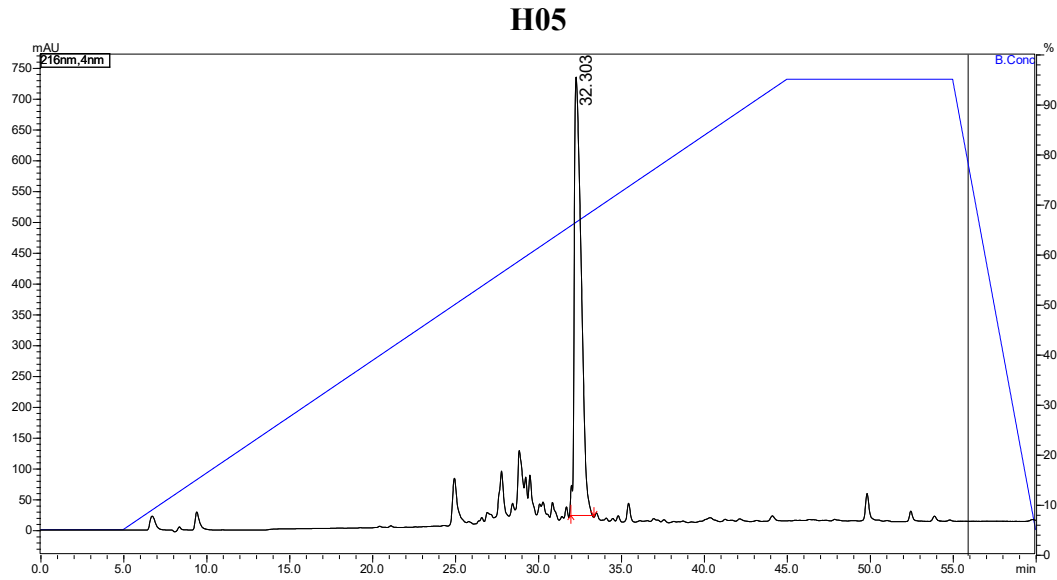
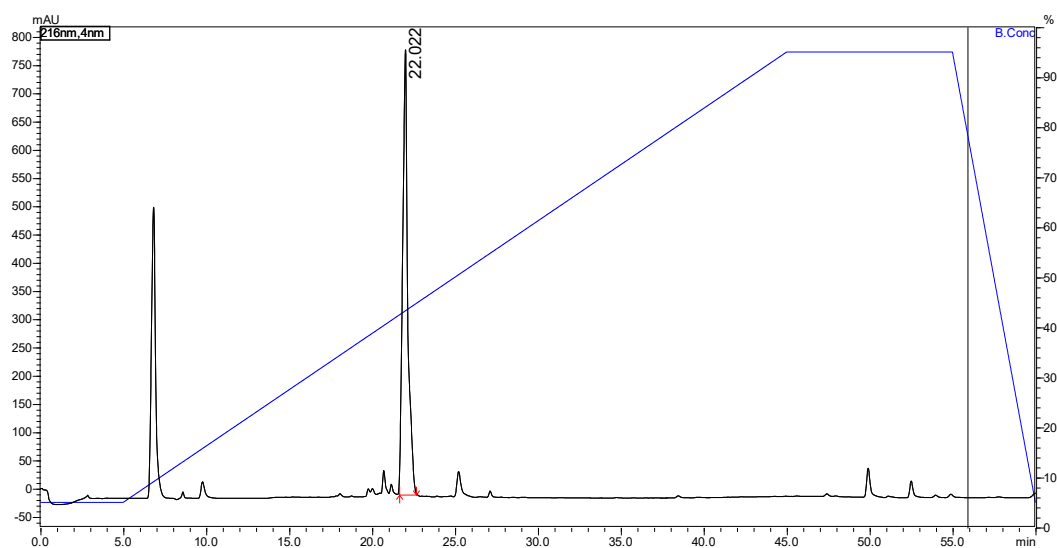


Figura D1. Cromatogramas da purificação dos peptídeos H05 e H06.

H07



H08

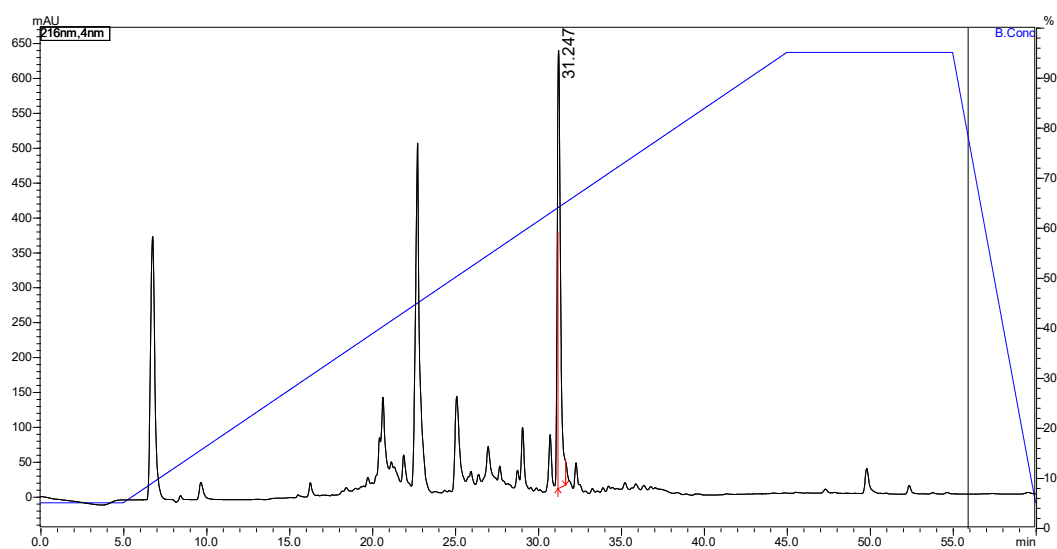
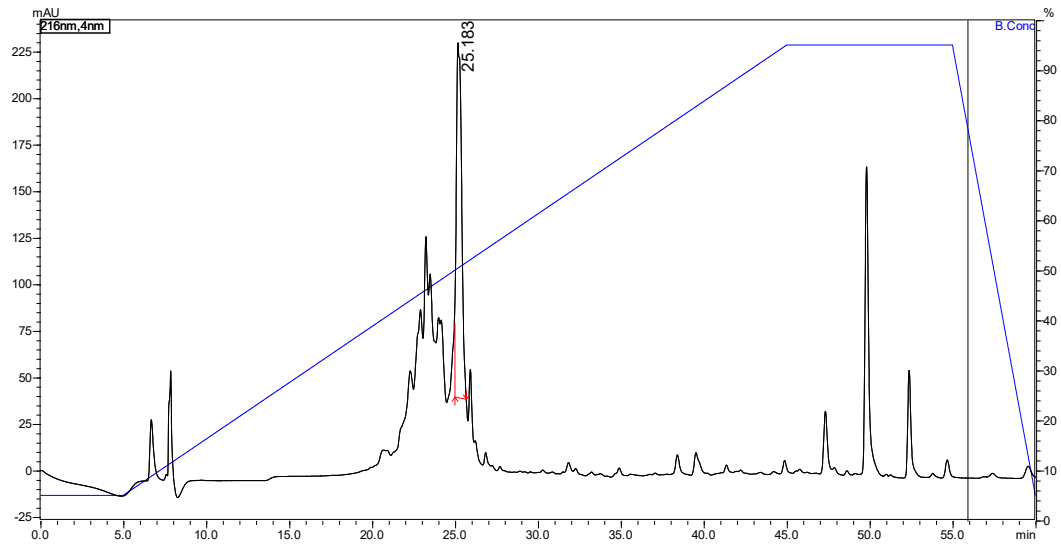


Figura D2. Cromatogramas da purificação dos peptídeos H07 e H08.

H09



Hs10

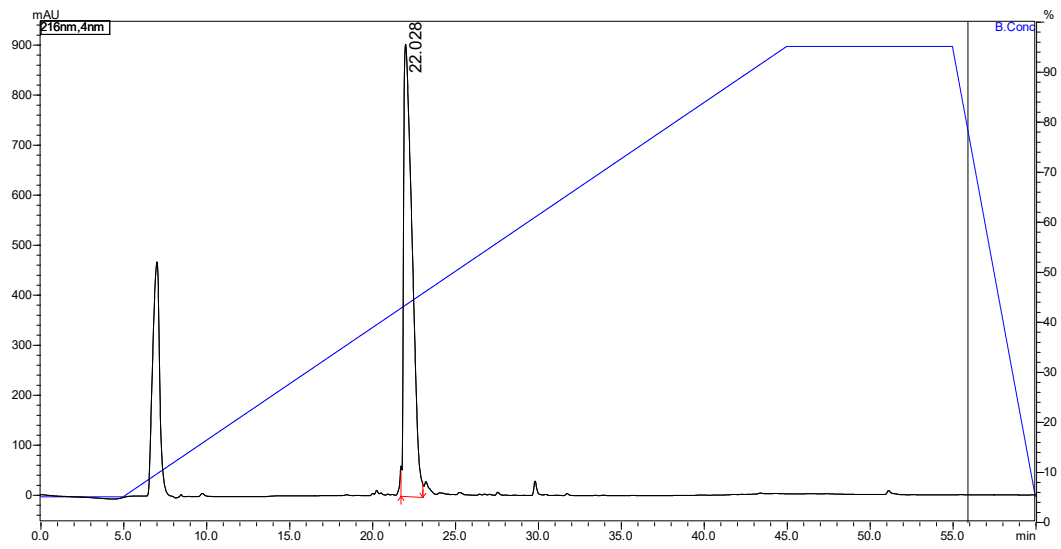


Figura D3. Cromatogramas da purificação dos peptídeos H9 e Hs10.

Anexo E

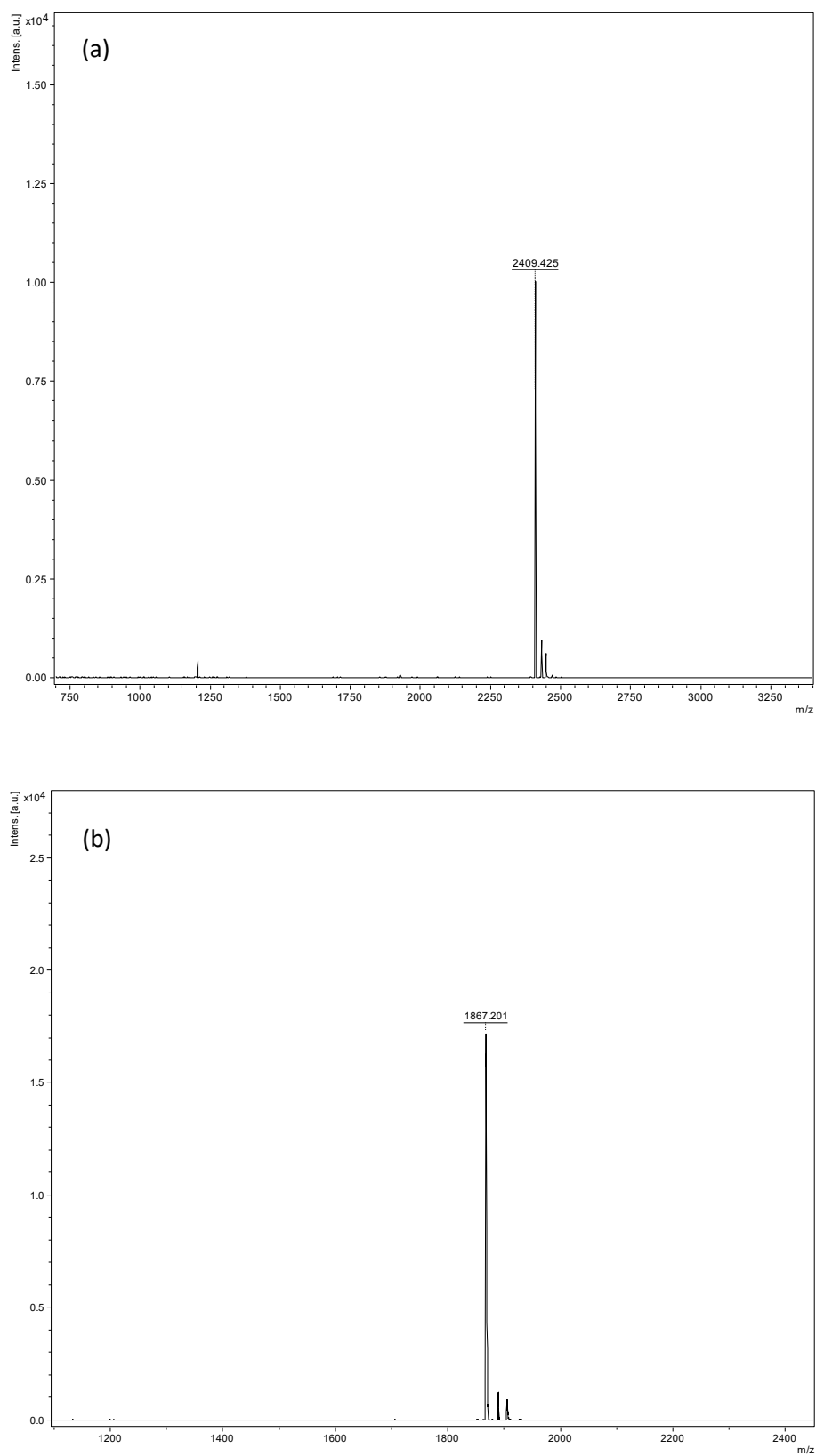


Figura E1. Espectro EM dos peptídeos após a purificação por CLAE (a) H05 ($[M+H]^+ = 2409,425$ Da) e (b) H06 ($[M+H]^+ = 1867,201$ Da).

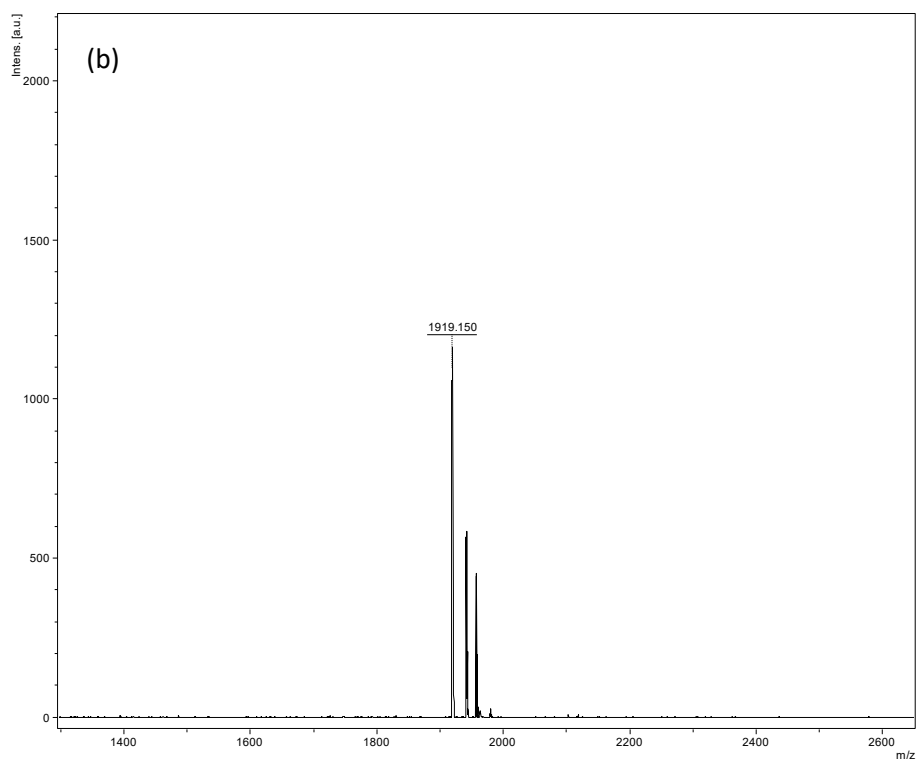
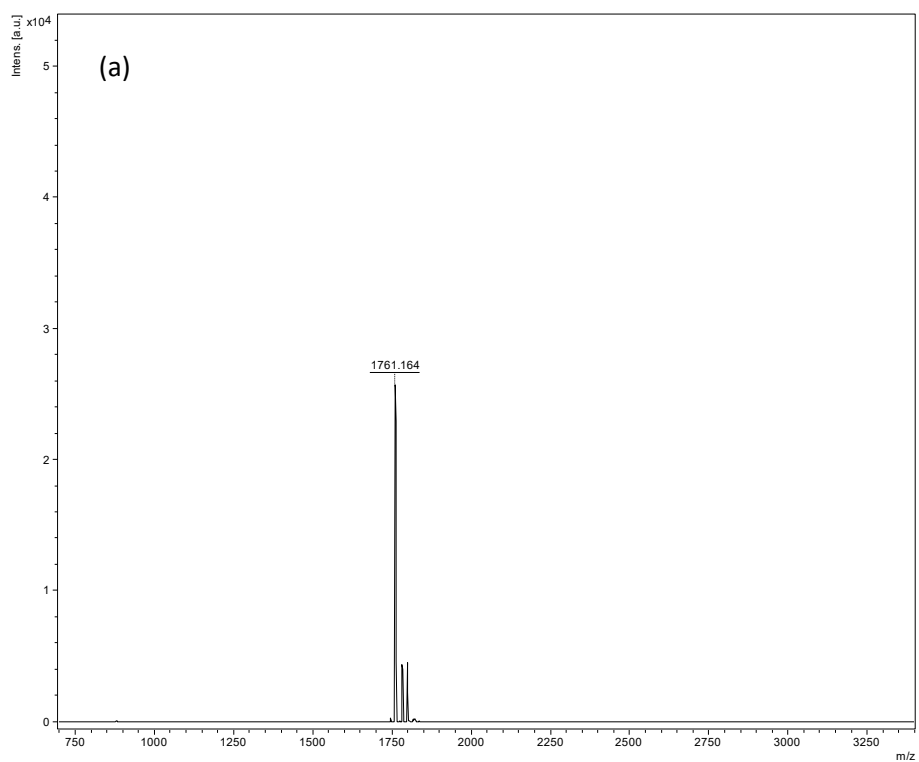


Figura E2. Espectro EM dos peptídeos após a purificação por CLAE (a) H07 ($[M+H]^+ = 1761,164$ Da) e (b) H08 ($[M+H]^+ = 191,150$ Da).

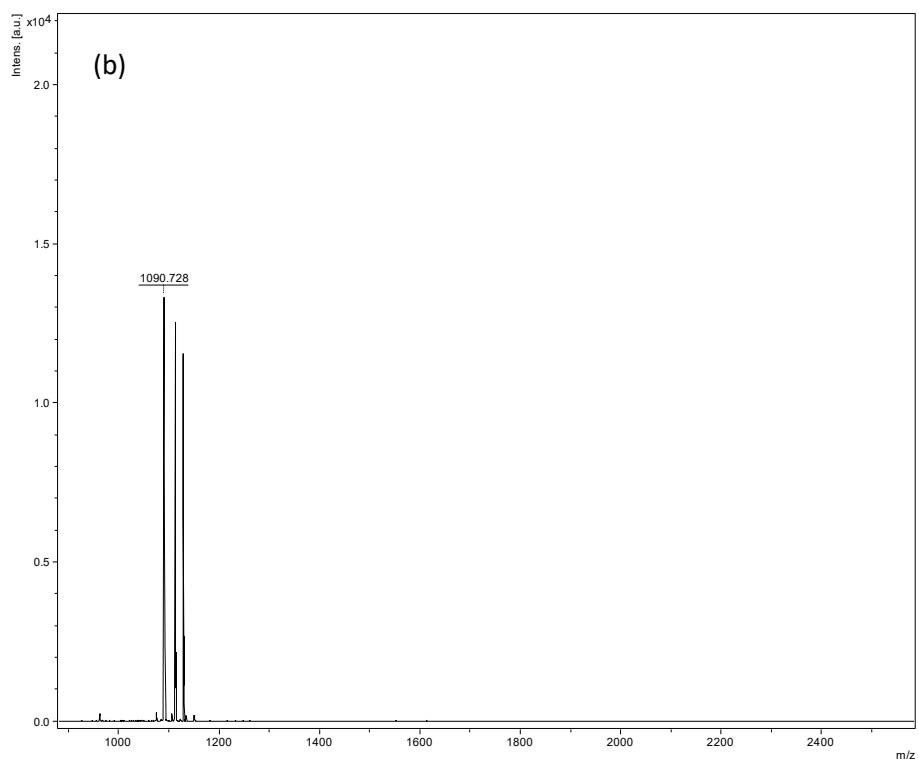
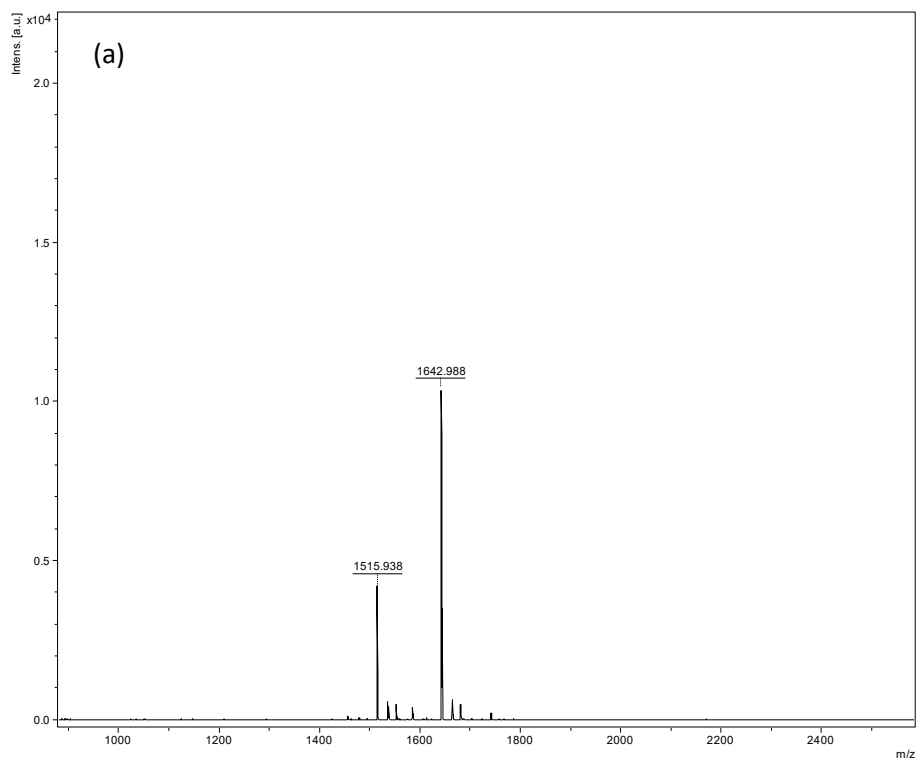


Figura E3. Espectro EM dos peptídeos após a purificação por CLAE (a) H09 ($[M+H]^+ = 1642,988\text{Da}$) e (b) Hs10 ($[M+H]^+ = 1090,728\text{ Da}$).

Anexo F

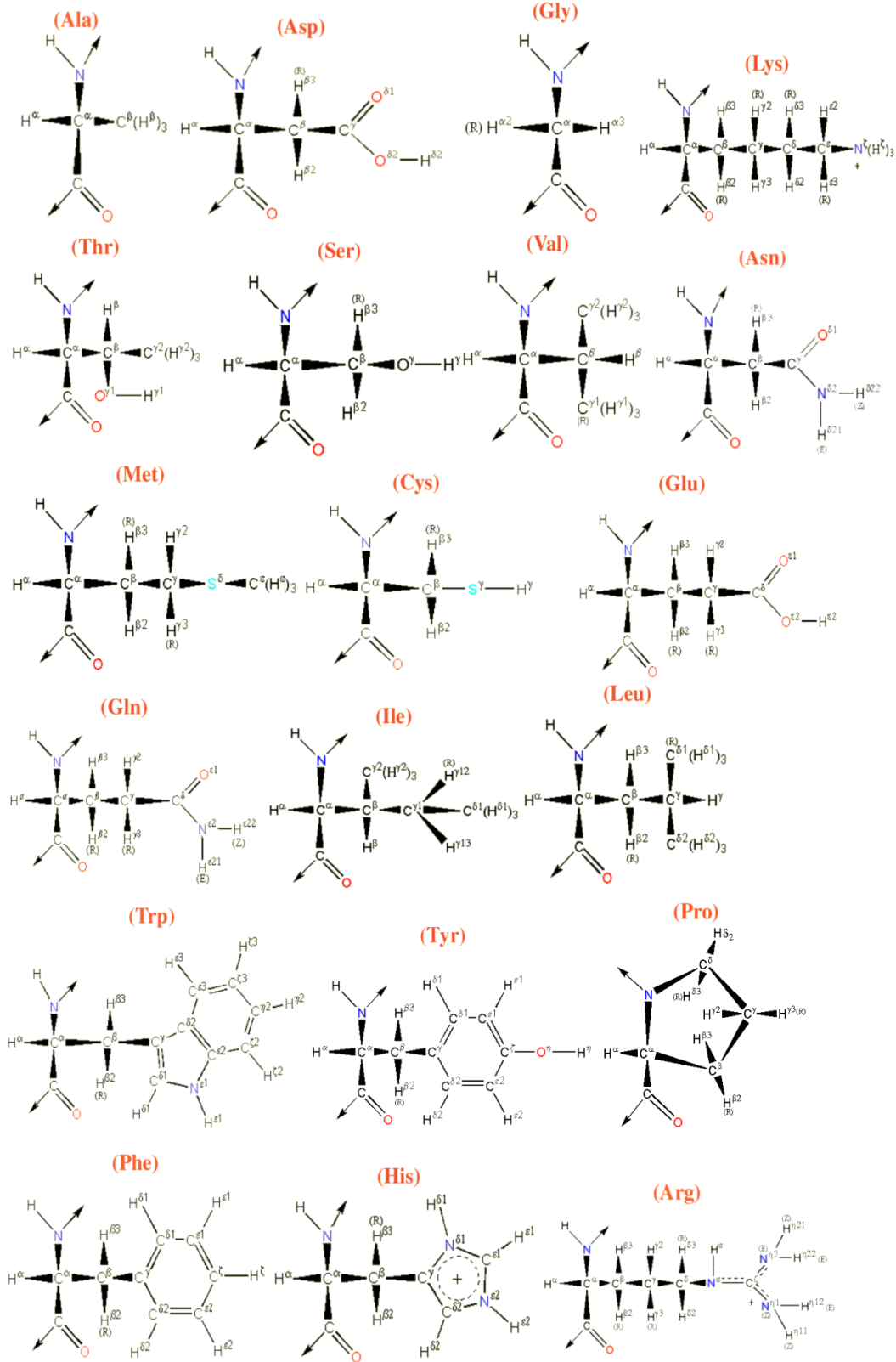
Tabela F1. Relação de aminoácidos com suas respectivas massas monoisotópicas.

Aminoácido	Símbolo de uma letra	Símbolo de três letras	Massa monoisotópica**
Ácido aspártico	D	Asp	115,03
Ácido glutâmico	E	Glu	129,04
Alanina	A	Ala	71,04
Arginina	R	Arg	156,10
Asparagina	N	Asn	114,04
Cisteína	C	Cys	103,01
Fenilalanina	F	Phe	147,07
Glicina	G	Gly	57,02
Glutamina	Q	Gln	128,06
Histidina	H	His	137,00
Isoleucina	I	Ile	113,08
Leucina	L	Leu	113,08
Lisina	K	Lys	128,09
Metionina	M	Met	131,04
Prolina	P	Pro	97,05
Serina	S	Ser	87,03
Tirosina	Y	Tyr	163,06
Treonina	T	Thr	101,05
Triptofano	W	Trp	186,08
Valina	V	Val	99,07

** Retirado de http://www.bmrwisc.edu/ref_info/statful.htm

Anexo G

Estrutura dos Aminoácidos



Retirado de http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statful.htm

Anexo H

Publicações

- (1) Brand, G. D.; Ramada, M. H. S.; Correa, R.; Ribeiro, D. J. S.; Santos, M. A.; Vasconcelos, A. G.; Murad, M.; Fh, L. C.; Abr, F. Y.; Prates, M. V. Intragenic Antimicrobial Peptides (IAPs) from Human Proteins with Potent Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activity. *PLoS One* **2019**, 14(8), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220656>.
- (2) Mariano, G. H.; Sá, L. G. G. De; Carmo, E. M.; Santos, M. A.; Fh, J. L. C.; Lira, B. O. V; Barbosa, E. A.; Araujo, A. R.; Leite, J. R. S. A.; Ramada, M. H. S.; et al. Characterization of Novel Human Intragenic Antimicrobial Peptides , Incorporation and Release Studies from Ureasil-Polyether Hybrid Matrix. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, 119, 111581.

**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE TESE DE
DOUTORADO**

Declaro que a presente tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifique e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, 10 de abril de 2022.

Assinatura da discente:



Programa: Programa de Pós-Graduação em Química

Nome completo: Michele Avila dos Santos

Título do Trabalho: Síntese e determinação da estrutura de peptídeos antimicrobianos intragênicos de proteínas humanas

Nível: () Mestrado (x) Doutorado

Orientadora: Profa. Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno