



Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)

Tese de Doutorado

**Desenho Racional e Síntese de Peptídeo
Carreador de Sequências Imunomoduladoras
Ativadas por Sinal Peptidase I (Spase I)
Bacteriana**

Samuel Ribeiro Costa

**Orientador: Dr. Guilherme Dotto Brand
Coorientador: Dr. Mauro Vicentini Correa**

**Brasília, DF
2024**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Wanderley e Silvia, por me incentivarem a ter força e fé, me fazendo buscar, a todo momento, ser uma pessoa melhor, tanto academicamente, emocionalmente e fisicamente. Tenho um enorme amor e admiração por vocês. Sinto-me sempre emocionado e encorajado pela trajetória de vida de cada um. Obrigado pelas orientações, apoio e suporte sempre que precisei mesmo quando isso implicava em renunciar os próprios afazeres e necessidades. Faltam-me palavras para expressar minha eterna gratidão e carinho por vocês.

Ao meu irmão, Anderson, onde, mesmo distante, mas sempre perto, tenho como exemplo de dedicação, superação e retidão. Todos os nossos momentos compartilhados na vida contribuíram, de uma forma ou de outra, para percorrer meu caminho até aqui. Obrigado sempre, pelo seu apoio, amizade e atenção. Saiba que eu o admiro muito.

À minha esposa, Katheryne, que sempre esteve ao meu lado em todos os meus momentos de alegria, cansaço, vitórias e desânimo. Tenho orgulho de você. Saiba que sempre estarei ao seu lado. Obrigado por me escolher para compartilhar a vida e construir nossa família. Dedico a você mais essa vitória. Todos os momentos vividos até aqui sempre pertencerão a nós dois e ficarão para o resto da vida. Seu amor, dedicação, carinho, amizade e apoio inconstitucional são verdadeiramente inestimáveis. Obrigado por ser minha bússola e minha luz em meio a essa turbulência que é a vida. Como diria Carl Sagan: “Diante da vastidão do tempo e do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta em uma época com você”.

Ao meu querido orientador, Professor Dr. Guilherme Dotto Brand, a quem considero um amigo próximo. Tive a oportunidade inenarrável de compartilhar o final da minha graduação e toda minha pós-graduação (mestrado e doutorado). Obrigado por confiar em mim e compartilhar sua experiência e aprendizado. Obrigado por toda sua paciência e dedicação para comigo. Espero algum dia retribuir tudo o que me proporcionou. Sempre me lembrarei do quanto avancei em todos os aspectos da minha vida, desde a escrita científica à visão de mundo, e em quanto desses aspectos

esteve presente. Tudo isso foi fundamental no meu crescimento pessoal, profissional, emocional e intelectual. Sempre muito ponderado, inteligente e perspicaz, obrigado pelos seus valorosos conselhos, conversas descontraídas e inestimáveis impulsos no momento certo. O senhor é minha referência.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Mauro Vicentini, sempre muito presente, disposto e interessando. Obrigado por fazer parte da minha trajetória e contribuir tão valorosamente no trabalho. Obrigado pela parceria e amizade. Vou levar sempre comigo todo o ensinamento que me proporcionou, não só em sala de aula e bancas de defesa, mas também informalmente. É uma honra para mim tê-lo perto nessa reta final.

Ao meu grupo de pesquisa LSAB, que tenho orgulho de pertencer, ter visto crescer e se consolidar ao longo desses anos. Foi uma oportunidade ter participado e ainda participar, em inúmeros projetos diferentes, compartilhar aprendizados, experiências, erros e acertos. Um obrigado excepcional aos amigos de pós-graduação e da vida Tiago, Miguel (meu querido amigo português), Éder, Luís e a tantos outros que de forma indireta ou direta me ajudaram e fizeram parte dessa caminhada.

Ao laboratório parceiro NuPMIA da Faculdade de Saúde (FS), coordenado pelo professor Dr. José Leite e aos colegas Daniel e Wanessa, sempre muito atenciosos e prestativos. Um agradecimento especial a Dra. Andreanne Vasconcelos pela atenção, disponibilidade e paciência durante toda a minha pós-graduação.

Ao João Bueno, sempre muito parceiro, tanto dentro quanto fora da Universidade de Brasília. Tenho orgulho de ser seu amigo e da trajetória que está trilhando. Saiba que vale a pena. Obrigado pela amizade, dedicação e confiança.

A Universidade Católica de Brasília (UCB) e ao Laboratório de Análises de Biomoléculas (LABM), do programa de pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Em especial ao prof. Dr. Ramada, sempre muito dedicado e atencioso. Obrigado por suas colaborações e instruções.

À Bianca, Ana Laura e Thaís, alunas de pós-graduação da UCB. Não tenho palavras para expressar minha gratidão pela paciência, atenção e dedicação. A parceria de vocês foi fundamental para o sucesso do trabalho.

Ao Adolfo, amigo de coração enorme e alma esplêndida, sempre muito leve nos conselhos e orientações. Meu amigo, obrigado pela confiança e parceria sempre.

Ao amigo Allan Mol, obrigado pela atenção e companheirismo ao longo desses anos. Sua disponibilidade e atenção foram fundamentais durante toda trajetória na pós-graduação.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial ao meu querido amigo Zé. Sempre muito prestativo atencioso. Obrigado pelas experiências e aprendizados compartilhados.

À central analítica do Instituto de Química – UnB, a quem devo meus agradecimentos pela disponibilidade de sempre, mesmo em requisitadas análises rápidas e de última hora o que possibilitou a realização e a dinâmica do trabalho.

Ao instituto de química (IQ), onde tive a oportunidade de ingressar em 2011, dando início a minha carreira como químico e professor. Foram inúmeros os momentos de aprendizado, alegrias, oportunidades e incontáveis altos e baixos. Obrigado a todos os professores que fizeram e ainda fazem parte da minha formação como profissional. Obrigado pela confiança em ministrar diversos cursos na semana universitária e contribuir, mesmo que em uma pequena parte, na formação de futuros profissionais dessa ciência tão bela, a qual sou tão empolgado, que é a Química.

Aos Professores componentes da banca:

Dr. Ângelo Machado, querido professor que sempre esteve me acompanhando de perto. Obrigado pela parceria, atenção e dedicação, e por ter testemunhado toda minha evolução desde a graduação.

Dr. Fernando Alberício, tenho o senhor como uma referência na área de peptídeos. É uma honra inestimável tê-lo em minha banca de defesa de doutorado.

Dr. Verly, obrigado por ter aceitado participar desta etapa do meu trabalho. Será uma honra ter suas valorosas contribuições.

Obrigado por aceitarem o convite. É um privilégio ser avaliado pelos senhores.

AGRADECIMENTOS	I
ÍNDICE	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V

Índice

1.	Introdução Teórica.....	1
1.1	Peptídeos Multifuncionais	1
1.2	Células procariontes	2
1.2.1	Composição química das membranas celulares bacterianas	2
1.3	<i>Escherichia coli</i>	4
1.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	6
1.5	Proteases expressas por <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> e seus fatores de patogenicidade bacteriana.....	6
1.6	Sinalização e secreção de proteínas em <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> 15	
1.7	Sinal-peptidase (Spase).....	15
1.7.1	Formas de translocação de pré-proteínas e secreção que demandam a atividade proteolítica da Spase I em bactérias.....	16
1.7.2	Peptidase I (Spase I) presentes nas células procariontes: Estrutura e propriedades.....	19
1.7.3	Especificidade do sítio proteolítico da Spase I.....	21
1.7.4	Porções de reconhecimento estrutural presentes na Spase I para o direcionamento da proteólise da pré-proteína.....	22
1.7.5	Mecanismo de proteólise da Spase I utilizando a díade catalítica Ser/Lys.....	24
1.8	Antibióticos como estratégia farmacêutica no combate a infecções bacterianas.....	26
1.7.1.	Resistência bacteriana a antibióticos	26
1.9	Drogas com ação de inibição de Spases	27
1.10	Peptídeos membrano-ativos como agentes de acúmulo preferencial em células bacterianas	29
1.10.1	Peptídeos imunomoduladores liberados por atividade proteolítica e ativação de receptores celulares	35
1.10.2	Desenho racional de um peptídeo quimera (CHIM3) com atividade dual de acúmulo em membrana bacteriana e quimiotaxia pela liberação de agonista de FPR2 pela ação da Spase I bacteriana.....	44
2.	Objetivos.....	50

2.1	Objetivos gerais.....	50
2.2	Objetivos Específicos	50
3.	Métodos	52
3.1	Síntese em fase sólida do peptídeo CHIM3, WKYM-NH ₂ e WRWWWW-NH ₂ 52	
3.1.1	Síntese em fase sólida dos peptídeo CHIM3-Y(NMe) e do peptídeo WK(Y-NMe)M-NH ₂	55
3.2	Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 56	
3.3	Caracterização dos peptídeos por Espectrometria de massa (MS)	58
3.3.1	Quantificação dos peptídeos.....	58
3.4	Determinação da concentração inibitória mínima dos peptídeos CHIM3 e CHIM3-Y(Me).....	59
3.5	Ensaio para medir a tensão de membrana induzida com Di-8-ANEPPS e interação com o peptídeo CHIM3.....	60
3.6.	Ensaio de digestão do CHIM3 e CHIM3 - Y(NMe) com bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> com diferentes concentrações.....	61
3.7.	Extração em fase sólida (SPE) das frações adquiridas no ensaio de digestão.	63
3.8.	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS/MS) da fração eluída na SPE.	63
3.9.	Investigação das enzimas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> com potencial digestão de CHIM3. 65	
3.10.	Ensaio de incubação do CHIM3 com <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> com inibidores proteicos.....	65
3.11.	Quantificação dos peptídeos WKYM-NH ₂ e WK(Y-NMe)M-NH ₂ por cromatografia líquida de alta eficiência	66
3.12.	Design molecular de agonista peptídico para receptor FPR2	68
3.13.	Ensaio de MTT para se determinar a viabilidade celular de BMDM tratados com WK(Y-NMe)M-NH ₂	68
3.14.	Ensaio para estimulação de células BMDM e dosagem da citocina TNF- α 69	
4.	Resultado e Discussão.....	70
4.1.	Síntese em fase sólida, purificação por CLAE e caracterização por Espectrometria de Massa (EM) do peptídeo CHIM3.....	70
4.2.	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (CMM) do peptídeo CHIM3.....	74
4.3.	Acúmulo de CHIM3 nas membranas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> por meio de experimentos utilizando o marcador fluorescente di-8-ANEPPS.....	76
4.4.	Ensaio de digestão do peptídeo CHIM3 após incubação com <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> . 77	

4.5.	Fragmentos de proteólise obtidos no ensaio de digestão do CHIM3 pelas bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> analisados por LC-MS	78
4.5.1.	Proteases expressas pela <i>E. coli</i> e por <i>S. aureus</i> e seus possíveis sítios de ação sobre o peptídeo CHIM3	87
4.5.2.	Quantificação relativa dos segmentos WKYM-NH ₂ , YM-NH ₂ e FIKGFISGPGANA em função da concentração do peptídeo CHIM3 e do tempo após incubação com <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	90
4.6.	Otimização do peptídeo CHIM3 a partir de modificações químicas deste e da porção agonista de FPR2 pela introdução de N-metil-aminoácidos.....	97
4.7.	Síntese dos peptídeos CHIM3 – Y(NMe), WK(Y-NMe)M-NH ₂ e WKYM-NH ₂ . 98	
4.7.1.	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (CMM) do peptídeo CHIM3 – Y(NMe).....	100
4.8.	Ensaio de digestão do peptídeo CHIM3-Y(NMe) após incubação com <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	101
4.9.	Avaliação in silico de WK(Y-NMe)M-NH ₂ como agonista do receptor FPR2 humano	105
4.10.	Ensaio de viabilidade celular e potencial de estimulação dos macrófagos com WK(Y-NMe)M-NH ₂	110
5.	CONCLUSÕES.....	115
6.	BIBLIOGRAFIA.....	119
7.	ANEXOS.....	126
	ANEXO A.....	126
	ANEXO B.....	127
	ANEXO C.....	128
	ANEXO D.....	132
	ANEXO E.....	133
	ANEXO F.....	134
	ANEXO G	135
	ANEXO H.....	136
	ANEXO I	137
	ANEXO J	138

LISTA DE ABREVIATURAS

IAP	Peptídeo Antimicrobiano Intragênico
AMP	Peptídeo Antimicrobiano
FPR2	Receptores de Peptídeos Formilados do Tipo 2
SPFS	Síntese de Peptídeo em Fase Sólida
MS	Mass Spectrometry
EM	Espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CAP	Cloranfenicol
LPS	Lipopolissacarídeo
AIP	<i>Peptídeo Auto Indutor</i>
DCM	Diclorometano
DMF	N,N – dimetilformamida
Fmoc	Fluorenilmetiloxicarbonil
DIC	N,N-diisopropilcarbodiimida
ACN	Acetonitrila
Py	Piridina
TFA	Ácido Trifluoroacético
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
PBS	Tampão Fosfato Salino
TR	Tempo de Retenção
DIPEA	N,N'-diisopropiletilamina
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 tetrametilurôniohexafluorofosfato
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de MASSA
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Spase	Sinal peptidase
PAMPs	Padrões Moleculares de Reconhecimento Padrão
FPRs	Receptores de Peptídeos Formilados
GPCRs	Receptores associados à proteína G

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
PLC	Fosfolipase C
PI3K	Fosfoinosídio 3-Quinase
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
TLR	Toll-like
QS	Quorum Sensing
SPE	Solid Phase Extraction
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
CL	Cardiolipina
LPG	Lisil-fosfatidilglicerol
PI	Fosfatidilinositol
PA	Ácido fosfatídico
OS	Fosfatidilserina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMM	Concentração Microbiana Mínima
SEC	Processo Secretor Geral
Tat	Translocação de arginina gêmea
DO	Densidade Óptica
HCCA	α -ciano-4-hidroxicinâmico
TLR	Receptores Toll-Like
EDT	Etanoditol
UNS	Células Não-estimuladas
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
FORMAZAN	E,Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan
BMDM	Bone-marrow-derived macrophage

“Ex nihilo nihil fit”

Parménides

**“Sane sicut lux seipsam et tenebras manifestat,
sic veritas norma sui et falsi est”**

Baruch Spinoza

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (AMPs), assim como outras classes de moléculas membrano-ativas, podem ser explorados para o desenho racional de fármacos devido sua afinidade diferencial por membranas microbianas. Estes peptídeos, após proteólise, podem liberar outros agentes farmacologicamente ativos. Em trabalhos anteriores do grupo, foi conceitualizado um peptídeo chamado CHIM2; uma quimera peptídica composta por Hs02, o qual é membrano-ativo; um sítio de hidrólise enzimática para enzimas do tipo tripsina; e uma porção agonista de receptores de peptídeos formilados do tipo 2 (FPR2). Com base em CHIM2 foi desenhado um novo peptídeo chamado CHIM3, sendo acrescentado a este uma sequência consenso para reconhecimento proteolítico pela enzima Spase I bacteriana. A Spase I é uma protease aderida à membrana de bactérias Gram-positivas e -negativas e que é fundamental à exportação de proteínas para o meio extracelular, com capacidade de reconhecer e hidrolisar sítios A-X-A em proteínas. O CHIM3 foi sintetizado quimicamente por síntese em fase sólida, purificado por cromatografia líquida (CLAE) e sua estrutura foi determinada por espectrometria de massa (MS). Sua atividade como agente antimicrobiano direto foi determinada pela concentração inibitória mínima, e, além disso, foram feitos ensaios de hidrólise após incubação com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* com posterior avaliação de fragmentos de CHIM3 por LC-MS. Os dados demonstram que CHIM3 apresenta atividade antimicrobiana potente contra os microrganismos testados. Após incubação com bactérias, CHIM3 sofreu uma intensa atividade proteolítica, especialmente pela bactéria *E. coli*. Observou-se proteólise no segmento desenhado para ser reconhecido pela Spase I em ambas as bactérias e verificou-se também a liberação do segmento agonista de FPR2. A síntese de uma estrutura aprimorada do CHIM3 com N-metil tirosina no segmento agonista de FPR2 foi feita (CHIM3Y-(NMe)). Esta modificação resultou em concentrações significativamente maiores da porção agonista de FPR2 advinda do peptídeo modificado. O agonista de FPR2 modificado apresentou ainda baixa toxicidade para macrófago murinos e foi capaz de induzir a liberação de TNF- α neste modelo celular, tornando o peptídeo CHIM3Y-(NMe) uma

molécula multifuncional, antimicrobiana e imunomodulatória, a ser considerada futuramente para o tratamento de infecções bacterianas.

Palavras chaves: Peptídeo Antimicrobianos (AMPs); Interação peptídeo-membrana; Spase I; Proteólise; Imunomodulador; Peptídeo metilado; FPR2; Imunomodulador.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides (AMPs), as well as other classes of membrane-active molecules, can be explored for the rational design of drugs due to their differential affinity for microbial membranes, which, after proteolysis, can release other pharmacologically active agents. In previous work, a peptide called CHIM2; a peptide chimera composed of Hs02, which is membrane-active; an enzymatic hydrolysis site for trypsin-like enzymes; and an agonist moiety of formylated peptide receptors type 2 (FPR2) were conceptualized. Based on CHIM2, a peptide called CHIM3 was designed, adding to it a consensus sequence for proteolytic recognition by the bacterial enzyme Spase I. Spase I is a protease adhered to the membrane of Gram-positive and -negative bacteria and it is essential for the export of proteins to the extracellular environment. This protease hydrolyzes A-X-A sites in exported proteins. CHIM3 was chemically synthesized by solid phase synthesis, purified by liquid chromatography (HPLC) and evaluated by mass spectrometry (MS). Its activity as a direct antimicrobial agent was determined by the minimum inhibitory concentration, and, in addition, hydrolysis assays were performed after incubation with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with further evaluation of hydrolysis products by LC-MS. The data demonstrate that CHIM3 has potent antimicrobial activity against the microorganisms tested. After incubation with bacteria, CHIM3 underwent intense proteolytic activity, especially by the bacterium *E. coli*. Proteolysis was observed in the segment designed to be recognized by Spase I in both bacteria and the release of the FPR2 agonist segment was also observed. The synthesis of an improved structure of CHIM3 with N-methyl tyrosine in the FPR2 agonist segment was performed (CHIM3Y-(NMe)). This modification resulted in significantly higher concentrations of the FPR2 agonist portion arising from the modified peptide. The modified FPR2 agonist also showed low toxicity for murine macrophages and was able to induce the release of TNF- α in this cellular model, making the CHIM3Y-(NMe) peptide a multifunctional, antimicrobial and immunomodulatory molecule, to be considered in the future for treatment of bacterial infections.

Key words: Antimicrobial Peptides (AMPs); Peptide-membrane interaction; Spase I; proteolysis; Immunomodulator.

1. Introdução Teórica

1.1 Peptídeos Multifuncionais

Os peptídeos multifuncionais compreendem uma classe de estruturas que carregam a capacidade de desenvolver algumas funções diferentes¹. Dentre esses peptídeos, pode-se destacar os peptídeos quiméricos (CHIM)². Esses peptídeos apresentam uma sequência carreadora ou membrano-ativa (1), sequência assim chamada por apresentar a capacidade de interagir e acumular seletivamente em membranas bacterianas (células procarióticas) e ainda uma sequência peptídica que pode atuar como um quimioatratante do sistema imunológico (3). Este último, liberado in situ por ação de proteases no meio da infecção, quando reconhecem e hidrolisam uma região racionalizada para sofrer tal ação (2)². Esse conjunto de sequências, racionalizada de forma estratégica, compõem um peptídeo multifuncional ou quimérico (figura 1).

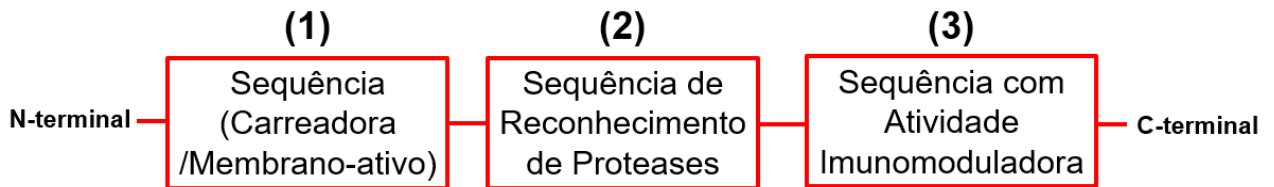


Figura 1: Estrutura de um peptídeo quimérico formada por três segmentos: (1) Sequência Membrano-ativo/carreadora; (2) Região projetada para ser reconhecida por proteases; (3) Sequência com capacidade quimioatratante do sistema imunológico.

Evidente que, para o correto entendimento de como os peptídeos quiméricos funcionam, é necessário entender como cada segmento funciona, tendo como ótica o meio biológico, partindo das características e propriedades das membranas procariontes e como se dá a capacidade de acúmulo, proteases expressas por bactérias e a resposta imunológica gerada por reconhecimento de estruturas peptídicas.

1.2 Células procariontes

Os procariotos, grupo no qual se insere o reino *Eubacteria*, são formados por células pequenas e estruturalmente simples se comparadas às células eucarióticas, que são maiores e apresentam estruturas citoplasmáticas envoltas em membrana, as organelas. As células bacterianas são envoltas em uma estrutura de parede celular, que é formada por peptídeo-glicanos, com o papel de conferir rigidez e força estrutural à célula. Juntamente com a parede celular, essas células apresentam uma membrana citoplasmática que separa o meio intracelular do ambiente extracelular que, apesar de fornecer pouca força estrutural contra a lise osmótica (extravasamento do material citoplasmático para o meio extracelular), tem um importante papel de permeabilidade seletiva, que é essencial na viabilidade celular. Caso essa membrana e/ou a parede celular seja comprometida, a integridade celular como um todo é comprometida, podendo ocorrer a lise celular, inutilizando a célula. A composição dessas membranas apresenta características específicas, o que também é um ponto de diferenciação para as células eucarióticas normais, como por exemplo a carga elétrica líquida, permeabilidade e força estrutural³.

1.2.1 Composição química das membranas celulares bacterianas

As membranas bacterianas são formadas por uma bicamada composta por fosfolipídios anfifílicos, onde as porções hidrofóbicas dessas estruturas (formadas por hidrocarbonetos) estão internalizadas e as porções hidrofílicas, contendo o grupamento fosfato, estão voltadas para o meio intracelular e extracelular (regiões interfaciais). Esses fosfolipídios anfifílicos, na maioria dos casos, são glicerofosfolipídios, constituídos por dois ácidos graxos, uma porção de glicerol e uma porção fosfato e um grupo cabeça variável, como por exemplo a fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), lisil-fosfatidilglicerol (LPG), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), e fosfatidilserina (PS), entre outros fosfolipídeos de membrana livres de fósforo como os fosfolipídeos de ornitina⁴.

Apesar de toda essa variedade, cada espécie de bactéria apresenta uma composição específica de fosfolipídios de membrana, que ainda podem variar

dependendo do meio em que se encontram. Entretanto, destaca-se o fato de a maioria delas apresentar em sua composição a fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina como fosfolipídios neutros e fosfatidilglicerol, cardiolipina e fosfatidilserina como fosfolipídios aniônicos. Um exemplo é a *Escherichia coli* (*E. coli*), uma bactéria Gram-negativa que tem sido usada como modelo de estudo para os fosfolipídeos de membrana. A *E. coli* apresenta em sua membrana três principais tipos de fosfolipídios: PE (~75%), PG (~20%) e CL (~5%), além de lipopolissacarídeos (LPS), os quais são estruturas que apresentam uma cadeia lipídica ligada covalentemente a um polissacarídeo. Outro exemplo é a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), uma bactéria Gram-positiva, que apresenta em sua membrana os fosfolipídios PG (~50%), CL (~1%) e LPG (~10%)⁵, entre outros componentes, como diacilglicerol (~20%), diglucosildiacilglicerol (~7%) e ácido lipoteitóico – LTA (~5%)⁶.

Uma vez que o fosfolipídio PE é zwitteriônico e os fosfolipídios PG e CL são aniônicos (Figura 2), as membranas bacterianas apresentam carga líquida negativa. Essa característica também difere das membranas eucarióticas, que são formadas predominantemente por fosfolipídios neutros ou isoeletrônicos, à exceção das células tumorais, que apresentam maior exposição de fosfolipídeos de carga negativa em sua monocamada externa, mais precisamente, PS^{7, 8}. Essa é uma particularidade que pode ser usada na elaboração de fármacos mais seletivos ou como um objetivo direto, explorando essa diferenciação para o tratamento de uma variedade de infecções, como as que são causadas pelas bactérias *S. aureus*, *E. coli*^{5, 9}.

Estudos como os feitos por Suman Halder¹⁰ e colaboradores mostram uma relação entre a particularidade da carga líquida negativa das membranas bacterianas, mudanças no potencial Zeta e a permeabilidade da superfície celular, utilizando como referência as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. O potencial Zeta é uma medida de magnitude de forças de repulsão ou atração eletrostática entre cargas de partículas, sendo um dos parâmetros que se pode utilizar como métrica^{6, 7}. Esse potencial Zeta pode ser usado como um marcador para se ter uma avaliação de danos à membrana, com o objetivo de prever uma alteração na viabilidade celular^{10, 11}.

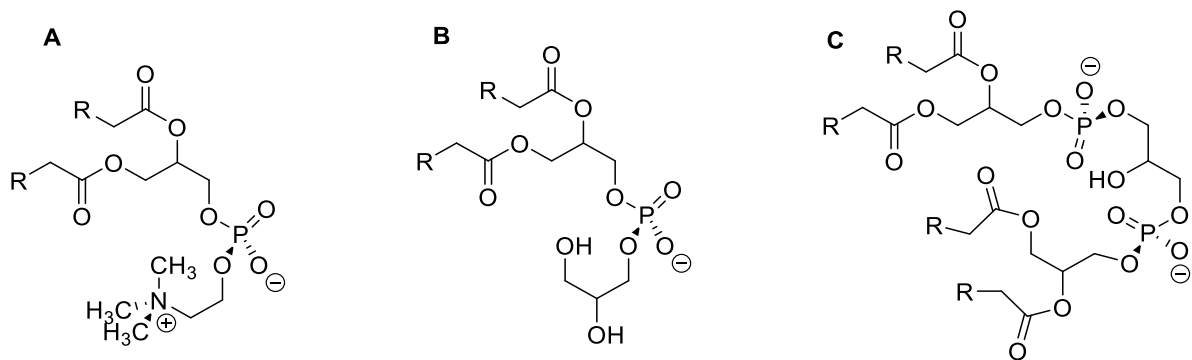


Figura 2: Estrutura dos principais fosfolipídios formadores da membrana de *E. coli* e *S. aureus* em pH neutro. **A)** fosfatidiletanolamina (isoeletrônica). **B)** fosfatidilglicerol (aniônica) **C)** Cardiolipina (aniônica). Como a fosfatidiletanolamina é zwitteriônica e os fosfolipídeos fosfatidilglicerol e a cardiolipina são aniônicos, as membranas com essa composição de fosfolipídeos apresentam carga líquida negativa⁵.

1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, ou seja, apresenta uma bicamada fosfolipídica, uma região interfacial contendo parede celular, chamada de periplasma, e, mais externamente, outra bicamada fosfolipídica, como mostrado na Figura 3¹². As bactérias desse gênero são não formadoras de esporos e podem se movimentar por flagelos peritríquios. São quase onipresentes no trato intestinal humano, mesmo representando uma pequena fração da microbiota intestinal, vivendo nesse ambiente, de maneira geral, sem comprometer a saúde humana.

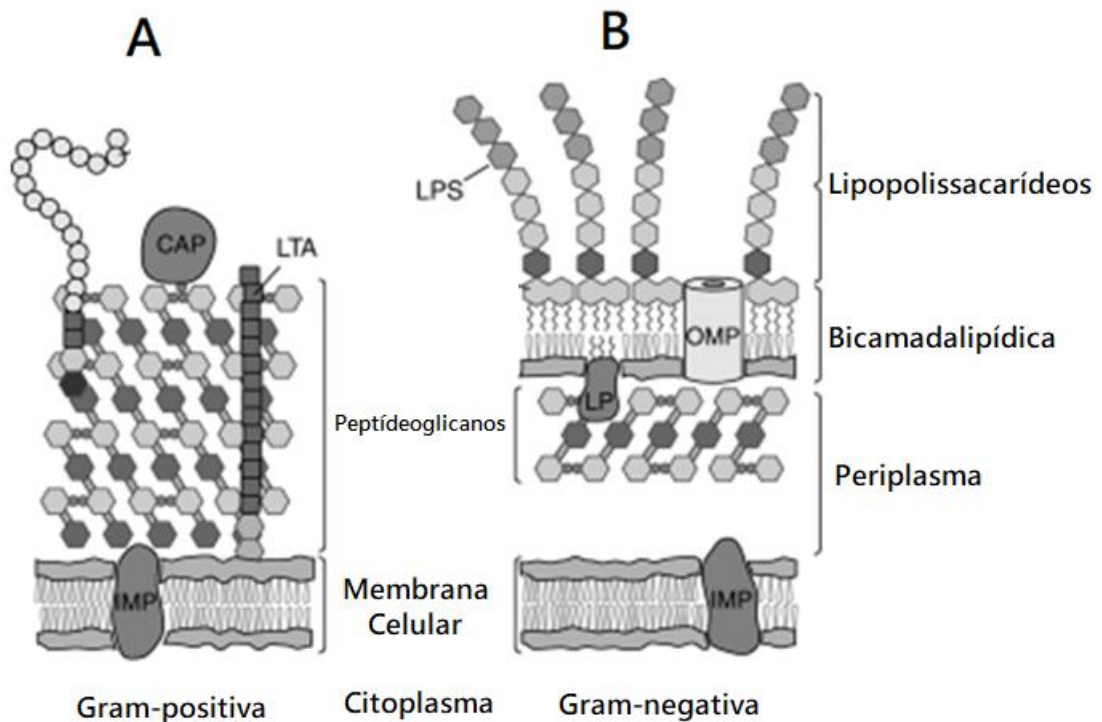


Figura 3: Representação das diferenças estruturais do envelope celular de bactérias Gram-positivas (à esquerda) e de Gram-negativas (à direita). **A)** Bicamada fosfolipídica na parte inferior seguida de uma estrutura de peptídeooglicanos (parede celular). IMP=proteína integral de membrana. CAP=proteína ligada covalentemente. LTA=ácido lipoteicoico. **B)** Bicamada fosfolipídica na parte inferior seguida de uma região de periplasma, peptídeooglicanos da parede celular e outra bicamada fosfolipídica. LP=lipoproteína. OMP=proteína de membrana externa. LPS=lipopolissacarídeos (Figura modificada da ref. 7)¹².

A *E. coli* que apresenta traços de virulência é capaz de causar uma variedade de doenças por diversos mecanismos como a sepse do trato urinário, meningite neonatal e abscessos em vários sistemas no organismo. A *E. coli* também está relacionada à enterite aguda e à colite hemorrágica, doença conhecida como diarreia de sangue¹³.

A virulência dessas bactérias, ou seja, a capacidade de se multiplicarem em um organismo e provocarem a doença, depende diretamente de alguns fatores como o sistema de sinalização entre elas^{13, 14}.

1.4 *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, ou seja, apresenta uma região de bicamada lipídica e, acima, uma espessa parede celular, como pode ser observado na Figura 3. Essas bactérias se caracterizam por cocos individuais que se dividem em mais de um plano para a formação de agrupamentos. Atualmente, existem mais de trinta espécies e oito subespécies do gênero *Staphylococcus*, entre as mais estudadas e caracterizadas estão a *S. aureus* e a *epidermidis*.

Os *Staphylococcus* são aeróbios facultativos não móveis, que crescem por respiração aeróbica ou fermentação, com uma relativa exigência nutricional. São resistentes a altas temperaturas e a ambientes com alta concentração de sal. Essas bactérias colonizam com sucesso aproximadamente 30% da população humana de maneira assintomática, porém, também são capazes de causar infecções¹⁵.

As bactérias patogênicas desse gênero são comumente identificadas pela capacidade de produzir coagulase, que é uma adesina, ou seja, um processo utilizado pela bactéria para se aderir nas células e nos tecidos do organismo, sendo esse fator determinante para a distinção entre cepas desse gênero. As bactérias dessa espécie são responsáveis por infecções simples que vão desde infecções de pele e tecidos moles, como espinhas, até infecções mais invasivas, como pneumonia e meningite. Isso significa que podem causar infecções em diferentes locais do corpo, não só no ser humano, mas em uma variedade de outros animais vertebrados, como bovinos¹⁶.

Um fator que contribui para o sucesso evolutivo desse e de outros patógenos, é uma ampla gama de fatores de virulência que manipulam a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. Muitos desses fatores estão relacionados ao suporte enzimático secretado por essas e outras espécies de bactéria.

1.5 Proteases expressas por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e seus fatores de patogenicidade bacteriana

Todos os procariotos patogênicos conhecidos até o presente são bactérias. Atualmente as bactérias são as responsáveis por cerca de metade das doenças humanas. Por exemplo, morrem, anualmente aproximadamente três milhões de pessoas por doenças ou complicações causadas por bactérias^{17,18}. Outro fator

agravante é o fato de algumas doenças bacterianas terem como origem pertinentes vetores como pulgas, carrapatos e camundongos, além de uma significativa parte da população mundial não ter acesso a saneamento ou estruturas de saúde básicas, contribuindo a agravar o número de infecções. O quadro geral se torna ainda mais preocupante pelo uso indiscriminado e/ou sem orientação médica de antibióticos, gerando cepas cada vez mais resistentes aos compostos utilizados atualmente.

A patogênese bacteriana é o processo pelo qual esses microrganismos geram doenças (o estado doentio pode ser definido como o conjunto de sintomas ou sinais específicos que afetam um ser vivo alterando seu estado normal de homeostase). Em geral, as bactérias estabelecem o quadro doentio pela produção de toxinas, que podem ser classificadas como endo ou exotoxinas. Para que isso ocorra é necessário que se tenha exposição ao microrganismo (que pode ocorrer por diferentes "portas de entradas" como: mucosas, parental ou outras vias específicas oportunistas), aderência, infecção, que é o crescimento do organismo patógeno no hospedeiro, e, por fim, a doença, que pode se apresentar como lesão, dano tecidual ou liberação de toxinas que prejudicam as funções ou homeostase do hospedeiro. A virulência, capacidade desses patógenos de causar a doença, é resultado das interações entre os patógenos e o hospedeiro, e é esse um dos fatores que diferenciam um microrganismo patogênico de um não patogênico¹⁹. É importante ainda ressaltar que, para um processo de infecção ser bem-sucedido, é necessário um número mínimo de microrganismos invasores (DI₅₀ – Dose Infectante para 50% da população, número não absoluto utilizado para comparar a virulência de microrganismos), sendo também um fator que determina a virulência bacteriana e que varia de cepa para cepa²⁰.

Muitos fatores de virulência aprimoram, direta ou indiretamente, a capacidade de invasão, permanência no hospedeiro e crescimento, determinando a infecção e a doença. Um desses fatores é a secreção de enzimas (proteases) e de outras oligoproteínas, que podem servir, dentre outros fatores, como sinalização celular e *quorum sensing*. Este último, é conhecido como um mecanismo de comunicação entre comunidades bacterianas e adaptação coletiva em relação à densidade celular e ao seu ambiente imediato²⁰.

No caso da *S. aureus* e *E. coli*, os fatores que determinam a patogenicidade e condições de virulência podem manipular as respostas imunes do hospedeiro, dificultando assim a ação do sistema imune e contribuindo para o escape e instalação da infecção²¹. Diversos desses fatores manipuladores e de escape do sistema imune

são toxinas secretadas, que muitas vezes causam severas inflamações. Esses fatores podem ser superantígenos causando a morte de células leucocitárias e cofatores para ativação de zimogênios, estes últimos pró-enzimas. Ainda outro fator podendo ser as exoenzimas, como as proteases, que clivam e inativam várias moléculas de defesa e vigilância imunológica, como receptores de superfície, essenciais para a quimiotaxia dos leucócitos e peptídeos antimicrobianos²². Essas exoenzimas ainda podem originar ruptura de barreiras endoteliais e epiteliais por lise celular e proteólise de proteínas de junção²².

As bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* secretam mais de 40 exotoxinas, enzimas que correspondem a cerca de 10% do total de secretoma. Muitas delas têm semelhanças estruturais, no entanto, apresentando propriedades especiais. Essas exotoxinas podem ser divididas em três grupos com base em suas funções conhecidas: citotoxinas, superantígenos e enzimas citotóxicas²³.

As citotoxinas, como a α -toxina - uma toxina prototípica formadora de poros (PFT) -, têm ação nas membranas das células hospedeiras, podendo resultar em lise celular quando em contato com receptores, como o C5aR1 e C5aR2, e inflamação. Já os superantígenos, como os superantígenos de células T (Sags), que representam boa parte do coquetel de exotoxinas secretado pela *S. aureus*, mediam a produção massiva de citocinas gerando uma cascata inflamatória. As enzimas citotóxicas têm ação danificando a célula dos mamíferos²³.

Além das toxinas supramencionadas, a *S. aureus* também apresenta uma significativa soma de outras enzimas, que são divididas em dois grupos: cofatores que ativam zimogênios do hospedeiro e enzimas para a degradação de componentes estruturais (exoenzimas), tendo essa última ação em diferentes substratos e mecanismos distintos. Essas exoenzimas têm o papel de degradar moléculas e obter nutrientes para sua sobrevivência e disseminação.

Entre as enzimas secretadas, estão as proteases. Essa espécie de bactéria secreta doze tipos de proteases diferentes conhecidas, divididas em três classes: metaloproteases, serino-proteases e cisteína-proteases (reunidas na tabela 1). Em conjunto, essas proteases têm o papel de obtenção de nutrientes, disseminação bacteriana e evasão do sistema imune.

As proteases reconhecem resíduos de aminoácidos ou uma sequência específica de resíduos de aminoácidos e clivam a ligação peptídica próxima. A nomenclatura da região de clivagem se dá pela posição do aminoácido. P1 é o aminoácido

imediatamente anterior à ligação peptídica clivada. O aminoácido P2, o anterior ao P1 e assim por diante. P1' é o aminoácido imediatamente posterior à ligação clivada. P2' é o aminoácido posterior ao P1' e assim por diante (Figura 4). Cada aminoácido colocado por "P/P" é reconhecido por um subsítio correspondente no sítio ativo da protease "S/S". Sendo que o aminoácido P1 é reconhecido pelo sítio enzimático S1 e S1' reconhece o aminoácido P1' e assim subsequentemente.

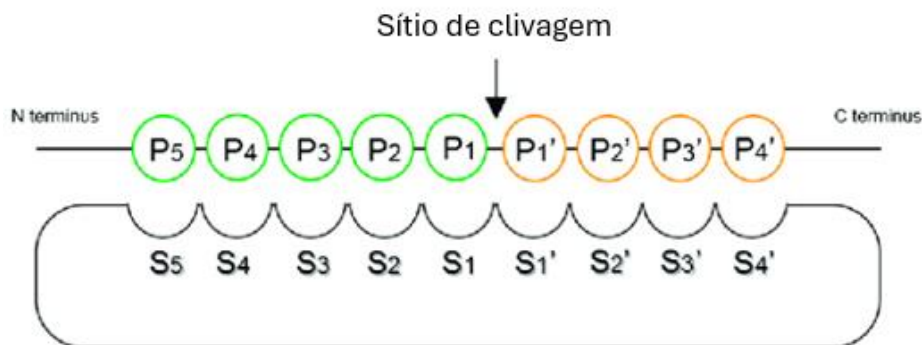


Figura 4: Representação entre uma protease e um substrato peptídico em um sítio de reconhecimento catalítico. P1/P1' representam, respectivamente, os aminoácidos imediatamente anterior e posterior ao sítio de clivagem (Cleavage site). S1/S1' representam os subsítios correspondentes de reconhecimento enzimático do substrato presente no sítio ativo²⁴.

Tabela 1: Arsenal enzimático proteolítico excretado pela *Staphylococcus aureus* dividido em metaloproteases, serino proteases e cisteíno proteases de acordo com seu método catalítico de proteólise. Essa biblioteca de enzimas pode ter funções como o de obtenção de nutrientes, sobrevivência e disseminação (Retirado do: <https://www.brenda-enzymes.org/>. Acesso em 07/04/2022)²³²⁵.

Enzima	Classe	Região de Reconhecimento
Aureolisina - EC 3.4.24.29	Metaloprotease	Especificidade de resíduo hidrofóbico P1
Glutamil endopeptidase - EC 3.4.21.19	Serino protease	Clivagem preferencial: Glu-/-, Asp-/-
SspA	Serino protease	(D ou E)-/-C-term
Staphopain A - EC 3.4.22.48	Cisteína protease	Ampla ação em proteínas, incluindo elastina.
Staphopain B - EC3.4.22.48	Cisteína protease	Ampla ação em proteínas, incluindo elastina.
PepT*	Peptidase não específica	Peptidase não específica ²³
SpIA*	Serino protease	Reconhecimento de aminoácidos hidrofóbicos e volumosos
SpIB*	Serino protease	Trp – Glu – Leu – Gln
SpIC*	Serino protease	Ainda não determinado ²³
SpID*	Serino protease	Reconhecimento de aminoácidos hidrofóbicos e volumosos
SpIE*	Serino protease	Clivagem preferencial: His-/- ^{23,26}
SpIF*	Serino protease	Ainda não determinado ²³

* EC não localizado

As metaloproteases recebem essa denominação por apresentarem em seu sítio ativo um cátion metálico, como Zn^{2+} e Co^{2+} ²³ (Figura 5 – C), essencial para estabilização de intermediários e atividade catalítica. Geralmente, no sítio ativo de metaloproteases encontra-se um cátion bivalente de zinco, coordenado com três resíduos de histidina ou dois resíduos de histidina e mais um resíduo ácido. Uma molécula de água, que é essencial no processo de proteólise, apresenta-se como mais um ligante coordenando com o zinco e fazendo ligação de hidrogênio com um resíduo de glutamato. O resíduo de glutamato desprotona a molécula de água, tornando-a mais nucleofílica para o ataque à carbonila da ligação peptídica, formando o íon alcoóxido que é estabilizado pelo zinco, ocorrendo a hidrólise da ligação.

As serino-proteases são assim chamadas pois o seu sítio catalítico possui um resíduo de serina. Essa classe de proteases pode ser dividida de acordo com a sua especificidade com seus respectivos substratos, como por exemplo a quimotripsina e a tripsina. A quimotripsina hidrolisa ligações peptídicas junto a aminoácidos hidrofóbicos como alanina, fenilalanina, triptofano e isoleucina. A tripsina hidrolisa ligações adjacentes a aminoácidos catiônicos, como a arginina e lisina.

As serino-proteases (Figura 5 – a) são caracterizadas por uma tríade catalítica de resíduos (Ser, His e Asp) que é responsável pela hidrólise da ligação peptídica. Cada resíduo apresenta um papel importante na atividade proteolítica. Nessa tríade, a histidina, com ajuda do aspartato, desprotona o grupo hidroxila da cadeia lateral do resíduo de serina, tornando-o mais nucleofílico para que ocorra o ataque nucleofílico.

As cisteino-proteases (Figura 5 – b) apresentam um mecanismo semelhante ao das serino-proteases. No entanto, a sua desprotonação ocorre em um grupamento tiol da cadeia lateral de um resíduo de cisteína, tornando assim o enxofre mais nucleofílico.

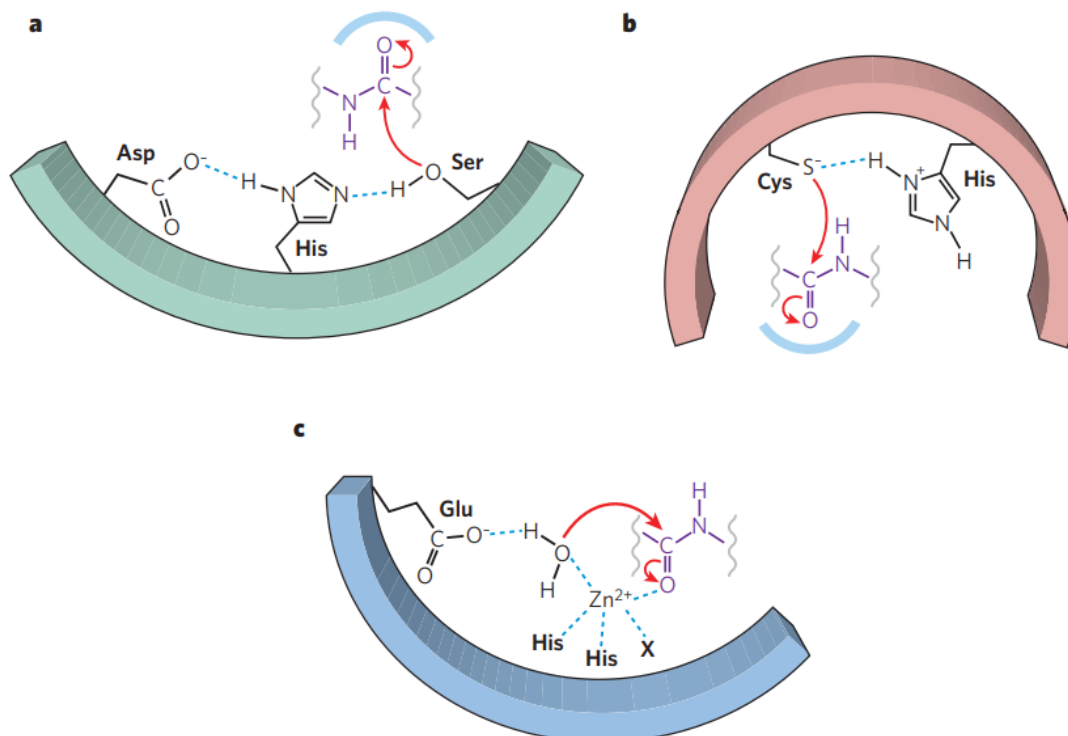


Figura 5: Representação dos resíduos de aminoácidos responsáveis pela clivagem de proteínas por serino, cisteíno e metalo-proteases. **a.** Serino proteases usam uma tríade catalítica de Asp, His e Ser localizada no sítio ativo da enzima sendo que cada resíduo apresenta um papel importante na atividade proteolítica. Os resíduos de histidina e aspartato são responsáveis pela desprotonação do grupo hidróxi, ocorrendo em seguida o ataque nucleofílico e hidrólise da ligação peptídica. **b.** Cisteíno proteases apresentam um mecanismo semelhante as serino proteases, ocorrendo a desprotonação do grupamento tiol, tornando o enxofre mais nucleofílico, ocorrendo um ataque a carbonila da ligação amidica e sua posterior hidrólise. **c.** As metaloproteases usam um metal coordenado no sítio ativo, geralmente zinco. A coordenação com o metal é feita por três resíduos de histidina ou dois resíduos de histidina e mais um resíduo ácido. Uma molécula de água, essencial na atividade catalítica, é um ligante adicional ao zinco e interage por ligação hidrogênio com o glutamato. Este último desprotona a água, ocorrendo o ataque nucleofílico a carbonila, formando o íon oxônio estabilizado pelo zinco e em seguida ocorrendo a hidrólise da ligação peptídica (Figura modificada da ref. 12)¹⁹.

Em bactérias da espécie *Escherichia coli*, a protease Spase I se mostra uma das enzimas mais comuns, no entanto uma ampla variedade de outras proteases já foram descritas, sendo algumas delas apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Proteases mais comuns produzidas e secretadas por *Escherichia coli*. Essa ampla gama de exoenzimas pode ter implicações na virulência de diferentes cepas e outras funções como a de obtenção de nutrientes, sobrevivência e disseminação (Retirado do: <https://www.brenda-enzymes.org/>. Acesso em 07/04/2022)²⁷

Enzima	Classe	Região de Reconhecimento
PepQ – EC 3.4.13.9	Prolina peptidase	Aminoácido N-terminal/-P
DegQ - EC 3.4.21.B50	Serino protease	Resíduo P1 entre um par de resíduos hidrofóbicos
4CHA - EC 3.4.21.1	Quimotripsina	Tyr-/-, Trp-/-, Phe-/-, Leu-/-

HtrA2 peptidase – EC 3.4.21.108	Serino protease	P1 (resíduos alifáticos apolares), Val, Ile e Met. Preferência para Arg (P2 e P3), com uma preferência secundária por outros resíduos hidrofílicos
Omptin - EC 3.4.21.87	Serino protease	Arg na posição P1 e uma preferência um pouco menos rigorosa por este resíduo na posição P1', que também pode conter Lys, Gly ou Val.
Peptidase DO - EC3.4.21.107	Serino protease	O resíduo P1 do sítio de clivagem está normalmente entre um par de resíduos hidrofóbicos
Caspase-8 - EC 3.4.22.61	Cisteíno-protease	Requisito estrito para Asp na posição P1 e tem uma sequência de clivagem preferencial de (Leu/Asp/Val)-Glu-Thr-Asp-/(Gly/Ser/Ala)
Papaína - EC 3.4.22.2	Cisteíno-protease	Hidrólise de proteínas com ampla especificidade para ligações peptídicas. Preferência por Aminoácido com cadeia lateral hidrofóbica e volumosa na posição P2. Não aceita Val em P1'
Alanina carboxipeptidase - EC 3.4.17.6	Metaloprotease	Liberação de uma alanina C-terminal
Leucil aminopeptidase - EC 3.4.11.1	Aminopeptidase	Liberação de um aminoácido N-terminal, preferencialmente leucina, mas não ácidos glutâmico ou aspártico.
Citosol Alanil aminopeptidase - EC 3.4.11.14	Aminopeptidase	Liberação de um aminoácido N-terminal, preferencialmente alanina, de uma ampla gama de peptídeos.
Metionina aminopeptidase - EC 3.4.11.18	Aminopeptidase	Liberação de aminoácido N-terminal, preferencialmente metionina.

Alanil aminopeptidase de membrana - EC3.4.11.2	Aminopeptidase	Liberação de aminoácido N-terminal, preferencialmente alanina podendo ser outros aminoácidos, incluindo prolina (liberação com cinética lenta)
Pep B, D e P*	Aminopeptidase	X-Prolina
Pep Q*	Aminopeptidase	Dipeptídeos
Pep T*	Aminopeptidase	Tripeptídeos
Metioninaminopeptidase*	Aminopeptidase	Metionina

* EC não localizado

O arsenal total de proteínas da *E. coli* é bastante fixo e proteínas “anormais” sofrem rápida digestão, como proteínas mutantes, que podem apresentar aminoácidos não convencionais ou proteínas mal dobradas. Em situações atípicas, como a superexpressão de proteínas específicas, pode haver um acúmulo proteico, fazendo com que as proteases entrem em ação e degradem rapidamente esse excesso de proteínas, gerando uma série de fragmentos. Em outras palavras, quando se tem um excesso de material proteico, deslocando a estequiometria, a ação das proteases produzidas pela *E. coli* tem como função regular a quantidade de um mesmo material proteico²⁷.

As condições para a seleção dos substratos pelas proteases ainda não são totalmente compreendidas. Não existe uma característica específica que faz com que uma proteína seja classificada como estável e outro alvo para a degradação pelas proteases, isso indica que uma ampla gama de proteínas poderiam ser alvo de degradação pela *E. coli*.

Toda essa ampla gama de proteases expressas e secretadas por ambas as bactérias têm um papel fundamental no escape do sistema imune, sobrevivência, disseminação e instalação da doença. Além dessas enzimas secretas, outras

proteases são importantes em outras fases do processo de virulência, como é o caso da sinalização (*quorum sensing*).

1.6 Sinalização e secreção de proteínas em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Das proteínas produzidas pelas bactérias, aproximadamente 30% delas têm como destino a membrana ou o ambiente externo²⁸. Um dos mecanismos utilizados pelas bactérias para que essas proteínas atinjam o meio extracelular é a translocação e proteólise de uma sequência sinal, que é feita por enzimas específicas aderidas à membrana e voltadas para a face extracelular. Para tal, primeiramente ocorre a síntese no citosol de pré-proteínas, que podem ou não sofrer modificações pós-traducionais¹⁹. Essas pré-proteínas são formadas por uma sequência curta (parte N-terminal), a região do peptídeo sinal, que varia de 15 a 30 resíduos de aminoácidos, e têm como destino o meio extracelular, seguida pelo restante da proteína. Quando a pré-proteína é translocada na membrana, a enzima sinal peptidase (Spase), uma protease (que será discutida de maneira aprofundada mais adiante no presente trabalho) é responsável pela ação de proteólise da pré-proteína, separando-a em dois segmentos: o da pré-proteína e o do peptídeo sinal, liberado para o meio extracelular²⁷.

Uma vez fora do citosol, esses peptídeos de sinalização podem servir como “cartões postais”, ou seja, como uma ferramenta de comunicação entre as células bacterianas. Um exemplo desses peptídeos são os AIPs, sigla em inglês para peptídeo de auto-indução. Eles são parte de um dos circuitos de *quorum sensing* tanto de bactérias Gram-positivas, por exemplo a *S. aureus*, quanto de bactérias Gram-negativas, por exemplo a *E. coli*, sendo um fator determinante para o crescimento bacteriano. Isso significa que a Spase desempenha um papel fundamental na sinalização e, por consequência, na regulação da virulência das bactérias.^{29, 30, 31, 15}

1.7 Sinal-peptidase (Spase)

As sinal-peptidases (Spases) ou Peptidases de sinal, já foram identificadas em todas as ordens de vida. Nas células eucarióticas as Spases são encontradas no retículo endoplasmático (RE), em mitocôndrias e em cloroplastos, mas apresentam um mecanismo diferente das Spases procarióticas. Em células bacterianas, as Spases são proteases ligadas à membrana plasmática e fazem parte do sistema de secreção de proteínas e sinalização celular das bactérias, sendo essenciais para a manutenção da viabilidade celular, já que o impedimento de seu correto funcionamento é danoso à célula devido ao acúmulo de material proteico na membrana²⁸.

As Spases bacterianas podem ser classificadas em tipos IV, II e I³². A Spase IV está envolvida na clivagem das pré-pilinas, que são pré-proteínas que formam as proteínas pilinas, principais constituintes de algumas estruturas ligadas à membrana de células procarióticas. A Spase II é uma enzima essencial na biossíntese de lipoproteínas, clivando peptídeos de sinalização apenas de lipoproteínas. Já a Spase do tipo I, o mais comum encontrado na maioria das células bacterianas, é uma endopeptidase importante no processo de *quorum sensing* (QS).³¹ Faz parte dos grupos das serino-proteases, chamadas assim por conta de seu mecanismo de proteólise que envolve a díade catalítica Serino-Lisina (o que difere das células eucarióticas que utilizam a tríade catalítica serina-histidina-asparagina), que será discutido mais adiante no presente trabalho³³. No entanto, para que a Spase I promova a proteólise, é necessário que as proteínas produzidas pela bactéria no citoplasma cheguem até ela por meio de translocação pela membrana³⁴.

1.7.1 Formas de translocação de pré-proteínas e secreção que demandam a atividade proteolítica da Spase I em bactérias

A Spase I tem como principal função clivar pré-proteínas, gerando, após a clivagem, uma proteína madura. Esta é então secretada pela bactéria, ou seja, o papel dessa peptidase de sinal *in vivo*, como já mencionado no presente trabalho, é o de liberar proteínas translocadas pela membrana para que atinjam seus alvos celulares ou extracelulares corretos, atuando assim como “cartões postais” para a comunicação entre as bactérias³⁵.

Tal translocação é geralmente feita por duas vias: Sec (Processo Secretor Geral) e Tat (Translocação de Arginina Gêmea). Esses mecanismos atuam em conjunto para apoiar a translocação e em seguida a proteólise das pré-proteínas. O processo de secreção de pré-proteínas dependente de Sec é uma via de translocação pós-traducional, ou seja, é feito após o peptídeo ser completamente sintetizado no ribossomo da célula. Nessa via, as pré-proteínas são ligadas ainda no citosol em Sec-A ou Sec-B (Figura 6 – A)³⁶, onde, nesse segundo caso, presente apenas em Gram-negativas, o complexo [Sec-B-Pré-proteína], formado após a ligação do Sec-B com a pré-proteína, transfere-a ao Sec-A. Em seguida, a Sec-A ligada à pré-proteína liga-se ao canal de translocação SecYEG tendo um gasto de energia na forma de ATP para translocar a pré-proteína. Uma vez translocada, para que não ocorra o processo no caminho inverso, de imediato a Spase I cliva a pré-proteína e a proteína madura é liberada no meio fora do citosol e em seguida sofre seu dobramento³⁶.

O processo de translocação via Tat (Figura 6 – B)³⁶ é uma via de translocação de proteínas já totalmente dobradas. Nesse caso, ocorre a ligação da pré-proteína enovelada ao complexo TatBC e essa ligação recruta o TatA formando então o complexo TatA translocador. A pré-proteína é translocada para o periplasma, mas com o peptídeo sinal mantendo-se ainda na membrana, onde estudos indicam que a interação com a membrana estabilizaria o peptídeo para então facilitar a proteólise. Estudos mais recentes também indicam o transporte via Twin-Arginina³⁷ via translocação Tat, que também é uma via de translocação de proteínas já enoveladas³⁵.

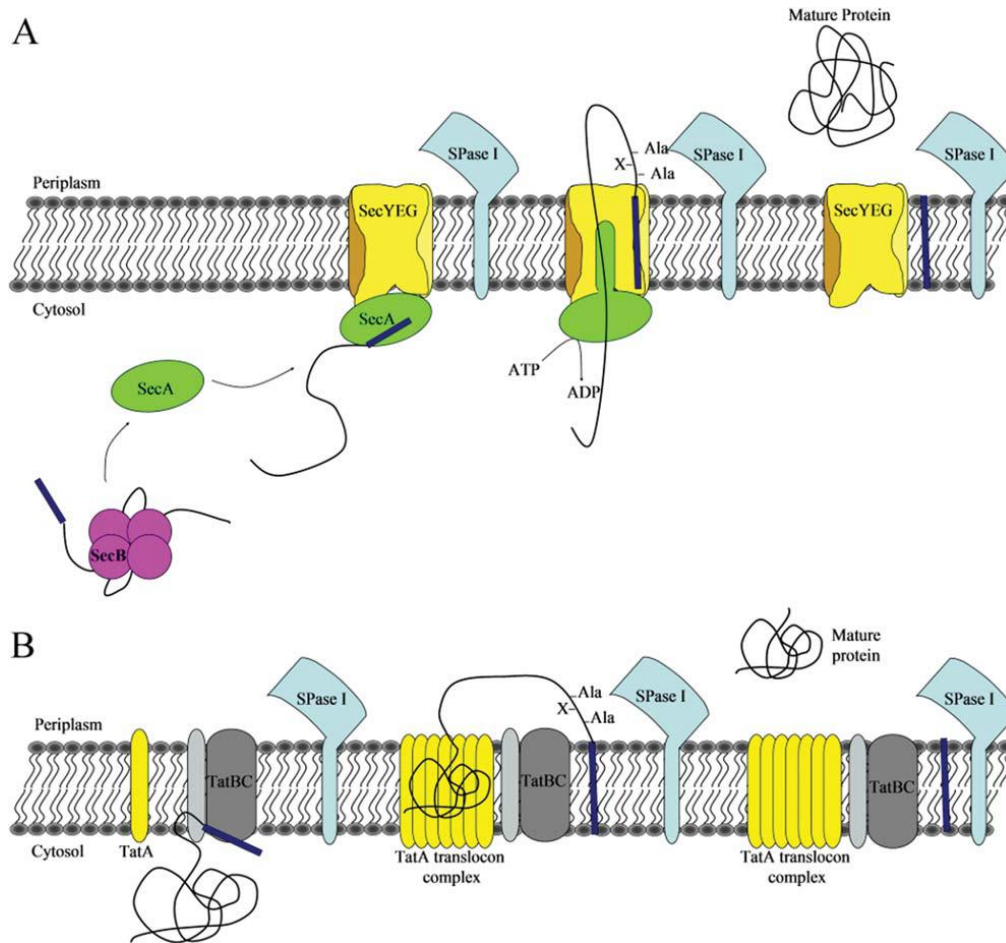


Figura 6: Esquema geral das vias de translocação de pré-proteínas e secreção que demandam a atividade proteolítica da Spase I. **A)** Via de translocação Sec. O transporte e reconhecimento da pré-proteína pode ser feito via duas maneiras: pela SecA ou SecB. O complexo SecA transporta a pré-proteína diretamente para o translocador SecYEG. A segunda alternativa é o reconhecimento e formação do complexo [SecB-pré-proteína]. O SecB transfere a pré-proteína para o SecA que então é reconhecido pelo translocador SecYEG. O Translocador transfere a pré-proteína para o meio fora do citosol com gasto de energia. Uma vez translocado a protease Spase I cliva a pré-proteína liberando para o meio extracelular e proteína madura que então se enovela. **B)** A segunda via a translocação das pré-proteínas se dá via TatA. Essa via transloca pré-proteínas já enoveladas. O reconhecimento da pré-proteína pelo TatBC recruta o segmento TatA para a translocação que então transfere a pré-proteína para o periplasma com o peptídeo sinal ainda mantendo-se preso a membrana, a Spase I reconhece o sítio de proteólise, cliva e libera no meio extracelular a proteína madura (Figura retirada da ref. 27)³⁵.

Em seguida da translocação pela membrana, ocorre o reconhecimento pela Spase I do sítio de proteólise e liberação da proteína madura no meio fora do citosol. No entanto, evidências corroboram com o fato de a Spase I clivar proteínas que chegam por qualquer via, desde que haja reconhecimento estrutural do sítio de proteólise.

1.7.2 Peptidase I (Spase I) presentes nas células procariontes: Estrutura e propriedades.

Algumas espécies de bactérias possuem apenas um tipo de Spase I, como é o caso da *E. coli*. Já outras espécies podem apresentar um número elevado, como por exemplo a *Bacillus subtilis*, que apresenta sete enzimas Spase I, sendo todas análogas. A Spase I de *E. coli* foi não só a primeira sinal-peptidase a ser estudada e purificada, como também é a mais bem estudada e caracterizada até o momento. Essa enzima em *E. coli* apresenta 324 resíduos e massa calculada de 35960 Da. Tem seu pH ótimo de catálise na faixa entre 8,5-9,0, sendo inibida por concentrações de NaCl acima de 160 mM e concentrações de MgCl₂ acima de 1mM³⁶.

A Spase I é uma proteína embebida em membrana (Figura 7)³⁶ onde a maior parte de sua estrutura está do lado de fora do citoplasma. Ela apresenta as porções N-terminal e C-terminal voltadas para o periplasma. Possui uma região amino-terminal de três resíduos na região do periplasma seguido por uma região transmembrana de vinte e quatro aminoácidos, uma alça no citosol de vinte e nove aminoácidos e outro segmento transmembrana de dezessete resíduos. Estudos consideram que os segmentos transmembrana são necessários para ancorar e estabilizar a enzima, para que assim ela possa posicionar o sítio catalítico da maneira correta para desempenhar a função de proteólise³⁶.

A região voltada para o periplasma de Spase I é dividida em duas folhas beta antiparalelas. O estudo da sua estrutura cristalina mostra que a Spase I de *E. coli* é formada principalmente por dois domínios antiparalelos que estão no periplasma (domínios I e II) e um domínio estendido. O domínio I, que guarda o sítio catalítico da enzima, apresenta resíduos de aminoácidos conservados tanto em bactérias Gram-positivas quanto em bactérias Gram-negativas, onde estão os resíduos fundamentais

da díade catalítica (Ser90 e Lys145). Esse domínio conservado ainda inclui uma região hidrofóbica que reconhece o local de ligação com o substrato.

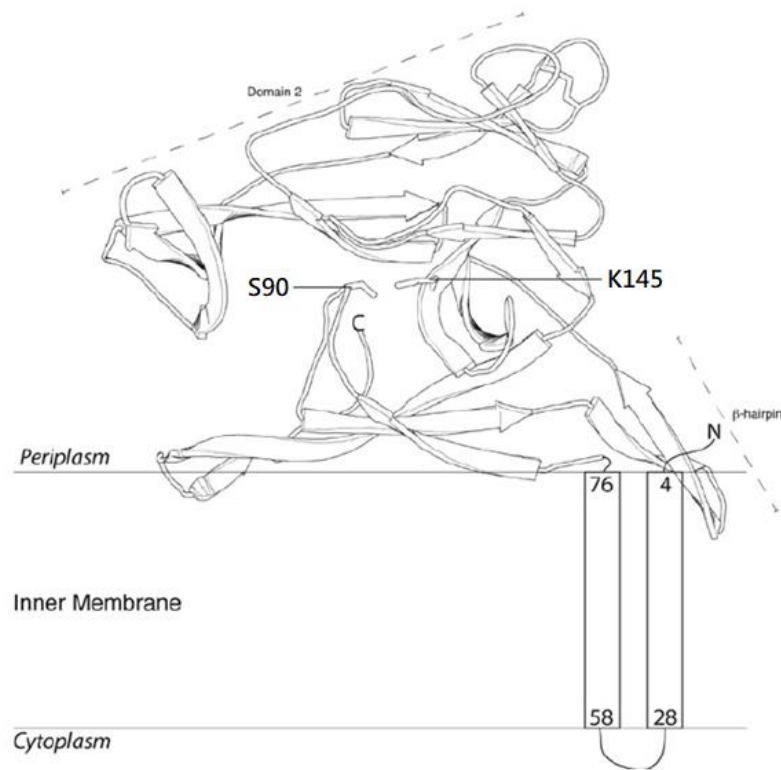


Figura 7: Esquema da estrutura da Spase I de *E. coli*. A Spase I é uma protease “ancorada” na membrana interna (na figura como Inner membrane) apresentando uma pequena “volta” na região do citoplasma (na figura como Cytoplasm). Na parte voltada para o periplasma (na figura como Periplasm), encontram-se dois domínios. O domínio I, significativamente conservados em diversas bactérias diferentes, onde encontram-se as regiões que reconhecem e se ligam ao substrato bem como, na parte inferior, o a díade catalítica da enzima, representado na figura por Ser90 e K145. O domínio II, pouco conservado entre as espécies bacterianas, possivelmente possui um papel mais estrutural, fornecendo estabilidade para que a enzima possa desenvolver corretamente sua atividade catalítica (Figura retirada da ref. 28)³⁶.

O domínio II não apresenta significativa conservação nos resíduos de aminoácidos, podendo variar de tamanho dependendo do microrganismo. Por exemplo, bactérias Gram-negativas tendem a ter esse domínio maior que as Gram-positivas. A função específica do domínio II ainda necessita de maiores estudos, no

entanto evidências indicam que não está diretamente envolvido no processo de catálise, mas sim em uma função de estabilidade. Ainda nesse domínio, existe uma ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína 170 e 176, mas estudos posteriores demonstraram que é uma estrutura não essencial à atividade da enzima. No entanto, esses domínios são estruturados de tal maneira a contribuir com que as porções estruturais de reconhecimento da Spase I se liguem corretamente ao substrato, determinando a especificidade da protease³⁴.

1.7.3 Especificidade do sítio proteolítico da Spase I

Praticamente todos os resíduos próximos ao sítio catalítico da Spase I que estão no domínio I são conservados. Nele existem dois resíduos ionizáveis de Ser90 e Lys145, sendo esses os responsáveis pela atividade catalítica da enzima. Isso significa que existe um mecanismo de díade catalítica Ser/Lys que catalisa a proteólise em uma região específica da pré-proteína, mecanismo que será discutido mais adiante no presente trabalho³⁶.

A análise estatística da sequência de resíduos de aminoácidos reconhecidos pelo sítio catalítico da Spase I levou à formulação da regra do -1, -3. A posição -1 é o resíduo de aminoácido imediatamente antes do local de proteólise, tipicamente constituído por pequenos resíduos neutros como alanina, glicina, cisteína e serina. No entanto, é notada a prevalência do resíduo de alanina nas posições -1 e -3, o que originou a regra Ala-X-Ala. Estudos realizados como sequências análogas modificando o resíduo na posição -1 para valina, asparagina e ácido glutâmico mostraram que a proteólise não ocorreu mais no local esperado e sim em outras regiões, o que indica uma preferência pela sequência A-X-A³⁵.

Estudos também demonstraram que o comprimento da região C-terminal afeta na eficiência da clivagem, onde porções com mais de nove resíduos a partir da posição -1 diminuem a eficiência de clivagem e nenhuma clivagem ocorre quando a porção é maior ou igual a treze aminoácidos. Isso provavelmente ocorre devido a um impedimento espacial que bloqueia o acesso da Spase I ao reconhecimento do sítio de clivagem e sua proteólise. Outra característica interessante é a conservação do resíduo da posição -6, apresentando geralmente um resíduo de glicina ou prolina. Esses pequenos resíduos podem gerar uma região desestruturada com uma maior

liberdade conformacional, causando um menor impedimento estérico e facilitando o acesso da Spase I ao sítio de reconhecimento e proteólise³⁵.

A estrutura de pré-proteína que é translocada pela membrana na qual a Spase I atua apresenta uma significativa conservação na sequência de seus aminoácidos, podendo ser dividida em três regiões com características semelhantes (Figura 8). A porção N-terminal, variando de um a cinco resíduos catiônicos. A região H que varia de sete a quinze resíduos hidrofóbicos; a região de proteólise A-X-A; e, por fim, a sequência peptídica que será secretada para o meio fora do citosol, que é a porção C-terminal (Figura 8)³⁶.

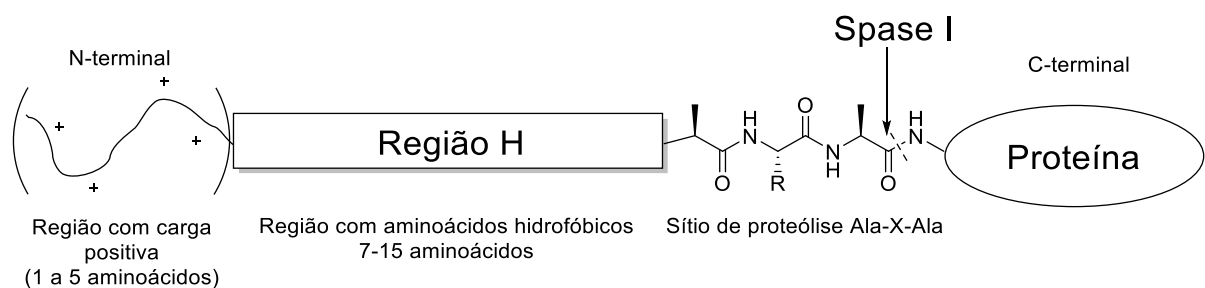


Figura 8: Esquema representativo das porções da pré-proteína. A porção N-terminal é uma porção desestruturada formada por aminoácidos básicos catiônicos. A região H formada de sete a quinze aminoácidos com caráter hidrofóbico. Adiante a porção de reconhecimento da Spase I e o sítio de proteólise seguido da porção C-terminal que é a proteína madura que será liberada para o meio fora do citosol após a proteólise (Figura de própria autoria).

A preferência da Spase I por esses segmentos da pré-proteína, determinando sua especificidade, pode ser explicada observando as estruturas ou porções de reconhecimento da própria enzima que guiam por interações de Van der Waals o esqueleto da pré-proteína ao sítio catalítico.

1.7.4 Porções de reconhecimento estrutural presentes na Spase I para o direcionamento da proteólise da pré-proteína.

As porções ou segmentos do substrato da Spase I determinam a especificidade da enzima. Duas grandes partes de ligação da Spase I com o substrato foram identificadas e são determinadas por S1 e S3. As “porções de especificidade” (S1 e S3) que levam ao sítio ativo a região de proteólise explicam a preferência por alanina (aminoácido hidrofóbico) nas posições -1 e -3 nas pré-proteínas, já que são porções hidrofóbicas, sendo a porção S1 formada por resíduos de metionina (Met92), isoleucina (Ile87 e 145) e leucina (Leu96) e a porção S3 formada por resíduos de fenilalanina (Phe85), isoleucina (Ile87, 102 e 145), valina (Val133) e asparagina (Asp143). Estudos demonstraram a importância desses aminoácidos para a fidelidade do local de proteólise^{35, 34}.

Recentemente, utilizando a técnica de modelagem computacional, onze porções da Spase I envolvidas no reconhecimento e proteólise da pré-proteína foram identificadas. Essas porções são denominadas: S7, S6, S5, S4, S3, S2, S1, S1', S2', S3', S4', S5' E S6'. Estudos sugerem que, respectivamente, os resíduos de -7 a +6 estão ligados nesses respectivos “bolsões” da enzima. Ademais, desses “bolsões” (S3, S2, S1, S1', S3' e S4') desempenham um papel mais incisivo na alta especificidade pelo peptídeo sinal (Figura 9)^{38, 35}.

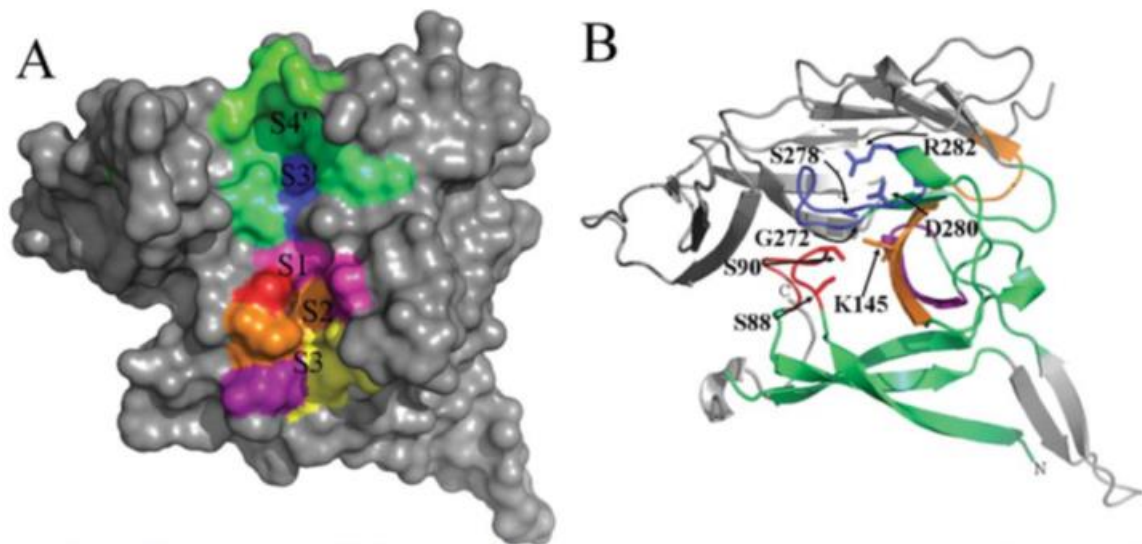


Figura 9: Estrutura cristalina da Spase I de *E. coli*. **A)** Estrutura de superfície com os “bolsões” do reconhecimento e interação com a pré-proteína destacados em cores diferentes. Os “bolsões” S1 e S3 são as partes que mais contribuem para a

especificidade do sítio de proteólise. Essas partes se ligam, respectivamente, aos resíduos de Alanina das posições -1 e -3. Sendo que no segmento -3 está o sítio catalítico da enzima e as posições da Ser90 e Lys145; **B)** Representação dos dois domínios da Spase I. Região colorida representa o domínio I, região que apresenta resíduos conservados e se encontra a díade catalítica da enzima, representado por Ser90 e Lys 145. O domínio II, representado em cinza, é a região sem conservação dos resíduos, variando inclusive de tamanho dependendo das espécies de bactérias, tendo um provável papel estrutural na Spase I (Figura modificada da ref. 22)³⁵.

Nota-se, pela estrutura representada na figura 8, que o resíduo -1 do substrato se liga na região marcada como S1, onde estão, dentre outros resíduos, os aminoácidos de Ser88 (um resíduo conservado na região do sítio catalítico que está envolvido na formação do íon alcóxido e na estabilização do tetraedro intermediário, cujo mecanismo detalhado será tratado a *posteriori*) e o resíduo de Ser90, que faz parte da díade catalítica da enzima. A região S2 tem uma cavidade mais pronunciada, a qual pode acomodar resíduos com cadeias laterais mais volumosas na posição -2, onde estudos de modelagem molecular indicam que essa parte fica totalmente inserida nesse “bolsão” da enzima. A região S3 está envolvida na especificidade do substrato por resíduos mais hidrofóbicos, explicando a preferência da alanina na posição -3. Toda essa estrutura propicia um correto reconhecimento do segmento de proteólise e a correta conformação do sítio catalítico, contribuindo para a eficiência na proteólise da ligação peptídica³⁹.

1.7.5 Mecanismo de proteólise da Spase I utilizando a díade catalítica Ser/Lys

Uma vez que o substrato é reconhecido pelos segmentos da enzima e direciona as partes corretas ao sítio catalítico, ele se acomoda de tal forma que os resíduos -1 e -3 se posicionam nos “bolsões” S1 e S3 respectivamente³³.

A proteólise começa com a Lys145 (Figura 10), que apresenta como característica a importante tarefa de transferir prótons ao sítio catalítico, que está em uma posição mais “aprofundada”, atuando em um ambiente formado predominantemente por resíduos hidrofóbicos como uma base/ácido na posição

correta em relação à Ser90. Ela atua primeiramente como uma base, desprotonando a Ser90, tornando o oxigênio mais nucleofílico que então ataca o carbono da carbonila (eletrófilo) do resíduo da posição +1 pela face si para a formação do intermediário tetraédrico, que é estabilizado pelos resíduos de Ser-88 e Ser-90³⁶. A Lys145 então doa um próton para o grupo amina do resíduo +1 permitindo assim sua liberação da enzima e restando um intermediário acil-enzima de peptídeo sinal. A Lys145 desprotona uma molécula de água tornando seu oxigênio mais nucleofílico e ataca o carbono da carbonila formado no intermediário tetraédrico, este ainda estabilizado por ligação de hidrogênio pelos resíduos de Ser88 e Ser90. Por fim, a Lys145 doa um próton para o oxigênio da Ser90 liberando da enzima a outra parte da pré-proteína³⁴.

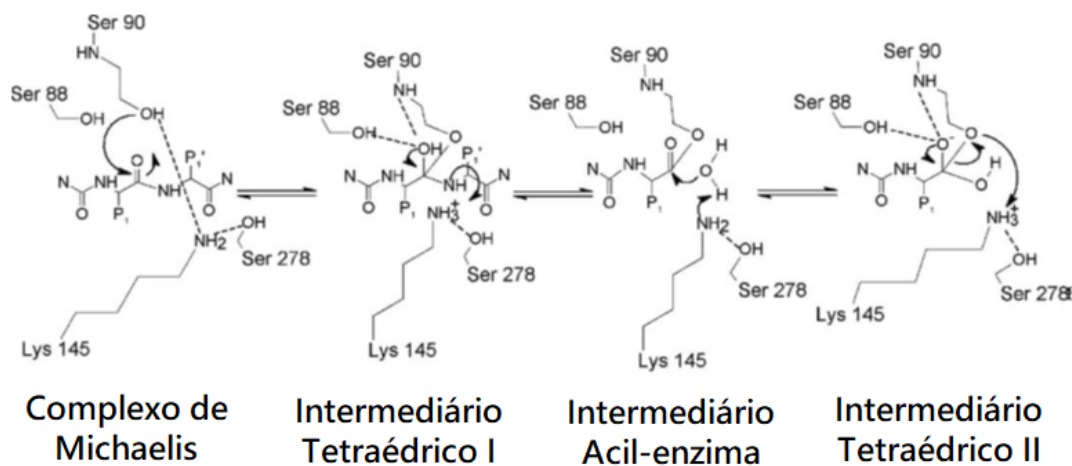


Figura 10: Mecanismo proposto para a clivagem de pré-proteínas pela Spase I usando a díade catalítica Ser-Lys³⁵. O processo de proteólise começa primeiramente pelo ataque nucleofílico do grupo hidroxila da cadeia lateral da Ser90, estabilização do estado de transição pela Ser89, transferência de próton do grupo amina protonado da cadeia lateral da Lys145 para o nitrogênio secundário da ligação amídica e finalmente a reforma da carbonila e rompimento da ligação C-N (Figura retirada da ref. 27)³⁵.

Estudos demonstraram que essa protease de membrana se mostrou fundamental para o crescimento, virulência bacteriana e instalação da infecção. Como visto, a Spase desempenha um papel fundamental na sinalização bacteriana contribuindo significativamente no desenvolvimento da doença. Devido a sua

importância, o uso de drogas que consigam inibir essa enzima, diminuindo ou até mesmo impedindo a entrega e processamento dessas pré-proteínas, torna-se uma alternativa no tratamento de infecções provocadas por cepas de amplo espectro³⁶

1.8 Antibióticos como estratégia farmacêutica no combate a infecções bacterianas

Um medicamento farmacêutico é um composto químico que, quando administrado, se distribui no organismo de forma sistêmica interagindo com diferentes estruturas desencadeando uma resposta fisiológica, como: cura, diagnóstico de doenças, prevenção, tratamento, entre outras⁴⁰. No entanto, justamente por esses medicamentos se distribuírem de forma generalizada no organismo, favorecem a interação do composto com variados receptores, o que pode promover a citotoxicidade e efeitos colaterais decorrentes do uso do fármaco, que podem ser agudos ou crônicos, acarretando assim um prejuízo à homeostase do organismo⁴¹.

Inserido na classe de fármacos, os antibióticos são compostos que podem matar ou controlar o crescimento das bactérias *in vivo* (bactericida ou bacteriostático). Os antibióticos usados no combate a infecções bacterianas têm como princípio as diferenças entre as células eucarióticas e procarióticas⁴⁰. Atualmente, existem antibióticos de amplo espectro e de espectro reduzido⁴². Geralmente, têm sua ação em um alvo específico, como a tradução de proteínas, síntese da parede celular, transcrição ou replicação do DNA e mais atualmente ações na membrana plasmática³⁸.

1.7.1. Resistência bacteriana a antibióticos

A resistência bacteriana é observada quando há uma diminuição da eficiência da ação de um antibiótico para o tratamento de uma infecção, levando a sua propagação, agravamento, ou mesmo à morte do indivíduo⁴¹. É uma ameaça global imediata e presente, sendo que anualmente tem se observado o surgimento de novas cepas bacterianas mais resistentes, além de que, múltiplos antibióticos estão perdendo a eficácia, possibilitando o surgimento de surtos de doenças não tratáveis⁴³. Essa resistência bacteriana pode ser alcançada por uma variedade de rotas bioquímicas, como pela inativação do agente antimicrobiano por modificações

estruturais acarretado por enzimas bacterianas, redução da permeabilidade, efluxo (bombeamento para fora da célula), mutação gênica, entre outros mecanismos⁴¹.

Embora muitos medicamentos antibióticos tenham ganhado grande destaque e tenham salvado incontáveis vidas, tanto de civis quanto de militares em campos de batalha (a exemplo da penicilina), o desenvolvimento de novos antibióticos não acompanhou a taxa na qual as bactérias desenvolvem resistência a esses medicamentos^{44, 45}. Isso tem demandado um esforço crescente de vários grupos de pesquisadores ao redor do mundo para descobrir novos compostos que apresentem ações alternativas. Uma dessas possíveis alternativas pode estar no processo de excreção de proteínas bacterianas, que tem como função básica a translocação de proteínas pela membrana citoplasmática e sua exportação para o meio fora do citosol⁴⁶

1.9 Drogas com ação de inibição de Spases

Como exposto, a Sinal peptidase I (Spase I) é uma importante proteína envolvida no processo de exportação de outras proteínas em bactérias, sendo a responsável pela proteólise de pré-proteínas secretadas pela membrana plasmática após a translocação. Como essa enzima, em células procariontes, apresenta um mecanismo catalítico diferente da maioria das serino-proteases, é possível inibir seletivamente a enzima bacteriana sem prejudicar células eucarióticas⁴⁷.

Além do mais, outros aspectos ainda contribuem com o fato da Spase I ser um bom alvo para o tratamento de infecções bacterianas. Dentre eles está o fato dessa enzima estar presente tanto em bactérias do tipo Gram-positiva quanto Gram-negativa e que, mesmo que a enzima esteja presa à membrana, a parte da enzima responsável pela proteólise está exposta no meio extracelular, fazendo com que ela seja um alvo relativamente acessível para inibidores (Figura 11)³⁸. A inibição da Spase I pode ser um alvo importante no tratamento de infecções bacterianas, dificultando ou mesmo impedindo a correta proteólise e exportação de proteínas. Essa estratégia pode ser usada quando tratamentos com outros antibióticos que tem ação em outros alvos, como a síntese da parede celular, já não apresentam o resultado esperado⁴⁸,

⁴⁹.

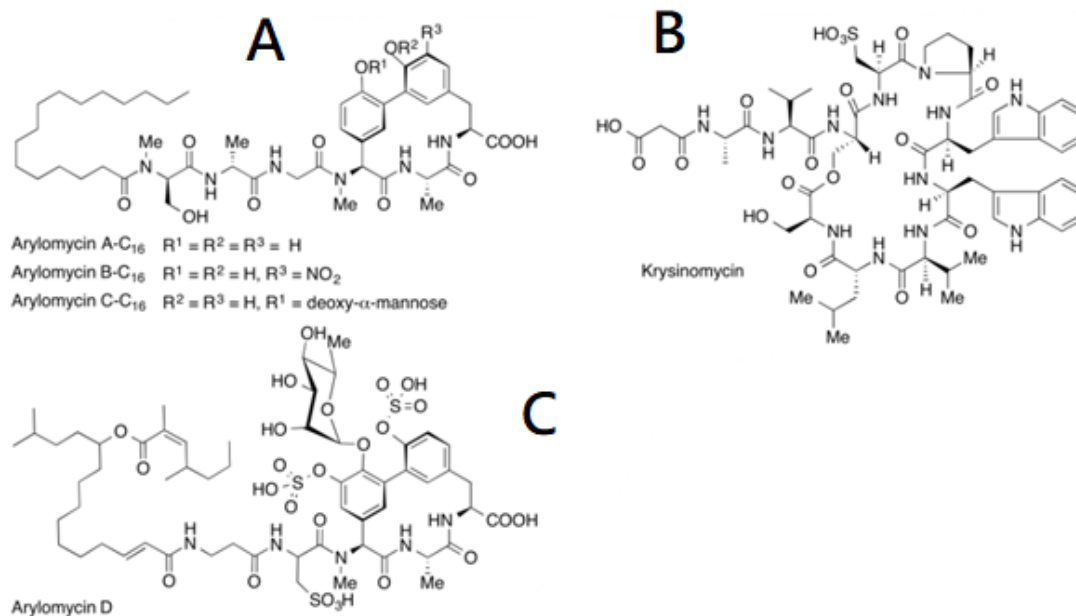


Figura 11: Variantes de compostos inibidores da Spase I de origem natural. **A)** Variantes da arilomicina C₁₆ já identificados. **B)** Crisinomicina a qual só a um representante desse inibidor. **C)** Arilomicina do tipo D (Figura retirada da ref. 38)³⁸.

Atualmente existem cinco grupos diferentes de inibidores de Spases no mercado, sendo dois deles de origem natural, como as variantes da Arilomicina e a Crisinomicina, e outros três sintéticos, como o Penems 5S e os mimetizadores de substrato peptídico. Esses inibidores têm como objetivo interromper o fluxo natural de secreção de proteínas, fazendo com que ocorra um acúmulo de material proteico na membrana, o que pode ser lesivo para a célula (Figura 12)^{38, 34}. Os estudos realizados em prol das descobertas de inibidores cada vez mais eficazes ajudaram a elucidar e aumentar o conhecimento acerca do funcionamento dessa enzima, o que possibilita o avanço na busca por melhores opções cujo alvo seja a Spase I. Dentre esses passos, foi possível demonstrar como a Spase I atua em proteínas que são secretadas, mas que o processo é essencial para diferentes aspectos na fisiologia bacteriana incluindo a manutenção da parede celular e a resposta a diferentes situações de estresse³⁸.

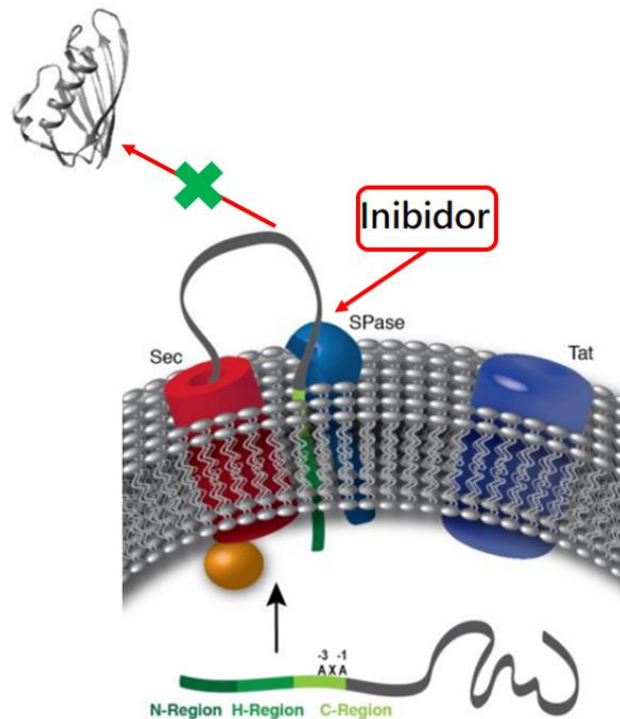


Figura 12: Esquema geral de funcionamento da Spase e sua inibição. As pré-proteínas secretadas por via Sec (Processo secretor geral) ou via Tat (Translocação de arginina gêmea) são reconhecidas pela Spase na região AXA e clivadas liberando para o meio proteínas maduras. Quando as Spases são inibidas de desempenharem corretamente sua atividade a secreção de proteínas para o meio deixa de acontecer, ocorrendo um acúmulo de material proteico na membrana afetando de maneira significativa o funcionamento da célula procariótica (Figura modificada da ref. 38)³⁸.

No entanto, a existência de diversos mecanismos de resistência a Arilomicina e seus análogos, bem como outros compostos sintéticos que mimetizam proteínas, têm levado à formulação de outros compostos para que se possa superar essa resistência à inibição da Spase adquirida com o tempo. Essa “corrida armamentista” tem levado ao desenvolvimento de outras formas mais eficazes de utilizar a Sinal peptidase I como alvo, ainda com controle da viabilidade e da virulência bacteriana⁴⁹.

1.10 Peptídeos membrano-ativos como agentes de acúmulo preferencial em células bacterianas

Peptídeos membrano-ativos são uma categoria vasta de moléculas, com diversas estruturas primárias e secundárias e que compartilham a capacidade de interagir com membranas fosfolipídicas. Essa categoria de peptídeos pode ser dividida em três grandes classes: peptídeos antimicrobianos (sigla em inglês, AMPs), que possuem atividade microbicida; peptídeos penetradores de células (sigla em inglês, CPPs) que transportam cargas através da bicamada fosfolipídica⁵⁰; e os peptídeos β -amilóide, que podem estar envolvidos em doenças, como a doença de Alzheimer⁵¹, mas que também podem ter atividade antimicrobiana. Estudos mostram que, neste último exemplo, estruturas de β -amilóide se ligam aos carboidratos da parede celular por meio de um domínio de ligação à heparina. A formação dessas protofibrilas inibe a adesão de patógenos às células hospedeiras⁵².

Esses AMPs têm ação contra uma ampla gama de microrganismos, como vírus e fungos, e têm sido amplamente estudados como novas estratégias ao combate de infecções bacterianas^{28, 53}. A maior parte dos peptídeos membrano-ativos apresentam caráter catiônico/anfifílico e estruturam-se em α -hélices. Alguns desses peptídeos, quando testados contra bactérias, apresentam ação de detergência da membrana bacteriana e, devido à alta pressão osmótica da célula, induzem lise celular²⁸. Em paralelo, outras estruturas, ao invés de atuarem como agentes antimicrobianos diretos, podem ser usadas como moléculas que apresentam algum grau de seletividade por membranas bacterianas, devido a uma simples atração eletrostática entre o peptídeo catiônico e os fosfolipídios aniônicos presentes nas membranas celulares bacterianas. Estes podem servir de estruturas carreadoras de outras moléculas, onde essas podem apresentar diferentes ações dependendo do objetivo, como a de imageamento ou antibiótica²⁸.

Em um estudo realizado por Chen e colaboradores⁵⁴ mostrou-se a utilização de peptídeo catiônico Ubiquicidina (UBI₂₉₋₄₁) (TGRAKRRMQYNRR), rico em argininas e lisina, como carreador do antibiótico Cloranfenicol (CAP) até o local de infecção (Figura 13). Quando na região alvo, a ligação peptídeo-antibiótico é quebrada liberando *in loco* o antibiótico, facilitando a entrega do medicamento, aumentando sua eficiência e reduzindo os efeitos colaterais.

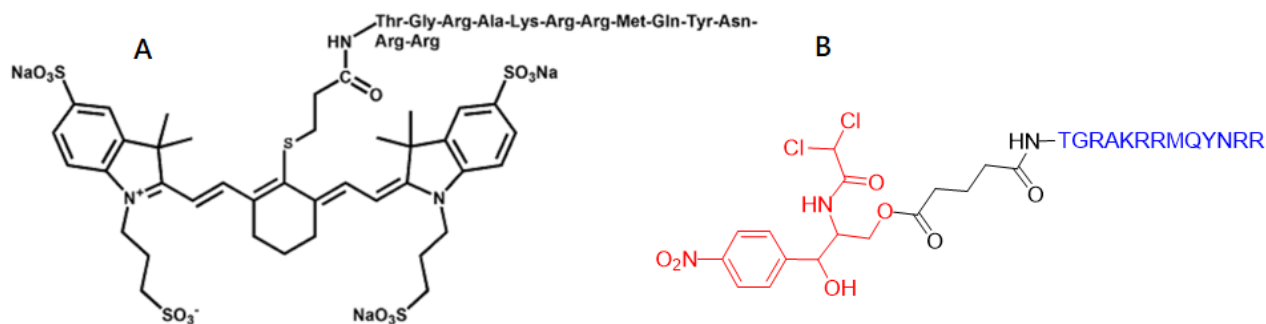


Figura 13: Estruturas para investigação da seletividade e direcionamento do peptídeo catiônico UBI₂₉₋₄₁. **A)** Peptídeo UBI₂₉₋₄₁ ligado a estrutura fluorescente no IV-próximo, ICG-Der02. Essa estrutura foi idealizada para monitorar em tempo real a capacidade de direcionamento, seletividade e acumulação do peptídeo catiônico a sítios de infecção. **B)** Peptídeo UBI₂₉₋₄₁ conjugado ao fármaco cloranfenicol (estrutura desenhada em vermelho), em preto o ligante e em azul o peptídeo. Essa estrutura foi idealizada como um pró-fármaco sendo ativada *in situ* por meio de esterases, liberando no seio da infecção o cloranfenicol (Figura modificada da ref. 36)⁵⁴.

A investigação da seletividade do peptídeo UBI₂₉₋₄₁ foi feita por imageamento no infravermelho próximo. Para tal, foi sintetizado pelos autores um híbrido entre o peptídeo e um corante fluorescente no IV-próximo (650nm-900nm), o ICG-Der02 (Figura 14) e testada sua capacidade de direcionamento seletivo, *in vivo*, utilizando camundongos inoculados com *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando como controle um processo inflamatório induzido por lipopolissacarídeos (LPS).

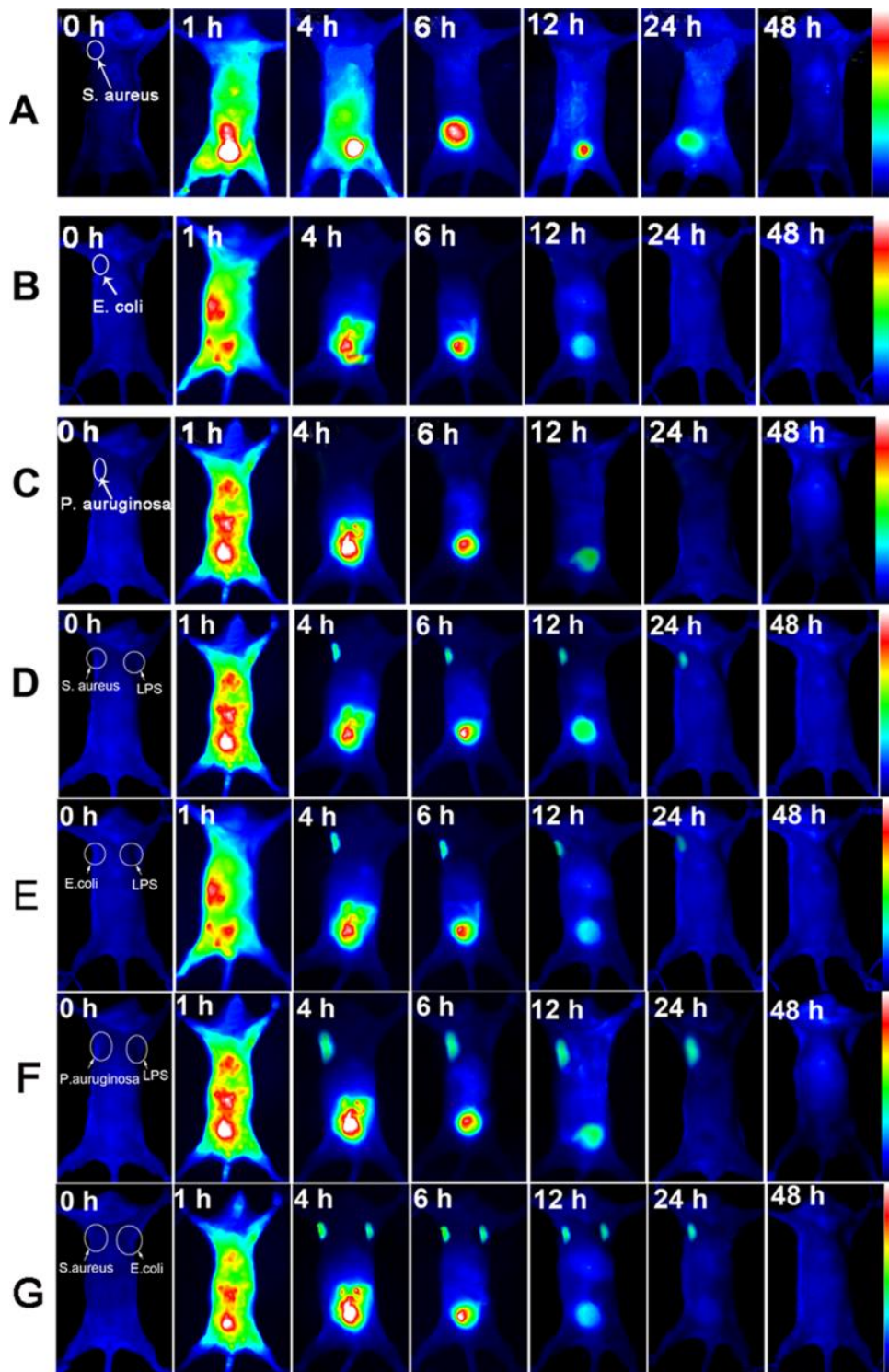


FIGURA 14: Experimento para investigação da seletividade do peptídeo UBI₂₉₋₄₁. Nos experimentos de **A** a **C** os camundongos inoculados respectivamente com *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* na parte superior esquerda e administração somente do corante fluorescente ao IV-próximo

ICG-Der02. Pode-se observar que ocorreu uma distribuição por todo corpo do animal sem seletividade nos sítios de infecção e eliminação total do composto fluorescente por volta de 24h. Nos segmentos de **D** a **F**, os pesquisadores inocularam as mesmas cepas de bactérias na mesma ordem e na mesma região, porém em todos os camundongos desse segmento foi gerado uma inflamação com LPS na parte superior direita. Em sequência foi administrado o híbrido UBI₂₉₋₄₁- ICG-Der02. Pode-se observar que inicialmente ocorre uma distribuição do composto por todo o animal e posterior eliminação por via renal. Porém, observa-se que a região da inoculação das bactérias ainda continua fluorescente mesmo após passado 24h do começo do experimento, indicando uma acumulação preferencial do composto nessa região, sugerindo uma seletividade do composto pelo sítio de infecção. Observa-se ainda que a região de inflamação provocada por LPS não apresenta fluorescência, indicando que o composto é seletivo não a um processo de inflamação e sim a região onde se encontra células bacterianas. Por fim, o segmento **G** mostra o camundongo inoculado com *Staphylococcus aureus* na parte superior esquerda e com *Escherichia coli* na parte superior direita. Observa-se que ocorre fluorescência nas duas regiões inoculadas com as bactérias, indicando que não há uma discriminação entre infecções causadas por bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas. Nesse experimento, a fluorescência também ficou aparente mesmo após 24h do começo do experimento (Figura retirada da ref. 46)⁵⁴.

Em um trabalho prévio do nosso grupo, foram reconhecidos alguns peptídeos antimicrobianos encriptados em proteínas humanas a partir da utilização do software Kamal (disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/kamal/>)⁵⁵. Esses peptídeos são classificados como intragênicos (IAPs) e denominados Hs IAPs^{28, 55}. Essa metodologia possibilitou a criação de uma quimioteca de potenciais peptídeos antimicrobianos membrano-ativos. Para uma seleção mais fina desses peptídeos, foi utilizada a técnica de microcalorimetria, a qual mede a variação termodinâmica (endotérmica ou exotérmica) de transformações físicas ou químicas, aplicada a biomoléculas²⁸. Tal técnica possibilita estudar desde mudanças conformacionais até a interação e estruturação dos AMPs nas membranas bacterianas bem como a perturbação causada nessas membranas. Ela ainda possibilita identificar os peptídeos que interagem seletivamente e superficialmente com bicamadas

fosfolipídicas aniônicas de bactérias em relação àquelas que são zwitteriônicas ou eletricamente neutras, como as membranas eucarióticas.

Dentre os IAPs selecionados está o peptídeo Hs02, um peptídeo de dezesseis resíduos de aminoácidos (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂) que tem origem na proteína miosina não convencional-1h (código uniprot: Q8N1T3)²⁸. Este apresenta estrutura em α -hélice quando na presença de micelas de DPC, conforme determinado por RMN, com uma face composta por aminoácidos hidrofílicos catiônicos e a face oposta com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 15). O Hs02 apresentou, além de atividade antimicrobiana ampla e potente, forte resposta anti-inflamatória pela sua capacidade de inibir a liberação de TNF- α induzidas por lipopolissacarídeos em macrófagos murinos^{54, 56}.

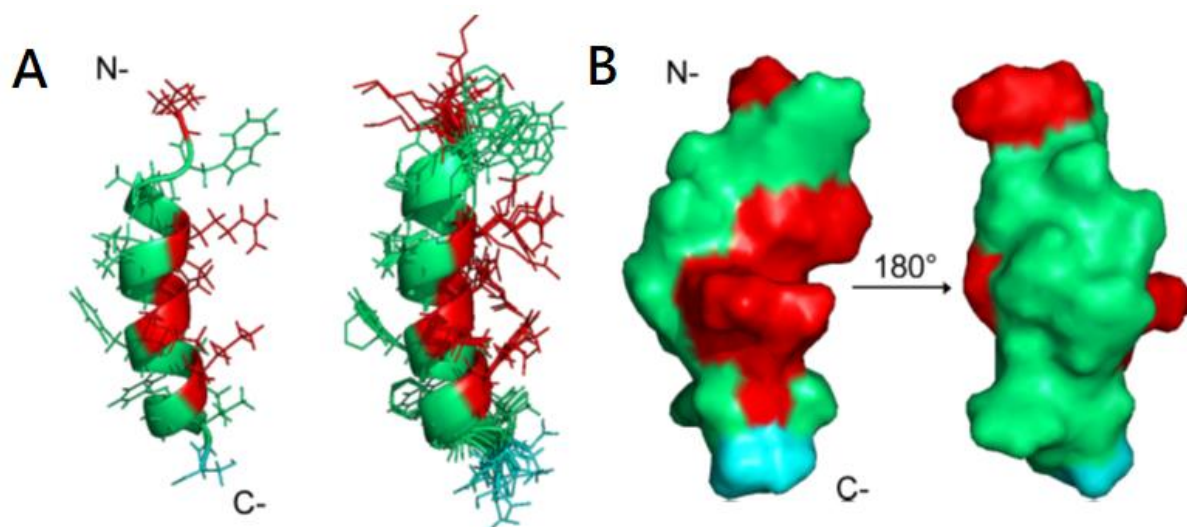


Figura 15: A) Representação em fita do peptídeo antimicrobiano Hs02 a esquerda. Pode-se perceber sua estruturação preferencial em alfa-hélice e uma região desestruturada, tanto na estrutura de menor energia a esquerda, quanto na sobreposição das dez estruturas de menor energia a direita. **B)** Características eletrônicas demonstram sua anfifilicidade. Em vermelho a representação de aminoácidos catiônicos, em verde resíduos de aminoácidos apolares (hidrofóbicos) e em azul uma pequena porção de aminoácidos polares (Figura modificada da ref. 18)²⁸.

Resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa ainda mostraram que parte dos peptídeos selecionados apresentaram uma interação destrutiva com a membrana, tendo uma ação de detergência e causando um rompimento da

membrana²⁸. O peptídeo Hs02 apresentou uma interação com algum grau de seletividade por membranas aniônicas em relação às eletricamente neutras. Essa interação, até uma determinada concentração, é superficial, mas significativamente forte, fazendo com que o peptídeo “ancore” e se acumule na membrana bacteriana, mas ainda assim apresentando uma forte característica antimicrobiana²⁸.

As propriedades demonstradas por esse peptídeo indicam seu potencial como um agente carreador de fármacos capaz de direcionar e acumular nos locais de infecção. Isso possibilitaria ter uma ferramenta mais efetiva no tratamento de infecções, podendo amenizar o quadro infeccioso, diminuir efeitos colaterais, diminuir a quantidade de medicamento utilizado e abreviar o tratamento.

Esse peptídeo foi selecionado no *hall* de estruturas preditas pelo Kamal²⁸ e foi modificado com a adição de outras cadeias de aminoácidos e utilizado na síntese de híbridos ou *quimeras*, chamadas de peptídeos de série Chim. Estas apresentam uma porção (Hs02) que seria responsável pelo direcionamento das membranas bacterianas (função de carregamento), uma região espaçadora e outra estrutura com atividade imunomoduladora, que seria liberada *in situ*. Essa liberação seria dependente de ativação por atividade proteolítica específica da grande variedade de enzimas presentes no seio da infecção, como as serino-proteases, metaloproteases ou as proteases pertencentes ao ciclo de *quorum sensing* da atividade bacteriana como as sinal peptidases (Spase). A liberação dessas estruturas *in situ* possibilitaria um combate mais efetivo à infecção bacteriana e causando um menor efeito colateral, o que abreviaria assim o tratamento da septicemia.

1.10.1 Peptídeos imunomoduladores liberados por atividade proteolítica e ativação de receptores celulares

Em um processo infeccioso, a percepção da presença de patógenos é feita pelos PRRs, sigla em inglês para Receptores de Reconhecimento Padrão. Estes receptores são sensíveis a porções conservadas de moléculas produzidas pelos microrganismos conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos no hospedeiro (DAMPs). Os receptores de peptídeos formilados (FPRs) são receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e são quimioatratores de células imunes. Esses receptores estão envolvidos

na defesa do hospedeiro contra patógenos no sistema imunológico inato e medeiam o recrutamento e a ativação dos leucócitos⁵⁷. No geral, o papel da família FPR na fisiologia animal ainda é pouco compreendido devido, em parte, à grande variedade de agonistas, a ambiguidades nas interações a depender dos agonistas, à redundância com outros agentes quimioatrativos e à falta de ortólogos (genes em espécies diferentes que surgem a partir de um único gene do ancestral comum) tangíveis entre humanos e camundongos. Contudo, estudos demonstram que esse receptor possui uma notável importância na resposta imune inata.

O organismo humano é conhecido por expressar três genes FPR: FPR1, FPR2 e FPR3^{58, 59, 54}, mas esse número varia em outras espécies de mamíferos. Os FPRs são expressos em células imunes envolvidas na resposta inata, principalmente em neutrófilos e, em menor quantidade, em macrófagos, monócitos, linfócitos T entre outras⁶⁰. O FPR1 foi o primeiro receptor descoberto da família dos FPRs e tem alta especificidade na detecção de peptídeos formilados⁶¹. O receptor FPR2 tem menor afinidade para peptídeos formilados que o FPR1, mas pode ser ativado por uma ampla gama de agonistas, como peptídeos amilóides, peptídeos antimicrobianos e mediadores lipídicos⁶¹. A função do receptor FPR3 ainda é incerta e ele é encontrado substancialmente em pequenas vesículas intracelulares, macrófagos, monócitos células dendríticas, mas não são encontradas nos neutrófilos. Estudos mostraram que o receptor FPR3 raramente interage com peptídeos formilados^{62, 63}. Embora esses receptores tenham sido descritos inicialmente em células imunes, estudos têm mostrado que os FPRs são expressos em outros tecidos, que vão desde células do sistema nervoso até células de pulmão e intestino, sugerindo que podem ter um papel na gestão e detecção da microbiota do corpo⁶⁰.

Em uma situação de infecção bacteriana, por exemplo, esses receptores são sensibilizados por padrões moleculares dos patógenos e ativam várias vias de sinalização. Essas vias geram uma resposta mais conhecida em neutrófilos (leucócitos fagocitários) que, por meio de quimiotaxia gerada pelos quimioatraentes de microrganismo, migram e se acumulam nos locais de infecção onde liberam alguns fatores como espécies reativas de oxigênio (ROS) para combater a os agentes invasores⁵⁹ (Figura 16).

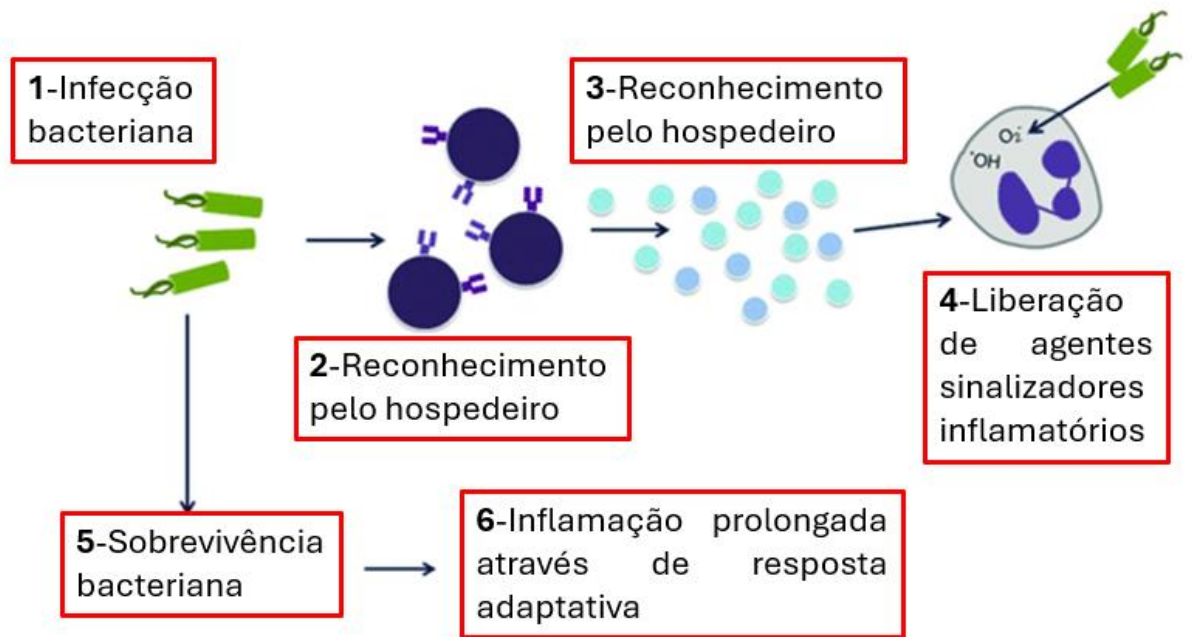


Figura 16: Diagrama esquemático da cascata de etapas que se procedem em uma resposta imune a uma infecção bacteriana. Quando a infecção bacteriana é reconhecida pelos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs), nas células hospedeiras tal como parte da resposta imune inata, citocinas e quimiocinas inflamatórias são liberadas para atrair neutrófilos para o local da infecção. Os neutrófilos fagocitam e matam as bactérias com espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura adaptada da referência 62)⁶⁴.

A cascata de sinalização se dá quando moléculas, como os peptídeos formilados, atuam como agonistas nesses tipos de receptores induzindo a subunidade $G_{\alpha i}$ a se dissociar da subunidade $G_{\beta\gamma}$. Essa última subunidade controla a resposta do fluxo de cálcio, fosfoinosídeo 3-quinase (PI3K), fosfolipase C (PLC), Akt, quinase SFK⁶⁵ e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), cascatas de sinalização que atuam na sensibilização das células. As SFKs, sigla em inglês para quinases da família Src, são enzimas protooncogênicas que controlam o crescimento e a proliferação de células em mamíferos, além de regular a adesão dos neutrófilos (Figura 17)^{46, 59, 66, 67}.

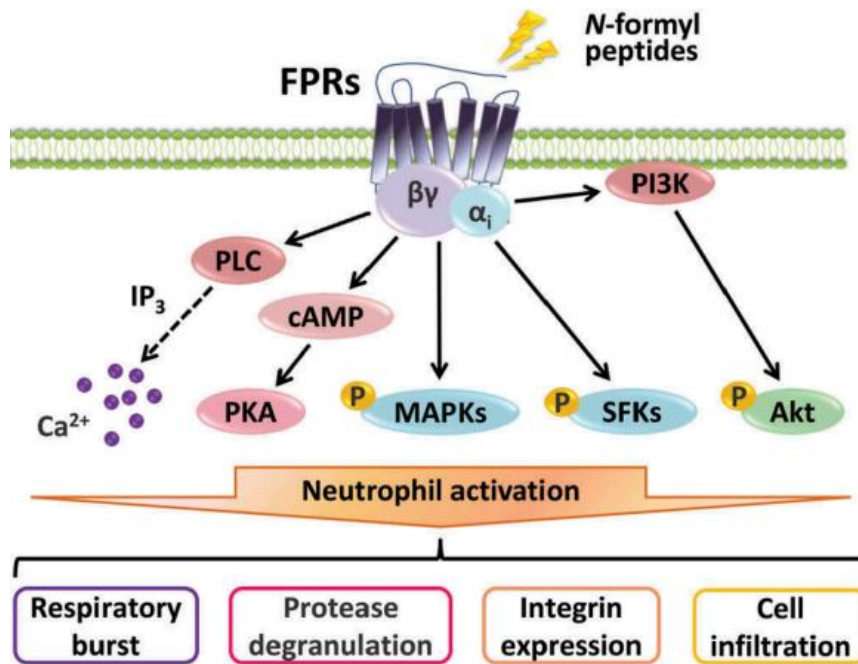


Figura 17: Cascata de sinalização decorrente da sensibilização do receptor FPR. A estimulação desse receptor leva a uma separação de duas subunidades, a Gαi da Gβγ. As subunidades Gαi e Gβγ podem mediar o influxo de íons Cálcio, ativação da proteína quinase (Akt), monofosfato de adenosina 3-5-cíclico (cAMP), 3,4,5-trifosfato de inositol (IP₃), Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK), fosfoinositida-3-quinase (PI3K), Proteína quinase A (PKA), fosfolipase C (PLC) e quinase da família Src (SFK). Essa cascata de sinalização gera uma série de respostas que, ao final, leva a uma ativação dos neutrófilos, que estão envolvidos na explosão respiratória, degradação de proteases, infiltração celular, dentre outros⁵⁹.

Embora os FPRs tenham sido identificados de acordo com sua capacidade em detectar peptídeos formilados, esses receptores podem reconhecer diversos outros agonistas, que não seguem um padrão estrutural único ou de sequência específica de aminoácidos. Como exemplo, tais agonistas podem ser N-formilados, C-amidados e oligopeptídeos sem modificação pós tradicional de invasores bacterianos e virais, além de ligantes não peptídicos⁵⁷. Essa particularidade de reconhecimento de outras estruturas é mais vultosa no receptor FPR2 se exibindo muito versátil dentre esses receptores. O FPR2 possui sete alfa-hélices transmembranas (Figura 18). É um tipo de receptor predominantemente expresso em neutrófilos, monócitos, células T,

células dendríticas, baço e pulmão. Sua ativação pode ser benéfica devido ao resultado proveniente de sua sensibilização, que pode variar no tipo de resposta apresentada. A depender do ligante, a ativação de FPR2 pode apresentar uma resposta pró- ou anti-inflamatória, embora a caracterização das propriedades farmacológicas de agonistas sintéticos sugira um papel anti-inflamatório predominante na defesa do hospedeiro⁶⁸.

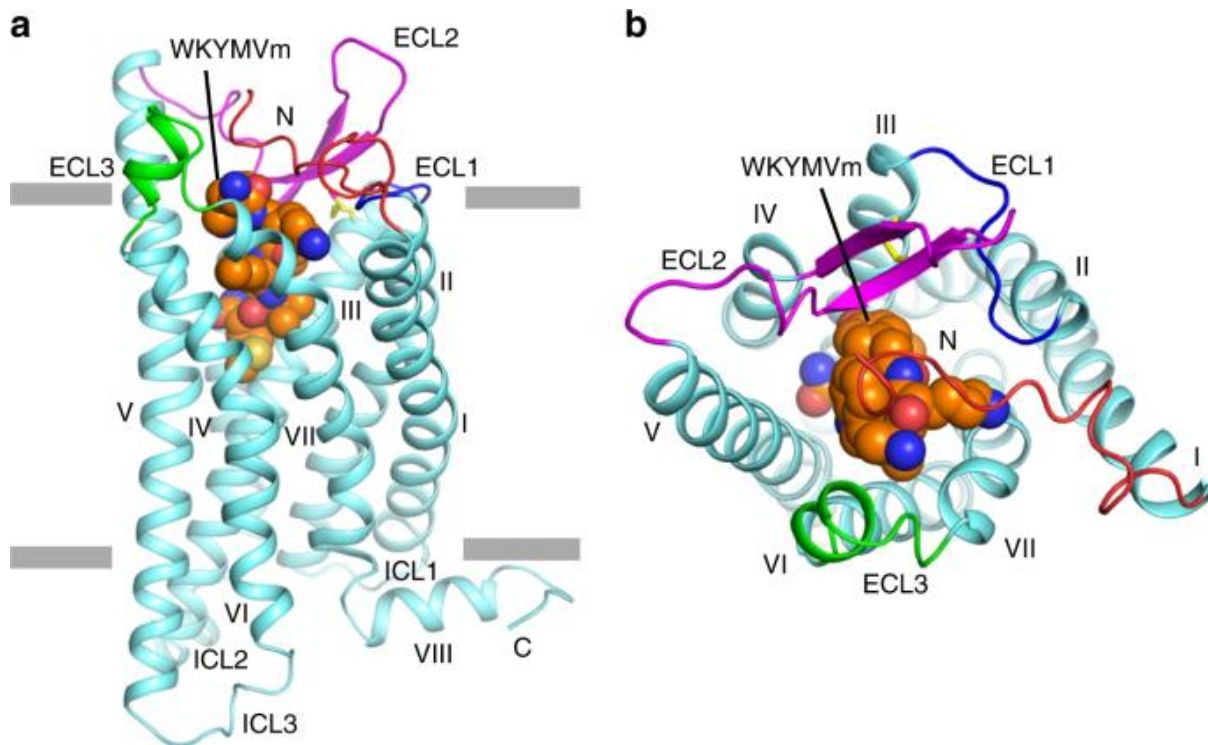


Figura 18: Estruturas do Receptor transmembrana FPR2. A) Vista lateral da estrutura FPR2 complexado com o peptídeo agonista WKYMVm. O receptor (em cor ciano) apresenta as alças ECL1, ECL2 e ECL3 voltadas para o meio extracelular. O peptídeo WKYMVm colorido com esferas com carbonos em laranja. B) Receptor FPR2 visto a partir de cima, do meio extracelular e ao centro o ligante peptídico WKYMVm⁶⁹.

Por exemplo, o FPR2 traduz respostas anti-inflamatórias quando tem como agonista o LXA4, mas também pode mediar resposta pró-inflamatórias a SAA, sigla em inglês para proteína amilóide A sérica e outros peptídeos. Não obstante, ainda não está totalmente esclarecido como o mesmo receptor pode levar a respostas antagônicas a depender do tipo de ligante⁶⁸.

Estudos sugerem que esses receptores sofreram um longo processo evolutivo para interceder no fluxo de células do sistema imune para os locais de infecção bacteriana ou injúria tecidual. O FPR2 desempenha papéis importantes em várias doenças e está fortemente associado ao câncer, especialmente no processo de metástase⁵⁹. Os agonistas desses receptores podem ter tanto estrutura lipídica quanto peptídica. Quando a estrutura é peptídica, a origem está na degradação de proteínas mitocondriais, que promovem a cascata de sinalização, como já mencionada no presente trabalho.

A cascata de sinalização (Figura 17), por sua vez, tem um papel importante na quimiotaxia podendo ser somada a ela a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α ⁶⁶. Esta última é uma citocina de imunidade natural, que é o principal mediador da resposta inflamatória a bactérias e microrganismos. Essa citocina pró-inflamatória, ativa os macrófagos, induz edema, rubor, dor e, no hipotálamo, ela age como pirógeno endógeno induzindo como resposta a febre, o que se traduz como inflamação. É importante ressaltar que, a liberação de TNF- α deve ser controlada, sendo sua liberação em curtos períodos, importante para o combate à infecção, no entanto, seu aumento agudo e constante pode gerar inflamação crônica e com isso prejuízos à homeostase do organismo. Em baixas concentrações o TNF- α atua nas células endoteliais promovendo vasodilatação e estimulando-as a produzir e secretarem uma variedade de citocinas, produzindo, dessa forma, um quadro de inflamação local que possibilita o combate a quadros infecciosos⁷⁰. Portanto, o receptor FPR2 é indispensável para os primeiros eventos de migração leucocitária para uma região infeccionada. Posto isso, a modulação da resposta imune no intrincado microambiente de infecção bacteriana é de vital importância⁷¹.

Dentre os ligantes de FPR2, merece ainda destaque a catelicidina humana (LL-37). Esta molécula apresenta atividade antimicrobiana, induzindo também quimiotaxia e estimulando a produção de interleucinas que podem ser pró ou anti-inflamatórias em células do sistema imune. No entanto, esse ligante também está envolvido em doenças autoimunes como a psoríase e lúpus, resultado de uma cascata inflamatória pela sensibilização dos receptores Toll-like (TLR)⁵⁸. Isso significa que o LL-37, apesar de atuar como agonista FPR2 e como um já conhecido peptídeo antimicrobiano (Figura 19)⁵⁷, gera uma série de efeitos colaterais pró-inflamatórios. Devido a essa característica do ligante LL-37, agonistas mais específicos ao FPR2 são desejáveis⁵⁸.

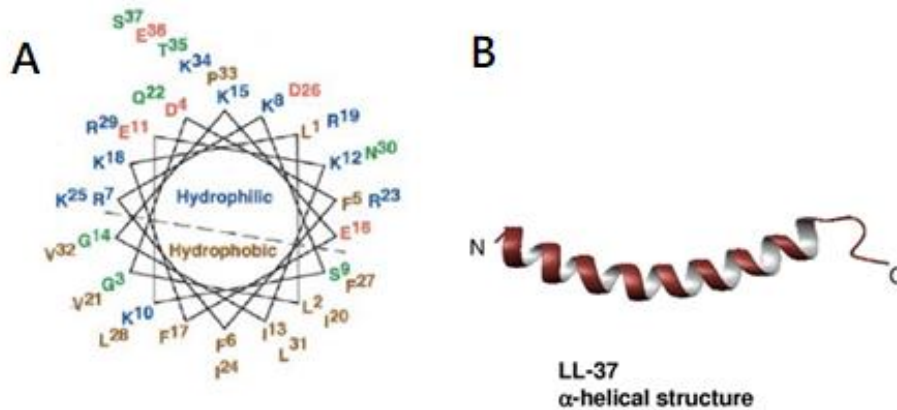


Figura 19: Estrutura do LL-37. Pode-se observar em **A** as duas porções formadoras desse peptídeo, uma hidrofóbica, na parte inferior e outra hidrofílica na parte de superior rica em aminoácidos catiônicos e em **B** sua estrutura preferencial em alfa hélice, características encontradas em peptídeos antimicrobianos⁵⁸⁵⁸.

Para a ativação do FPR2 são também conhecidos os W-peptídeos (também chamados de peptídeos da série W), como o bem estudado WKYVM (Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met), que foi obtido de uma variedade de outros peptídeos⁵⁴.

Foi mostrado que esse peptídeo pode provocar um aumento na atividade bactericida, apoptose de células imunes e inibição da inflamação em órgãos vitais em modelos biológicos murinos de sepse por punção da ligação de ceco (CLP). Essa atividade bactericida se deu por um aumento na produção de citocinas do tipo 1 (INF- γ e IL-12). A citocina INF- γ é uma importante citocina liberada em respostas imunes adaptativas, com a função de atrair os macrófagos que ostentam capacidade fagocítica, auxiliam na remoção de restos celulares, promovem a cicatrização e reorganização das áreas com inflamação. Já a principal ação da interleucina 12 é a de estimular as células “Natural Killer” (NK) e bloquear a ação de anticorpos anti-TNF- α . O peptídeo WKYVM também atua na liberação de citocinas do tipo 17 (IL-17 e TGF- β)^{54, 59}. A interleucina 17 é produzida principalmente por células T CD4+, células epiteliais, endoteliais, entre outras e promovem a liberação de citocinas inflamatórias, como a IL-6 e a angiogênese, que é a formação de novos vasos sanguíneos, envolvido no processo natural de crescimento e cura. A IL-17 mantém o estímulo à proliferação da progenitura hematopoiética e sua maturação preferencial em neutrófilos. Já o TGF- β é um polipeptídeo que estimula o crescimento e diferenciação celular (reparo tecidual), entre outras funções relacionadas à imunidade.

Foi demonstrando ainda que a estrutura do agonista WKYMVm tolera alongamentos no N-terminal e a remoção dos dois primeiros resíduos, na porção C-terminal (Vm), sem uma significativa perda como agonista do receptor FPR2. A eliminação do terceiro e quarto resíduo (WK) desse pentapeptídeo reduz drasticamente sua potência como agonista, sugerindo que esses dois resíduos de aminoácidos são fundamentais para a interação receptor-ligante⁵⁷.

Hui-Xin Wan⁵⁴ e colaboradores prepararam análogos de L-aminoácidos de variantes sintéticos do já conhecido agonista WKYMVm. Foi demonstrado que, embora a substituição do D-aminoácido metionina na posição 6 tenha diminuído a potência agonista, a remoção da D-metionina e da valina na posição 5 produziu um peptídeo que conservou a maior parte da bioatividade do peptídeo parental, resultando na variante WKYM. Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, com trabalho já publicado, mostraram o potencial do WKYM-NH₂ (CHIM2)⁷² na mediação da geração de ROS e de IL-6 e 12 em células BMDM de camundongos (Figura 20).

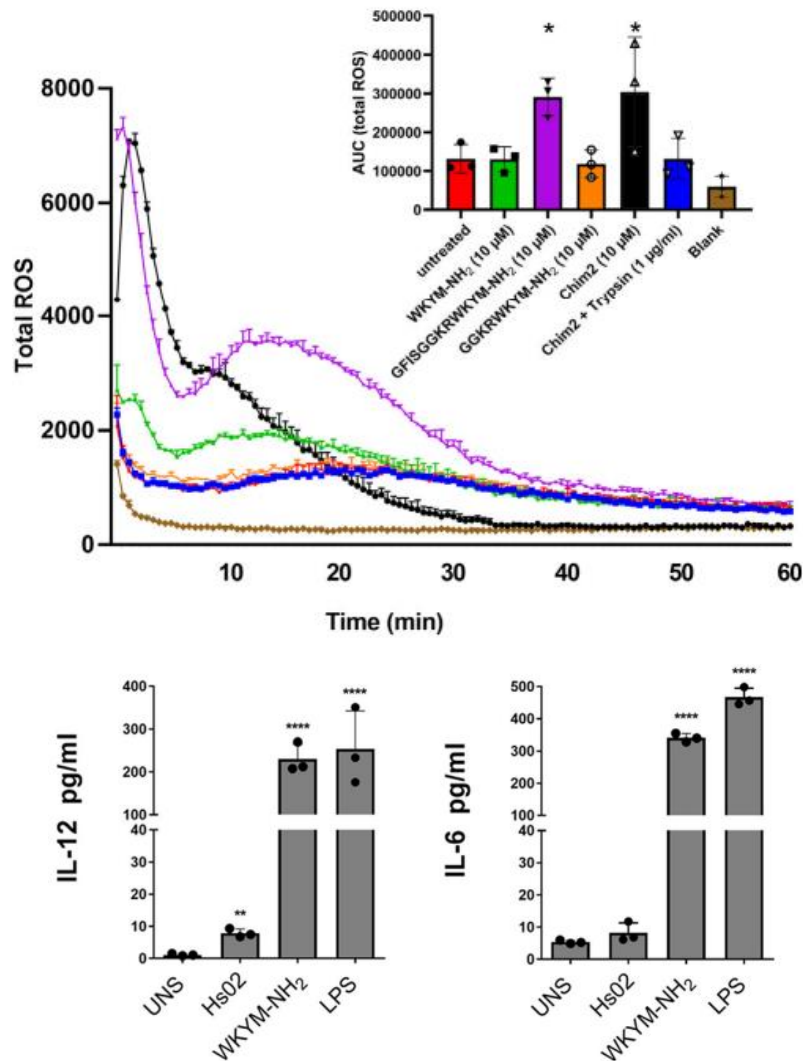


FIGURA 20: Liberação de ROS em neutrófilos humanos estimulados por LPS na presença de diferentes peptídeos na mesma concentração (10μM). Nota-se que há a liberação total de ROS na presença de estruturas que apresentam WKYM-NH₂ em níveis superiores as células que não tinham o peptídeo. Ensaios com ELISA em células de BMDM não estimuladas e estimuladas com LPS, o peptídeo WKYM-NH₂ estimulou a liberação de interleucinas 6 e 12².

Esses estudos corroboram com a ideia de que os W-peptídeos^{54, 59, 46}, variantes do agonista WKYVM, como o WKYM-NH₂, possuem uma interação mais específica com o agonista FPR2, estimulando o sistema imunológico e possivelmente sem gerar os efeitos colaterais relatados do agonista LL-37. Com isso, a utilização desse tetrapeptídeo para a sinalização química e ativação do sistema imunológico pode ser

uma alternativa para um tratamento mais eficaz de infecções bacterianas tendo uma resposta imune simulando a ação do agonista LL-37, no entanto de maneira mais controlada⁵⁴.

1.10.2 Desenho racional de um peptídeo quimera (CHIM3) com atividade dual de acúmulo em membrana bacteriana e quimiotaxia pela liberação de agonista de FPR2 pela ação da Spase I bacteriana.

Como apresentado no presente trabalho, a presença de microrganismos invasores gera um microambiente rico em proteases com diversas atividades, como a de tripsina e quimotripsina. Todavia, essas proteases podem ter origem tanto nos microrganismos invasores quanto no próprio hospedeiro, afinal são expressas de maneira exacerbada ao longo do processo inflamatório. O sistema imune apresenta variadas formas de ativação contra processos virulentos mediante a ativação e amplificação de respostas celulares e humorais. Uma dessas respostas é as serinoproteases secretadas pelos leucócitos de mastócitos como: elastase, catepsina G, trombina e caliceínas (que podem apresentar atividade de quimotripsina ou tripsina). Outras enzimas, FXIIa, PK, FXIa relacionadas a fatores pró-inflamatórios e pró-coagulantes em situações de injúria possuem atividade do tipo tripsina²⁷. Esse ambiente, rico em proteases, pode ser explorado para o desenvolvimento de drogas imunomoduladoras que possam ser ativadas *in situ* utilizando a atividade proteolítica das próprias enzimas do seio da infecção ou mesmo das próprias bactérias, como a já apresentada, Spase I.

O nosso grupo de pesquisa já explorou essas características e desenhou anteriormente outras quimeras peptídicas, chamadas de CHIM1 e CHIM2 (Tabela 3) com base no mesmo conceito². Estas quimeras utilizam a estrutura do Hs02 (Figura 15), com poucas alterações, como peptídeo carreador e direcionador a membranas bacterianas. Mais recentemente, o peptídeo CHIM2 foi avaliado em vesículas modelo compostas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e de dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), onde foi possível evidenciar sua seletividade por vesículas de carga negativa (LUVs de 2:1 DMPC:DMPG) e o padrão diferencial de liberação da porção agonista de FPR2 em sistemas acrescidos de CHIM2, vesículas fosfolipídicas e da

enzima tripsina². Além disso, foi possível determinar, por ressonância magnética nuclear, a estrutura do peptídeo ligado em micelas de DPC, demonstrando a presença de uma região estruturada (correspondente a Hs02) e uma região desestruturada (Figura 21).

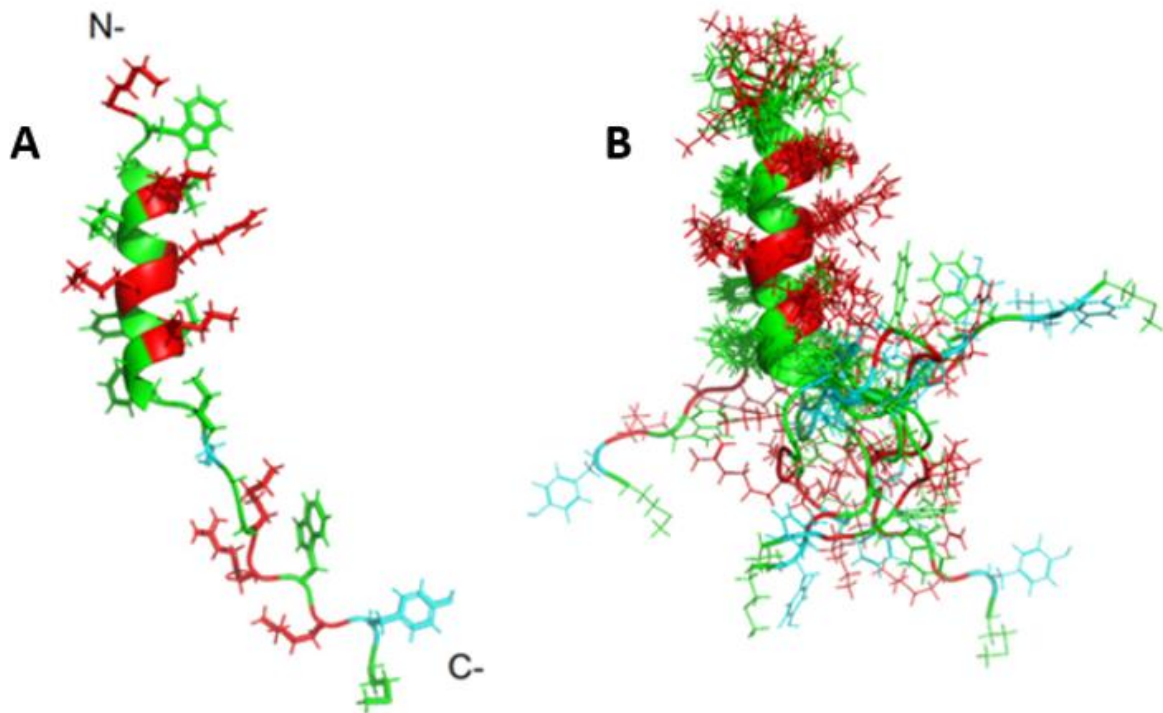


Figura 21: Estruturação do peptídeo CHIM2 determinada por RMN pelo nosso grupo de pesquisa: Observa-se a estruturação do peptídeo CHIM2 em alfa-hélice (A); além de regiões desestruturadas ou que possuem um maior grau de liberdade próximo a região N- e C-terminal (B)².

Para o desenho de uma nova estrutura quimérica aprimorada (CHIM3) que ainda apresente atividade dual (carreadora/antimicrobiana e imunomoduladora), foi mantido o desenho do peptídeo catiônico Hs02 e acrescentou-se uma região nova de reconhecimento da Spase I (fora as estruturas de reconhecimento enzimático já presentes no CHIM2). Esse novo sítio de reconhecimento lançado nessa nova estrutura peptídica, -ANAAQH-, foi desenhado a partir da literatura, onde foi demonstrada uma atividade proteolítica intensa na ligação entre as alaninas (ANA↓AQH) para a enzima Spase I em *S. aureus*³³. Além disso, foi planejado para

que, na posição -6, onde se encontra o espaçador desestruturado (GPG), tivesse um resíduo de glicina, visto que estudos mostraram ser um resíduo conservado em pré-proteínas que são reconhecidas pela Spase I. O espaçador desenovelado formado por glicina-prolina-glicina (GPG)^{73,74}, deve conferir maior liberdade conformacional a essa parte da estrutura, possibilitando, assim, um menor impedimento ao acesso da enzima ao sítio de clivagem. Também se projetou a porção C-terminal de forma a ter nove resíduos, a partir da posição -1 do segmento de clivagem, pois estudos mostraram que acima de nove resíduos a atividade de proteólise da Spase I é significativamente diminuída³³. Em seguida, outra região que pode atuar como um sítio extra de reconhecimento enzimático, agora com preferência de atividade do tipo tripsina, desenhado como: Lisina-Arginina (KR)². A partir desse desenho do peptídeo, com essas duas regiões que apresentam sítios de atividade proteolítica de enzimas diferentes, é esperada uma maior eficiência na liberação da parte final do peptídeo, que é a região imunomoduladora, o tetrapeptídeo com atividade agonista de FPR2, WKYM-NH₂².

Isto posto, de maneira concisa, o presente trabalho teve como propósito a racionalização estrutural de uma quimera peptídica que parte do conhecimento acumulado até o momento para os peptídeos da série CHIM. Essa estrutura foi dividida em quatro segmentos:

1. Peptídeo catiônico anfifílico com afinidade diferencial por membranas bacterianas. Para esse segmento foi usado um variante do peptídeo Hs02, descrito pelo nosso grupo de pesquisa². Esse peptídeo pode tanto ter uma atividade antimicrobiana direta na membrana, como a de detergência ou apenas, em concentrações sub-líticas, apresentar interação superficial e acúmulo. Sua interação superficial na membrana pode fornecer, a princípio, uma proteção à clivagem enzimática da cadeia polipeptídica expondo somente o sítio de proteólise de interesse. Essa atividade pode ainda prolongar a liberação da porção agonista no tempo, fazendo com que a ação de estimulação do sistema imune perdure;
2. Um segmento espaçador desestruturado que permita maior liberdade conformacional, distanciando o sítio de clivagem da membrana bacteriana

para o acesso mais facilitado a proteases. Essa região pode ser desenhada com aminoácidos que tenham uma menor cadeia lateral facilitando outros estados conformacionais, como a glicina;

3. Sítio de proteólise. O sítio de proteólise pode ser desenhado de tal forma a contemplar diferentes proteases expressas no local da infecção, podendo ser de origem do próprio sistema de defesa, exoproteases bacterianas ou proteases presas a membrana;
4. O segmento imunomodulador. Esse peptídeo deve ser liberado pela proteólise do precursor e ser capaz de sinalizar e guiar por quimiotaxia o sistema de defesa para o local de infecção. Esse segmento será composto pelo agonista de FPR2, WKYM-NH₂^{2, 75}.

Tabela 3: Estruturas primárias dos peptídeos Hs02, CHIM1, CHIM2 e CHIM3

Peptídeo	Estrutura Primária
Hs02	KWAVRIIRKFIKGFIS-NH ₂
CHIM1	KWAVRIIRKFIKGFISGGKWKYM-NH ₂
CHIM2	KWAVKIIRKFIKGFISGGKRWKYM-NH ₂
CHIM3	KWAVKIIRKFIKGFISGPGANAQHKRWKYM-NH ₂

Na tabela 3 acima, podemos comparar as estruturas dos peptídeos da série CHIM. Começando pelo carreador, a sequência primária do peptídeo **Hs02**, prospectado pelo Software Kamal. No peptídeo **CHIM1** a porção carreadora, sem modificações, foi ligada a um espaçador glicina-glicina (em vermelho) e em sequência à região de reconhecimento enzimático, KK, em amarelo, e o sítio de clivagem entre a lisina e o triptofano (K-↓-W), liberando a porção agonista WKYM-NH₂, em roxo. No peptídeo **CHIM2** ocorreu a troca de Arg6 para Lys (em azul), com o objetivo de diminuir a hidrólise na região e conservar por mais tempo a porção carreadora e a troca do sítio de reconhecimento enzimático para KR (em amarelo). Para o peptídeo **CHIM3** a modificação da Arg6Lys se manteve e o espaçador foi modificado para GPG (em vermelho) ligado ao sítio de reconhecimento ANA (em verde) e um sítio de reconhecimento após o sítio de clivagem AQH (em azul claro) e o outro sítio de clivagem com atividade da tripsina KR conservado do peptídeo CHIM2.

A racionalização dessa melhor atividade dual, procedente da ação direta na membrana e liberação do fragmento imunomodulador gerando assim um potencial quimiotático, é representada pelo mecanismo da figura 22 abaixo.

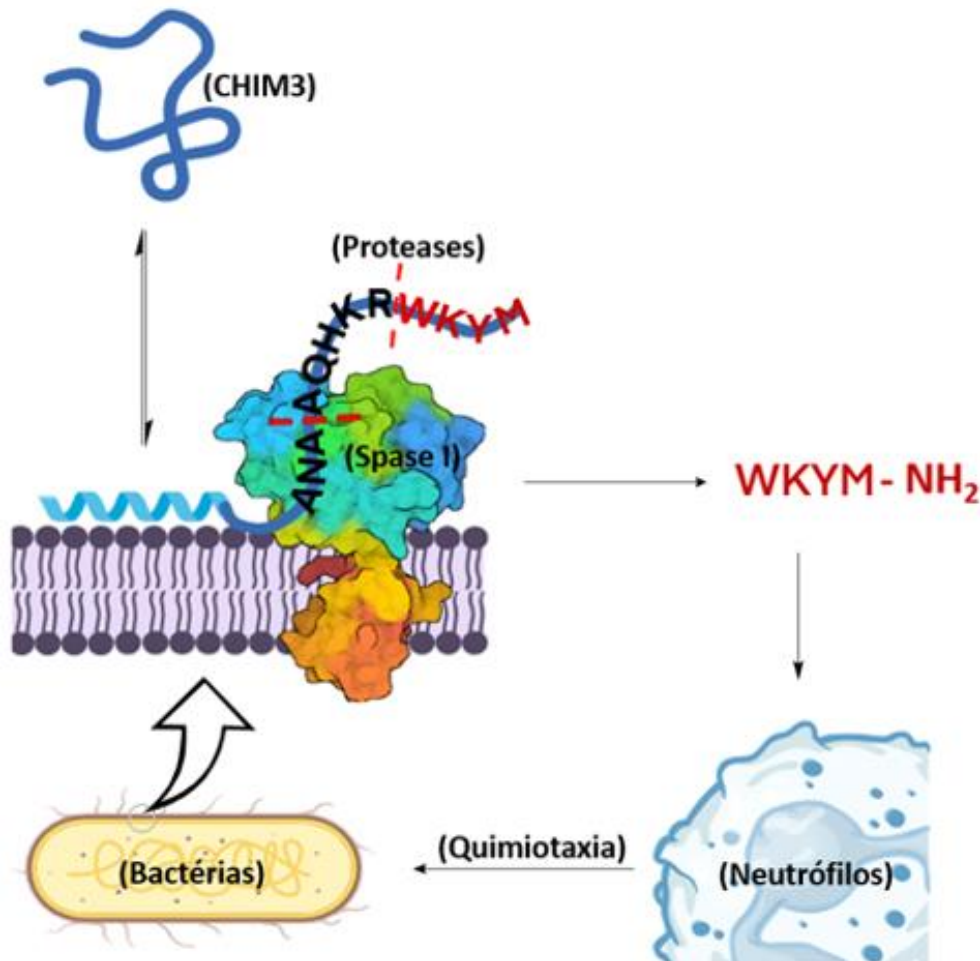


Figura 22: Representação da interação do peptídeo CHIM3 com a membrana bacteriana, proteólise e liberação do agonista de FPR2. O peptídeo CHIM3 após o direcionamento e acumulação no local da infecção interagiria de forma reversível com a membrana bacteriana, onde em situações com uma quantidade maior de células bacterianas, ocorreria o deslocamento do equilíbrio para a forma do peptídeo ligado a membrana, em seguida o reconhecimento, pela Spase I do sítio ANAA e proteólise e liberação no meio do precursor do agonista WKYM-NH₂, que seria reconhecido pelo receptor FPR2 ocasionando a sinalização recrutando o sistema imune para o combate a infecção.

Como o microambiente de uma infecção bacteriana é rico em proteases diversas, ainda é possível prever que CHIM3 será alvo de hidrólise enzimática em posições indesejadas da cadeia polipeptídica. Assim, pode-se cogitar que modificações estruturais aumentem a meia vida de determinados fragmentos peptídicos⁷⁶. Essas modificações podem impedir ou dificultar o correto reconhecimento enzimático, por efeito estérico ou mudança das interações intermoleculares no sítio ativo. A amidação no C-terminal, a título de exemplo, é uma das modificações cotidianamente feitas na síntese de peptídeos diversos, sendo relacionada à menor susceptibilidade à ação de enzimas do tipo carboxipeptidase⁷⁶.

Alternativamente, outra modificação que pode ser pensada na estrutura do peptídeo CHIM3 é a N-metilação. A N-metilação apresenta algumas características interessantes. Trata-se de uma modificação estrutural relativamente simples, com poucos impactos na estrutura dos peptídeos. Alguns trabalhos demonstram que a N-metilação de resíduos de aminoácidos em ligações peptídicas adjacentes à sítios de proteólise com tripsina são capazes de reduzir de maneira dramática a taxa de hidrólise nestas ligações e em ligações adjacentes⁷⁷⁻⁷⁹. Por último, Fmoc-N-metil-aminoácidos são disponíveis comercialmente, o que facilita de sobremaneira a síntese de moléculas modificadas.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo geral a síntese de CHIM3 e a avaliação do seu perfil de hidrólise a partir das bactérias *E. coli* e *S. aureus*, visando, principalmente, a verificação da atividade da enzima bacteriana Spase I. Além disso, pretende-se avaliar a liberação no meio reacional de um tetrapeptídeo responsável pela sensibilização de FPR2, WKYM-NH₂, provindo de CHIM3, e que dirigirá a maturação e quimiotaxia de neutrófilos para o local infeccionado. Objetiva-se também a proposição de modificações estruturais em CHIM3 que melhorem sua atividade biológica.

2.2 Objetivos Específicos

O presente estudo tem como objetivos específicos:

1. Desenho racional do peptídeo CHIM3, correspondente a CHIM2 acrescido de um sítio proteolítico de Spase I bacteriana;
2. Síntese em fase sólida do peptídeo CHIM3;
3. Purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e caracterização por espectrometria de massa do peptídeo sintetizado;
4. Ensaios de determinação de CIM e CBM de CHIM3
5. Incubação de CHIM3 com *E. coli* e *S. aureus* a partir de diferentes concentrações de peptídeo e tempos de incubação variáveis;
6. Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS) dos fragmentos de CHIM3 gerados pela digestão enzimática no experimento de incubação das bactérias com o peptídeo CHIM3;
7. Verificação do efeito de inibidores enzimáticos na hidrólise de CHIM3 promovida por *E. coli* e *S. aureus*;
8. Síntese de análogos do peptídeo CHIM3 visando o aumento da vida média do WKYM-NH₂ em meio contendo bactérias;

9. Avaliação *in silico* da interação do peptídeo WKYM-NH₂ e WK(Y-NMe)M-NH₂ com FPR2;
10. Ensaio de citotoxicidade para macrófagos murinos do peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂;
11. Quantificação do peptídeo WKYM-NH₂ e WK(Y-NMe)M-NH₂ proveniente dos ensaios de digestão de CHIM3 e CHIM3-Y(NMe) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
12. Perfil de liberação de citocinas induzidas pelo peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂ em macrófagos peritoneais murinos.

3. Métodos

3.1 Síntese em fase sólida do peptídeo CHIM3, WKYM-NH₂ e WRWWWW-NH₂

Os peptídeos foram sintetizados utilizando-se a técnica de síntese de peptídeos em fase sólida, SPPS (sigla em inglês para Solid Phase Peptide Synthesis) (Esquema 1). Essa técnica de síntese de peptídeos foi introduzida por Robert Bruce Merrifield em 1963. A sequência peptídica desejada é sintetizada quimicamente ancorada a uma matriz polimérica, através de sua extremidade carboxiterminal. Essa extremidade se liga à resina polimérica por um *linker*. Dependendo do *linker* utilizado, após a síntese, a região C-terminal pode deixar a resina como uma carboxila ou como uma amida.

Nesse tipo de síntese, os aminoácidos apresentam, geralmente, grupos protetores na amina e, caso tenham grupo funcional reativo na cadeia lateral, grupos protetores de cadeia lateral. Dependendo dos grupos protetores nos aminoácidos presentes, emprega-se métodos sintéticos diferentes. A técnica mais amplamente utilizada é a com o grupo protetor Fmoc no grupo amina. Esse tipo de técnica foi compilado no trabalho de Chan e White⁵⁸, e usado como base esquemática para as sínteses em fase sólida do presente trabalho.

Para a síntese, foi utilizada como fase sólida a resina de Rink (Figura 23), uma vez que se objetivava um peptídeo amidado no “C terminal” após a clivagem da resina. Isso é possível pois o “linker” apresenta uma amina, que ao se ligar ao primeiro aminoácido formará uma amida.

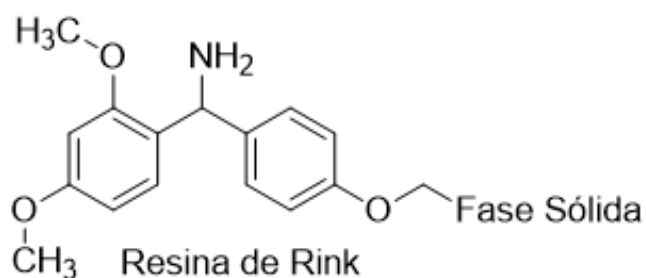
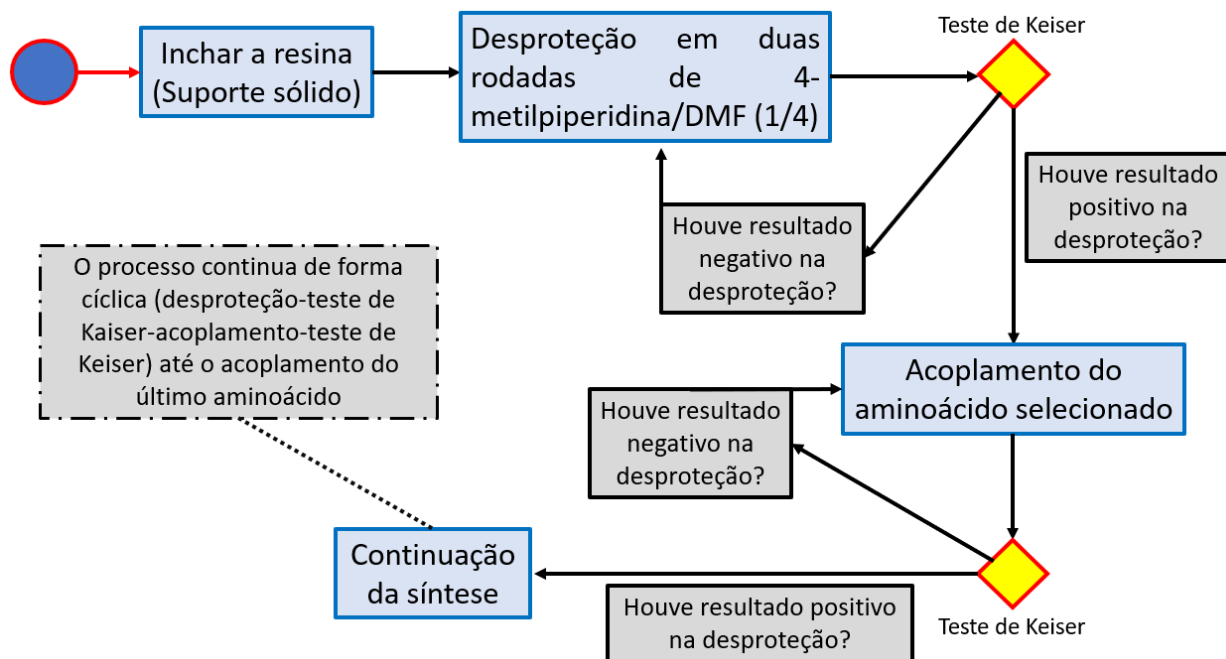


Figura 23: Estrutura do “linker” da resina de Rink ligada a fase polimérica sólida.

A Síntese do peptídeo foi feita seguindo o protocolo de síntese para rendimento de 0,15mmol. Para tal, pesou-se inicialmente uma massa de resina de 215,0 mg para a síntese dos dois peptídeos (grau de substituição de 0,45 mmol.g⁻¹ - Novabiochem® - 100-200 mesh) e em seguida adicionou-se à resina 2,5ml de diclorometano (DCM) para a etapa de solvatação. A mistura ficou sob agitação durante 30 minutos. Após essa etapa, adicionou-se 2,5ml de 4-metilpiperidina (20%) em DMF para a remoção do grupo protetor do “N-terminal” da resina, o meio reacional ficou sob agitação durante 15 minutos, repetiu-se essa etapa mais uma vez para renovar o excesso de 4-metilpiperidina e garantir a saída do grupo protetor. Em seguida, após o procedimento de lavagem com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM), foi feito um teste de Kaiser para a verificação da desproteção. Confirmada a desproteção, passou-se para a etapa de acoplamento do aminoácido da sequência estabelecida. Para o procedimento, pesou-se e adicionou-se a um recipiente do tipo falcon a massa do aminoácido com quatro equivalentes de excesso, a Oxima® (83,5mg), 93µL de DIC e 2ml de DMF. Essa mistura reacional ficou sob agitação durante 1,5h. Transcorrido o tempo de reação, procedeu-se a uma nova etapa de lavagem com DMF e DCM e a um novo teste de Kaiser para a confirmação do acoplamento. Esse procedimento é seguido por uma nova etapa de desproteção, repetindo-se o ciclo de acoplamento até o último aminoácido da sequência estabelecida.

O teste de Kaiser é um teste qualitativo colorimétrico idealizado por Kaiser e usado para testar a presença de grupos amino livres. O teste é simples, rápido e com boa confiabilidade. Para a realização do teste, é recolhida uma amostra de resina, colocada em um recipiente separado e adicionada uma sequência de três reagentes: solução de KCN em piridina, solução de 80% fenol em etanol anidro e uma solução de 5% de ninhidrina em etanol anidro.

Em presença de grupamento amino livre, ocorre uma reação com a ninhidrina formando uma estrutura com ligações duplas conjugadas, tal fato confere uma coloração normalmente azulada à resina indicando de maneira colorimétrica, assim, a presença do grupo amino livre. A coloração da resina é indicada como um resultado positivo, que deve ser obtido em etapas de desproteção ou quando a etapa de acoplamento não ocorreu de maneira adequada, indicando a necessidade de um procedimento de reacoplamento.



Esquema 1: Fluxograma resumido da Síntese em Fase Sólida de Peptídeos.

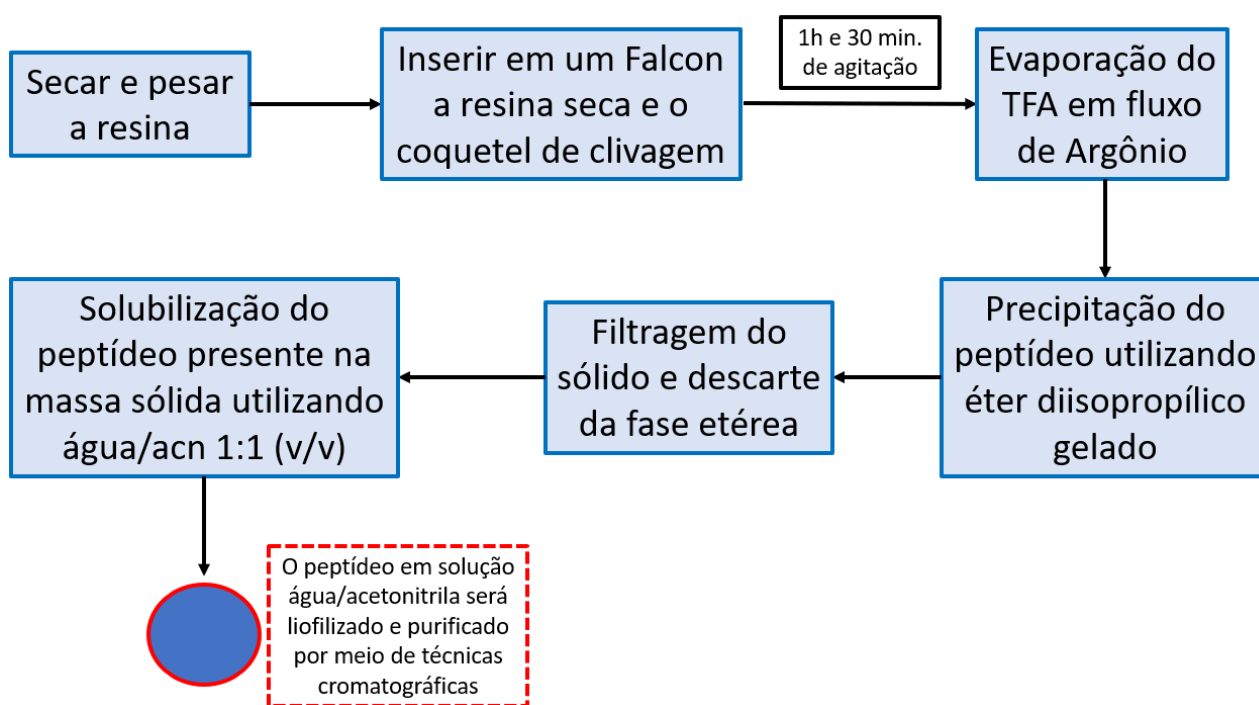
Após o acoplamento e desproteção do último aminoácido, foi feito o procedimento de clivagem da resina para a obtenção do peptídeo bruto, utilizando para tal um “coquetel” de clivagem geral de peptídeos, com ácido trifluoracético (TFA), água, fenol, tioanisol e etanoditiol (82,5:5:5:5:2,5 v/v), totalizando um volume de 10 ml (Tabela 4).

Tabela 4: Tipos de soluções utilizadas na clivagem de peptídeos da resina polimérica e a desproteção simultânea dos grupos funcionais presentes nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos.

Tipos de Aminoácidos nos Peptídeos	“Coquetel de Clivagem”	Tempo de reação
Peptídeos contendo todos os aminoácidos exceto Arg, Cys e Trp desprotegido.	TFA/TIS/Água 95:2.5:2.5 (V/V)	1,5h - 3,0h
Peptídeos contendo todos os aminoácidos exceto Arg e/ou Trp Desprotegido	TFA/TIS/Água/EDT 94:1:2.5:2.5 (V/V)	1,5h - 3,0h

Todos os Peptídeos	TFA/Tioanisol/Água/Fenol/EDT 82.5:5:5:5:2.5 (V/V)	1,5h - 18,0h
--------------------	--	--------------

O procedimento de clivagem (Esquema 2) foi feito colocando a resina seca após a desproteção do último aminoácido em um Falcon de 50 ml e com a adição dos reagentes do “coquetel” geral de clivagem e mistura posta sob agitação durante 1,5h. Após transcorrido o tempo de clivagem, a solução foi purgada com hélio para a remoção do excesso de TFA. Em seguida, foi adicionado diisopropil éter gelado para a precipitação do peptídeo e solubilização dos grupos de proteção de cadeia lateral. Após a precipitação, foi feita uma filtração a vácuo e em seguida uma solubilização do peptídeo com uma solução de água/acetoneitrila (50:50). O peptídeo solubilizado foi submetido a liofilização para a obtenção do peptídeo bruto seco.



Esquema 2: Fluxo de etapas envolvidas na clivagem do peptídeo sintetizado.

3.1.1 Síntese em fase sólida dos peptídeo CHIM3-Y(NMe) e do peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂

O peptídeo CHIM3-Y(NMe), bem como o peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂ são peptídeos modificados quimicamente. Ambos foram sintetizados em fase sólida utilizando o mesmo protocolo de síntese do peptídeo CHIM3, no entanto, o segundo aminoácido a partir do C-terminal também amidado, apresenta um grupo metila (-CH₃) ligado no nitrogênio da ligação amídica. Foi utilizado uma massa de resina Rink, com grau de substituição de 0,62 mMol (Novabiochem® - S7958701 - 100-200 mesh), respectivamente de 242,0 mg e 243,2 mg.

A síntese foi realizada a partir de Fmoc-N-Me-Tyr(tBu)-OH, (Sigma Aldrich – 773174) utilizando para o seu acoplamento, 4 equivalentes de aminoácido, totalizando uma massa de 284,136 mg, juntamente com os costumeiros reagentes de acoplamento DIC e Oxima®. Após a síntese em fase sólida, o último grupamento de proteção Fmoc foi removido com 4-metilpiperidina e o processo de clivagem da resina e desproteção das cadeias laterais foi feita com o coquetel geral de clivagem (TFA/Tioanisola/Água/Fenol/EDT – 82.5:5:5:5:2.5 (V/V)), durante 1,5h. Transcorrido esse tempo, os peptídeos foram precipitados com diisopropileter, filtrados, ressolubilizados em acetonitrila e água MilliQ (50:50) e encaminhados para a liofilização. Após a liofilização, os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência e, em seguida, a fração recolhida da cromatografia foi liofilizada. A caracterização com sequenciamento dos mesmos foram feitos por espectrometria de massa para a confirmação da síntese. Todas essas etapas seguindo os mesmos protocolos utilizados para a síntese do peptídeo CHIM3.

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

Os peptídeos obtidos na síntese em fase sólida, após passado pelo processo de clivagem, pré-purificação por precipitação e filtração, foram então liofilizados para, em seguida, serem purificados por cromatografia para a remoção de subprodutos, resíduos de síntese e clivagem restantes. Para tal, foi utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

O cromatógrafo utilizado é da marca Shimadzu® com sistema de bombeamento binário (LC-20AR), detector de arranjo de diodo (DAD, SPD-M20A), injetor manual e

sistema de análise e processamento de dados LabSolutions versão 5.92. Foi utilizada a coluna preparativa de fase reversa Jupiter C18 (250 x 21,2 mm, 10 μm , 300 Å) da Phenomenex. A fase móvel foi composta por acetonitrila (acn) + 0,1% TFA e água Miliq + 0,1% TFA em um fluxo de 10 mL/min. A solução do peptídeo possuía a concentração de 20 mg.mL⁻¹, sendo injetado 1 mL no aparelho. As corridas tiveram duração de 55 minutos. O método utilizado (Figura 24) para a purificação foi o de gradiente, utilizando os seguintes parâmetros: 0,0 a 5,0 minutos a 5% acetonitrila + TFA (0,1%); de 5,0 a 50,0 minutos com gradiente de 5 a 100% de acetonitrila + TFA (0,1%); de 50 a 55 minutos com gradiente constante a 100% de acetonitrila + TFA (0,1%); de 55 a 60 minutos com gradiente de 100 a 5% de acetonitrila + TFA (0,1%) mantendo isocraticamente nessa concentração até o término da cromatografia em 55 minutos. A corrida cromatográfica foi monitorada entre 200 e 300nm e mais especificamente nos comprimentos de 216 e 280 nm, que são comprimentos de onda que correspondem, respectivamente, à absorção das ligações peptídicas e dos aminoácidos aromáticos como o triptofano (W), a tirosina (Y) e fenilalanina (F), presentes na estrutura primária do peptídeo. A fração correspondente ao peptídeo foi recolhida e encaminhada para a liofilização.

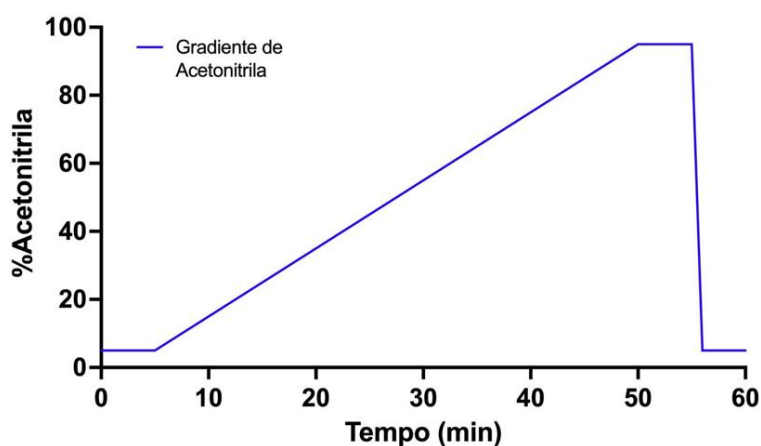


Figura 24: Método utilizado para a purificação dos peptídeos sintetizados em laboratório. Foi utilizado um método de gradiente, começando com 5% de acn (+ 0,1% TFA) durante 5 min., aumentando sua concentração até 100% gradualmente até o tempo de 50min. mantendo essa concentração durante 5min. e novamente retornando a uma concentração de 5% de acn (+ 0,1% TFA) até completar 60min. de corrida cromatográfica.

3.3 Caracterização dos peptídeos por Espectrometria de massa (MS)

Após o processo de purificação por CLAE e posterior liofilização, o peptídeo foi analisado por espectrometria de massa (MS) para a confirmação da sua estrutura primária e correta sequência de aminoácidos. Essa confirmação foi feita utilizando um Espectrômetro de massa do tipo TripleTof 5600+ (Sciex, Ontário, Canadá) por análise por cromatografia líquida (Eksigent UltraLC 100, Sciex). Foi utilizado o modo IDA de aquisição fragmentando íons com massa maior que 400 Da a 1250 Da, com intensidade superior a 1000 cps e moléculas de 1 a 4 cargas positivas, com temperatura da fonte de 500°C. Voltagem da fonte de 5200.00 Volts. Foi utilizado o método de injeção direto das amostras (FIA – Flow Injection Analysis)

O espectro de massa de fragmentação (MS/MS) de algumas moléculas foi obtido usando o MALDI Autoflex Speed TOF/TOF (Bruker Daltonics) operando no modo refletor positivo. Uma mistura de peptídeos foi empregada na calibração externa do espectrômetro (Peptide Calibration Standard IV, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O equipamento foi controlado com o Software Flex Control versão 3.4 e as análises foram realizadas com o Software Flex Analysis (versão 3.4 Build 76, Bruker Daltonics). As massas teóricas foram calculadas usando o Software Isotope Pattern (versão 3.4 Build 76, Bruker Daltonics). As análises foram realizadas a partir de um volume correspondente a 1 µL do peptídeo purificado, na molaridade de 30 pM (solução contendo 5% de acetonitrila em água), misturado com 3 µL de uma solução de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA). A mistura foi adicionada em duplicata diretamente na placa alvo MALDI MTP Ground Steel. Os espectros de fragmentação (MS/MS) foram adquiridos para sequenciamento de peptídeos. A fragmentação dos íons precursores foi realizada por LIFT com pressão da célula de colisão mantida em $3,0 \times 10^{-6}$ torr.

3.3.1 Quantificação dos peptídeos

A quantificação dos peptídeos foi feita por espectrometria na região do UV/VIS, utilizando um espectrofotômetro da marca Shimadzu® (UV-1280) do Núcleo de

Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Para a quantificação, foi feita uma solução com 5 mg do peptídeo em 1 mL de água Miliq, fazendo em seguida uma diluição de 200 vezes, para a obtenção de valores na faixa entre 0,3 e 0,7 UA. A absorbância foi medida utilizando o comprimento de onda de 280 nm que é a faixa de absorção de aminoácidos aromáticos, como alguns presentes na estrutura primária dos peptídeos.

Para o cálculo da concentração do peptídeo, foi calculada a absorvidade molar teórica do peptídeo, levando em consideração sua estrutura primária e a presença de cinco resíduos de aminoácidos aromáticos, sendo eles, dois triptofanos (W), duas fenilalaninas (F) e uma tirosina (Y). Foi calculado o valor de $12490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, para o peptídeo CHIM3 e para o peptídeo CHIM3-Y(NMe), e em $6990 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para os peptídeos WKYM e WK(Y-NMe)M-NH₂, utilizado o ProtParam no site do ExPASy *Bioinformatic Resource Portal* (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>). Como a solução para a mensuração da absorbância foi preparada pesando-se 5mg e dissolvendo em água para se obter 500µL de solução. Dessa solução pegou-se 5µL e diluiu para se obter um volume de 1000 µL, medindo-se então a absorvidade. O valor obtido no espectrofotômetro foi dividido pelo valor teórico calculado e o resultado multiplicado por 200, visto que foi realizada uma diluição inicial de duzentas vezes. O resultado é a concentração molar do peptídeo na solução inicial preparada com a massa de 5 mg.

3.4 Determinação da concentração inibitória mínima dos peptídeos CHIM3 e CHIM3-Y(Me)

O teste de concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado em colaboração com a Universidade Católica de Brasília (UCB) e ao Laboratório de Análises de Biomoléculas (LABM), do programa de pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Para a análise da atividade antimicrobiana do peptídeo CHIM3 e CHIM3-Y(NMe) de acordo com o protocolo M7-A10 do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). A faixa de concentração testada consiste em 128 a 0,25 µM. Para o teste foram incubadas 5×10^5 células.mL⁻¹ de concentração inicial de células bacterianas em meio Mueller-Hinton (MH) (Kasvi). Além do peptídeo testado, foi realizado três tipos de controles:

- 1) Controle positivo com o antibiótico gentamicina na concentração de 20 a 0,039 μM ;
- 2) Controle negativo, que consiste apenas do crescimento dos microrganismos no meio de cultura;
- 3) Controle de esterilidade do meio de cultura.

A incubação foi realizada em uma estufa a 37°C por 24h utilizando bactérias da espécie *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). Após esse período, foi realizada a leitura do teste através da visualização da presença ou não da turvação nos poços. Para a avaliação da concentração microbicida mínima (CMM), 10 μL da concentração do CIM e mais uma concentração acima foram plaqueadas em placas contendo meio MH sólido e incubadas nas mesmas condições para o teste de CIM. Tais testes foram realizados em triplicata.

3.5 Ensaio para medir a tensão de membrana induzida com Di-8-ANEPPS e interação com o peptídeo CHIM3

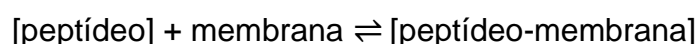
Os impactos nas mudanças no potencial dipolar ($\Delta\Phi$) das membranas plasmáticas devido a interação do peptídeo CHIM3 foram realizadas em colaboração com a Universidade de Lisboa – Portugal, mais especificamente, o Instituto de Medicina Molecular. Essas mudanças no potencial foram monitorados avaliando a mudança no espectro de excitação de Di-8-ANEPPS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Dessa forma, é possível analisar a afinidade do peptídeo pela membrana de forma não invasiva. Foi feita uma suspensão bacteriana de 600 μL , tanto com a *E. coli*, quanto com a *S. aureus*, para uma densidade celular final de $1 \cdot 10^4$ células/ml, padronizando com uma concentração de Di-8-ANEPPS de 100 μM . O tempo de incubação foi de 60 minutos. Após a marcação, o peptídeo foi adicionado e incubado, protegido da luz, por 1h, sob agitação. Transcorrido esse tempo, foi feito uma centrifugação durante 10 minutos a 1000 rpm, descartado o sobrenadante e as células foram ressuspensas em um mesmo volume com tampão PBS. As medidas fluorimétricas foram feitas a partir de uma varredura em λ_{exc} de 380 a 580nm com λ_{em} fixo em 670 nm em um Varian Eclipse (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA).

Mudanças no potencial dipolar das membranas bacterianas causadas pela interação dos peptídeos são traduzidas em alterações do espectro de excitação,

sendo essas alterações relacionadas matematicamente a afinidade/seletividade do peptídeo com a membrana por meio do cálculo da constante de dissociação K_d utilizando a equação 1 abaixo, por meio da razão entre as intensidades nos comprimentos de onda de excitação de 455 e 525 nm ($R = I_{455} / I_{525}$)⁸⁰.

$$\frac{R}{R_0} = \frac{\frac{R_{\min}}{R_0} [P]}{k_d + [P]}$$

Sendo que, quanto maior a afinidade do peptídeo pela membrana, menor será o valor de K_d , já que o $K_d = [\text{peptídeo}] \cdot [\text{membrana}] / [\text{peptídeo-membrana}]$, ou seja, mais o equilíbrio estará deslocado no sentido [peptídeo-membrana].



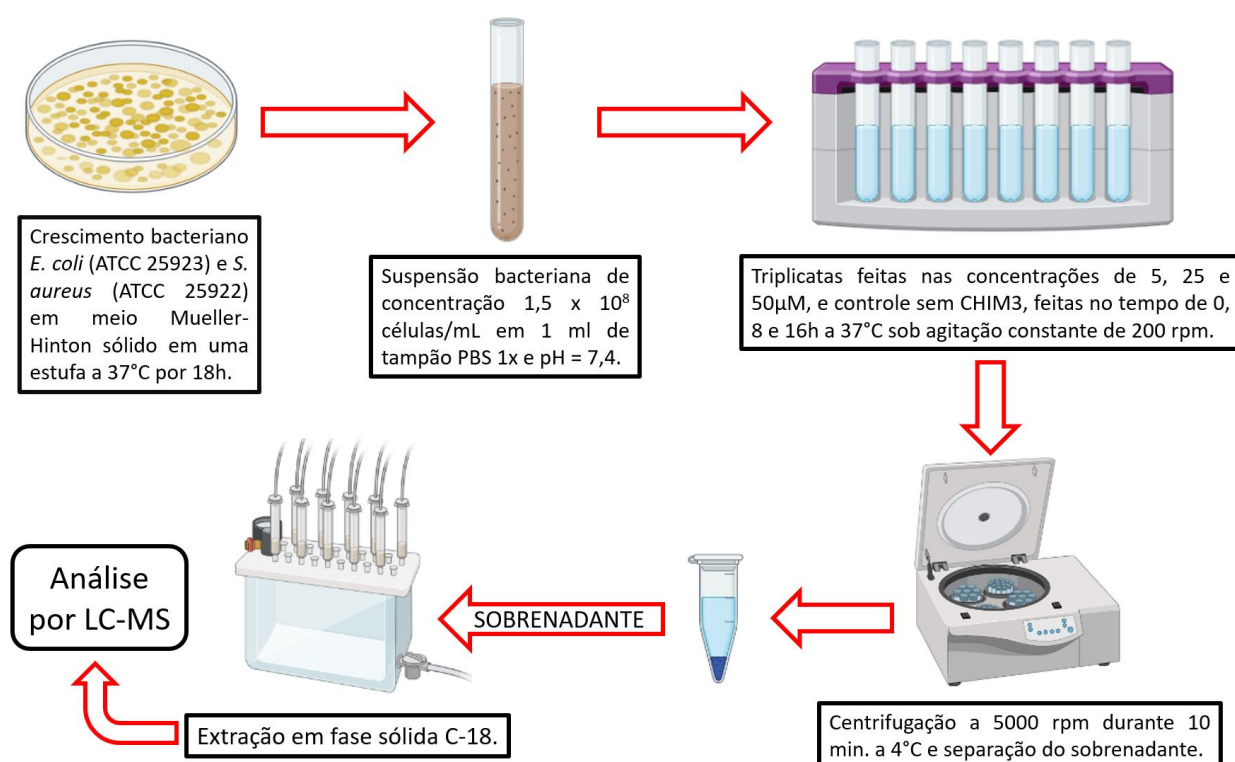
A razão de intensidades nos comprimentos de onda de excitação de 455 e 525 nm ($R = I_{455} / I_{525}$) foi calculado para as diferentes concentrações de peptídeos. O ajuste e formatação da imagem obtida pela equação foi feita utilizando o software GraphPad Prism v9.

3.6. Ensaio de digestão do CHIM3 e CHIM3 - Y(NMe) com bactérias *E. coli* e *S. aureus* com diferentes concentrações.

Os ensaios de digestão foram feitos em colaboração com a Universidade Católica de Brasília (UCB) - Laboratório de Análises de Biomoléculas (LABM), do programa de pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Foram utilizadas bactérias da espécie *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). Para o ensaio, as bactérias foram crescidas em meio Mueller-Hinton sólido em uma estufa a 37°C por 18h, para a obtenção de bactérias com alta atividade metabólica. Após esse período, foi realizada uma suspensão bacteriana, transferindo algumas colônias para um meio em PBS (Phosphate Buffered Saline) a 1x, medindo-se a Densidade

Óptica (OD) para 600nm, para alcançar o equivalente a 1.5×10^8 células/mL, e o pH ajustado para 7,4.

Essa suspensão foi incubada com o peptídeo CHIM3 nas concentrações de 5, 25 e 50 μ M, todos em triplicata, perfazendo um volume de 1ml. A incubação foi feita nos tempos de 0, 8 e 16h a 37°C sob agitação constante a 200 rpm. Transcorrido o tempo de incubação, a suspensão foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 5000 rpm, o sobrenadante foi separado e congelado a -20°C para análises posteriores. O desenho esquemático do experimento está explicado no esquema 3 abaixo.



Esquema 3: Esquema do ensaio biológico de digestão do CHIM3 por *E. coli* e *S. aureus*. Primeiramente, foi realizado o crescimento bacteriano em meio de cultura com ágar. Em seguida, foi feita uma inoculação das duas espécies de bactérias em 1 ml de solução tamponada de PBS a 1X. Após a inoculação, foi feito o ensaio em três concentrações diferentes de CHIM3, 5 μ M, 25 μ M e 50 μ M, todos a 37°C nos tempos de 0, 8 e 16h sob agitação constante a 200 rpm. Transcorrido o tempo do experimento foi feito uma centrifugação a 5000 rpm durante dez minutos para a separação do

sobrenadante, sendo guardado para a pré-purificação por SPE e posterior análise por LC-MS.

Ademais, o controle para este ensaio consistiu-se na incubação da suspensão bacteriana sem adição do peptídeo CHIM3 e CHIM3-Y(NMe) nas mesmas condições citadas acima, também em triplicata.

3.7. Extração em fase sólida (SPE) das frações adquiridas no ensaio de digestão.

O sobrenadante separado do ensaio de digestão dos peptídeos foi submetido a uma extração em fase sólida (SPE, sigla em inglês para solid phase extraction). Os cartuchos da SPE, filtro cartucho SPE STRATA® 100mg/3ml com fase sólida sendo constituída por uma C-18-E (55µm, 70A – 8B-S001-EBL), foram primeiramente preparados com 5 ml de acetonitrila, em seguida com 5 ml de água. Depois de preparados, os cartuchos foram carregados com a amostra do sobrenadante descrito no item anterior e lavado com 3 ml de água. Posteriormente, o retentado foi eluído com 1ml de acetonitrila e congelado a -20°C para posteriormente ser levado para análise de LC-MS.

3.8. Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (LC-MS/MS) da fração eluída na SPE.

Para análise do perfil de hidrólise de CHIM3 e CHIM3-Y(NMe) por bactérias, foi realizada cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa da fração eluída na SPE. Os espectros foram adquiridos em um Q-Tof 5600+ (Sciex, Ontário, Canadá) por análise de injeção de fluxo utilizando um cromatógrafo líquido (Eksigent UltraLC 100, Sciex) do Instituto de Química - UnB. Uma fonte de íons DuoSpray (ESI) foi usada e os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos em modo positivo. Foi utilizado o modo IDA de aquisição fragmentando íons com massa maior que 400 Da a 1250 Da, com intensidade superior a 1000 cps e moléculas de 1 a 4 cargas positivas, com temperatura da fonte de 500°C. Voltagem da fonte de 5200.00 Volts. A coluna utilizada foi da marca KINETEX® (phenomenex®) de 2,6µm, C-18 100 Å com dimensão de 50 x 2,1 mm acomodada em um forno mantido a 40°C.

O gradiente utilizado e o método cromatográfico foi ajustado para priorizar a separação mais eficiente dos fragmentos gerados na digestão. Foi utilizado para a fase móvel Água (Fração A) e Metanol (Fração B) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico e uma vazão de 0,4ml/min. A corrida teve um tempo total de 23 minutos com um gradiente de 0-2 minutos com 5% do solvente B, 2-12 minutos de 5 a 40% do solvente B, 12-16 minutos de 40 a 95% do solvente B, de 16-17 minutos uma diminuição do solvente B de 95% para 5% mantendo essa concentração até o final da corrida (Figura 25). A análise dos dados obtidos no LC-MS para a obtenção das áreas de cada sinal das frações proteicas para uma posterior relação com a concentração de CHIM3 e CHIM3-Y(NMe) foi feita utilizando o Software MultiQuant (<https://sciex.com/products/software/multiquant-software>). A plotagem do gráfico e análise de dados obtidos foi feita utilizando o Software GraphPad Prism 7.04 (<https://www.graphpad.com/>). Os espectros de MS/MS foram plotados com a ajuda do aplicativo online <http://www.interactivepeptidespectralannotator.com/PeptideAnnotator.html>.

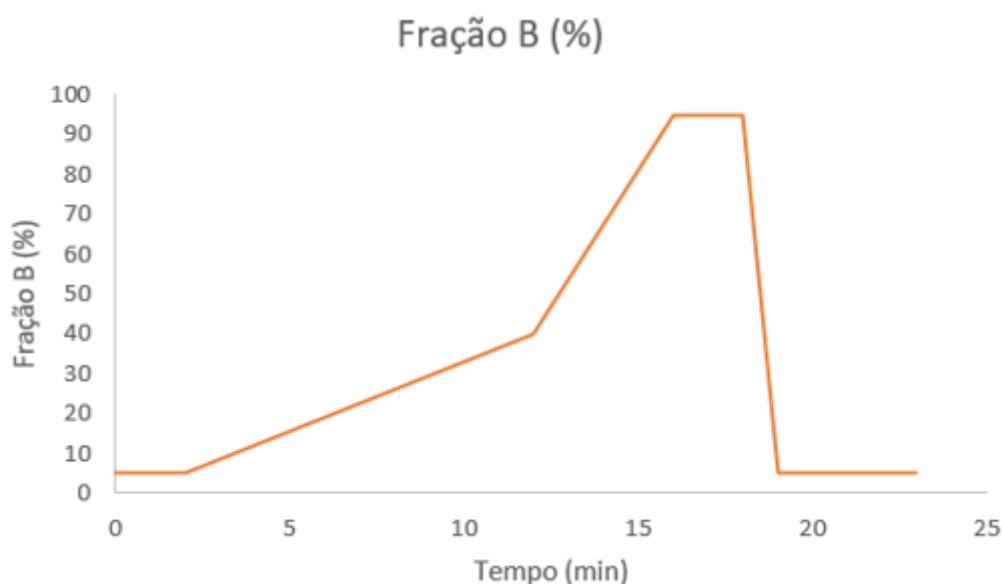


Figura 25: Gradiente utilizado na cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa. O solvente B é a fase móvel orgânica constituída de metanol + 0,1% de ácido fórmico. Gradiente de 0-2 minutos, a 5% de solvente B, 2-12 minutos aumento

do solvente B de 5% para 40%, de 12-16 minutos, aumento do solvente B de 40% para 95%, mantendo essa porcentagem volume/volume até o décimo oitavo minuto e em seguida, de 18-19 minutos, reduzindo a porcentagem do solvente B de 95% para 5% mantendo até o minuto 23, finalizando a corrida cromatográfica.

3.9. Investigação das enzimas de *E. coli* e *S. aureus* com potencial digestão de CHIM3.

A identidade das enzimas que digerem, potencialmente, CHIM3 para as bactérias avaliadas foi obtida pela literatura ou alternativamente pelo website BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/index.php>).

3.10. Ensaios de incubação do CHIM3 com *S. aureus* e *E. coli* com inibidores proteicos.

Para a investigação das enzimas envolvidas nos processos de proteólise dos sítios identificados na digestão do peptídeo CHIM3, foi elaborado um ensaio com inibidores de proteases no geral PIC (sigla em inglês para Coquetel Inibidor de Proteases) (Número de catálogo: P2714), com o objetivo de inibir, indiscriminadamente, as serino, cisteino e metalo proteases (Tabela 5), juntamente com um ensaio com cloreto de magnésio ($MgCl_2$) com concentração de 5mM, o qual já havia sido reportado como um inibidor direcionado a Spase I⁸¹. Os ensaios foram feitos em colaboração com a Universidade Católica de Brasília (UCB) - Laboratório de Análises de Biomoléculas (LABM), do programa de pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Tabela 5: Coquetel inibidor de proteínas utilizado no teste de digestão do peptídeo CHIM3 com *E. coli* e *S. aureus*.

AEBSF – [4-(2-Aminoethyl)Benzenesulfonyl fluoride hydrochloride]	Serino proteases, tripsina, quimotripsina, plasmina, calicreína e trombina.
---	---

Aprotinina	Serino proteases, tripsina, quimotripsina, calicreína, leucócito elastase humana
Bestatina hydrochloride	Amino peptidases, leucina amino peptidase e alanil
E-64 – [N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4- guanidinobutylamide]	Cisteino proteases, calpaina, papaína, catepsina B e L
EDTA	Metalo proteases
Sal de Hemissulfato leupeptina	Serino proteases, cisteino proteases, plasmina, tripsina, papaína e Catepsina B

Tanto os ensaios com o PIC quanto com MgCl₂ foram feitos em triplicata no tempo de 16h, utilizando CHIM3 a 50 µM, repetindo as mesmas condições dos ensaios de digestão para ambas as bactérias.

3.11. Quantificação dos peptídeos WKYM-NH₂ e WK(Y-NMe)M-NH₂ por cromatografia líquida de alta eficiência

Os peptídeos WKYM-NH₂ e WK(Y-NMe)M-NH₂ formados por proteólise de CHIM3 e CHIM3-Y(NMe) nos ensaios com as bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram quantificados pela área nos sinais gerados por cromatografia. Para tal finalidade, primeiramente foi feita uma curva de calibração para o peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂ por com padrões sintetizados, purificados e quantificados, nas concentrações 0 (branco sem peptídeo), 3.125, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 e 100.0 µM por CLAE, utilizando a e a área média sob o pico foi calculada, juntamente com o desvio padrão respectivo de cada pico, feita a regressão linear (Figura 26) e estimado o limite de quantificação, sigla em inglês LOQ, em 3,74 µM.

Tanto a curva, quanto as amostras foram analisadas no cromatógrafo Shimadzu (Japão) com sistema de bombeamento binário (LC-20AR), detector de arranjo de diodo (DAD, SPD-M20A), injetor manual e sistema de análise e processamento de dados LabSolutions versão 5.92 no Laboratório NuPMIA da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Foi utilizada a coluna analítica Vydac 218TP C18 (250 x 4,2 mm, 5 µm). A fase móvel era composta de acetonitrila + 0,1% TFA/água + 0,1% TFA em fluxo de 1 mL.min⁻¹. Essas concentrações foram ajustadas para que o volume de amostra injetado no aparelho fosse de 50 µL. As corridas tiveram duração de 52 minutos, com um gradiente de concentração variado de seguinte perfil: de 0 à 5 min (5% de ACN + TFA); de 5 à 25 min (5 - 95% de ACN + TFA); de 25 à 35 min (95 % de ACN + TFA); de 36 à 37 min (95 - 5% ACN + TFA) e de 37 à 52 min (5% de ACN + TFA). Nos detectores, foram utilizados os comprimentos de onda de 216 nm e 280 nm, para monitoramento do peptídeo, que correspondem ao comprimento de onda de absorção da ligação peptídica e de absorção do anel aromático das cadeias laterais, respectivamente.

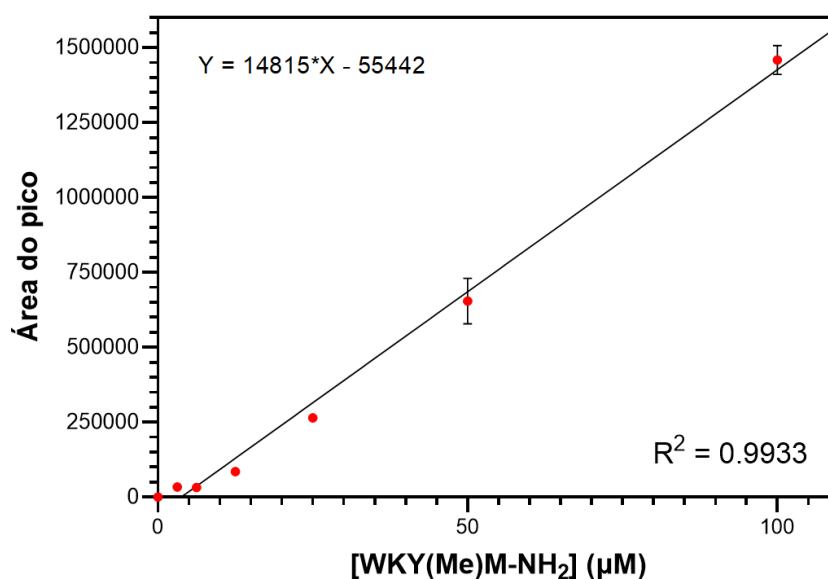


Figura 26: Curva de calibração feita por cromatografia líquida de alta eficiência do peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂ com base na média das áreas dos picos obtidos no cromatograma. As corridas cromatográficas dos padrões foram feitas nas concentrações 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 e 100.0 µM.

Para o peptídeo WKYM-NH₂, foi utilizado uma curva de calibração previamente confeccionada pelo nosso grupo de pesquisa (Anexo I), utilizando os mesmos padrões de injeção, monitoramento, fluxo e gradiente. Em seguida, foi feita a injeção, em triplicata, de frações de digestão das bactérias e calculado a concentração com base na média da área do pico gerado na corrida cromatográfica.

3.12. Design molecular de agonista peptídico para receptor FPR2

A triagem *in silico* do agonista peptídico foi realizada em colaboração com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A análise foi feita importando o arquivo do banco de dados da proteína do receptor FPR2, código: 6LW5, para o software BioLuminate versão 2018-2 (Schrodinger LLC, Nova York). O complexo FPR2-WKYMVm foi relaxado por dinâmica molecular usando um modelo de membrana POPC por 10 ns usando o pacote Desmond na interface BioLuminate, configurando classe de conjunto em NPT, 300 K de temperatura e 1 bar de pressão. Após 10ns de simulação, o último quadro foi exportado e a mutação pontual na sequência WKYMVm foi realizada para obter WKYM e WK(Y-NMe)M-NH₂ e outras dinâmicas moleculares foram realizadas conforme descrito acima. A varredura de resíduos também foi empregada definindo a mutação de resíduos para P,A,L,V,W no resíduo W1, M,S,Q,T,N,H no resíduo M4 e Q,V,N,S,T,H no resíduo V5. As mutações foram selecionadas para síntese com base no melhor equilíbrio entre afinidade delta, estabilidade e sistema.

3.13. Ensaios de MTT para se determinar a viabilidade celular de BMDM tratados com WK(Y-NMe)M-NH₂

Para a determinação da viabilidade celular, foram feitos ensaios de MTT ((3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo) utilizando células de BMDM em colaboração com o Laboratório de Imunologia e Inflamação, do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB) Para este experimento, as células foram plaqueadas em placa de cultura de 96 poços, tratadas por 24 horas com cada peptídeo em diferentes concentrações (0,1 µM, 1 µM e 10 µM). Após os tempos de estímulo, o sobrenadante foi substituído por uma solução de 10% de reagente MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo) (Sigma-Aldrich, USA) 5mg/mL

diluído no próprio meio de cultura celular. Em seguida, a placa foi incubada por 4h protegida da luz na estufa com 5% de CO₂. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan formados foram diluídos em 100µL de DMSO. A absorbância lida foi de 570nm no espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA). Para o cálculo da viabilidade, as células não estimuladas foram consideradas como 100% viáveis e os demais estímulos foram calculados proporcionalmente.

3.14. Ensaios para estimulação de células BMDM e dosagem da citocina TNF- α

Os ensaios de estimulação foram feitos em colaboração com o Laboratório de Imunologia e Inflamação, do Instituto de Biologia (IB) da Universidade de Brasília (UnB). As células BMDM depois de diferenciadas e plaqueadas foram estimuladas pelo peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂ nas concentrações de 0,1; 1,0 e 10,0µM. Após o período de 24 horas, a citocina TNF- α , proveniente do sobrenadante livre de células foram analisados pelo método de enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), utilizando-se kits comerciais (eBioscience e R&D System). O ensaio foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante e os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL). A absorbância foi lida a 570nm no espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA). Para o ensaio, ainda foi utilizado o inibidor WRW4 (WRWWWW-NH₂), antagonista de FPR2, na concentração de 10 µM.

4. Resultado e Discussão

4.1. Síntese em fase sólida, purificação por CLAE e caracterização por Espectrometria de Massa (EM) do peptídeo CHIM3

A síntese do peptídeo CHIM3 (KWAVKIIRKFIKGFISGPGANAAQHKRWKYM-NH₂) foi feita a partir da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida utilizando a química Fmoc/tBu. A síntese procedeu de maneira normal até o vigésimo quarto aminoácido (Arginina), quando foram encontradas dificuldades para o acoplamento dos resíduos subsequentes. Isso foi evidenciado pelo teste de Kaiser, que apresentava grãos totalmente translúcidos, com coloração azulada intensa ou semi-translúcidos, indicando a presença de grupamentos amino livres e um baixo rendimento de acoplamento. Os aminoácidos que apresentaram esse problema foram reacoplados. Esse método possibilita que o rendimento de síntese do peptídeo não diminua significativamente e que não ocorra a formação de cadeias peptídicas com um aminoácido de diferença, o que poderia dificultar a etapa de purificação.

Para o procedimento de reacoplamento, pesou-se novamente o aminoácido correspondente, com um acréscimo de 10% no seu excesso, juntamente com a resina, as mesmas quantidades dos reagentes de acoplamento (DIC e Oxima[®]), surfactante não iônico Triton[®] X-100 (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n), tudo solubilizado e homogeneizado em 2 ml de DMF e colocado novamente para reagir sob agitação constante durante 1:30h. A adição do surfactante Triton[®] X-100 teve como objetivo tornar disponível os sítios de acoplamento (aminas livres) que, por vezes, se internalizam e não acoplam com o próximo aminoácido.

Com exceção do vigésimo quarto resíduo, que teve de ser reacoplado quatro vezes, todos os outros da sequência até o término do peptídeo passaram por um procedimento de reacoplamento, sendo sempre confirmados pelo teste de Kaiser. Essa dificuldade no acoplamento é provavelmente causada pelo impedimento estérico ocasionado pelos volumosos grupos de proteção da cadeia lateral dos aminoácidos ou por conta do tamanho da cadeia peptídica que possivelmente ocasionou a internalização dos pontos de acoplamento. Dificuldades superadas com a adição do surfactante e o aumento em 10% na proporção dos aminoácidos a serem acoplados.

Após o acoplamento e desproteção do último aminoácido da sequência, passou-se para a etapa final de clivagem da resina e desproteção geral das cadeias laterais dos aminoácidos. Após precipitação com 50ml de diisopropil éter gelado, o tubo Falcon contendo peptídeo clivado foi colocado em repouso por 10 minutos no congelador. Após esse tempo foi feita uma filtração e descartado o filtrado. A massa restante retida no filtro, correspondente à resina e ao peptídeo livre, foi tratada com uma solução de água e acetonitrila (50:50) para a solubilização do peptídeo, sendo o filtrado levado a liofilização. Após a etapa de liofilização, foi obtido um sólido fino e branco correspondente ao CHIM3 impuro com massa de 198,5mg.

O peptídeo foi purificado por CLAE no método preparativo. O cromatograma obtido apresentou um sinal intenso (>2000 m(a.u.)) com tempo de retenção de aproximadamente 24,9 minutos, sendo coletado logo após a subida do sinal em 23,5 minutos e até a região anterior a base descendente do sinal em 25,6 minutos (Figura 27 - A). Pode-se observar ainda que os outros picos, fora o relativo ao CHIM3, presentes no cromatograma são poucos e de baixa intensidade, indicando que o peptídeo já se apresenta um bom grau de pureza, demonstrando ainda que a síntese química gerou poucos subprodutos.

O material coletado foi posteriormente caracterizado por espectrometria de massa (MS e MS/MS) confirmando a massa e a sequência do peptídeo CHIM3. A massa obtida por MS, com predominância do CHIM3 com tripla carga $[M+3H]^{3+} = 1210.3641$ Da, está em concordância com a massa monoisotópica teórica calculada de $[M+3H]^{3+} = 1210.3613$ Da (erro = 2,31 ppm) que pode ser observado na série isotópica na Figura 27 - B.

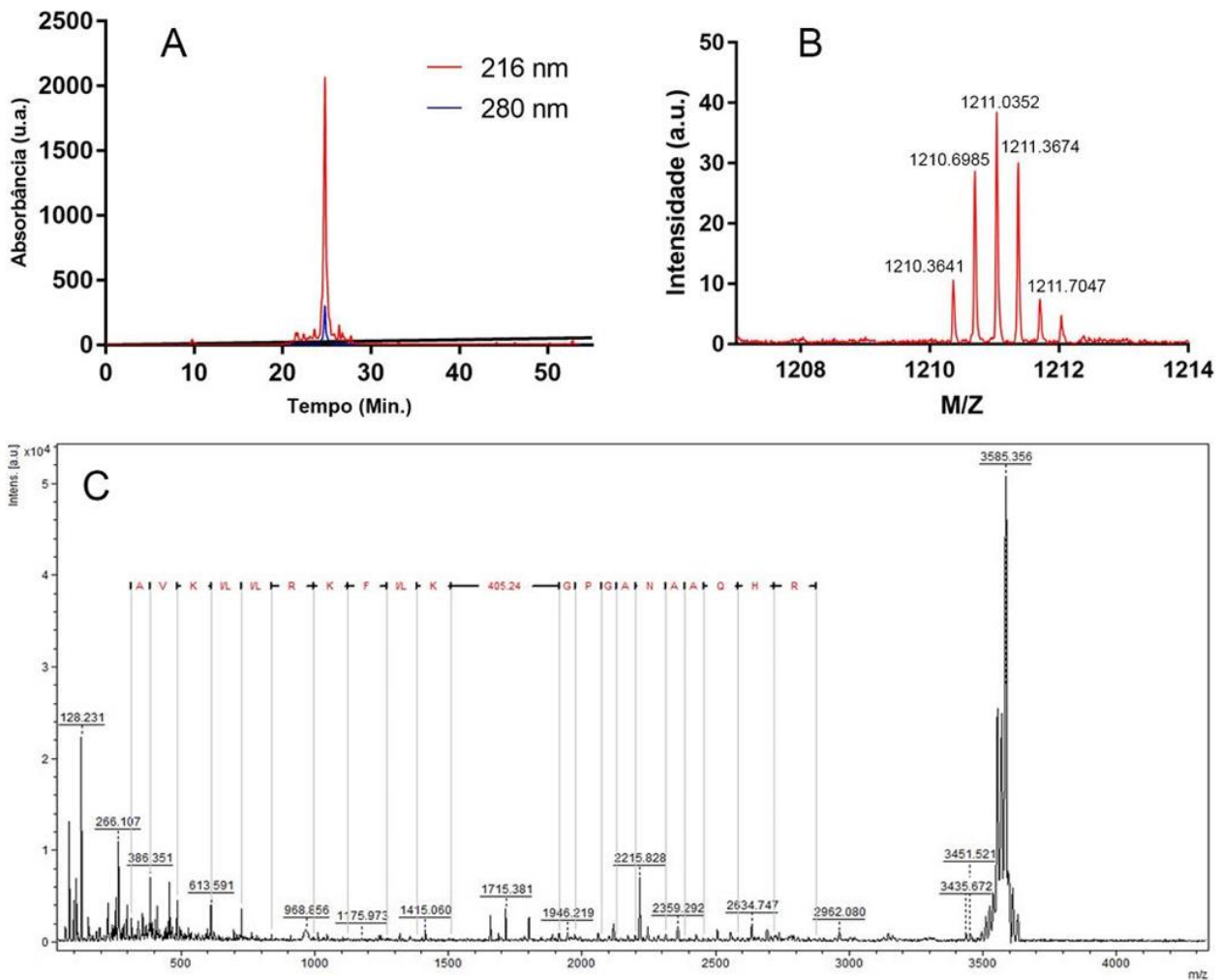


Figura 27: Purificação e caracterização do CHIM3. **A)** Cromatograma com monitoramento em dois comprimentos de onda: 216 e 280 nm onde o peptídeo apresentou um tempo de retenção de aproximadamente 24,9 minutos com uma concentração de aproximadamente 50% de acetonitrila. Pelo cromatograma pode-se inferir a presença de poucas impurezas sendo o CHIM3 com sinal significativamente predominante. **B)** Espectro de MS do CHIM3 referente ao peptídeo com tripla carga positiva ($[M+3H]^{3+}$) e sua série isotópica. **C)** Espectro de MS/MS e sequenciamento do CHIM3 utilizando para a confirmação da série -b de sua estrutura primária obtido por MALDI-TOF MS.

O íon precursor foi fragmentado gerando um espectro de MS/MS, em uma análise separada, feita por MALDI TOF/TOF e a estrutura primária do peptídeo foi parcialmente assinalada (Figura 27 - C). Para isso, foi feito o sequenciamento utilizando os íons gerados nas fragmentações provenientes da quebra das ligações peptídicas. Essas ligações são fragilizadas pela mobilidade dos prótons que

desestabilizam o esqueleto peptídico⁸². A diferença de massa entre os íons detectados pode fornecer a estrutura primária dos peptídeos.

No espectro de MS/MS obtido do CHIM3 foi possível realizar o sequenciamento parcial de sua estrutura primária e confirmar que a síntese do peptídeo foi feita com os aminoácidos na sequência pré-estabelecida. Nota-se que alguns fragmentos não possuem intensidade suficiente para propiciarem o sequenciamento, como é o caso da região referente à sequência GFIS. No entanto, o espectro nos permite concluir que o peptídeo foi sintetizado corretamente, algo que será extensamente verificado após experimentos de hidrólise dessa molécula por bactérias.

Após a purificação e confirmação da estrutura primária, o peptídeo foi quantificado por UV-vis, utilizando como base o cálculo do valor teórico de absorvância molar do CHIM3, calculado pelo ProtParam no site do ExPASy *Bioinformatic Resource Portal*. Para isso, foi levado em conta, na sua estrutura primária, os aminoácidos aromáticos: dois triptofanos (W), duas fenilalaninas (F) e uma tirosina (Y), onde a absorvância molar teórica foi calculada no valor de 12490 M⁻¹cm⁻¹. A absorvância a 280nm obtida pela análise espectrofotométrica foi dividida pelo valor teórico calculado e o resultado multiplicado por 200, levando em consideração a diluição inicial e então a concentração do peptídeo na massa de 5 mg. Foi obtida uma concentração de 1080 µM.

Para se determinar o rendimento teórico da síntese (R_t) foi feito o seguinte cálculo:

$$R_t = \text{massa da resina (g). substituição. M. M. do peptídeo}$$

Como foram utilizados 215mg (0,215g) de resina, com grau de substituição de 0,69 mMol (0,69.10⁻³ Mol) e a massa do peptídeo é 3628,0604 g/Mol, temos um rendimento teórico de 0,351g ou 351mg. Com base na massa calculada, podemos calcular o rendimento bruto frente ao teórico, dividindo a massa do peptídeo obtido, em gramas pela massa de rendimento teórico multiplicado por 100%, obtendo um rendimento bruto de 56,55%.

Para o cálculo do rendimento após a purificação, é necessário calcular a pureza do peptídeo após a purificação, que pode ser feito a partir dos dados obtidos por UV-vis. Como foi calculada uma concentração de 1080 µM na solução preparada com 5mg do peptídeo purificado, temos que a massa, em gramas de peptídeo é

simplesmente a concentração em quantidade de matéria x massa molar, chegando a um resultado de 3,94mg em 5mg e um rendimento final, pós-purificação de 27,66%.

Após a síntese e caracterização do peptídeo CHIM3 foram feitos testes de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM). Teste de fundamental importância para nortear a concentração mais adequada para tratar o crescimento bacteriano.

4.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (CMM) do peptídeo CHIM3

A concentração inibitória mínima para o peptídeo CHIM3 contra bactérias foi realizada seguindo protocolo M7-A10 da CLSI. O teste foi feito em caldo em uma faixa de concentração variando de 128 a 0,25 μ M com *S. aureus* e *E. coli* incubadas a 37°C por 24h em uma concentração inicial de 5x10⁵ células.mL⁻¹. Foram usados três controles diferentes: Controle positivo com o antibiótico gentamicina na concentração de 20 a 0,039 uM; Controle negativo, que consiste apenas do crescimento dos microrganismos no meio de cultura; Controle de esterilidade do meio de cultura. Após transcorrido o período de incubação, foi realizada a inspeção visual da turbidez dos poços.

Para a avaliação da concentração microbicida mínima (CMM), 10 μ L da concentração do CIM e mais uma concentração acima, foram plaqueadas em meio Mueller-Hinton ágar e incubadas nas mesmas condições para o teste de CIM. Tais testes foram realizados em triplicata.

Os resultados obtidos tanto dos testes de CIM quanto CMM estão apresentados, respectivamente, nas tabelas 6 e 7, em seguida. Na tabela 6 ainda está compilado os dados de CIM de outros peptídeos antimicrobianos já catalogados bem como o antibiótico Ampicilina, que foram dados extraídos da literatura testados pelo mesmo grupo.

Tabela 6: Resultados de concentração inibitória mínima (CIM).

	<i>S. aureus</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 25923
CHIM3	4 $\mu\text{M} \pm 0$	5,33 $\mu\text{M} \pm 1,89$
CHIM2 ²	4 $\mu\text{M} \pm 0$	3.33 $\mu\text{M} \pm 0.94$
Gentamicina	0,078 $\mu\text{M} \pm 0$	0, 31 $\mu\text{M} \pm 0$
Hs02 ⁵⁶	1,0 $\mu\text{M} \pm 0,0$	2,0 $\mu\text{M} \pm 0$
Asc-08 ⁸³	1,67 $\mu\text{M} \pm 0,57$	2,0 $\mu\text{M} \pm 0$
Ds 01 ⁸³	8,0 $\mu\text{M} \pm 0,0$	1,0 $\mu\text{M} \pm 0$
Ampicilina ⁸³	5,38 $\mu\text{M} \pm 0,0$	10,77 $\mu\text{M} \pm 0$

Tabela 7: Concentração microbicida mínima (CMM).

	<i>S. aureus</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 25923
CHIM3	6,67 $\mu\text{M} \pm 1,89$	5,33 $\mu\text{M} \pm 1,89$
CHIM2 ²	8.00 $\mu\text{M} \pm 5.66$	8 $\mu\text{M} \pm 0$
Gentamicina	0,234 $\mu\text{M} \pm 0,078$	0,31 $\mu\text{M} \pm 0$
Hs02 ⁷⁵	4.1 $\mu\text{M} \pm 0^{56}$	2,0 $\mu\text{M} \pm 0^{56}$

Os dados obtidos para o CHIM3 mostram que a CIM foi mais elevada que aquela obtida para o peptídeo Hs02. Essa perda de potência deve ser decorrente da extensão da cadeia polipeptídica e da modificação Arg6Lys, já que são essas as diferenças entre essas moléculas. Como a porção C-terminal de CHIM3, a princípio, não contribui para sua interação com membranas, e assim, com sua atividade antimicrobiana, essa perda de potência em relação a Hs02 é justificável. Entretanto, CHIM3 é ainda um potente agente antimicrobiano, o que permite concluir que extensões C-terminais em Hs02 são toleradas e não ocasionam perdas dramáticas em potência antimicrobiana. Além disso, o CHIM3 apresentou valores de CIM e CMM equivalentes ao CHIM2². Isso indica que a extensão no C-terminal na estrutura do CHIM3 não modificou de maneira significativa a atividade antimicrobiana, quando comparado a CHIM2. CHIM3 pode ser comparado ainda a outros peptídeos antimicrobianos descritos na literatura, como o Asc-08 e o Ds01, peptídeos naturais presente na pele de anfíbios⁸⁴. Comparado ao peptídeo Asc-08, o CHIM3 se mostrou

menos potente tanto para a bactéria *S. aureus* quanto para a *E. coli*. Todavia, se mostrou mais eficiente contra a bactéria *S. aureus* que o AMP Ds01, um peptídeo de 29 resíduos que mostrou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas⁸⁴. Mesmo o CHIM3 tendo um potencial antimicrobiano levemente reduzido em relação ao Hs02, conserva ainda sua atividade bactericida, provavelmente por lise, possuindo valores de CMM muito próximos ao de CIM (Tabela 7).

Uma vez constatada a potente atividade antimicrobiana de CHIM3 contra ambas as bactérias avaliadas, pode-se agora investigar o acúmulo desse peptídeo na membrana desses microrganismos.

4.3. Acúmulo de CHIM3 nas membranas de *E. coli* e *S. aureus* por meio de experimentos utilizando o marcador fluorescente di-8-ANEPPS

A estrutura do peptídeo CHIM3 foi projetada de tal modo que ocorresse a adsorção na membrana bacteriana. Esse acúmulo preferencial pode ser usado para provocar a hidrólise pelas enzimas da própria membrana bacteriana, liberando a porção WKYM-NH₂, além de ter uma atividade direta antimicrobiana. Essa interação entre peptídeo e membrana pode ser mensurada utilizando o marcador fluorescente Di-8-ANEPPS. Essa afinidade do peptídeo CHIM3 com a membrana, expressa pelo K_d (constante de dissociação) é calculada com base na razão entre as intensidades de excitação de Di-8-ANEPPS, com e sem a presença de peptídeo (R/R_0) relacionado a concentração do peptídeo incubado (Figura 28).

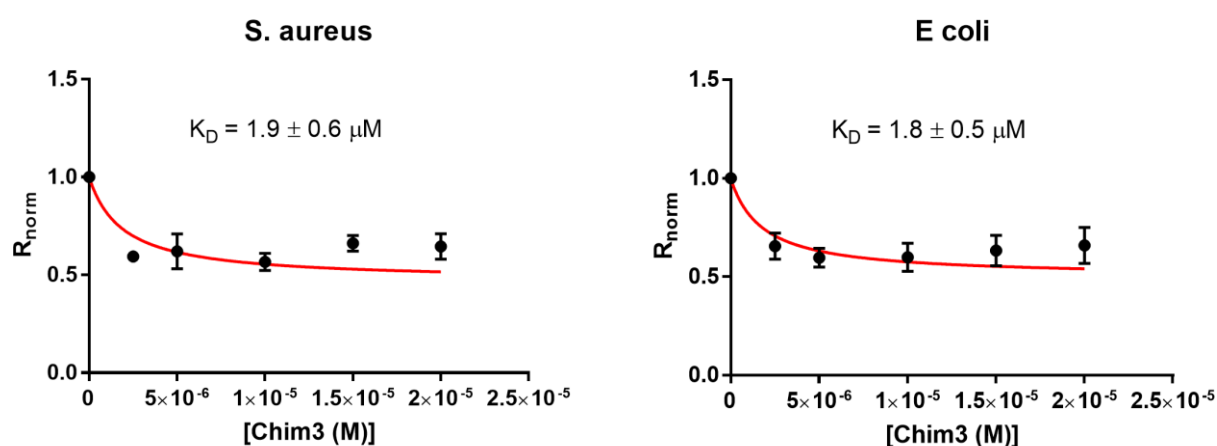


Figura 28: Relação entre as intensidades de excitação ($R_{\text{norm}} = R/R_0$) pela concentração de peptídeo CHIM3 nas duas bactérias avaliadas. Observa-se uma diminuição no valor de R_{norm} com o aumento da concentração de CHIM3, tanto para *S. aureus* quanto para *E. coli* até uma concentração de CHIM3 de aproximadamente 1.10^{-5} M, obtendo um valor aparente de K_d , respectivamente de $1,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$ e $1,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$.

Como já esperado, ocorreu uma diminuição do valor de R_{norm} (R/R_0) com o aumento da concentração de peptídeo até uma concentração de aproximadamente 1.10^{-5} μM . Após essa concentração, os valores de R_{norm} permaneceram aproximadamente constantes, indicando uma saturação da membrana bacteriana pelo peptídeo e um valor máximo da concentração [peptídeo-membrana], ou seja, é possível atingir a quantidade máxima do peptídeo associado a membrana em concentrações relativamente baixas de 1.10^{-5} M, para ambas as bactérias, refletindo em valores semelhantes de K_d (da ordem de 1,8 a 1,9 μM). Essa constante de dissociação aponta uma boa interação entre o peptídeo e a membrana bacteriana, tanto nas Gram – negativas quanto em Gram – positivas, quando comparado com outros peptídeos já publicados, como no trabalho de Makowski e colaboradores⁸⁵, obtendo o valor de $1,7 \pm 0,49 \mu\text{M}$ ou ainda no trabalho de Felício e colaboradores⁸⁶ de $1.88 \pm 0.28 \mu\text{M}$, ambos para a bactéria *E. Coli*.

Identificada a adsorção de CHIM3 na membrana das bactérias avaliadas, ainda se faz necessário que ocorra a proteólise nas regiões racionalizadas previamente e a liberação dos fragmentos quimioatrativos do sistema imune em um meio relativamente complexo.

4.4. Ensaios de digestão do peptídeo CHIM3 após incubação com *E. coli* e *S. aureus*.

Para os ensaios de hidrólise do peptídeo CHIM3 por *E. coli* e *S. aureus*, primeiramente foi feito o crescimento bacteriano em meio Mueller-Hinton com posterior transferência das bactérias para 1 ml de solução PBS a 1M, até atingir uma concentração bacteriana de $1,5 \times 10^8$ células/mL (0,5 Mc Farland). O CHIM3 foi adicionado em triplicata, com três concentrações diferentes de peptídeo: 5 μM , 25 μM

e 50µM, com incubação a 37°C durante 0, 8 e 16h sob agitação a 200 rpm. Como ilustrado no esquema 3.

O experimento de hidrólise bacteriana de CHIM3 foi elaborado dessa maneira para simplificar a matriz de ação do peptídeo e facilitar a identificação posterior dos fragmentos gerados pela proteólise. Por tal motivo, foi feita a transferência das cepas bacterianas para uma solução tamponada de PBS, um meio significativamente mais simples que o meio Mueller-Hinton. Após a centrifugação para a separação do sobrenadante, foi feita uma pré-purificação utilizando uma Extração em Fase Sólida (SPE, C18) e, das amostras eluídas, foi feita uma análise por cromatografia líquida acoplada a um espectrometro de massa (LC-MS) utilizando uma coluna de fase reversa C-18. No geral, foram feitos, para cada bactéria, ensaios em triplicata para as concentrações de 0, 5, 25 e 50 µM de CHIM3 e mais três replicatas de controle, para cada tempo testado (0, 8 e 16h), contendo somente bactérias mas sem a adição do peptídeo.

4.5. Fragmentos de proteólise obtidos no ensaio de digestão do CHIM3 pelas bactérias *E. coli* e *S. aureus* analisados por LC-MS

As amostras de sobrenadante resultantes da incubação de CHIM3 com *E. coli* e *S. aureus* foram submetidas a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS) operando em modo positivo e utilizando o método de aquisição IDA (Independent Data Acquisition). Após aquisição de dados, os espectros de MS/MS obtidos foram avaliados manualmente para verificação de sua natureza química (se eram provenientes de peptídeos) e assinalamento de sua estrutura primária. Foram usados como referência os dados de CHIM3 a 50uM incubado com *E.coli*, já que essa condição resultou em maior número de peptídeos identificados. Os mesmos íons, identificados nessa amostra, foram depois buscados nas demais análises e também na amostra de CHIM3 incubada com *S. aureus*.

É possível afirmar que CHIM3 sofreu uma intensa atividade proteolítica, sendo essa mais pronunciada para a bactéria *E. coli* do que para *S. aureus*. Percebe-se pelos fragmentos gerados atividade proteolítica do tipo tripsina (trypsin-like) evidenciada pela presença de fragmentos resultantes da digestão na porção C-terminal de resíduos básicos (K e R), como por exemplo: K↓YM-NH₂ (encontrado em *E. coli*) e -R↓WKYM-NH₂ (encontrado em *E. coli* e em *S. aureus*). Além disso, foram

detectados fragmentos cuja hidrólise ocorreu na porção C-terminal de resíduos hidrofóbicos e volumosos, compatível então com atividade do tipo quimotripsina (chymotrypsin-like), como por exemplo -F↓ISGPGANAAQH (encontrado em *E. coli*). É possível inferir também a presença de aminopeptidases e carboxipeptidases⁸⁷, enzimas naturalmente expressas por essas bactérias e que clivam ligações peptídicas na extremidade amino- ou carboxi-terminal, respectivamente. Como exemplo, infere-se a possível presença da metaloprotease Alanina Carboxipeptidase⁸⁷, que cliva aminoácido do tipo alanina na porção carboxi-terminal dos peptídeos, compatível com a presença de um dos fragmentos encontrados: FIKGFISGPGAN↓A.

Alguns dos segmentos identificados por LC-MS nestas amostras estão aqui apresentados como forma de ilustração dos dados. O fragmento WKYM-NH₂, proveniente da ação de enzima do tipo tripsina (trypsin-like) diretamente em CHIM3, ou em fragmentos deste, teve um tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos (Figura 29 - A), com massa [M+H]⁺ = 626.3118 Da (Figura 29 - D). O fragmento YM-NH₂, compatível com os dois resíduos C-terminais de CHIM3, foi encontrado em dois tempos de retenção, mostrando um sinal intenso em aproximadamente 2 minutos e um pequeno sinal ao final da cromatografia, em aproximadamente 15,5 minutos (Figura 29 - B). Esse fragmento apresentou [M+H]⁺ = 312.1374 Da (Figura 29 - E), e a identidade deste foi confirmada pelo espectro de MS/MS somente no íon de menor retenção cromatográfica. Foi também possível detectar um fragmento resultante de uma clivagem interna dupla em CHIM3. Este é advindo de uma hidrólise do tipo trypsin-like, após aminoácidos di-básicos -KR-, e de uma segunda hidrólise na ligação ANA↓A, resultando no fragmento FIKGFISGPGANA. Este teve tempo de retenção de aproximadamente 17,5 minutos (Figura 29 - C), sendo identificado com a massa de sua dupla carga: [M+2H]²⁺ = 639.8449 Da (Figura 29 - F), já que a diferença entre seus sinais monoisotópicos é de 0.5.

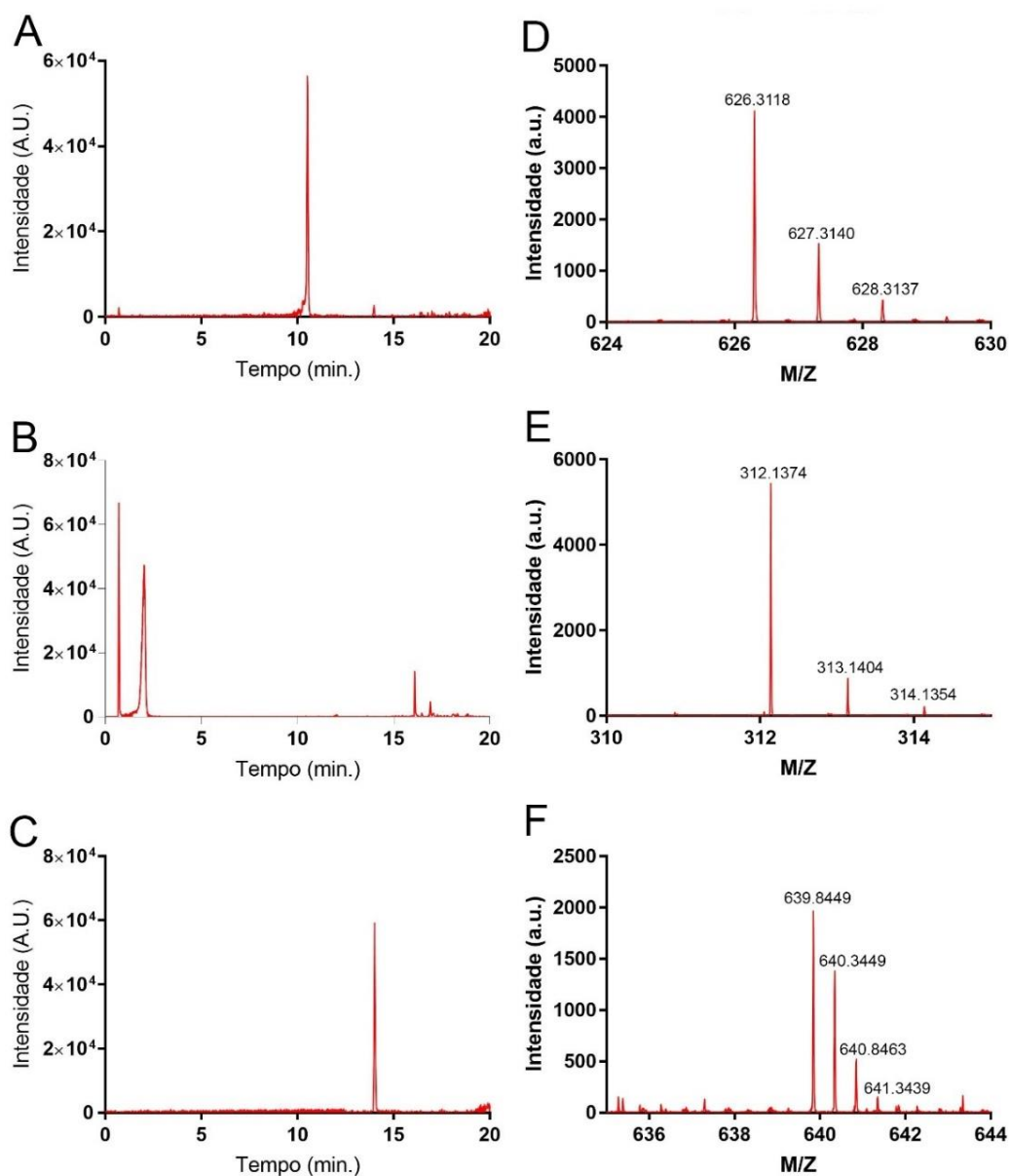


Figura 29: Cromatogramas de íon extraído, XICs (coluna da esquerda) e espectros de MS (Coluna da direita), respectivamente, dos fragmentos WKYM-NH₂, YM-NH₂ e FIKGFISGPGANA de CHIM3. **A)** Cromatograma do WKYM-NH₂ mostrando um tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos, eluindo em uma região com aproximadamente 30% de metanol. **B)** Cromatograma do fragmento YM-NH₂, eluindo em dois tempos diferentes, aproximadamente 2 minutos e um pequeno sinal ao final do cromatograma, em aproximadamente 15,5 minutos. **C)** Cromatograma do segmento FIKGFISGPGANA, com tempo de retenção de aproximadamente 17,5 minutos, eluindo em uma região com maior concentração de metanol. **D)** Espectro de MS referente ao segmentos agonista de FPR2, encontrado com uma massa de

$[M+H]^+ = 626.3118$ Da e sua série isotópica. **E)** Espectro de massa referente ao YM-NH₂ com massa de $[M+H]^+ = 312.1374$ Da. **F)** Espectro de massa do fragmento FIKGFISGPGANA, encontrado como dupla carga com massa $[M+2H]^{2+} = 639.8449$ Da. Todos os dados são referente a 50 µM de CHIM3 incubada com *E. coli* por 16h.

Os espectros de MS/MS dos fragmentos de CHIM3 em destaque na figura anterior foram submetidos ao sequenciamento manual (Figura 30) para a confirmação de sua estrutura primária. O sequenciamento das estruturas pode ser feito tanto pelos íons da série -b, que se mostraram intensos no espectro de fragmentação, quanto pelos íons da série -y.

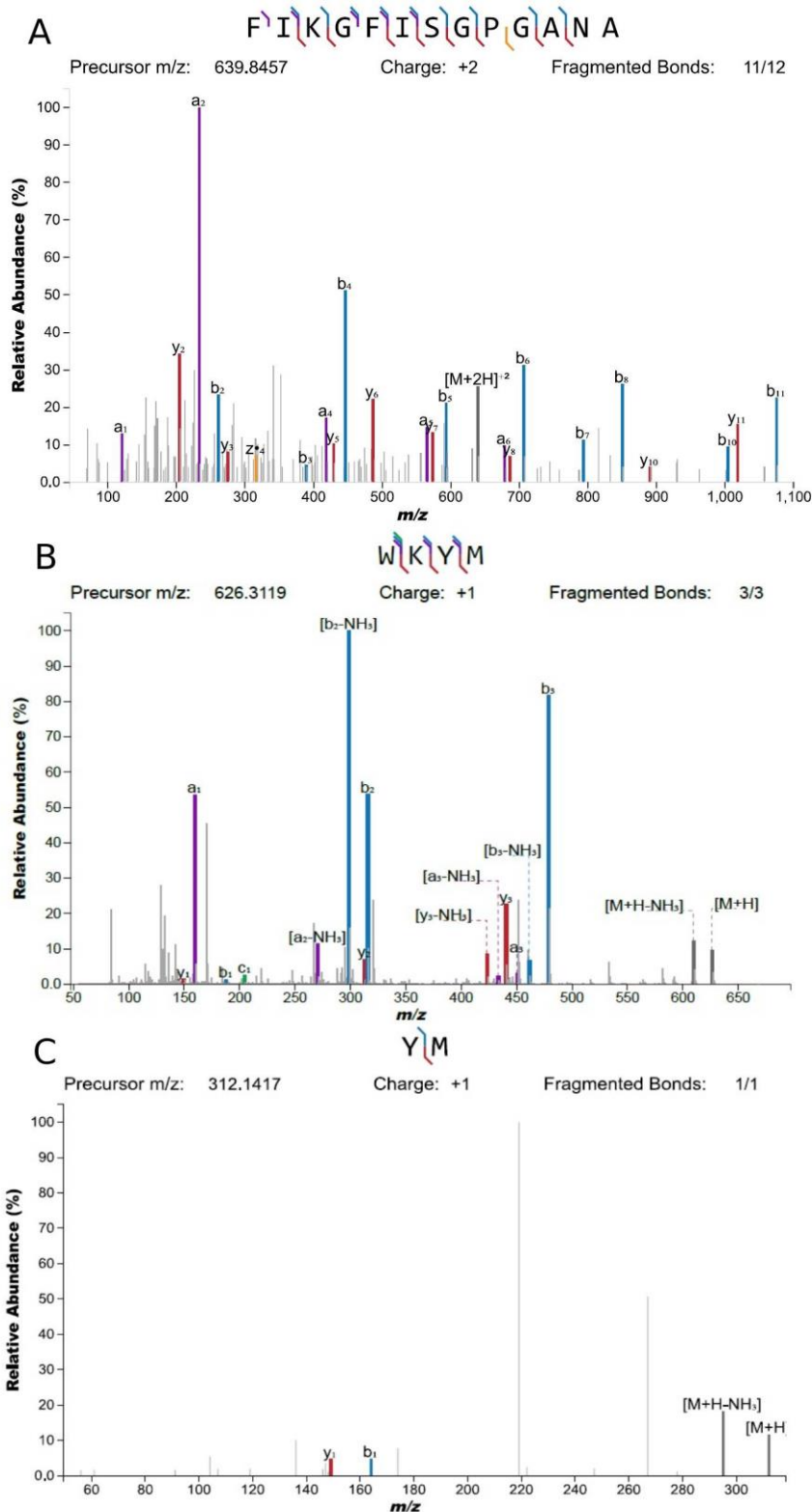


Figura 30: Sequenciamento dos íons relativos aos fragmentos de CHIM3, WKYM-NH₂, YM-NH₂ e FIKGFISGPGANA encontrados por LC-MS. A sequência de resíduos foi determinada por sequenciamento manual e suas estruturas primárias confirmadas nos espectros de MS/MS.

A relação entre o fragmento encontrado no LC-MS e a estrutura original do peptídeo foi útil na identificação dos sítios de proteólise em CHIM3 e ainda no estabelecimento das possíveis enzimas que podem ter sido responsáveis pela atividade proteolítica. Os fragmentos identificados, bem como sua estrutura primária estão compilados na Tabela 8. Contudo, deve-se fazer uma ressalva: é possível que ainda existam fragmentos de menor intensidade não caracterizados, e estes, contidos na Tabela 8, foram os mais significativos. Um maior apanhado de espectros de MS/MS dos fragmentos de CHIM3 das estruturas apresentadas na tabela abaixo, que também foram submetidos a sequenciamento manual para confirmação de identidade, estão no anexo C.

Tabela 8: Fragmentos identificados no LC-MS por sequenciamento manual de espectros de MS/MS. Na tabela, da esquerda para a direita, a massa teórica monoisotópica, a massa encontrada no espectrometro de massas, a posição do fragmento no peptídeo parental, posição em número da sequência dos aminoácidos e a estrutura primária do segmento encontrado.

M_t [M+xH] ^{x+} (Da)	M_{exp} [M+xH] ^{x+} (Da)	Número de cargas	Erro (ppm)	Sítio de hidrólise em CHIM3	Inicial-final	Bac
626.3125	626.3118	1	-1.11	KWAVKIIRKFIKGFISGPGANAAQHKR↓WKYM-NH ₂	28-31	<i>E.c.</i> e <i>S.a.</i>
312.1382	312.1374	1	-2.56	KWAVKIIRKFIKGFISGPGANAAQHKRWK↓YM-NH ₂	30-31	<i>E.c.</i>
639.8462	639.8449	2	-2.03	KWAVKIIRK↓FIKGFISGPGANA↓AQHKRWKYM-NH ₂	10-21	<i>E.c.</i> e <i>S.a.</i>
604.3235	604.3268	2	+2.03	KWAVKIIRK↓FIKGFISGPGAN↓AAQHKRWKYM-NH ₂	10-20	<i>E.c.</i>
675.3616	675.3632	2	+2.37	KWAVKIIRK↓FIKGFISGPGANAA↓QHKRWKYM-NH ₂	10-22	<i>E.c.</i>
739.3920	739.3929	2	+1.22	KWAVKIIRK↓FIKGFISGPGANAAQ↓HKRWKYM-NH ₂	10-23	<i>E.c.</i>
443.2855	443.2871	2	+3.61	K↓WAVKIIR↓KFIKGFISGPGANAAQHKRWKYM-NH ₂	2-8	<i>E.c.</i>
511.7876	511.7871	2	-0.98	KWAVKIIRK↓FIKGFISGPG↓ANAAQHKRWKYM-NH ₂	15-24	<i>E.c.</i>
575.8053	575.8070	2	+2.95	KWAVKIIRKFIKGF↓ISGPGANAAQHK↓RWKYM-NH ₂	15-25	<i>E.c.</i>
440.2330	440.2319	1	-2.50	KWAVKIIRKFIKGFISGPGANAAQHKRW↓KYM-NH ₂	29-31	<i>E.c.</i>

x = número de cargas; *E. c.* = *Escherichia coli*; *S. a.* = *Staphylococcus aureus*

A hidrólise no sítio -ANA↓A verificada no fragmento FIKGFISGPGANA, de massa $[M+2H]^{2+} = 639.8449$ Da, encontrado após incubação com ambas as bactérias, indica que o sítio pretendido, desenhado para sofrer ação da Spase I, foi efetivamente hidrolisado. Esse dado indica que o peptídeo CHIM3 foi adsorvido nas membranas destas bactérias, conforme dos dados obtidos com Di-8-ANEPPS, e que seu sítio de hidrólise para Spase I foi efetivamente reconhecido e o precursor peptídico hidrolisado.

Pode-se ainda perceber que, principalmente para a *E. coli*, ocorreu proteólise em regiões adjacentes ao sítio de clivagem preferencial da Spase I (AN↓AAQ- e -ANAA↓Q-), indicando ação de outras proteases ou uma menor especificidade desta enzima para este microrganismo. Entretanto, já foi relatado na literatura, como no trabalho de Santosh e colaboradores⁸⁸, que a Spase I pode apresentar uma falta de especificidade em relação ao sítio preferencial A-X-A. Foi verificado nesse estudo que as clivagens não específicas ocorrem em resíduos relativamente próximos a região normal de clivagem, nas posições -1, +1 e +2, porém em menor proporção. Ainda no trabalho de Santosh, clivagens aleatórias mais próximas ao C-terminal também foram relatadas, mas em menor quantidade⁸⁸. Esse processamento adicional pode fazer parte de alguns mecanismos ainda desconhecidos ou em situações de stress, como o que as bactérias foram submetidas⁸⁸. Observa-se que essas outras regiões próximas ao sítio de preferência da Spase I apresentaram aproximadamente a mesma área em função da concentração de CHIM3 para *E. coli* (Anexo D). Na concentração de 50μM no tempo de 16h (concentração e tempo em que foram encontrados mais fragmentos peptídeos para essa bactéria), a razão entre a clivagem entre as alaninas, ANA↓A (Anexo D - C) e após a última alanina, ANAA↓Q (Anexo D - B) foi de $2,74 \pm 1,28$ e a razão entre a clivagem entre as alaninas, ANA↓A (Anexo D - A) e entre a asparagina e a alanina (AN↓AA) foi de $0,84 \pm 0,46$. Contudo, embora o desenho racional de CHIM3 tenha tido aparente sucesso, não se pode excluir a possibilidade de que este sítio tenha sido hidrolisado pela ação de outras proteases dentro do arsenal produzido por essas bactérias. Assim, são necessários ensaios adicionais para a confirmação da(s) identidade(s) das enzimas atuando nestes sítios⁸⁹

É interessante observar que, para *S. aureus*, o íon obtido pela hidrólise no segmento ANA↓A, ação específica da Spase I neste microrganismo, é mais abundante em relação àqueles obtidos por hidrólise nas ligações adjacentes. A 5μM no tempo de 16h (concentração e tempo em que foram encontrados mais fragmentos

peptídicos para essa bactéria), a proteólise após a última alanina (ANAA↓Q) não foi detectada e a razão entre a clivagem entre as alaninas (ANA↓A) e entre a asparagina e a alanina (AN↓AA) foi de $2,42 \pm 1,44$. Embora não seja possível descartar que a abundância relativa desses íons seja devido a ação de múltiplas enzimas, pode-se hipotetizar uma maior seletividade de substrato por parte da Spase I de *S. aureus* em relação a *E. coli*. Esse resultado reforça o racionalizado no presente trabalho. Dado que CHIM3 conta com um sítio de proteólise para Spase I desenhado para reconhecimento por *S. aureus*, é plausível que a enzima produzida por esse microrganismo apresente maior seletividade para a clivagem -ANA↓A-, enquanto a mesma enzima de *E. coli* seja menos seletiva, hidrolisando a ligação peptídica em outras regiões próximas ao sítio preferencial.

Nos dados obtidos na análise de LC-MS não foi identificado a massa referente a AQHKRWKYM-NH₂ (em nenhum estado de carga), porção C-terminal da proteólise na região ANAA↓Q- em CHIM3 em nenhuma das bactérias avaliadas. Esse fragmento seria gerado a partir de uma simples hidrólise da Spase I sobre CHIM3. Havia expectativa de recuperação desse fragmento, já que a parte complementar (KWAVKIIRKFIKGFISGPGANA-OH) ficaria “ancorada” à membrana dos microrganismos. A não identificação desse segmento pode nos indicar que esse peptídeo tem um curto tempo de meia-vida, podendo ter sido hidrolisado pela variedade de proteases presentes na membrana bacteriana responsáveis pela degradação dos peptídeos sinais, em um fenômeno chamado de proteólise intramembranar⁹⁰. Assim, é possível que o peptídeo KWAVKIIRKFIKGFISGPGANA-OH, produzido após ação da Spase I, sofra hidrólise em KWAVKIIRK↓FIKGFISGPGANA-OH após seu primeiro processamento, resultando assim no fragmento FIKGFISGPGANA-OH, identificado neste trabalho. Uma hipótese alternativa é que este peptídeo fica adsorvido às bactérias e é removido da análise na etapa de centrifugação para preparo de amostras, pois fica adsorvido aos restos de membrana das bactérias.

Outro fragmento identificado no LC-MS foi o WKYM-NH₂. Este é de significativa importância, pois mostrou que é possível liberar esse peptídeo, o agonista de FPR2, mesmo sem a adição de enzimas exógenas, como em esforços anteriores do grupo². No trabalho realizado por Viana e colaboradores², esse peptídeo foi liberado de CHIM2 a partir da adição de tripsina em um sistema contendo peptídeo e vesículas².

A liberação desse agonista, objetivo do presente trabalho, é relevante para a sinalização e para o recrutamento e maturação de neutrófilos para o local que está sendo acometido pela infecção⁹¹. Esse dado indica que, mesmo que sejam necessários mais ensaios para a comprovação que a liberação de WKYM-NH₂ a partir de CHIM3 é dependente da atividade proteolítica da Spase I, esse peptídeo está sendo disponibilizado no meio pelo arsenal enzimático bacteriano, o que demonstra a plausibilidade do conceito aqui explorado.

4.5.1. Proteases expressas pela *E. coli* e por *S. aureus* e seus possíveis sítios de ação sobre o peptídeo CHIM3

As estruturas que compõe a biblioteca de fragmentos gerados na hidrólise do CHIM3 por bactérias podem ser resultado da atividade proteolítica de diferentes enzimas já que, como visto no presente trabalho, bactérias expressam naturalmente uma ampla gama de proteases além da Spase I (Tabelas 1 e 2). Estas desempenham diferentes atividades, como por exemplo as apresentadas pela Omptina, 4CHA entre outras, que podem hidrolisar o peptídeo em diferentes regiões, explicando o amplo leque de fragmentos encontrados (Figura 31). O estudo realizado por Charles Miller utilizando cepas de *E. coli* e *S. Typhimurium* apontou que expressão dessas enzimas pelas bactérias pode ser aumentada como alternativa de sobrevivência em um ambiente de estresse nutricional com pouco ou nenhum recurso energético, como limitação de íons, carbono e nitrogênio⁹². O aumento na expressão de proteases pelas bactérias aumentaria a digestão de peptídeos *in situ*, fornecendo a elas os elementos básicos de seu metabolismo como uma fonte secundária de energia. Esse mesmo fenômeno pode ter ocorrido nos experimentos realizados já que as bactérias cresceram em um meio de cultura rico em nutrientes, mas foram transferidas para um sistema tamponado de PBS juntamente com o CHIM3 durante 16h. Assim, o stress de transferência de um meio rico em nutrientes para um meio pobre pode ter papel significativo na geração dos numerosos fragmentos detectados.



Figura 31: Possíveis enzimas expressas por *E. coli* (em azul) e por *S. aureus* (em marrom) que podem ter ação proteolítica em diferentes segmentos do peptídeo CHIM3. A Spase I, destacada em verde, é expressa em ambas as bactérias. Essas fragmentações poderiam explicar a ampla gama de fragmentos observados do ensaio de digestão do peptídeo.

A literatura traz diversas proteases expressas por *E. coli*, o que permite fazer um maior número de inferências em relação às enzimas que hidrolisam CHIM3. Dentre essas enzimas catalogadas e descritas na literatura, destaca-se a atividade da OmpTina (OmpT), atualmente reclassificada como uma aspartato-protease⁹³, a qual é uma protease integral de membrana externa que está presente em diversas bactérias Gram-negativas além da *E. coli*, como *Salmonella enterica* e *Yersinia pestis*^{93, 94}. Esta enzima está associada à patogenicidade bacteriana, podendo cumprir funções específicas necessárias a colonização e infecção dos hospedeiros. Estudos demonstraram que essa enzima reconhece e cliva substratos em regiões com dois resíduos básicos em sequência^{93, 95, 96, 97}. Os dados indicam que essa enzima é ativa na digestão de CHIM3 e fornecem subsídios para melhorias no desenho desta molécula a partir da modificação de sítios de clivagem preferenciais. Esta enzima é, provavelmente, a responsável pela liberação do agonista de FPR2, WKYM-NH₂, no meio reacional para esta bactéria.

Os dados de enzimas recolhidos na literatura para a *S. aureus* são menos detalhados, já que algumas das proteases expressas por este microrganismo ainda não tem uma região de preferência determinado, como a SplC e SplF. Já outras

proteases são inespecíficas, como a PepT. Ainda outras possuem uma ampla ação em proteínas diversas como a Staphopain A, que apresenta atividade na proteína elastina²². Essas características tornaram a relação entre as enzimas e as regiões de reconhecimento no CHIM3 mais laborioso. No entanto, com algumas proteases essa relação é possível de ser feita, como a aureolisina. Apesar disso, pode-se hipotetizar que essa bactéria expressa alguma enzima com atividade do tipo tripsina, já que essa atividade foi evidenciada a partir do padrão de hidrólise de CHIM3, mas ainda não está elucidado qual de acordo com a literatura. É interessante perceber que, para *S. aureus*, as díades -KR- e -RK- foram hidrolisadas, porém não um resíduo de lisina isoladamente como em WKYM-NH₂. Isso indica que a enzima com atividade do tipo tripsina expressa por essa bactéria requer dois resíduos de aminoácidos básicos em sequência e não somente um, como comumente observado para enzimas com atividade do tipo tripsina. Ainda, para as enzimas expressas pela *S. aureus*, é possível sugerir a atividade da aureolisina (Aur) em algumas regiões do peptídeo CHIM3. Assim como observado em estudos de digestão do peptídeo LL-37⁹⁸, essa metaloprotease tem especificidade em sítios de reconhecimento contendo aminoácidos hidrofóbicos^{98,99}. A Aur prefere clivar ligações peptídicas no lado N-terminal de resíduos hidrofóbicos volumosos, como: Ala, Leu, Ile e Val. como alguns descritos na literatura: KR-↓-I; R-↓-I; NL-↓-V e QR-↓-I⁹⁹. Essa enzima pode ser uma boa opção para as clivagens observadas em RK-↓-F e KR-↓-W e uma boa candidata a ser explorada para a liberação do agonista WKYM-NH₂ *in situ*.

Outro fator a ser considerado na interpretação dos resultados obtidos é o excesso de peptídeo utilizado nos ensaios, significativamente acima da concentração inibitória mínima (CIM). É possível inferir que parte do CHIM3 está interagindo, acumulando e saturando a membrana aniônica bacteriana, tendo como base o K_d calculado para o peptídeo (da ordem de 1,8 a 1,9 μM) feito no presente trabalho. Sendo assim, outra parte dessas moléculas fica no meio, sem conseguir interagir de maneira efetiva com a membrana e sujeita-se à ação de outras proteases expressas e secretadas pela bactéria. Isso significa que esses peptídeos que não se ancoram na membrana ficam mais acessíveis à ação proteolítica dessas outras enzimas, gerando então essa série de fragmentos compilados na tabela 8. Em contrapartida, acredita-se que a fração de peptídeo que fica adsorvida em membranas bacterianas permanece ancorado e fica, assim, “protegido” da ação de exoproteases. Essa característica impediria o acesso físico dessas exoenzimas ao CHIM3, e é esperado

que isso diminua a taxa de proteólise desse peptídeo e aumente a seletividade para a hidrólise por Spase I, por exemplo. Tal efeito de seletividade com base na extensão de adsorção em membranas seria similar ao que foi observado em sistemas modelo usando CHIM2 adsorvido em vesículas².

Não obstante, vários estudos¹⁰⁰ como os feitos por Bernard J. Moncla¹⁰¹ e colaboradores e Charles G. Star e colaboradores¹⁰² corroboram com os resultados obtidos nos ensaios com as bactérias. Ensaio de digestão do peptídeo antimicrobiano LL-37 utilizando diferentes cepas de bactérias, mostraram a sensibilidade de peptídeos antimicrobianos em um meio rico com grande abundância em proteases diversas. No entanto, como comentado, um aprimoramento na estrutura do peptídeo, como a troca de aminoácidos, bem como a inserção de aminoácidos modificados, sem alterar, a princípio, as propriedades físico-químicas da molécula parental, podem ser uma boa estratégia para aumentar o tempo de meia-vida desses compostos em um meio complexo rico em proteases²².

4.5.2. Quantificação relativa dos segmentos WKYM-NH₂, YM-NH₂ e FIKGFISGPGANA em função da concentração do peptídeo CHIM3 e do tempo após incubação com *E. coli* e *S. aureus*.

O experimento de hidrólise do peptídeo CHIM3 por *E. coli* e *S. aureus* foi feito em triplicata nos tempos de 0, 8 e 16h, variando a concentração do peptídeo em 5, 25 e 50 µM. Isso é importante para se entender como se dá a cinética de liberação do WKYM-NH₂ formado na digestão do peptídeo e como isso varia em função da concentração de CHIM3. A fração sobrenadante foi processada conforme descrito na seção de material e métodos e analisada por LC-MS, gerando cromatogramas de íon extraído (XICs) para fragmentos selecionados. A área de cada íon foi então relacionada com a concentração do peptídeo CHIM3 no experimento.

Da ação enzimática sobre o CHIM3, podemos ressaltar a produção de três importantes fragmentos: FIKGFISGPGANA (sítio de possível ação da Spase I), WKYM-NH₂ (agonista de FPR2) e YM-NH₂. Destes, pode-se destacar a presença do dipeptídeo YM-NH₂, produto da atividade proteolítica do tipo *trypsin-like* sobre o WKYM-NH₂. Tal evento é indesejado, pois reduz a concentração do agonista de FPR2 no meio e dificulta sua ação imunomoduladora.

A comparação da área dos íons obtidos pode indicar a relação entre a produção dos fragmentos de CHIM3 por hidrólise bacteriana em função da concentração do peptídeo presente no meio (5 μM , 25 μM e 50 μM) e do tempo de incubação. Na figura 32, a coluna da esquerda é referente à bactéria *E. coli* e a coluna da direita é referente à *S. aureus* para, respectivamente, os segmentos WKYM-NH₂, YM-NH₂ e FIKGFISGPGANA. Observa-se que, para *E. coli*, a área dos íons avaliados aumenta para os três fragmentos com o aumento de concentração de CHIM3 no meio. Esse resultado mostra que existe uma proporcionalidade entre CHIM3 e estes produtos de hidrólise após a incubação com esta bactéria. Outra tendência observada nos dados de hidrólise de CHIM3 em *E. coli* é que, conforme aumenta o tempo de incubação do peptídeo com o meio contendo a bactéria, maior é a área dos fragmentos específicos. Assim como descrito por Nikolai e colaboradores⁷³ no estudo da Sinal peptidase I originária de *S. aureus* quando essa enzima foi incubada com quantidades controladas de substrato SigPep1, ainda apresentou 20% de reminiscência do substrato mesmo após 22h de incubação. Isso aponta para uma cinética enzimática lenta. Desse modo, esse dado poderia explicar o motivo de quase todos os íons produzidos pela *E. coli* na hidrólise de CHIM3 serem mais intensos após 16h de incubação, o que corrobora com o relatado na literatura⁷³.

Embora as relações descritas no parágrafo anterior sejam esperadas, torna-se interessante traçar algumas inferências relativas ao estado metabólico das bactérias neste ensaio. Nos ensaios de digestão foram usadas concentrações superiores ao CIM (tabela 6 do presente trabalho), 4 μM para *S. aureus* e 5,33 μM para *E. coli*. Uma maior presença de fragmentos de CHIM3 com o aumento da concentração da molécula parental, mesmo em uma concentração significativamente superior ao CIM, pode fomentar algumas hipóteses: 1. Manutenção da atividade enzimática em *E. coli* mesmo após a eliminação de todo o inóculo bacteriano inicial; 2. Aumento significativo do CIM devido ao inóculo utilizado ($\sim 10^8$ células. mL⁻¹), conforme fenômeno reportado na literatura¹⁰³, como no estudo de tolerância coletiva aos antibióticos, de Meredith e colaboradores¹⁰⁴, mostrando que populações bacterianas podem sobreviver coletivamente a antibióticos em concentrações letais para as células individuais. Isso manteria parte das células ainda metabolicamente vivas na escala de tempo do experimento; ou 3. Células de *E. coli*. mortas podem ter absorvido o peptídeo protegendo outras da morte, o que também manteria células metabolicamente ativas

ao longo do experimento¹⁰⁵. Alguns estudos podem corroborar com as últimas hipóteses, como o de Savani e colaboradores¹⁰⁶, onde foi demonstrado que, quando o peptídeo catiônico interage com a membrana bacteriana pelo mecanismo “carpete”, é necessário a associação da ordem de 10^7 moléculas de peptídeo/célula para matá-la. Esse número se mostrou semelhante tanto para bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas. Ainda, este estudo mostrou que a associação dessa classe de peptídeos com células mortas é uma ordem de grandeza maior (10^8 moléculas/célula), sugerindo uma forte interação dos peptídeos antimicrobianos com o material intracelular, que se torna acessível após o rompimento da membrana. Esses indícios podem corroborar com a ideia de que as células mortas podem proteger as células bacterianas vivas por diminuir a concentração efetiva de peptídeo do meio.

Ainda não é possível saber qual dessas hipóteses é verdadeira e pode-se inferir que todos esses fenômenos ocorrem de maneira conjunta, em algum grau.

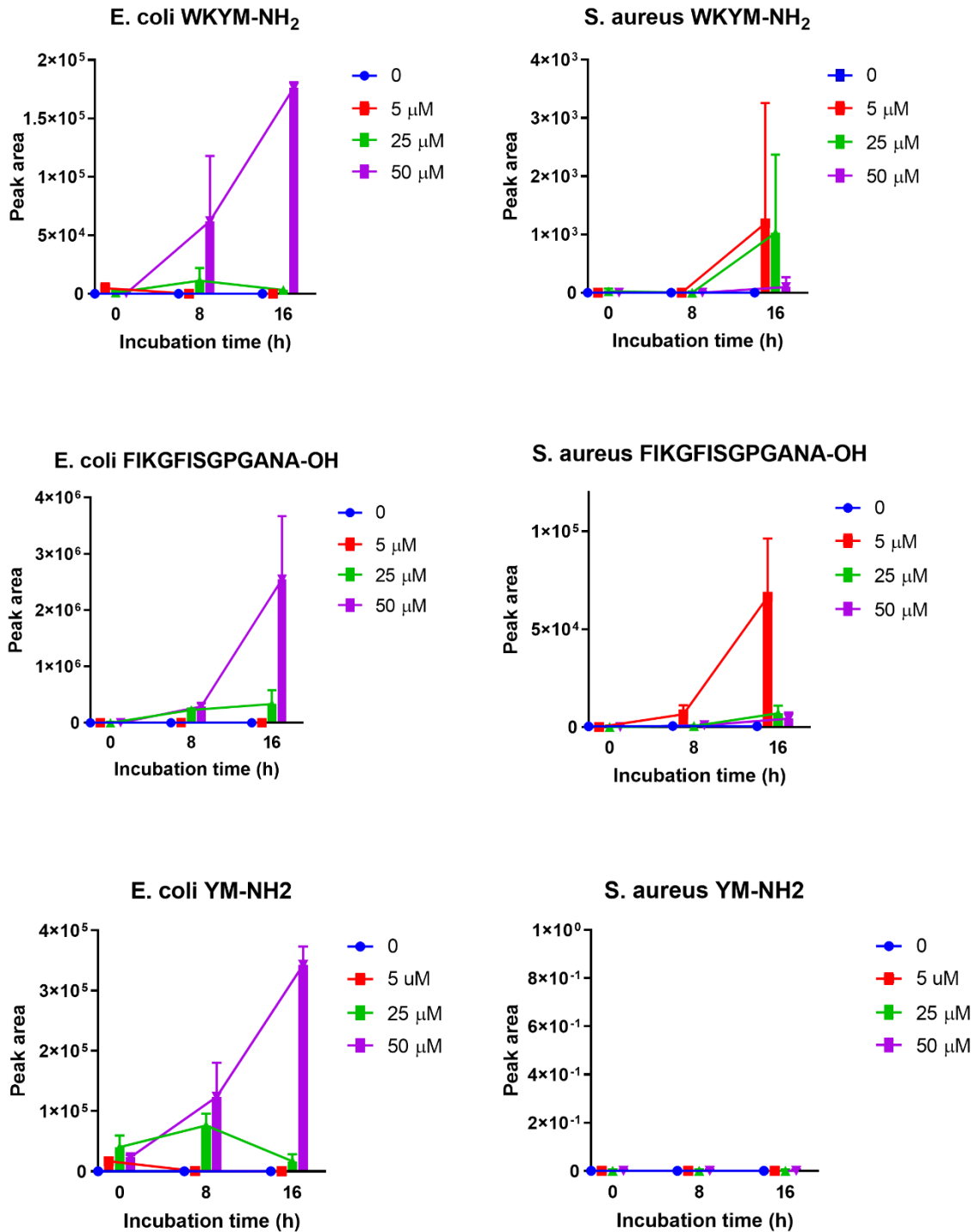


Figura 32: Área dos íons relativos a fragmentos de CHIM3 obtidos por LC-MS em função da concentração deste peptídeo, em μM , e do tempo de incubação, dado em horas. A coluna da esquerda é referente aos ensaios com *E. coli* e as colunas da direita, referentes a *S. aureus*. As concentrações de peptídeo para cada ensaio estão colocadas em cores diferentes: Azul ($0 \mu\text{M}$); Vermelho ($5 \mu\text{M}$); Verde ($25 \mu\text{M}$); Roxo

(50 μM) **A)** Área do íon relativo ao peptídeo WKYM-NH₂, em função da concentração de CHIM3. **B)** Área do íon do fragmento YM-NH₂ em relação à concentração do CHIM3. **C)** Taxa de formação do fragmento FIKGFISGPGANA em relação à concentração de CHIM3. **D)** Área do íon referente ao WKYM-NH₂ em relação ao aumento da concentração de CHIM3. **E)** Comportamento semelhante a formação do YM-NH₂ produto da atividade proteolítica sobre o WKYM-NH₂. **F)** Taxa de formação do fragmento FIKGFISGPGANA em relação à concentração de CHIM3.

De maneira imprevista, a relação entre concentração de CHIM3 e a abundância de produtos de hidrólise desta molécula foi inversa para a bactéria *S. aureus*. Para esta bactéria, foi detectada uma maior abundância de fragmentos a partir da incubação de 5 μM de peptídeo, enquanto concentrações mais altas, de 25 e 50 μM de CHIM3, resultaram em menores quantidades de produtos de hidrólise. Cineticamente, contudo, os dados foram compatíveis com os dados de *E. coli*, e a maior abundância de fragmentos foi detectada após 16h de incubação, como constatado no trabalho de Sharkov e colaboradores⁷³, indicando que os tempos para a obtenção da atividade da Spase I são da ordem de 16h-24h. Uma primeira hipótese para a relação inversa entre concentração de CHIM3 e a abundância de fragmentos para essa bactéria é que a formação dos fragmentos de hidrólise de CHIM3 detectados por MS requer células metabolicamente ativas. Enquanto parte da população de *E. coli* se mantém mesmo após a incubação com concentrações elevadas de CHIM3, o mesmo não aconteceria para *S. aureus*.

Ainda sobre esses dados, devemos nos atentar a alguns fatores. Em todos os experimentos, as concentrações utilizadas foram próximas ou superiores ao CIM das bactérias testadas (tabela 6 do presente trabalho). Contudo, a menor concentração de CHIM3 testada, de 5 μM , é próxima ou inferior ao CMM de ambas as bactérias. Isso indica que, nessa concentração, uma parte da população bacteriana permanece metabolicamente ativa ao longo do ensaio. Esse tempo se torna importante porque as bactérias metabolizam primariamente carboidratos e passam a expressar peptidases/proteases em grande quantidade como uma resposta ao stress nutricional e alternativa na obtenção de elementos para seu metabolismo, como carbono e nitrogênio²¹. Essa adaptação na obtenção de recursos energéticos passa justamente pelo aumento da expressão de proteases e digestão de peptídeos do meio.

Sendo assim, uma hipótese para o comportamento divergente de *E. coli* e *S. aureus* no ensaio é que a bactéria Gram-negativa, *E. coli*, expressa constitutivamente um maior número e uma maior quantidade de proteases, ou, alternativamente, que essa bactéria se mantém metabolicamente ativa por um maior tempo após a incubação com o inóculo inicial do peptídeo. O stress induzido pela troca do meio para PBS acrescido do stress causado pelo peptídeo induziriam a expressão de proteases e, com isso, o CHIM3 seria hidrolisado de maneira mais significativa. Tal efeito não seria observado em *S. aureus*, visto que esta não expressa proteases constitutivamente de maneira expressiva e somente a incubação desta bactéria com o peptídeo a 5 µM, concentração inferior ao CMM, daria tempo suficiente para o desencadeamento da resposta ao stress, com a transcrição e tradução de genes relativos a proteases. As concentrações mais elevadas de CHIM3 eliminariam o inóculo inicial desta bactéria de maneira rápida, não havendo tempo para a transição de um metabolismo com base em açúcares para um catabolismo baseado em proteólise.

O efeito descrito acima pode ter ainda outras nuances. Estudos indicam que o valor de CIM depende da quantidade de unidades formadoras de colônia (cfu/mL) no inóculo inicial^{103, 107}. O trabalho de C. König e colaboradores demonstrou que em concentrações da ordem de $2 \cdot 10^8$ cfu/mL (faixa de concentração inoculada juntamente com o peptídeo CHIM3), como as encontradas em algumas infecções de tecido mole, a CIM aumentava significativamente (>10x em alguns casos) para diversos AMPs testados¹⁰³. Assim, este trabalho indica que a CIM é dependente do inóculo, aumentando sobremaneira quando se aumenta o número inicial de bactérias^{103, 107}. Isso pode indicar que, mesmo em concentrações mais elevadas de CHIM3, ainda podem ser encontradas células metabolicamente ativas e que essas podem ser responsáveis pela hidrólise de CHIM3 no caso de *E. coli* a 25 e 50µM.

Ainda sobre os dados da figura 32, como observado nos ensaios com *E. coli*, houve uma significativa taxa de proteólise do WKYM-NH₂, gerando YM-NH₂. É interessante observar que a hidrólise nesse local é um dos primeiros eventos observados, ocorrendo de maneira significativa após 8h de incubação. A área deste íon para *E. coli* é da mesma ordem da encontrada para WKYM-NH₂ (Figura 32). Esse achado pode nos indicar: 1. Hidrólise de CHIM3 para liberação de WKYM-NH₂, gerando uma quantidade significativa e que, a *posteriori*, sofreu atividade proteolítica;

2. Ação de proteólise direta sobre a estrutura íntegra do CHIM3. Ademais, nos ensaios com as duas bactérias, pode-se observar uma relação entre a área do fragmento FIKGFISGPGANA e do fragmento WKYM-NH₂, indicando que a proteólise no sítio desejado está relacionada ao aumento da taxa de liberação do agonista de FPR2 no meio.

Ainda que tenha sido observado esse comportamento aparentemente divergente das duas bactérias, o objetivo da liberação do WKYM-NH₂, agonista de FPR2, foi alcançado, mesmo para concentrações relativamente baixas de CHIM3, como 5 μM, para ambas as bactérias estudadas. Esse resultado mostra-se promissor tendo em vista ser um meio de matriz significativamente complexo dependente apenas das enzimas secretadas pelas próprias bactérias. Isso corrobora com a hipótese inicial, de que esse tetrapeptídeo poderia ser liberado em uma situação de injúria causada pela instalação de uma infecção, guiando por quimiotaxia os neutrófilos para o local desejado^{103, 107}.

Também foram feitos ensaios adicionais de hidrólise do peptídeo CHIM3 com um coquetel de inibidores de proteases (PIC), como descrito na metodologia (tabela 5 do tópico 3.10), e com cloreto de magnésio (MgCl₂)⁷⁴, um inibidor de Spase I relatado na literatura (Anexo E). Esses ensaios foram realizados utilizando 50 μM de CHIM3 em um único tempo de 16h. Decorrido esse tempo, as suspensões bacterianas foram centrifugadas e, do sobrenadante, foi feita uma extração em fase sólida, com a fase orgânica analisada por LC-MS. Os dados mostram, mais uma vez, um comportamento divergente: tanto MgCl₂ quanto PIC inibiram de maneira significativa a proteólise em *E. coli* para os fragmentos avaliados. Já para *S. aureus*, MgCl₂ aumentou significativamente a área do íon relativo a WKYM-NH₂ e o PIC não teve o mesmo efeito. Estes ensaios permitiram reconhecer que a proteólise do CHIM3 promovida pelas bactérias é efetivamente o mecanismo pelo qual os fragmentos de CHIM3 são produzidos, porém, não permitiram obter conclusões assertivas sobre o papel da Spase I nos fragmentos encontrados. Enquanto MgCl₂ foi inibitório para *E. coli*, teve papel contrário em *S. aureus*. Deve-se ressaltar que estudos que definem o MgCl₂ como inibidor de Spase I o fazem a partir da enzima isolada, enquanto estamos usando um sistema mais complexo, com bactérias íntegras⁸¹. É difícil prever o papel desse íon na sobrevivência/produção de proteases desses microrganismos, já que este íon é um agente antimicrobiano por si só, podendo ainda interferir na atividade antimicrobiana direta de CHIM3 de maneira ainda não compreendida. Os dados

relativos a esta parte do trabalho e uma discussão mais aprofundada podem ser encontrados no anexo E.

4.6. Otimização do peptídeo CHIM3 a partir de modificações químicas deste e da porção agonista de FPR2 pela introdução de N-metil-aminoácidos

Os ensaios de incubação do peptídeo CHIM3 com *S. aureus* e *E. coli* mostraram uma extensiva e rápida taxa de hidrólise enzimática ao longo de todo o peptídeo CHIM3. Para abrandar esse problema, modificações peptídicas pontuais podem reduzir ou inibir a hidrólise enzimática, aumentando o tempo de meia vida do peptídeo em meio biológico. Essas modificações podem incluir troca de aminoácidos, amidações, acetilações, metilações entre outras modificações^{77,78}.

A N-metilação, por exemplo, é uma modificação química que objetiva aumentar a meia vida do peptídeo *in vivo*. Mais especificamente, a N-metilação da tirosina no segmento agonista de FPR2 de CHIM3, WKYM-NH₂, poderia reduzir a ação de enzimas do tipo tripsina nessa ligação. Estudos, como o feito por Chatterjee e colaboradores, demonstram que a modificação de aminoácido do tipo N-metilação reduz a capacidade de hidrólise dessa ligação pela tripsina, tipo de enzima que tem como preferência essa região de reconhecimento^{108, 109, 110, 111}.

Com o objetivo de aprimorar o peptídeo CHIM3, foi sintetizada uma variante, o CHIM3-Y(NMe), com um resíduo de tirosina N-metilada na porção C-terminal (Figura 33), modificando a estrutura do agonista de FPR2 para WK(Y-NMe)M-NH₂.

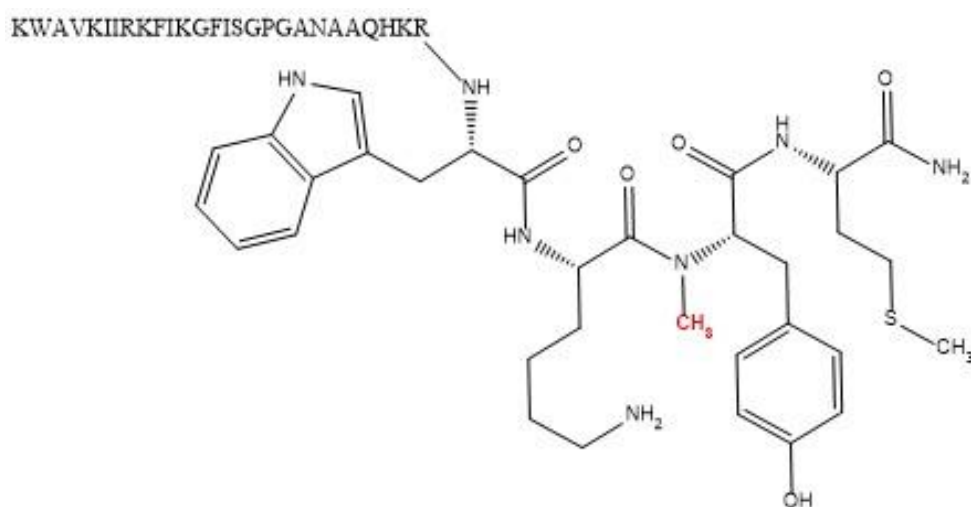


Figura 33: Estrutura variante do peptídeo CHIM3 com o aminoácido Tirosina na porção C – Terminal metilada no nitrogênio da ligação peptídica (destacado em vermelho).

É importante que a variante CHIM3-Y(NMe) retenha a atividade antimicrobiana de CHIM3 e que sua porção agonista de FPR2, WK(Y-NMe)M-NH₂, seja capaz de ativar o receptor FPR2, assim como o peptídeo original WKYM-NH₂. Desta forma, foram executados ensaios para verificar as atividades biológicas deste variante.

4.7. Síntese dos peptídeos CHIM3 – Y(NMe), WK(Y-NMe)M-NH₂ e WKYM-NH₂.

Para a síntese do peptídeo CHIM3 – Y(NMe) (KWAVKIIRKFIKGFISGPGANAAQHKRWK(Y-NMe)M-NH₂) foi utilizado 242,0 mg de resina Rink Amide e os protocolos utilizados para a síntese foram os mesmos do peptídeo CHIM3, para uma escala de 0,15mMol. A síntese se deu de maneira convencional, sendo cada acoplamento e desproteção confirmado de maneira qualitativa pelo teste colorimétrico de Kaiser. Não obstante, foi constatada uma dificuldade na confirmação da desproteção do segundo aminoácido referente a tirosina N-metilada. Visto tratar de uma amina secundária, a ligação do cromóforo do teste com a amina do N-terminal é dificultada, permanecendo a resina, mesmo desprotegida, descorada implicando uma desproteção não efetiva. Entretanto, já prevendo essa indicação de falso negativo, deu-se prosseguimento a síntese e foi confirmado a desproteção da tirosina metilada com o acoplamento e desproteção do próximo aminoácido da sequência, no caso, a lisina.

No proceder da síntese, houve dificuldades no acoplamento do aminoácido arginina da vigésima quinta posição, com o teste de Keiser se mostrando semi-translúcido, indicando um acoplamento parcial. Para contornar o problema, foi feito um reacoplamento, pesando-se a massa do aminoácido com um acréscimo de 10% no excesso, as mesmas quantidades dos reagentes de acoplamento (DIC e Oxima[®]), 3 gotas do surfactante não iônico Triton[®] X-100 (~0,15mL), tudo solubilizado e

homogeneizado em 2,0 mL de DMF, colocando-se para reagir, sob constante agitação, durante 1:30h.

Após o acoplamento e desproteção do último aminoácido, procedeu-se para a etapa de clivagem e precipitação com diisopropil éter. Após essa última etapa, passou-se para a etapa de liofilização. A purificação por cromatografia foi feita utilizando o mesmo método e gradiente de purificação do peptídeo CHIM3, onde o peptídeo obteve um tempo de retenção de 26,4 min. (contra 24,9min. do peptídeo CHIM3), com um sinal com intensidade maior que 2500 m.A.u. Pode-se observar ainda a presença de outros picos, fora o relativo ao CHIM3 – Y(NMe). Estes, no entanto, são poucos e de baixa intensidade, sendo que o sinal de maior intensidade não ultrapassou o valor de 400 m.A.u., o que indica que o peptídeo já se apresenta um significativo grau de pureza, demonstrando ainda que a síntese química gerou poucos subprodutos.

A confirmação da síntese e da correta estrutura primária foi feita utilizando por espectrometria de massa elétron-spray (ESI) Q-TOF/TOF. O íon precursor foi detectado como uma tripla carga $[M + 3H]^{3+} = 1215,7092$ Da (erro = 6,49 ppm) (Anexo F). Foi feito o sequenciamento manual pela diferença de massa entre os íons gerados no espectro de fragmentação do íon precursor. Ainda, a presença do íon imônio m/z 150,09, proveniente da tirosina metilada, íon utilizado como marcador da presença do aminoácido modificado.

Para a síntese do peptídeo WK(Y-NMe)M, utilizou-se 243,2 mg de resina Rink Amide e o mesmo protocolo utilizado nas sínteses dos peptídeos CHIM3 e CHIM3-Y(NMe). Assim como o ocorrido na síntese do peptídeo CHIM3-Y(NMe), a desproteção da tirosina N-metilada deu como falso negativo no teste de Kaiser, como já esperado, sendo sua desproteção confirmada pela desproteção da lisina, que era o próximo aminoácido da sequência e que respondeu corretamente ao teste de Keiser. Com excessão a esse fato pontual, a síntese avançou sem mais dificuldades até o último aminoácido. Após a desproteção do último aminoácido, o processo de clivagem e precipitação ocorreram utilizando o mesmo protocolo e coquetel de clivagem dos peptídeos CHIM3 e CHIM3-Y(NMe), passando para a etapa de liofilização. Foi obtida uma massa bruta de peptídeo igual a 46,38 mg.

A purificação do peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂ foi feita também por cromatografia utilizando o mesmo método de purificação dos peptídeos CHIM3 e

CHIM3-Y(NMe). O peptídeo eluiu com um tempo de 22,29 min. (Anexo F), indicando uma boa hidrofiliçidade, e com um sinal maior que 3000 m.A.u.. Nota-se pelo cromatograma que outros sinais, fora o relativo ao peptídeo de interesse, eram poucos e de baixa intensidade, indicando que o peptídeo apresentava uma boa pureza, obtendo uma massa final de peptídeo purificado de 27,83 mg.

A caracterização feita por espectrometria de massa confirmou a correta síntese do tetrapeptídeo modificado, sendo identificado com a massa de $[M + H]^+ = 640.3327$ Da (erro = 3,27 ppm) Também foi detectada a presença do imônio alusivo à tirosina modificada (os resultados relativos à síntese e purificação por cromatografia podem ser encontrados ao final do trabalho no Anexo F).

Foi necessário também ressintetizar o peptídeo WKYM-NH₂. Sua síntese se deu similar à do CHIM3. Foi utilizado 215,0 mg de resina Rink Amide[®] com os reagentes de acoplamento DIC e Oxima[®] e o mesmo coquetel de clivagem geral para peptídeos. A purificação foi feita igualmente por cromatografia, na qual o peptídeo obteve um tempo de retenção igual a 28,2 min (Anexo G).

A caracterização do peptídeo foi feita por espectrometria de massa elétron-spray (ESI) Q-TOF/TOF com íon precursor detectado com massa igual a $[M + H]^+ = 626,3148$ Da. Sua fragmentação gerou um espectro de MS/MS o qual foi possível realizar o sequenciamento e confirmar sua estrutura primária pela diferença de massa entre os íons da série -b e -y no espectro de MS/MS (o cromatograma e o espectro de massa se encontram nos anexos ao final do trabalho no Anexo G)

4.7.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (CMM) do peptídeo CHIM3 – Y(NMe)

Os testes de CIM e CMM foram feitos seguindo o mesmo protocolo já aplicado para o CHIM3. No entanto, os testes de concentração inibitória e microbicida mínima foram refeitos para o CHIM3 e simultaneamente com o CHIM3 – Y(NMe), com o objetivo de obter resultados mais fiéis o possível para a comparação dos dois peptídeos.

Os resultados obtidos tanto dos testes de CIM quanto CMM estão apresentados abaixo, respectivamente, nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Resultados de concentração inibitória mínima para ambas as bactérias.

_____	<i>S. aureus</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 25923
CHIM3	4 $\mu\text{M} \pm 0$	5,33 $\mu\text{M} \pm 1,89$
CHIM3-Y(NMe)	3 $\mu\text{M} \pm 1,09$	2,33 $\mu\text{M} \pm 0,81$

Tabela 10: Resultados de concentração microbicida mínima (CMM) para ambas as bactérias.

_____	<i>S. aureus</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 25923
CHIM3	6,67 $\mu\text{M} \pm 1,89$	5,33 $\mu\text{M} \pm 1,89$
CHIM3-Y(NMe)	5 $\mu\text{M} \pm 2,44$	3 $\mu\text{M} \pm 1,09$

Foram obtidos valores menores para a variante CHIM3-Y(NMe), tanto para a CIM quanto para a CMM. Esses resultados podem indicar uma leve tendência no aumento no potencial antimicrobiano. Todavia, mesmo os valores encontrados para o CHIM3-Y(NMe) terem sido menores, ainda assim foram próximos dos valores encontrados para CHIM3, mantendo-se aproximadamente dentro do desvio padrão para *S. aureus* e *E. coli*, tanto na CIM quanto da CMM para os dois peptídeos. Isso indica que a introdução da metila na estrutura do peptídeo não afetou substancialmente sua ação microbicida, sugerindo que, a princípio, pode ser utilizado em substituição ao peptídeo CHIM3, sendo ainda necessário testes de incubação para a efetividade dessa modificação na diminuição da taxa de proteólise e aumento do tempo de vida das frações peptídicas de interesse.

4.8. Ensaio de digestão do peptídeo CHIM3-Y(NMe) após incubação com *E. coli* e *S. aureus*.

Os ensaios de digestão dos peptídeos CHIM3-Y(NMe) foram feitos com as bactérias *E. coli* e *S. aureus* em tampão PBS 1x (pH = 7,4) sob agitação constante de 200 rpm a 37°C durante 16h, ou seja, mantendo as mesmas condições do ensaio de

digestão do peptídeo CHIM3. O experimento foi feito em triplicata para as concentrações de 50 μM para *E. coli* e 5 μM para *S. aureus*, sendo essas as concentrações em que foi observado uma maior formação de WKYM-NH₂ para as duas bactérias, respectivamente. O ensaio foi realizado com tempo de incubação de 16h, pois foi o tempo em que se encontrou a mais extensa quantidade de diferentes fragmentos peptídicos provenientes da degradação do CHIM3 (Figura 34). Após a aquisição dos dados, foram gerados XICs para os íons pertinentes e verificados os espectros de MS/MS, para garantir a identidade dos fragmentos. Após isso, as áreas dos íons foram quantificadas.

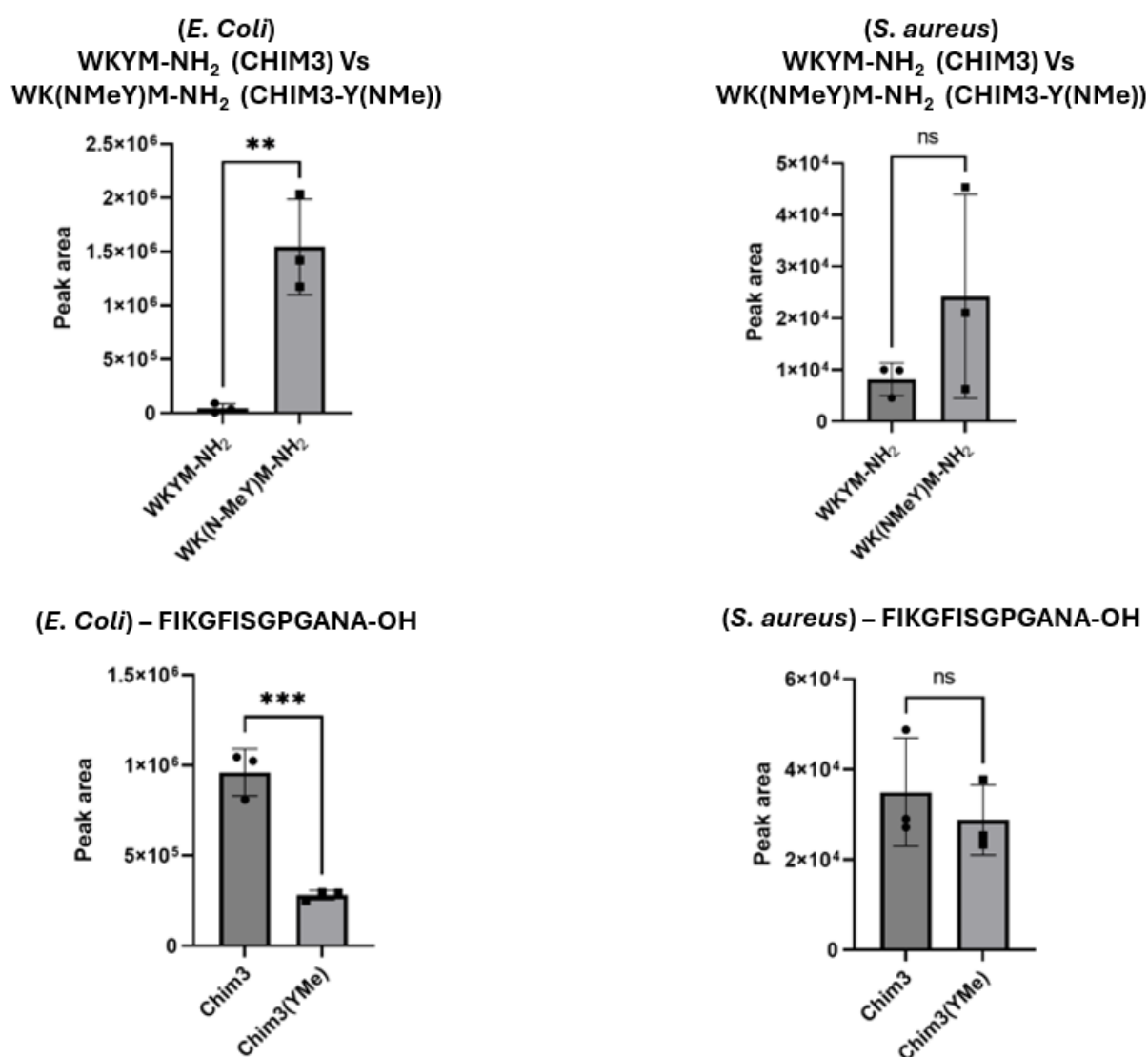


Figura 34: Quantificação da área relativa dos fragmentos obtidos na digestão do peptídeo CHIM3 – Y(NMe) comparativamente ao peptídeo CHIM3 nas bactérias *E.*

coli e *S. aureus*. **A)** Aumento da área do pico indicando uma maior concentração do fragmento WK(Y-NMe)M-NH₂ na digestão por *E. coli*. **B)** Áreas dos picos, indicando concentrações próximas entre o fragmento WK(Y-NMe)M-NH₂ e WKYM-NH₂ na digestão por *S. aureus*. **C)** Diminuição da área do pico, na digestão por *E. coli*, relacionado a uma menor concentração do fragmento FIKGFISGPGANA, indicando uma menor taxa de proteólise nesse sítio. **D)** Diminuição da área do pico, na digestão por *S. aureus*, relacionado a uma menor concentração do fragmento FIKGFISGPGANA, indicando uma menor taxa de proteólise nesse sítio.

Os ensaios de digestão do peptídeo CHIM3-Y(NMe) expuseram que a troca da tirosina em WKYM-NH₂ por uma tirosina N-metilada foi vantajosa, apresentando uma menor taxa de hidrólise enzimática tanto no sítio -ANA↓A- quanto na ligação -WK↓Y(NMe)M-NH₂. Esse dado é curioso pois é possível se ter uma noção de proporção comparativa na hidrólise dos dois peptídeos. Apesar de se observar essa menor taxa de hidrólise nesses sítios para as duas bactérias, nota-se uma diminuição mais significativa na proteólise do peptídeo CHIM3 – Y(NMe) e do WK(Y-NMe)M-NH₂, ou seja, um maior tempo de vida *in situ* desses peptídeos, nas cepas de *E. coli*, indicando que a modificação gerada pela metilação afetou mais significativamente no reconhecimento pelas proteases dessa bactéria frente à cepa utilizada de *S. aureus*. É importante ressaltar que não foi encontrado o íon equivalente a NMe-YM-NH₂ (*m/z* 326.1533) na amostra em que CHIM3 – Y(NMe) foi incubada com *E. coli*. Isso indica que o aumento na área do íon relativo ao fragmento WKY(NMe)M-NH₂ é devido a inibição da hidrólise dessa ligação pela N-metilação deste resíduo. Isso indica que, assim como a tripsina, a enzima responsável por esse comportamento em *E. coli* é também sensível a esta modificação.

Uma hidrólise mais lenta, no caso do peptídeo CHIM3 – Y(NMe), e o aumento do tempo de meia vida do imunomodulador WK(Y-NMe)M-NH₂ é notável pois pode potencializar sua finalidade, bem como possibilitar o uso de uma menor concentração de peptídeo no tratamento de infecções causadas por esta bactéria.

Embora os experimentos demonstrem que a área relativa ao íon referente a porção agonista de FPR2, WK(Y-NMe)M-NH₂ proveniente de CHIM3(YMe), esteja significativamente aumentada em relação a WKYM-NH₂ de CHIM3 para *E. coli*, indicando o sucesso da estratégia, é necessário estimar as concentrações relativas destas moléculas nestes ensaios. Somente de posse dessa informação poderemos

saber se estes peptídeos agonistas de FPR2 acumulam no meio reacional em concentração compatível com a ativação do receptor FPR2 *in vivo*.

Ainda, as frações recolhidas dos ensaios de digestão do peptídeo CHIM3 e CHIM3-Y(NMe) com *S. aureus* e *E. coli* foram submetidos a corridas de cromatografia (CLAE) com o objetivo de quantificar os peptídeos WKYM-NH₂ e WK(Y-NMe)M-NH₂ provenientes de CHIM3 e CHIM3-Y(NMe), respectivamente. Para tal fim, foi feita uma curva de calibração para cada um dos peptídeos, com monitoramento a 280nm, nas concentrações de 0, 3.125, 6.250, 12.500, 25.000, 50.000 e 100.000 µM (Anexo H).

Em seguida à construção das curvas de calibração, injetou-se, em triplicata, as frações de digestão referentes ao tempo de 16h para a *E. coli* e *S. aureus*, selecionando respectivamente as concentrações de 50 e 5 µM, tempo e concentração em que foi encontrada uma maior concentração desses peptídeos para os respectivos microrganismos.

A quantificação do peptídeo WKYM-NH₂ por CLAE se mostrou extremamente desafiadora. Para esse peptídeo, não foi possível se determinar com segurança a sua concentração após a digestão com *E.coli* e *S. aureus* devido à complexidade das amostras. Os picos apresentaram áreas diminutas que eluíram muito próximos ao tempo de retenção dos peptídeos de interesse, dificultando a identificação precisa do pico referente a esse fragmento. Além da incerteza quanto ao pico referente ao fragmento, a análise de suas áreas indicam concentrações próximos ou abaixo do limite de quantificação, o que impossibilita a quantificação do WKYM-NH₂ e comparação precisa com a concentração do WK(Y-NMe)M-NH₂ por esse método.

Todavia, para o ensaio de incubação de CHIM3-Y(NMe) com *E. coli* (50µM - 16h), foi possível identificar picos que eluíram com tempo de retenção compatível com WK(Y-NMe)M-NH₂. Para essa bactéria, os picos que eluíram próximos ao tempo de retenção do WK(Y-NMe)M-NH₂ foram proporcionalmente mais intensos que os gerados para o WKYM-NH₂, indicando uma concentração proporcionalmente maior que o imunomodulador original. Para o peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂ foi obtida a concentração de ~7 µM. Assim, é possível dizer que para os 50 µM de CHIM3-Y(NMe) utilizados neste ensaio, os quais poderiam gerar até 50 µM de WK(Y-NMe)M-NH₂, temos aproximadamente 15% disso, ou seja, 7 µM, sendo gerado.

Todas as concentrações obtidas a partir das áreas do pico para os ensaios de digestão com a *S. aureus* mostraram resultados abaixo do limite de quantificação, não sendo possível confirmar uma concentração exata para o WK(Y-NMe)M-NH₂ e WKYM-NH₂.

Assim sendo, faz-se necessário novos experimentos para uma quantificação e comparação mais precisa das porções agonistas de FPR2 provenientes de seus peptídeos parentais para as duas bactérias utilizadas. Esses novos experimentos de quantificação podem ser feitos via LC-MS, com novas curvas de calibração. Esse método poderia indicar com uma maior segurança qual dos picos que co-eluíram é deveras o peptídeo de interesse.

4.9. Avaliação in sílico de WK(Y-NMe)M-NH₂ como agonista do receptor FPR2 humano

O FPR2 é um receptor “promíscuo”, pois interage com moléculas de estruturas variadas. A literatura traz o padrão de mudança conformacional deste receptor ao se ligar ao agonista WKYVM-NH₂. Dadas as mudanças estruturais propostas no agonista WK(Y-NMe)M-NH₂, é importante avaliar as consequências desta modificação na ativação do receptor. A literatura demonstra que quando o FPR2 se liga ao peptídeo WKYVM-NH₂, observa-se um movimento da hélice VI e uma acomodação da estrutura⁶⁹. É com base nesse “movimento/ajuste” da estrutura causada pela interação com o agonista, que é dito que o receptor FPR2 apresenta uma “conformação ativa”⁶⁹.

A interação e posterior sensibilização do receptor depende de um intrincado e fino ajuste com o ligante. Alguns estudos, como o Tong Chen e colaboradores⁶⁹, indicam os aminoácidos que melhor interagem e causam uma mudança de conformação no receptor e sua ativação. Com base no agonista WKYVM-NH₂, foi observado que as interações (principalmente hidrofóbicas) entre o receptor e os resíduos peptídicos nas posições 3 (metionina), 5 (lisina) e 6 (triptofano), a partir da porção C – terminal, desempenham papéis críticos na mediação da atividade agonista e na sinalização através do receptor⁶⁹.

Para avaliação da atividade do peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂ como agonista do receptor FPR2 *in silico*, foi feito um mapeamento de interações entre os resíduos de aminoácidos do receptor e os agonistas WKYMVm-NH₂ e WKYM-NH₂ (Figura 35).

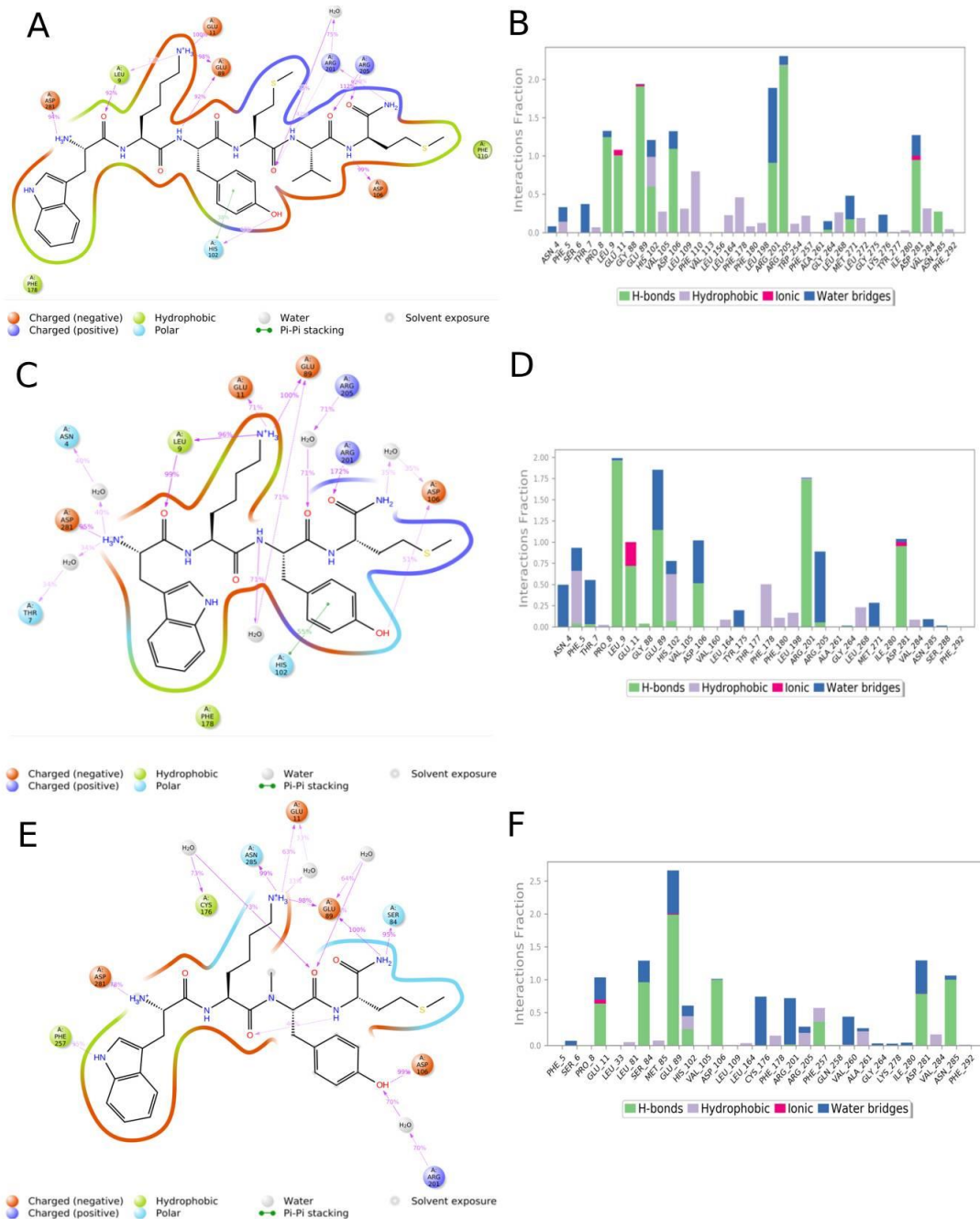
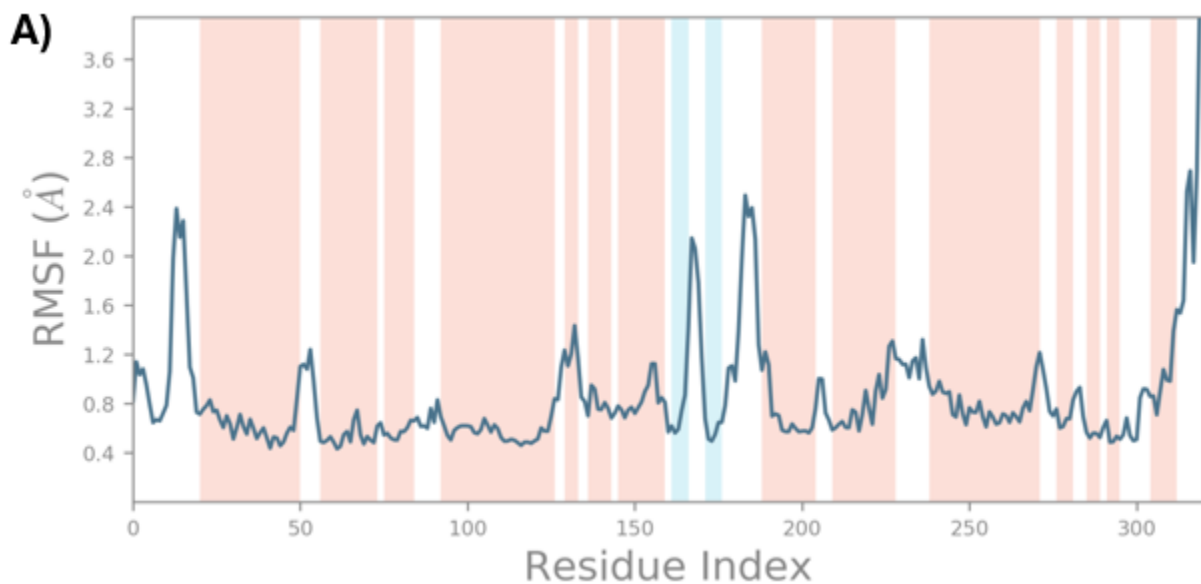


Figura 35: Estrutura dos agonistas de FPR2 e o mapeamento dos contatos com os aminoácidos do receptor. Cores relacionadas às regiões do receptor: Vermelho: Carga negativa; Verde claro: região hidrofóbica; Branco: água; Azul escuro: carga positiva; Azul claro: região polar. **A)** Peptídeo WKYMVm. **B)** Interações entre os

resíduos de aminoácidos do receptor com o ligante WKYMVm. **C)** Peptídeo WKYM. **D)** Interações entre os resíduos de aminoácidos do receptor com o ligante WKYM. As frações de interação indicam uma conservação significativa das interações quando comparada com o peptídeo WKYMVm. **E)** Peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂. **F)** Interações entre os resíduos de aminoácidos do receptor com o ligante WKY(Me)M. Observa-se uma diferença significativa nas frações de interações peptídeo-receptor, mas ainda ocorrendo na mesma região.

A análise das interações peptídeo-FPR2 nos permite entender quais resíduos compõem a interface entre as moléculas e como a estrutura geral do receptor se “conforma” na ligação com o agonista. Para obter maior confiabilidade nos resultados, a modelagem da interação do FPR2 com WKYMVm-NH₂ foi refeita, comparada com a literatura, e usada como base para a compreensão da interação dos demais agonistas de FPR2 avaliados por nosso grupo. Na figura 35, em **(A)**, temos o mapeamento das regiões do receptor FPR2 que interagem com o peptídeo WKYMVm-NH₂. Como visto na literatura, aglomerados contendo resíduos hidrofóbicos se mostram fundamentais na interação com a parte N-terminal deste peptídeo, em especial com os resíduos WK. Em **(B)** podemos observar as interações mais relevantes são as ligações de hidrogênio com os aminoácidos Arg 201, 205 e Glu 89 de FPR2, além de diversas interações formadas pelas estruturas apolares. Estas interações estão de acordo com a literatura⁶⁹. Em **(C)**, o peptídeo WKYM-NH₂, estudado por nosso grupo de pesquisa, conservou algumas interações fortes com o receptor em relação ao peptídeo de referência. Em **(D)**, nota-se as interações de WKYM-NH₂ com Arg201 e Glu89 do FPR2, mas já se observa uma mudança nas frações de interação peptídeo-receptor e nos aminoácidos que melhor interagem. Em **(E)**, o mapeamento de interações com o receptor FPR2 e o fragmento WK(Y-NMe)M-NH₂. Pode-se notar uma modificação proeminente nos resíduos de FPR2 que compõem a superfície de interação com este peptídeo. Para esta molécula, a interação com os aminoácidos Leu198 e Arg201 se tornaram significativamente menos relevantes e a interação com a Met85 passou a ser de grande relevância mediante ligação de hidrogênio. Provavelmente, existe uma interação do tipo ligação de hidrogênio entre o N-H da ligação amídica do resíduo de Tyr em WKYMVm-NH₂ de e o oxigênio da carbonila do resíduo Leu198, de forma que essa é interrompida com a metilação do átomo de nitrogênio em WK(Y-NMe)M-NH₂.

A mudança na conformação do receptor gerada a partir da interação com o agonista pode ser mensurada com base em estudos de RMSF, sigla em inglês para Root Mean Square Fluctuation (Raiz Quadrada Média da Flutuação). Esses dados nos fornecem uma medida do desvio médio das posições atômicas de suas posições médias originais ao longo do tempo em simulações de dinâmica molecular¹¹². Com isso, esse dado nos fornece informações sobre a flexibilidade e dinâmica de uma estrutura proteica ao longo de sua estrutura primária. As regiões com valores elevados de RMSF são normalmente mais flexíveis, enquanto as regiões com valores baixos de RMSF são mais rígidas. Na figura 35 abaixo, temos a comparação de qual região e de como a estrutura do receptor FPR2 se conforma a partir da interação com os peptídeos.



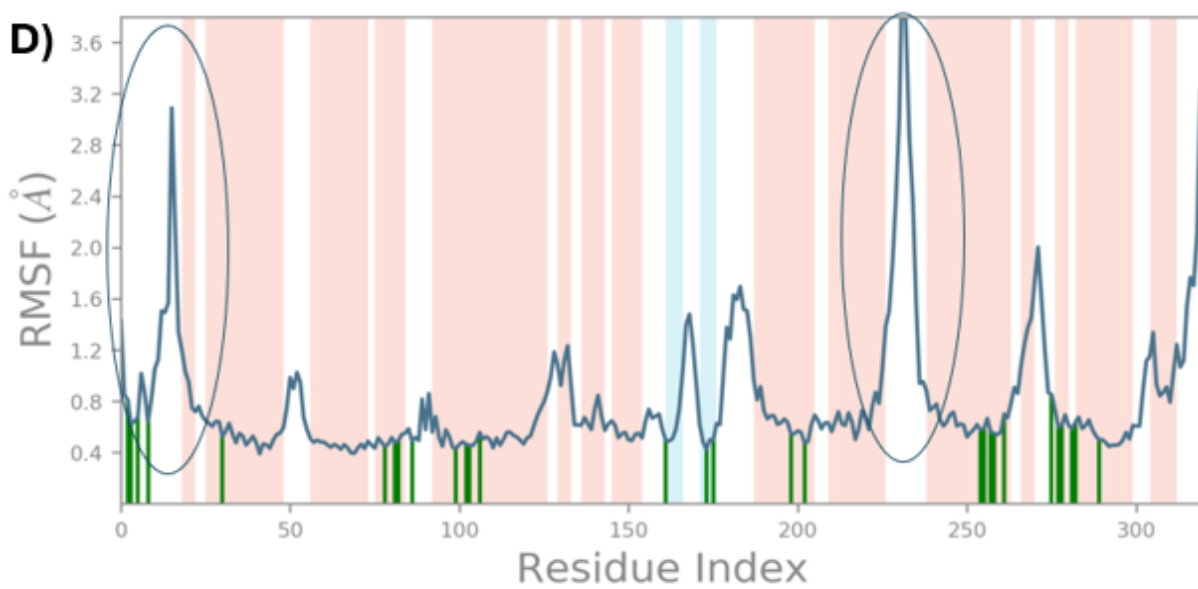
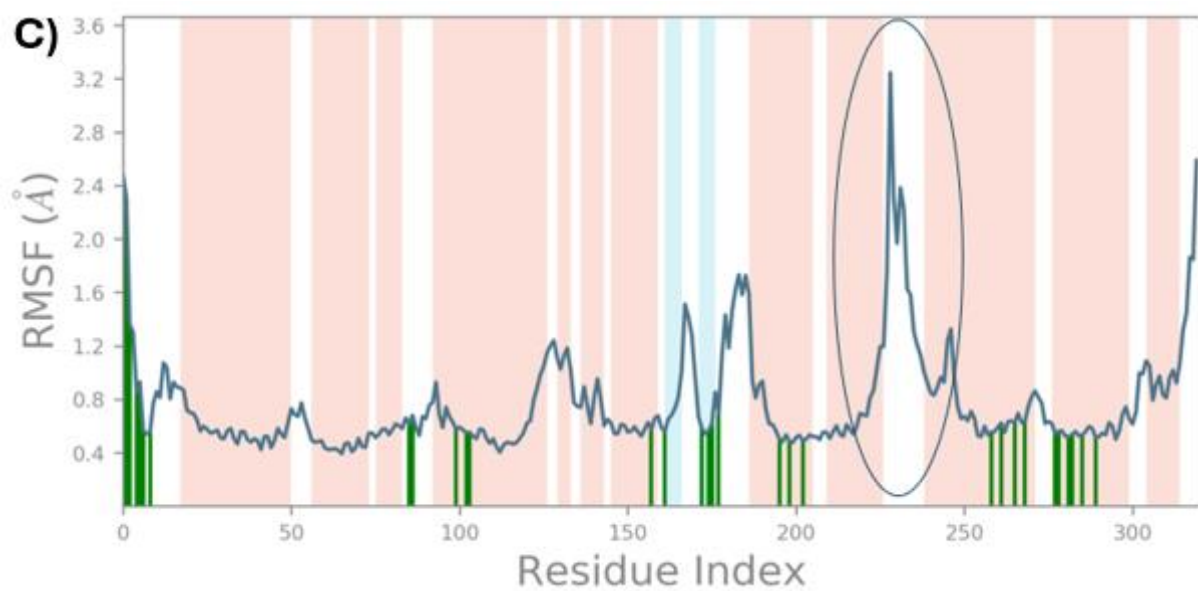
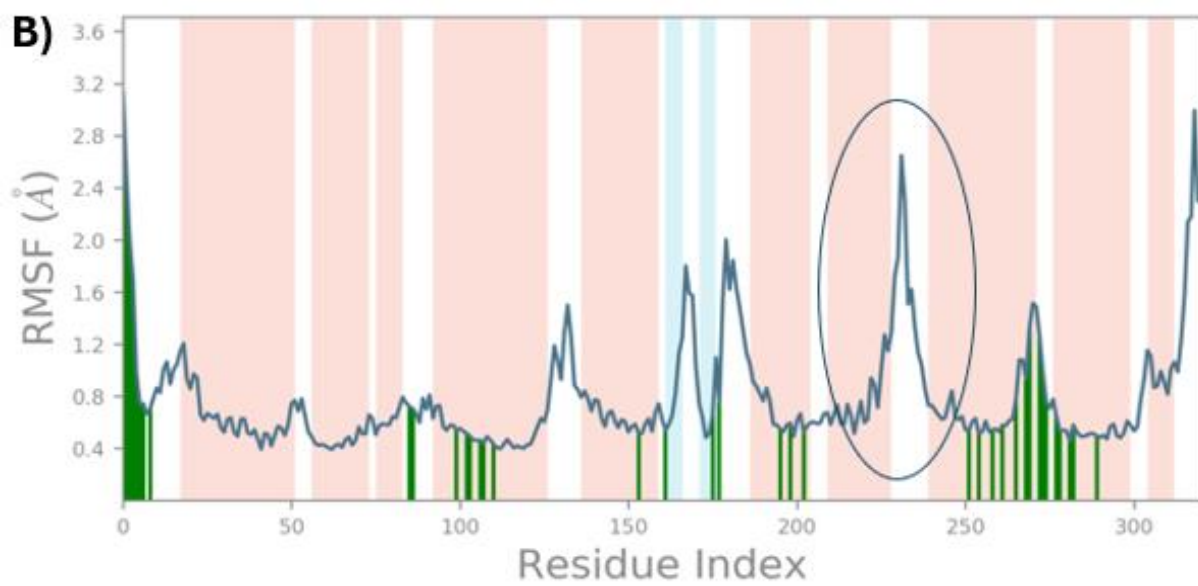


Figura 36: Estudos comparativos de RMSF (Root Mean Square Fluctuation) do receptor FPR2 sem a presença de ligantes ou na presença dos ligantes WKYMVm-NH₂; WKYM-NH₂ ou WK(Y-NMe)M-NH₂. **A)** Dinâmica do receptor FPR2 sem nenhum ligante. **B)** Dinâmica molecular com o peptídeo WKYMVm-NH₂ (com D-Met no C-terminal). **C)** Dinâmica molecular com o peptídeo WKYM-NH₂. **D)** Dinâmica molecular com o peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂.

Comparando a dinâmica molecular do FPR2 sem nenhum agonista **(A)** e a interação com os peptídeos WKYMVm-NH₂ **(B)**, WKYM-NH₂ **(C)** e o WK(Y-NMe)M-NH₂ **(D)**, podemos observar que a interação com os peptídeos induz o aumento do RMSF em uma região específica do receptor. Essa região está compreendida entre o resíduo 226 e 246 da proteína, sendo o maior RMSF atribuído ao resíduo Ile234. Essa região é equivalente ao loop citoplasmático do receptor entre as hélices V e VI, o que indica que a interação destas moléculas com FPR2 aumenta a mobilidade dessa região. A literatura indica que WKYMVm-NH₂ gera uma movimentação da hélice VI para fora e que esta seria a característica que marca uma conformação ativa deste receptor. É interessante observar que todos os ligantes avaliados promovem aumento de RMSF na mesma região do receptor, no entanto, com intensidades diferentes. O peptídeo WKYMVm-NH₂ e WKYM-NH₂ de maneira muito similar, mas o peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂, apesar de ser na mesma região, de maneira mais intensa e, com o *acrescentum* de provocar uma mudança conformacional na região entre os resíduos 15-20 do receptor. Não se sabe o que isso significa em termos de padrão de ativação deste receptor, dada a complexidade das vias de sinalização decorrentes de sua ativação.¹¹³

Em suma, esses dados indicam que o peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂ embora apresente outros pontos de contato com FPR2, induz uma transição conformacional compatível com WKYMVm-NH₂. Assim, conclui-se que este peptídeo continua sendo um potencial modulador de FPR2 apesar da modificação feita. Resta avaliar isso experimentalmente para validar o modelo gerado.

4.10. Ensaios de viabilidade celular e potencial de estimulação dos macrófagos com WK(Y-NMe)M-NH₂

Como visto no presente trabalho, o peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂, proveniente de hidrólise de CHIM3-Y(NMe), teve maior tempo de vida nos ensaios com bactérias que sua versão não modificada, WKYM-NH₂. Além disso, WK(Y-NMe)M-NH₂ foi capaz de induzir mudanças conformacionais em FPR2 compatíveis com sua ativação. Com esse objetivo alcançado, é necessário verificar se a N-metilação da tirosina em WK(Y-NMe)M-NH₂ não afetou sua citotoxicidade. Para tal, foi medida a viabilidade de células a partir da incubação com este peptídeo. Além disso, foram feitos experimentos para depois verificar se esta molécula atua como um potencial agonista de FPR2 em macrófagos murinos (BMDM).

Para isso, foram realizados ensaios de MTT com o WK(Y-NMe)M-NH₂ incubado com BMDM, no período de 24h, nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10,0 µM (Figura 37). BMDM são células hematopoiéticas fagocíticas proveniente da medula óssea de camundongos. Os ensaios de MTT são amplamente empregados para a avaliação da atividade metabólica celular e da funcionalidade das mitocôndrias. O sal de MTT (coloração amarela) tem a capacidade de penetrar nas células e suas mitocôndrias, por conta de sua polaridade positiva. Caso um conjunto de células esteja vivo e ativo, ocorre a metabolização (redução do anel tetrazólico) do MTT em cristais de formazan (coloração púrpura), pela ação de desidrogenases mitocondriais, consistindo em um método colorimétrico. Portanto, esse método empregado, tem por objetivo avaliar a citotoxicidade do WK(Y-NMe)M-NH₂.

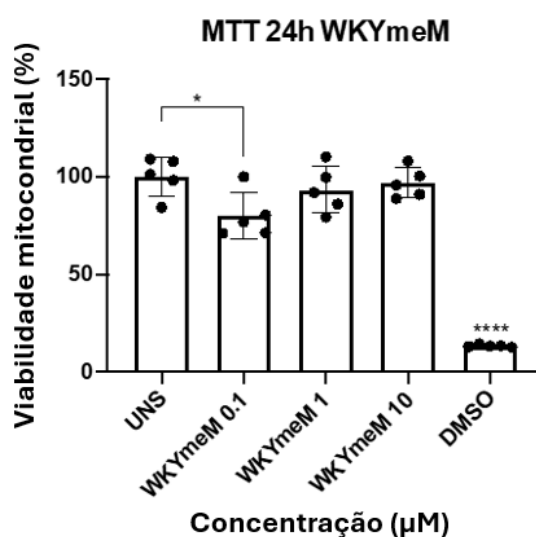


Figura 37: Ensaio de viabilidade celular (MTT) na presença de WK(Y-NMe)M-NH₂: Os ensaios foram realizados em três concentrações diferentes de peptídeo: 0,1, 1,0 e 10,0 μM, em comparação a células não-estimuladas (UNS), no tempo total de 24h. Os resultados indicam que a presença do peptídeo não afetou, de maneira expressiva, a viabilidade celular (mitocondrial).

Os resultados obtidos nos ensaios de MTT apontam que a presença do peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂ na concentração de 0,1 μM reduz a viabilidade destas células, embora o mesmo não seja observado para concentrações peptídicas mais altas. No entanto, embora seja um dado estatisticamente significativo, é provável que seja decorrente de uma variação analítica. Isso porque no período de 24h, não houve uma tendência no aumento da citotoxicidade com o aumento da concentração do peptídeo. Esse resultado de grande importância para futuras aplicações *in vivo*, já que uma baixa toxicidade relativa poderia viabilizar seu uso, gerando menos efeitos colaterais indesejados.

Constatada a baixa toxicidade do WK(Y-NMe)M-NH₂, ainda persiste a investigação sobre a manutenção do seu potencial de estímulo do sistema imune e posterior quimiotaxia. Para isso, foram realizados ensaios imuno enzimáticos (ELISA -enzyme-linked immunosorbent assay), que permite detectar e quantificar substâncias solúveis, como peptídeos, proteínas, anticorpos etc.^{114, 115}. Nesse tipo de ensaio, a macromolécula alvo (antígeno) é imobilizada em uma superfície sólida (microplaca) e então complexada com um anticorpo que está ligado a uma enzima repórter. O processo de detecção é feito medindo a atividade da enzima repórter através da incubação com o substrato apropriado para produzir um produto mensurável. No presente caso, foi dosado a citocina TNF-α, que é formada pelo processo de estímulo. Dessa forma, podemos ter uma métrica do quão efetivo está sendo o peptídeo WK(Y-NMe)M na estimulação das células BMDM.

Para o ensaio, foi feito o estímulo de células BMDM¹⁰⁵⁷⁰ no tempo de 24h, com concentrações de 0,1; 1,0; e 10,0 μM deste peptídeo (Figura 38).

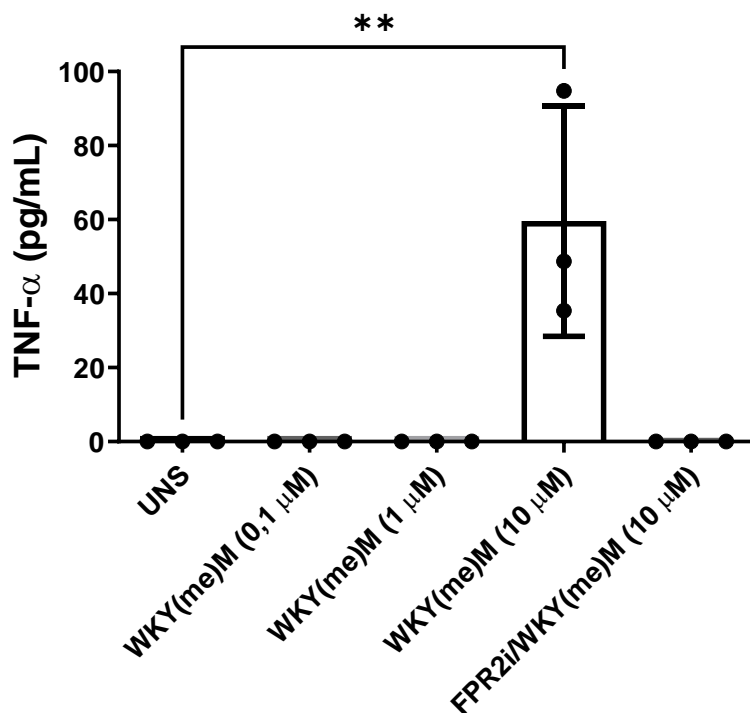


Figura 38: Ensaio de estímulo de células BMDM no tempo de 24h: TNF- α liberado pelos BMDM para as concentrações de peptídeo: 0,1; 1,0; e 10,0 μ M em comparação a células não-estimuladas (UNS). Não se observou diferença significativa e nem expressiva na produção de TNF- α nas concentrações de 0,1 e 1,0 μ M. No entanto, detectado um significativo estímulo motivado pelo peptídeo na concentração de 10,00 μ M. O ensaio com WK(Y-NMe)M feito na presença do inibidor (FPR2i) provocou uma baixa produção de TFN- α .

Os ensaios de estímulo das células de BMDM (24h) com WK(Y-NMe)M-NH₂ e posterior medição da concentração de TNF- α (pg/mL) em solução, indicaram que esta molécula retém a capacidade de ativar FPR2. Os dados demonstram que não houve uma diferença significativa na produção de TNF- α para WK(Y-NMe)M-NH₂ a 0,1 e 1,0 μ M frente a UNS. Entretanto, esse estímulo se mostrou expressivo com concentração do peptídeo igual a 10,0 μ M. O ensaio feito na presença de 10,0 μ M do inibidor de FPR2 WRW4 (WRWWWW)¹¹⁶ e da mesma concentração de WK(Y-NMe)M-NH₂ indicam que a liberação de TNF- α ocorreu mesmo mediante agonismo de FPR2 (Figura 37, FPR2i/WKY(me)M). Este inibidor foi sintetizado e purificado pelo nosso grupo de pesquisa por síntese de peptídeos em fase sólida, sigla em inglês para SPPS pelo método t-Bu/Fmoc. O cromatograma da purificação por CLAE e sua

caracterização por espectrometria de massas constam no anexo J. A presença deste em mesma concentração de WK(Y-NMe)M-NH₂ reduziu significativamente a produção de TNF- α em relação ao agonista isolado. Esse resultado é importante, pois nos comprova que a ação apresentada pelo peptídeo WK(Y-NMe)M está sendo efetivamente no receptor FPR2.

É importante destacar que a ativação do receptor FPR2 pode levar a diferentes vias de sinalização intracelular.¹¹⁶ É possível que, em ensaios controlados utilizando o WK(Y-NMe)M-NH₂ e células de BMDM, fomentem a produção de TNF- α e por consequência uma provável resposta pró-inflamatória, como o demonstrado no experimento. Mas ensaios complementares ainda são necessários para a avaliação do potencial quimiotático com base na concentração de TNF- α formado nos ensaios e ainda da atuação do WK(Y-NMe)M-NH₂ em células já ativadas por fatores pró-inflamatórios, como o LPS. Destacando, como já argumentado no presente trabalho, que a atuação de agonistas de FPR2 podem gerar processos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios, dependendo do contexto. Por exemplo, o estudo realizado por Trojan e colaboradores¹¹³, utilizando cultura de células do hipocampo, mostrou que o agonista de FPR2, MR-39 pode, sozinho, estimular fatores pró-inflamatórios, como a liberação de TNF- α . Entretanto, esse agonista inibiu a produção de citocinas em células previamente estimuladas por LPS. Isso mostra que o papel desses inibidores pode ser divergente dependendo da circunstância a qual se encontra.

Os ensaios de imunoestimulação de BMDM com WK(Y-NMe)M-NH₂ indicam que, mesmo com a modificação estrutural em relação a WKYM-NH₂, este foi capaz de estimular as BMDM. Este, contudo, é um trabalho em andamento e o perfil de ativação destas células será avaliado usando outras metodologias, como a quantificação de corpúsculos lipídicos. Estamos adquirindo mais dados relativos ao perfil imunológico de WK(Y-NMe)M-NH₂ para uma maior confiabilidade dos resultados obtidos.

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que houve êxito na síntese em fase sólida, na purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), na identificação e no sequenciamento por espectrometria de massa do peptídeo CHIM3. Também foram bem-sucedidos os mesmos procedimentos realizados com a variante do CHIM3, o peptídeo CHIM3–Y(NMe), confirmando o desenho racional de sua sequência incluindo as regiões de reconhecimento enzimático de tripsinas e da Spase I, juntamente como a porção carreadora e a região imunomoduladora com e sem a metilação na tirosina.

Os fragmentos peptídicos: WKYM-NH₂ e WK(Y-NMe)NH₂, sintetizados quimicamente em fase sólida, de acordo com os mesmos protocolos utilizados para o CHIM3 e CHIM3 – Y(NMe), foram obtidos com sucesso e sem contratempos nas etapas de purificação e caracterização por MS.

Para o CHIM3, os ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) mostraram valores de 4 µM ± 0 para a *E. coli* e de aproximadamente 5,33 µM ± 1,89 para a *S. aureus*, e da Concentração Microbicida Mínima (CMM) valores de 6,67 µM ± 1,89 para a *E. coli* e 5,33 µM ± 1,89 para a *S. aureus*. Os resultados encontrados foram acima da CIM e do CMM do antibiótico de comparação Gentamicina, mas ainda com valores significativamente baixos, demonstrando uma atividade antimicrobiana significativa.

A análise por LC-MS comprovou que o peptídeo CHIM3 sofreu uma intensa atividade proteolítica após incubação com *E. coli* e *S. aureus* por 16h, gerando um amplo leque de fragmentos. Esses fragmentos de material proteico podem ter sido gerados por uma variedade significativa de proteases diferentes que são expressas por essas duas bactérias. Também pode-se atestar que o sítio referente à atividade proteolítica preferencial da Spase I sofreu proteólise, indicando a atividade dessa enzima. Apesar disso, compreende-se que são dados que ainda carecem de experimentos adicionais para a comprovação que essa proteólise está realmente sendo feita pela ação da Peptidase Sinal I.

Além disso, foi possível comprovar que para ambas as bactérias ocorreu a liberação do agonista de FPR2, WKYM-NH₂ mesmo a partir de CHIM3 na menor concentração testada, de 5µM. Isso é um dado de significativa importância já que

essa liberação foi dependente apenas da atividade proteolítica das enzimas expressas pelas próprias bactérias sem a adição de proteases exógenas, reforçando a hipótese de que é possível a liberação desse agonista a partir da ação de bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas.

Também foi possível verificar que, em *E. coli*, o comportamento de proteólise se intensificou com o aumento da concentração de peptídeo no meio, mas foi um comportamento antagônico quando comparado com a *S. aureus*, onde a taxa de digestão do CHIM3 parece ter sido mais seletiva e decrescente com o aumento da concentração do peptídeo. A hipótese primária é que as bactérias podem se adaptar a um meio pobre em açúcares, o que demandaria um certo tempo em meio tamponado e adicionado de peptídeos. Parte dessa adaptação é a expressão de proteases. As bactérias que morrem rapidamente não têm tempo para tal e com isso o meio fica pobre em proteases. No primeiro caso, com a *E. coli*, aparentemente o aumento da concentração do CHIM3 pouco influi na atividade de protease das enzimas, tanto exoenzimas quanto as embebidas em membrana, como a Spase I. No segundo caso, em *S. aureus*, o aumento da concentração do peptídeo mostra ter inutilizado total ou parcialmente o conjunto de enzimas responsáveis pela digestão do peptídeo.

Os ensaios feitos para o CHIM3 corroboram com a eficácia da atividade dual do peptídeo, tanto sua atividade antimicrobiana com ação direta na membrana, comportamento já esperado pela estrutura do Hs02 presente no CHIM3, quanto da capacidade atestada da liberação do agonista de FPR2, WKYM-NH₂ em um meio significativamente complexo e sem a adição de proteases exógenas para a aumentar a taxa de liberação desse imunomodulador no meio.

Mesmo com características adequadas e necessárias, ainda foi possível a otimização da estrutura racionalizada inicialmente. Essa modificação foi alcançada pela síntese do peptídeo CHIM3 utilizando o aminoácido tirosina metilado, Y-NMe, na porção do agonista de FPR2, WKY-(NMe)M-NH₂, tendo como objetivo diminuir ou até mesmo inibir a proteólise entre as ligações lisina-tirosina (WK-↓-YM-NH₂) e aumentar o tempo de vida *in situ* do agonista de FPR2. Essa modificação específica foi pensada de forma a não alterar, de maneira significativa, as propriedades físico-químicas da

estrutura peptídica original (CHIM3) e dificultar o reconhecimento enzimático de proteases extracelulares.

Após a síntese, caracterização e purificação do peptídeo CHIM3 – Y(NMe), novos ensaios de CIM e CMM foram feitos para as mesmas bactérias. Foram obtidos os valores de $3 \mu\text{M} \pm 1,09$ para a *S. aureus* e $2,33 \mu\text{M} \pm 0,81$, e da CMM valores de $5 \mu\text{M} \pm 2,44$ para a *S. aureus* e $3 \mu\text{M} \pm 1,09$ para *E. coli*. Esses resultados não apresentaram diferença significativa para as concentrações de CIM ou CMM quando comparado ao peptídeo CHIM3, corroborando o fato de que a modificação estrutural (metilação) não causou perda na atividade microbiana do peptídeo.

A quantificação pela área dos picos, obtidos por CLAE e a posterior comparação das concentrações dos peptídeos formados na digestão, WKYM-NH₂ e WK(Y-NMe)M-NH₂ para as duas bactérias, se mostrou muito desafiadora, visto a concentração desses peptídeos terem ficado próxima ou abaixo do limite de quantificação obtido para as curvas. Entretanto, os picos que co-eluíram na região referente ao tempo de retenção do peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂, para *E. coli*, foram proporcionalmente maiores que os encontrados para o peptídeo WKYM-NH₂, que ficou abaixo do limite de quantificação, solidando com os dados da quantificação relativa por LC-MS, de que a concentração do peptídeo metilado, *in situ*, é maior que o não metilado.

A avaliação *in silico* da interação de WK(Y-NMe)M com o FPR2 em relação das outras estruturas já estudadas indicam que o imunomodulador metilado provoca mudanças conformacionais na mesma região do receptor e com intensidade similar, apontando uma capacidade semelhante ao WKYMVm-NH₂ de ativar esse receptor.

Ainda, ensaios de viabilidade celular (MTT) foram realizados com o objetivo de assegurar a baixa citotoxicidade do fragmento gerado *post* digestão WK(Y-NMe)M-NH₂, mostrando não haver, mesmo após um período de 24h e em diferentes concentrações de 0,1 a 10,0 μM , citotoxicidade significativa. Ensaios de estímulo de células BMDM com WK(Y-NMe)NH₂ e monitoramento do TNF- α indicaram a capacidade de estímulo do fragmento mesmo após a modificação, apresentando um máximo de estímulo na concentração de 10,0 μM e não apresentando diferenças significativas para as concentrações de 0,1 e 1,0 μM .

Os resultados aqui obtidos e as otimizações feitas nos peptídeos da série CHIM apresentaram, de acordo com a expectativa, uma melhora na sua estabilidade em um microambiente rico em bactérias e rico em proteases. Além das melhorias propostas para o peptídeo CHIM3, o presente trabalho também demonstrou possibilidades de aplicações *in vivo* dessas moléculas multifuncionais. As conclusões alcançadas possibilitaram a melhora do entendimento dessa classe de moléculas e do seu comportamento frente a um ambiente significativamente mais complexo. É mais um passo em direção a moléculas que possuam uma melhor estabilidade à proteólise e consequente aumento de sua vida, podendo, dessa forma, não só acumular nas membranas bacterianas, como liberar a fração imunomoduladora sem a adição de enzimas exógenas. Abriu-se um caminho promissor para o desenho de uma nova geração de moléculas da série CHIM. O presente trabalho tem a capacidade, portanto, de servir como base para modificações estruturais futuras visando a redução ainda mais significativa de proteólises em regiões que não as de interesse. Dessa forma, em um futuro próximo, essa classe de moléculas poderá ser mais um recurso como alternativa diante de infecções bacterianas, tanto de Gram – positivas, quanto de Gram – negativas.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Juretić, D. Designed Multifunctional Peptides for Intracellular Targets. *Antibiotics* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091196> (2022).
2. Viana de Freitas, T. *et al.* Release of immunomodulatory peptides at bacterial membrane interfaces as a novel strategy to fight microorganisms. *Journal of Biological Chemistry* **299**, 103056 (2023).
3. Ganev, A. L. *et al.* Células : uma breve revisão sobre a diversidade , características , organização , estruturas e funções celulares Cells : a brief review of the diversity , characteristics , organization , structures and cellular functions. *UNISANTA Bioscience* **8**, 457–465 (2019).
4. Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R. & Casadevall, A. Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* **13**, 620–630 (2015).
5. Sohlenkamp, C. & Geiger, O. Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol Rev* **40**, 133–159 (2015).
6. Young, S. A., Desbois, A. P., Coote, P. J. & Smith, T. K. Characterisation of *Staphylococcus aureus* lipids by nanoelectrospray ionisation tandem mass spectrometry (nESI-MS/MS). *bioRxiv* (2019) doi:10.1101/593483.
7. Travkova, O. G., Moehwald, H. & Brezesinski, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Adv Colloid Interface Sci* **247**, 521–532 (2017).
8. Fidler, I. J., Schroit, A. J., Connor, J., Bucana, C. D. & Fidler, I. J. Elevated Expression of Phosphatidylserine in the Outer Membrane Leaflet of Human Tumor Cells and Recognition by Activated Human Blood Monocytes. *Cancer Res* **51**, 3062–3066 (1991).
9. Hurdle, J. G., O’Neill, A. J., Chopra, I. & Lee, R. E. Targeting bacterial membrane function: An underexploited mechanism for treating persistent infections. *Nat Rev Microbiol* **9**, 62–75 (2011).
10. Halder, S. *et al.* Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *Springerplus* **4**, 1–14 (2015).
11. Hong, Y. & Brown, D. G. Cell surface acid-base properties of *Escherichia coli* and *Bacillus brevis* and variation as a function of growth phase, nitrogen source and C:N ratio. *Colloids Surf B Biointerfaces* **50**, 112–119 (2006).
12. Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, (2010).
13. Poolman, J. T. *Escherichia Coli*. *International Encyclopedia of Public Health* vol. 2 (Elsevier, 2016).
14. Percival, S. L. & Williams, D. W. *Escherichia Coli*. *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks: Second Edition* (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8.
15. Wang, B. & Muir, T. W. Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell Chem Biol* **23**, 214–224 (2016).
16. Gnanamani, A., Hariharan, P. & Paul-Satyaseela, M. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. *Frontiers in Staphylococcus aureus* (2017) doi:10.5772/67338.
17. Wang, B. & Muir, T. W. Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell Chem Biol* **23**, 214–224 (2016).

18. Gnanamani, A., Hariharan, P. & Paul-Satyaseela, M. Staphylococcus aureus: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. *Frontiers in Staphylococcus aureus* (2017) doi:10.5772/67338.
19. Ruiz-Perez, F. & Nataro, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: Classification, specificity, and role in virulence. *Cellular and Molecular Life Sciences* **71**, 745–770 (2014).
20. Stach, N., Kaszycki, P., Wladyka, B. & Dubin, G. *Extracellular Proteases of Staphylococcus Spp. Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress* (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/B978-0-12-813547-1.00011-X.
21. Lazdunski, A. M. Peptidases and proteases of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *FEMS Microbiol Lett* **63**, 265–276 (1989).
22. Stach, N., Kaszycki, P., Wladyka, B. & Dubin, G. *Extracellular Proteases of Staphylococcus Spp. Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress* (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/B978-0-12-813547-1.00011-X.
23. Tam, K. & Torres, V. J. Staphylococcus aureus secreted toxins and extracellular enzymes. *Gram-Positive Pathogens* 640–668 (2019) doi:10.1128/9781683670131.ch40.
24. Schechter, I. & Berger, A. *Biochemical and Biophysical Research Communications on the Size of the Active Site in Proteases. I. PAPAIN*. vol. 27 (1967).
25. Miller, C. G. Peptidases and proteases of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *Annu Rev Microbiol* 485–504 (1975). doi: 10.1146/annurev.mi.29.100175.002413
26. Stach, N. *et al.* Unique Substrate Specificity of SplE Serine Protease from Staphylococcus aureus. *Structure* **26**, 572–579.e4 (2018).
27. Gottesman, S. Proteases and their targets in Escherichia coli. *Annu Rev Genet* **30**, 465–506 (1996).
28. Brand, G. D. *et al.* Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. *PLoS One* **14**, 1–20 (2019).
29. Wang, B., Zhao, A., Novick, R. P. & Muir, T. W. Key driving forces in the biosynthesis of autoinducing peptides required for staphylococcal virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 10679–10684 (2015).
30. Kavanaugh, J. S., Thoendel, M. & Horswill, A. R. A role for type I signal peptidase in Staphylococcus aureus quorum sensing. *Mol Microbiol* **65**, 780–798 (2007).
31. Schwartz, K. *et al.* The AgrD N-terminal leader peptide of Staphylococcus aureus has cytolytic and amyloidogenic properties. *Infect Immun* **82**, 3837–3844 (2014).
32. Chimalapati, S., Sankaran, K. & Brown, J. S. Signal Peptidase II. *Handbook of Proteolytic Enzymes* **1**, 258–261 (2013).
33. Misal, S. A., Li, S., Tang, H., Radivojac, P. & Reilly, J. P. Identification of N-terminal protein processing sites by chemical labeling mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **33**, 1015–1023 (2019).
34. Paetzl, M. *Bacterial Signal Peptidases. Subcellular Biochemistry* vol. 92 (2019).
35. Auclair, S. M., Bhanu, M. K. & Kendall, D. A. Signal peptidase I: Cleaving the way to mature proteins. *Protein Science* **21**, 13–25 (2012).
36. Tuteja, R. Type I signal peptidase: An overview. *Arch Biochem Biophys* **441**, 107–111 (2005).
37. Sargent, F. The twin-arginine transport system: Moving folded proteins across membranes. *Biochem Soc Trans* **35**, 835–847 (2007).
38. Craney, A. & Romesberg, F. E. The inhibition of type I bacterial signal peptidase: Biological consequences and therapeutic potential. *Bioorg Med Chem Lett* **25**, 4761–4766 (2015).

39. Paes, J. A. Caracterização funcional e imunológica da sinal-peptidase I de *Mycoplasma hyopneumoniae*. (2015).
40. Madigan, Martinko, Bender, Buckley, Stahl. *Microbiologia de Brock*. 14^o Edição. Artmed editora LTDA (2016).
41. Tortora, G. J., Funke, B. R. and Case, C. L. *Anatomia Funcional de Células Procarióticas e Eucarióticas*. *Microbiologia* (2000).
42. Upadhy R, K., Shenoy, L. & Venkateswaran, R. Effect of intravenous dexmedetomidine administered as bolus or as bolus-plus-infusion on subarachnoid anesthesia with hyperbaric bupivacaine. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* **34**, 46–50 (2018).
43. Bukhari, S. A. *et al.* Biochemistry of Drugs Action and their Resistance Mechanism: A Brief Discussion. *Frontiers in Chemical Sciences* **2**, 73–96 (2021).
44. Oeschger, T., Kret, L. & Erickson, D. Multiplexed paper-based assay for personalized antimicrobial susceptibility profiling of Carbapenem-resistant Enterobacterales performed in a rechargeable coffee mug. *Sci Rep* **12**, 1–8 (2022).
45. Michael, Baym *et al.* Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science* **3072**, 598–600 (2014). doi: 10.1126/science.aag0822
46. Bufe, B. *et al.* Recognition of bacterial signal peptides by mammalian formyl peptide receptors: A new mechanism for sensing pathogens. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 7369–7387 (2015).
47. Bruton, G. *et al.* Lipopeptide substrates for SpsB, the *Staphylococcus aureus* type I signal peptidase: Design, conformation and conversion to α -ketoamide inhibitors. *Eur J Med Chem* **38**, 351–356 (2003).
48. Smith, P. A. *et al.* Optimized arylomycins are a new class of Gram-negative antibiotics. *Nature* **561**, 189–194 (2018).
49. Rao, S. *et al.* Enzymatic investigation of the *Staphylococcus aureus* type I signal peptidase SpsB - Implications for the search for novel antibiotics. *FEBS Journal* **276**, 3222–3234 (2009).
50. Avci, F. G., Akbulut, B. S. & Ozkirimli, E. Membrane active peptides and their biophysical characterization. *Biomolecules* **8**, 1–43 (2018).
51. Murphy, M. P. & Levine, H. Alzheimer's disease and the amyloid- β peptide. *Journal of Alzheimer's Disease* **19**, 311–323 (2010).
52. Chirag M Lakhani¹, Braden T Tierney, Arjun K Manrai, Jian Yang, Peter M Visscher and Chirag J Patel, Department & Kushner. HHS Public Access. *Physiol Behav* **176**, 139–148 (2017).
53. Liu, C. & Gu, Y. Noninvasive optical imaging of staphylococcus aureus infection in vivo using an antimicrobial peptide fragment based near-infrared fluorescent probes. *J Innov Opt Health Sci* **6**, 1–9 (2013).
54. Wan, H. X. *et al.* Discovery of Trp-Nle-Tyr-Met as a novel agonist for human formyl peptide receptor-like 1. *Biochem Pharmacol* **74**, 317–326 (2007).
55. Brand, G. D. *et al.* Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. *PLoS One* **7**, (2012).
56. Bessa, L. J. *et al.* Intragenic antimicrobial peptide Hs02 hampers the proliferation of single-and dual-species biofilms of *P. Aeruginosa* and *S. aureus*: A promising agent for mitigation of biofilm-associated infections. *Int J Mol Sci* **20**, 8–10 (2019).
57. Cattaneo, F., Parisi, M. & Ammendola, R. *Distinct Signaling Cascades Elicited by Different Formyl Peptide Receptor 2 (FPR2) Agonists*. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 14 (2013).
58. Chan, W. & White, P. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press (2000).

59. Tsai, Y. F., Yang, S. C. & Hwang, T. L. Formyl peptide receptor modulators: a patent review and potential applications for inflammatory diseases (2012-2015). *Expert Opin Ther Pat* **26**, 1139–1156 (2016).
60. Migeotte, I., Communi, D. & Parmentier, M. Formyl peptide receptors: A promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 501–519 (2006).
61. Jeong, Y. S. & Bae, Y. S. Formyl peptide receptors in the mucosal immune system. *Exp Mol Med* **52**, 1694–1704 (2020).
62. Rabiet, M. J., Macari, L., Dahlgren, C. & Boulay, F. N-formyl peptide receptor 3 (FPR3) departs from the homologous FPR2/ALX receptor with regard to the major processes governing chemoattractant receptor regulation, expression at the cell surface, and phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 26718–26731 (2011).
63. Snapkov, I. *et al.* The role of formyl peptide receptor 1 (FPR1) in neuroblastoma tumorigenesis. *BMC Cancer* **16**, 1–12 (2016).
64. Sahan, A. Z., Hazra, T. K. & Das, S. The Pivotal role of DNA repair in infection mediated-inflammation and cancer. *Front Microbiol* **9**, 1–17 (2018).
65. Chong, Y. P., Ia, K. K., Mulhern, T. D. & Cheng, H. C. Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. in *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* vol. 1754 210–220 (2005).
66. Yücel, G. *et al.* Lipopolysaccharides induced inflammatory responses and electrophysiological dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Sci Rep* **7**, 1–13 (2017).
67. Kim, S. D. *et al.* The Agonists of Formyl Peptide Receptors Prevent Development of Severe Sepsis after Microbial Infection. *The Journal of Immunology* **185**, 4302–4310 (2010).
68. Cattaneo, F., Parisi, M. & Ammendola, R. *Distinct Signaling Cascades Elicited by Different Formyl Peptide Receptor 2 (FPR2) Agonists*. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 14 (2013).
69. Chen, T. *et al.* Structural basis of ligand binding modes at the human formyl peptide receptor 2. *Nat Commun* **11**, (2020).
70. Santos, E. G. F. B. B. D. B. D. S. V. A. S. J. N. Dos. Receptores Toll-Like : ativação e regulação da resposta imune Toll-Like Receptors : regulation of the immune responses. *RGO - Rev Gaúcha Odontol.* **59**, 483–490 (2011).
71. Vitale, R. F. & Ribeiro, F. de A. Q. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. *Revista brasileira de otorrinolaringologia (English ed.)* **73**, 117–121 (2007).
72. Viana de Freitas, T. *et al.* Release of immunomodulatory peptides at bacterial membrane interfaces as a novel strategy to fight microorganisms. *Journal of Biological Chemistry* **299**, 103056 (2023).
73. Sharkov, N. A. & Cai, D. Discovery of substrate for type I signal peptidase SpsB from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 5796–5803 (2002).
74. Kavanaugh, J. S., Thoendel, M. & Horswill, A. R. A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Mol Microbiol* **65**, 780–798 (2007).
75. Bessa, L. J. *et al.* Intragenic antimicrobial peptide Hs02 hampers the proliferation of single-and dual-species biofilms of *P. Aeruginosa* and *S. aureus*: A promising agent for mitigation of biofilm-associated infections. *Int J Mol Sci* **20**, 8–10 (2019).
76. Beck, A. *et al.* Stability and CTL activity of N-terminal glutamic acid containing peptides. *Journal of Peptide Research* **57**, 528–538 (2001).

77. Chatterjee, J., Rechenmacher, F. & Kessler, H. N-Methylation of peptides and proteins: An important element for modulating biological functions. *Angewandte Chemie - International Edition* **52**, 254–269 (2013).
78. Fiacco, S. V. & Roberts, R. W. N-methyl scanning mutagenesis generates protease-resistant G protein ligands with improved affinity and selectivity. *ChemBioChem* **9**, 2200–2203 (2008).
79. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition*. vol. 32 (2012).
80. Pucihar, G., Kotnik, T. & Miklavčič, D. Measuring the induced membrane voltage with Di-8-ANEPPS. *Journal of Visualized Experiments* 2009 (2009) doi:10.3791/1659.
81. Tuteja, R. Type I signal peptidase: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* vol. 441 107–111 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.07.013> (2005).
82. Delmar, M. *et al.* Marcelo Delmar Cantú e Emanuel Carrilho. **31**, 669–675 (2008).
83. Ramada, M. H. S. *et al.* Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. *Sci Rep* **7**, 1–14 (2017).
84. Brand, G. D. *et al.* Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Anti-trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 49332–49340 (2002).
85. Makowski, M. *et al.* EcDBS1R4, an antimicrobial peptide effective against *Escherichia coli* with in vitro fusogenic ability. *Int J Mol Sci* **21**, 1–19 (2020).
86. Felício, M. R. *et al.* Polyalanine peptide variations may have different mechanisms of action against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **76**, 1174–1186 (2021).
87. Levy, C. C. Bacterial Peptidases. *Journal of Biological Chemistry* **244**, 4467–4472 (1969).
88. Misal, S. A. *et al.* Non-Specific Signal Peptidase Processing of Extracellular Proteins in *Staphylococcus aureus* N315. *Proteomes* **11**, (2023).
89. Kavanaugh, J. S., Thoendel, M. & Horswill, A. R. A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Mol Microbiol* **65**, 780–798 (2007).
90. Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B. & Goldstein, J. L. Regulated Intramembrane Proteolysis: Review A Control Mechanism Conserved from Bacteria to Humans Includes the SREBPs (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins), Transmembrane Proteins of the ER Whose Cy-Tosolic Transcription Factor Domains Are Liberated When Cells Are Deprived of Sterols, Thereby Activating Genes Controlling Lipid Synthesis and Uptake (*Brown and Gold. Cell* vol. 100 (2000).
91. Bloes, D. A., Kretschmer, D. & Peschel, A. Enemy attraction: Bacterial agonists for leukocyte chemotaxis receptors. *Nat Rev Microbiol* **13**, 95–104 (2015).
92. Miller, C. G. Peptidases and proteases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Annu Rev Microbiol* 485-504 (1975). doi: 10.1146/annurev.mi.29.100175.002413
93. Brannon, J. R. *et al.* Inhibition of outer membrane proteases of the ompT family by aprotinin. *Infect Immun* **83**, 2300–2311 (2015).
94. National, B. Comparison OmpT. *Microbiology (N Y)* **171**, 2903–2905 (1989).
95. Grodberg, J. & Dunn, J. J. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* **170**, 1245–1253 (1988).
96. McCarter, J. D. *et al.* Substrate specificity of the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J Bacteriol* **186**, 5919–5925 (2004).

97. Dekker, N., Cox, R. C., Kramer, R. A. & Egmond, M. R. Substrate specificity of the integral membrane protease OmpT determined by spatially addressed peptide libraries. *Biochemistry* **40**, 1694–1701 (2001).
98. Sieprawska-Lupa, M. *et al.* Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 4673–4679 (2004).
99. Seo, S., Jung, J., Kim, C. Y., Kang, H. & Lee, I. H. Antimicrobial Peptides Encounter Resistance of Aureolysin during Their Action on *Staphylococcus aureus* Biofilm. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **26**, 216–222 (2021).
100. Andersson, D. I., Hughes, D. & Kubicek-Sutherland, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates* **26**, 43–57 (2016).
101. Starr, C. G. & Wimley, W. C. Antimicrobial peptides are degraded by the cytosolic proteases of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1859**, 2319–2326 (2017).
102. Moncla, B. J., Pryke, K., Rohan, L. C. & Graebing, P. W. Degradation of naturally occurring and engineered antimicrobial peptides by proteases. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **02**, 404–408 (2011).
103. König, C., Simmen, H. P. & Blaser, J. Bacterial concentrations in pus and infected peritoneal fluid - Implications for bactericidal activity of antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **42**, 227–232 (1998).
104. Meredith, H. R., Srimani, J. K., Lee, A. J., Lopatkin, A. J. & You, L. Collective antibiotic tolerance: Mechanisms, dynamics and intervention. *Nature Chemical Biology* vol. 11 182–188 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nchembio.1754> (2015).
105. Wu, F. & Tan, C. Dead bacterial absorption of antimicrobial peptides underlies collective tolerance. *J R Soc Interface* **16**, (2019).
106. Savini, F. *et al.* Binding of an antimicrobial peptide to bacterial cells: Interaction with different species, strains and cellular components. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1862**, (2020).
107. Savini, F. *et al.* Cell-density dependence of host-defense peptide activity and selectivity in the presence of host cells. *ACS Chem Biol* **12**, 52–56 (2017).
108. Chatterjee, J., Rechenmacher, F. & Kessler, H. N-Methylation of peptides and proteins: An important element for modulating biological functions. *Angewandte Chemie - International Edition* **52**, 254–269 (2013).
109. Lintner, K. & Fromageot, P. analogs: Correlated. **77**, 82–86 (1980).
110. Fiacco, S. V. & Roberts, R. W. N-methyl scanning mutagenesis generates protease-resistant G protein ligands with improved affinity and selectivity. *ChemBioChem* **9**, 2200–2203 (2008).
111. Depeursinge, A. *et al.* Fusing Visual and Clinical Information for Lung Tissue Classification in HRCT Data. *Artif Intell Med* **10**, ARTMED1118 (2010).
112. Farmer, J., Kanwal, F., Nikulsin, N., Tsilimigras, M. C. B. & Jacobs, D. J. Statistical measures to quantify similarity between molecular dynamics simulation trajectories. *Entropy* **19**, (2017).
113. Trojan, E. *et al.* The n-formyl peptide receptor 2 (Fpr2) agonist mr-39 exhibits anti-inflammatory activity in lps-stimulated organotypic hippocampal cultures. *Cells* **10**, (2021).
114. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871–874 (1971).

115. Rendeovski, V. *et al.* Validation of the ELISA method for quantitative detection of TNF- α in patients with intracerebral hemorrhage. *Open Access Maced J Med Sci* **5**, 703–707 (2017).
116. Kain, V., Jadapalli, J. K., Tourki, B. & Halade, G. V. Inhibition of FPR2 impaired leukocytes recruitment and elicited non-resolving inflammation in acute heart failure. *Pharmacol Res* **146**, (2019).

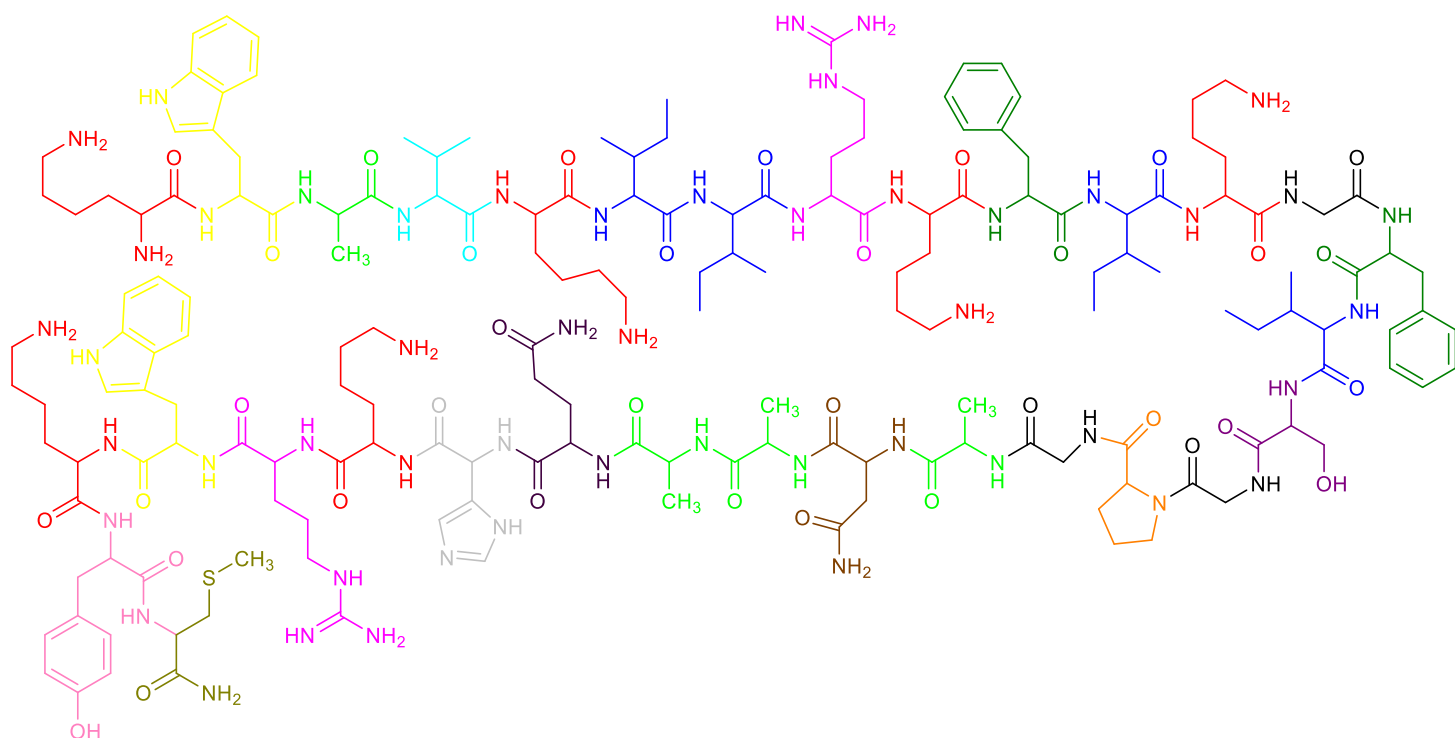
7. ANEXOS

ANEXO A

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

Tabela de aminoácidos, organizados pelos nomes em ordem alfabética, incluindo sua representação de uma letra, de três letras e sua massa monoisotópica.

ANEXO B

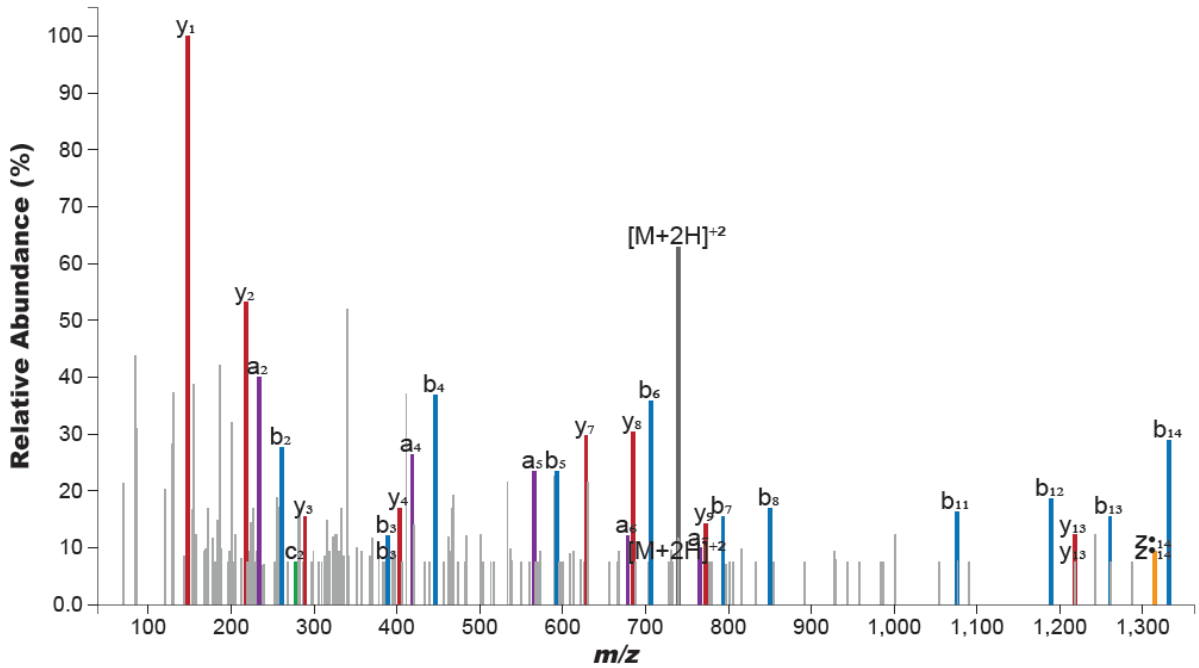


Estrutura primária do peptídeo CHIM3: KWAVKIIRKFIKGFISGPGANAAQHKRWKYM-NH₂. Cada resíduo de aminoácido está representado por uma cor diferente. De cima para baixo, começando com o aminoácido lisina, em vermelho (N-terminal), e terminando com o resíduo metionina, em marrom (C-terminal).

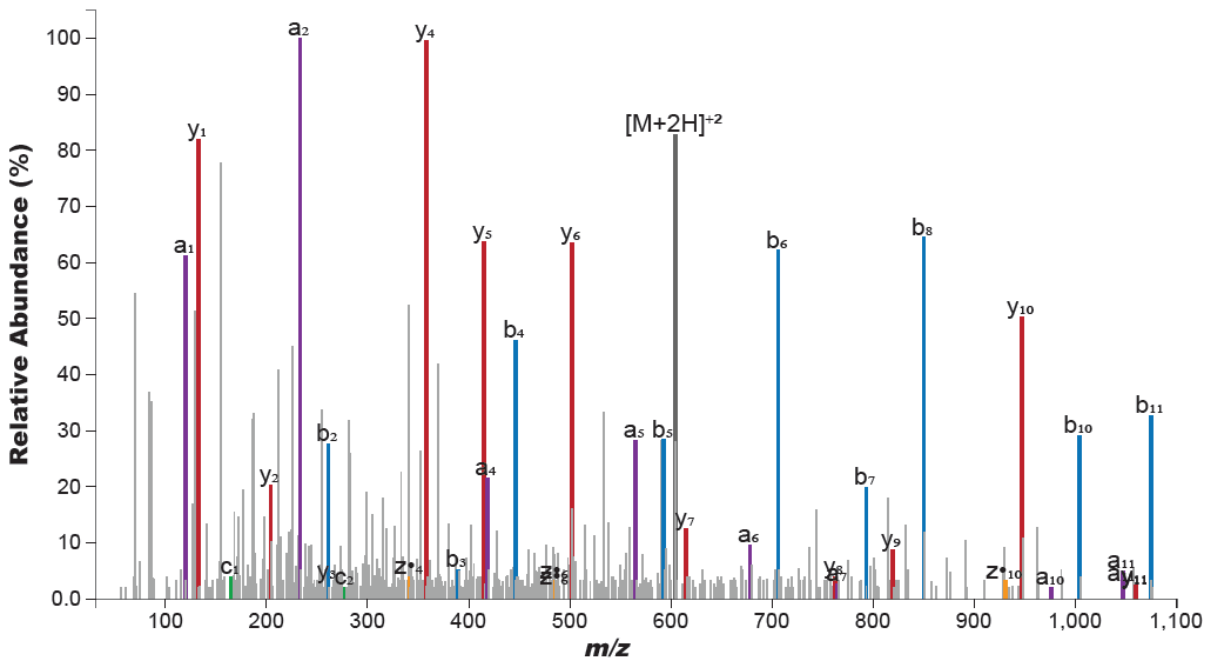
ANEXO C



Precursor m/z: 739.3935 Charge: +2 Fragmented Bonds: 12/14



Precursor m/z: 604.3271 Charge: +2 Fragmented Bonds: 11/11

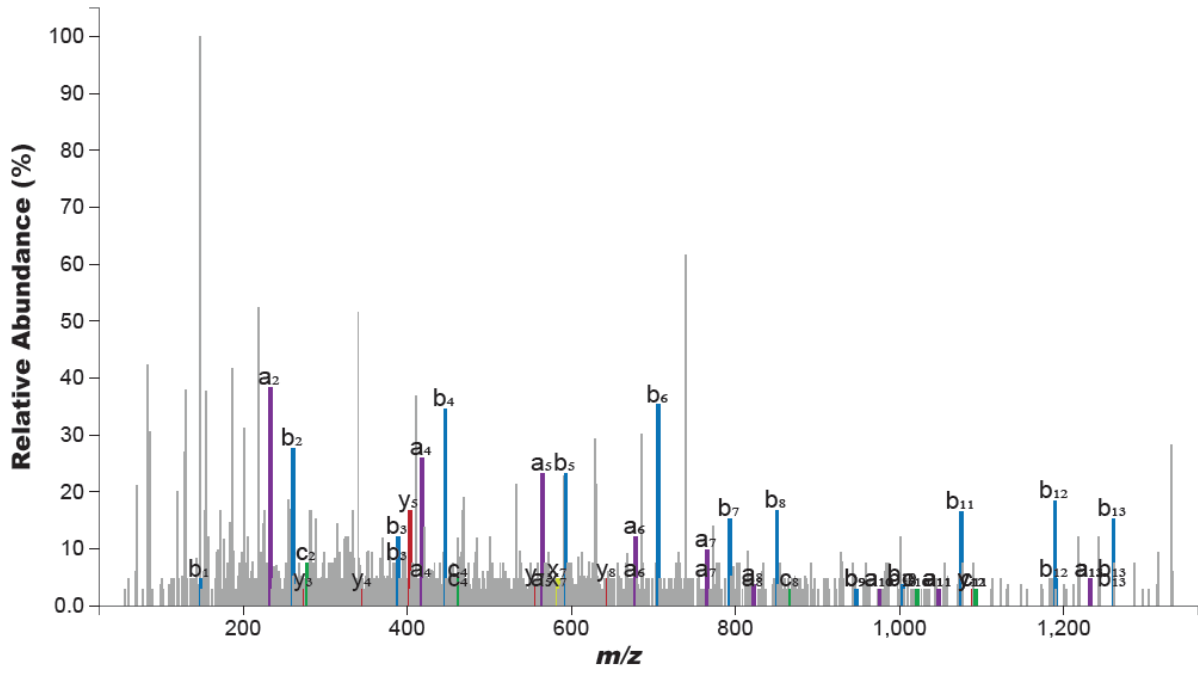


F I K G F I S G P G A N A A

Precursor m/z: 675.3642

Charge: +2

Fragmented Bonds: 13/13

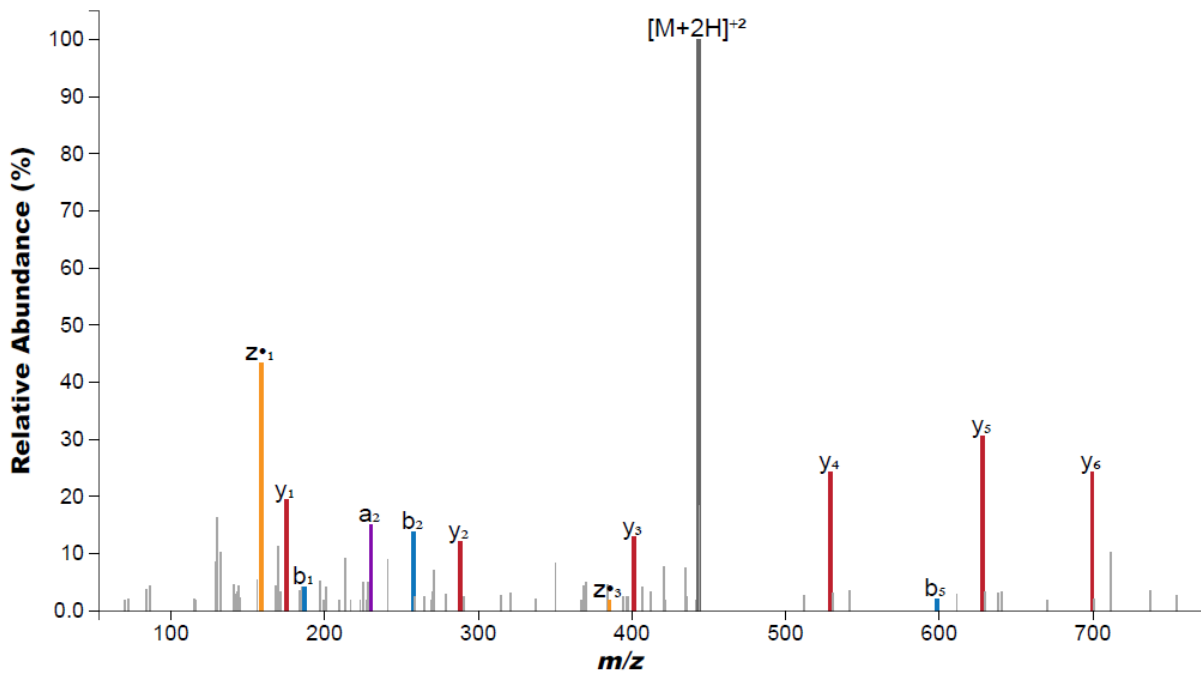


W A V K I I R

Precursor m/z: 443.2871

Charge: +2

Fragmented Bonds: 6/6

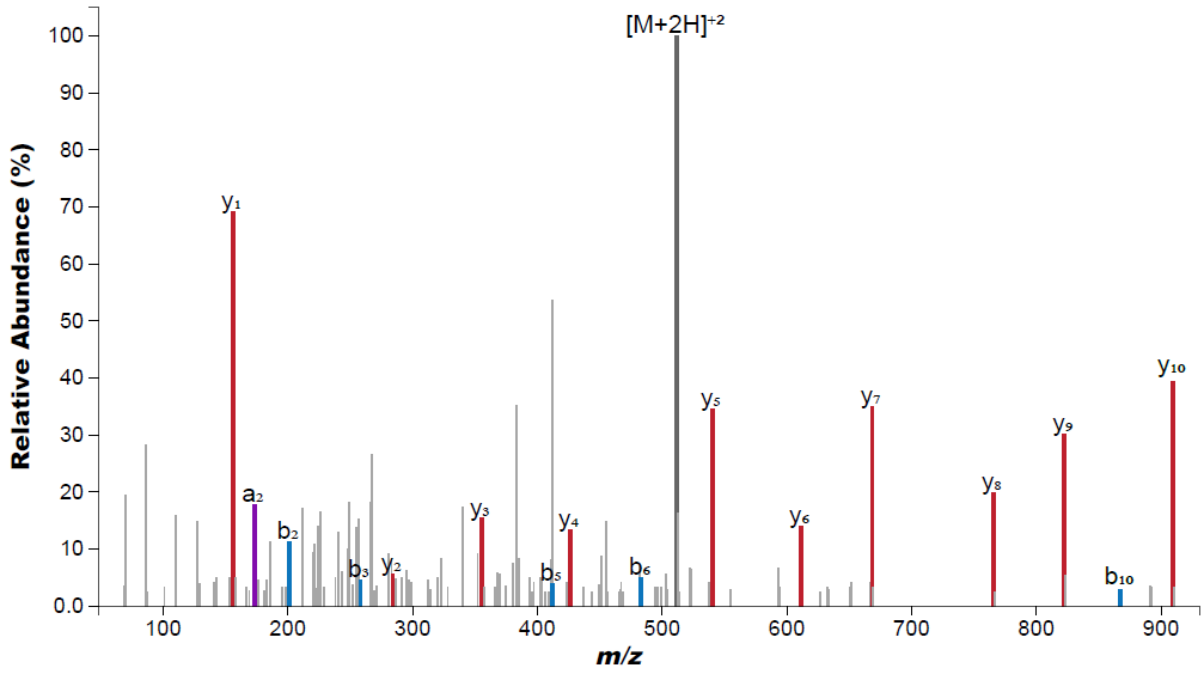




Precursor m/z: 511.7543

Charge: +2

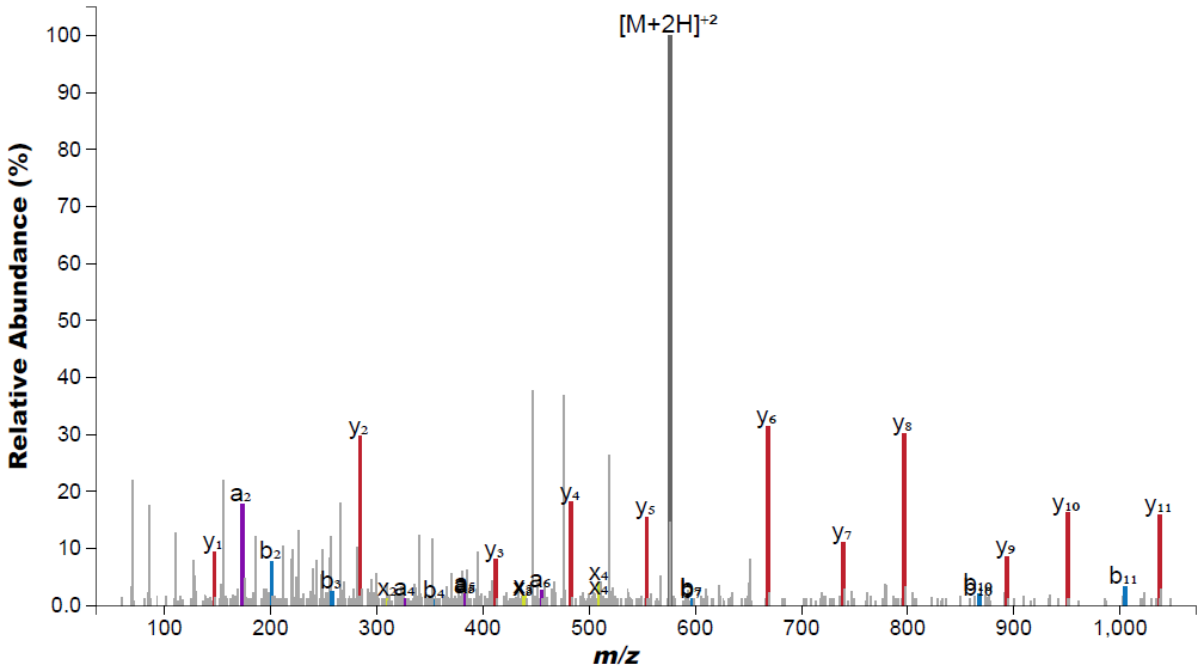
Fragmented Bonds: 10/10

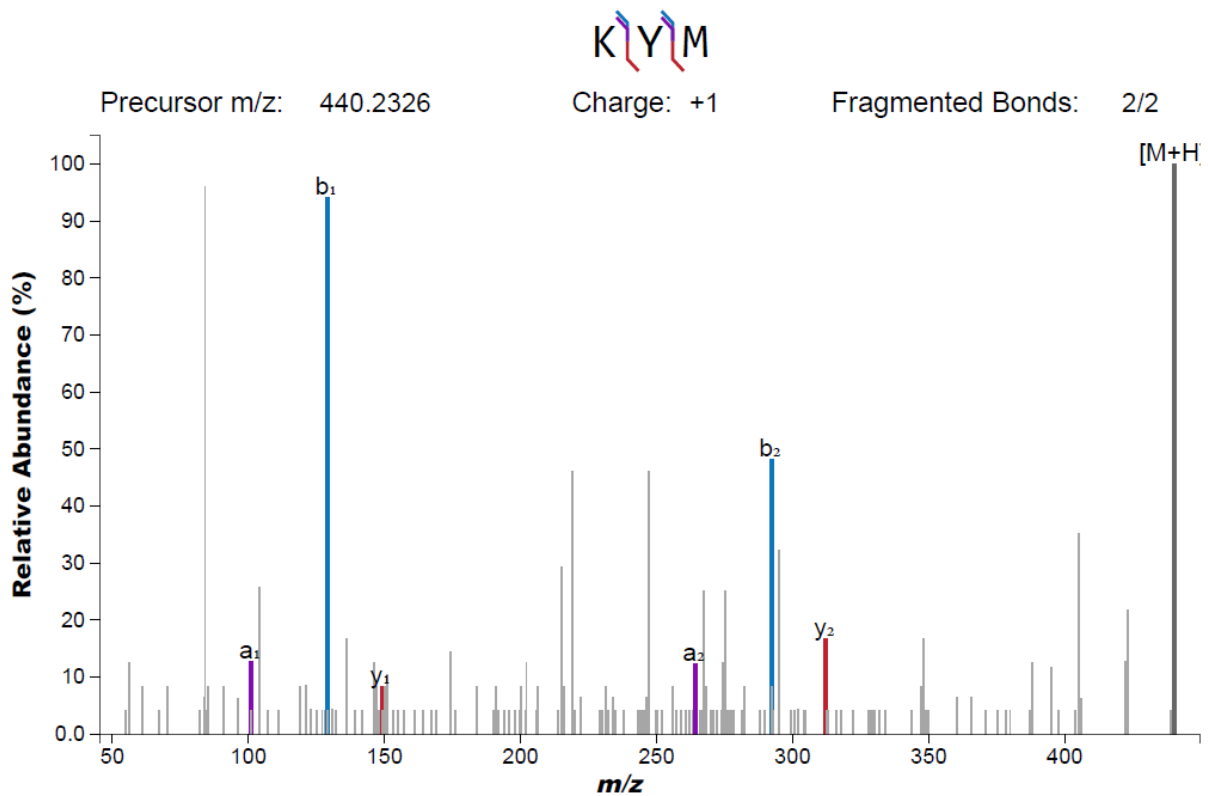


Precursor m/z: 575.8018

Charge: +2

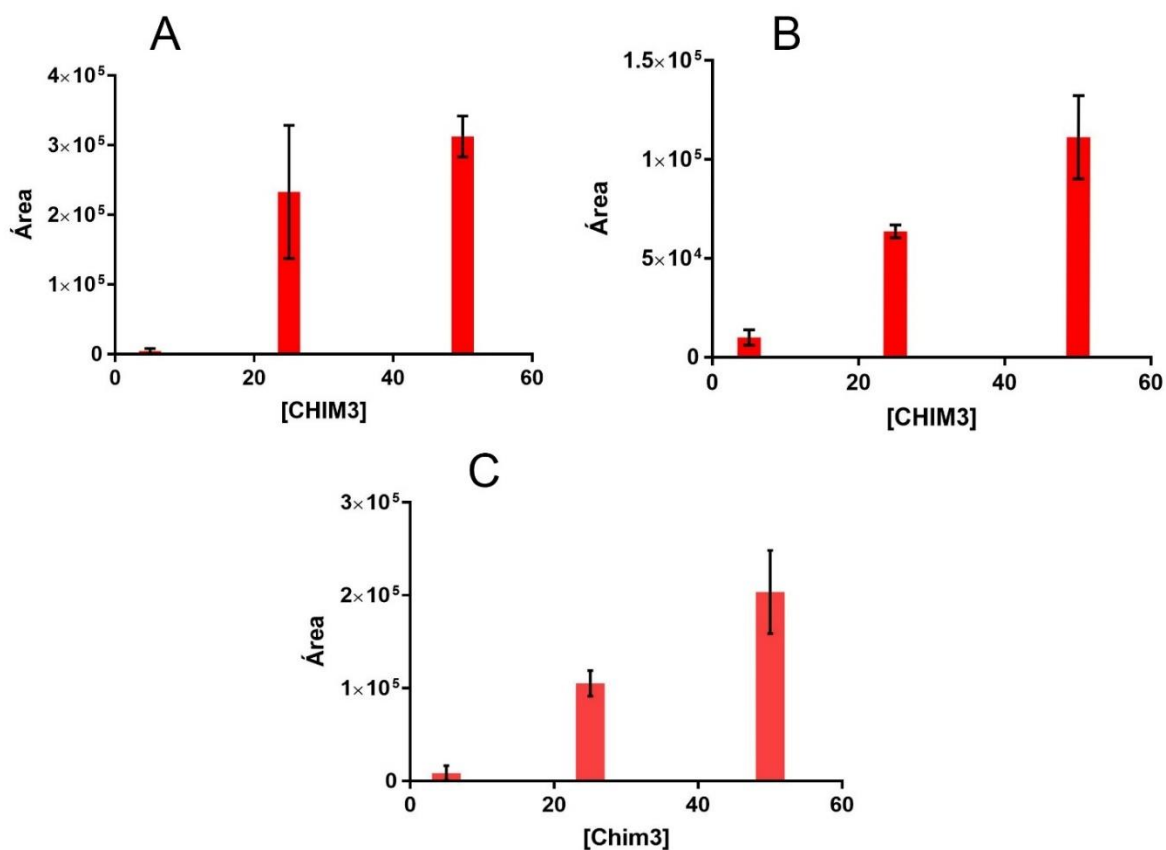
Fragmented Bonds: 11/11





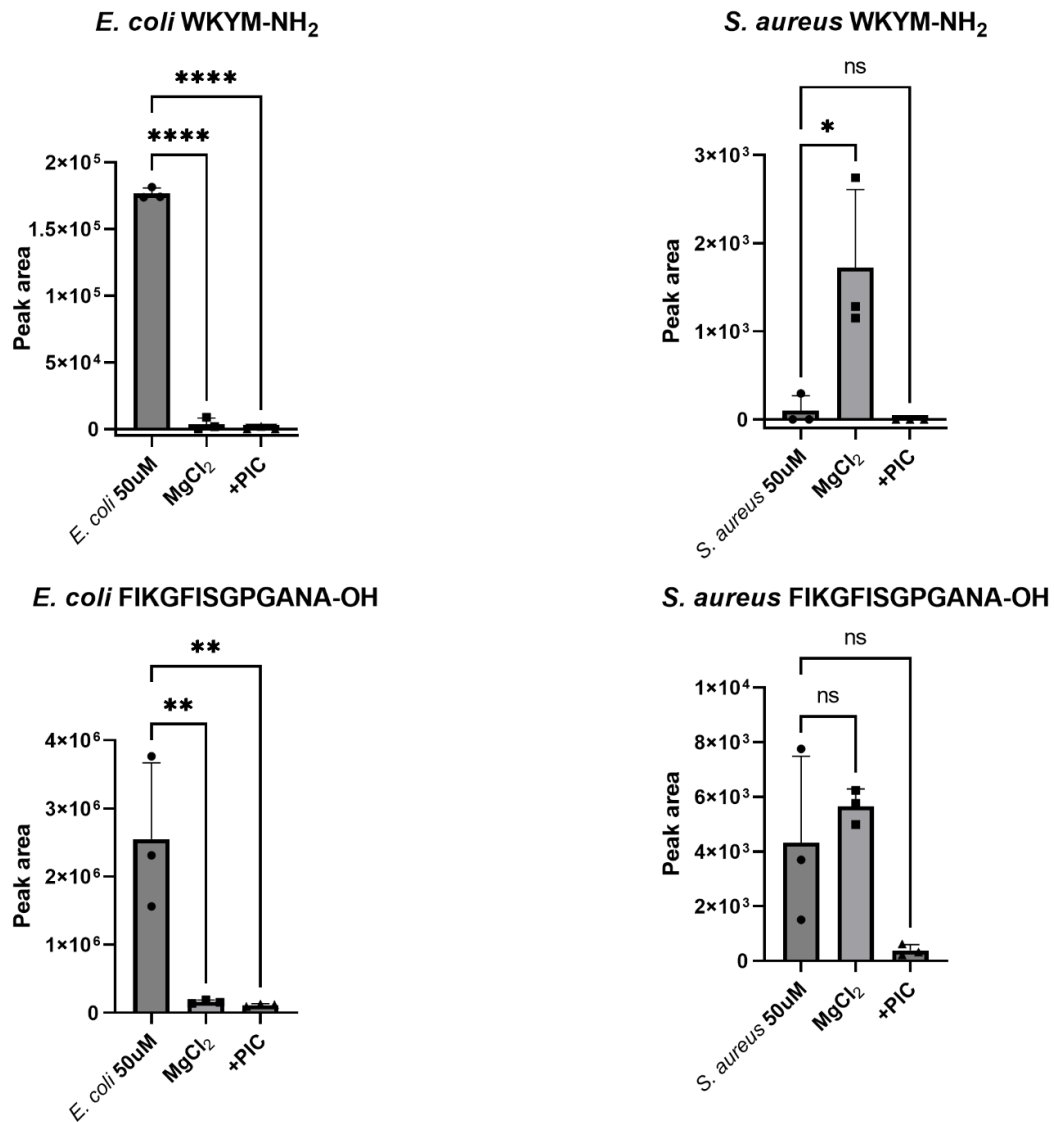
Espectros de massa dos fragmentos gerados nos ensaios de digestão do peptídeo CHIM3 com *E. coli* e *S. aureus*. Sequenciamento dos fragmentos identificados por LC-MS feitos utilizando o *software* Interactive Peptide Spectral Annotator – IPSA (<https://www.interactivepeptidespectralannotator.com/PeptideAnnotator.html>). Os traços em azul representam a série b, em roxo a série a e, em vermelho a série y.

ANEXO D



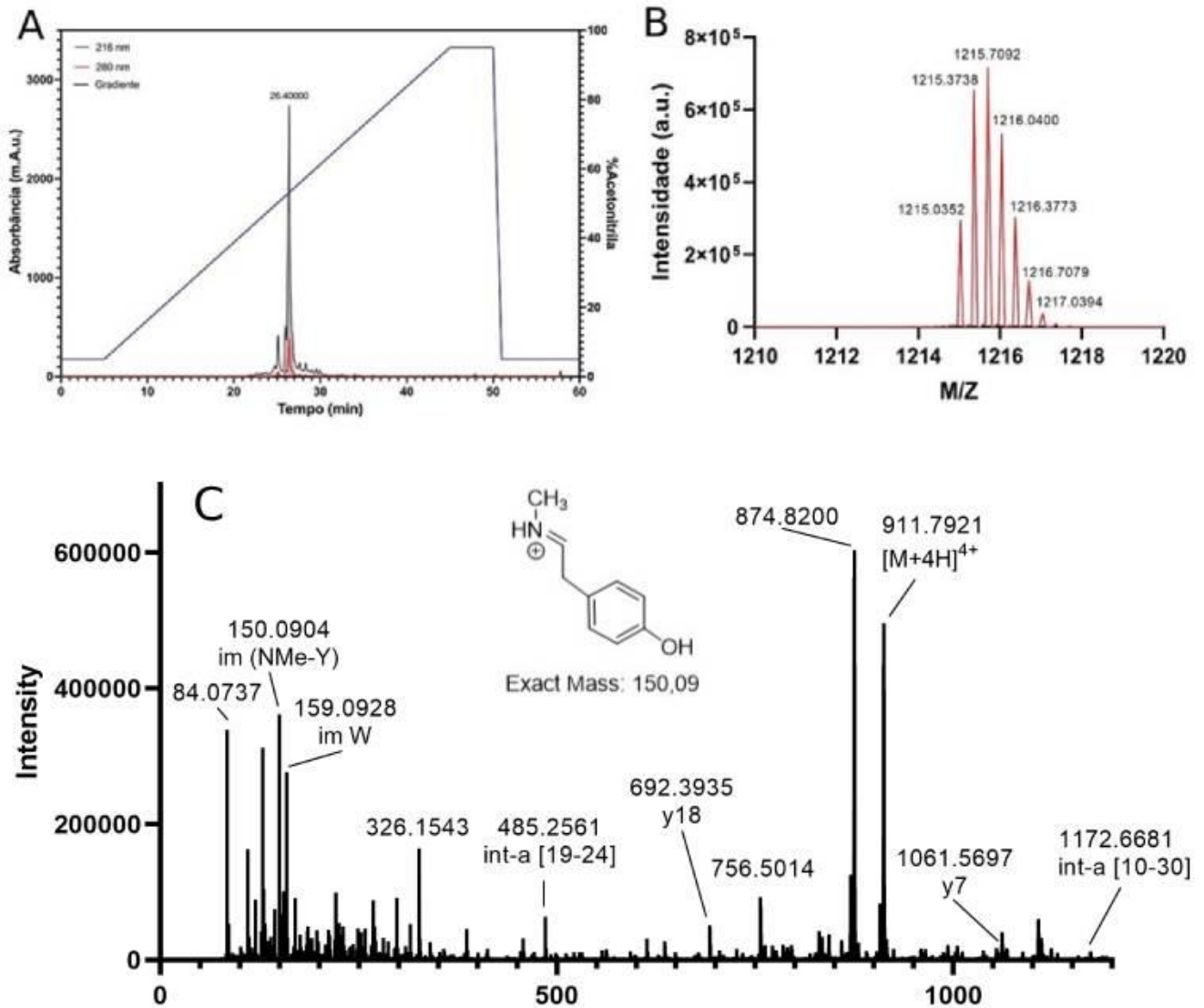
Comparação da área do pico do fragmento de peptídeo gerado na digestão do peptídeo CHIM3 a $50 \mu\text{M}$ com a *E. coli* durante 16h pela concentração de CHIM3. Em A) clivagem entre a asparagina e a alanina, AN↓AA. Em B) clivagem após a última alanina ANAA↓Q. Em C, clivagem entre as alaninas ANA↓A.

ANEXO E



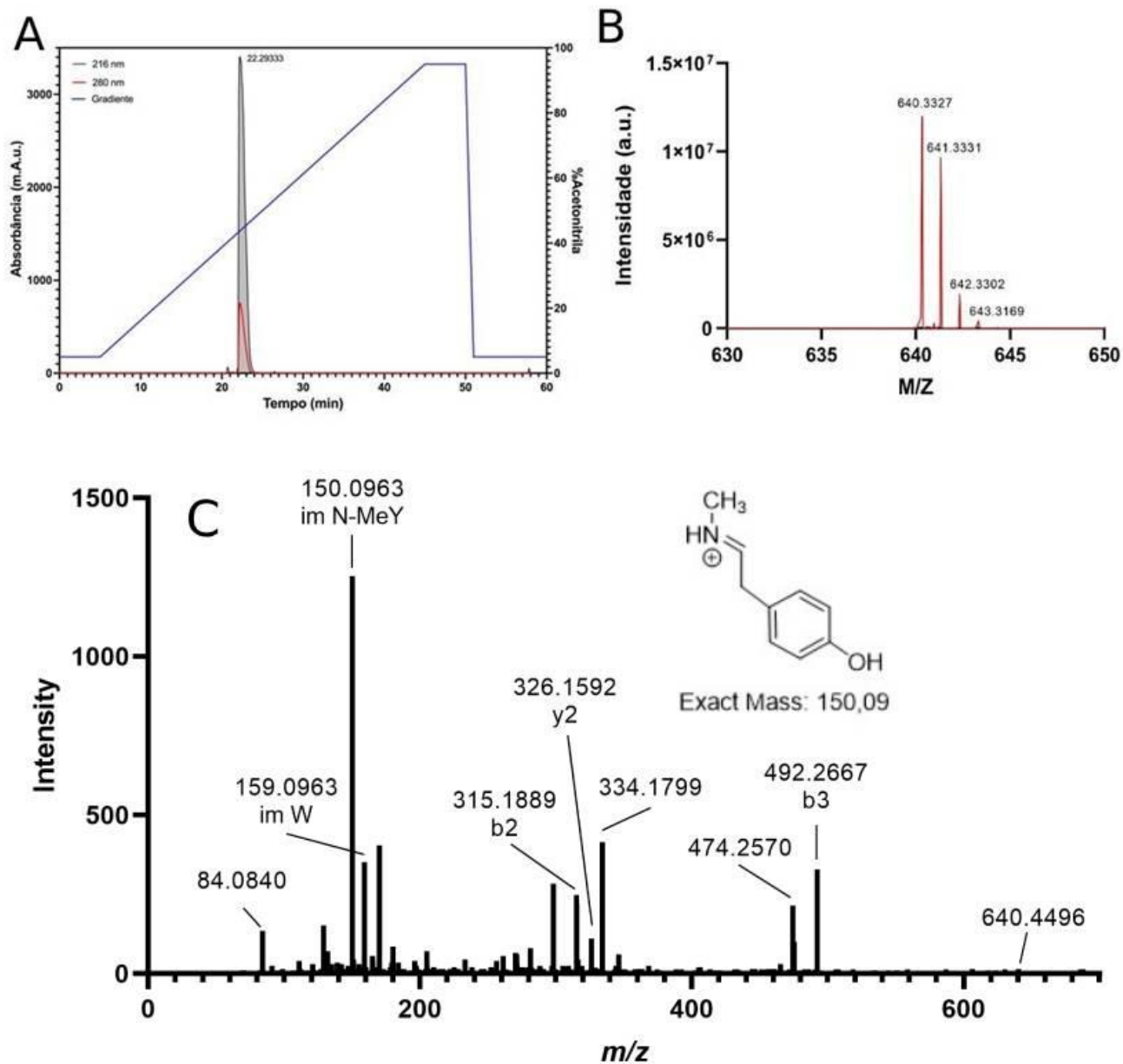
Experimentos comparativos da área dos picos referentes a fragmento WKYM-NH₂ e FIKGFISGPGANA formados no processo de digestão do peptídeo CHIM3 a 50 μM durante 16h com e sem inibidores (MgCl₂ e PIC). A coluna da esquerda referente a *E. coli* e a da esquerda referente a *S. aureus*.

ANEXO F



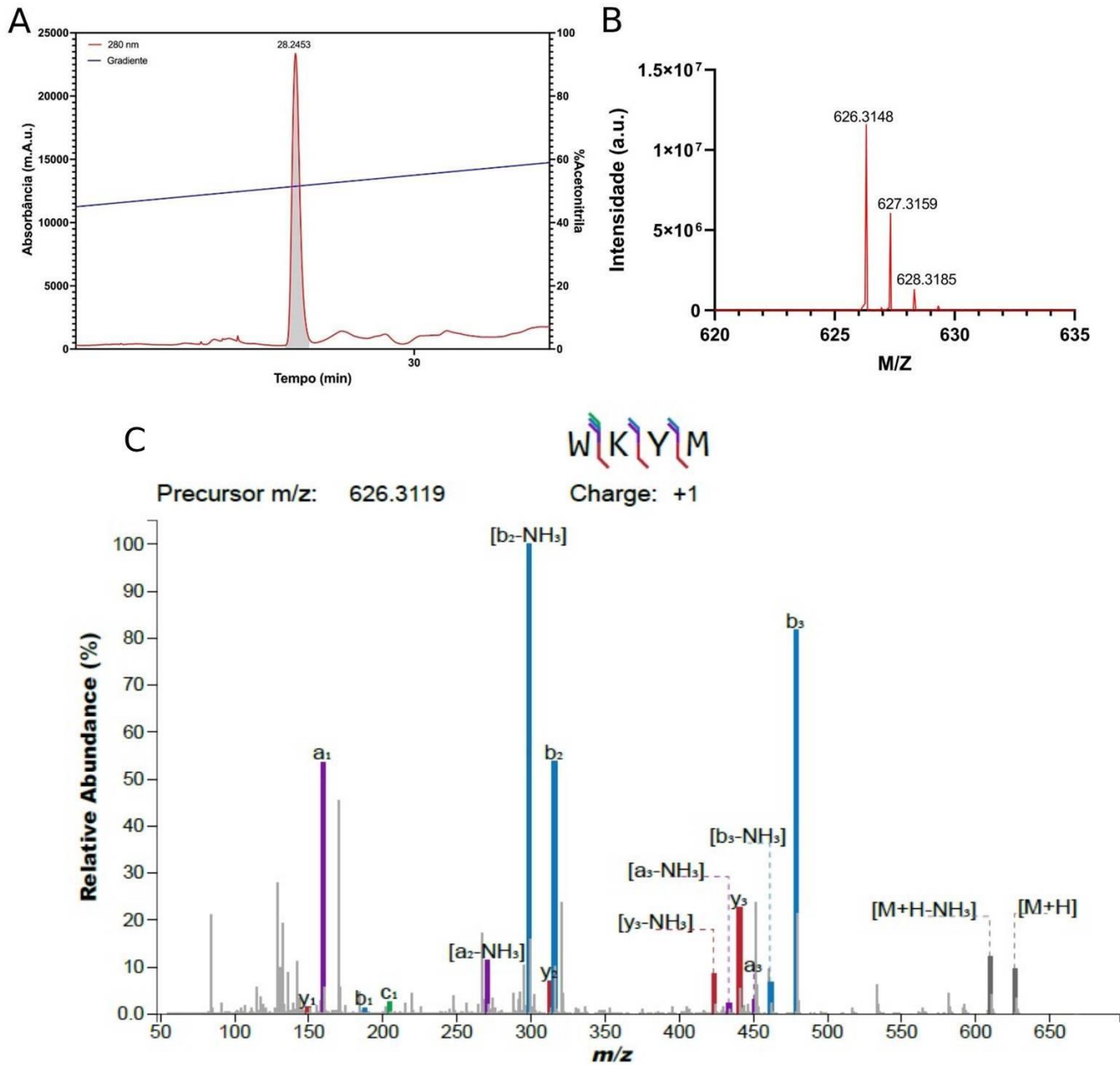
Cromatograma de CLAE e espectro de MS e MS/MS do peptídeo CHIM3-Y(NMe) sintetizado quimicamente em fase sólida. O íon do imônio da tirosina metilada em destaque $[M + H^+] = 150,09$ usado como marcador para o peptídeo.

ANEXO G



Cromatograma de purificação pro CLAE e espectro de MS e MS/MS do peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂ sintetizado quimicamente em fase sólida. O íon do imônio da tirosina metilada em destaque [M + H⁺] = 150,09 usado como marcador para o peptídeo.

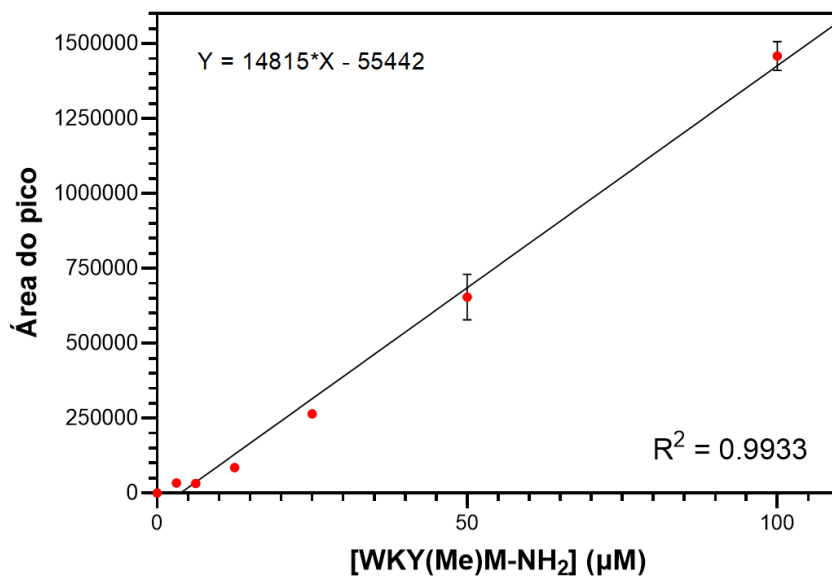
ANEXO H



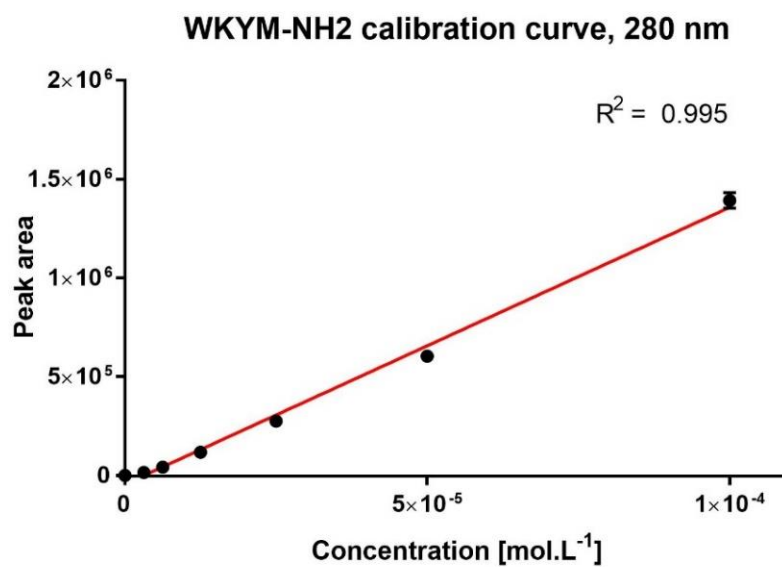
Cromatograma de purificação por CLAE, espectro de MS e MS/MS do peptídeo WKYM-NH₂ sintetizado em fase sólida. Sequenciamento feito utilizando o *software* Interactive Peptide Spectral Annotator – IPSA (<https://www.interactivepeptidespectralannotator.com/PeptideAnnotator.html>). Os traços em azul representam a série b, em roxo a série a e, em vermelho a série y.

ANEXO I

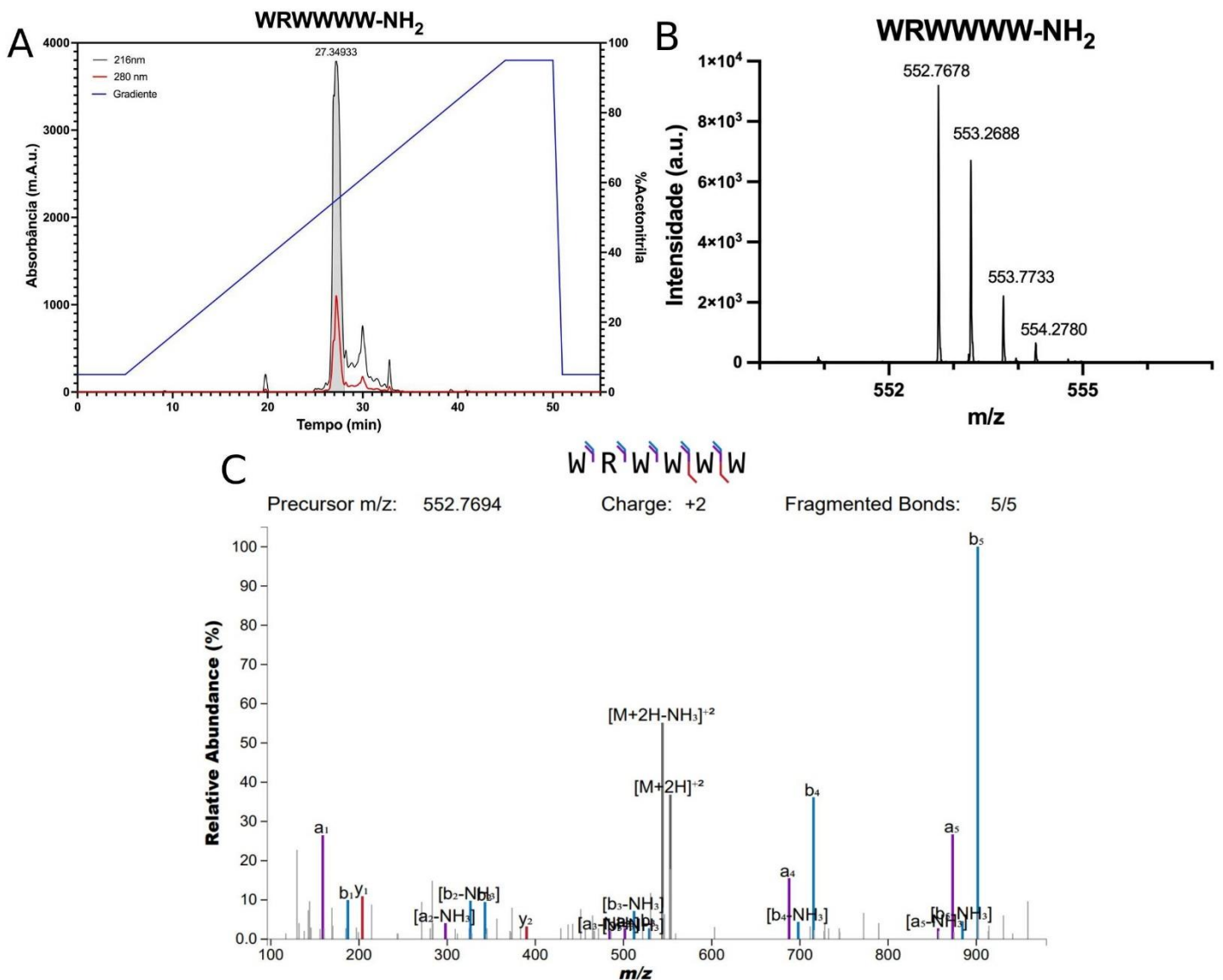
ANEXO I: A) Curva de calibração para o peptídeo WK(Y-NMe)M-NH₂.



ANEXO I: B) Curva de calibração para o peptídeo WKYM-NH₂.



ANEXO J



Cromatograma de purificação por CLAE, espectro de MS e MS/MS do peptídeo inibidor de FPR2, WKWWW-NH₂ sintetizado em fase sólida. Sequenciamento feito utilizando o *software* Interactive Peptide Spectral Annotator – IPSA (<https://www.interactivepeptidespectralannotator.com/PeptideAnnotator.html>). Os traços em azul representam a série b, em roxo a série a e, em vermelho a série y.

ANEXO K

Produção acadêmica durante o período da pós-graduação (mestrado e doutorado - período: 2017-2024):



pubs.acs.org/jnp

Article

Antioxidant and Neuroprotective Effects of the First Tryptophyllin Found in Snake Venom (*Bothrops moojeni*)

Anderson Dematei, Samuel Ribeiro Costa, Daniel C. Moreira, Eder Alves Barbosa, Lucas F. Friaça Albuquerque, Andreanne G. Vasconcelos, Tiago Nascimento, Pedro Costa Silva, Amanda É. Silva-Carvalho, Felipe Saldanha-Araújo, Mariana Camargo Silva Mancini, Luis Gustavo Saboia Ponte, Rosangela Maria Neves Bezerra, Fernando Moreira Simabuco, Augusto Batagin-Neto, Guilherme Brand, Tatiana Karla S. Borges, Peter Eaton, and José Roberto S. A. Leite*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00304>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



Article Recommendations

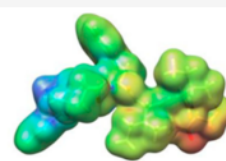


Supporting Information

ABSTRACT: In this study, we report the isolation, characterization, and synthesis of the peptide BmT-2 belonging to the tryptophyllins family, isolated from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. This is the first time a tryptophyllin is identified in snake venom. We tested whether BmT-2 had cytotoxic effects and antioxidant activity in a set of experiments that included both in vitro and cell-based assays. BmT-2 presented a radical scavenging activity toward ABTS* and AAPH-derived radicals. BmT-2 protected fluorescein, DNA molecules, and human red blood cells (RBCs) from free radicals generated by the thermal decomposition of AAPH. The novel tryptophyllin was not toxic in cell viability tests, where it (up to 0.4 mg/mL) did not cause hemolysis of human RBCs and did not cause significant loss of cell viability, showing a $CC_{50} > 1.5$ mM for



Bothrops moojeni



Novel tryptophyllin (BmT-2)

Homeostasis

Antioxidants effects



pharmaceutics



Article

Antiviral Action against SARS-CoV-2 of a Synthetic Peptide Based on a Novel Defensin Present in the Transcriptome of the Fire Salamander (*Salamandra salamandra*)

Ana Luisa A. N. Barros ^{1,2}, Vladimir C. Silva ³, Atvaldo F. Ribeiro-Junior ¹, Miguel G. Cardoso ^{1,4}, Samuel R. Costa ⁵, Carolina B. Moraes ⁶, Cecília G. Barbosa ⁷, Alex P. Coleone ⁸, Rafael P. Simões ⁹, Wanessa F. Cabral ¹, Raul M. Falcão ¹⁰, Andreanne G. Vasconcelos ^{1,11}, Jefferson A. Rocha ¹², Daniel D. R. Arcanjo ¹³, Augusto Batagin-Neto ^{8,14}, Tatiana Karla S. Borges ¹, João Gonçalves ⁴, Guilherme D. Brand ⁵, Lucio H. G. Freitas-Junior ⁷, Peter Eaton ^{15,16}, Mariela Marani ¹⁷, Massuo J. Kato ¹⁸, Alexandra Plácido ¹⁵ and José Roberto S. A. Leite ^{1,*}



Article

Purification and Biological Properties of Raniseptins-3 and -6, Two Antimicrobial Peptides from *Boana raniceps* (Cope, 1862) Skin Secretion

Gabriel Gonçalves de Freitas ^{1,2}, João Martins Barbosa ^{1,2}, Carlos José Correia de Santana ^{1,2}, Ana Carolina Martins Magalhães ¹, Keven Wender Rodrigues Macedo ¹, Jéssica Oliveira de Souza ¹, Jessica Schneider de Castro ¹, Isadora Alves de Vasconcelos ¹, Amanda Araújo Souza ³, Sonia Maria de Freitas ⁴, Sônia Nair Bão ⁵, Samuel Ribeiro Costa ⁶, Guilherme Dotto Brand ⁶, Ian de Meira Chaves ⁷, Vivian Vasconcelos Costa ⁷, Wagner Fontes ², Osmindo Rodrigues Pires Júnior ¹ and Mariana S. Castro ^{1,2,*}

JBC RESEARCH ARTICLE



Release of immunomodulatory peptides at bacterial membrane interfaces as a novel strategy to fight microorganisms

Received for publication, September 23, 2022, and in revised form, February 18, 2023. Published, Papers in Press, February 22, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.103056>

Thiago Viana de Freitas ¹, Utsa Karmakar ², Andreanne G. Vasconcelos ³, Michele A. Santos ^{1,4}, Bianca Oliveira do Vale Lira ^{5,6}, Samuel Ribeiro Costa ¹, Eder Alves Barbosa ¹, José Cardozo-Fh ⁷, Rafael Correa ⁸, Dalila J. S. Ribeiro ⁸, Maura Vianna Prates ¹, Kelly G. Magalhães ⁸, Marcelo Henrique Soller Ramada ^{5,6}, José Roberto de Souza Almeida Leite ³, Carlos Bloch Jr ⁷, Aline Lima de Oliveira ⁴, Marc Vendrell ², and Guilherme Dotto Brand ^{1,*}

From the ¹Universidade de Brasília, Instituto de Química, Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas, LSAB, Brasília, Distrito Federal, Brasil; ²Centre for Inflammation Research, The University of Edinburgh, Edinburgh, UK; ³Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada, NuPMIA, Brasília, Distrito Federal, Brasil; ⁴Universidade de Brasília, Instituto de Química, Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, LRMN, Brasília, Distrito Federal, Brasília, Brasil; ⁵Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, and ⁶Programa de Pós-Graduação em Gerontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil; ⁷Laboratório de Espectrometria de Massa, LEM, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil; ⁸Universidade de Brasília, Instituto de Biologia, Laboratório de Imunologia e Inflamação, LIMi, Brasília, Distrito Federal, Brasil

Reviewed by members of the JBC Editorial Board. Edited by Philip A. Cole

Structural Characterization and Rat Aortic Vascular Reactivity of Bradykinin-Potentiating Peptides (BPPs) from the Snake Venom of *Bothrops moojeni* from Delta do Parnaíba Region, Brazil

Samuel R. Costa, Andreeane G. Vasconcelos, José Otávio C. S. Almeida, Daniel D. R. Arcanjo, Anderson Dematei, Eder A. Barbosa, Pedro Costa Silva, Thiago Nascimento, Lucianna H. Santos, Peter Eaton, José Roberto S. de A. Leite, and Guilherme D. Brand*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.3c00991>

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Snake venoms contain various bradykinin-potentiating peptides (BPPs). First studied for their vasorelaxant properties due to angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition, these molecules present a range of binding partners, among them the argininosuccinate synthase (AsS) enzyme. This has renewed interest in their characterization from biological sources and the evaluation of their pharmacological activities. In the present work, the low molecular weight fraction of *Bothrops moojeni* venom was obtained and BPPs were characterized by mass spectrometry. Eleven BPPs or related peptides were sequenced, and one of them, BPP-Bm01, was new. Interestingly, some oxidized BPPs were detected. The three most abundant peptides were BPP-Bm01, BPP-Bax12, and BPP-13a, and their putative interactions with the AsS enzyme were investigated *in silico*. A binding cavity for these molecules was predicted, and docking studies allowed their ranking.

Three peptides were synthesized and submitted to vasorelaxation assays using rat aortic rings. While all BPPs were active, BPP-Bm01 showed the highest potency in this assay. This work adds further diversity to BPPs from snake venoms and suggests, for the first time, a putative binding pocket for these molecules in the AsS enzyme. This can guide the design of new and more potent AsS activators.

