



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Biologia Molecular

**SÍNTESE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
ANTIBACTERIANAS E ANTIPARASITÁRIAS DE
ANÁLOGOS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE
ANUROS**

Aline Barbosa Guimarães

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília
Setembro de 2015

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Biologia Molecular

**SÍNTESE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
ANTIBACTERIANAS E ANTIPARASITÁRIAS DE
ANÁLOGOS DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS DE
ANUROS**

Aline Barbosa Guimarães

Tese apresentada ao programa de
Pós-graduação em Biologia
Molecular da Universidade de
Brasília como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Brasília
Setembro de 2015

“Confia no Senhor de todo o teu coração,
e não te apoies na tua própria prudência:
pensa nele em todos os teus caminhos
e ele conduzirá teus passos.”

Provérbios 3, 5-6

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me dado a graça de fazer um doutorado. E por nunca ter me deixado desamparada, perto ou longe da bancada.

À minha família, por todo o apoio e carinho! À minha mãe, Olivia: minha estilista, conselheira e minha intercessora! Ao meu Bobby pai, Marco Aurélio, que além de todo o suporte (inclusive financeiro!), nunca me deixou desanimar e sempre acreditou em mim. Ah! Créditos à ele também, por ter auxiliado na formação da tese! Obrigada, painho!!! Às minhas irmãs Dani, Taty e Cacá, que estiveram sempre presentes! Obrigada por não deixarem que a distância nos afastasse. Esse povo é a expressão do amor de Deus em minha vida. Amo vocês demais! Ah! E à Preta, o membro canino de nossa família, companhia constante enquanto eu estava escrevendo! Tão presente que roubava meu lugar quando eu saía para comer alguma coisa...

À Prof^a. Mariana, minha orientadora! Obrigada por ter confiado em mim e me aceitado como tua aluna, quando eu quis vir oficialmente para a Biologia. Obrigada também por todo o apoio e compreensão, por ter me ajudado a resolver tantos problemas e a encarar as dificuldades que surgiram. Ah, agradeço também pelos momentos na bancada, aprendi muito trabalhando ao teu lado. Espero que a nossa parceria não termine!

Aos demais professores do LBQP: Prof. Marcelo, Prof. Carlos André (CA), Profa. Consuelo, Prof. Pedro, Prof. Sébastien, Profa. Fabiane (Fabi) e Prof. Wagner, obrigada por tudo! Cada um de vocês é muito especial para mim. Sempre muito atenciosos e queridos, obrigada por fazerem do nosso Lab um segundo lar para todos nós. Após 10 anos de convivência, posso dizer que somos uma família mesmo.

Ao Prof. Osmino, que tanto me ajudou a solucionar problemas no HPLC da Toxino (na minha ata tem 15 menções ao teu nome! Depois, parei de contar hahaha). E valeu também, por todas as conversas. Sempre saí mais tranquila de todas elas.

Vamos lá, ao povo do Lab: ao grupo dos alunos e ex-alunos da Profa. Mariana: Rosa, Déa (a topética mais legal de todas!), Jéssica (a melhor dançarina de forró que conheço!), César (babadador oficial da minha almofada de sapo), Diego (aquele que desafiou uma jararaca!), Carlos e Aline Chagas! Obrigada por todas as risadas e discussões de protocolos! Às meninas tão fofas: Simone, Marina e Bruna! Adorei ter convivido com vocês!! À Carol, Agneeelo!, Nicolas, Hialy, Thuany, David, Samuel e

toda uma turma que sempre me divertiu muito! Ao Rayner, Dri, Aline, Gabriel, Rafael, Rodrigo, Pedro, Humberto, Fussa e à todos os outros com quem já convivi ao longo de tantos anos no Lab. Vocês fazem muita falta!!

Ao Nuno, que sempre foi muito atencioso quando precisei de alguma ajuda! Quantas vezes eu gritei: Nuuuuuno!!!! ??? Valeu por ter me atendido sempre!!

Ao Adolfo, por me ajudar nas sínteses e nas purificações! Pena que não pudemos utilizar os peptídeos no final, mas...valeu! A gente ao menos aprendeu, né?

Ao povo da Toxino também: Sol, Carol, Bia, Harry, Aninha, Tânia... fazer as corridas com algum de vocês por perto era garantia de muita diversão!

Às minhas xuxuletes queridas!! Diana, Mica, Elaine e Anne! São pessoas que Deus escolheu à dedo para mim. Obrigada por todas as conversas cheias de risadas, pelas conversas sérias, pelas noites de gordices..., dividimos conquistas e compartilhamos momentos tristes. Amo muito vocês, minhas luluzetes!

Ao Prof. Robert Miller, coordenador da Pós-Graduação em Biologia Molecular, por ter permitido a minha ida ao *Muséum National d'Histoire Naturelle* (MNHN), em Paris, para a realização dos ensaios antiparasitários

Às meninas da secretaria da Pós-Graduação: Silvia, Luciana e Ana. Sempre que fui resolver alguma coisa lá, vocês sempre foram muito prestativas!

À Capes, pela bolsa de doutorado.

Ao Prof. Philippe Grellier, meu professor-supervisor no laboratório *Biodiversité et Adaptation des Microorganismes Eucaryotes à leur Environnement* (BAMEE-MNHN). Aprendi muito com a tua seriedade na bancada e foi uma benção ter sido aceita no teu laboratório para os ensaios antiparasitários. Je vous remercie infiniment!

À Cissé Sow, ma chéééerie!! Obrigada por ter me cedido tua casa e ter me ajudado a praticar o francês. Mas, principalmente, obrigada por todo o apoio, pelas conversas à noite e por fazer com que me sentisse em casa! À Fouley também, tua irmã, que me fez rir demais contando os meus *ouais*!

À Luz, minha irmã em Cristo, com quem dividi a bancada, os aprendizados e todas as emoções no BAMEE! Obrigada por estar lá! E à Clênia, “a pequenininha” mais fofa do mundo!! E à Prof^a. Carla, que foi uma mãezona lá! A experiência no MNHN não teria sido a mesma sem vocês!

Ao Agenor, pela ajuda nos ensaios contra formas epimastigotas de *T. cruzi* aqui em Brasília. Você foi um companheiro de bancada muito querido! Obrigada por ter atendido à nossa demanda tão prontamente! E claro, à Prof^a. Beatriz Dolabela, por ter permitido que fizéssemos os ensaios no Laboratório de Biologia do Gene!

E finalmente, ao Jax, meu namorado e também meu melhor amigo. Obrigada por ser essa pessoa tão querida e por renovar minhas forças (sem esquecer do meu estoque de doces também!). E obrigada também por me fazer sorrir com tantas coisas, principalmente quando estou estressada!! Conte comigo também na tua reta final de doutorado! Valeu valeu valeu!

Agora, citando novamente a Mendoza, mas agora em 2014: CHEGA!!

APOIO FINANCEIRO

A tese de doutorado intitulada "Síntese química e avaliação das propriedades antibacterianas e antiparasitárias de análogos de peptídeos antimicrobianos de anuros" desenvolvida por Aline Barbosa Guimarães sob a orientação da Profa. Dra. Mariana S. Castro teve o apoio financeiro do CNPq (processos no. 563972/2010-6 - Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRÓ-CENTRO-OESTE nº 31/2010, no. 302925/2012-0 - Produtividade em Pesquisa 2012 e no. 407801-2013 - Rede Centro-Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação - REDE PRÓ-CENTRO-OESTE), da FAPDF (processos no 193.000.461/2011 - Edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/PRÓ-CENTRO-OESTE nº 31/2010 e no. 193.000.429/2010 - EDITAL FAPDF – Nº 10/2010), da CAPES (por meio da concessão de bolsa de estudos), da FINEP (CT-INFRA) e da FUB-UnB.

RESUMO

Com o surgimento de cepas de fungos e bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos comerciais disponíveis, o tratamento de diversas infecções passou a ser prejudicado. Para o desenvolvimento de novos agentes eficazes para o controle dessas infecções, novos tipos de compostos antimicrobianos estão sendo investigados e as secreções da pele de anfíbios, ricas em peptídeos antimicrobianos (PAMs), são uma das principais fontes biológicas em estudo. Na pele de anuros, tais peptídeos apresentam um relevante papel fisiológico na resposta imune inata, agindo como uma barreira contra potenciais agentes patogênicos. Embora os PAMs naturais sejam agentes terapêuticos potenciais, as suas propriedades físico-químicas e a bioatividade geralmente precisam ser melhoradas de modo que o uso clínico possa ser considerado. No presente estudo, o PAM com 25 resíduos de aminoácidos ocelatina-P1 (OC-P1), isolado das rãs *Leptodactylus pentadactylus* e *L. labyrinthicus*, foi empregado como modelo para o desenho de análogos peptídicos, de modo a avaliar os efeitos de modificações em parâmetros estruturais como hidrofobicidade, anfipaticidade, carga líquida e comprimento da cadeia peptídica sobre a sua eficácia biológica. Um grupo de análogos da Oc-P1 foi sintetizado e testado na presença de bactérias, fungos e protozoários patogênicos. Os efeitos observados foram correlacionados com as modificações estruturais propostas. Dentro deste grupo de peptídeos, que compreende 8 análogos contendo entre 14 e 16 resíduos e o PAM selvagem Oc-P1, o peptídeo selvagem foi o mais eficaz, e dentre os análogos propostos, somente um apresentou atividade biológica. Este análogo apresentou atividade hemolítica considerável, sendo observado que o aumento da atividade hemolítica estava geralmente relacionado ao aumento da hidrofobicidade e da anfipaticidade. No geral, o presente trabalho sugere que o desenho e a síntese química de novos peptídeos a partir de PAMs de anuros é uma atraente metodologia de estudo para concepção de novos compostos, mas que o delicado refinamento das características estruturais é limitante no desenvolvimento de novas drogas baseadas em estruturas peptídicas com uso terapêutico em potencial.

Palavras-chave: ocelatina-P1; pentadactilina; atividade antimicrobiana; atividade antiparasitária; análogos.

ABSTRACT

The treatment of several infections has become impaired considering the resistance of pathogenic fungi and bacteria to commercial antibiotics. In order to develop new effective agents for controlling these infections, new types of antimicrobial compounds are under investigation, and the skin secretions of amphibians, rich in antimicrobial peptides (AMPs), are one of the major biological sources under study. In anurans skin, such peptides display important physiological role in the innate immune response, acting as a barrier against potential pathogens. While natural AMPs are potential therapeutic agents, their physicochemical properties and bioactivity generally need improvement to permit their clinical use. In the present study, the 25-residue ocellatin-P1 (Oc-P1), isolated from *Leptodactylus pentadactylus* and *L. labyrinthicus*, was used as a template in the design of new peptide analogs, in order to allow the evaluation of the effects of structural parameters, such as hydrophobicity, amphipathicity, net charge and sequence length on their biological properties. One group of analogs was synthesized and tested against pathogenic bacteria, fungi and protozoan. The detected biological effects were analyzed considering the structural modifications implemented. Within this group, comprising eight peptides with 14 to 16 residues and the native ocellatin-P1, the wild type peptide was the most active and among the analogs, only one exhibited biological activity. This analog showed significant hemolytic activity and the strong hemolytic activity of the peptides generally correlated with high hydrophobicity and amphipathicity. Overall, our study suggests that the design and chemical synthesis of new peptides derivated from frog-skin AMPs is an attractive methodology in the search for new biologically active compounds, but the delicate refinement of the structural features is limitant for the development of new therapeutic peptide-based drugs.

Keywords: ocellatin-P1, pentadactylin, antiparasitic activity, antimicrobial activity, analog

LISTA DE ABREVIATURAS

α . Alfa.

β . Beta.

$^{\circ}\text{C}$. Graus Celsius.

<H>. Hidrofobicidade média.

< μH >. Momento hidrofóbico.

μL . Microlitro.

v/v. Volume/volume

AF. Ácido fosfatídico.

AL. Ácido lipoteicóico.

ATCC. *American Type Culture Collection*.

Boc. *t*-butiloxicarbonila.

CC₅₀. Concentração citotóxica capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%.

CH₅₀. Concentração capaz de promover 50% de hemólise.

CI₅₀. Concentração capaz de provocar a redução/inibição de 50% dos parasitos.

CMI. Concentração mínima inibitória.

CL₅₀. Concentração de peptídeo que leva à lise celular de 50% dos parasitos presentes na cultura.

DMF. N,N-dimetilformamida.

DMSO. Dimetilsufóxido.

EDT. 1,2- etanoditiol.

Fmoc. 9-fluorenilmetiloxicarbonil.

FL. Fosfolipídeos.

FC. Fosfatidilcolina.

FE. Fosfatidiletanolamina.

FI. Fosfatidilinositol.

GILFs. Glicosilinsitolfosfolipídeos.

GPI. Glicosilfosfatidilinositol.

HPLC. *High performance liquid chromatography*; cromatografia líquida de alto desempenho.

IT_{teor.} Índice terapêutico teórico.

IT_{exp.} Índice terapêutico experimental

kDa. Quilodaltons.

LFG. Lipofosfoglicano.

LPS. Lipopolissacarídeos.

M. Molar, mol/L.

MALDI-TOF-MS. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Espectrometria de massa por tempo de voo com ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz.

mL. Mililitro.

mg. Miligrama.

mM. Milimolar, milimol/L.

OMS. Organização Mundial de Saúde.

PAM. Peptídeo antimicrobiano.

PIP. Piridina.

PG. Peptidoglicano.

PFG. Proteofosfoglicano.

Q. Carga.

RP. *Reversed-phase*; fase reversa.

SPFS. Síntese de peptídeos em fase sólida.

t_R. Tempo de retenção.

TBTU. Tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio.

tBu. Radical t-butila.

TFA. Ácido trifluoroacético.

Triton X-100. t-octilfenoxipolietanol.

UFC. Unidade formadora de colônia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática das paredes celulares de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.	18
Figura 2. Ilustração esquemática dos diferentes modos de ação descritos para os PAMs em membranas lipídicas.....	19
Figura 3. Ilustração esquemática dos diferentes mecanismos de resistência bacteriana propostos à ação dos PAMs	22
Figura 4. Modelos propostos para a interação de PAMs em tripanossomatídeos.....	27
Figura 5. Frequência de distribuição de grupos de resíduos de aminoácidos após comparação de 150 PAMs	29
Figura 6. Distribuição e frequência de alguns parâmetros encontrados em PAMs	32
Figura 7. Esquema representativo geral da síntese de um tetrapeptídeo por SPFS	34
Figura 8. Esquema representando os grupos protetores na SPFS.....	36
Figura 9. Remoção dos grupos de proteção na SPFS.....	37
Figura 10a. Atividade antiparasitária dos PAMs descritos de anuros em função dos estágios dos parasitos em seus respectivos ciclos de vida (<i>T. brucei</i> e <i>T. cruzi</i>).....	41
Figura 10b. Atividade antiparasitária dos PAMs descritos de anuros em função dos estágios dos parasitos em seus respectivos ciclos de vida (<i>Leishmania</i> e <i>P. falciparum</i>)	42
Figura 11. Motivos de sequência comuns à família de peptídeos ocelatinas utilizando o algoritmo MEME.....	65
Figura 12. Projeção em hélice do peptídeo ocelatina-P1.	69
Figura 13. Esquema do delineamento experimental do presente trabalho.....	73
Figura 14. Alinhamento múltiplo entre os oito análogos propostos e o peptídeo selvagem Oc-P1	81
Figura 15. Perfis SPLIT 4.0 para a sequência do peptídeo PGYa referente à análise de preferência às conformações estruturais secundárias	84
Figura 16. Perfis SPLIT 4.0 para a sequência do peptídeo melitina referente à análise de preferência às conformações estruturais secundárias	85
Figura 17. Perfil SPLIT 4.0 para a sequência do peptídeo Oc-P1 referente à análise de preferência às conformações estruturais secundárias	86
Figura 18. Perfis SPLIT 4.0 para a sequência de cada análogo de Oc-P1 da série A1 referente à análise de preferência às conformações estruturais secundárias	87
Figura 19. Perfis SPLIT 4.0 para a sequência de cada análogo de Oc-P1 da série A2 referente à análise de preferência às conformações estruturais secundárias	88
Figura 20. Perfis SPLIT 4.0 para a sequência do peptídeo temporina-1TGb referente à análise de preferência às conformações estruturais secundárias.	89
Figura 21. Estruturas em 3D da primeira série de análogos de Oc-P1 (A1 a A1.3).....	91
Figura 22. Estruturas em 3D da segunda série de análogos de Oc-P1 (A2 a A2.3).....	92
Figura 23. Estrutura em 3D do peptídeo Oc-P1	94
Figura 24. Projeção em hélice (painel superior) e em rede helicoidal (painel inferior) para os peptídeos do primeiro conjunto de derivados da ocelatina-P1.....	97
Figura 25. Projeção em hélice (painel superior) e em rede helicoidal (painel inferior) para os peptídeos do segundo conjunto de derivados da ocelatina-P1.....	99

Figura 26. Projeção em hélice (à esquerda) e em rede helicoidal (à direita) para o peptídeo ocelatina-P1.....	101
Figura 27. Atividade hemolítica dos diferentes análogos contra hemácias humanas após 1 hora de incubação com os peptídeos.....	102
Figura 28. Atividade inibitória sobre o crescimento parasitário dos PAMs Oc-P1 e A2.1 contra o protozoário <i>T. brucei brucei</i> (formas sanguíneas) após 72h de incubação com os peptídeos	107
Figura 29. Atividade citotóxica do PAM Oc-P1 em células L6 após três dias de incubação	109
Figura 30. Atividade inibitória sobre o crescimento parasitário dos PAMs Oc-P1 e A2.1 contra o protozoário <i>T. cruzi</i> (forma amastigota) após cinco dias de incubação com os peptídeos	110
Figura 31. Atividade inibitória sobre o crescimento parasitário do PAM Oc-P1 em formas intraeritrocitárias de <i>P. falciparum</i> após 24h de incubação..	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista representativa de dermaseptinas e os seus principais análogos sintéticos com atividade antiparasitária.	49
Tabela 2. Lista representativa de temporinas a apresentarem atividade antiparasitária.....	54
Tabela 3. Lista representativa de bombininas a apresentarem atividade antiparasitária.	56
Tabela 4. Lista representativa de filosseptinas a apresentarem atividade antiparasitária.....	59
Tabela 5. Lista representativa de magaininas, PGLa e os principais análogos sintéticos a apresentarem atividade antiparasitária.	63
Tabela 6. Lista representativa dos peptídeos descritos para <i>S. tropicalis</i> com atividade antiparasitária.	64
Tabela 7. Relação das principais ocelatinas já descritas.....	66
Tabela 8. Estruturas primárias dos análogos propostos para a ocelatina-4, incluindo o peptídeo selvagem.	68
Tabela 9. Predição de estrutura secundária para os oito análogos de Oc-P1 a partir da ferramenta online <i>Proteus2</i>	92
Tabela 10. Relação de parâmetros teóricos para o peptídeo Oc-P1 e os oito análogos propostos.....	96
Tabela 11. Atividades antimicrobianas (CMI) e hemolíticas (CH ₅₀) definidas para os análogos de ocelatina-P1.....	103
Tabela 12. Relação dos efeitos dos peptídeos ativos nos parasitos avaliados.....	106

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Peptídeos Antimicrobianos (PAMs)	17
1.1.1. Interações de PAMs com membranas	18
1.1.2. Membranas de parasitos e interações com PAMs	23
1.2. Otimização da atividade biológica dos PAMs	27
1.3. Síntese de peptídeos em fase sólida	33
1.4. Doenças negligenciadas e potencial biotecnológico dos peptídeos antimicrobianos	39
1.5. Famílias de peptídeos de anuros com atividade antiparasitária	43
1.5.1. Dermaseptinas	43
1.5.2. Temporinas	51
1.5.3. Bombininas H2 e H4	56
1.5.4. Filosseptinas	56
1.5.5. PAMs de <i>Xenopus laevis</i> e alguns de seus análogos	60
1.5.6. Peptídeos isolados de <i>Silurana tropicalis</i>	64
1.6. PAMs de Leptodactilídeos – as ocelatinas	65
1.6.1. Ocelatina-P1	69
2. JUSTIFICATIVA	71
3. OBJETIVO GERAL	72
3.1. Objetivos específicos	72
4. MATERIAIS E MÉTODOS	73
4.1. Delineamento experimental	73
4.2. Desenho racional dos análogos do peptídeo ocelatina-P1 e análise por bioinformática	73
4.3. Obtenção dos análogos propostos	74
4.4. Determinação da concentração das soluções-estoque de peptídeos	75
4.5. Ensaio antibacteriano	75
4.6. Ensaio hemolítico	76
4.7. Ensaio antiparasitários	77
4.7.1. Preparação dos peptídeos	77
4.7.2. Avaliação da atividade antiparasitária dos peptídeos contra formas intraeritrocitárias de <i>Plasmodium falciparum</i>	77
4.7.3. Avaliação de citotoxicidade em células de mamíferos	78
4.7.4. Avaliação de atividade antiparasitária contra formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	78

4.7.5. Avaliação de atividade antiparasitária contra formas tripomastigotas sanguíneas de <i>T. brucei brucei</i>	79
4.7.6. Avaliação de atividade antiparasitária contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	80
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1. Desenho racional dos oito análogos de Oc-P1	81
5.2. Atividade antibacteriana e hemolítica	101
5.3. Avaliação da seletividade	104
5.4. Ensaio antiparasitários	106
5.4.1. Atividade antiparasitária contra <i>T. brucei brucei</i> (formas tripomastigotas sanguíneas)	106
5.4.2. Atividade antiparasitária contra <i>T. cruzi</i> (formas amastigotas)	108
5.4.3. Atividade antiparasitária contra <i>T. cruzi</i> (formas epimastigotas)	111
5.4.4. Atividade antiparasitária contra <i>P. falciparum</i> (formas intraeritrocitárias)	112
6. CONCLUSÕES	114
7. PERSPECTIVAS	116
8. REFERÊNCIAS	117
9. ANEXO 1	134

1. INTRODUÇÃO

1.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS (PAMS)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana frente às opções terapêuticas existentes é uma ameaça crescente à saúde pública. Cada vez mais, essa situação aumenta o interesse dos governos de cada país em busca por novas drogas, pois este grave problema ameaça as conquistas da medicina moderna (WHO, 2014a). Pesquisas resultantes do reconhecimento do papel central dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) mostram que estes compostos, isolados de diversas fontes biológicas, podem representar uma opção promissora às abordagens disponíveis. Os PAMs são substâncias que compõem o arsenal de proteção de um organismo, sendo encontrados em todos os sistemas imunes inatos. Diversas funções já foram descritas para esses peptídeos, incluindo a prevenção do surgimento de diversas infecções e doenças em organismos, em virtude de suas atividades antitumoral, fungicida, espermicida e antiparasitária, o que indica que esses peptídeos poderiam fornecer a base para o desenvolvimento de uma nova classe de antibióticos e drogas citotóxicas (MARSHALL; ARENAS, 2003; CONLON, 2011a; NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

Os PAMs exibem uma variedade de estruturas secundárias podendo ser classificados em cinco grupos principais: (1) peptídeos que adotam conformações folhas- β estabilizadas por duas ou três ligações de dissulfeto; (2) peptídeos sem resíduos de cisteína e de estruturas α -hélice anfipáticas; (3) peptídeos aniônicos, ricos em aspartato e glutamato; (4) peptídeos ricos em resíduos de Trp, Pro e/ou His, (5) peptídeos compostos por aminoácidos raros (HANCOCK; PATRZYKAT, 2002; REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004). Os PAMs geralmente apresentam entre 10 a 50 resíduos de aminoácidos e podem ser agrupados em famílias, de acordo com a similaridade observada nas suas estruturas primárias (CONLON, 2011a).

Embora atuem por diversos mecanismos, a membrana celular é a mediadora central da atividade biológica dos PAMs (HANCOCK, 2001). Assim, a partir do estudo de modelos de membranas artificiais, diversas hipóteses para explicar o mecanismo de ação desses peptídeos em membranas bacterianas foram formuladas. Os principais mecanismos descritos na literatura são apresentados a seguir.

1.1.1. INTERAÇÕES DE PAMS COM MEMBRANAS

As membranas biológicas apresentam uma ampla variedade de lipídeos e as diferenças nas composições contribuem para a força de adsorção do peptídeo, assim como para a sua inserção na membrana plasmática. Com isso, a efetividade da ação antibacteriana é dependente das diferenças estruturais entre as paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, ilustradas na **Figura 1**. A parede celular de bactérias Gram-negativas apresenta um revestimento de peptidoglicano (PG), além de outros componentes, como lipoproteínas (LP) associadas ao PG e uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos (LPS), enquanto que as bactérias Gram-positivas contêm ácido lipoteicóico (AL) ligado de forma covalente ao PG. Tais diferenças na composição estimulam o estudo de PAMs com ação seletiva (EPAND; VOGEL, 1999; SCHMIDTCHEN; PASUPULETI; MALMSTEN, 2014).

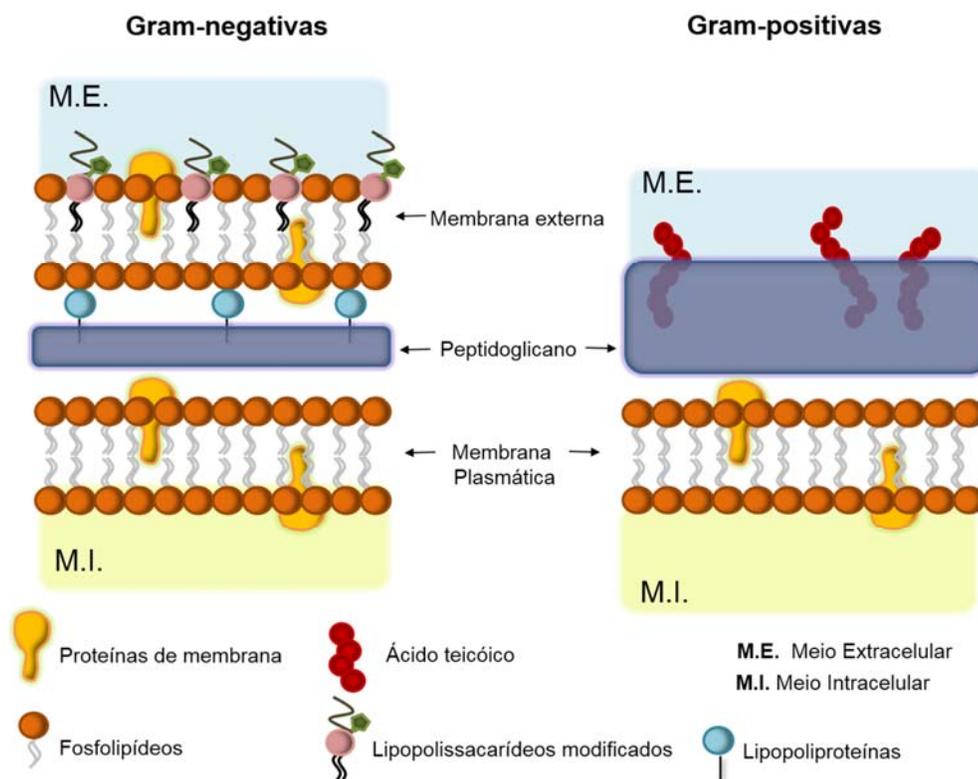


Figura 1. Ilustração esquemática das paredes celulares de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, em função das estruturas encontradas. Baseada em SCHMIDTCHEN; PASUPULETI; MALMSTEN, 2014.

A interação inicial, promovida pela atração aos componentes aniônicos nas membranas bacterianas (como, por exemplo, os LPSs ou o AL presentes nas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, conforme apresentado) sustenta a correlação entre a atividade dos PAMs em fosfolipídios de membranas celulares e sua função biológica. A carga positiva conferida pela presença de resíduos catiônicos em sua estrutura primária atribui aos PAMs catiônicos uma maior afinidade às membranas carregadas negativamente que às membranas zwitteriônicas de fosfatidilcolina e esfingomiéline, constituintes da monocamada externa de células como os eritrócitos. Essa ação, muitas vezes específica, justifica o interesse em utilizar os PAMs no desenvolvimento de agentes terapêuticos. Contudo, há relatos de peptídeos que atuam de forma não-seletiva, apresentando afinidade tanto às membranas de patógenos quanto para as células do hospedeiro, levando à formação de poros em ambas as estruturas, resultando em um desbalanço osmótico e lise celular (DE OLIVEIRA; SALDANHA, 2010; FEIO; BASTOS, 2012; AOKI; UEDA, 2013; TEIXEIRA; ZHAO et al., 2013; EBENHAN et al., 2014)

Atualmente, existem pelo menos quatro modelos para descrever os possíveis mecanismos de ação dos PAMs, conforme a **Figura 2**.

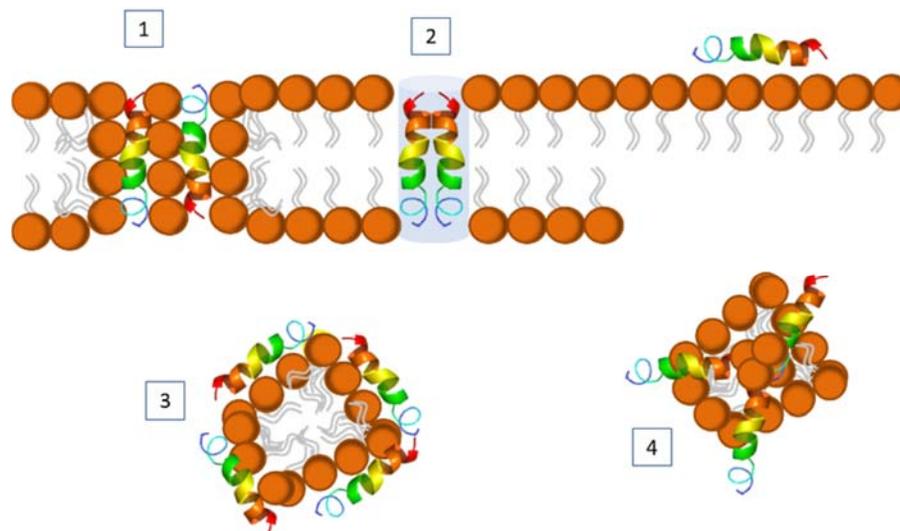


Figura 2. Ilustração esquemática dos diferentes modos de ação descritos para os PAMs em membranas lipídicas: poro toroidal (1), barril (2), carpete (3) e modelo agregado (4). Baseada em LI et al., (2012).

O primeiro deles, o modelo do poro toroidal (**Figura 2, número 1**), sugere que após ou antes do peptídeo se ligar à membrana, a interação eletrostática entre ele e as cabeças polares dos lipídeos impõe uma tensão na membrana e a permeação é induzida no local onde a concentração de peptídeos excede a relação crítica entre peptídeo e lipídeo. A mudança de orientação destes peptídeos induz também uma mudança na orientação dos lipídeos vizinhos, caracterizando a formação de poros toroidais na membrana. A expansão da membrana lipídica devida às interações permite o relaxamento das cadeias alquila e o afinamento da membrana, facilitando posteriormente também sua ruptura. É um processo, portanto, em que há influência mútua de lipídeos e peptídeos em relação à formação de poros: enquanto o peptídeo promove a curvatura da membrana, a organização lipídica modula a conformação do PAM (LI et al., 2012; PUSHPANATHAN; GUNASEKARAN; RAJENDHRAN, 2013; SCHMIDTCHEN; PASUPULETI; MALMSTEN, 2014).

O segundo é o modelo “formação de barril” (*barrel-stave* - **Figura 2, número 2**). Através deste mecanismo, os peptídeos assumem uma orientação de forma a permitir a formação de um canal e a morte celular resulta de efeitos como a perda de polarização e vazamento de conteúdos intracelulares. A estrutura secundária do PAM é determinante para este modelo, pois os resíduos hidrofóbicos e catiônicos devem se organizar de tal modo a promover a organização de oligômeros peptídicos em uma configuração transmembranar, correspondente a espessura da membrana (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; LI et al., 2012).

O terceiro é o mecanismo de formação de carpete (*carpet-like* – **Figura 2, número 3**), no qual os peptídeos são adsorvidos paralelamente à superfície da membrana, formando agregados toroidais estabilizados. Após a formação de poros transitórios, o colapso da membrana ocorre e há formação de pequenas vesículas revestidas pelos PAMs. No entanto, ao contrário do mecanismo de formação de barril, esse modelo não depende que o PAM tenha uma estrutura distinta, como conformações em α -hélice ou folha- β , nem a formação de canais (SHAI; OREN, 2001; JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; LI et al., 2012; SCHMIDTCHEN; PASUPULETI; MALMSTEN, 2014).

O último mecanismo é definido pelo modelo agregado (**Figura 2, número 4**). De acordo com este modelo, a ação inicial do peptídeo envolveria um deslocamento competitivo de cátions bivalentes (Mg^{2+} e Ca^{2+}) associados aos fosfolipídios da

membrana, de forma a obter acesso às membranas externas e internas. Este modelo tem uma natureza menos formal e pode explicar tanto a permeabilização da membrana, onde são formados canais de tamanhos e tempos de vida diversos, como a translocação de um PAM através da camada bilipídica. Neste modelo, os PAMs se reorientam para formar um complexo de micelas (conforme sugerido por outros modelos, como os já citados anteriormente), mas aqui, os peptídeos não adotam nenhuma orientação particular. Assim, a ausência de uma estrutura formal de canal leva à formação de canais que variam dramaticamente em suas características estruturais (WU et al., 1999; PAPO; SHAI, 2003; JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; HUANG; HUANG; CHEN, 2010; LI et al., 2012).

Além dos mecanismos descritos, alguns PAMs podem provocar a morte de células-alvo sem provocar a permeabilização da membrana, indicando haver outros mecanismos de indução de morte celular. A redução das sínteses de proteínas e de componentes estruturais da parede celular, assim como a inibição de atividade enzimática e interações com ácidos nucleicos, são processos que podem ser comprometidos pela ação de um PAM (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006; GUILHELMELLI et al., 2013). Desta forma, os mecanismos de ação de PAMs podem ser classificados conforme seu alvo de atuação: a membrana plasmática ou um alvo intracelular.

Contudo, a eficácia de um PAM é modulada por diversos fatores, sendo os mecanismos de resistência apresentados pelos patógenos fatores limitantes da potencialidade desses compostos (**Figura 3**). Uma vez que o reconhecimento de PAMs catiônicos é feito pela membrana plasmática por meio de interações eletrostáticas, a inativação de um peptídeo pode ser originada por modificações estruturais na própria membrana (**Figura 3, número 1**), como a redução da eletronegatividade (pela diminuição do teor de fosfolipídios aniônicos e o aumento de componentes catiônicos) e modificações no AL (comuns nas bactérias Gram-positivas). Em Gram-negativas, foram relatadas modificações na estrutura dos LPSs (como a acilação do lipídeo A, âncora hidrofóbica do LPS), onde níveis mais baixos de fosfolipídios aniônicos estão associados à resistência bacteriana (ANDREU; RIVAS, 1998; BAHAR; REN, 2013).

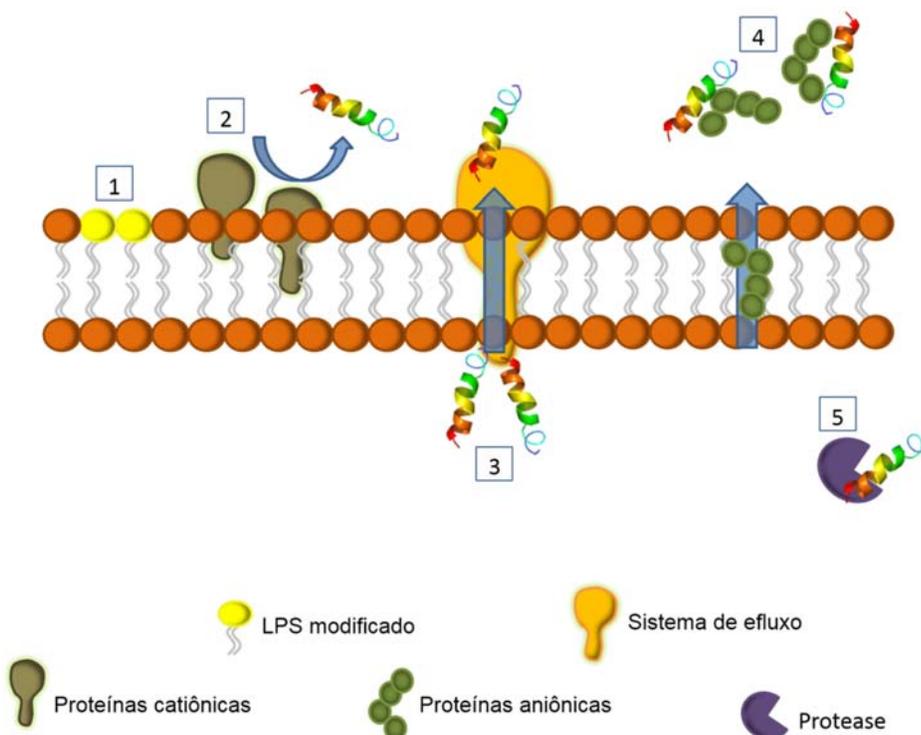


Figura 3. Ilustração esquemática dos diferentes mecanismos de resistência bacteriana propostos à ação dos PAMs: (1) a presença de modificações estruturais em componentes da membrana podem diminuir a atração dos PAMs a essas estruturas; (2) as proteínas catiônicas expressas na membrana podem atuar repelindo os PAMs; (3) os sistemas de efluxo que podem bombear para fora da célula compostos indesejados, como os PAMs; (4) a secreção de proteínas aniônicas para o meio extracelular pode neutralizar a ação de PAMs catiônicos e (5) a atuação de proteases pode resultar na degradação dos PAMs. Baseada em BAHAR e REN, (2013).

As bactérias também podem expressar algumas proteínas catiônicas (**Figura 3, número 2**), bloqueando o acesso dos PAMs à membrana bacteriana. Sistemas de efluxo (**Figura 3, número 3**) também compõem a maquinaria utilizada para impedir a concentração de PAMs no meio intracelular. Estes complexos protéicos, geralmente ligados à membrana bacteriana, atuam bombeando compostos tóxicos para fora das células e possuem um importante papel na resistência a diferentes agentes antimicrobianos. Além disso, a produção de proteínas carregadas negativamente por essas bactérias também pode neutralizar a ação dos PAMs, os afastando da membrana plasmática bacteriana (**Figura 3, número 4**). E finalmente, a inativação dos PAMs pode ser promovida pela ação de proteases (**Figura 3, número 5**).

secretadas pelas bactérias no meio extracelular (NIZET, 2006; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012; BAHAR; REN, 2013; NAWROCKI; CRISPELL; MCBRIDE, 2014).

1.1.2. MEMBRANAS DE PARASITOS E INTERAÇÕES COM PAMs

O conhecimento atual sobre a composição geral e distribuição de fosfolipídeos em membranas no grupo dos protozoários ainda é muito limitado. A avaliação morfológica e ensaios funcionais sugerem que a permeabilização da membrana é causada pela distorção de sua estrutura, mas não por meio da ativação de um poro ou um transportador pré-existentes. A resposta a essa ação geralmente inclui a dissipação de gradientes iônicos através da membrana, perda de nutrientes e/ou componentes citoplasmáticos e, enfim, um colapso do complexo bioenergético celular e lise osmótica. A resistência por vezes descrita para os PAMs no Reino Protozoa é justificada pela existência de barreiras extracelulares, como a formação de cistos (encontrados em protozoários dos gêneros *Entamoeba*, *Giardia*, *Toxoplasma* e *Cryptosporidium*), a produção de glicocálix (em *Trypanosomatidae*) e a dificuldade de acesso às formas parasitárias intracelulares (como em *Plasmodium*, *Leishmania*, *T. cruzi*) (RIVAS; LUQUE-ORTEGA; ANDREU, 2009; ZUCCA; SAVOIA, 2011).

São diversas as moléculas essenciais para a virulência de um parasito. A diversidade de glicoconjugados presentes na membrana externa e, conseqüentemente, as múltiplas funções atribuídas a estas moléculas justificam a importância de se avaliar essas estruturas, responsáveis por processos como a invasão da célula hospedeira e a manipulação de seu sistema imune (GUHA-NIYOGI; SULLIVAN; TURCO, 2001). A superfície membranar de tripanossomatídeos, por exemplo, é composta por moléculas ancoradas via glicosilfosfatidilinositol (GFI) e/ou glicolípídios livres, incluindo o lipofosfoglicano (LFG), proteofosfoglicano (PFG) e glicosilinsitolfosfolipídeos (GIFLs). Estas moléculas são expressas em grande quantidade nos protozoários e são conhecidas por desempenhar funções biológicas essenciais, tais como a proteção contra o sistema imunitário do hospedeiro, a preservação do parasita no hospedeiro invertebrado e atuação moduladora no processo de infecciosidade (VIAL et al., 2003; GOLDSTON; POWELL; TEMESVARI, 2012; RAMAKRISHNAN et al., 2013).

Embora esses glicoconjugados de superfície, por vezes, compartilhem características estruturais, bem como estratégias biossintéticas com moléculas do hospedeiro, todos são únicos em certos aspectos (GUHA-NIYOGI; SULLIVAN; TURCO, 2001). A superfície de formas tripomastigotas de *T. cruzi* é coberta principalmente por duas famílias heterogêneas de glicoproteínas ancoradas por GPI, as glicoproteínas tipo mucina e as trans-sialidases, esta última sendo uma enzima única e importante para este parasita, também caracterizado como fator de virulência (MCCONVILLE et al., 2002).

A superfície de formas sanguíneas de *T. brucei* é coberta por uma glicoproteína denominada glicoproteína variante de superfície e a sua ausência em formas próclicas desempenha um papel na seletividade de alguns PAMs. A susceptibilidade diferencial exibida pelos parasitos após o tratamento com alguns PAMs sugere que as diferenças entre as composições das membranas pode ser um alvo atrativo para o desenvolvimento de drogas antiparasitárias (GRUSZYNSKI et al., 2003; HARRINGTON et al., 2010).

Em *Leishmania*, o LFG é o lipoconjugado mais presente na superfície de promastigotos e desempenha um importante papel na interação entre o parasito e o vetor. Uma vez no hospedeiro mamífero, é capaz de promover a infectividade do parasito (KAYE; SCOTT, 2011). A investigação das implicações do LFG na virulência entre parasitas *knockouts* (gerados após a remoção da região codificante para esta biomolécula) e as linhagens *wild-type* mostrou que o LFG é necessário para o estabelecimento da infecção em células mamíferas. No entanto, no mesmo estudo, foi mostrado que o LFG não é um fator crítico para as formas amastigotas, uma vez que esta glicoproteína é expressa em níveis muito baixos neste estágio (SPÄTH et al., 2000; SACKS; KAMHAWI, 2001). Um estudo recente realizado por Eggimann e colaboradores (2015) demonstrou que formas mutantes de *L. mexicana* sem o PFG, outra glicoproteína presente na membrana da forma promastigota, foram menos suscetíveis à atividade leishmanicida de PAMs, sugerindo que as características das membranas de formas amastigotas, por apresentarem quantidades reduzidas de LFG e PFG, podem justificar a resistência à ação de agentes citolíticos.

Ainda em *Leishmania*, a classe de GFILs (formas livres de GIFs) está presente de forma abundante, em um número de cópias de aproximadamente 10^7 por célula. Estudos apontam que a presença de uma glicoproteína proteolítica, a gp63

metaloproteinase (leishmanolisina) desempenha um papel importante na virulência do parasito e também parece estar envolvida na proteção de processos de morte apoptótica induzida por PAMs (TACHADO; MAZHARI-TABRIZI; SCHOFIELD, 1999; SACKS; KAMHAWI, 2001; KULKARNI et al., 2006; KAYE; SCOTT, 2011).

A composição de fosfolipídeos das membranas do parasito *Plasmodium* durante o ciclo eritrocítico é significativamente diferente daquelas das células eucarióticas hospedeiras. Durante seu estágio biológico, os parasitos promovem alterações substanciais nas propriedades estruturais e funcionais na membrana da célula hospedeira. Essas mudanças, além de estarem envolvidas com diversos aspectos fisiopatológicos da doença (como fagocitose, citoaderência e outros), também estão relacionadas ao seu desenvolvimento intracelular. Após a infecção, o conteúdo de fosfolipídeos (FL) da membrana eritrocitária é acrescido em até seis vezes, havendo assim diferenças na composição lipídica entre eritrócitos infectados e não infectados, com grandes aumentos de fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE) e ácido fosfatídico (AF). No parasito, a distribuição relativa de FC e FE é maior, uma vez que estes FLs constituem 40-50% e 35-45% do total de FL, respectivamente; a proporção de fosfatidilinositol (FI) também é consideravelmente elevada (HSIAO et al., 1991; VIAL et al., 2003; MENDONÇA-PREVIATO et al., 2005; VALE; AGUIAR; GOMES, 2014).

Desta forma, a compreensão da biossíntese de lipídeos em protozoários, processo responsável pela divisão e diferenciação celular, processos dependentes da manipulação do maquinário lipídico e do recrutamento de enzimas presentes na célula hospedeira, apresenta-se como uma estratégia potencial para o estudo da ação dos PAMs sobre os parasitos. Com isso, é possível comprometer o ciclo biológico do parasito sem causar efeitos prejudiciais ao hospedeiro (MARÉCHAL et al., 2011; RUB et al., 2013).

Conforme discutido anteriormente para a ação de PAMs em bactérias, os principais mecanismos de ação dos PAMs podem ser divididos em dois grupos: a atividade membranolítica ou uma ação direcionada a alvos intracelulares. O primeiro mecanismo é mediado pela formação de poros e ruptura da membrana plasmática, sendo que a resistência à ação de PAMs resulta também da natureza das barreiras extracelulares (RIVAS; LUQUE-ORTEGA; ANDREU, 2009; MARÉCHAL et al., 2011). O segundo mecanismo é representado pela morte por autofagia-like e apoptose,

processos relacionados com a disfunção mitocondrial e perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), mediados por PAMs (MOR, 2009; VALE; AGUIAR; GOMES, 2014). A autofagia, resultado do mecanismo de sobrevivência catabólico, tem sido relatada em protozoários parasitas. Os traços característicos da autofagia, tais como o colapso do potencial de membrana e um declínio do nível de ATP, incluindo a observação de vacúolos autofágicos, fragmentação nuclear mínima e a independência da atividade da caspase-like foram observados em vários estudos (BERA et al., 2003; DELGADO et al., 2009; SMIRLIS et al., 2010; MARR; MCGWIRE; MCMASTER, 2012; DUQUE et al., 2013; PROTO; COOMBS; MOTTRAM, 2013).

A exposição de proteínas mitocondriais, como o citocromo c e as caspases, conduz à desestabilização da membrana externa da mitocôndria, resultando em dissipação do $\Delta\Psi_m$. Embora este processo ainda não esteja totalmente esclarecido em protozoários, foi demonstrado, por exemplo, que a atuação do PAM pexiganan, um análogo do PAM magainina-2, gera a liberação de íons cálcio no meio intracelular, resultando em toxicidade mitocondrial, levando à morte celular de parasitos do gênero *Leishmania* (KULKARNI et al., 2006, 2009; PROTO; COOMBS; MOTTRAM, 2013).

As evidências experimentais sugerem, portanto, diversos mecanismos de ação antiparasitária para os PAMs, conforme ilustrado pela **Figura 4**. De forma geral, os peptídeos (representados pelas estruturas em hélice) parecem ter afinidade pela membrana negativamente carregada do parasito e essa interação danificaria a sua estrutura, causando lesões de diversos tamanhos, promovendo o trânsito de diversas molécula e comprometendo a integridade celular (**Figura 4, números 1 e 2**). No entanto, alguns PAMs podem ser inativos fora do parasito, sendo ativados pelo ambiente intracelular após a indução de sua internalização. Dentro do parasito, os PAMs podem ter alvos como os acidocalcisomas (**Figura 4, número 3**), os glicosomos (**Figura 4, número 4**) e o retículo endoplasmático (estrutura representada junto ao núcleo – **Figura 4, número 5**). A ação nessas organelas provoca o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} a partir do extravasamento desse íon, armazenado nas estruturas citadas. Os PAMs também podem provocar uma alteração no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$ – na mitocôndria, representada na **Figura 4, número 6**), interrompendo a produção de ATP, possivelmente pelo efeito tóxico do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular. Também pode ocorrer extravasamento de ATP através das membranas celulares,

danificadas pelas lesões (DELGADO et al., 2009; MCGWIRE; KULKARNI, 2010; TORRENT et al., 2012).

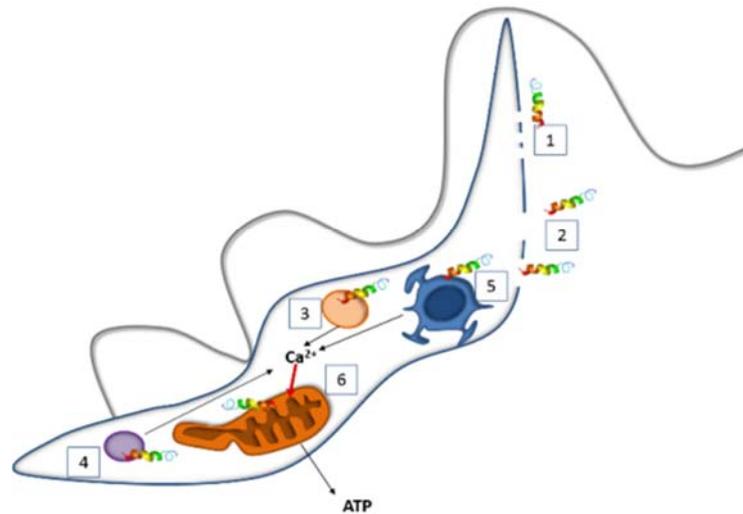


Figura 4. Modelos propostos para a interação de PAMs em tripanossomatídeos. A ação dos PAMs sendo direcionada à membrana do parasito pode resultar em pequenas (1) ou grandes (2) lesões. Os alvos intracelulares dos PAMs podem ser os acidocalisomas (3), os glicossomos (4), o retículo endoplasmático (5) ou a mitocôndria (6). Baseada nos trabalhos de MCGWIRE; KULKARNI, (2010) e TORRENT et al., (2012).

1.2. OTIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS PAMs

Um fator crucial para que um PAM seja considerado terapeuticamente relevante é sua seletividade quanto às interações com membranas-alvo, pois sua ação deve provocar a morte do patógeno e causar o mínimo de dano às células hospedeiras. Com essa finalidade, diversos peptídeos sintéticos vêm sendo propostos com vistas a aumentar a compreensão sobre os parâmetros importantes para cada peptídeo, procurando assim, apresentar novas estruturas que desempenhem a atividade biológica desejada (FJELL et al., 2012). É desejável que os peptídeos modificados sejam estáveis em meios adversos, de forma a manter sua atividade nas condições fisiológicas e resistir à degradação por enzimas proteolíticas (BROGDEN; BROGDEN, 2011). O desenho racional visando aplicações terapêuticas também busca obter peptídeos com o menor domínio ativo possível, de forma a reduzir os

custos voltados à sua produção. Para o *design* de novos peptídeos existem quatro abordagens básicas, de acordo com ZELEZETSKY; TOSSI, (2006):

a) *Modificações nas estruturas primárias de peptídeos selvagens*, por meio da substituição, adição ou deleção de resíduos de aminoácidos, incluindo modificações nas porções N- e C-terminal e também a síntese de peptídeos híbridos (combinação de dois ou mais peptídeos);

b) *Abordagem minimalista*, na qual os peptídeos gerados a partir desse raciocínio possuem poucos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos diferentes, e a carga positiva pode ser conferida pela presença dos resíduos lisina e/ou arginina. Aqui a intenção principal é manter o caráter anfipático da α -hélice. No entanto, é importante salientar que essa abordagem ignora sequências e características já previamente selecionadas por processos evolutivos, o que pode resultar em peptídeos de atividade citotóxica considerável;

c) *Bibliotecas combinatórias*, contendo diversas sequências de peptídeos ativos, da qual várias informações como o tamanho de interesse e posições de certos resíduos de aminoácidos (assim como os tipos a serem utilizados), podem ser utilizadas para a construção de novas sequências. Uma biblioteca sintética pode ser preparada por duas maneiras diferentes: "síntese em paralelo", onde os produtos são gerados em diferentes vasos de reação e estão disponíveis individualmente, ou os compostos podem ser obtidos na forma de uma mistura pela metodologia sintética "one-pot", denominada também como reação telescópica (CASTRO; CILLI; FONTES, 2006);

d) *Abordagem assistida por template*, na qual o *template* pode ser obtido por meio da comparação de trechos estruturalmente homólogos a partir de buscas em grandes bancos de dados de sequências de peptídeos; os padrões conservados podem então ser utilizados para desenhar novos PAMs. A lógica não é determinar homologias significativas entre sequências ou a conservação posicional de aminoácidos específicos, mas sim identificar padrões subjacentes na distribuição dos diferentes tipos de resíduos, e na variação dos parâmetros físico-químicos, que podem ser correlacionados com a potência e especificidade. Usando este modelo como guia reduz significativamente o número de compostos a serem sintetizados. Além disso, esta abordagem também pode auxiliar na construção de bibliotecas sintéticas.

A **Figura 5** retrata a análise publicada por Tossi e colaboradores (2006) sobre um estudo de composição de PAMs, após o alinhamento de 150 peptídeos de diversos organismos. O gráfico representa a frequência dos diferentes resíduos de aminoácidos em cada posição em uma projeção em hélice da estrutura primária, na qual somente duas posições foram consideradas conservadas: a posição 1 (>70% Gly) e 8 (>50% Lys). Foi observado que a maioria dos peptídeos comparados apresentava carga residual entre +4 e +9, entre 40 e 60% de porção hidrofóbica e uma anfipaticidade relativa entre 50 e 60%

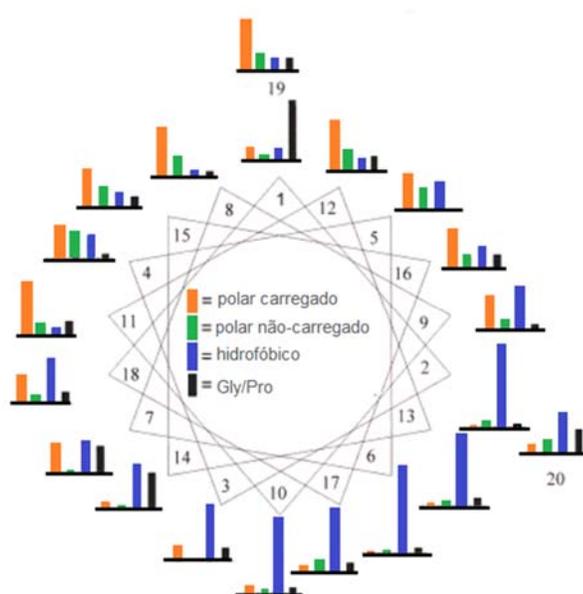


Figura 5. Frequência de distribuição de grupos de resíduos de aminoácidos após comparação de 150 PAMs. A projeção em hélice retrata a frequência observada de grupos de resíduos em cada posição. Adaptado de TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, (2000).

O estudo da relação entre *estrutura-atividade* de peptídeos envolve modificações sistemáticas de moléculas já caracterizadas e a determinação da atividade via a realização de diversos ensaios. Diferentes parâmetros são avaliados e a importância de cada um deles deve ser considerada, pois podem influenciar a eficácia da ação e seu espectro de atuação. Cada uma dessas características físico-químicas é descrita a seguir.

Cationicidade (carga): é um parâmetro caracterizado pela distribuição de resíduos de aminoácidos positivamente carregados ao longo da estrutura primária de

um peptídeo (DENNISON et al., 2005a). A maioria dos peptídeos anfipáticos catiônicos apresenta uma carga positiva líquida variando entre +2 e +9. Diversos valores de carga líquida são encontrados nos PAMs, sendo que a amidação do domínio carboxi-terminal também confere um aumento na carga positiva, sendo tal característica geralmente essencial para a atividade biológica de peptídeos que apresentam essa alteração. No entanto, tal modificação pós-traducional não é detectada em todos os PAMs antibióticos já descritos, mas é comum em diversos peptídeos isolados de anuros (YEAMAN; YOUNT, 2003; PUKALA et al., 2006).

A manipulação de resíduos de carga positiva (lisina, por exemplo) aumenta a discriminação entre a superfície negativa de membranas bacterianas e de membranas de células eucarióticas. No entanto, embora a ação de um PAM possa ser promovida pelo aumento de sua cationicidade, existe um limite para cada peptídeo, onde as interações eletrostáticas entre os resíduos carregados podem afetar a estabilidade da estrutura, comprometendo assim sua atividade biológica (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012; SCHMIDTCHEN; PASUPULETI; MALMSTEN, 2014).

Anfipaticidade, momento hidrofóbico e ângulo polar: a anfipaticidade está relacionada à disposição periódica de resíduos hidrofóbicos, alternada com padrões similares de resíduos polares. A periodicidade de resíduos polares e apolares ideal é de 3 a 4 resíduos, o que permite a formação de uma conformação em α -hélice (ZELEZETSKY; TOSSI, 2006). Assim, a anfipaticidade é medida pelo momento hidrofóbico ($\langle\mu_H\rangle$) caracterizado pelo somatório dos vetores de hidrofobicidade de cada resíduo perpendicular ao eixo de uma α -hélice ideal, na qual o ângulo entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos está próximo de 100° (EISENBERG; WEISS; TERWILLIGER, 1984; DATHE et al., 1997).

Esta disposição dos resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos em conformação α -hélice retrata o ângulo polar. Em um caso hipotético no qual uma face é exclusivamente polar e a outra face exclusivamente composta por resíduos hidrofóbicos, o ângulo entre elas seria igual a 180° . É um parâmetro passível de manipulação, por meio da substituição dos resíduos de aminoácidos de forma a reduzir esse índice. A influência deste fator está relacionada à estabilidade do peptídeo e à formação dos poros promovidos pela interação peptídeo-membrana. A expressão dessas grandezas está relacionada à permeabilização da membrana da célula-alvo, sendo esse efeito significativo em membranas lipídicas de carga neutra,

visto que a atividade citotóxica é influenciada por estes parâmetros (YEAMAN; YOUNT, 2003; DELGADO et al., 2009; EBENHAN et al., 2014; SCHMIDTCHEN; PASUPULETI; MALMSTEN, 2014).

Hidrofobicidade: retrata a capacidade de um dado composto se posicionar entre uma fase aquosa e uma fase hidrofóbica, o que revela ser uma grandeza de grande importância, pois regula a extensão da estrutura primária envolvida na interação entre peptídeos e membranas biológicas (DATHE; WIEPRECHT, 1999). A manipulação deste parâmetro por meio de modificações na face hidrofóbica frequentemente compõe a abordagem de estudo utilizada para o desenho de novos peptídeos.

Embora seja um parâmetro importante para a permeabilização da membrana, o aumento da hidrofobicidade acima de um limiar ótimo está relacionado a uma atividade hemolítica mais pronunciada e à diminuição da atividade antimicrobiana, reduzindo então a atividade seletiva de um PAM. Além disso, pode também comprometer sua estabilidade química e enzimática (APPELT et al., 2007; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012; BAHAR; REN, 2013; SCHMIDTCHEN; PASUPULETI; MALMSTEN, 2014).

A **Figura 6** reúne alguns dos parâmetros discutidos até o momento, de acordo com sua distribuição nos diversos PAMs comparados por (ZELEZETSKY; TOSSI, 2006).

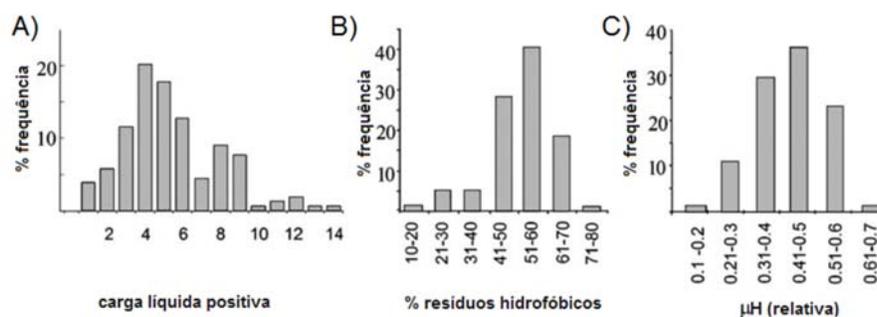


Figura 6. Distribuição e frequência de alguns parâmetros encontrados em PAMs. (A) carga; (B) composição hidrofóbica e (C) anfipaticidade relativa. A determinação dos dois primeiros parâmetros foi feita a partir da análise das sequências completas avaliadas enquanto que o último, para os 20 resíduos de aminoácidos a contar da porção N-terminal. Modificado de ZELEZETSKY; TOSSI, (2006).

Extensão da cadeia peptídica: embora existam peptídeos de sequências ainda menores, a maioria dos PAMs descritos apresenta um número de resíduos abaixo de 45 (massa molecular de ~4,5 kDa), demonstrando que este fator também é relevante na produção biológica de PAMs como agentes moduladores de defesa do sistema imune de diversos organismos. Esta importância pode ser justificada pela maior facilidade metabólica em sintetizar peptídeos de sequências mais curtas, representando uma economia energética para o hospedeiro, além de possibilitar o armazenamento desses PAMs em grandes quantidades, melhorando assim, a resposta do organismo no caso de um ataque microbiano.

A extensão da cadeia peptídica também promove a sua conformação estrutural e o modo de ação em membranas (DENNISON et al., 2005b; HUANG; HUANG; CHEN, 2010; SCHMIDTCHEN; PASUPULETI; MALMSTEN, 2014). Além dos efeitos na sua estruturação e no mecanismo de ação, o comprimento de um PAM também pode afetar sua seletividade. Em PAMs isolados de anuros, tem sido demonstrado que um peptídeo selvagem pode ser reduzido até uma forma mínima ativa, sendo que alguns derivados são mais seletivos e eficazes (ROTEM; RADZISHEVSKY; MOR, 2006; SAVOIA et al., 2008). Além disso, temos as temporinas e bombininas, peptídeos naturalmente pequenos, que são exemplos de peptídeos ativos (MANGONI; MARCELLINI; SIMMACO, 2007).

Assim, a manipulação de parâmetros como a extensão da cadeia peptídica, composição, carga, hidrofobicidade e anfipaticidade pode permitir uma melhoria na relação entre as concentrações citotóxicas e antimicrobianas, de forma a tornar um peptídeo mais seletivo. No entanto, como esses parâmetros físico-químicos estão correlacionados, somente a variação de um deles influencia a resposta dos demais, sendo assim revelada a limitação da compreensão de como um único fator atua na promoção da atividade biológica (HUANG; HUANG; CHEN, 2010; AOKI; UEDA, 2013).

1.3. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

No início da década de 60, Robert Bruce Merrifield (1921–2006) apresentou a proposta de utilização de um suporte sólido à base de poliestireno para a síntese de peptídeos. Após um trabalho iniciado em 1959, três anos depois foi descrita a preparação do tetrapeptídeo Leu-Ala-Gly-Val. Após a síntese de outros peptídeos, como a bradicinina, a angiotensina e a ocitocina, Merrifield anunciou em 1971 a primeira síntese de uma enzima, a ribonuclease A, demonstrando que uma enzima poderia ser obtida pela técnica e que ela apresentaria todas as funcionalidades de uma enzima nativa (MERRIFIELD, 1963; MARSHALL; MERRIFIELD, 1965; GUTTE; MERRIFIELD, 1971a, 1971b; ANDREU et al., 1983; SIEBER, 1987; KRESGE; SIMONI; HILL, 2006; MITCHELL, 2008). Pelo desenvolvimento desta metodologia, Merrifield foi agraciado com o prêmio Nobel de Química em 1984. A técnica está ilustrada pela **Figura 7**.

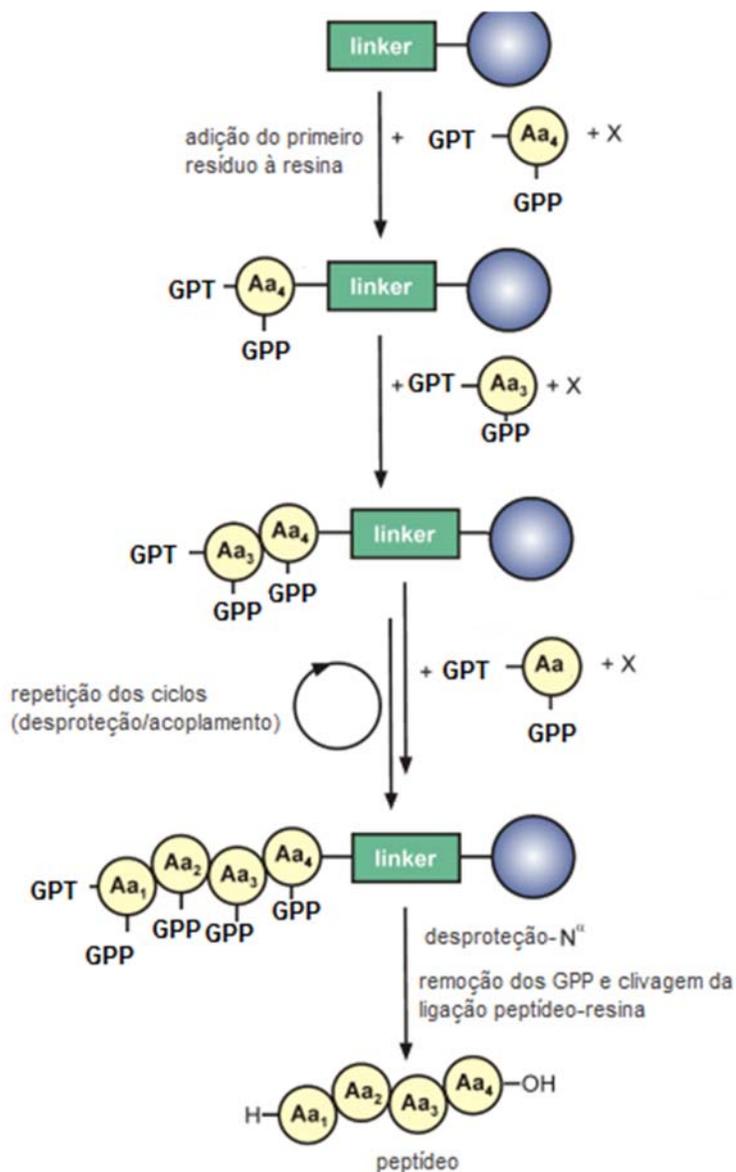


Figura 7. Esquema representativo geral da síntese de um tetrapeptídeo por SPFS. O primeiro aminoácido (Aa₄) a ser ligado à resina (bola azul) é referente ao último resíduo da sequência de interesse. Esta ligação é direcionada pela presença de um *linker* (quadrado verde) e promovida pela ativação do grupo carboxílico do Aa₄, feita pelo componente X. Cada aminoácido a ser acoplado apresenta duas modificações em sua estrutura: um GPT (grupo de proteção temporário) e um GPP (grupo de proteção permanente). Para o acoplamento do aminoácido seguinte (Aa₃), é necessária a sua ativação por X e a remoção do GPT na porção N-terminal de Aa₄. O mesmo processo é repetido até que seja adicionado o último resíduo (Aa₁). Para a obtenção do peptídeo livre, é realizada a clivagem da ligação entre o peptídeo e a resina, além da remoção dos GPPs. Modificado de MÄDE; ELS-HEINDL; BECK-SICKINGER (2014a).

Na síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), derivados de aminoácidos (ou seja, aminoácidos modificados com grupos protetores nas cadeias laterais e no grupo amino) são ancorados a uma resina. Após a adição do primeiro resíduo, o crescimento do peptídeo prossegue em sentido linear, da direção C- para a N-terminal por meio de ciclos repetitivos de desproteção N- α e reações de acoplamento de aminoácidos. O processo de desproteção/acoplamento é repetido até a adição do último resíduo a compor a sequência peptídica. Ao final da síntese, os grupos protetores são clivados para obtenção do peptídeo (MITCHELL et al., 2008; GÓNGORA-BENÍTEZ; TULLA-PUCHE; ALBERICIO, 2013; MÄDE; ELS-HEINDL; BECK-SICKINGER, 2014).

Na SPFS, as estratégias são determinadas a partir da escolha dos compostos protetores dos grupos reativos dos aminoácidos envolvidos na síntese. A primeira baseia-se na utilização do grupo Boc (t-butiloxicarbonila), que é removido por ácido trifluoroacético (TFA) ou pela combinação TFA em diclorometano, enquanto que a etapa final de clivagem acontece mediante tratamento com um ácido forte, como o ácido fluorídrico anidro (HF). Embora este método permita uma síntese eficiente, o uso de HF, um composto altamente tóxico, e a necessidade de equipamentos especiais para tal, limitam a aplicabilidade desta abordagem à especialistas. Além disso, a utilização de condições extremamente ácidas pode resultar em deleções de aminoácidos (CHANDRUDU; SIMERSKA; TOTH, 2013; MACHADO et al., 2004).

O segundo método, denominado química Fmoc/tBu, foi empregado no presente estudo e é baseado em uma estratégia de proteção ortogonal, desenvolvida por Barany e Merrifield, que tem como vantagem a remoção dos grupos temporários e permanentes por diferentes mecanismos, permitindo assim, a utilização de condições ácidas mais brandas para a desproteção final e a clivagem do peptídeo da resina. Por todas estas razões, a síntese de peptídeos baseada na metodologia Fmoc é a mais escolhida para sínteses rotineiras (BARANY; MERRIFIELD, 1977; CARPINO, 1987; BENOITON; GROUP, 2006; WONG; ZIMMERMAN, 2013; MÄDE; ELS-HEINDL; BECK-SICKINGER, 2014).

Na **Figura 8** é apresentado um esquema geral para melhor exemplificar a utilização dos grupos protetores na SPFS. Os protetores de grupos amino (em vermelho) conferem uma proteção temporária (GPT), a qual é retirada no final de cada ciclo antes da adição de um novo resíduo à sequência. Já os grupos protetores de cadeia lateral (em verde) são grupos permanentes (GPP), que somente são retirados

na etapa de clivagem. O *linker* (ou ligante), parte constituinte do suporte sólido, é o local onde o peptídeo se liga à resina, e evita a sua clivagem prematura durante os diversos ciclos de acoplamento e desproteção. Além disso, ainda pode atribuir alguma característica ao grupamento carboxi-terminal após a clivagem do peptídeo (GUILLIER; ORAIN; BRADLEY, 2000a; MITCHELL et al., 2008).

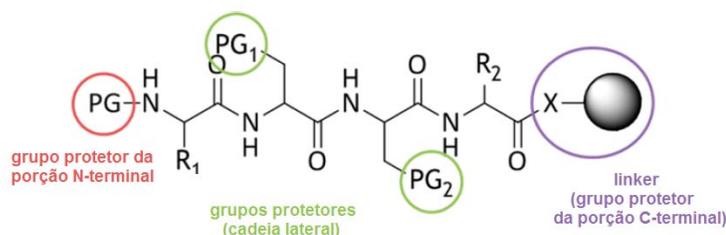


Figura 8. Esquema representando os grupos protetores na SPFS. Circulados em verde, estão os grupos protetores das cadeias laterais, destacando a proteção que só serão retiradas na etapa final da rota sintética. Em vermelho, está apontado o grupo de protetor da região N-terminal, proteção que é retirada a cada ciclo de acoplamento de um novo aminoácido. Modificado de (GÓNGORA-BENÍTEZ; TULLA-PUCHE; ALBERICIO, 2013).

Para a abordagem Fmoc, o mecanismo de clivagem do grupo fluoreno (do grupo Fmoc) ocorre conforme representado na **Figura 9**. A presença de um hidrogênio ácido susceptível à remoção por bases fracas faz com que ocorra a formação de um intermediário altamente reativo, o qual é eliminado após rearranjo para a formação do ânion dibenzofulveno, que é neutralizado pelo excesso de reagente básico em solução. O ânion carboamida, correspondente à porção N-terminal do último resíduo acoplado, por ser instável, sofre decomposição, fornecendo dióxido de carbono e liberando o grupo amina. O grupo Fmoc é, em geral, rapidamente removido por aminas primárias e algumas aminas secundárias, com remoção mais lenta por aminas terciárias. Este processo pode ser catalisado em um meio relativamente polar, na presença de dimetilformamida (DMF), por exemplo, em comparação a um solvente relativamente apolar (diclorometano). Sendo a piperidina (PIP) uma das bases mais utilizadas durante esta etapa, tem-se a formação de um aduto de dibenzofulveno-PIP (FIELDS, 1994; CLAYDEN et al., 2001; KAWANO, 2010).

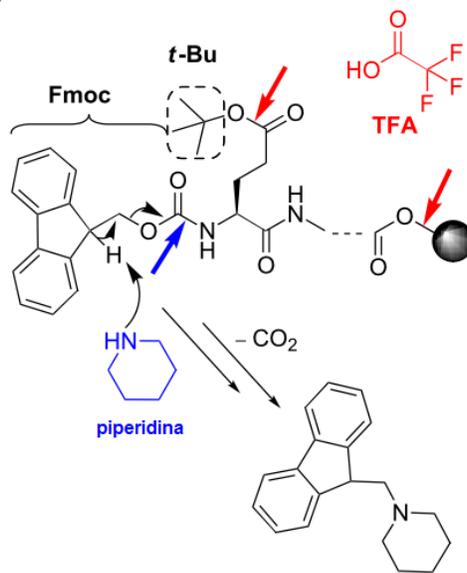


Figura 9. Remoção dos grupos de proteção na SPFS. A seta azul indica a condição básica utilizada (representada pelo uso de PIP) para a remoção do grupo de proteção Fmoc (GPT). O produto gerado no caso é o aduto de dibenzofulveno-PIP. As setas vermelhas destacam a condição ácida (com TFA), importante para a remoção dos GPPs (representado pelo grupo *t*-Bu) e a clivagem da ligação entre o peptídeo e o suporte sólido (bola preta). Modificado de (MÄDE; ELS-HEINDL; BECK-SICKINGER, (2014a).

A clivagem e a desproteção do peptídeo, compõem a etapa final da etapa sintética, sendo este um dos passos cruciais da síntese peptídica. O tratamento da resina com o coquetel de clivagem é composto por uma série de reações, envolvendo a separação do peptídeo do suporte sólido e a remoção dos grupos protetores ao mesmo tempo. Os agentes sequestradores, os *scavengers*, são espécies reativas que suprimem seletivamente ou sequestram os subprodutos gerados durante a etapa de clivagem. Na literatura há a descrição de diversos protocolos de desproteção para os peptídeos sintetizados pela estratégia Fmoc/*t*Bu; a maioria deles se baseiam no uso do ácido TFA, mas diferem na proporção em que ele é utilizado, assim como nos tipos de compostos *scavengers* empregados e no tempo de reação (KING; FIELDS; FIELDS, 1990; GUILLIER; ORAIN; BRADLEY, 2000b; LEY; BAXENDALE, 2002).

A escolha é direcionada pela composição da estrutura primária, uma vez que alguns resíduos apresentam cadeias laterais potencialmente reativas durante o processo de clivagem. A adição do *scavenger* etanoditiol (EDT) é eficiente contra a ação do *t*Bu além de prevenir a realquilação de resíduos de cisteína por radicais

trifenilmetila; enquanto que a presença de tioanisol suprime a oxidação do grupo tioéter do resíduo metionina. Além dos compostos geralmente usados como EDT, tiofenol e tioanisol, a água (H₂O) é um comum aditivo aos reagentes. No reagente K, por exemplo, existe a seguinte proporção: 82,5% TFA, 5%, fenol, 5% H₂O, 5% tioanisol, 2,5% EDT (KING; FIELDS; FIELDS, 1990; GUILLIER; ORAIN; BRADLEY, 2000b; LEY; BAXENDALE, 2002).

O produto bruto obtido pode ser facilmente purificado por meio de métodos analíticos convencionais, sendo geralmente efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR, mas comumente conhecida pela sigla em inglês *RP-HPLC*), enquanto que o controle da pureza é realizado por espectrometria de massas, como a do tipo MALDI-TOF. O desenvolvimento destas técnicas foi um grande ganho para a síntese de peptídeos moderna, uma vez que permite a remoção e identificação de compostos indesejados que foram gerados durante o processo sintético ou após a clivagem do peptídeo da resina (AUBAGNAC et al., 2002; STAWIKOWSKI; FIELDS, 2002; MÄDE; ELS-HEINDL; BECK-SICKINGER, 2014).

É importante salientar que o processo sintético apresenta algumas restrições, como a obtenção de subprodutos resultantes de acoplamentos indevidos ou incompletos. Por se tratar de um processo sequencial, o rendimento de um peptídeo é limitado pela eficiência de cada etapa da síntese. Por exemplo, a síntese de um peptídeo contendo 21 resíduos, se realizada com uma eficiência de 99,8% em cada passo, proporciona um rendimento global de 98%, enquanto que se a eficiência cair para 96%, o rendimento final é de 66%. Dificuldades durante as etapas de acoplamento e desproteção estão associadas à má solvatação da cadeia polipeptídica ancorada ao suporte sólido, elevada tendência de agrupamento de sequências peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos ou à presença consecutiva de aminoácidos com cadeias laterais volumosas (NELSON; COX, 2011; GÓNGORA-BENÍTEZ; TULLA-PUCHE; ALBERICIO, 2013).

Apesar de suas limitações, a produção de peptídeos por meio da SPFS, ainda se trata de uma técnica vantajosa, principalmente após o advento de técnicas automatizadas. A síntese de diversos compostos pode ser feita simultaneamente e em abundância, de acordo o número de “linhas” disponíveis para os vasos de reação em cada equipamento e, além disso, como não é necessário realizar purificações intermediárias e os reagentes podem ser utilizados em excesso. Assim, a SPFS é uma

importante opção para a produção de peptídeos de interesse terapêutico, impulsionando assim, o desenvolvimento e pesquisa de novas drogas (ELS-HEINDL; BECK-SICKINGER, 2014; CHANDRUDU; SIMERSKA; TOTH, 2013; MÄDE).

1.4. DOENÇAS NEGLIGENCIADAS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

As doenças negligenciadas (DNs) compreendem um grupo de doenças infecciosas classificadas pela negligência particular que sofreram em termos de investimento em medidas de controle e abrangem um amplo espectro de infecções virais, bacterianas e parasitárias. Segundo a OMS, estão agrupadas em 17 tipos de infecções e existem mais de um bilhão de pessoas infectadas por uma ou mais DNs, ou seja, um sexto da população mundial (DNDI, 2004; SAVIOLI; DAUMERIE, 2010; MARTIN-PLAZA; CHATELAIN, 2014).

Embora as doenças tropicais e a tuberculose representem aproximadamente 12% dos registros globais de doenças, apenas cinco (0,6%) dos 850 novos medicamentos registrados entre 2000-2011 foram desenvolvidos exclusivamente para o tratamento de DNs. Embora exista financiamento para pesquisas relacionadas às DNs, as inovações dificilmente são revertidas em avanços terapêuticos, como, por exemplo, produção de novos fármacos, métodos de diagnósticos e vacinas. Uma das razões para esse quadro é o baixo interesse da indústria farmacêutica, justificada pelo baixo potencial de retorno lucrativo, uma vez que a população atingida não possui poder aquisitivo para persistir com o tratamento (IOSET JR, BRUN R, WENZLER T, KAISER M, 2009; SAVIOLI; DAUMERIE, 2010; MARTIN-PLAZA; CHATELAIN, 2015).

As opções de drogas disponíveis, além de apresentarem toxicidade ao paciente e exigirem uma aderência sistemática, são comprometidas pela constante seleção de cepas resistentes. Portanto, existe uma necessidade contínua de buscas por novas terapias contra as doenças parasitárias que sejam seguras, eficazes e de fácil administração (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Com o objetivo de ampliar as opções para o desenvolvimento de novos fármacos antiparasitários, a eficácia de diversos PAMs vem sendo investigada dentre alguns dos principais patógenos causadores de DNs, como tripanossomatídeos (*Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania spp*) e *Plasmodium falciparum*.

Pesquisas sobre o papel desses PAMs na regulação do desenvolvimento de cada protozoário ainda é limitado, mas o conhecimento atual sobre as famílias de peptídeos isolados de anuros, apresentado a seguir, busca promover a compreensão dos mecanismos de ação bem como dar suporte ao desenvolvimento futuro de agentes quimioterápicos. As **Figuras 10a** e **10b** apresentam os ciclos biológicos referentes aos tripanossomatídeos e o parasito apicomplexo apresentados nesta introdução, incluindo o estágio de desenvolvimento utilizado como alvo nos estudos a serem citados.

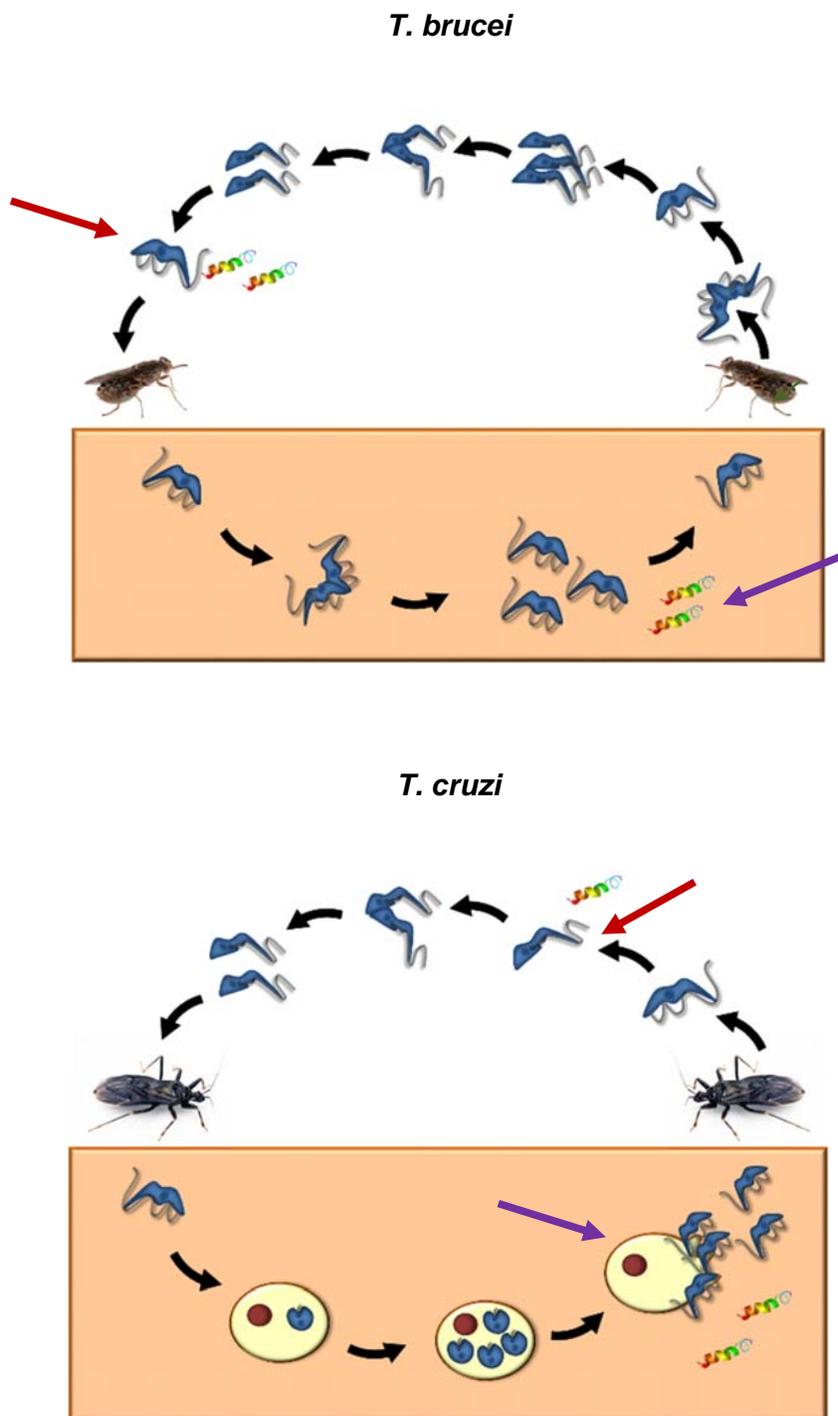


Figura 10a. Atividade antiparasitária dos PAMs descritos de anuros em função dos estágios dos parasitos em seus respectivos ciclos de vida. Em *T. brucei*, foi reportada a atividade em formas tripomastigotas procíclicas (indicada pela seta vermelha) e formas tripomastigotas sanguíneas (seta roxa). Em *T. cruzi*, formas tripomastigotas (seta roxa) e epimastigotas (seta vermelha). Ilustrações baseadas em (RIDGLEY; XIONG; RUBEN, 1999; STUART et al., 2008; TORRENT et al., 2012).

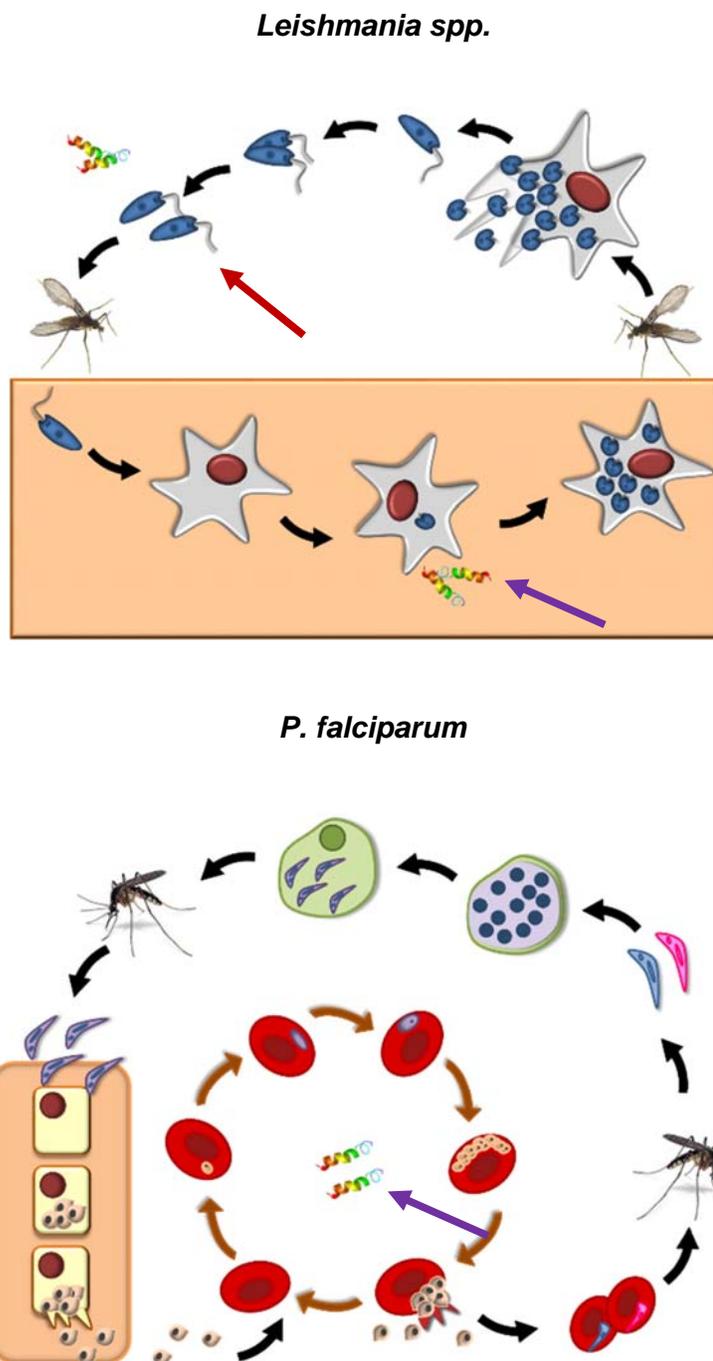


Figura 10b. Atividade antiparasitária dos PAMs descritos de anuros em função dos estágios dos parasitos em seus respectivos ciclos de vida. Em *Leishmania*, foi reportada a ação leishmanicida nas formas promastigotas (seta vermelha) e amastigotas (seta roxa). Em *P. falciparum*, a atividade antimalárica foi observada principalmente em formas do parasito envolvidas no ciclo eritrocítico (seta roxa). Ilustrações baseadas em (RIDGLEY; XIONG; RUBEN, 1999; STUART et al., 2008; TORRENT et al., 2012; VALE; AGUIAR; GOMES, 2014).

1.5. FAMÍLIAS DE PEPTÍDEOS DE ANUROS COM ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

1.5.1. DERMASEPTINAS

A superfamília das dermaseptinas (DRSs) reúne alguns dos peptídeos encontrados na secreção de rãs dos gêneros *Agalychnis*, *Hylomantis*, *Pachymedusa* e *Phyllomedusa*, presentes na subfamília Phyllomedusinae (CONLON, 2011b). Com mais de 50 peptídeos já caracterizados, as dermaseptinas geralmente apresentam entre 21 e 33 resíduos de aminoácidos, sendo um resíduo conservado de triptofano na posição 3 (são exceções as DRS-A4, DRS-C3 e DRS-S13 de *A. annae*, *A. callidryas* e *P. sauvagii*, respectivamente) e um padrão característico de resíduos na região central da estrutura primária: AA(A/G)KAAL(G/N)A (KÖNIG; BININDA-EMONDS; SHAW, 2015). Embora compartilhem alta similaridade, são observadas diferenças na eficácia das atividades biológicas contra diversas espécies de patógenos (AMICHE; LADRAM; NICOLAS, 2008; NICOLAS; EL AMRI, 2009). Dentre os peptídeos de anuros já descritos, a família das dermaseptinas foi a mais explorada até o momento quanto à atividade antimalárica. Quanto aos relatos de atividades antiparasitárias, a **Tabela 1** reúne alguns dados a respeito das DRSs, incluindo alguns dos derivados já produzidos.

A dermaseptina 01 (DRS-S1) foi o primeiro peptídeo da família das dermaseptinas a ser descrito. Obtido a partir de extratos de peles secas de *Phyllomedusa sauvagii*, é composto por 34 resíduos de aminoácidos e apresenta ampla atividade biológica, sem exibir atividade citotóxica frente às células de mamíferos (MOR et al., 1991). Os ensaios realizados para avaliação da atividade antiparasitária de DRS-S1 em formas promastigotas de *L. mexicana* apontaram que a DRS-S1 provoca perturbações na camada bilipídica, modificando a permeabilidade da superfície membranar, levando à morte do parasito após 24 h de incubação. (HERNANDEZ et al., 1992). Este foi o primeiro estudo realizado para esse peptídeo mostrando sua atividade leishmanicida.

Um estudo de Mor e Nicholas (1994) relacionou o desenho de 10 análogos truncados da DRS-S1 e suas respectivas atividades. Foi observado que deleções/modificações na porção N-terminal geraram peptídeos inativos, enquanto que a deleção de resíduos na porção C-terminal resultou no análogo

DRS-S1(1-18)-NH₂, que apresentou maior eficácia em relação à atividade descrita para a molécula nativa. Os resultados indicaram haver uma relação entre os últimos resíduos da sequência de DRS-S1 e sua atividade seletiva, além da importância da porção N-terminal intacta para a atividade antimicrobiana (MOR; NICOLAS, 1994). Savoia e colaboradores (2008) demonstraram, na avaliação da atividade leishmanicida, que o análogo DRS-S1(1-29)-NH₂ apresentou em conjunto ao peptídeo nativo, as atividades leishmanicidas mais eficazes, sem apresentar uma atividade hemolítica associada. Este trabalho revelou outras características essenciais do peptídeo DRS-S1: uma sequência mínima bioativa de DS1(1–15)-NH₂ e a importância do resíduo triptofano na posição 3 para a manutenção da atividade biológica.

Em um ensaio mais recente foram apresentadas as atividades hemolíticas, citotóxicas e leishmanicidas de DRS-S1 em células dendríticas infectadas pelas formas promastigotas de *L. panamensis* e *L. major*. Embora os resultados tenham mostrado ação inibitória para o crescimento das formas avaliadas, os autores salientaram que as concentrações médias eficazes (que estão relacionadas com a infecção intracelular de *L. major*), são mais baixas que as concentrações inibitórias obtidas para as formas extracelulares, apesar da existência de uma barreira entre o peptídeo e o parasito (a célula hospedeira). Isto sugere que existem diferenças estruturais associadas à forma do parasito e às espécies avaliadas, como evidenciado pelos diferentes valores obtidos para as mesmas formas evolutivas, mas em espécies distintas (PÉREZ-CORDERO et al., 2011).

Obtida da secreção de *Phyllomedusa oreades*, a DRS-01 é um peptídeo de 29 resíduos com atividade inibitória entre 3-25 µmol/L para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Sua atividade antiparasitária foi investigada usando as formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*, crescidas em culturas celulares e em meio contendo eritrócitos. Não houve detecção de parasitos após o período de incubação de 2 h com DRS-01, apontando que houve ruptura celular. Os meios de cultura contendo os eritrócitos foram avaliados por microscopia de força atômica e não foi observada nenhuma alteração morfológica, pois não houve associação entre os peptídeos e as membranas dessas células (BRAND et al., 2002).

Os peptídeos dermadistinctina-K e dermadistinctina-L (DDK e DDL, mas, em função da atual nomenclatura, foram renomeados para DI1 e DI2, respectivamente) isolados da secreção de *P. distincta* também foram avaliados no estudo de Brand e

colaboradores, (2002). Os dois compostos sintéticos utilizados foram incubados por 2 h em culturas de formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi* e induziram a morte dos parasitos a uma concentração de 16 µg/mL, não havendo, portanto, diferenças significativas nas atividades desempenhadas em função da composição de cada peptídeo. Também não foi constatada toxicidade em eritrócitos murinos (BRAND et al., 2002).

A avaliação do carácter leishmanicida de DRS-01 em *L. chagasi* (*syn. L. infantum*) mostrou que a suscetibilidade ao peptídeo é dependente do tempo de exposição, uma vez que a concentração necessária para inibir completamente o crescimento da população de formas promastigotas diminui à medida que se aumenta o tempo de exposição (ZAMPA et al., 2009). A avaliação por microscopia de formas promastigotas de *L. chagasi* (*syn. L. infantum*) incubadas com a DRS-01 mostrou que ocorrem modificações morfológicas consideráveis em concentrações iguais e acima do CI_{50} determinado para esta cultura de células (10,8 µg/mL). Danos nas membranas e alterações nos flagelos sugerem que a ação da DRS-01 é direcionada às membranas do parasito, provocando a lise celular (EATON et al., 2014).

A dermaseptina DShypo 1 foi isolada a partir da secreção de *P. hypochondrialis* e sua atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas mostra que na concentração mínima inibitória (CMI) de 6 µM não há atividade hemolítica (CONCEIÇÃO et al., 2006). Este peptídeo foi avaliado em conjunto a DShypo 4 quanto à atividade antiparasitária em formas tripomastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. infantum*. As culturas de *T. cruzi* foram suscetíveis à ação dos peptídeos mas, no entanto, não foi observada atividade leishmanicida. Os peptídeos avaliados, identificados na secreção de *P. nordestina*, não mostraram atividade citotóxica em macrófagos nas concentrações avaliadas (PINTO et al., 2013).

A atividade de DRS-01 foi avaliada em conjunto com DShypo 01 contra formas promastigotas de *L. amazonensis* em um estudo realizado por Brand e colaboradores, (2006). Os ensaios demonstraram que a população de protozoários foi reduzida a uma concentração não detectável após incubação entre 2 a 6 horas. O interessante observado foi que acima da concentração efetiva (32 µg/mL), as dermaseptinas avaliadas provocavam um aumento significativo na atividade parasitária, enquanto

que em concentrações mais baixas (entre 5 a 20 µg/mL) não houve diferença significativa entre sua atividade inibitória e o antimoníato de N-metilglucamina (Glucantime®), medicamento antiparasitário utilizado como controle (BRAND et al., 2006).

Análogos da DR-S3, peptídeo isolado de *P. savagii*, foram testados contra diversos microrganismos e foi observado que a carboxiamidação da porção C-terminal produziu um derivado com uma atividade antimicrobiana entre 2 a 10 vezes mais eficaz nos ensaios contra diversos microrganismos patogênicos. A redução da cadeia peptídica mostrou que os análogos DRS-S3-(1-20)-NH₂ e DRS-S3-(1-16)-NH₂ não alteraram de forma significativa a atividade em comparação ao peptídeo selvagem, sendo o menor análogo desprovido de atividade hemolítica mesmo em concentrações mais elevadas. No entanto, a redução gradual do comprimento da cadeia até a obtenção do menor segmento de DRS3-(1-10)-NH₂ produziu derivados peptídicos exibindo uma perda lenta e progressiva da potência em comparação ao peptídeo DRS-S3 (MOR; HANI; NICOLAS, 1994).

A atividade antimalárica dos peptídeos DRS-S3 e DRS-S4 foi investigada em conjunto. A viabilidade da forma intraeritrocitária do parasito *P. falciparum* foi comparada, após 48 horas de tratamento com os dois peptídeos, utilizando três linhagens de parasitos sensíveis à cloroquina. Os ensaios mostraram que DRS-S3 causou efeitos citotóxicos apenas para as culturas de parasitos, uma vez que a atividade hemolítica só foi detectada na concentração de 34 µM, enquanto que para DRS-S4 foi observada hemólise em concentrações acima de 8,5 µM (GHOSH et al., 1997).

O peptídeo DRS-S4 é a dermaseptina com mais estudos de estrutura-função já realizados. Esse peptídeo apresenta quatro resíduos de lisina na porção central de sua estrutura primária, característica incomum para as outras dermaseptinas já descritas. A distribuição desses resíduos básicos resultou em baixa atividade biológica, uma vez que a redução da atividade antibacteriana está relacionada ao perfil de agregação (FEDER; DAGAN; MOR, 2000). Com isso, ao alterar a composição dos domínios hidrofóbicos, por meio da redução da hidrofobicidade ou do aumento da carga líquida positiva de DRS-S4, foi observado que os análogos gerados exibiram atividade antibacteriana mais expressiva e atividade hemolítica reduzida. Entre estes

derivados, o K₄K₂₀-S4 foi o mais eficaz contra protozoários e bactérias (KUSTANOVICH et al., 2002; NAVON-VENEZIA et al., 2002).

O efeito do peptídeo DRS-S4 e de seus derivados também foram avaliados em culturas de *P. falciparum*. O estudo revelou uma relação direta entre a atividade e a cationicidade, sendo o análogo K₄K₂₀-S4 o mais ativo. Nos casos de deleções na porção C-terminal, o derivado K₄S4(1-13)-NH₂ apresentou melhor atividade antimalárica. Esses dois derivados também foram avaliados quanto às atividades hemolítica e cinética. No segundo ensaio, foi observado que a inibição da atividade foi mais pronunciada nos estágios de trofozoítos maduros que nos trofozoítos jovens, o que reflete maior sensibilidade nesta etapa, sendo o análogo K₄K₂₀-S4 mais seletivo que o K₄S4(1-13)-NH₂. A comparação entre os isômeros D e L revelou que a ação dos análogos não é mediada por interações específicas com uma molécula quiral (como uma enzima, por exemplo), pois não foi observada diferença entre as atividades. Um dado interessante gerado a partir da análise por microscopia confocal mostrou que o análogo K₄S4(1-13)-NH₂ é capaz de atravessar a membrana do hospedeiro e interagir diretamente com o parasito intracelular, provocando sua lise sem provocar danos à célula-hospedeira (KRUGLIAK et al., 2000)

A partir destes estudos, o análogo K₄S4(1-13)-NH₂ foi selecionado para a síntese de novos derivados, por ser o menor peptídeo gerado a partir de DRS-S4 a manter sua atividade biológica. No entanto, como sua atividade hemolítica é considerável (57±3 µM), diversos análogos modificados com grupos aminoácilas foram sintetizados. Um *screening* revelou que o derivado NC7-K₄S4(1-13)-NH₂ não é estágio-seletivo, pois apresentou atividade inibitória para ambas as formas de trofozoítos (jovens e maduros), ao contrário do observado para K₄S4(1-13)-NH₂ no estudo apresentado por Krugliak e colaboradores, em 2000 (EFRON et al., 2002).

A investigação da atividade membranolítica de análogos de DRS-S4 em eritrócitos humanos e em formas promastigotas de *Leishmania major* mostrou que os peptídeos mais hemolíticos apresentaram a maior atividade inibitória, pois apresentavam mais afinidade à inserção em um modelo sintético de lipossomas (contendo a mesma proporção de fosfatidilcolina/ácido fosfatídico). Os análogos com 16 e 13 resíduos de aminoácidos mostram uma redução progressiva na afinidade aos lipossomas, resultado também observado pela redução nas atividades hemolíticas e citolíticas (GAIDUKOV; FISH; MOR, 2003).

Um estudo com derivados acila de $K_4S_4(1-13)-NH_2$ sem a adição de grupo amina revelou que ao aumentar a lipofilicidade dos peptídeos, eles tornaram-se mais permeáveis à membrana celular do hospedeiro e, portanto, mais acessíveis à membrana do parasito. Os resultados de uma análise dose-dependente mostraram que a CI_{50} dos derivados foi até ~2,5 vezes mais baixa que a de $K_4S_4(1-13)-NH_2$. O derivado mais interessante, $iC_4-K_4S_4(1-13)-NH_2$, apresentou maior efeito antimalárico e atividade hemolítica atenuada. O trabalho também mostrou que os peptídeos avaliados não apresentaram atividade seletiva para as formas diferenciadas dos trofozoítos (DAGAN et al., 2002).

Um estudo comparativo com os análogos gerados anteriormente para $K_4S_4(1-13)-NH_2$ mostrou que o comprimento da cadeia dos derivados de acila está relacionado ao aumento gradual da hidrofobicidade e estabilização da estrutura helicoidal do análogo. No entanto, o efeito sobre as atividades citolíticas variou nas diferentes células avaliadas, para as quais a acilação crescente aumentou a atividade hemolítica e antiparasitária (*L. major*), entretanto, para a bactéria Gram-positiva *S. aureus* foi observada perda de atividade para os derivados de cadeias mais longas. A adição do grupo amina nos derivados de acila resultou num padrão geral de redução da hidrofobicidade em comparação com os outros derivados, resultando em uma diminuição dos valores do ensaio de hemólise com relação aos derivados acila correspondentes. Os análogos $NC_7-K_4S_4(1-13)-NH_2$ e $NC_4-K_4S_4(1-13)-NH_2$ apresentaram as melhores relações terapêuticas, em comparação aos outros peptídeos, uma vez que apresentaram valores de $CH_{50} > 50 \mu M$ e uma inibição de 100% na concentração de $6,25 \mu M$ após incubação em culturas de formas promastigotas de *L. major* (RADZISHEVSKY et al., 2005).

A DRS-H10, caracterizada a partir da secreção de *P nordestina*, apresenta uma carga residual +2 e trata-se da menor dermaseptina já descrita. Apesar de não ser muito ativa contra bactérias, apresenta atividade antiparasitária próxima a da droga anfotericina B, utilizada como controle no ensaio contra formas promastigotas de *L. infantum* (CI_{50} 8,1 μM e 9,2 μM , respectivamente) e é capaz de reduzir a viabilidade de formas amastigotas deste mesmo parasito (BRAND et al., 2013).

Tabela 1. Lista representativa de dermaseptinas e os principais análogos sintéticos com atividade antiparasitária.

Peptídeo ^a	Estrutura Primária	Protozoário (estágio) ^b	Efeito antiparasitário ^c (µM)	Referências
DRS-S1	ALWKTMLKKLGTMLHAGKAALGAAADTISQGTQ	<i>L. major</i> (pro)	2,4-4,74	PÉREZ-CORDERO et al., 2011 HERNANDEZ et al., 1992 PÉREZ-CORDERO et al., 2011
		<i>L. mexicana</i> (pro)	3	
		<i>L. major</i> (f.i)	1,22	
		<i>L. major</i> (pro)	16,38	
		<i>L. panamensis</i> (f.i)	3,27	
		<i>L. panamensis</i> (pro)	18,35	
DRS-S1(1-29)-NH ₂	ALWKTMLKKLGTMLHAGKAALGAAADTI-NH ₂	<i>L. major</i> (pro)	2,3	SAVOIA et al., 2008
DShypo 01	GLWSTIKNVGKEAAIAAGKAALGAL-NH ₂	<i>T. cruzi</i> (tri)	0,68	PINTO et al., 2013
		<i>L. amazonensis</i> (pro)	15	BRAND et al., 2006
DShypo 04	GLWSTIKQKGKEAAIAAACAAGKAVLNAASEAL-NH ₂	<i>T. cruzi</i> (tri)	0,25	PINTO et al., 2013
DRS-01	GLWSTIKQKGKEAAIAAACAAGQAALGAL-NH ₂	<i>L. infantum</i> (pro)	3,9	EATON et al., 2014
		<i>L. amazonensis</i> (pro)	16	BRAND et al., 2006
		<i>L. chagasi</i> (infantum) (pro)	7,15	ZAMPA et al., 2009
		<i>T. cruzi</i> (trip/epi)	6 (100% inibição)	BRAND et al., 2002
DRS-S4	ALWMTLLKKVLKAAAKALNAVLVGANA	<i>L. major</i> (pro)	1,5	GAIDUKOV; FISH; MOR, 2003
		<i>P. falciparum</i> (f.i.)	0,3-2	GHOSH et al., 1997
K ₄ K ₂₀ S ₄	ALWKTLLKKVLKAAAKAALKAVLVGANA	<i>L. major</i> (pro)	1,5	KUSTANOVICH et al., 2002
K ₄ S ₄ (1-13) _a	ALWKTLLKKVLKA-NH ₂	<i>L. major</i> (pro)	12,5*	RADZISHEVSKY et al., 2005
		<i>P. falciparum</i> (anel)	7,7±0,9	DAGAN et al., 2002; EFRON et al., 2002
		<i>P. falciparum</i> (tro)	3,4±0,3	

Peptídeo ^a	Estrutura Primária	Protozoário (estágio) ^b	Efeito antiparasitário ^c (µM)	Referências
C3-K ₄ S ₄ (1–13)a	Propionyl-ALWKTLLKKVLKA-NH ₂	<i>L. major</i> (pro)	18±7*	RADZISHEVSKY et al., 2005
		<i>P. falciparum</i> (anel)	4,33±0,25	DAGAN et al., 2002
		<i>P. falciparum</i> (tro)	3,80±0,32	
iC4-K ₄ S ₄ (1–13)a	Isobutyryl-ALWKTLLKKVLKA-NH ₂	<i>P. falciparum</i> (anel)	3,82±0,47	DAGAN et al., 2002
		<i>P. falciparum</i> (tro)	2,54±0,34	
NC7-K ₄ S ₄ (1–13)a	Aminoheptanoyl-ALWKTLLKKVLKA-NH ₂	<i>L. major</i> (pro)	6,25*	RADZISHEVSKY et al., 2005
		<i>P. falciparum</i> (anel)	5,3±0,7	EFRON et al., 2002
		<i>P. falciparum</i> (tro)	6,2±0,5	
NC4-K ₄ S ₄ (1–13)a	Aminobutyryl-ALWKTLLKKVLKA-NH ₂	<i>L. major</i> (pro)	6,25µM*	RADZISHEVSKY et al., 2005
DRS-S3	ALWKNMLKGIGKLAGKAALGAVKKLVGAES	<i>P. falciparum</i> (f.i)	0,3-1,5	GHOSH et al., 1997
DRS-H10	GLWSTIKNVAAAAGKAALGAL-NH ₂	<i>L. infantum</i> (pro)	8,1	BRAND et al., 2013
		<i>L. infantum</i> (ama)	64,6	
(DRS-DI1)	GLWSKIKAAAGKEAAKAAAKAAGKAALNAVSEAV	<i>T. cruzi</i> (tri/epi)	6	BRAND et al., 2002
(DRS-DI2)	ALWKTLLKNVGKAAGKAALNAVTDVMVQ	<i>T. cruzi</i> (tri/epi)	6	

^aDe acordo com nova nomenclatura. ^bAbreviações: ama, amastigota; epi, epimastigota; f.i., forma intracelular; pro, promastigota; tro, trofozoíta; tri, tripomastigota. ^c Medido por (CI₅₀), ou caso indicado por *, trata da concentração necessária para induzir 100% de inibição. Tabela revisada e atualizada de RIVAS; LUQUE-ORTEGA; ANDREU, (2009).

1.5.2. TEMPORINAS

A família das temporinas compreende peptídeos contendo entre 10 e 20 resíduos de aminoácidos, sendo esta uma das menores famílias de PAMs de anuros já reportadas. As primeiras temporinas foram identificadas nas secreções de *Rana esculenta* e *R. temporaria*, mas elas já foram descritas para outras espécies. Embora apresentem características comuns, como a presença de um único resíduo básico (arginina ou lisina) e a ausência de resíduos de cisteína, não foi detectado um *template* comum a esses peptídeos. Em geral, as temporinas apresentam atividade somente contra bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* e *Enterococcus faecium*, com valores de CMI entre 1 a >100 µM. No entanto, a temporina L (FVQWFSKFLGRIL-NH₂) de *R. temporaria* apresenta carga líquida +3 e é ativa contra espécies Gram-negativas, como *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de apresentar atividade antifúngica contra *C. albicans*, alta atividade hemolítica e atividade citotóxica em várias linhagens de células tumorais (RINALDI et al., 2002; CONLON; KOLODZIEJEK; NOWOTNY, 2004; MANGONI et al., 2005; KÖNIG; BININDA-EMONDS; SHAW, 2015).

Da família das temporinas, a temporina-A (T-A) é uma das mais estudadas, com a produção de diversos análogos contendo modificações como substituições pontuais por resíduos de alanina ou D-aminoácidos (WADE et al., 2000; CONLON; KOLODZIEJEK; NOWOTNY, 2004). No entanto, não existem estudos avaliando a atividade antiparasitária dos análogos desse peptídeo.

Em peptídeos selvagens, a atividade leishmanicida foi primeiramente reportada para T-A e T-B, contra as formas promastigotas e amastigotas em concentrações micromolares, sem citotoxicidade sobre eritrócitos humanos. Os autores revelaram que a ação das temporinas resulta em um forte colapso do metabolismo energético do parasito, observado por meio de ensaio de luminescência em protozoários que expressavam a enzima citoplasmática luciferase. A inibição completa do crescimento foi detectada entre 15 e 30 µM. Foi observado também que a presença de uma camada de LFG em formas promastigotas (característica ausente em amastigotas) não comprometeu a atividade dos peptídeos, pois a ação antiparasitária foi observada para ambas as formas do parasito (MANGONI et al., 2005; MANGONI; MARCELLINI; SIMMACO, 2007).

A temporina-1Sa (T-1Sa, T-SHa), identificada na secreção da espécie *Pelophylax (Rana) saharica* é ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos (CMI entre 2 e 30 μM) e atividade hemolítica detectada na concentração de 25 μM . Contendo treze resíduos e uma carga líquida +2, ela apresenta atividade também contra o parasito *L. infantum* nas formas promastigota e amastigota axênica, sendo que em doses letais para o parasito, a T-1Sa não apresenta efeito citotóxico em macrófagos. No mesmo trabalho foi apresentada a caracterização de outras duas temporinas, T-1Sb e T-1Sc, mas ambas não apresentaram atividade leishmanicida, indicando a importância funcional da cationicidade de T-1Sa na atividade (ABBASSI et al., 2008).

A atividade leishmanicida foi estimada para os peptídeos T-A, T-B e T-1Sa em formas amastigotas e promastigotas de *L. mexicana*. Em ensaios realizados na presença de soro e em formas promastigotas, somente a T-A apresentou atividade contra o parasito (57% de inibição na concentração de 100 μM). Embora as temporinas avaliadas já tenham apresentado anteriormente atividade em formas amastigotas de outras espécies do gênero *Leishmania*, nas culturas de *L. mexicana* nenhuma atividade foi detectada. No entanto, ao incubar os parasitos com os peptídeos na ausência de soro, as temporinas A e B exibiram atividade inibitória em formas promastigotas (causando 63% de inibição na concentração de 12,5 μM e 38% na concentração de 50 μM , respectivamente). Contudo, as formas amastigotas ainda não foram suscetíveis à ação dos peptídeos, uma vez que somente a T-A apresentou atividade leishmanicida, sendo que na concentração de 12,5 μM , foi observada 23% de inibição (CHADBOURNE et al., 2011).

Eggimand e colaboradores (2015) conduziram um estudo relacionando a influência da composição da parede celular do parasito *L. mexicana* na atividade antiparasitária de algumas temporinas. Os resultados mostraram que a ausência de PFG na superfície membranar da forma amastigota de *L. mexicana* pode estar relacionada a resistência observada às temporinas, sugerindo que a presença de PFG desempenhe um papel importante na sensibilidade das formas promastigotas à ação dos peptídeos, visto que a carga negativa conferida pela presença deste componente poderia favorecer a interação entre a membrana parasitária e as temporinas. Um outro dado interessante foi a atividade leishmanicida detectada para a temporina T-1Sa, peptídeo inativo segundo o estudo publicado por Chadbourne e colaboradores (2011).

Os autores sugeriram que os resultados apresentados anteriormente podem ter sido prejudicados pela remoção inadequada de soro, uma vez que já foi relatado que a atividade de peptídeos desta família pode ser mascarada por esse componente.

O peptídeo temporina-SHd (T-SHd) também isolado da espécie *P. saharica*, possui 17 resíduos, carga +2 e é ativo contra diversas linhagens bacterianas. Sua atividade antiparasitária foi avaliada em *T. brucei*, *T. cruzi* e cinco espécies de *Leishmania*. A atividade citotóxica em macrófagos (CL₅₀ de 60 µM) foi acima da faixa da atividade antiparasitária detectada, padrão que se repetiu nas outras linhagens de células de mamíferos avaliadas, mostrando que a T-SHd atua com certa seletividade (ABBASSI et al., 2013).

A **Tabela 2** relaciona alguns dados sobre as temporinas que possuem atividade antiparasitária.

Tabela 2. Lista representativa de temporinas a apresentarem atividade antiparasitária.

Peptídeo ^a	Estrutura Primária	Protozoário (estágio) ^b	Efeito antiparasitário ^c (µM)	Referências
T-A	FLPLIGRVLSGIL-NH ₂	<i>L. donovani</i> (pro)	8,4	MANGONI et al., 2005
		<i>L. pifanoi</i> (ama)	14,6	
		<i>L. mexicana</i> (pro)	8	
		<i>L. mexicana</i> (ama)	~100	
T-B	LLPIVGNLLKSLN-NH ₂	<i>L. donovani</i> (pro)	8,6	MANGONI et al., 2005
		<i>L. pifanoi</i> (ama)	7,1	EGGIMANN et al., 2015
		<i>L. mexicana</i> (pro)	38	
		<i>L. mexicana</i> (ama)	>100	
T-1Sa /T-SHa	FLSGIVGMLGKLF-NH ₂	<i>L. infantum</i> (pro)	18,1	ABBASSI et al., 2008
		<i>L. infantum</i> (amax)	22,8	
		<i>L. mexicana</i> (pro)	4	EGGIMANN et al., 2015
		<i>L. mexicana</i> (ama)	42	
T--Sa[K ³]	FLKGIVGMLGKLF-NH ₂	<i>L. infantum</i> (pro)	10	LADRAM et al., 2010
T-SHd	FLPAALAGIGGILGKLF-NH ₂	<i>L. infantum</i> (amax)	23,5	ABBASSI et al., 2013
		<i>L. infantum</i> (f.i.)	6,7	
		<i>L. infantum</i> (pro)	16,5	
		<i>L. major</i> (pro)	14,6	
		<i>L. amazonenses</i> (pro)	14	
		<i>L. braziliensis</i> (pro)	18	
		<i>L. tropica</i> (pro)	14	
		<i>T. brucei</i> (proc)	21,8	
		<i>T. cruzi</i> (epi)	16,8	
		T-F	FLPLIGKVLGIL NH ₂	
<i>L. mexicana</i> (ama)	>100			
T L	FVQWFSKFLGRIL- NH ₂	<i>L. mexicana</i> (pro)	5	EGGIMANN et al., 2015
		<i>L. mexicana</i> (ama)	83	

^aAbreviações: ama, amastigota; amax, amastigota axênica; epi, epimastigota; f.i., forma intracelular; proc, formas procíclicas; pro, promastigota. ^b medido por (CI₅₀). Tabela revisada e atualizada de RIVAS; LUQUE-ORTEGA; ANDREU, (2009).

1.5.3. BOMBININAS H2 E H4

Os peptídeos hidrofóbicos bombininas H referem-se a uma família de PAMs compreendendo entre 17 e 20 resíduos de aminoácidos, na qual o H denota a característica hemolítica das bombininas. Caracterizadas a partir das secreções de rãs pertencentes ao gênero *Bombina*, tais como *B. bombina*, *B. orientalis* e *B. variegata*, as bombininas H1 a H4 possuem carga líquida +3, são carboxi-amidadas e adotam uma estrutura α -hélice anfipática. Estes peptídeos diferem entre si por um ou dois aminoácidos como, por exemplo, o par de peptídeos H2/H4, em que a substituição da isoleucina na posição 2 por uma D-alo-isoleucina em H4 confere uma atividade antibacteriana mais potente para este peptídeo (BOLOGNETTI et al., 2007; MANGONI et al., 2000).

Para as bombininas H2/H4 foi relatada a inibição da proliferação de formas promastigotas e amastigotas de parasitos do gênero *Leishmania* (**Tabela 3**), sendo a bombinina H4 mais ativa, com um CI_{50} significativamente menor, espelhando os resultados obtidos para a atividade antibacteriana (MANGONI et al., 2006).

Tabela 3. Lista representativa de bombininas a apresentarem atividade antiparasitária.

Peptídeo	Sequência	Estágio	CI_{50} (μM)
B-H2	IIGPVLGLVGSALGGLLKKI-NH ₂	<i>L. donovani</i> (pro)	7,3
		<i>L. pifanoi</i> (ama)	11
B- H4	IIGPVLGLVGSALGGLLKKI-NH ₂	<i>L. donovani</i> (pro)	1,7
		<i>L. pifanoi</i> (ama)	5,6

^aAbreviações: ama, amastigota; pro, promastigota. Tabela adaptada e atualizada de RIVAS; LUQUE-ORTEGA; ANDREU, (2009).

1.5.4. FILOSSEPTINAS

A família das filosseptinas reúne peptídeos caracterizados da secreção de hilídeos do gênero *Phyllomedusa*, encontrados em florestas tropicais nas Américas Central e Sul. Esses peptídeos contêm entre 19 e 21 resíduos de aminoácidos, são ricos em resíduos de lisina/histidina, sendo que a presença de resíduos de histidina (entre 1 e 3) confere variações na carga efetiva e atividade biológica em pHs ácidos e

fisiológicos. A estrutura primária apresenta a porção N-terminal bem conservada, além de amidação no C-terminal (RAJA et al., 2013).

O peptídeo PS-H1 isolado de *Phyllomedusa azurea* (espécie conhecida, até 2005, como *Phyllomedusa hypochondrialis*) exibe uma conformação enovelada (*random coil*) em solução aquosa, mas adota uma estrutura em α -hélice em meios que promovam essa conformação (RESENDE et al., 2008). A essa característica se credita a sua afinidade por membranas plasmáticas aniônicas de microrganismos, e sua ação leva à lise celular. Contudo, não foi relatada atividade citotóxica em células de mamífero *in vivo* (LEITE et al., 2005). Quanto à sua atividade antiparasitária, PS-H1 foi incubado em culturas de *L. amazonenses* e *P. falciparum*, mostrando efetividade leishmanicida comparável à droga Glucantime[®], um dos quimioterápicos utilizados no tratamento da leishmaniose. O efeito antiplasmódico foi semelhante ao do medicamento Artesunato[®], sendo observada perda da morfologia dos parasitos em ambos os tratamentos. No entanto, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ foi observado que as células incubadas com PS-1 apresentaram aceleração no desenvolvimento das formas trofozoítos jovens a trofozoítos maduros, efeito possivelmente justificado pela hormese, uma resposta adaptativa de um organismo quando exposto à situação de estresse (CALABRESE, 2002; KÜCKELHAUS et al., 2009)

Um estudo peptidômico da análise da secreção cutânea de *P. sauvagii* possibilitou a caracterização biológica de algumas *filosseptinas*, dentre elas, os peptídeos PSN-1, -S2, e -S4. Esses PAMs compartilham entre 79 a 95% de identidade, apresentam carga +2 e são ativos contra bactérias Gram-positivas, incluindo cepas resistentes de *S. aureus*. A ação leishmanicida foi observada para os estágios promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. major* (CI_{50} entre 12-22 μM). No entanto, os três peptídeos apresentaram sobreposição entre as concentrações inibitórias para protozoários e hemolíticas (CH_{50} igual a 23 μM) e mostraram-se menos ativos frente às bactérias testadas (CMI entre 25-40 μM) (RAJA et al., 2013).

A avaliação da atividade contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* (*L. chagasi*) foi reportada para os peptídeos PLS-H6 e PLS-H8b, caracterizados da secreção de *P. nordestina*. Os peptídeos apresentaram atividades mais baixas contra as formas promastigotas que as já relatadas para PAMs com atividade leishmanicida, sendo que as formas amastigotas mostraram maior resistência, mesmo em concentrações em que apresentavam suscetibilidade ao

medicamento controle Glucantime®. No entanto, a ausência de toxicidade perante macrófagos ainda indica que existe um uso potencial como agentes leishmanicidas para esses peptídeos (BRAND et al., 2013).

As filosseptinas 7 e 8 foram avaliadas em *L. infantum* e *T. cruzi* em um trabalho realizado por Pinto e colaboradores (2013) com a secreção de *P. nordestina*. Dentre os peptídeos avaliados, somente a PLS-7 se mostrou ativa contra os dois parasitos avaliados, sendo o composto mais citotóxico também (34,42 µM). O peptídeo PLS-8 não apresentou atividade nos ensaios com a forma promastigota de *L. infantum*, mas foi determinado a CI_{50} de 0,46 µM para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A comparação entre as estruturas primárias desses peptídeos mostrou que na posição 7 há uma substituição do resíduo His para Thr (de PLS-7 e PLS-8) e na posição 15, o resíduo de Ile em PLS-7 é uma Leu em PLS-8. Os resultados obtidos nos ensaios sugerem que este dois resíduos presentes na estrutura primária de PLS-7 são importantes para a manutenção da atividade antiparasitária contra *L. infantum* e para uma atividade mais eficaz contra *T. cruzi*.

A **Tabela 4** relaciona as atividade relatadas para as filosseptinas com atividade antiparasitária.

Tabela 4. Lista representativa de filossetinas a apresentarem atividade antiparasitária.

Peptídeo ^a	Estrutura Primária	Protozoário (estágio) ^b	Efeito antiparasitário ^c (µM)	Referências
PLS-4	FLSLIPHAINAVSTLVHHSG-NH ₂	<i>T. cruzi</i> (tri)	5,1	LEITE et al., 2005
PLS-5	FLSLIPHAINAVSAIAKHS-NH ₂	<i>T. cruzi</i> (tri)	4,9	
PLS-1	FLSLIPHAINAVSAIAKHN-NH ₂	<i>P. falciparum</i> (tro)	~32 (IC ₁₀₀)	KÜCKELHAUS et al., 2009
		<i>L. amazonensis</i> (pro)	~64(97% inib)	
PLS-H6,PLS-8	FLSLIPTAINAVSALAKHF-NH ₂	<i>L. amazonensis</i> (pro/ama)	>15,90	BRAND et al., 2013
		<i>L. infantum</i> (pro/ama)	>15,90	
		<i>T. cruzi</i> (tri)	0,46	PINTO et al., 2013
PLS-H8b, -10	FLSLLPSLVSGAVSLVKKL-OH	<i>L. amazonensis</i> (pro)	>17,22	BRAND et al., 2013
		<i>L. amazonensis</i> (ama)	>17,22	
		<i>L. infantum</i> (pro/ama)	>17,22	
PLS-S1	FLSLIPHIVSGVASIAKHFG-NH ₂	<i>L. infantum</i> (pro)	6,5	RAJA et al., 2013
		<i>L. major</i> (pro)	12,6	
		<i>L. braziliensis</i> (pro)	15,3	
PLS-S2	FLSLIPHIVSGVASLAKHFG-NH ₂	<i>L. infantum</i> (pro)	18,5	RAJA et al., 2013
		<i>L. major</i> (pro)	13,3	
		<i>L. braziliensis</i> (pro)	15	
PLS-S4	FLSMIPHIVSGVAALAKHLG-NH ₂	<i>L. infantum</i> (pro)	22	RAJA et al., 2013
		<i>L. major</i> (pro)	18	
		<i>L. braziliensis</i> (pro)	17,2	
PLS-07	FLSLIPHAINAVSAIAKHF-NH ₂	<i>L. infantum</i> (pro)	10,06	PINTO et al., 2013
		<i>T. cruzi</i> (tri)	0,34	

^aAbreviações: ama, amastigota; pro, promastigota; tro, trofozoíta; tri, tripomastigota. ^b medido por (CI₅₀). Tabela adaptada e atualizada de RIVAS; LUQUE-ORTEGA; ANDREU, (2009).

1.5.5. PAMs DE *Xenopus laevis* E ALGUNS DE SEUS ANÁLOGOS

Dentre os PAMs já caracterizados para anuros, as magaininas tem sido as mais estudadas. As magaininas 1 e 2 foram isoladas da secreção da rã africana *Xenopus laevis* e ambas exibem atividade antibacteriana (sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas), antifúngica, antiviral e antitumoral. Estruturalmente, são peptídeos catiônicos, anfipáticos e adotam conformação em α -hélice (ZASLOFF, 1987; ZASLOFF; MARTIN; CHEN, 1988).

Os efeitos dos peptídeos magainina-2 e PGLa (um outro PAM também caracterizado a partir da secreção de *X. laevis*) foram avaliados em formas eritrocitárias de *P. falciparum*, em um trabalho que investigou a atividade antiparasitária do peptídeos híbridos sintetizados a partir de cecropinas e melitinas (peptídeos isolados da hemolinfa de mariposas e peçonha de abelhas, respectivamente). Embora este não tenha sido o foco, foi um dos primeiros relatos de atividade antiparasitária de peptídeos isolados de *X. laevis*. (BOMAN et al., 1989).

Os PAMs podem ser expressos como agentes antiparasitários em organismos transgênicos, de forma a prevenir a transmissão de doenças que envolvem insetos-vetores (HURWITZ et al., 2012). Usando essa abordagem, Fieck e colaboradores (2010) avaliaram seis PAMs, entre eles a magainina-2, a fim de determinar os perfis de toxicidade contra linhagens bacterianas presentes no hospedeiro invertebrado *Rhodococcus rhodnii*, visando uma interrupção da transmissão vetorial de *T. cruzi*. A magainina-2 exibiu uma atividade seletiva ao parasito *T. cruzi* (CL₁₀₀ 30 μ M) em comparação ao vetor (toxicidade > 320 μ M). O tratamento da magainina-2 associado a outros peptídeos mostrou uma ação sinérgica, sugerindo que a utilização de PAMs combinados pode reduzir a seleção de resistência por parte do parasito.

Alguns trabalhos foram apresentados descrevendo a síntese de análogos de magaininas, como o estudo da ação da magainina-2-NH₂ em mosquitos *Anopheles* inoculados com sangue infectado por protozoários do gênero *Plasmodium*. Os valores das CI₅₀ encontradas, entre 0,5 e 1 μ g/ μ l, geraram percentuais de inibição do desenvolvimento do parasito no hospedeiro invertebrado entre 82 e 95% (GWADZ et al., 1989).

A atividade inibitória de três análogos de magainina foi determinada em culturas de *T. cruzi* (estágio não relatado). Para a magainina-B, na concentração de 500 μM , a mobilidade parasitária não foi mais detectada após 5 min de incubação, enquanto que o análogo magainina H exibiu atividade inibitória a 500 $\mu\text{g/mL}$ ($\sim 192 \mu\text{M}$). O análogo magainina-G não apresentou atividade contra o parasito citado (HUANG; CHEN; ZIERDT, 1990).

Os análogos MG-H1 e MG-H2 foram comparados quanto à atividade citotóxica em formas promastigotas de *L. donovani*. Ambos os peptídeos apresentam cargas similares (+3) e sequências homólogas, mas contendo diferentes hidrofobicidades posicionais. Os valores de CI_{50} foram comparados aos do análogo F5W magainina-2. A ordem de classificação para a atividade leishmanicida (MG-H2 > MG-H1 > F5W-magainina-2) diferiu tanto na atividade hemolítica (MG-H1 > MG-H2 > F5W-magainina-2) quanto na atividade antibacteriana (MG-H2 > F5W-magainina-2 > MG-H1) contra *E. coli*. Os resultados indicaram que a hidrofobicidade posicional, que retrata a distribuição de curtas sequências ricas em aminoácidos hidrofóbicos, desempenha um papel importante na atividade leishmanicida. O mecanismo de ação envolve a permeabilização da membrana plasmática, uma vez que foi observado, após a adição dos peptídeos, ruptura da membrana e rápido colapso bioenergético (Guerrero, Saugar, Matsuzaki, & Rivas, 2004).

A construção sintética MSI-94 foi avaliada em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. brasilienses*. O MSI-94 foi capaz de inibir completamente a mobilidade parasitária após 5 min (50 μM) ou 15 min (25 μM) de incubação. O peptídeo teve baixa eficácia na redução da viabilidade parasitária, principalmente em *Leishmania*, reduzindo somente em 20% após 24h de incubação, na concentração de 100 μM (LÖFGREN et al., 2008).

O pexiganan (MSI-78), também um derivado das magaininas, apresenta atividade antibacteriana de amplo espectro e, embora não tenha sido aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) norte-americano para comercialização, foi um peptídeo bastante caracterizado para fins terapêuticos. Sua ação leishmanicida foi determinada para as espécies *L. amazonensis* e *L. major*. Foi observado que esse peptídeo além de provocar perturbações na membrana plasmática do parasito, resultando em um aumento da permeabilidade, é capaz de induzir uma variedade de processos associados à apoptose, como ativação de caspases, degradação de DNA

e perda de potencial de membrana mitocondrial (KULKARNI et al., 2006). Em um estudo realizado pelos mesmos autores em 2009 foi apontado que a inativação proteolítica do pexiganan é resultado de um mecanismo de proteção de formas selvagens de *L. major* e *L. amazonenses*. Treze fragmentos distintos de pexiganan foram detectados após 15 min de incubação, mostrando que a enzima *leishmanolysin* tem preferência por clivar ligações peptídicas entre resíduos de lisina, sugerindo uma especificidade pela inativação de PAMs catiônicos. No entanto, a atividade antiparasitária foi mais pronunciada quando o pexiganan foi incubado com um inibidor de protease nos tipos selvagens de *Leishmania* estudados, onde o inibidor e o peptídeo atuaram sinergicamente para inibir a atividade parasitária (KULKARNI et al., 2009).

A **Tabela 5** reúne as magaininas, o PGLa e os principais análogos sintéticos desenvolvidos que apresentaram atividade antiparasitária.

Tabela 5. Lista representativa de magaininas, PGLa e os principais análogos sintéticos a apresentarem atividade antiparasitária.

Peptídeo ^a	Estrutura Primária	Protozoário (estágio) ^b	Efeito antiparasitário ^c (µM)	Referências
Magainina-2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	<i>P. falciparum</i> (tro)	100 (90% inib)	BOMAN et al., 1989
		<i>T. cruzi</i> (e.d.)	30 (IC ₁₀₀)	FIECK et al., 2010
Magainina-2-NH ₂	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-NH ₂	<i>P. cynomolgi</i> (ooc)	>0,5 (94% inib)	GWADZ et al., 1989
		<i>P. cynomolgi</i> (ooc)	>0,5 (95% inib)	
		<i>P. falciparum</i> (ooc)	>0,5 (86% inib)	
MSI-94	GIGKFLKAKKFGKAFVKMCK-NH ₂	<i>T. cruzi</i> (epi)	>100	LÖFGREN et al., 2008
		<i>T. cruzi</i> (tri)	64,8	
		<i>L. braziliensis</i> (pro)	>100	
Magainina-B	GIGKFLHAAKKFAKAFVAEIMNS-NH ₂	<i>T. cruzi</i> (e.d.)	40,4 (IC ₁₀₀)	HUANG; CHEN; ZIERDT, 1990
Magainina-H	GIGKFLHSaKKFaKAFVaEIMNS-NH ₂	<i>T. cruzi</i> (e.d.)	~192 (pouco dano)	HUANG; CHEN; ZIERDT, 1990
MSI-78 (pexiganan)	GIGKFLKAKKFGKAFVKILKK	<i>L. amazonenses</i> (pro)	100 (30%)	KULKARNI et al., 2006
F5W-Magainina-2	GIGKWLHSAKKFGKAFVGEIMNS	<i>L. donovani</i> (pro)	6,1	GUERRERO et al., 2004
MG-H1	GIKKFLHIIWKFIKAFVGEIMNS	<i>L. donovani</i> (pro)	2,4	
MG-H2	IKKFLHSIWKFGKAFVGEIMNI	<i>L. donovani</i> (pro)	>1	
PGLa	GMASKAGAIAGKIAKVALKAL-NH ₂	<i>P. falciparum</i> (tro+esq)	40	BOMAN et al., 1989

^aAbreviações: ooc, oócito; epi, epimastigota; e.d, estágio desconhecido; esq, esquizonte; pro, promastigota; tro, trofozoíto, .^b caso não indicado o grau de inibição(%,inib), o valor foi medido por (CI₅₀). Tabela adaptada e atualizada de RIVAS; LUQUE-ORTEGA; ANDREU, (2009)

1.5.6. PEPTÍDEOS ISOLADOS DE *Silurana tropicalis*

Um estudo do arsenal de peptídeos que compõem a defesa da rã *Silurana tropicalis* foi conduzido por várias abordagens, como transcriptômica, peptidômica e análise filogenética. Os peptídeos caracterizados estão dispostos na **Tabela 6**, incluindo a atividade tripanocida relatada, em valores de CI_{95} (a menor concentração capaz de matar 95% dos parasitos em 30 min) para formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma brucei brucei*.

Os peptídeos apresentaram atividade hemolítica entre 64-256 μM , sendo os peptídeos CPF-St4 e CPF-St5 mais promissores, pois apresentaram atividade seletiva, obtendo valores altos de CH_{50} (64 μM), desempenhando efeito antiparasitário abaixo de 4 μM . A variação observada para os peptídeos avaliados foi justificada pela utilização de culturas pleomórficas, contendo misturas de duas formas do parasito (forma sanguínea delgada e formas sanguíneas mais curtas), o que resultaria em diferentes suscetibilidades à permeabilização da membrana do parasito (ROELANTS et al., 2013).

Tabela 6. Lista representativa dos peptídeos descritos para *S. tropicalis* com atividade antiparasitária.

Peptídeo	Estrutura Primária	Efeito antiparasitário (μM)
CPF-St4	SLFGTFAKMALKGASKLIPHLLPSRQQ	2-4
CPF-St5	GVFGLLAKAALKGASKLIPHLLPSRQQ	1-2
CPF-St6	KLGFENFLVKALKTVMHVPTSPLL	16-256
CPF-St7	NLLGSLLKTGLKVGSNLL-NH ₂	2-64
Magainina-St1	GLKEVAHSAKKFAKGFISGLTGS	8-256
XPF-St1	GVWSTVLGGLKKFAKGGLEAIVNPK	2-64
XPF-St4	GWASSIGSILGKFAKGGQAFLQPK	4
XPF-St5	GWLPTFGKILRKAMQLGPKLIQPI	2-4
XPF-St6	GVWSTILGGLKKFAKGGDAIVNPK	2-4
XPF-St7	GLLSNVAGLLKQFAKGGVNAVLPK	2-64
XPF-St8	GFMSKVANFAKKFAKGGVNAIMNQK	1-8
PFQa-St2	FIGALLRPALKLLAGK	16-32
PGLa-St2	GMATKAGTAFGKAAKAIIGAAL-NH ₂	16-32

1.6. PAMs DE LEPTODACTILÍDEOS – AS OCELATINAS

Embora a família Leptodactylidae seja composta por 199 espécies, sendo 99 catalogadas para o gênero *Leptodactylus* (FROST, 2014), ainda são poucos os trabalhos relatando o isolamento e a caracterização de peptídeos obtidos da secreção cutânea desses anuros. As ocelatinas foram caracterizadas primeiramente por Nascimento e colaboradores (2004) como peptídeos ativos de *Leptodactylus ocellatus*, sendo então descritas para outras espécies, como *L. fallax*, *L. pentadactylus*, *L. laticeps*, *L. syphax*, *L. validus* e *L. pustulatus* (KÖNIG; BININDA-EMONDS; SHAW, 2015).

Os peptídeos pertencentes à família das ocelatinas (Oc) são ativos contra bactérias Gram-negativas, mas geralmente são inativos ou são pouco eficazes contra bactérias Gram-positivas e leveduras, tais como *C. albicans*. Além disso, a atividade hemolítica relatada para esses PAMs também é muito baixa (CONLON, 2011b). Os membros da família ocelatinas constituem um grupo de peptídeos catiônicos carboxi-amidados, apresentando entre 20 e 25 resíduos de aminoácidos e compartilham um alto grau de similaridade, conforme pode ser visualizado na **Figura 11**.

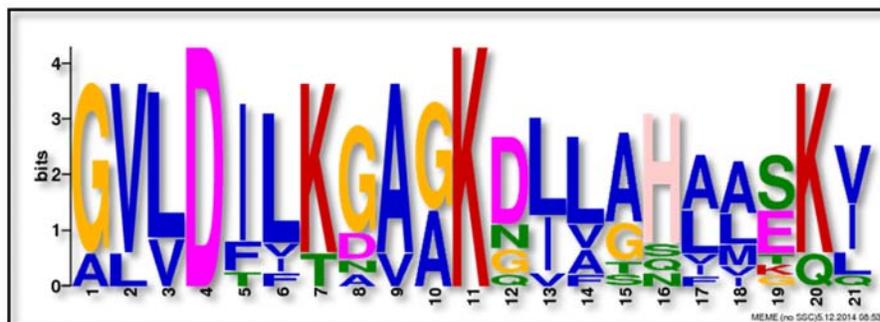


Figura 11. Motivos de sequência comuns à família de peptídeos ocelatinas utilizando o algoritmo MEME. Os parâmetros para cada grupo de resíduos são: para A, C, F, I, L, V, W e M é utilizada a cor azul; para N, Q, S, T, a cor verde por serem polares, não carregados e não alifáticos; para D e E, magenta por serem ácidos, para K e R, vermelho por serem carregados positivamente, H em rosa, G em laranja, P em amarelo e Y em azul turquesa. A plataforma MEME (*Multiple Em for Motif Elicitation*) pode ser acessada pelo endereço eletrônico <http://meme.nbcr.net/meme/intro.html>.

Em 2008, foi sugerida uma nomenclatura para esses peptídeos, uma vez que a nomenclatura anterior (pentadactilina, para *L. pentadactylus*, laticeptina para *L. laticeps*, entre outros) não deixava clara a relação de homologia entre os peptídeos

até então caracterizados. Desta forma, todos os peptídeos ortólogos receberiam a denominação “ocelatina-Xn”, sendo que “X” indicaria a letra da espécie, e “n”, o número de parólogos caracterizados. A **Tabela 7** reúne algumas das ocelatinas já descritas na literatura.

Tabela 7. Relação das principais ocelatinas já descritas

PAM	Denominação original	Estrutura Primária	Referência
Oc-1	Ocelatina 1	GVVDILKGAGKDLLAHLVGKISEKV-a	NASCIMENTO et al., 2004
Oc-2	Ocelatina 2	GVLDFKDAAKQILAHAAEKQI-a	NASCIMENTO et al., 2004
Oc-3	Ocelatina 3	GVLDFKDAAKQILAHAAEKQI-a	NASCIMENTO et al., 2004
Oc-4	Ocelatina 4	GLLDFVTGVGKDIFAQLIKQI-a	NASCIMENTO et al., 2007b
Oc-5	Ocelatina 5	AVLDILKDVGKGLLSHFMEKV-a	LEITE et al., 2010
Oc-6	Ocelatina 6	AVLDFIKAAGKGLVTNIMEKVG-a	LEITE et al., 2010
Oc-V1	-	GVVDILKGAGKDLLAHALSKLSEKV-a	KING et al., 2008
Oc-V2	-	GVLDFKDAAKQILAHAAEKQI-a	KING et al., 2008
Oc-V3	-	GVLDFKDAAKQILAHAAEKQI-a	KING et al., 2008
Oc-S1	Sifaxina	GVLDFKDAAKQILAHAAEKQI-a	DOURADO et al., 2007
Oc-F1	Falaxina	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL-a	ROLLINS-SMITH et al., 2005
Oc-P1	Pentadactilina	GLLDTLKGAAKNVVGSLSASKVMEKL-a	KING et al., 2005
Oc-L1	Lacceptina	GVVDILKGAAKDLAGHLATKVMNKL-a	CONLON et al., 2006

*A letra a indica que o C-terminal está na forma COONH₂.

Considerando que são poucos os trabalhos disponíveis na literatura tratando da caracterização de ocelatinas, é de se esperar que existam menos trabalhos ainda apresentando estudos de estrutura-função, incluindo o desenho de análogos para esta família de peptídeos. O relato dos dois trabalhos existentes será apresentado a seguir.

O peptídeo ocelatina-F1, PAM isolado da secreção de *L. fallax*, apresenta atividade inibitória (CMI $\geq 20 \mu\text{M}$) para diversas espécies de bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa*, mas é inativo contra as Gram-positivas. Este peptídeo de 25 resíduos apresenta homologia estrutural com peptídeos pertencentes à família da ranatuerina-2 e apresenta baixa atividade hemolítica, aonde CH₅₀ é maior que 200 μM (ROLLINS-SMITH et al., 2005).

Em um trabalho de 2007, foram apresentados 25 derivados de ocelatina-F1 a partir de substituições pontuais de cada resíduo por uma alanina (Ala), enquanto que os resíduos preexistentes de Ala foram substituídos por resíduos de leucina. Este estudo identificou sete análogos (FA8, FL9, FL10, FA12, FL14, FA15) que apresentaram melhores concentrações inibitórias para pelo menos uma das linhagens bacterianas avaliadas, sendo que peptídeos foram mais ativos contra bactérias Gram-negativas que contra Gram-positivas. No entanto, os análogos mais ativos também apresentaram atividade hemolítica mais pronunciada. As substituições dos resíduos de leucina e lisina por Ala resultaram em diminuição da atividade antimicrobiana, apontando a importância desses resíduos na manutenção da atividade. No mesmo estudo também foram avaliadas 38 formas truncadas do peptídeo e foi observado que a atividade biológica foi prejudicada, indicando que dentro da estrutura primária da ocelatina-F1 existem alguns motivos essenciais para que ele seja um peptídeo bioativo (NIELSEN et al., 2007).

O segundo e último trabalho realizado até o momento, também datado de 2007a, foi realizado por Nascimento e colaboradores e descreve a síntese e avaliação de sete análogos (**Tabela 8**) da ocelatina 4, peptídeo obtido da rã *L. latrans* (sinônimo *L. ocellatus*). Trata-se de um peptídeo hemolítico e pouco potente quando avaliado contra bactérias como *E. coli* e *S. aureus* (CMI de 64 μM) (DO NASCIMENTO, 2007a; DO NASCIMENTO, 2007b).

Tabela 8. Estruturas primárias dos análogos propostos para a ocelatina-4, incluindo o peptídeo selvagem.

Peptídeo	Estrutura Primária Sequência	Carga residual
K[1,4,8,15], A[12,26,20]	KLLKFVTKVKGKAIFKALIKAI-a	+7
K[1,8,15],R[4,12]	KLLRFVTKVKGKRIFKQLIKQI-a	+8
K[1,8,15],N[4,12]	KLLNFVTKVKGKNIFKQLIKQI-a	+6
<i>Ocelatina-4</i>	GLLDFVTGVGKDIFAQLIKQI-a	+1
S5,K7,A10,N12	GLLDSVKGVAKNIFAQLIKQI-a	+3
S5,K7,Ins-V10,A11,N13	GLLDSVKGVVAKNIFAQLIKQI-a	+3
Del-2, S4, K6, A9, N11	GLDFVTGVGKDIFAQLIKQI-a	+3
Del-2, S4, K6, A9, N11,K17	GLDFVTGVGKDIFAQLKKQI-a	+4

*A letra a indica que o C-terminal está na forma COONH₂.

Os três primeiros análogos dispostos na **Tabela 8** são peptídeos altamente catiônicos, nos quais os resíduos de aspartato (D, Asp) foram substituídos por lisina (K, Lys), com o intuito de substituir a carga negativa conferida pela cadeia lateral de Asp por resíduos de Lys, aminoácido positivamente carregado. O segundo grupo foi proposto a partir de análise das projeções helicoidais dos peptídeos ocelatina-P1 e ranatuerina-2B. Seis dos análogos apresentaram aumento da atividade contra *E. coli*, (com relação à atividade do peptídeo precursor), um indício de que a carga foi um determinante importante para a atividade biológica (DO NASCIMENTO, 2007a).

Os peptídeos do primeiro grupo foram os mais ativos contra *S. aureus*, sugerindo que a forte cationicidade também pode contribuir para a atividade contra algumas bactérias Gram-positivas. Os três últimos análogos dispostos na **Tabela 8** foram inativos contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* e essa ausência de atividade pode estar relacionada às modificações feitas (deleções e inserções) ou mesmo à ausência de um resíduo de Lys na posição 11, que está presente nos demais análogos ativos contra essas bactérias e é uma característica conservada nos leptodactilídeos. Os análogos com as deleções do resíduo de leucina na posição 2 foram menos ativos contra *E. coli*, sugerindo importância para este resíduo para a atividade antimicrobiana (DO NASCIMENTO, 2007a).

Dentre os análogos apresentados, o peptídeo K[1,8,15],N[4,12] exibiu uma atividade contra *S. aureus* 32 vezes maior que a observada para ocelatina-4, mas sua atividade em fungos foi a mais baixa. Incluindo a ausência de atividade hemolítica, os

valores de CMI obtidos para este análogo sugerem que os resíduos de Asn nas posições 4 e 12 podem ter contribuído para as atividades observadas. Do segundo grupo de análogos avaliados, S5,K7,A10,N12 obteve atividade antibacteriana aumentada, e não foi detectada atividade hemolítica. Com isso, os derivados K[1,8,15],N[4,12] e S5,K7,A10,N12 foram considerados os peptídeos mais promissores em caso de uma posterior continuação do trabalho (DO NASCIMENTO, 2007a).

1.6.1. OCELATINA-P1

Identificada primeiramente na secreção da pele da rã *L. pentadactylus*, a ocelatina-P1 (Oc-P1) é um peptídeo catiônico (carga +3) de massa molecular 2.541 Da. Apresenta atividade inibitória relativamente baixa, (valores de CMI entre 25 a 200 μM) sobre o crescimento de linhagens de referência de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, exibindo também atividade hemolítica reduzida ($\text{LD}_{50} > 400 \mu\text{M}$). A projeção da estrutura primária em roda helicoidal (**Figura 12**) indica baixa anfipaticidade, com distribuição de dois resíduos de Lys¹¹ e Lys⁷ em uma face da hélice e os resíduos Lys²⁰ e Lys²⁴ na face oposta (KING et al., 2005).

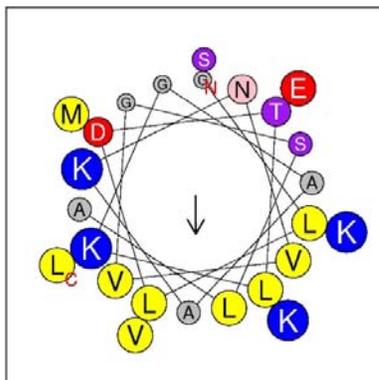


Figura 12. Projeção em hélice do peptídeo ocelatina-P1.

Em 2011, o nosso grupo de pesquisa reportou a presença da Oc-P1 pela primeira vez na secreção de *L. labyrinthicus*, uma espécie amplamente distribuída por nosso país, inclusive em nosso cerrado, sendo conhecida popularmente como rã-pimenta (HEYER; MIJARES; BALDO, 2008; LIBÉRIO et al., 2011). No mesmo trabalho de 2011, foi descrita a ação citotóxica de Oc-P1 sobre a linhagem de melanoma murino B16-F10, sendo esta a primeira avaliação de uma ocelatina em células tumorais. No entanto, foi relatado também que ocelatina-P1 é pouco seletiva, pois foram observados mais efeitos citotóxicos em células normais de fibroblasto (FHN) do que em células tumorais. Os mecanismos de ação do peptídeo não foram elucidados, mas foi sugerido que a morte das células B16-F10 seria via apoptose, com possível processo necrótico subsequente (LIBÉRIO et al., 2011).

Isto posto, o presente trabalho foi direcionado para a utilização da Oc-P1 como um *template* para o desenho racional e a produção de análogos, de forma a melhorar sua eficácia e aumentar sua seletividade, além de gerar mais informações a respeito de suas possíveis aplicações biológicas, prestigiando assim, um PAM caracterizado também a partir das secreções de um anfíbio presente em nossa fauna.

2. JUSTIFICATIVA

A prospecção molecular na secreção de anuros por moléculas que possam servir de modelo farmacológico no tratamento de doenças vem apresentando resultados promissores. Este conhecimento gerado a partir dos diversos trabalhos apresentados descrevendo a purificação e caracterização de peptídeos ativos presentes nestas secreções pode ser aplicado na investigação sobre as relações entre estrutura e função biológica. Assim, o desenho de novos peptídeos busca fornecer informações sobre os componentes estruturais que são determinantes para a eficácia de um composto. Tal abordagem representa uma etapa significativa para a descoberta de novos compostos bioativos. Futuramente, espera-se que tais compostos possam ser empregados como ferramentas biotecnológicas para o tratamento de patologias endêmicas negligenciadas ou, ainda, de infecções causadas por cepas de microrganismos resistentes à terapêutica convencional.

3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral propor o desenho racional de oito análogos da ocelatina-P1 e a avaliação de seu potencial inibitório sobre a proliferação de bactérias, fungos e protozoários de importância médica. Esperava-se assim correlacionar às atividades biológicas de cada um dos análogos produzidos com as substituições estruturais propostas, visando uma maior compreensão das relações estrutura-função de modo a direcionar a produção de análogos mais potentes e seletivos.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar o desenho racional de análogos da ocelatina-P1 a partir do estudo de sua estrutura primária, considerando parâmetros físico-químicos como: hidrofobicidade, momento hidrofóbico, carga e extensão da cadeia peptídica;

Avaliar as estruturas propostas a partir da ferramenta *in silico* de predição do índice terapêutico teórico;

Avaliar as estruturas primárias dos análogos propostos com ferramentas de bioinformática para análise de parâmetros físico-químicos e estruturais;

Gerar estruturas tridimensionais a partir de ferramentas *in silico*, de forma a avaliar os perfis gerados pela análise pelo programa SPLIT 4.0;

Obter os peptídeos sintéticos por meio de síntese Fmoc;

Caracterizar biologicamente os peptídeos por meio da determinação das CMI's em ensaios antimicrobianos;

Investigar a citotoxicidade dos peptídeos por meio da avaliação da atividade hemolítica;

Avaliar a atividade antiparasitária dos peptídeos em diversos parasitos e diferentes estágios do ciclo de vida;

Identificar possíveis determinantes estruturais para as atividades observadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

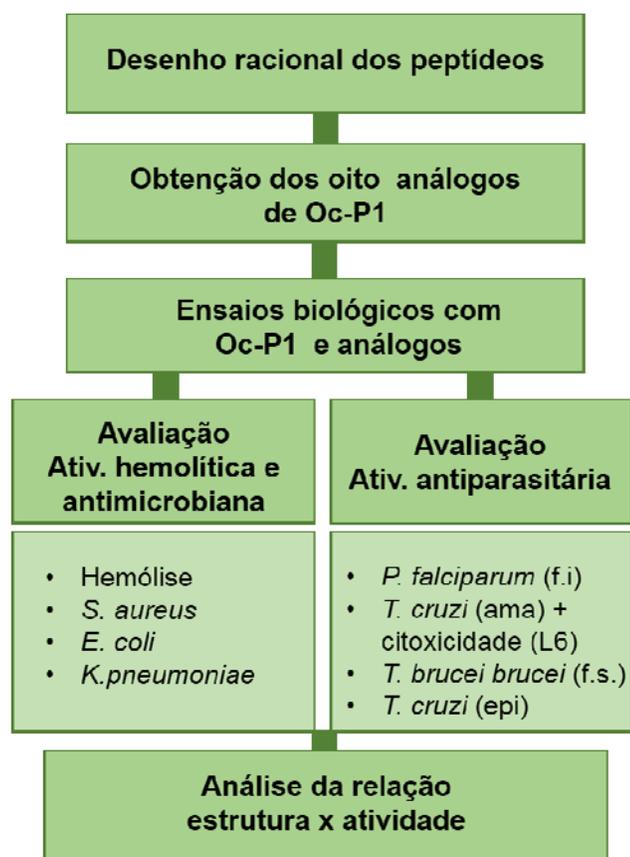


Figura 13. Esquema do delineamento experimental do presente trabalho. Siglas: f.i, forma intraeritrocitária; ama, amastigota; f.s., formas sanguíneas e epi, epimastigota.

4.2. DESENHO RACIONAL DOS ANÁLOGOS DO PEPTÍDEO OCELATINA-P1 E ANÁLISE POR BIOINFORMÁTICA

Os oito análogos propostos foram desenhados tendo como base a estrutura primária do peptídeo Oc-P1, de modo a possibilitar alterações nas faces polar e apolar da molécula procurando manter e/ou melhorar seu poder de atuação frente a microrganismos e diminuir sua toxicidade sobre eritrócitos humanos. Com este propósito, a estrutura primária do peptídeo foi analisada e modificações foram

propostas, de modo a manter a formação de uma estrutura anfipática, importante para a manutenção da sua atividade citolítica.

Para o desenho racional dos análogos a serem sintetizados foram feitas análises com as seguintes ferramentas:

- 1- *SPLIT*, versão 4.0 *Membrane Protein Secondary Structure Prediction Server*, para a predição do comportamento de cada análogo frente a uma membrana biológica (<http://split4.pmfst.hr/split/>);
- 2- *Therapeutic Índice Estimator*, para avaliar o índice terapêutico teórico (<http://split4.pmfst.hr/split/dserv1/>);
- 3- *HeliQuest*, (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>) para os cálculos da hidrofobicidade e do momento hidrofóbico médio e projeção em α -hélice;
- 4- *Peptide Property Calculator*, para a obtenção da massa molecular teórica (<http://www.innovagen.se/custom-peptide-synthesis/peptide-property-calculator/peptide-property-calculator.asp>);
- 5- *ClustaW2*, para o alinhamento das estruturas primárias (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>);
- 6- *Pepstr*, para a predição de estruturas terciárias (<http://www.imtech.res.in/raghava/pepstr/>).
- 7- *RasMol*, para a modelagem dos dados obtidos pela plataforma *Pepstr* (<http://www.openrasmol.org/>);
- 8- *Proteus2*, para a predição dos componentes de estrutura secundária (<http://www.proteus2.ca/proteus2/indice.jsp>).

4.3. OBTENÇÃO DOS ANÁLOGOS PROPOSTOS

Os análogos propostos foram sintetizados de forma automatizada e seu grau de pureza foi determinado por HPLC (> 98%). Os análogos foram produzidos pela empresa *GenOne Biotechnologies*, Rio de Janeiro, Brasil.

4.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES-ESTOQUE DE PEPTÍDEOS

Após a obtenção dos peptídeos purificados, as amostras foram quantificadas em um nanofotômetro (*Nanophotometer Pearl 3468*, IMPLEN, Alemanha). Para o cálculo das concentrações, foi determinada as absorbâncias de cada composto no comprimento de onda de 205 nm, uma vez que os peptídeos não apresentam resíduos aromáticos em suas estruturas primárias. Para isso, foi utilizada a seguinte fórmula (SCOPES, 1974; SIMONIAN, 2001):

$$C \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{A}{31 \left(\frac{mL}{mg \times cm} \right) \times b(cm)} \quad (4.1)$$

Aonde C é a concentração obtida, A, a absorbância no comprimento de onda de 205 nm; b, o caminho óptico e 31, um valor de absortividade estimado para este comprimento de onda (para peptídeos e proteínas).

4.5. ENSAIO ANTIBACTERIANO

Linhagens referenciais de bactérias, obtidas do Banco de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP), foram cultivadas em 7 mL de meio *Mueller-Hinton* sob agitação a 37°C até a densidade óptica igual a 1 a 595 nm. As bactérias, em fase logarítmica de crescimento, foram diluídas com o mesmo meio de cultura nas proporções 1:50 para as Gram-negativas e 1:100 para as Gram-positivas. Uma alíquota de 50 µL de cada cultura bacteriana (contendo de 2 a 7 x 10⁵ UFCs) foi incubada em um *shaker* por 22 horas, a 37°C. com alíquotas de 50 µL de cada peptídeo diluídos serialmente em água Milli-Q, esterilizada em filtros Millex GV 0,22 µm. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e água Milli-Q estéril, ambos incubados com as suspensões bacterianas. A inibição do crescimento foi determinada pela leitura da densidade óptica a 595 nm, com uma leitora de microplacas (*Multiskan™ FC*, Thermo Scientific, EUA). O valor da concentração mínima inibitória (CMI) foi assumido como a menor concentração necessária para inibir o crescimento bacteriano detectado

espectrometricamente. Para o conjunto de oito análogos de Oc-P1 foram testadas as seguintes bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13884).

4.6. ENSAIO HEMOLÍTICO

O ensaio hemolítico utilizado foi modificado do protocolo descrito por ONUMA et al., (1999). Eritrócitos de sangue humano O positivo, coletado de doador saudável, foram separados do plasma por sedimentação e, em seguida, três lavagens sucessivas foram realizadas com tampão 1x (Tris-HCL 0,01 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M). Tanto a solubilização das amostras quanto o preparo da solução a 1% (v/v) de hemácias foram efetuadas com este tampão. Para o ensaio, os análogos foram diluídos serialmente a partir de uma solução estoque de 256 µM e incubados com a suspensão de eritrócitos por 1 hora, à temperatura ambiente. As amostras foram incubadas por uma hora a temperatura ambiente, com posterior centrifugação a 3000 rpm por 2 min. Alíquotas de 100 µL do sobrenadante de cada peptídeo foram transferidas para uma placa de 96 poços de fundo chato (TPP) e a leitura da absorvância realizada a 405 nm com uma leitora de microplacas (*Multiskan™ FC, Thermo Scientific*, EUA). Para as amostras de referência utilizaram-se 100 µL da suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) incubada com 100 µL de Triton X-100 1% (v/v) como referência de 100% de lise e 100 µL da suspensão de eritrócitos a 1% (v/v) com tampão salino como referência de 0% de hemólise. Cada ensaio foi realizado em triplicata. O percentual de hemólise foi definido a partir da seguinte equação:

$$\%hemólise = \frac{A-A_0}{A_x-A_0} \times 100 \quad (4.2)$$

Sendo que A é a absorvância referente ao tratamento com cada peptídeo, A₀ é a absorvância em tampão salino e A_x, a absorvância em Triton X-100 1%.

4.7. ENSAIOS ANTIPARASITÁRIOS

4.7.1. PREPARAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos foram ressuspensos em DMSO a uma concentração-estoque de 20 mg/mL para utilização nos ensaios.

4.7.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DOS PEPTÍDEOS CONTRA FORMAS INTRAERITROCITÁRIAS DE *Plasmodium falciparum*

A linhagem resistente à cloroquina FcB1 de *P. falciparum* foi mantida em eritrócitos humanos *in vitro* em meio RPMI 1640 suplementado com 8% de pool de soro humano por 2 semanas, a 37°C sob atmosfera de 3% CO₂, 6% O₂ e 91% N₂. Para avaliar o efeito antiparasitário de cada peptídeo, foi determinada a incorporação de [³H]-hipoxantina, conforme descrito na literatura (DE MESQUITA et al., 2005; FROMENTIN et al., 2013). A cultura de parasitos não sincronizada (100 µL, 1% de parasitemia e 1% de hematócrito final) foi adicionada a 100 µL de uma diluição seriada de cada peptídeo avaliado (200 a 9,8 x 10⁻² µM), e o período de incubação foi de 24 horas a 37°C. Após esse período, a cada poço foram adicionados 20 µL de solução de [³H]-hipoxantina a 0,5 µCi (GE Healthcare, Grã-Bretanha, 1-5 mmol/mL), para posterior incubação por mais 24 horas a 37°C (DESJARDINS et al., 1979). Após este segundo período de incubação, as microplacas foram mantidas a -20°C (entre 6 e 10 horas) para promover a lise das hemácias. A concentração de hipoxantina tritiada incorporada aos parasitos foi avaliada por meio da leitura da radioatividade incorporada (1450 Microbeta TRILUX – Liquid Scintillation and Luminescence Counter, Perkin Elmer, EUA). A relação de incorporação de [³H]-hipoxantina foi observada por meio de contagem por minuto, sendo proporcional à viabilidade do parasito. O valor de CI₅₀ (referente à concentração que inibe em 50% a viabilidade das formas intraeritrocitárias do parasito) foi calculado a partir de regressão não linear no programa Prism 6.0 GraphPad (GraphPad Software, Inc, EUA), obtido a partir da média de um experimento realizado em triplicata. O fármaco padrão utilizado como controle positivo foi a cloroquina e como controle negativo foi utilizado DMSO a 0,1%.

4.7.3. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Células do músculo cardíaco de camundongos (linhagem L6) foram semeadas em microplacas com 96 poços, em meio DMEM suplementado com HEPES 25 mM pH 7,5; 2 g/L de glicose; 10% de soro fetal bovino (SFB) na presença de penicilina e estreptomicina (100 µg/mL), em uma relação de 5×10^3 células/poço em 100 µL. Após 24 h, as células foram lavadas e incubadas em 100 µL de uma diluição seriada de cada peptídeo (200 a $9,8 \times 10^{-2}$ µM), durante 72 h, a 37°C sob uma atmosfera de 5% de CO₂. O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o reagente colorimétrico *Alamar Blue*TM (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), baseado na redução da resazurina, composto que possui cor azul e não é fluorescente, para resofurin, composto de coloração rosada e fluorescente (MOSMANN, 1983). As diferentes concentrações dos peptídeos foram avaliadas com o objetivo de determinar a concentração que inibe em 50% a viabilidade celular (CI₅₀). A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas (FL600 *microplate fluorescence reader*, *BIO-TEK*[®] *Instruments, Inc*, EUA), a 540 nm. O valor de IC₅₀ foi calculado a partir de regressão não linear no programa *Prism 6.0 GraphPad* (*GraphPad Software*), obtido a partir da média de um experimento realizado em triplicata. Como controle negativo foi utilizado DMSO a 0,1%.

4.7.4. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Os ensaios *in vitro* com a forma intracelular de *T. cruzi* foram realizados conforme descrito por GRELLIER *et al.*, (2001) usando formas tripomastigotas de *T. cruzi* que expressam o gene da enzima β-galactosidase (LacZ Tulahuen clone 4). Células da linhagem L6 foram semeadas em uma placa de 96 poços contendo de 5×10^3 células / poço. Após 24 h, 10^5 parasitos na forma tripomastigota obtidos a partir de culturas de células L6 infectadas foram adicionados a cada poço e incubados por 6 h. As células foram lavadas duas vezes para a remoção das formas tripomastigotas e, posteriormente, incubadas com uma diluição seriada dos peptídeos sintéticos (200 a $9,8 \cdot 10^{-2}$ µM) a 37 °C, sob uma atmosfera de 5% de CO₂ durante 5 dias, em meio RPMI 1640, suplementado com 25 mM de HEPES pH 7,35 e 10% SFB. A inibição da viabilidade parasitária foi quantificada utilizando o substrato orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo na detecção de atividade de beta-galactosidase, pois sua hidrólise

gera orto-nitrofenol, composto que pode ser quantificado. Assim, a absorvância corresponde ao nível de permeabilização da membrana (BUCKNER et al., 1996; BOSC et al., 2013). A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas (FL600 *microplate fluorescence reader*, BIO-TEK® *Instruments, Inc*, EUA), a 540 nm. O valor de IC₅₀ foi calculado a partir de regressão não linear no programa *Prism 6.0 GraphPad* (*GraphPad Software*), obtido a partir da média de um experimento realizado em triplicata. O fármaco padrão utilizado como controle positivo foi o Nifurtimox e, como controle negativo de inibição, foi utilizada como referência uma cultura de parasitos não tratada com os compostos, mas incubada com DMSO 0,1% (v/v).

4.7.5. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA CONTRA FORMAS TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEAS DE *T. brucei brucei*

Formas sanguíneas de *T. brucei brucei* (linhagem Feo) foram cultivadas em meio HMI9 suplementado com 10% de SFB, a 37 °C, sob uma atmosfera de 5% de CO₂ (LOISEAU et al., 1997; RÄZ et al., 1997). O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o reagente colorimétrico *Alamar Blue*TM (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) (MOSMANN, 1983). Os parasitos foram incubados em placas de 96 poços (com 10⁴ parasitos, 200 µL/ poço), em concentrações seriadas (200 a 9,8.10⁻² µM) dos peptídeos. Após incubação por 72 h, a solução de *Alamar Blue*TM foi adicionada a cada poço em uma concentração final de 45 µM. A leitura da fluorescência foi medida após 4 horas de incubação, nos seguintes comprimentos de onda: 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão), em uma leitora de microplacas (FL600 *microplate fluorescence reader*, BIO-TEK® *Instruments, Inc*, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicata e o valor de IC₅₀ foi calculado a a partir de regressão não linear no programa *Prism 6.0 GraphPad* (*GraphPad Software*). O fármaco padrão utilizado como controle positivo foi a pentamidina.

4.7.6. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA CONTRA FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

As culturas de formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa CL-Brener) foram cultivadas a 28 °C em estufa, em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*), contendo 10% de SFB. Resumidamente, as culturas foram crescidas até que a densidade celular de 10^7 parasitos/mL fosse atingida. Cem microlitros da suspensão de parasita a 5×10^6 parasitas/mL foram incubados em microplacas de 96 poços para leitura de fluorescência com um volume igual dos peptídeos, diluídos em série (200 a 1,56 μ M) em meio LIT, por 72 h, para avaliação da ação inibitória sobre o crescimento dos protozoários. Depois deste tempo, cada poço recebeu 40 μ L da solução do reagente *CellTiter-Blue*[®] (*Promega*, EUA), baseado na resposta celular em função da redução do composto resazurina para resofurina e aferição da fluorescência resultante (MOSMANN, 1983). A viabilidade parasitária foi determinada por fluorescência a 560 nm (excitação) e 590 nm (emissão), após 4h de incubação a 37 °C, em uma leitora de microplacas (*SpectraMax*[®] M5 *Microplate Reader*, *Molecular Devices*, EUA). Como controle positivo, foi utilizado o composto Nifurtimox. Os ensaios foram realizados em triplicata e o valor de CI_{50} foi estimado a partir de regressão não linear no programa *Prism 6.0 GraphPad* (*GraphPad Software*).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DESENHO RACIONAL DOS OITO ANÁLOGOS DE OC-P1

Inicialmente foram propostos dois análogos da Oc-P1, denominados A1 e A2, contendo, respectivamente, 16 e 14 resíduos de aminoácidos. Tais peptídeos foram propostos como base na redução na extensão da cadeia polipeptídica da Oc-P1 a partir da porção N-terminal e a manutenção da tendência à formação de estrutura em α -hélice anfipática. A partir de cada análogo, foram gerados outros três peptídeos; sendo, portanto, quatro análogos de ocelatina-P1 por grupo. Todos os peptídeos são catiônicos e apresentam amidação no domínio carboxi-terminal, característica observada em diversos PAMs descritos na literatura, incluindo na família das ocelatinas, conforme discutido anteriormente. Estas propriedades, associadas à presença de um resíduo de glicina na extremidade N-terminal (com exceção do análogo A2, que contém uma lisina na mesma posição) estão relacionadas à resistência contra a ação de peptidases além da formação de pontes de hidrogênio na estrutura α -helicoidal (ZELEZETSKY; TOSSI, 2006).

O alinhamento das sequências dos oito análogos com o peptídeo selvagem Oc-P1 está apresentado na **Figura 14**.

```

ocellatina-P1      GLLDTLKGAAKNVWVGLASLAKVMEKL 25
A1                 -----GAANVVKSLASKVVKL- 16
A11                -----GAANVVKGLAVK-GKL- 15
A12                -----GAANVVKKLVKVKGL- 16
A13                -----GAANVVKKLVKVKGL- 16
A2                 -----K-AAKKVWVGLASIV---- 14
A21                -----GAAKVWVGLLAKVL--- 15
A22                -----GAAKVWVGLAAKVL--- 15
A23                -----GAAKNVVGLKAAKVA--- 15
                    . * : **

```

Figura 14. Alinhamento múltiplo entre os oito análogos propostos e o peptídeo selvagem ocelatina-P1. Os símbolos asterisco (*), um ponto (.) e dois pontos (:) dispostos na linha inferior indicam máxima identidade entre todas as sequências, uma substituição semi-conservativa e uma substituição conservativa, respectivamente. As cores agrupam os aminoácidos por características: vermelho para os aminoácidos de cadeias laterais apolares e alifáticas; azul para as cadeias laterais com grupos ácidos; magenta para os básicos; verde para os cadeias laterais contendo grupos polares, além da glicina (que geralmente é incluída neste grupo, embora tenha como cadeia lateral um hidrogênio).

Um dos parâmetros utilizados também como critério de escolha dos peptídeos a serem sintetizados foi a determinação do índice terapêutico teórico (IT_{teor}). A relação estabelecida entre a toxicidade e a atividade antimicrobiana fornece a medida do índice terapêutico (IT). Estes dois parâmetros indicam quão específica é a atividade de um peptídeo, uma vez que é definida pela razão entre a concentração peptídica que provoca a lise de 50% de eritrócitos mamíferos (CH_{50}) e a concentração mínima inibitória (CMI) capaz de inibir o crescimento de uma colônia de bactérias; sendo então, expresso como $TI = CH_{50}/CMI$ (JURETIĆ et al., 2011). Este estudo inicial foi utilizado posteriormente na comparação entre os valores obtidos experimentalmente.

O IT_{teor} foi avaliado com auxílio da ferramenta *Therapeutic índice estimator for frog-derived helical antimicrobial peptides*, gerado a partir da análise de peptídeos depositados no banco de dados DADP (NOVKOVIĆ et al., 2012). O critério de escolha para a construção do algoritmo ditava que as sequências deveriam compartilhar menos que 70% de identidade, incluindo peptídeos que apresentavam nenhuma similaridade, para que um perfil geral fosse obtido para a predição do índice. Esses estudos foram restringidos para peptídeos antimicrobianos isolados de secreções de anfíbios e, para gerar os ITs, foram utilizados os resultados de ensaios antimicrobianos (dados para linhagens de *Escherichia coli*) e ensaios hemolíticos (com eritrócitos humanos, em sua maioria) (JURETIĆ et al., 2011). Os autores relataram que a relação *D descriptor*, que trata do coeficiente calculado a partir dos valores de IT teórico e experimental, foi avaliada após comparação de 36 PAMs (não homólogos), gerando um $r^2 = 0.83$. O estudo também foi validado para análogos peptídicos (por meio da comparação de onze derivados do peptídeo pseudina, de *Pseudis paradoxa*) com um r^2 de 0.84. Com isso, foi mostrado que a predição de IT_{teor} poderia ser aplicada tanto para casos nos quais os peptídeos não apresentavam nenhuma similaridade entre si e também em casos em que as sequências compartilhavam certa homologia (JURETIĆ et al., 2009).

Jurétic e colaboradores relataram que, uma vez que o D-descriptor varia de -1 a +1 ($\cos 0^\circ - \cos 180^\circ$), o valor teórico de IT teria uma variação entre ≈ 5 e ≈ 95 . Desta forma, um valor teórico de 95 poderia estar relacionado a um valor experimental acima deste, da mesma forma que um valor 5 para IT_{teor} poderia representar um valor menor que o mínimo indicado. No entanto, foi ressaltado que um valor próximo de 95 não iria garantir uma expressiva atividade antimicrobiana de um peptídeo (JURETIĆ et al.,

2011). Assim, conforme os autores indicam, esse algoritmo busca selecionar, dentre os peptídeos isolados de anuros, os que podem apresentar índices muito baixos de IT, mas não se destina a fornecer uma previsão precisa para este parâmetro.

Cabe informar que o peptídeo *ocelatina*-P1, escolhido como *template* para os análogos avaliados neste projeto, foi um dos peptídeos presentes no *training set* do trabalho que gerou a ferramenta *Therapeutic índice estimator for frog-derived helical antimicrobial peptides*. Os resultados observados para este peptídeo (IT_{teor} de 10,06 e IT_{exp} de 16) motivaram a utilização desta ferramenta como suporte para a construção dos derivados de *ocelatina*-P1.

O segundo parâmetro utilizado para o desenho racional tratou da predição do comportamento de orientação de um dado peptídeo em uma membrana celular. Com auxílio do algoritmo *online* SPLIT (<http://split4.pmfst.hr/split/4/>), é sugerido um padrão de comportamento (JURETIĆ; ZORANIĆ; ZUCIĆ, 2002). O algoritmo compara predições que indiquem a preferência do peptídeo/proteína a adotar uma conformação em hélice transmembrantar, α -hélice anfipática, folha- β (também podendo ser transmembrantar) ou até mesmo, uma conformação indefinida. O índice de momento hidrofóbico (eixo das ordenadas em cada perfil) é relatado por duas conformações-padrão: α -hélice, com um ângulo de torção de 100° , e folha- β , com um ângulo de torção de 180° . Embora este algoritmo seja mais utilizado na predição de regiões transmembranares para o estudo de proteínas, é sugerido também para a predição do perfil conformacional de peptídeos em uma interação com membranas biológicas (JURETIĆ; JERONČIĆ; ZUCIĆ, 1999).

Os peptídeos denominados “antibióticos”, são definidos como os compostos que apresentam pouca preferência por adentrar a membrana interna de uma célula-alvo, enquanto que os peptídeos ditos “tóxicos”, são relacionados pelo programa como peptídeos que apresentariam um pronunciado comportamento transmembrantar (JURETIĆ; JERONČIĆ; ZUCIĆ, 1999; JURETIĆ et al., 2011). Como exemplos para auxiliar a compreensão, serão apresentados os *perfis* dos peptídeos PGYa e melitina, considerados pelo algoritmo como um antibiótico e uma toxina, respectivamente.

O perfil obtido para peptídeo PGYa, um peptídeo sintético desenvolvido por Tossi e colaboradores (1997), é descrito como uma estrutura secundária simétrica com ambas as porções terminais apresentando elevada preferência por uma conformação em hélice enterrada na membrana (linha vermelha), enquanto que a sua região central seria susceptível à associação à membrana, buscando promover a conformação em α -hélice (**Figura 15**) (JURETIĆ; JERONČIĆ; ZUCIĆ, 1999). O índice do momento hidrofóbico (INDA) fornece, neste caso, informações sobre a localização possível do segmento de sequência referente à α -hélice (linha cinza): entre Arg⁴ e Lys¹⁹. Com esse perfil, o programa não prediz PGYa como um peptídeo essencialmente transmembranar.

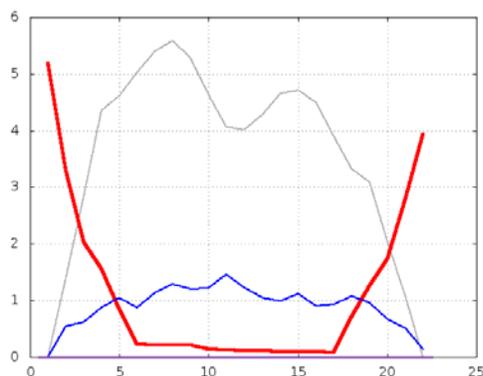


Figura 15. Perfis SPLIT 4.0 para a sequência do peptídeo PGYa referente à análise de preferência às conformações estruturais secundárias. Linha azul: preferência à folha- β (índice BET); linha vermelha: preferência à hélice transmembranar (índice TMH) e linha cinza: índice do momento hidrofóbico modificado (índice INDA), que relaciona a preferência pela estruturação em uma α -hélice anfipática. O eixo das abscissas corresponde ao número de resíduos do peptídeo, enquanto que o eixo das ordenadas, retrata a amplitude dos três parâmetros avaliados.

O perfil do peptídeo hemolítico melitina (**Figura 16**) é distinto, sendo possível observar como o padrão da linha vermelha, referente à hélice transmembranar (TMH) é alto até o resíduo 15 (no programa estão relacionados os maiores índices para este parâmetro), sendo que, do resíduo 16 ao 21, a linha azul retrata a tendência a adotar uma conformação em folha- β . No entanto, para este peptídeo, foi observado que os parâmetros avaliados para esta tendência não cumprem o pré-requisito para esta conformação, pois não há um segmento contínuo contendo 6 resíduos, aonde cada

um apresentaria um *score* maior que 2 (na soma total dos índices referentes à essa conformação, na análise dos dados numéricos referentes à análise). Assim, este segmento de sequência entre os resíduos 16 a 21 compõe a parte principal da porção transmembrantar do peptídeo, referente à conformação em α -hélice. Importante observar ainda que esta tendência é mais acentuada na porção N-terminal (**Figura 16**). Para peptídeos que são menos citotóxicos, essa característica é discreta na região central, como no caso do PGYa (JURETIĆ; JERONČIĆ; ZUCIĆ, 1999).

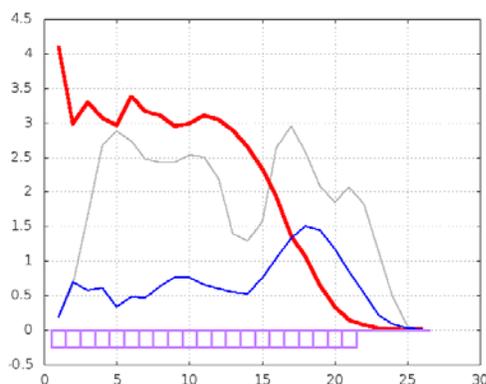


Figura 16. Perfis SPLIT 4.0 para a sequência do peptídeo melitina referente à análise de preferência às conformações estruturais secundárias. Linha azul: preferência à folha- β (índice BET); linha vermelha: preferência à hélice transmembrantar (índice TMH); linha cinza: índice do momento hidrofóbico modificado (índice INDA), relaciona a preferência pela estruturação em uma α -hélice anfipática; caixas em violeta (abaixo da abscissa), posição prevista da hélice transmembrantar (índice DIG). O eixo das abscissas corresponde ao número de resíduos do peptídeo, enquanto que o eixo das ordenadas, retrata a amplitude dos três parâmetros avaliados.

Portanto, a avaliação inicial dos perfis obtidos pelo algoritmo SPLIT podem auxiliar na distinção entre peptídeos hemolíticos e peptídeos ditos seletivos, uma vez que, para o primeiro caso, é prevista a preferência pronunciada pela conformação helicoidal transmembrantar (parâmetro TMH, representado pela linha vermelha - destacado no caso da melitina, **Figura 16**), enquanto os PAMs seletivos (conforme exemplificado por PGYa, na **Figura 15**) não compartilham o mesmo padrão (JURETIĆ et al., 2011). Deste modo, o desenho racional dos peptídeos apresentados no presente trabalho foi direcionado pelas informações geradas também por esse algoritmo

O perfil da Oc-P1, apresentado na **Figura 17** abaixo permite relacionar um dos resultados experimentais já descritos para Oc-P1, aonde a baixa atividade hemolítica ($CH_{50} > 400 \mu M$) é representada principalmente pelo perfil do parâmetro TMH, sugerindo que a sequência Gly¹ a Asp⁴ estariam envolvidos na porção transmembranar da hélice, enquanto que o segmento Lys²⁰ a Met²² (maiores valores indicados pelo perfil INDA) comporia parte da α -hélice anfipática.

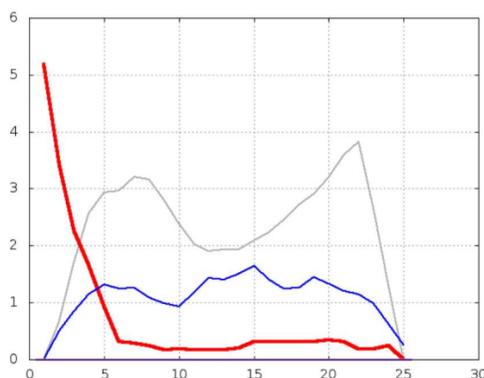


Figura 17. Perfil SPLIT 4.0 para a sequência do peptídeo Oc-P1 referente à análise de preferência às conformações estruturais secundárias. Linha azul: preferência à folha- β (índice BET); linha vermelha: preferência à hélice transmembranar (índice TMH); linha cinza: índice do momento hidrofóbico modificado (índice INDA), relaciona a preferência pela estruturação em uma α -hélice anfipática. O eixo das abcissas corresponde ao número de resíduos do peptídeo, enquanto que o eixo das ordenadas, retrata a amplitude dos três parâmetros avaliados.

As **Figuras 18 e 19** apresentam os perfis previstos para os análogos propostos para *ocellatin*-P1.

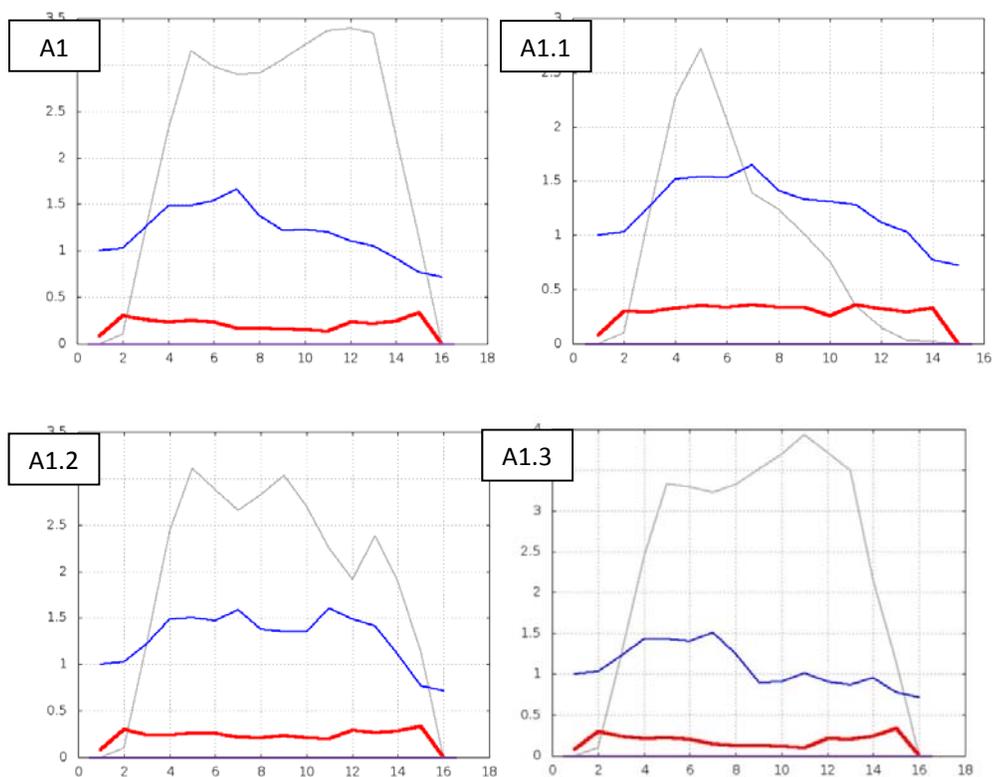


Figura 18. Perfis SPLIT 4.0 para a sequência de cada análogo de Oc-P1 da série A1 referente à análise de preferência às conformações estruturais secundárias. Linha azul: preferência à folha- β (índice BET); linha vermelha: preferência à hélice transmembranar (índice TMH); linha cinza: índice do momento hidrofóbico modificado (índice INDA), relaciona a preferência pela estruturação em uma α -hélice anfipática. O eixo das abcissas corresponde ao número de resíduos do peptídeo, enquanto que o eixo das ordenadas, retrata a amplitude dos três parâmetros avaliados.

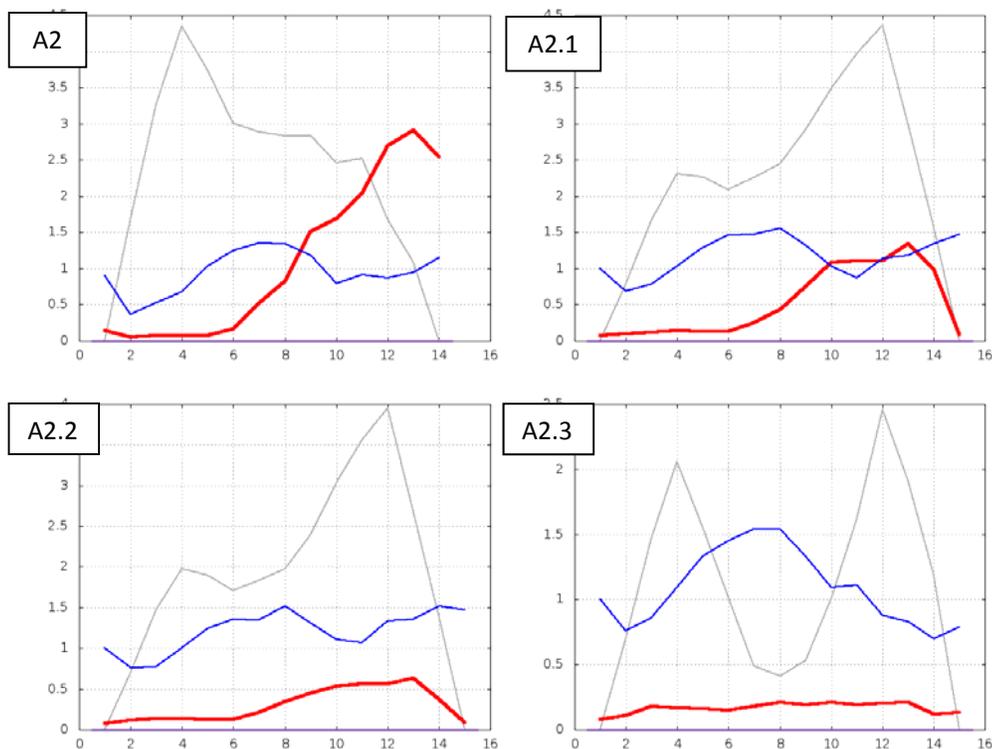


Figura 19. Perfis SPLIT 4.0 para a sequência de cada análogo de Oc-P1 da série A2 referente à análise de preferência às conformações estruturais secundárias. Linha azul: preferência à folha- β (índice BET); linha vermelha: preferência à hélice transmembranar (índice TMH); linha cinza: índice do momento hidrofóbico modificado (índice INDA), relaciona a preferência pela estruturação em uma α -hélice anfipática. O eixo das abcissas corresponde ao número de resíduos do peptídeo, enquanto que o eixo das ordenadas, retrata a amplitude dos três parâmetros avaliados.

Os perfis obtidos sugeriram que, dentre os análogos propostos, somente A2 e A2.1 apresentariam atividade hemolítica pronunciada, pois em ambos os gráficos as linhas referentes à afinidade pela membrana plasmática (em vermelho) estão acentuadas, principalmente na porção C-terminal. No entanto, conforme será discutido, o peptídeo A2 não apresentou atividade hemolítica na maior concentração avaliada (128 μ M), enquanto que A2.1 foi o peptídeo mais hemolítico dentre os avaliados. O padrão visualizado para A2 foi semelhante ao observado na temporina-1TGb (**Figura 20**) que possui um CH_{50} de 250 μ M, confirmando o resultado obtido para este peptídeo. Embora os outros análogos tenham apresentado atividade hemolítica mais baixa que A2 (mas não tão altas como A2.1), este fator não foi previsto pelos perfis obtidos, pois o índice TMH foi muito baixo. No entanto, o algoritmo SPLIT

informa que é possível sim encontrar PAMs hemolíticos que não apresentem esse padrão pronunciado de TMH (JURETIĆ et al., 2011).

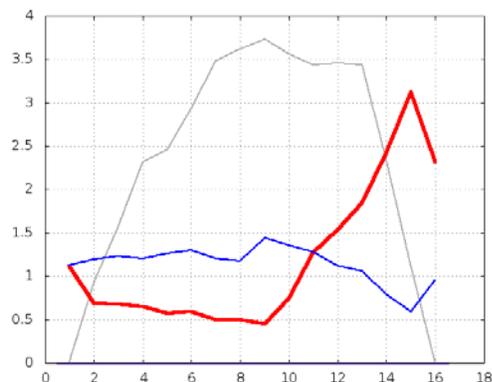


Figura 20. Perfis SPLIT 4.0 para a sequência do peptídeo temporina-1TGb referente à análise de preferência às conformações estruturais secundárias. Linha azul: preferência à folha- β (índice BET); linha vermelha: preferência à hélice transmembranar (índice TMH); linha cinza: índice do momento hidrofóbico modificado (índice INDA), relaciona a preferência pela estruturação em uma α -hélice anfipática. O eixo das abcissas corresponde ao número de resíduos do peptídeo, enquanto que o eixo das ordenadas, retrata a amplitude dos três parâmetros avaliados.

Uma informação fornecida pelo índice INDA trata da possível localização dos segmentos de sequência envolvidos na conformação em α -hélice, em que a medida *INDA-length* (*I-L*) retrata a anfipaticidade do peptídeo avaliado, de acordo com a análise de resíduos com valores de INDA acima de 3.0 (JURETIĆ; JERONČIĆ; ZUCIĆ, 1999; JURETIĆ et al., 2011). Assim, a análise do índice *I-L* para os análogos do primeiro conjunto mostrou que A1 e A1.3 apresentam grandes segmentos (predição entre os resíduos Leu⁹ a Val¹³ e Val⁵-Val¹³, respectivamente), enquanto que A1.2 só teria dois resíduos (Val⁵ e Leu⁹) e A1.1, nenhuma posição. No segundo conjunto de análogos, A2.1 e A2.2 apresentam o mesmo segmento (Leu¹⁰ a Ala¹²), A2 possui o segmento entre Ala³ e Val⁶ e A2, não foi observado nenhum segmento.

Uma outra avaliação dos perfis obtidos trata da predição conformacional representada pela linha azul (índice BET), referente à estrutura secundária em folha- β . Embora uma primeira análise este índice pareça estar pronunciado nos perfis apresentados, a predição para esta estrutura secundária é “confirmada” somente quando a soma dos índices BET e MOMB (momento hidrofóbico calculado para a

conformação folha- β) é maior que 2, sendo ainda necessário que o parâmetro MOMB seja maior que o MOMA, que retrata o momento hidrofóbico calculado para a conformação α -hélice (JURETIĆ et al., 1998a, 1998b). Esta confirmação estava presente somente na análise do análogo A1.1, aonde foi observada a predição de uma conformação em folha- β entre os resíduos Ala¹⁰ a Gly¹³.

Assim, a análise dos perfis numéricos (dispostos no **Anexo 1**) sugere que a maioria dos análogos gerados apresentaria uma maior predição à se estruturarem em uma conformação em α -hélice de superfície. Graficamente, isso fica mais claro pela análise do perfil mais pronunciado do índice INDA (linha cinza), com relação ao índice BET (linha azul). É importante ainda ressaltar que o análogo A2.3 apresentou os maiores segmentos relacionados à uma estruturação indefinida (dos resíduos Ala²-Lys⁴ e Lys¹⁰ a Ala¹⁵).

Para avaliar as predições de estruturas secundárias obtidas a partir do estudos dos perfis SPLIT 4.0, dois programas foram utilizados para a predição da estrutura 3D dos análogos propostos e sua visualização gráfica: o *Pepstr* e o *RasMol*. Conforme a plataforma *Pepstr*, desenvolvida por KAUR, GARG e RAGHAVA (2007), a predição da estrutura terciária de pequenos peptídeos (compreendendo entre 7 e 25 resíduos) é baseada na seguinte constatação: a presença de pelo menos uma volta- β é uma característica importante e consistente em pequenos peptídeos (além também de estruturas regulares). Os autores mostram que com o emprego deste algoritmo é possível prever, portanto, a estrutura de pequenas moléculas bioativas, usando informações sobre estruturas regulares (α -hélice e folha- β) e irregulares (volta- β). Este programa foi escolhido por ser direcionado a peptídeos pequenos (caso dos análogos do presente estudo). Além disso, em todos os análogos foram observadas regiões indicados como “indefinidas”, podendo se tratar de estruturas do tipo volta- β ou alças desorganizadas (*random coils*), o emprego deste programa de predição de estruturas secundárias poderia confirmar esses indícios. A predição de cada sequência foi feita em um ambiente hidrofóbico e o programa *RasMol* (SAYLE; MILNER-WHITE, 1995) foi utilizado para a visualização dos gráficos moleculares gerados a partir do *Pepster* (arquivos com extensão .pdb, contendo as coordenadas finais possíveis de cada resíduo).

A **Figura 21** mostra as predições para cada um dos análogos de Oc.P1 pertencentes ao primeiro conjunto (A1 e A1.1 - A1.3), a **Figura 22**, ao segundo

conjunto (A2 e A2.1 - A2.3), enquanto que a **Figura 23** mostra em isolado, a predição para o peptídeo selvagem Oc-P1.

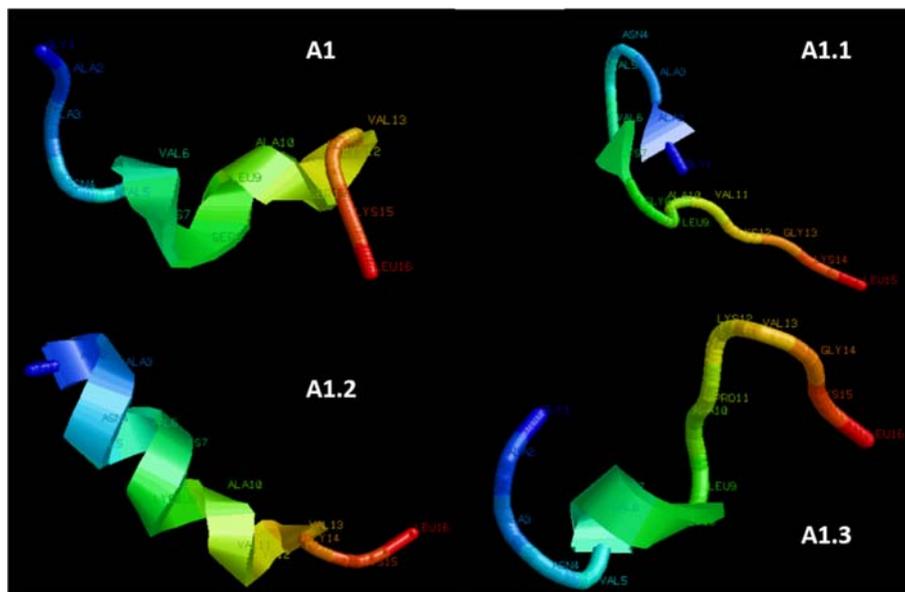


Figura 21. Estruturas em 3D da primeira série de análogos de Oc-P1 (A1 a A1.3). Perfis obtidos com os programas Pepstr e RasMol.

Conforme será discutido, as projeções obtidas corroboram em parte os resultados obtidos com o uso da plataforma *SPLIT 4.0*.

O programa *Proteus2* também foi utilizado como uma terceira ferramenta para auxiliar as análises (os dados gerados pelo programa estão na **Tabela 9**).

Analisando-se o análogo A1 observa-se a presença de α -hélice no segmento Val⁶ a Lys¹² (**Figura 21**), sendo que este segmento compreende parte do previsto pelo *SPLIT 4.0*, enquanto que a predição pelo *Proteus* gerou o intervalo de Ala² a Lys¹²; sugerindo que houve uma sobreposição dos intervalos de sequências;

Em A1.1, a ausência de um segmento para α -hélice foi confirmado por ambos os algoritmos *SPLIT 4.0* e *Proteus2*. O primeiro algoritmo sugere o segmento Ala³ a Ala¹⁰ como envolvido em uma conformação em folha- β , enquanto que o segundo sugere que somente o segmento Leu⁹ a Val¹¹ adotaria a conformação predita;

Para A1.2, a conformação obtida não teve relação com a predição do índice IL, para a qual pelo *Proteus2* foi obtido um segmento semelhante (começando por Ala³) ao observado na **Figura 21**: Ala² a Val¹³;

Em A1.3, para o segmento previsto de Val⁵ a Val¹³ (*SPLIT 4.0*), foi observada uma porção menor (Val⁵ a Lys⁸) segundo o *Pepstr*, sendo que a predição pelo *Proteus* foi de Val³ a Val¹¹.

Tabela 9. Predição de estrutura secundária para os oito análogos de Oc-P1 a partir da ferramenta online *Proteus2*.

Peptídeo	Predição <i>Proteus2</i>	Peptídeo	Predição <i>Proteus2</i>
A1	CHHHHHHHHHHHCCCC	A2	CCHHHHHHHHHHHHC
A1.1	CCCCCCCCEEECCCC	A2.1	CCHHHHHHHHHHHHC
A1.2	CCHHHHHHHHHHHCCC	A2.2	CCHHHHHHHHHHHCC
A1.3	CCHHHHHHHHHCCCC	A2.3	CCCCCCCCEEEEEEC

Siglas: H, α -hélice; E, Folha- β ; C, aleatória.

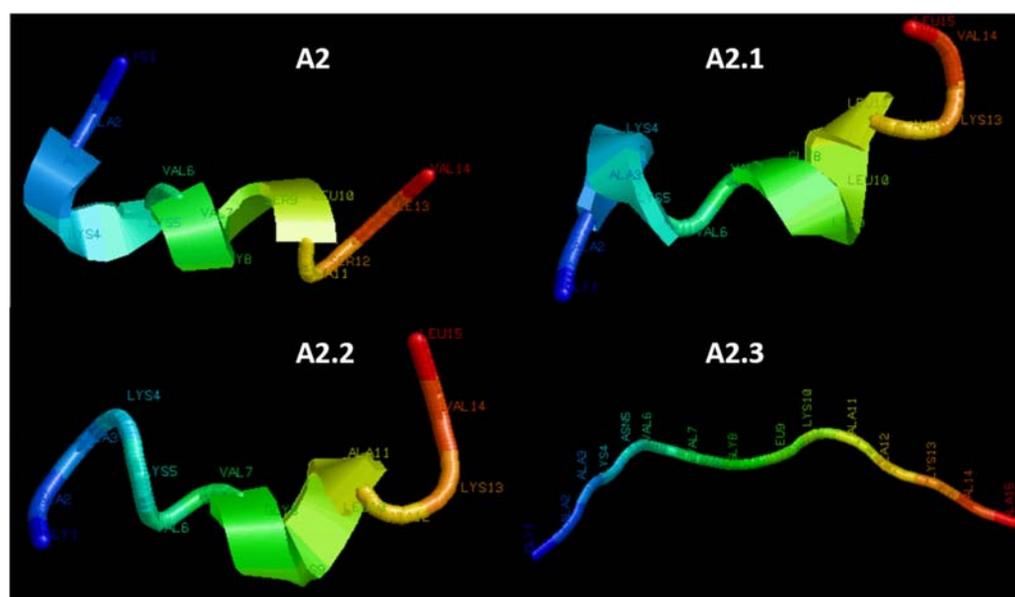


Figura 22. Estruturas em 3D da segunda série de análogos de Oc-P1 (A2 a A2.3).

Perfis obtidos com os programas *Pepstr* e *RasMol*.

Em A2, os segmentos de hélice Ala³ a Lys⁵ e Val⁷ a Leu¹⁰ compreendem boa parte das sequências Ala³ a Val⁶ (α -hélice) e Ser⁹ a Val¹⁴ (α -hélice transmembranar)

previstas pelo *SPLIT 4.0*, e apresentam uma certa sobreposição ao padrão previsto pelo *Proteus* (Ala³ a Ile¹³).

Em A2.1, a hélice observada (Ala³ a Leu¹⁰) e o perfil *Proteus2* (Ala³ a Leu¹³) foram novamente mais extensos que o predito pelo *SPLIT 4.0* (Leu¹⁰ a Ala¹³). No entanto, segundo o algoritmo este segmento, referente à porção C-terminal, teria uma grande preferência a adotar uma conformação em α -hélice transmembranar.

Para A2.2, o perfil *SPLIT 4.0* (Leu¹⁰ a Ala¹²) foi dois resíduos menor que o apresentado na **Figura 22** (Gly⁸ a Ala¹²), sendo que o segmento Ala³ a Lys¹⁴ predito pelo *Proteus2* não coincidiu com as análises estruturais dos dois algoritmos.

E no caso de A2.3, a ausência de um segmento para α -hélice foi confirmado pela predição *SPLIT 4.0* e confirmada pelo *Proteus2*. Segundo o *SPLIT 4.0*, a sequência de A2.3 apresenta os segmentos Ala² a Lys⁴ e Lys¹⁰ a Ala¹⁵ como indefinidos, com Asn⁵ a Leu⁹ com predição à folha- β , padrão previsto pelo *Proteus2* para a porção C-terminal somente.

E, finalmente, para o peptídeo Oc-P1, a predição *SPLIT* sugere que os resíduos Lys⁷, Gly⁸, Lys²⁰ a Met²² estariam envolvidos na conformação em α -hélice, incluindo o segmento Gly¹ a Asp⁴ como uma estrutura transmembranar; enquanto que o algoritmo *Proteus2* gerou uma predição que sugere que a sequência entre Leu³ a Lys²⁴ pode adotar a conformação sugerida.

Na **Figura 23** está representada a modelagem feita pelo algoritmo *Pepstr*, na qual pode ser observado o segmento entre Leu⁶ e Lys²⁴ na hélice. Os resultados indicam que o algoritmo *SPLIT* não foi capaz de prever um segmento mais extenso envolvido na predição da estrutura em α -hélice.

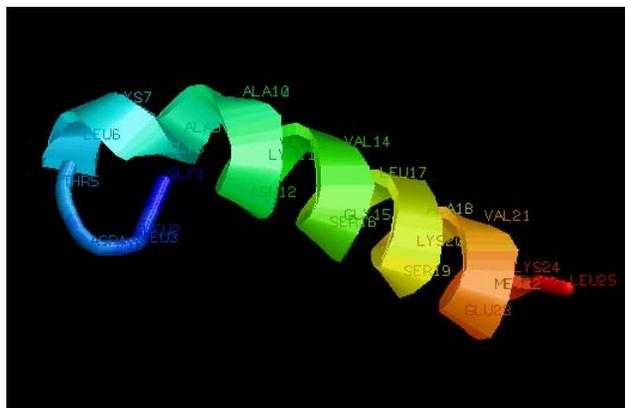


Figura 23. Estrutura em 3D do peptídeo Oc-P1. Perfil obtido com os programas Pepstr e RasMol.

De posse dessas análises, concluímos que cada *software* utilizado forneceu dados importantes para esse estudo preliminar sobre a predição das estruturas adotadas, mas que maiores considerações precisam ser respaldadas por técnicas como dicroísmo circular e o estudo do comportamento dos peptídeos em modelos de membranas lipídicas.

Para melhor explicar as propriedades biológicas observadas e comparar cada análogo, as **Figuras 24, 25 e 26** mostram as sequências de aminoácidos nas projeções em hélice e em rede helicoidal. A projeção em hélice auxilia na visualização de faces hidrofóbicas e hidrofílicas, em função da distribuição dos resíduos presentes na estrutura primária, fornecendo, portanto a propensão de um peptídeo a adotar uma estrutura anfipática.

A projeção em rede helicoidal facilita a visualização de interações repulsivas entre resíduos com cadeias laterais carregadas positivamente dispostas a i a $i + 3$ ou a i a $i + 4$ (mostradas como linhas tracejadas em preto) e interações hidrofóbicas ocorrendo de i a $i + 3$ ou i a $i + 4$ entre grandes resíduos hidrofóbicos (linhas pretas sólidas). Cabe informar que as interações entre resíduos de Ala e outros resíduos hidrofóbicos não são consideradas, uma vez que este resíduo motiva a formação de um microambiente apolar (pois sua cadeia lateral não é muito reativa), sendo então inesperado que interações hidrofóbicas sejam favorecidas (CHEN; MANT; HODGES, 2002; GRAY; BARNES, 2003).

Em ambas as projeções, os resíduos de lisina estão destacados pela cor azul e situam-se na face polar dos PAMs. Os resíduos hidrofóbicos com cadeias laterais volumosas (Val, Ile, Leu e Met), em amarelo, estão localizados na face apolar. O resíduo Asn está indicado pela cor rosa, a Ser em roxo, a Pro em verde e os resíduos pequenos, em cinza. Os resíduos em vermelho destacam Glu e Asp, pois apresentam cadeias laterais com grupos negativamente carregados.

Em conjunto, discutiremos os parâmetros físico-químicos resultantes das modificações estruturais de cada análogo, incluindo os índices terapêuticos teóricos (IT_{teor}), conforme apresentado na **Tabela 10**.

Tabela 10. Relação de parâmetros teóricos para o peptídeo Oc-P1 e os oito análogos propostos.

Peptídeos	MM (g/mol)	<H>	< μ H>	t _R	Q	IT _{teor}
Oc-P1	2542,09	0,341	0,324	ND	+3	10,06
A1	1540,87	0,271	0,492	29,72	+4	92,11
A1.1	1423,77	0,295	0,204	27,80	+4	94,93
A1.2	1594,02	0,291	0,448	36,95	+5	92,99
A1.3	1592,01	0,259	0,479	34,52	+5	87,88
A2	1369,72	0,360	0,549	26,11	+4	41,50
A2.1	1493,94	0,382	0,416	37,40	+5	73,19
A2.2	1451,86	0,289	0,357	27,26	+5	85,89
A2.3	1395,71	0,223	0,094	19,75	+4	94,91

^aParâmetros: <H>, hidrofobicidade média, aonde os valores variam entre -1,01 a 2,25; < μ H>, momento hidrofóbico; cuja faixa é de 0 a 3,26, calculado pela escala de Eisenberg; Q, carga. Valores obtidos após análise no *site* http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py_ND, não determinado no presente estudo. t_R, tempo de retenção obtido por RP-HPLC a 25°C.

Para os análogos do primeiro conjunto (A1), o análogo A1.1, apresentou o valor mais alto de $\langle H \rangle$, mas obteve o menor tempo de eluição. A avaliação das interações possíveis aponta que as substituições dos resíduos de serina por glicina e valina nas respectivas posições 8 e 11, além da deleção de um resíduo de valina na porção C-terminal (quando comparado à A1) geraram um peptídeo menos hidrofóbico, conforme o t_R obtido (27,80 min). Este peptídeo apresenta duas interações hidrofóbicas a menos que os outros análogos (**Figura 24**), além de não apresentar nenhuma interação de repulsão entre os resíduos de lisina presentes em sua sequência, pois o resíduo de lisina na posição 15 foi substituído por uma leucina.

A melhor relação foi observada entre os análogos A1.2 e A1.3, uma vez que eles se diferem somente por um resíduo, visto que a substituição de uma valina por uma prolina na posição 11 conferiu um caráter ligeiramente menos hidrofóbico para A1.3, conforme pode ser observado pelos t_{RS} de 36,95 e 34,52 min para A1.2 e A1.3, respectivamente. Este resultado está relacionado à natureza da prolina com sua cadeia lateral, pois ela é mais hidrofílica comparada a outros aminoácidos com cadeias laterais alifáticas acíclicas (como a própria valina) pela presença de uma amina (GIBBS; RADZICKA; WOLFENDEN, 1991; MCLAIN et al., 2007). O resíduo prolina foi incluído na porção C-terminal para avaliar a sua influência na atividade biológica do análogo proposto, pois conforme apresentado por Fernandez e colaboradores (2013), este resíduo é importante para a inserção do peptídeo maculatina 1.1 em membranas bacterianas. Este potente peptídeo isolado da rã da espécie *Litoria genimaculata* apresenta atividade antibacteriana, antitumoral e antiviral e a substituição da prolina (localizada na posição 15 de um peptídeo de 21 resíduos) por resíduos hidrofóbicos geraram peptídeos com atividade antibacteriana reduzida.

Os três peptídeos A1.2, A1.3 e A1 compartilham o mesmo agrupamento hidrofóbico, nos quais os resíduos V5, V6, L9, V13 e L16 possibilitam quatro interações hidrofóbicas segundo o esquema i a $i + 3$ / i a $i + 4$, mas diferem por modificações em duas posições. A primeira, no oitavo resíduo, com a substituição do resíduo hidrofílico Ser (em A1) pelo resíduo catiônico Lys em A1.2 e A1.3, conferindo aos dois análogos uma carga +5. A segunda, na posição 11, a serina em A1 foi substituída conforme explicado anteriormente (Val para A1.2 e Pro para A1.3). Os dois resíduos de serina em A1 conferem ao peptídeo A1 o menor t_R dentre esses três análogos, pois suas características hidrofílicas (a propensão a estabelecer ligações

de hidrogênio) estão associadas à uma diminuição do t_R (CHEN; MANT; HODGES, 2002; CLAYDEN et al., 2001; NELSON; COX, 2011).

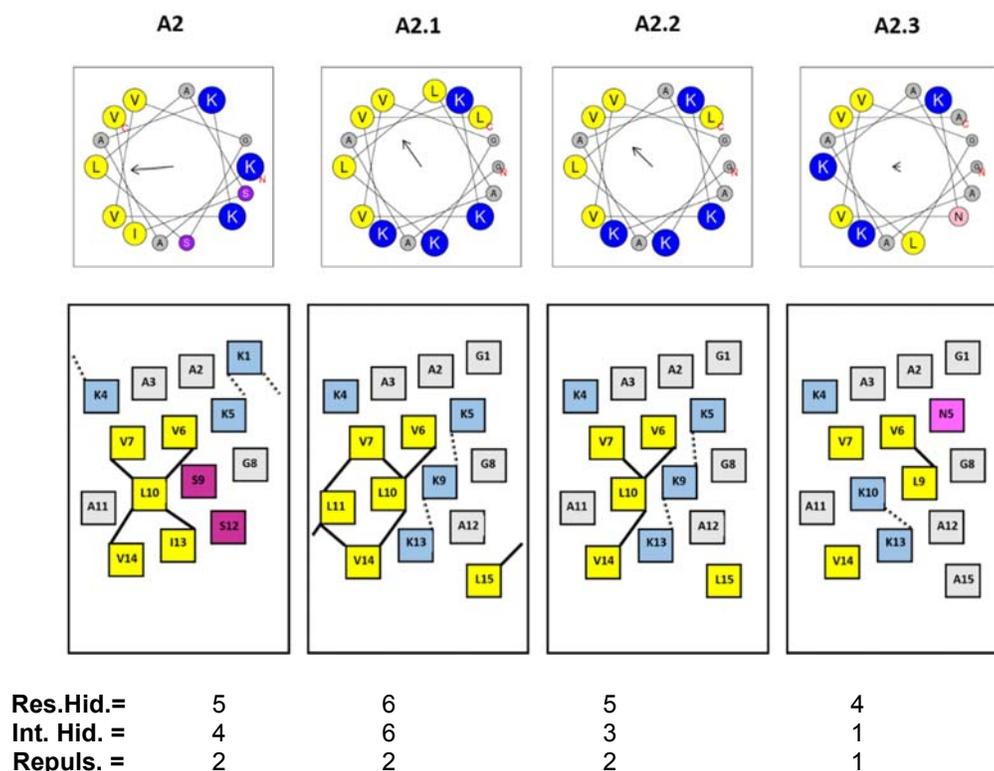


Figura 25. Projeção em hélice (painel superior) e em rede helicoidal (painel inferior) para os peptídeos do segundo conjunto de derivados da ocelatina-P1. Cada aminoácido está representado pela abreviação de seu nome. Os termos indicados na tabela como “Res. Hid.,” “Int. Hid.” e “Int. Rep.” retratam o número de resíduos hidrofóbicos, interações hidrofóbicas e interações repulsivas, respectivamente.

No segundo grupo de análogos, foi observada uma maior correlação para ambos os parâmetros $\langle H \rangle$ e t_R , quando considerados os análogos mais semelhantes A2.3 < A2.2 < A2.1. A presença dos três resíduos de leucina em A2.1 conferiu a este peptídeo uma hidrofobicidade média ~1,32 vezes maior que A2.2 (que difere por uma leucina a menos). Um efeito no tempo de eluição também foi observado, aonde A2.1 eluiu 10 minutos após o análogo A2.2. O análogo A2.3 só possui um resíduo de leucina, sendo o primeiro a eluir (19,75 min). Estas observações concordaram com o

padrão de hidrofobicidade descrito por Chen e colaboradores (2002): Leu > Val > Ala > Gly > Ser > Lys.

O número de interações hidrofóbicas i a $i + 3$ / i a $i + 4$ também se correlacionou ao parâmetro hidrofobicidade, avaliado em termos de $\langle H \rangle$ e t_R . O análogo A2 possui um resíduo a menos que os demais derivados deste conjunto (**Figura 25**), mas ele possui cinco resíduos hidrofóbicos e todos participam das quatro interações hidrofóbicas observadas. Em A2.2 também está presente o mesmo número de resíduos hidrofóbicos, mas somente quatro participam das três interações possíveis. No entanto, como o seu t_R é discretamente maior que o observado para A2, sugere-se que o padrão de eluição de A2 estaria relacionado à presença de dois resíduos de serina, que conferem um caráter mais hidrofílico para este análogo.

Ainda sobre o número de interações hidrofóbicas, a presença do resíduo de leucina na posição 11 em A2.1 permitiu três interações a mais que em A2.2, concordando com o caráter mais hidrofóbico da série de análogos, o que representou uma relação direta com a atividade biológica observada, uma vez que ele foi o único análogo ativo em todos os ensaios realizados. No entanto, o aumento do número de interações hidrofóbicas na face apolar teve um efeito negativo na atividade hemolítica, conforme será apresentado no próximo tópico.

A inversão dos resíduos Lys⁹ e Leu¹⁰ em A2.2 para Leu⁹ e Lys¹⁰ em A2.3 resultou na diminuição do número de interações hidrofóbicas (de 3 para 1), o que justificaria a perda da estrutura em hélice para A2.3. O análogo A2.3 foi o menos hemolítico, mas por outro lado, também foi inativo em todos os ensaios realizados.

O peptídeo Oc-P1 foi o único a apresentar resíduos aniônicos em sua estrutura primária e a posição dos dois resíduos (E e D) podem promover a estabilidade da α -hélice, aspecto destacado na **Figura 26** nas duas interações entre os resíduos de Asp⁴/Lys⁷ e Lys²⁰/Glu²³ que interagem por atrações eletrostáticas nas posições i a $i + 3$ ou i a $i +$

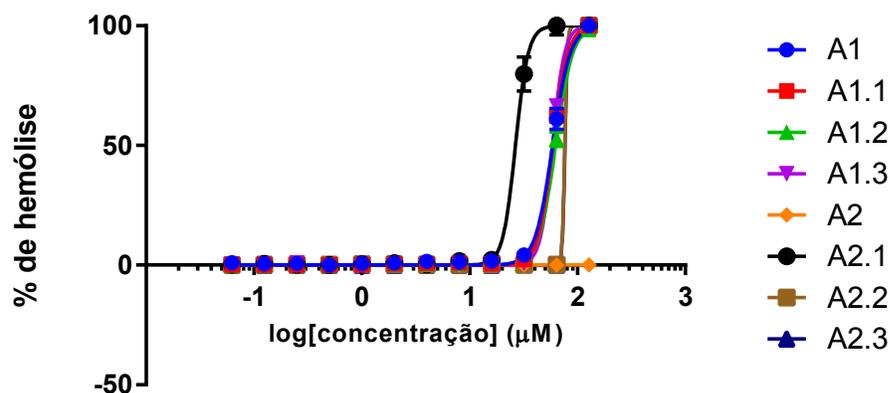


Figura 27. Atividade hemolítica dos diferentes análogos contra hemácias humanas após 1 hora de incubação com os peptídeos. Os dados estão representados sob a forma de média e desvio-padrão.

Segundo Yeaman e Yount (2003), a grandeza $\langle \mu H \rangle$ traduz o grau de anfipaticidade de um peptídeo e está correlacionada à expressão da toxicidade frente à células compostas por membranas lipídicas neutras. No ensaio hemolítico, a discreta variação deste parâmetro nos análogos pertencentes ao primeiro grupo resultou em valores de CH_{50} muito próximos, enquanto que, no segundo grupo, como a variação foi maior, os valores de CH_{50} compreenderam uma faixa entre ~27 a 128 μM .

A análise geral dos oito análogos mostrou que A2.1 foi o mais tóxico, causando 80% de hemólise na concentração de 32 μM , enquanto que os demais análogos passaram a apresentar atividade hemolítica somente a partir de 64 μM (**Figura 27**). No entanto, conforme pode ser observado na **Tabela 11**, todos os análogos foram mais hemolíticos que o peptídeo *template* (ocelatina-P1). Os resultados sugerem que o aumento da atividade hemolítica está relacionado diretamente à hidrofobicidade, o que indica a influência da composição lipídica de membranas no suporte aos efeitos da hidrofobicidade sobre a atividade hemolítica.

A presença de resíduos com cadeias laterais ramificadas (como as dos resíduos Leu e Val, presentes nos análogos avaliados) favorece uma estruturação em solução estabilizada pelas interações hidrofóbicas, promovendo uma aglomeração destas cadeias laterais. Esta organização sob a forma de agregados pode promover a hemólise por meio de um mecanismo coloidal de lises osmóticas, resultado da

formação de poros transmembranares na bicamada lipídica eritrocitária. Isto acontece, por exemplo, no caso do peptídeo melitina, para a qual a atividade hemolítica não é mediada por receptores na membrana do eritrócito (SABERWAL; NAGARAJ, 1994; ZELEZETSKY; TOSSI, 2006; NELSON; COX, 2011).

Quanto à atividade antimicrobiana, os peptídeos foram avaliados *in vitro* contra um conjunto de espécies bacterianas, compreendendo uma espécie de bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e 2 espécies de Gram-negativas (*E. coli* e *K. pneumoniae*), por meio da incubação com os peptídeos em concentrações micro diluídas de forma seriada. Conforme apresentado também na **Tabela 11**, o único análogo para o qual foi detectada a CMI foi peptídeo A2.1.

Tabela 11. Atividades antimicrobianas (CMI) e hemolíticas (CH₅₀) definidas para os análogos de ocelatina-P1.

Peptídeo	CMI (µM) ^a			CH ₅₀ (µM) ^b	IT _{exp}
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>K.pneumoniae</i>		
A1	Inativo	Inativo	Inativo	58,80	0,23
A1.1	Inativo	Inativo	Inativo	59,09	0,231
A1.2	Inativo	Inativo	Inativo	62,72	0,245
A1.3	Inativo	Inativo	Inativo	58,63	0,230
A2	Inativo	Inativo	Inativo	-	1
A2.1	>128 (61%)	>128 (60%)	128 (99%) ^d	26,60	0,208
A2.2	Inativo	Inativo	Inativo	~ 76,33	0,286
A2.3	Inativo	Inativo	Inativo	~ 76,54	0,299

A atividade antimicrobiana (CMI)^a foi determinada como a concentração mínima de peptídeo capaz inibir o crescimento bacteriano espectrofotometricamente observado. Nos casos em que não foi detectada nenhuma atividade antimicrobiana frente à bactéria *E. coli* até a

concentração máxima avaliada (128 μM), o valor de concentração equivalente à 256 μM foi usado para o cálculo do índice terapêutico. ^bA atividade hemolítica (CH_{50}) foi determinada para eritrócitos humanos. ^cÍndice terapêutico teórico definido como $\text{CH}_{50}/\text{CMI}$, parâmetro definido por Jurérit e colaboradores (2009) a partir da avaliação de atividade antibacteriana frente à bactéria *E.coli*. ^{*}Valores retirados de (KING et al., 2005)

A avaliação das atividades observadas para o análogo A2.1 sugere haver dois fatores importantes para a atividade observada: o número de resíduos hidrofóbicos (6) e as interações hidrofóbicas possíveis. Alguns estudos já mostraram que um maior número de interações hidrofóbicas está relacionada à atividade hemolítica de um peptídeo (HUANG et al., 2010; TAN et al., 2014). Em um estudo de Avrahami e colaboradores (2001), foi mostrado que na sequência KXXXKWXXKXXXK (em que X = Val, Ile ou Leu), a substituição de X por Leu resultou em peptídeos hemolíticos e ativos na maioria das bactérias avaliadas, enquanto que os peptídeos gerados a partir de resíduos Val ou Ile nas posições X foram menos hemolíticos, mas também inativos na maioria das bactérias avaliadas.

No entanto, segundo Jiang e colaboradores (2011), as substituições por resíduos de Leu resultaram em peptídeos com propriedades mais desejáveis, como uma atividade hemolítica reduzida seguida de alta atividade antimicrobiana, o que sugere que PAMs de sequências maiores, contendo 26 resíduos, podem apresentar um comportamento diferente de PAMs de sequências menores. A relação entre a hidrofobicidade e permeabilização da membrana também foi examinada por Chen e colaboradores (2007), aonde a tripla substituição de resíduos de Ala por Leu na face apolar de um peptídeo-modelo tornou o análogo mais hidrofóbico e 62,5 vezes mais hemolítico que o primeiro peptídeo.

5.3. AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE

O potencial terapêutico de PAMs reside em sua capacidade de inibir completamente células bacterianas sem exibir citotoxicidade significativamente em relação às células de mamíferos. Assim, o índice terapêutico pode ser definido como a relação entre estes dois parâmetros. Conforme apresentado na **Tabela 11**, para o cálculo do índice terapêutico experimental (IT_{exp}) foi utilizada a concentração de 256 μM para os análogos inativos perante *E. coli*. Este tipo de estimativa,

considerando o dobro da maior concentração avaliada em um ensaio para o cálculo de IT_{exp} foi apresentada recentemente por LEE *et al.*, (2015), em um estudo com análogos de papiliocina, um PAM caracterizado a partir da borboleta *Papilio xuthus*.

Assim, a partir dos valores obtidos para IT_{teor} (**Tabela 10**) é possível observar a discrepância entre os valores experimentais e teóricos, apontando que a grande seletividade prevista não foi alcançada experimentalmente. No caso dos análogos que apresentaram atividade hemolítica, para que o valor de IT_{exp} se aproximasse do IT_{teor} estipulado, seria necessário que a atividade antibacteriana tivesse sido detectada a pelo menos 0,63 μ M. No caso de A2, seu IT_{teor} iria requerer uma atividade antibacteriana mínima de 6,17 μ M, considerando uma atividade hemolítica extrapolada para 256 μ M.

O IT_{teor} aparentemente está relacionado à hidrofobicidade ($\langle H \rangle$), sendo que, segundo Juréic e colaboradores, (2009), quanto maior o parâmetro $\langle H \rangle$, mais baixo seria o seu índice terapêutico. Isso foi observado para o segundo conjunto de análogos (A2), no qual houve redução dos valores de IT_{teor} à medida que a hidrofobicidade dos peptídeos foi aumentada. Isso pode ser explicado pelo número de resíduos de leucina presentes em cada análogo (sendo três resíduos para A2.1; dois resíduos para A2.2 e um somente para A2.3). Em um estudo relacionando o efeito múltiplo de resíduos de Leu e a atividade biológica mostrou que os análogos peptídicos ricos em leucina apresentaram atividade antibacteriana maior que análogos ricos em valina (utilizados na comparação), mas apresentaram atividade citotóxica considerável (QQ *et al.*, 2011). Esta relação, conforme descrito para a atividade hemolítica, foi observada para este conjunto de análogos.

No entanto, não foi possível tecer muitas considerações para o primeiro conjunto de análogos, uma vez que não foi detectada atividade antibacteriana para nenhum dos peptídeos e o estudo das estruturas também não apontou impedimentos para que os peptídeos não fossem ativos. Assim, a análise dos parâmetros observados para o análogo ativo A2.1 sugere que as características deste peptídeo estejam em uma “janela ótima”, onde os valores acima ou abaixo resultem em derivados menos ativos ou menos seletivos. Um outro fator que pode ter prejudicado a atividade antibacteriana dos demais análogos pode ser a auto associação de peptídeos, resultado de um alto caráter hidrofóbico, sendo este um fator limitante da atividade antibacteriana, pois dificultam que o peptídeo atravesse a camada bilipídica

de células procarióticas (FEDER; DAGAN; MOR, 2000; CHEN et al., 2007; JIANG et al., 2014). No entanto, somente um estudo mais aprofundado daria mais informações sobre os mecanismos de ação destes peptídeos.

5.4. ENSAIOS ANTIPARASITÁRIOS

Este é o primeiro trabalho, de nosso conhecimento, que procurou avaliar os efeitos antiparasitários de ocelatinas. No presente trabalho, três espécies foram avaliadas: *Trypanosoma brucei brucei*, *T. cruzi* e *Plasmodium falciparum*, incubadas com diferentes concentrações de Oc-P1 e seus derivados. A **Tabela 12** reúne os resultados obtidos para as concentrações Cl_{50} , e conforme será discutido a seguir, além da Oc-P1, somente o análogo A2.1 foi ativo em todos os ensaios realizados.

Tabela 12. Relação dos efeitos dos peptídeos ativos nos parasitos avaliados.

Peptídeo	Atividade antiparasitária (μ M)				Ativ. citotóxica (μ M) ^c
	<i>T. brucei</i> (f.s.) ^a	<i>T. cruzi</i> (epi) ^b	<i>T. cruzi</i> (ama) ^a	<i>P. falciparum</i> (f.i.) ^a	L6
Oc-P1	4,97	30,34	29,90	26,71	23,15
A2.1	24,66	>200 (67)	105,5	84,32	100(58)
A2.2	~110	Inativo	Inativo	Inativo	Inativo

^a Cl_{50} , concentração de peptídeo responsável pela inibição de 50% da proliferação celular. ^b CL_{50} , concentração de peptídeo que leva à lise celular de 50% dos parasitos presentes na cultura. Siglas: F.s.; formas tripomastigotas sanguíneas; epi, epimastigotas; ama, amastigota; f. i., formas intraeritrocitária. Valores de referência de Cl_{50} : *T. brucei*: pentamidina, 1,67 μ M; *T. cruzi*: nifurtimox, 1,25 μ M; *P. falciparum*: cloroquina, 0,3 μ M.

5.4.1. ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA CONTRA *T. brucei brucei* (FORMAS TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEAS)

A susceptibilidade das formas sanguíneas de *T. brucei brucei* aos peptídeos foi avaliada após três dias de incubação de 10^4 parasitos com os oito análogos de Oc-

P1, além do peptídeo selvagem em concentrações entre 200 a $9,8 \cdot 10^{-2}$ μM . A **Tabela 12** reúne as respostas obtidas no tratamento de *T. brucei brucei* com Oc-P1, A2.1 e A2.2, os peptídeos que foram ativos na faixa de concentração avaliada, enquanto que a **Figura 28** retrata a curva de dose-resposta para cada peptídeo.

Os peptídeos Oc-P1 e A2.1 foram os mais eficazes, pois provocaram 95% de inibição do crescimento dos parasitos na concentração de 100 μM , enquanto que A2.2 provocou ~16% de inibição na mesma concentração. O análogo 2.2, que difere de A2.1 pela substituição de um resíduo de leucina por uma alanina na posição 11, apresentou uma IC_{50} estimada de ~110 μM , sugerindo que a substituição de um grupo isobutila na leucina por um grupo metila (alanina) conferiu uma menor lipofilicidade ao análogo, uma vez que sua atividade foi reduzida em 4,4 vezes, comparada à A2.1.

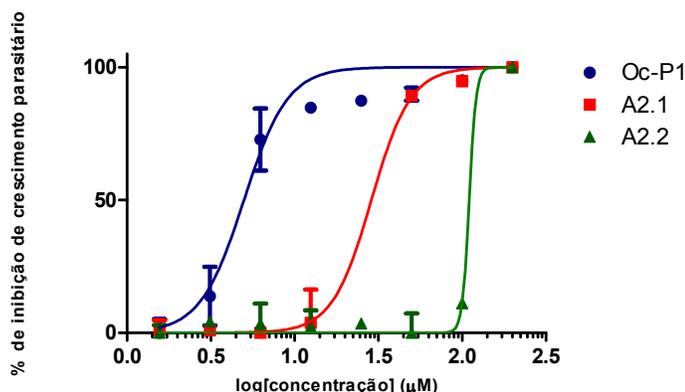


Figura 28. Atividade inibitória sobre o crescimento parasitário dos PAMs Oc-P1 e A2.1 contra o protozoário *T. brucei brucei* (formas sanguíneas) após 72h de incubação com os peptídeos. Cada ponto está representado sob a forma de média e desvio-padrão.

Importante observar que o análogo A2.3, um dos peptídeos inativos na faixa de concentração avaliada, apresenta somente um resíduo de leucina a menos que A2.2, conferindo a ele uma redução no parâmetro $\langle H \rangle$ de 0,289 para 0,223, sugerindo ser este parâmetro muito importante para a atividade tripanocida. No trabalho de Harrington e colaboradores (2010), foi investigado o efeito da alteração da hidrofobicidade em análogos gerados a partir da sequência N-terminal da proteína apolipoteína humana relacionada com haptoglobina (denominada no estudo como SPH-1 – *Small Hydrophobic Peptide*) na atividade tripanocida em formas sanguíneas de *T. brucei*. A redução do núcleo hidrofóbico de SPH-1, pela deleção de um resíduo

de leucina na porção C-terminal resultou em uma redução de cinco vezes da atividade antiparasitária, sugerindo que a hidrofobicidade do peptídeo atua mediando sua interação com a membrana do parasito.

Com PAMs de anuros, foi realizada a avaliação da atividade tripanocida também em formas sanguíneas de *T. brucei brucei*, realizada por Roelans e colaboradores (2013), com peptídeos isolados a partir da secreção de *S. tropicalis*. Os resultados obtidos para os treze peptídeos caracterizados mostraram desde compostos muito ativos como, por exemplo, os CPF-St4 e CPF-St5 (com uma concentração capaz de reduzir a viabilidade parasitária em 95%, CL_{95} , de 2-4 e 1-2 μM , respectivamente), como também peptídeos com uma CL_{95} entre 8 a 256 μM (como o CPF-St6, a magainina-St1, entre outros). O período de incubação utilizado, de 30 min foi mais curto que o utilizado no presente trabalho (72 h), mas foi possível observar, ao se comparar os dois peptídeos mais homólogos XPF-St1 e XPF-St6 (que diferem somente em duas posições: Val⁶→Ile⁶ e Glu¹⁹→Asp¹⁹), que os parâmetros momento hidrofóbico e hidrofobicidade podem estar relacionados à atividade antiparasitária, na qual o peptídeo XPF-St1 ($\langle H \rangle = 0,438$ e $\langle \mu H \rangle = 0,449$), apresentou uma CL_{95} de 2-64 μM , enquanto que XPF-St6, mais hidrofóbico ($\langle H \rangle = 0,456$ e $\langle \mu H \rangle = 0,473$) foi mais eficaz, com um CL_{95} de 2-4 μM .

Para a primeira série de análogos, no entanto, não foi possível estabelecer um determinante para a atividade, pois nenhum dos peptídeos foi ativo contra esse parasito.

5.4.2. ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA CONTRA *T. cruzi* (FORMAS AMASTIGOTAS)

Antes de investigar os efeitos dos peptídeos em formas intracelulares de *T. cruzi*, foram testados primeiramente os possíveis efeitos citotóxicos dos peptídeos nas células hospedeiras. Células da cultura L6 (células musculares esqueléticas de rato, modelo hospedeiro das formas amastigotas de *T. cruzi*) foram tratadas com os peptídeos por três dias. Conforme apresentado na **Figura 29** (para a Oc-P1) e na **Tabela 12**, os ensaios de viabilidade celular sobre a linhagem L6 mostraram que Oc-P1, assim como A2.1, são peptídeos citotóxicos. Os demais peptídeos inibiram somente em até 10% a viabilidade celular na faixa de concentrações avaliadas.

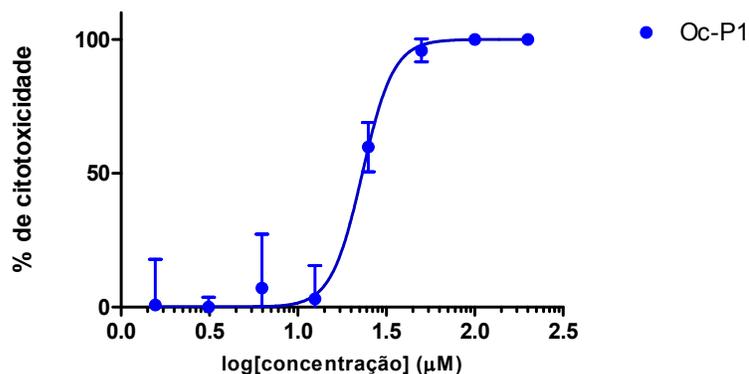


Figura 29. Atividade citotóxica do PAM Oc-P1 em células L6 após três dias de incubação. Cada ponto está representado sob a forma de média e desvio-padrão.

No ensaio propriamente dito contra as formas amastigotas de *T. cruzi* em células L6, foi detectada a atividade inibitória somente para os dois peptídeos, Oc-P1 e A2.1, sendo que novamente a Oc-P1 foi a mais eficaz reduzindo a proliferação celular em 100% a 50 µM, enquanto que na mesma concentração foi observada 37% de inibição promovida pelo análogo A2.1. Após essa triagem inicial, o ensaio foi repetido somente para os dois peptídeos ativos, uma vez que os outros sete análogos também não apresentaram atividade tripanocida dentro da faixa de concentração avaliada (100 a 3,125 µM). No segundo ensaio, a avaliação da atividade antiparasitária foi ampliada até a concentração de 200 µM, sendo assim possível determinar o valor de CI_{50} para o A2.1 (**Tabela 12**). A **Figura 30** retrata o padrão de inibição para Oc-P1 e A2.1.

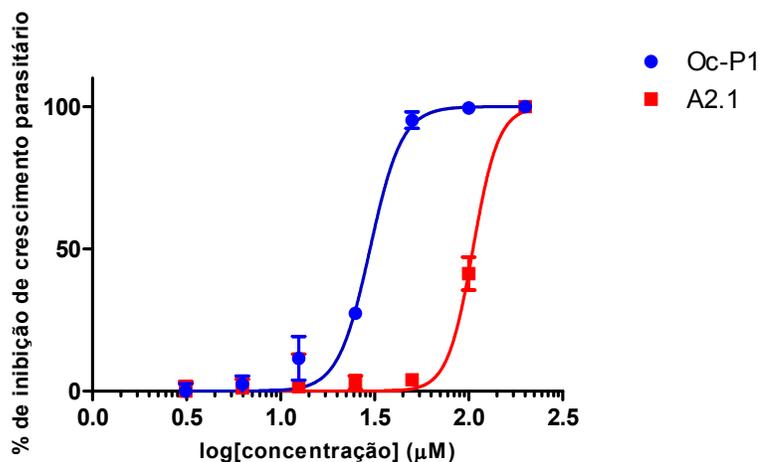


Figura 30. Atividade inibitória sobre o crescimento parasitário dos PAMs Oc-P1 e A2.1 contra o protozoário *T. cruzi* (forma amastigota) após cinco dias de incubação com os peptídeos. Cada ponto está representado sob a forma de média e desvio-padrão.

Na literatura, faltam trabalhos sobre o efeito de PAMs isolados de anuros sobre formas amastigotas de *T. cruzi*, onde as atividades antiparasitárias relatam os efeitos dos PAMs sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas. Mas em se tratando de outros PAMs, Adade e colaboradores (2013) descreveram recentemente a atividade do peptídeo melitina sobre as formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. Contra as formas amastigotas após 72 h de incubação, foi detectada uma concentração inibitória CI_{50} de 0,053 μM . No entanto, embora a melitina não tenha sido citotóxica na concentração de 0,35 μM , como ela é extremamente hemolítica (CH_{50} de 1,75 μM), isso limitaria sua utilização como agente terapêutico (YAN et al., 2003). Comparando os resultados, os peptídeos Oc-P1 e A2.1 foram menos eficazes e os resultados obtidos com os dois ensaios (avaliação da atividade citotóxica em células L6 e a inibição relativa de formas amastigotas de *T. cruzi*) revelam que Oc-P1 e A2.1 também não apresentam atividade seletiva, pois houve uma sobreposição entre as faixas de concentrações antiparasitárias efetivas e as citotóxicas. No caso dos análogos restantes, como nenhum peptídeo apresentou efeito algum, não foi possível tecer considerações sobre os parâmetros determinantes da atividade tripanocida. No entanto, a ausência de toxicidade observada em células L6 sugere que, embora estas moléculas não sejam agentes antiparasitários, esta característica favorável pode torná-los compostos promissores para o desenvolvimento de outros análogos, de forma a promover sua especificidade.

5.4.3. ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA CONTRA *T. cruzi* (FORMAS EPIMASTIGOTAS)

A Oc-P1 e os análogos A2.1 e A2.2 foram incubados por 72 h em culturas contendo formas epimastigotas. Neste ensaio, o análogo A2.1, o único análogo ativo, causou a inibição celular em 67% na concentração mais alta avaliada (200 µM), mostrando que esta forma parasitária foi a menos suscetível a sua ação. A Oc-P1 continuou sendo o peptídeo mais eficaz e apresentou uma CI_{50} de 30,34 µM, valor próximo à concentração tripanocida detectada no ensaio anterior (**Tabela 12**).

Os resultados obtidos mostraram que os dois estágios de desenvolvimento de *T. cruzi* avaliados no presente trabalho foram diferentemente suscetíveis aos peptídeos testados, aonde as formas epimastigotas (referentes ao estágio proliferativo no hospedeiro invertebrado) foram menos sensíveis ao tratamento que as formas amastigotas (formas infectivas e proliferativas). Os resultados podem ser também aqui justificados pela composição de membrana, em função do estágio do parasito, onde as formas epimastigotas apresentam a superfície menos negativa dentre os diferentes estágios de desenvolvimento de *T. cruzi*, enquanto os amastigotas têm uma superfície mais negativa que estas formas, o que poderia favorecer a interação entre os peptídeos catiônicos avaliados (SOUTO-PADRON, 2002). No entanto, ainda precisa ser considerado que o acesso aos parasitos intracelulares foi facilitado pela atividade citotóxica de Oc-P1- e A2.1 frente às células hospedeiras utilizadas. Os valores de CC_{50} , menores que as concentrações obtidas no ensaio contra formas amastigotas, sugerem que a morte dos parasitos também foi resultado da inibição da viabilidade celular da linhagem L6, o que comprometeria este estágio parasitário.

Avaliando as duas espécies de tripanossomatídeos, nossa análise sugere haver diferenças nas suscetibilidades deste parasitos aos peptídeos avaliados. De acordo com Souto-Padrón (2002), os tripanossomatídeos apresentam uma carga de superfície negativa cujas propriedades e valores são dependentes da espécie, sendo assim, organizados na seguinte ordem: *T. cruzi* > *T. lewisi* > *T. vivax* > *T. congolense* > *T. rhodesiense*, *T. gambiense*, *T. brucei* e *T. evansi*.

As formas sanguíneas de *T. brucei* se diferem dos outros tripanossomatídeos, por apresentarem predominantemente o componente colesterol (incorporado a partir do meio) em sua membrana celular (DE SOUZA; RODRIGUES, 2009). Com isso, podemos sugerir que a espécie *T. brucei brucei* foi mais sensível à ação dos peptídeos

testados porque eles, por serem consideravelmente hemolíticos, apresentam afinidade a este componente que está presente também em membranas eritrocitárias.

5.4.4. ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA CONTRA *P. falciparum* (FORMAS INTRAERITROCITÁRIAS)

A influência de Oc-P1 e de seus oito derivados sobre as formas intraeritrocitárias de *P. falciparum* foi avaliada após incubação por 24 horas. O CI_{50} só foi determinado para Oc-P1 (**Figura 31**), sendo igual a 26,71 μ M. Dentre os derivados sintéticos de Oc-P1, somente o peptídeo A2.1 foi detectada atividade antiparasitária, sendo que na concentração de 200 μ M foi observada redução de 96% na viabilidade parasitária

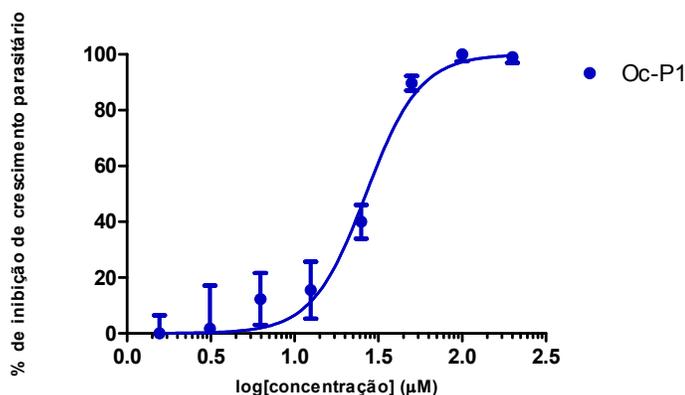


Figura 31. Atividade inibitória sobre o crescimento parasitário do PAM Oc-P1 em formas intraeritrocitárias de *P. falciparum* após 24h de incubação. Cada ponto está representado sob a forma de média e desvio-padrão.

Um tema comum avaliado em diversos estudos envolvendo a atividade antimalárica trata da capacidade de um PAM de diferenciar entre membranas de eritrócitos infectados e eritrócitos saudáveis, de forma que sua ação deve ser a mais seletiva possível (BELL, 2011; PRETZEL et al., 2013). Especula-se que, devido às diferenças na composição lipídica de membranas de eritrócitos parasitados, resultado da redução do teor de esfingomiélna em até 47% com relação à células não infectadas e a proporção de colesterol/fosfolipídios que também é reduzida em 55%, aumentem a fluidez e a permeabilidade de células parasitadas aos PAMs catiônicos (MAGUIRE; SHERMAN, 1990; MOR, 2009).

Conforme os resultados obtidos, o peptídeo A2.1 é mais tóxico na presença de eritrócitos não infectados, aonde sua concentração hemolítica foi menor que a concentração na qual foi detectada o efeito antiplasmódico. O efeito do aumento da hidrofobicidade, avaliado em derivados da DRS-S4 mostraram que, embora os análogos tenham apresentado atividade antimalárica, também foi associado o aumento no grau de hemólise, indicando a ausência de discriminação entre eritrócitos infectados e não infectados (DAGAN et al., 2002; EFRON et al., 2002). Para a Oc-P1, foi observado o contrário, aonde ela apresentou uma atividade mais direcionada aos eritrócitos parasitados, embora, dentre os peptídeos antiplasmódicos isolados de anuros, a Oc-P1 tenha apresentado atividade inferior quando comparado às dermaseptinas DRS-S3 e DRS-4, peptídeos selvagens que, no ciclo eritrocítico, mostraram atividade inibitória abaixo de 2 μM (GHOSH et al., 1997; GAIDUKOV; FISH; MOR, 2003). Boman e colaboradores (1989) mostraram que a incubação de *P. falciparum* com magainina-2 levou a inibição de 90% dos parasitos em uma concentração próxima a 100 μM . Na mesma concentração, a Oc-P1 provocou a inibição de <99% da cultura avaliada, mostrando que ela é tão efetiva quanto a magainina-2.

6. CONCLUSÕES

Os relatos de PAMs com atividade antiparasitária e antimicrobiana motivam a constante investigação de novos compostos e a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos, buscando fornecer novas informações que direcionem o desenvolvimento de novas drogas.

O principal objetivo deste trabalho foi propor novos análogos de Oc-P1, por meio de modificações em diversos parâmetros como anfipaticidade, hidrofobicidade, comprimento da cadeia peptídica e carga líquida, buscando avaliar a influência destes parâmetros na atividade biológica. Além disso, foram utilizadas ferramentas descritas na literatura para auxiliar na sugestão de estruturas para peptídeos ativos, como o SPLIT 4.0 e o *Therapeutic Índice estimator for frog-derived helical antimicrobial peptides*. Nossas análises mostraram que as informações geradas por estes algoritmos podem ser aplicadas no desenho racional de peptídeos, mas que no entanto, elas precisam ser validadas por meio de ensaios biológicos, pois as estimativas fornecidas podem não condizer com os resultados biológicos obtidos.

Os nossos resultados mostraram também que a hidrofobicidade média e o momento hidrofóbico por si só não podem ser usados como ferramentas gerais na predição da atividade antimicrobiana de um peptídeo. Estes parâmetros são úteis apenas quando são comparados os análogos derivados do mesmo peptídeo, gerados a partir de pequenas modificações (NIELSEN et al., 2007), conforme também observado em nosso trabalho.

Dentre os análogos avaliados, somente o peptídeo A2.1 apresentou atividade em todos os ensaios realizados. No entanto, foi constatado que este análogo também é bastante citotóxico, sendo que sua faixa de concentração ativa contra os patógenos avaliados é acima das concentrações citotóxicas. Assim, para que este análogo seja interessante para ensaios *in vivo*, é necessário melhorar sua seletividade, por meio de outras substituições.

Embora o índice terapêutico teórico obtido para cada peptídeo não reflita o resultado experimental, acreditamos que a inatividade observada pode ter sido gerada a partir da dimerização dos análogos avaliados, prejudicando a atividade antimicrobiana por dificultar o acesso dos peptídeos às membranas de células procarióticas (JIANG et al., 2014). Também consideramos o efeito relacionado a uma

possível sensibilidade provocada por algum suplemento presente nos meios de cultura utilizados, sendo este problema já relatado na literatura (EGGIMANN et al., 2015; LÖFGREN et al., 2008). Estas duas possibilidades precisam ser investigadas. A ausência de toxicidade destes análogos sugere que, embora estas moléculas não sejam particularmente agentes antibacterianos e antiparasitários, eles podem ser utilizados como *templates* para o desenho de novos peptídeos.

E finalmente, a identificação da atividade antiparasitária do peptídeo Oc-P1 reforça a complexidade do arsenal químico presente nas secreções de anuros. Em um trabalho recente de Lemos e colaboradores (2013) foi reportado o estudo de tripanossomatídeos do gênero *Trypanosoma* isolados de *L. ocellatus*, o que nos mostra que tais peptídeos podem ser importantes para que o animal seja capaz de modular sua resistência às infecções por parasitos presentes em seu meio ambiente.

Assim, mostramos que a alteração de alguns parâmetros físico-químicos influencia na eficiência da atividade antimicrobiana e antiparasitária, incluindo na expressão da citotoxicidade, e que isso se aplica também às modificações feitas em um único resíduo.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Propor o desenho racional de outros peptídeos, mantendo as modificações que gerou o análogo ativo A2.1, de forma a torná-lo mais específico para organismos patogênicos, modulando sua natureza lítica em células de mamíferos;
- ✓ Identificar as características presentes nos demais análogos que contribuíram para a inatividade observada;
- ✓ Avaliar a ação dos peptídeos ativos em outras espécies de bactérias, principalmente em linhagens resistentes;
- ✓ Realizar novos ensaios com outras espécies de parasitos, incluindo outras formas celulares, para avaliar o efeito dos análogos em função do estágio do ciclo de vida parasitário e
- ✓ Determinar a estrutura tridimensional do análogo A2.1, inclusive para a Oc-P1, a fim de obter detalhes estruturais e relacioná-los às atividades biológicas observadas.

8. REFERÊNCIAS

- ABBASSI, F. et al. Isolation, characterization and molecular cloning of new temporins from the skin of the North African ranid *Pelophylax saharica*. **Peptides**, v. 29, n. 9, p. 1526–1533, 2008.
- ABBASSI, F. et al. Antibacterial and leishmanicidal activities of temporin-SHd, a 17-residue long membrane-damaging peptide. **Biochimie**, v. 95, n. 2, p. 388–399, 2013.
- ADADE, C. M. et al. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v. 69, p. 227–239, 2013.
- AMICHE, M.; LADRAM, A.; NICOLAS, P. A consistent nomenclature of antimicrobial peptides isolated from frogs of the subfamily Phyllomedusinae. **Peptides**, v. 29, n. 11, p. 2074–2082, 2008.
- ANDREU, D. et al. Solid-phase synthesis of cecropin A and related peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, p. 6475–6479, 1983.
- ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides : An overview. **Biopolymers**, v. 47, n. 415-433, 1998.
- AOKI, W.; UEDA, M. Characterization of antimicrobial peptides toward the development of novel antibiotics. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 8, p. 1055–1081, 2013.
- APPELT, C. et al. Design of antimicrobial compounds based on peptide structures. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 8, p. 2334–2337, 2007.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Cleavage, Deprotection, and Isolation of Peptides after Fmoc Synthesis. [s.d.], **Technical Bulletin**, 1998.
- AUBAGNAC, J.-L. et al. Quality control of solid-phase synthesis by mass spectrometry. In: ENGLISH, B. L. (Ed.). **Methods in Molecular Biology - Combinatorial Library , Methods and Protocols**. [s.l.] Human Press, v. 201p. 15-22, 2002.
- AVRAHAMI, D.; OREN, Z.; SHAI, Y. Effect of multiple aliphatic amino acids substitutions on the structure, function, and mode of action of diastereomeric membrane active peptides. **Biochemistry**, v. 40, n. 42, p. 12591–12603, 2001.
- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1543–1575, 2013.
- BARANY, G.; MERRIFIELD, R. B. A new amino protecting group removable by reduction. Chemistry of the dithiasuccinoyl (Dts) function. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, p. 7363–7365, 1977.
- BELL, A. Antimalarial peptides: the long and the short of it. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 25, p. 2719–2731, 2011.

BENOITON, N. L. **Chemistry of Peptide Synthesis**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.

BERA, A. et al. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 23–35, mar. 2003.

BISWAS, K. M.; DEVIDO, D. R.; DORSEY, J. G. Evaluation of methods for measuring amino acid hydrophobicities and interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 637–655, 2003.

BLONDELLE, S. E.; LOHNER, K.; AGUILAR, M. I. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: Determination and biological specificity. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1462, n. 1-2, p. 89–108, 1999.

BOMAN, H. G. et al. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. **FEBS Letters**, v. 259, n. 1, p. 103–106, 1989.

BOSC, D. et al. Introduction of methionine mimics on 3-arylthiophene: influence on protein farnesyltransferase inhibition and on antiparasitic activity. **Med Chem Comm**, v. 4, p. 1034, 2013.

BRAND, G. D. et al. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity without cytotoxicity to mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 51, p. 49332–49340, 2002.

BRAND, G. D. et al. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 347, p. 739–746, 2006.

BRAND, G. D. et al. The skin secretion of the amphibian *Phyllomedusa nordestina*: A source of antimicrobial and antiprotozoal peptides. **Molecules**, v. 18, p. 7058-7070, 2013.

BROGDEN, N. K.; BROGDEN, K. A. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 3, p. 217–225, 2011.

BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592–2597, 1996.

CALABRESE, E. J. Hormesis: Changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 511, p. 181–189, 2002.

CARPINO, A. Elimination of Nitrogen from 1,1-Disubstituted-2-arenesulfonhydrazides¹⁻⁴. **J. Am. Chem. Soc**, v. 572, p. 1–5, 1957.

CARPINO, L. A. The 9-fluorenylmethyloxycarbonyl family of base-sensitive amino-protecting groups. **Accounts of Chemical Research**, v. 20, p. 401–407, 1987.

CASTRO, M. S.; CILLI, E. M.; FONTES, W. Combinatorial synthesis and directed evolution applied to the production of alpha-helix forming antimicrobial peptides analogues. **Current Protein & Peptide Science**, v. 7, n. 6, p. 473–478, 2006.

CHADBOURNE, F. L. et al. Studies on the antileishmanial properties of the antimicrobial peptides temporin A, B and 1Sa. **Journal of Peptide Science**, v. 17, n. 11, p. 751–755, 2011.

CHANDRUDU, S.; SIMERSKA, P.; TOTH, I. Chemical methods for peptide and protein production. **Molecules**, v. 18, p. 4373–4388, 2013.

CHEN, Y. et al. Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of α -helical antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1398–1406, 2007.

CHEN, Y.; MANT, C. T.; HODGES, R. S. Determination of stereochemistry stability coefficients of amino acid side-chains in an amphipathic α -helix. **Journal of Peptide Research**, v. 59, n. 1, p. 18–33, 2002.

CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**. 1a. ed. [s.l.] Oxford University Press Inc., New York, 2001.

CONCEIÇÃO, K. et al. Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 27, n. 12, p. 3092–3099, 2006.

CONLON, J. M. et al. Purification and properties of laticceptin, an antimicrobial peptide from skin secretions of the South American frog *Leptodactylus laticeps*. **Protein and Peptide Letters**, v. 13, n. 4, p. 411–415, 2006.

CONLON, J. M. Clinical applications of amphibian antimicrobial peptides. **Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 62–72, 2011a.

CONLON, J. M. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 13, p. 2303–2315, 2011b.

CONLON, J. M.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. Antimicrobial peptides from ranid frogs: taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, v. 1696, n. 1, p. 1–14, 2004.

DAGAN, A. et al. *In vitro* antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 1059–1066, 2002.

DATHE, M. et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. **FEBS Letters**, v. 403, n. 2, p. 208–212, 1997.

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 71–87, 1999.

DE MESQUITA, M. L. et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 783–787, 2005.

DE OLIVEIRA, S.; SALDANHA, C. An overview about erythrocyte membrane. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 44, n. 1, p. 63–74, 2010.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol biosynthesis pathway as target for Anti-trypanosomatid drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, p. 1–19, 2009.

DELGADO, M. et al. Neuropeptides kill African trypanosomes by targeting intracellular compartments and inducing autophagic-like cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 3, p. 406–416, 2009.

DENNISON, S. R. et al. Amphiphilic alpha-helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. **Protein and Peptide Letters**, v. 12, p. 31–39, 2005.

DESJARDINS, R. E. et al. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 16, n. 6, p. 710–718, 1979.

DNDI. **Contexto - Doenças Negligenciadas**. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/contexto.html>>. Acesso em: 8 fev. 2015.

DOURADO, F. S. et al. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus siphax*. **Toxicon**, v. 50, n. 4, p. 572–80, 2007.

DUQUE, T. L. A. et al. Autophagic balance between mammals and protozoa: A molecular, biochemical and morphological review of apicomplexa and trypanosomatidae infections. In: **Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?** [s.l.: s.n.], Dr. Yannick Bailly (Ed.), ISBN: 978-953-51-1062-0, InTech, DOI: 10.5772/54970. Available from: <http://www.intechopen.com/books/autophagy-a-double-edged-sword-cell-survival-or-death/autophagic-balance-between-mammals-and-protozoa-a-molecular-biochemical-and-morphological-review-of->, 2013.

EATON, P. et al. Anti-leishmanial activity of the antimicrobial peptide DRS 01 observed in *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 483–490, 2014.

EBENHAN, T. et al. Antimicrobial peptides: Their role as infection-selective tracers for molecular imaging. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–15, 2014.

EFRON, L. et al. Direct interaction of dermaseptin S4 aminoheptanoyl derivative with intraerythrocytic malaria parasite leading to increased specific antiparasitic activity in culture. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 24067–24072, 2002.

EGGIMANN, G. et al. The role of phosphoglycans in the susceptibility of *Leishmania mexicana* to the temporin family of anti-microbial peptides. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2775–2785, 2015.

EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 140–144, 1984.

EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 11–28, 1999.

FEDER, R.; DAGAN, A.; MOR, A. Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 4230–4238, 2000.

FERNANDEZ, D. I. et al. Proline facilitates membrane insertion of the antimicrobial peptide maculatin 1.1 via surface indentation and subsequent lipid disordering. **Bioophysical Journal**, v. 104, n. 7, p. 1495–1507, 2013.

FIECK, A. et al. *Trypanosoma cruzi*: Synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to *T. cruzi* and potential bacterial hosts. **Experimental Parasitology**, v. 125, n. 4, p. 342–347, 2010.

FIELDS, G. B. Methods for removing the Fmoc group in Peptide synthesis protocols, **Methods in Molecular Biology**, v. 35, p 17-27, 1994.

FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, p. 37–51, 2012.

FRANÇA, R. R. F. et al. Potent inhibitors of the enzyme sterol 14 α -demethylase against *Trypanosoma cruzi*. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1483–1516, 2014.

FROMENTIN, Y. et al. Synthesis of novel guttiferone A derivatives: *In vitro* evaluation toward *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania donovani*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, p. 284–294, 2013.

FROST, D. **Amphibian Species of the World: an Online Reference**. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.htm>>. Acesso em: 3 fev. 2015.

GAIDUKOV, L.; FISH, A.; MOR, A. Analysis of membrane-binding properties of dermaseptin analogues: relationships between binding and cytotoxicity. **Biochemistry**, v. 42, n. 44, p. 12866–12874, 2003.

GAUTAM, A. et al. Hemolytik: A database of experimentally determined hemolytic and non-hemolytic peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 444–449, 2014.

GHOSH, J. K. et al. Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 31609–31616, 1997.

GIBBS, P. R.; RADZICKA, A.; WOLFENDEN, R. The anomalous hydrophilic character of proline. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. ref 2, p. 4714–4715, 1991.

GOLDSTON, A. M.; POWELL, R. R.; TEMESVARI, L. A. Sink or swim: Lipid rafts in parasite pathogenesis. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 417–426, 2012.

GÓNGORA-BENÍTEZ, M.; TULLA-PUCHE, J.; ALBERICIO, F. Handles for Fmoc solid-phase synthesis of protected peptides. **ACS Combinatorial Science**, v. 15, p. 217–228, 2013.

GRAY, I. C.; BARNES, M. R. Amino acid properties and consequences of substitutions. **Bioinformatics for Geneticists**, v. 4, p. 289–304, 2003.

GRELLIER, P. et al. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47078–47086, 2001.

GRUSZYNSKI, A. E. et al. Surface coat remodeling during differentiation of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 27, p. 24665–24672, 2003.

GUERRERO, E. et al. Role of positional hydrophobicity in the leishmanicidal activity of magainin 2. v. 48, n. 8, p. 2980–2986, 2004.

GUHA-NIYOGI, A; SULLIVAN, D. R.; TURCO, S. J. Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. **Glycobiology**, v. 11, n. 4, p. 45R–59R, 2001.

GUILHELMELLI, F. et al. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 353, 2013.

GUILLIER, F.; ORAIN, D.; BRADLEY, M. Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry. **Chemical Reviews**, v. 100, p. 2091–2157, 2000.

GUTTE, B.; MERRIFIELD, R. B. Chemistry and metabolism of macromolecules: The synthesis of ribonuclease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 246, p. 1922–1941, 1971a.

GUTTE, B.; MERRIFIELD, R. B. MACROMOLECULES: The synthesis of ribonuclease. p. 1922–1941, 1971b.

GWADZ, R. W. et al. Effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 9, p. 2628–2633, 1989.

HANCOCK, R. E. W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, p. 156–164, 2001.

HANCOCK, R. E. W.; PATRZYKAT, A. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: From natural to novel antibiotics. **Current Drug Targets. Infectious Disorders**, v. 2, n. 1, p. 79–83, mar. 2002.

HARRINGTON, J. M. et al. The plasma membrane of bloodstream-form African trypanosomes confers susceptibility and specificity to killing by hydrophobic peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 28659–28666, 2010.

HERNANDEZ, C. et al. Functional and structural damage in *Leishmania mexicana* exposed to the cationic peptide dermaseptin. **European Journal of Cell Biology**, 1992.

HEYER, R.; MIJARES, A.; BALDO, D. *Leptodactylus labyrinthicus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: **e.T57137A11589949**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T57137A11589949.en>>.

HSIAO, L. L. et al. Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Biochemical Journal**, v. 274, n. Pt 1, p. 121–132, 1991.

HUANG, C. M.; CHEN, H. C.; ZIERDT, C. H. Magainin analogs effective against pathogenic protozoa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 9, p. 1824–1826, 1990.

HUANG, J.-F. et al. Structure-guided de novo design of α -helical antimicrobial peptide with enhanced specificity. **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 243–257, 2010.

HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. **Protein and Cell**, v. 1, n. 2, p. 143–152, 2010.

HURWITZ, I. et al. A paratransgenic strategy for the control of chagas disease. **Psyche**, v. 2012, 2012.

IOSET JR, BRUN R, WENZLER T, KAISER M, Y. V. **Drug screening for kinetoplastid diseases: A training manual for screening in neglected diseases**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.dndi.org/images/stories/pdf_scientific_pub/2009/kinetoplastid_drug_screening_manual_final.pdf>.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

JIANG, Z. et al. Rational design of α -helical antimicrobial peptides to target Gram-negative pathogens, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Utilization of charge, “specificity determinants,” total hydrophobicity, hydrophobe type and location as design parameters to improve the therapeutic ratio. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 77, n. 4, p. 225-240, 2011.

JIANG, Z. et al. “Specificity determinants” improve therapeutic indices of two antimicrobial peptides piscidin 1 and dermaseptin S4 against the Gram-negative pathogens *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 4, p. 366–391, 2014.

JURETIĆ, D. et al. Preference functions for prediction of membrane-buried helices in integral membrane proteins. **Computers & Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 279–294 1998a.

JURETIĆ, D. et al. Protein transmembrane structure: recognition and prediction by using hydrophobicity scales through preference functions. In: PÁRKÁNYI, C. (Ed.). **Theoretical and Computational Chemistry**. v. 5, [s.l.] Elsevier Science, p. 405-445, 1998b.

JURETIĆ, D. et al. Computational design of highly selective antimicrobial peptides. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 12, p. 2873–2882, 2009.

JURETIĆ, D. et al. Knowledge-based computational methods for identifying or designing novel, non-homologous antimicrobial peptides. **European Biophysics Journal**, v. 40, n. 4, p. 371–385, 2011.

JURETIĆ, D.; JERONČIĆ, A.; ZUCIĆ, D. Sequence Analysis of Membrane Proteins with the Web Server SPLIT. **Croatica Chemica Acta**, v. 72, n. 4, p. 975–997, 1999.

KAUR, H.; GARG, A.; RAGHAVA, G. P. S. PEPstr: A *de novo* method for tertiary structure prediction of small bioactive peptides. **Protein and Peptide Letters**, v. 14, n. 7, p. 626–631, 2007.

KAWANO, D. F. **Síntese de derivados do fator de agregação plaquetária imobilizados em resina e identificação do correspondente receptor em *Trypanosoma cruzi***. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KIM, S.; KIM, S. S.; LEE, B. J. Correlation between the activities of alpha-helical antimicrobial peptides and hydrophobicities represented as RP HPLC retention times. **Peptides**, v. 26, p. 2050–2056, 2005.

KIM, Y. S.; CHA, H. J. Disperse distribution of cationic amino acids on hydrophilic surface of helical wheel enhances antimicrobial peptide activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 216–23, 2010.

KING, D. S.; FIELDS, C. G.; FIELDS, G. B. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 36, n. 16, p. 255–266, 1990.

KING, J. D. et al. Pentadactylin: an antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v. 141, n. 4, p. 393-397, 2005.

KING, J. D. et al. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the Caribbean frog, *Leptodactylus validus* (Anura: Leptodactylidae). **Peptides**, v. 29, n. 8, p. 1287–92, 2008.

KIYOTA, T.; LEE, S.; SUGIHARA, G. Design and synthesis of amphiphilic α -helical model peptides with systematically varied hydrophobic - hydrophilic balance and their interaction with lipid and bio membranes. **Biochemistry**, v. 35, n. 96, p. 13196-13204, 1996.

KÖNIG, E.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; SHAW, C. The diversity and evolution of anuran skin peptides. **Peptides**, v. 63, p. 96–117, 2015.

KRESGE, N.; SIMONI, R. D.; HILL, R. L. The solid phase synthesis of ribonuclease A by Robert Bruce Merrifield. **ChemInform**, v. 37, p. 0–3, 2006.

KRUGLIAK, M. et al. Antimalarial activities of dermaseptin S4 derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2442–2451, 2000.

KÜCKELHAUS, S. A. S. et al. Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Amphibia). **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 1, p. 11–16, 2009.

KULKARNI, M. M. et al. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. **Molecular Microbiology**, v. 62, p. 1484–1497, 2006.

KULKARNI, M. M. et al. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 23, p. 15496–15504, 2009.

KUSTANOVICH, I. et al. Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin S4 derivatives. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 16941–16951, 2002.

LADRAM, A. et al. The analogs of temporin-SHa. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2010106293&recNum=284&docAn=FR2010050487&queryString=%28CL/peptide%29%20AND%20%28IC/C07K-7/00%29&maxRec=2186>, 2010.

LEE, E. et al. Functional roles of aromatic residues and helices of papiliocin in its antimicrobial and anti-inflammatory activities. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12048, 2015.

LEITE, J. M. A. et al. *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia): mechanism of defense in the skin and molecular phylogenetic relationships. **Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology**, v. 313, n. 1, p. 1–8, 2010.

LEITE, J. R. S. A et al. Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. **Peptides**, v. 26, n. 4, p. 565-573, 2005.

LEMOS, M. et al. Isolation and *in vitro* culture of trypanosomes from *Leptodactylus ocellatus* from the Atlantic Forest in a new experimental culture medium. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 164–167, 2013.

LEY, S. V; BAXENDALE, I. R. New tools and concepts for modern organic synthesis. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, p. 573–586, 2002.

LI, Y. et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207–215, 2012.

LIBÉRIO, M. S. et al. Anti-proliferative and cytotoxic activity of pentadactylin isolated from *Leptodactylus labyrinthicus* on melanoma cells. **Amino acids**, v. 40, n. 1, p. 51-9, 2011.

LÖFGREN, S. E. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 197–202, 2008.

LOISEAU, P. M. et al. Trypanocidal effect of Ir-(COD)-pentamidine tetraphenylborate on *Trypanosoma brucei* and *T. b. gambiense* rodent models and serum kinetics in sheep. **Tropical Medicine & International Health** v. 2, p. 19–27, 1997.

MACHADO, A. et al. Sínteses química e enzimática de peptídeos: Princípios básicos e aplicações. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 781–789, 2004.

MÄDE, V.; ELS-HEINDL, S.; BECK-SICKINGER, A. G. Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 1197–1212, 22 2014.

MAGUIRE, P. A; SHERMAN, I. W. Phospholipid composition, cholesterol content and cholesterol exchange in *Plasmodium falciparum*-infected red cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 38, p. 105–112, 1990.

MANGONI, M. L. et al. Structure-function relationships in bombinins H, antimicrobial peptides from *Bombina* skin secretions. **Peptides**, v. 21, n. 11, p. 1673–9, 2000.

MANGONI, M. L. et al. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 984–990, 2005.

MANGONI, M. L. et al. Effect of natural L- to D-amino acid conversion on the organization, membrane binding, and biological function of the antimicrobial peptides bombinins H. **Biochemistry**, v. 45, n. 13, p. 4266–4276, 2006.

MANGONI, M. L.; MARCELLINI, L.; SIMMACO, M. Biological characterization and modes of action of temporins and bombinins H, multiple forms of short and mildly cationic anti-microbial peptides from amphibian skin. **Journal of Peptide Science**, v. 13, p. 603–613, 2007.

MARÉCHAL, E. et al. Membrane lipidomics for the discovery of new antiparasitic drug targets. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 11, p. 496–504, 2011.

MARR, A. K.; MCGWIRE, B. S.; MCMASTER, W. R. Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. **Future Microbiology**, v. 7, p. 1047–1059, 2012.

MARSHALL, G. R. Amide protection and amide supports in solid-phase peptide synthesis. **Chem**, v. 485, n. 4, p. 3–4, 1970.

MARSHALL, G. R.; MERRIFIELD, R. B. Synthesis of angiotensins by the solid-phase method. **Biochemistry**, v. 4, p. 2394–2401, 1965.

MARSHALL, S. H.; ARENAS, G. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 3, 15 dez. 2003.

MARTIN-PLAZA, J.; CHATELAIN, E. Novel therapeutic approaches for neglected infectious diseases. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, p. 3–5, 2014.

MCCONVILLE, M. J. et al. Secretory pathway of Trypanosomatid parasites. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 1, p. 122–154, 2002.

MCGWIRE, B. S.; KULKARNI, M. M. Interactions of antimicrobial peptides with *Leishmania* and trypanosomes and their functional role in host parasitism. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 397–405, 2010.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MCLAIN, S. E. et al. Structure and hydration of L-proline in aqueous solutions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 17, p. 4568–4580, 2007.

MENDONÇA-PREVIATO, L. et al. Protozoan parasite-specific carbohydrate structures. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 15, p. 499–505, 2005.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, p. 2149–2154, 1963.

MITCHELL, A. R. Bruce Merrifield and solid-phase peptide synthesis: A historical assessment. **Biopolymers**, v. 90, n. 3, p. 175–184, 2008.

MONERA, O. D. et al. Relationship of sidechain hydrophobicity and alpha-helical propensity on the stability of the single-stranded amphipathic alpha-helix. **Journal of Peptide Science**, v. 1, n. 5, p. 319–329, 1995.

MOR, A.; NICOLAS, P. The NH₂-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 3, p. 1934–1939, 1994.

MOR, A. et al. Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. **Biochemistry**, v. 30, n. 36, p. 8824–8830, 1991.

MOR, A. Multifunctional host defense peptides: antiparasitic activities. **FEBS Journal**, v. 276, n. 22, p. 6474–6482, 2009.

MOR, A.; HANI, K.; NICOLAS, P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 50, p. 31635–31641, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NASCIMENTO, A. C. C. C. **Avaliação biológica da secreção cutânea da rã *Leptodactylus ocellatus*: peptídeos citolíticos e proteases**. [s.l.: s.n.].Universidade de Brasília, 2007a.

NASCIMENTO, A. et al. Purification, characterization and homology analysis of ocellatin 4, a cytolytic peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus ocellatus*. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1095–1104, 2007b.

NASCIMENTO, A. C. C. et al. Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). **The Protein Journal**, v. 23, n. 8, p. 501–508, 2004.

NAVON-VENEZIA, S. et al. Antibacterial properties of dermaseptin S4 derivatives with *in vivo* activity. v. 46, n. 3, p. 689–694, 2002.

NAWROCKI, K.; CRISPELL, E.; MCBRIDE, S. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of Gram-positive bacteria. **Antibiotics**, v. 3, n. 4, p. 461–492, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5a edição ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, 2011.

NICOLAS, P.; EL AMRI, C. The dermaseptin superfamily: a gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 8, p. 1537–1550, 2009.

NIELSEN, S. L. et al. Structure–activity study of the antibacterial peptide fallaxin. **Protein Science**, v. 16, p. 1969–1976, 2007.

NIZET, V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 8, n. 1, p. 11–26, 2006.

NOVKOVIĆ, M. et al. DADP: The database of anuran defense peptides. **Bioinformatics**, v. 28, n. 10, p. 1406–7, 2012.

NUSSBAUM, K. et al. Trypanosomatid parasites causing neglected diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 15, p. 1594–1617, 2010.

ONUMA, Y. et al. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. **Toxicon**, v. 37, p. 55–65, 1999.

PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Peptides**, v. 24, n. 11, p. 1693–703, 2003.

PÉREZ-CORDERO, J. J. et al. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. **Peptides**, v. 32, p. 683–690, 2011.

PINTO, E. G. et al. Antimicrobial peptides isolated from *Phyllomedusa nordestina* (Amphibia) alter the permeability of plasma membrane of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 4, p. 655–660, 2013.

PRETZEL, J. et al. Antiparasitic Peptides. In: *Yellow Biotechnology I*. [s.l.: s.n.]. v. 135, p. 157–192, 2013.

PROTO, W. R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? **Nature Reviews. Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 58–66, 2013.

PUKALA, T. L. et al. Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 3, p. 368–93, 2006.

PUSHPANATHAN, M.; GUNASEKARAN, P.; RAJENDHRAN, J. Antimicrobial peptides: Versatile biological properties. **International Journal of Peptides**, v. 2013, p. 1–15, 2013.

QQ, M. et al. The effects of Leu or Val residues on cell selectivity of α -helical peptides. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, n. 11, p. 1112–8, 2011.

RADZISHEVSKY, I. S. et al. Effects of acyl versus aminoacyl conjugation on the properties of antimicrobial peptides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2412–2420, 2005.

RAJA, Z. et al. Structure, antimicrobial activities and mode of interaction with membranes of bovel phylloseptins from the painted-belly leaf frog, *Phyllomedusa sauvagii*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

RAMAKRISHNAN, S. et al. Lipid synthesis in protozoan parasites: A comparison between kinetoplastids and apicomplexans. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 488–512, 2013.

RÄZ, B. et al. The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) *in vitro*. **Acta Tropica**, v. 68, p. 139–147, 1997.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 536–547, 2004.

RESENDE, J. M. et al. Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1, -2, and -3 and biological activity: the role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1633–1644, 2008.

RIDGLEY, E. L.; XIONG, Z. H.; RUBEN, L. Reactive oxygen species activate a Ca^{2+} -dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei brucei*. **The Biochemical Journal**, v. 340, p. 33–40, 1999.

RINALDI, A. C. et al. on membrane permeabilization in lipid vesicles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 368, p. 91–100, 2002.

RINK, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. **Tetrahedron Letters**, v. 28, n. 33, p. 3787–3790, 1987.

RIVAS, L.; LUQUE-ORTEGA, J. R.; ANDREU, D. Amphibian antimicrobial peptides and Protozoa: Lessons from parasites. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1788, n. 8, p. 1570–81, 2009.

ROELANTS, K. et al. Origin and functional diversification of an amphibian defense peptide arsenal. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 8, 2013.

ROLLINS-SMITH, L. A et al. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae). **Regulatory Peptides**, v. 124, n. 1-3, p. 173–178, 2005.

ROTEM, S.; RADZISHEVSKY, I.; MOR, A. Physicochemical properties that enhance discriminative antibacterial activity of short dermaseptin derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2666–2672, 2006.

RUB, A. et al. Host-lipidome as a potential target of protozoan parasites. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 10-11, p. 649–660, 2013.

SABERWAL, G.; NAGARAJ, R. Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: Facets of their conformational features, structure-function correlations and membrane-perturbing abilities. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes**, v. 1197, n. 2, p. 109–131, 1994.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453–83, 2001.

SAVIOLI, L.; DAUMERIE, D. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **World Health Organization**. Geneva. 2010.

SAVOIA, D. et al. Synthesis and antimicrobial activity of dermaseptin S1 analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 8205–8209, 2008.

SAYLE, R. A.; MILNER-WHITE, E. J. RASMOL: Biomolecular graphics for all. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, n. 9, p. 374–376, 1995.

SCHMIDTCHEN, A.; PASUPULETI, M.; MALMSTEN, M. Effect of hydrophobic modifications in antimicrobial peptides. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 205, p. 265–274, 2014.

SCOPES, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. **Analytical Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 277–282, 1974.

SHAI, Y.; OREN, Z. From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. **Peptides**, v. 22, n. 10, p. 1629–1641, 2001.

SIEBER, P. A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method. **Tetrahedron Letters**, v. 28, n. 19, p. 2107–2110, 1987.

SIMMACO, M.; KREIL, G.; BARRA, D. Bombinins, antimicrobial peptides from *Bombina* species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 8, p. 1551–1555, 2009.

SIMONIAN, M. H. Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. In: **Current Protocols in Toxicology**. COSTA, L. G. et al. (Eds.). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., p. 1–7(A–3G), 2001.

SITARAM, N.; NAGARAJ, R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: Structural and charge requirements for activity. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1462, p. 29–54, 1999.

SMIRLIS, D. et al. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 107, 2010.

SOUTO-PADRON, T. The surface charge of trypanosomatids. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 74, n. 4, p. 649–675, 2002.

SPÄTH, G. F. et al. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 9258–9263, 2000.

STAWIKOWSKI, M.; FIELDS, G. B. Introduction to peptide synthesis. Current protocols in protein science. **Curr. Protoc. Protein Sci.**, v. 26, p. 1–17, 2002.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.

TACHADO, S. D.; MAZHARI-TABRIZI, R.; SCHOFIELD, L. Specificity in signal transduction among glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 12, p. 609–617, 1999.

TAN, J. et al. Effects of single amino acid substitution on the biophysical properties and biological activities of an amphipathic α -helical antibacterial peptide against Gram-negative bacteria. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 10803–10817, 2014.

TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 2, p. 149–77, 2012.

TORRENT, M. et al. Antimicrobial peptide action on parasites. **Current Drug Targets**, v. 13, p. 1138–1147, 2012.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, p. 4–30, 2000.

TOSSI, A.; TARANTINO, C.; ROMEO, D. Design of synthetic antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 250, n. 2, p. 549–558, 1997.

VALE, N.; AGUIAR, L.; GOMES, P. Antimicrobial peptides: A new class of antimalarial drugs? **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 1–13, 2014.

VAN DER WEERDEN, N. L.; BLEACKLEY, M. R.; ANDERSON, M. A. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 3545–3570, 2013.

VIAL, H. J. et al. Phospholipids in parasitic protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 126, p. 143–154, 2003.

WADE, D. et al. Antibacterial activities of temporin A analogs. **FEBS Letters**, v. 479, n. 1-2, p. 6–9, 2000.

WANG, S.-S. p-Alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 21, n. 1971, p. 1328–1333, 1973.

WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. p. 232, 2014a.

WHO. **Abordagem epidemiológica na luta contra o paludismo**. 2a edição ed.[s.l.] World Health Organization, 2014b.

WONG, C.-H.; ZIMMERMAN, S. C. Orthogonality in organic, polymer, and supramolecular chemistry: from Merrifield to click chemistry. **Chemical Communications**, v. 49, n. 17, p. 1679–95, 2013.

WU, M. et al. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 38, n. 22, p. 7235–42, jun. 1999.

XIAO, Y.; LIU, C.; LAI, R. Antimicrobial peptides from amphibians. **BioMolecular Concepts**, v. 2, n. 1-2, p. 27–38, 2011.

YAN, H. et al. Individual substitution analogs of Mel(12–26), melittin's C-terminal 15-residue peptide: their antimicrobial and hemolytic actions. **FEBS Letters**, v. 554, n. 1-2, p. 100–104, 2003.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.

ZAMPA, M. F. et al. Leishmanicidal activity and immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, n. 3, p. 352–358, 2009.

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

ZASLOFF, M.; MARTIN, B.; CHEN, H. C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 910–913, 1988.

ZELEZETSKY, I.; TOSSI, A. Alpha-helical antimicrobial peptides using a sequence template to guide structure-activity relationship studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, n. 9, p. 1436–1449, 2006.

ZHAO, J. et al. Engineering antimicrobial peptides with improved antimicrobial and hemolytic activities. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, p. 3280–3296, 2013.

ZUCCA, M.; SAVOIA, D. Current developments in the therapy of protozoan infections. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 4–10, 2011.

9. ANEXO 1

Perfil numérico gerado pelo algoritmo SPLIT 4.0 o peptídeo Oc-P1 e os análogos apresentados no presente trabalho

Apresentados na seguinte ordem:

1. Oc-P1
2. A1
3. A1.1
4. A1.2
5. A1.3
6. A2
7. A2.1
8. A2.2
9. A2.3

Oc-P1

The Secondary Structure Prediction Results

 PREDICTED TM HELICES + TOPOLOGY PREDICTION

scale #TMS pred. topo.

12 0

TM HELICES

motif bias: 0

charge bias: 0

charge difference: 0

overall bias: 0

AA#	S	O	P	TMH	BET	TUR	UND	H-T	H*T	MOMA	MOMB	INDA	INDB	MBET	DIG	OBS	SC1	T*60
1	G	U	H	5.18	0.00	0.05	0.01	5.13	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	-4.00	0.0	0.0	0.00	0.00
2	L	U	H	3.42	0.50	0.37	0.44	3.05	1.26	0.00	0.00	0.67	0.02	-3.48	0.0	0.0	0.00	0.00
3	L	U	H	2.26	0.84	0.86	0.78	1.40	1.95	1.91	1.32	1.71	0.14	-3.01	0.0	0.0	0.00	0.00
4	D	U	H	1.66	1.14	1.15	1.05	0.51	1.91	2.66	1.46	2.56	0.24	-2.62	0.0	0.0	0.00	0.00
5	T	U	B	0.93	1.32	1.11	1.11	-0.17	1.04	2.23	1.07	2.93	0.32	-2.36	0.0	0.0	0.00	0.00
6	L	U	B	0.32	1.24	1.03	1.16	-0.72	0.33	2.59	1.69	2.97	0.27	-2.49	0.0	0.0	0.00	0.00
7	K	U	B	0.28	1.26	1.16	1.22	-0.88	0.32	2.70	1.29	3.21	0.26	-2.49	0.0	0.0	0.00	0.00
8	G	U	T	0.24	1.09	1.26	1.22	-1.02	0.30	2.74	1.44	3.17	0.20	-2.71	0.0	0.0	0.00	0.00
9	A	U	U	0.17	0.99	1.15	1.24	-0.98	0.20	2.57	1.28	2.80	0.17	-2.85	0.0	0.0	0.00	0.00
10	A	U	U	0.18	0.93	1.06	1.26	-0.88	0.19	1.93	1.60	2.38	0.12	-2.95	0.0	0.0	0.56	0.10
11	K	U	U	0.17	1.18	1.19	1.24	-1.02	0.21	1.90	1.66	2.04	0.12	-2.70	0.0	0.0	0.38	0.07
12	N	U	B	0.17	1.43	1.14	1.19	-0.97	0.19	1.82	1.69	1.90	0.09	-2.48	0.0	0.0	0.40	0.07
13	V	U	B	0.17	1.41	0.98	1.18	-0.81	0.16	1.61	0.71	1.94	0.07	-2.52	0.0	0.0	0.30	0.05
14	V	U	B	0.20	1.50	1.02	1.16	-0.82	0.21	1.92	0.42	1.93	0.06	-2.44	0.0	0.0	0.30	0.06
15	G	U	B	0.31	1.64	1.19	1.16	-0.88	0.36	1.77	1.30	2.09	0.08	-2.28	0.0	0.0	0.13	0.04
16	S	U	B	0.31	1.41	1.17	1.16	-0.86	0.37	1.99	1.44	2.23	0.10	-2.49	0.0	0.0	0.13	0.04
17	L	U	B	0.31	1.25	1.06	1.09	-0.75	0.33	2.21	0.84	2.45	0.10	-2.65	0.0	0.0	0.00	0.00
18	A	U	B	0.32	1.26	1.05	1.09	-0.74	0.33	2.22	0.95	2.72	0.10	-2.64	0.0	0.0	0.00	0.00
19	S	U	B	0.31	1.44	1.24	1.10	-0.92	0.39	2.57	1.16	2.90	0.11	-2.45	0.0	0.0	0.00	0.00
20	K	U	B	0.35	1.33	1.12	1.15	-0.77	0.39	2.63	1.02	3.20	0.12	-2.55	0.0	0.0	0.00	0.00
21	V	U	U	0.31	1.21	0.93	1.27	-0.62	0.29	3.01	1.39	3.59	0.16	-2.63	0.0	0.0	0.00	0.00
22	M	U	U	0.19	1.14	1.02	1.22	-0.83	0.19	3.51	1.95	3.82	0.17	-2.70	0.0	0.0	0.00	0.00
23	E	U	T	0.19	0.99	1.23	1.22	-1.04	0.23	3.43	1.97	2.67	0.13	-2.88	0.0	0.0	0.00	0.00
24	K	U	U	0.25	0.61	1.17	1.28	-0.92	0.29	0.00	0.00	1.27	0.04	-3.35	0.0	0.0	0.00	0.00
25	L	U	U	0.00	0.26	0.51	1.64	-0.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.74	0.0	0.0	0.00	0.00
AA#	S	O	P	TMH	BET	TUR	UND	H-T	H*T	MOMA	MOMB	INDA	INDB	MBET	DIG	OBS	SC1	T*60
25	in/new130.					XXXX												
PROGRAM VERSION																		
split4.0.																		

A1

The Secondary Structure Prediction Results

PREDICTED TM HELICES + TOPOLOGY PREDICTION

scale #TMS pred. topo.

12 0

TM HELICES

motif bias: 0

charge bias: 0

charge difference: 0

overall bias: 0

AA#	S	O	P	TMH	BET	TUR	UND	H-T	H*T	MOMA	MOMB	INDA	INDB	MBET	DIG	OBS	SC1	T*60
1	G	U	T	0.08	1.00	1.52	1.16	-1.44	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.00	0.0	0.0	0.00	0.00
2	A	U	T	0.30	1.03	1.19	1.18	-0.89	0.35	0.00	0.00	0.10	0.89	-2.07	0.0	0.0	0.00	0.00
3	A	U	B	0.26	1.25	1.15	1.19	-0.89	0.30	1.83	2.24	1.21	0.97	-1.77	0.0	0.0	0.00	0.00
4	N	U	B	0.23	1.49	1.11	1.12	-0.88	0.25	2.76	1.31	2.31	0.99	-1.52	0.0	0.0	0.00	0.00
5	V	U	B	0.25	1.49	1.01	1.15	-0.76	0.25	2.78	0.39	3.15	0.13	-2.38	0.0	0.0	0.00	0.00
6	V	U	B	0.23	1.54	0.95	1.17	-0.71	0.22	2.36	0.68	2.98	0.06	-2.40	0.0	0.0	0.00	0.00
7	K	U	B	0.17	1.66	1.11	1.17	-0.94	0.19	2.39	0.34	2.90	0.06	-2.28	0.0	0.0	0.00	0.00
8	S	U	B	0.17	1.38	1.05	1.23	-0.88	0.18	2.62	0.58	2.91	0.04	-2.58	0.0	0.0	0.00	0.00
9	L	U	U	0.16	1.22	0.94	1.27	-0.77	0.15	2.53	0.64	3.06	0.04	-2.74	0.0	0.0	0.00	0.00
10	A	U	U	0.15	1.23	0.92	1.28	-0.78	0.14	2.83	0.45	3.22	0.05	-2.72	0.0	0.0	0.00	0.00
11	S	U	U	0.13	1.20	1.15	1.23	-1.02	0.16	2.99	0.61	3.37	0.14	-2.65	0.0	0.0	0.00	0.00
12	K	U	U	0.23	1.10	1.14	1.22	-0.91	0.27	2.76	1.67	3.39	0.26	-2.64	0.0	0.0	0.00	0.00
13	V	U	U	0.22	1.05	1.23	1.23	-1.01	0.27	3.07	1.30	3.34	0.56	-2.39	0.0	0.0	0.00	0.00
14	G	U	T	0.24	0.92	1.36	1.12	-1.12	0.33	3.64	2.42	2.24	0.45	-2.63	0.0	0.0	0.00	0.00
15	K	U	T	0.33	0.77	1.23	1.20	-0.89	0.40	0.00	0.00	1.14	0.32	-2.91	0.0	0.0	0.00	0.00
16	L	U	U	0.00	0.72	0.47	1.57	-0.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.28	0.0	0.0	0.00	0.00

AA# S O P TMH BET TUR UND H-T H*T MOMA MOMB INDA INDB MBET DIG OBS SC1 T*60

16 in/new136. XXXX

PROGRAM VERSION

split4.0.

A1.2

The Secondary Structure Prediction Results

PREDICTED TM HELICES + TOPOLOGY PREDICTION

scale #TMS pred. topo.

12 0

TM HELICES

motif bias: 0

charge bias: 0

charge difference: 0

overall bias: 0

AA#	S	O	P	TMH	BET	TUR	UND	H-T	H*T	MOMA	MOMB	INDA	INDB	MBET	DIG	OBS	SC1	T*60
1	G	U	T	0.08	1.00	1.52	1.16	-1.44	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.00	0.0	0.0	0.00	0.00
2	A	U	T	0.30	1.03	1.19	1.18	-0.89	0.35	0.00	0.00	0.10	0.89	-2.07	0.0	0.0	0.00	0.00
3	A	U	B	0.24	1.22	1.15	1.19	-0.91	0.28	1.83	2.24	1.21	0.97	-1.81	0.0	0.0	0.00	0.00
4	N	U	B	0.24	1.49	1.11	1.14	-0.87	0.26	2.76	1.31	2.44	1.00	-1.51	0.0	0.0	0.00	0.00
5	V	U	B	0.26	1.50	1.01	1.14	-0.75	0.26	3.09	0.66	3.11	0.12	-2.39	0.0	0.0	0.00	0.00
6	V	U	B	0.26	1.47	0.97	1.15	-0.71	0.25	2.11	0.53	2.88	0.07	-2.47	0.0	0.0	0.00	0.00
7	K	U	B	0.22	1.59	1.16	1.14	-0.94	0.25	2.36	1.18	2.66	0.08	-2.32	0.0	0.0	0.00	0.00
8	K	U	B	0.21	1.38	1.12	1.21	-0.91	0.23	2.61	1.29	2.82	0.11	-2.52	0.0	0.0	0.00	0.00
9	L	U	B	0.23	1.35	1.02	1.23	-0.79	0.23	2.51	1.40	3.03	0.12	-2.53	0.0	0.0	0.00	0.00
10	A	U	B	0.21	1.35	0.83	1.23	-0.61	0.18	2.85	1.45	2.70	0.47	-2.17	0.0	0.0	0.00	0.00
11	V	U	B	0.20	1.60	1.07	1.17	-0.87	0.21	3.02	1.61	2.25	1.40	-1.00	0.0	0.0	0.00	0.00
12	K	U	B	0.29	1.49	1.00	1.14	-0.71	0.29	2.98	2.91	1.91	1.63	-0.88	0.0	0.0	0.00	0.00
13	V	U	B	0.27	1.41	1.23	1.15	-0.97	0.33	2.56	1.90	2.38	1.56	-1.03	0.0	0.0	0.00	0.00
14	G	U	T	0.28	1.11	1.34	1.06	-1.06	0.37	3.64	2.42	1.90	0.60	-2.30	0.0	0.0	0.00	0.00
15	K	U	T	0.33	0.77	1.23	1.20	-0.89	0.40	0.00	0.00	1.14	0.32	-2.91	0.0	0.0	0.00	0.00
16	L	U	U	0.00	0.72	0.47	1.57	-0.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.28	0.0	0.0	0.00	0.00

AA# S O P TMH BET TUR UND H-T H*T MOMA MOMB INDA INDB MBET DIG OBS SC1 T*60
 16 in/new138. XXXX
 PROGRAM VERSION
 split4.0.

A1.3

The Secondary Structure Prediction Results

PREDICTED TM HELICES + TOPOLOGY PREDICTION

scale #TMS pred. topo.
 12 0
 TM HELICES

motif bias: 0
 charge bias: 0
 charge difference: 0
 overall bias: 0

AA#	S	O	P	TMH	BET	TUR	UND	H-T	H*T	MOMA	MOMB	INDA	INDB	MBET	DIG	OBS	SC1	T*60
1	G	U	T	0.08	1.00	1.52	1.16	-1.44	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.00	0.0	0.0	0.00	0.00
2	A	U	T	0.30	1.03	1.19	1.18	-0.89	0.35	0.00	0.00	0.10	0.89	-2.07	0.0	0.0	0.00	0.00
3	A	U	B	0.24	1.22	1.15	1.19	-0.91	0.28	1.83	2.24	1.21	0.97	-1.81	0.0	0.0	0.00	0.00
4	N	U	B	0.21	1.43	1.11	1.14	-0.90	0.23	2.76	1.31	2.44	1.00	-1.57	0.0	0.0	0.00	0.00
5	V	U	B	0.22	1.43	1.01	1.18	-0.79	0.22	3.09	0.66	3.33	0.12	-2.45	0.0	0.0	0.00	0.00
6	V	U	B	0.20	1.40	0.94	1.20	-0.74	0.19	2.55	0.48	3.29	0.06	-2.54	0.0	0.0	0.00	0.00
7	K	U	B	0.14	1.51	1.10	1.21	-0.96	0.15	2.75	0.75	3.23	0.06	-2.42	0.0	0.0	0.00	0.00
8	K	U	U	0.12	1.25	1.03	1.28	-0.92	0.12	2.99	0.85	3.32	0.07	-2.68	0.0	0.0	0.00	0.00
9	L	U	U	0.12	0.90	0.92	1.32	-0.80	0.11	2.89	0.95	3.51	0.08	-3.02	0.0	0.0	0.00	0.00
10	A	U	U	0.11	0.91	0.94	1.36	-0.83	0.11	3.22	1.03	3.69	0.10	-2.99	0.0	0.0	0.00	0.00
11	P	U	U	0.10	1.01	1.16	1.31	-1.06	0.12	3.39	1.18	3.93	0.25	-2.74	0.0	0.0	0.00	0.00
12	K	U	U	0.21	0.91	1.16	1.29	-0.95	0.24	3.35	2.53	3.71	0.37	-2.71	0.0	0.0	0.00	0.00
13	V	U	U	0.20	0.87	1.21	1.23	-1.01	0.24	2.93	1.41	3.49	0.65	-2.48	0.0	0.0	0.00	0.00
14	G	U	T	0.24	0.95	1.35	1.11	-1.12	0.32	3.64	2.42	2.16	0.48	-2.57	0.0	0.0	0.00	0.00
15	K	U	T	0.33	0.77	1.23	1.20	-0.89	0.40	0.00	0.00	1.14	0.32	-2.91	0.0	0.0	0.00	0.00
16	L	U	U	0.00	0.72	0.47	1.57	-0.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.28	0.0	0.0	0.00	0.00

AA# S O P TMH BET TUR UND H-T H*T MOMA MOMB INDA INDB MBET DIG OBS SC1 T*60
 16 in/new139. XXXX
 PROGRAM VERSION
 split4.0.

A2

The Secondary Structure Prediction Results

PREDICTED TM HELICES + TOPOLOGY PREDICTION

scale #TMS pred. topo.
 12 0
 TM HELICES

motif bias: 0
 charge bias: 0
 charge difference: 0
 overall bias: 0

AA#	S	O	P	TMH	BET	TUR	UND	H-T	H*T	MOMA	MOMB	INDA	INDB	MBET	DIG	OBS	SC1	T*60
1	K	U	U	0.14	0.90	1.20	1.26	-1.07	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.10	0.0	0.0	0.00	0.00
2	A	U	U	0.05	0.36	0.72	1.54	-0.67	0.03	0.00	0.00	1.68	0.03	-3.61	0.0	0.0	0.00	0.00
3	A	U	U	0.08	0.53	0.70	1.55	-0.63	0.05	4.26	1.20	3.26	0.06	-3.41	0.0	0.0	0.00	0.00
4	K	U	U	0.07	0.68	0.91	1.44	-0.84	0.07	4.02	1.10	4.35	0.08	-3.24	0.0	0.0	0.00	0.00
5	K	U	U	0.08	1.03	1.05	1.29	-0.97	0.08	2.87	0.70	3.75	0.06	-2.91	0.0	0.0	0.00	0.00
6	V	U	U	0.16	1.25	0.93	1.27	-0.77	0.15	2.80	0.53	3.01	0.05	-2.71	0.0	0.0	0.00	0.00
7	V	U	B	0.52	1.35	1.08	1.19	-0.56	0.56	2.19	0.54	2.89	0.07	-2.58	0.0	0.0	0.00	0.00
8	G	U	B	0.83	1.34	1.26	1.09	-0.44	1.04	2.44	0.74	2.83	0.08	-2.58	0.0	0.0	0.00	0.00
9	S	U	H	1.51	1.18	1.22	0.89	0.29	1.84	2.57	0.52	2.84	0.09	-2.73	0.0	0.0	0.00	0.00
10	L	U	H	1.69	0.80	1.05	0.72	0.64	1.77	2.09	0.50	2.46	0.12	-3.07	0.0	0.0	0.00	0.00
11	A	U	H	2.04	0.91	0.65	0.41	1.39	1.33	1.67	0.61	2.52	0.12	-2.97	0.0	0.0	0.00	0.00
12	S	U	H	2.70	0.87	0.66	0.50	2.04	1.79	2.71	0.43	1.68	0.10	-3.04	0.0	0.0	0.00	0.00
13	I	U	H	2.91	0.94	0.52	0.49	2.39	1.50	0.00	0.00	1.08	0.02	-3.04	0.0	0.0	0.00	0.00
14	V	U	H	2.54	1.15	0.63	0.55	1.91	1.61	0.00	0.00	0.00	0.00	-2.85	0.0	0.0	0.00	0.00
AA#	S	O	P	TMH	BET	TUR	UND	H-T	H*T	MOMA	MOMB	INDA	INDB	MBET	DIG	OBS	SC1	T*60
14	in/new140.																	

PROGRAM VERSION
split4.0.

A2.1

The Secondary Structure Prediction Results

PREDICTED TM HELICES + TOPOLOGY PREDICTION

scale #TMS pred. topo.

12 0

TM HELICES

motif bias: 0

charge bias: 0

charge difference: 0

overall bias: 0

AA#	S	O	P	TMH	BET	TUR	UND	H-T	H*T	MOMA	MOMB	INDA	INDB	MBET	DIG	OBS	SC1	T*60
1	G	U	T	0.08	1.00	1.52	1.16	-1.44	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.00	0.0	0.0	0.00	0.00
2	A	U	U	0.10	0.69	0.99	1.37	-0.89	0.10	0.00	0.00	0.78	0.01	-3.29	0.0	0.0	0.00	0.00
3	A	U	U	0.12	0.78	0.91	1.39	-0.79	0.11	2.29	0.83	1.66	0.02	-3.21	0.0	0.0	0.00	0.00
4	K	U	U	0.14	1.03	0.98	1.38	-0.85	0.13	2.57	0.36	2.31	0.04	-2.93	0.0	0.0	0.00	0.00
5	K	U	B	0.13	1.29	1.08	1.21	-0.95	0.15	1.99	1.37	2.27	0.05	-2.66	0.0	0.0	0.00	0.00
6	V	U	B	0.13	1.46	0.92	1.18	-0.79	0.12	2.20	1.19	2.09	0.06	-2.48	0.0	0.0	0.00	0.00
7	V	U	B	0.25	1.47	1.03	1.14	-0.78	0.26	2.11	1.18	2.25	0.08	-2.46	0.0	0.0	0.00	0.00
8	G	U	B	0.43	1.56	1.21	1.16	-0.78	0.52	2.35	1.80	2.45	0.10	-2.34	0.0	0.0	0.00	0.00
9	K	U	B	0.75	1.32	1.21	1.14	-0.46	0.90	2.60	1.85	2.92	0.13	-2.55	0.0	0.0	0.00	0.00
10	L	U	H	1.09	1.03	0.97	1.06	0.12	1.06	3.09	1.63	3.49	0.16	-2.81	0.0	0.0	0.00	0.00
11	L	U	H	1.11	0.87	0.88	0.84	0.23	0.97	3.47	1.85	3.97	0.19	-2.94	0.0	0.0	0.00	0.00
12	A	U	B	1.11	1.14	1.08	0.63	0.02	1.20	3.66	2.41	4.36	0.22	-2.64	0.0	0.0	0.00	0.00
13	K	U	H	1.34	1.18	1.09	0.69	0.26	1.46	3.91	1.45	2.99	0.15	-2.67	0.0	0.0	0.00	0.00
14	V	U	B	0.99	1.34	0.94	0.96	0.05	0.93	0.00	0.00	1.57	0.07	-2.59	0.0	0.0	0.00	0.00
15	L	U	B	0.09	1.47	0.61	1.36	-0.52	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	-2.53	0.0	0.0	0.00	0.00
AA#	S	O	P	TMH	BET	TUR	UND	H-T	H*T	MOMA	MOMB	INDA	INDB	MBET	DIG	OBS	SC1	T*60
15	in/new141.						XXXX											

PROGRAM VERSION
split4.0.

A2.2

The Secondary Structure Prediction Results

PREDICTED TM HELICES + TOPOLOGY PREDICTION

scale #TMS pred. topo.

12 0

TM HELICES

motif bias: 0

charge bias: 0

charge difference: 0

overall bias: 0

AA#	S	O	P	TMH	BET	TUR	UND	H-T	H*T	MOMA	MOMB	INDA	INDB	MBET	DIG	OBS	SC1	T*60
1	G	U	T	0.08	1.00	1.52	1.16	-1.44	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.00	0.0	0.0	0.00	0.00
2	A	U	U	0.10	0.69	0.99	1.37	-0.89	0.10	0.00	0.00	0.78	0.01	-3.29	0.0	0.0	0.00	0.00
3	A	U	U	0.12	0.78	0.91	1.39	-0.79	0.11	2.29	0.83	1.66	0.02	-3.21	0.0	0.0	0.00	0.00
4	K	U	U	0.10	0.95	0.98	1.38	-0.88	0.10	2.57	0.36	2.31	0.04	-3.01	0.0	0.0	0.00	0.00
5	K	U	U	0.10	1.14	1.09	1.24	-0.99	0.10	1.99	1.37	2.26	0.05	-2.81	0.0	0.0	0.00	0.00
6	V	U	B	0.09	1.27	0.94	1.25	-0.85	0.08	2.14	1.35	2.07	0.07	-2.66	0.0	0.0	0.00	0.00
7	V	U	B	0.13	1.26	1.01	1.24	-0.88	0.14	2.06	1.35	2.19	0.09	-2.65	0.0	0.0	0.00	0.00
8	G	U	B	0.28	1.39	1.15	1.24	-0.87	0.32	2.22	2.00	2.35	0.12	-2.49	0.0	0.0	0.00	0.00
9	K	U	U	0.38	1.24	1.12	1.24	-0.74	0.42	2.47	2.05	2.77	0.15	-2.61	0.0	0.0	0.00	0.00
10	L	U	U	0.48	1.09	1.04	1.11	-0.56	0.49	2.91	1.79	3.28	0.19	-2.71	0.0	0.0	0.00	0.00
11	A	U	B	0.51	1.08	1.01	1.03	-0.50	0.51	3.22	2.10	3.67	0.23	-2.69	0.0	0.0	0.00	0.00
12	A	U	B	0.52	1.36	1.33	0.92	-0.81	0.69	3.34	2.73	3.95	0.28	-2.35	0.0	0.0	0.00	0.00
13	K	U	B	0.63	1.36	1.21	0.99	-0.58	0.76	3.48	1.81	2.67	0.20	-2.43	0.0	0.0	0.00	0.00
14	V	U	B	0.37	1.52	1.03	1.12	-0.66	0.39	0.00	0.00	1.38	0.11	-2.37	0.0	0.0	0.00	0.00
15	L	U	B	0.09	1.47	0.61	1.36	-0.52	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	-2.53	0.0	0.0	0.00	0.00

AA# S O P TMH BET TUR UND H-T H*T MOMA MOMB INDA INDB MBET DIG OBS SC1 T*60

15 in/new142. XXXX

PROGRAM VERSION
split4.0.

A2.3

The Secondary Structure Prediction Results

PREDICTED TM HELICES + TOPOLOGY PREDICTION

scale #TMS pred. topo.

12 0
TM HELICES

motif bias: 0
charge bias: 0
charge difference: 0
overall bias: 0

AA#	S	O	P	TMH	BET	TUR	UND	H-T	H*T	MOMA	MOMB	INDA	INDB	MBET	DIG	OBS	SC1	T*60
1	G	U	T	0.08	1.00	1.52	1.16	-1.44	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.00	0.0	0.0	0.00	0.00
2	A	U	U	0.11	0.76	1.03	1.35	-0.92	0.11	0.00	0.00	0.70	0.02	-3.22	0.0	0.0	0.00	0.00
3	A	U	U	0.18	0.86	0.98	1.34	-0.80	0.18	2.02	1.25	1.47	0.03	-3.11	0.0	0.0	0.00	0.00
4	K	U	U	0.17	1.09	1.18	1.26	-1.01	0.20	2.26	0.67	2.06	0.04	-2.87	0.0	0.0	0.00	0.00
5	N	U	B	0.16	1.33	1.24	1.12	-1.08	0.20	1.67	0.48	1.56	0.20	-2.46	0.0	0.0	0.00	0.00
6	V	U	B	0.15	1.45	1.05	1.13	-0.90	0.15	0.65	1.08	1.02	0.34	-2.21	0.0	0.0	0.00	0.00
7	V	U	B	0.18	1.54	1.03	1.18	-0.85	0.18	0.72	1.09	0.49	0.50	-1.96	0.0	0.0	0.00	0.00
8	G	U	B	0.21	1.54	0.96	1.24	-0.75	0.20	0.26	1.19	0.41	0.54	-1.92	0.0	0.0	0.00	0.00
9	L	U	B	0.19	1.33	1.16	1.23	-0.97	0.22	0.45	1.43	0.53	0.53	-2.14	0.0	0.0	0.00	0.00
10	K	U	U	0.21	1.09	1.03	1.21	-0.82	0.21	1.37	0.74	1.01	0.79	-2.12	0.0	0.0	0.00	0.00
11	A	U	U	0.19	1.11	1.14	1.19	-0.95	0.21	2.23	1.80	1.62	0.83	-2.06	0.0	0.0	0.00	0.00
12	A	U	U	0.20	0.88	1.13	1.20	-0.93	0.23	2.40	1.86	2.46	0.89	-2.23	0.0	0.0	0.00	0.00
13	K	U	U	0.21	0.83	1.16	1.29	-0.95	0.25	3.07	2.17	1.91	0.46	-2.70	0.0	0.0	0.00	0.00
14	V	U	U	0.12	0.70	1.13	1.32	-1.01	0.14	0.00	0.00	1.19	0.19	-3.11	0.0	0.0	0.00	0.00
15	A	U	U	0.13	0.79	0.85	1.39	-0.73	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	-3.21	0.0	0.0	0.00	0.00

AA# S O P TMH BET TUR UND H-T H*T MOMA MOMB INDA INDB MBET DIG OBS SC1 T*60

15 in/new143. XXXX

PROGRAM VERSION
split4.0.