



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**Desenho Racional de Peptídeos Membrano-ativos
Liberadores de Fragmentos Imunomodulatórios por
Proteólise Direcionada pela Membrana**

THIAGO VIANA DE FREITAS

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand

Co-orientadora: Prof. Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno

Brasília, DF

2023

Universidade de Brasília

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**Desenho Racional de Peptídeos Membrano-ativos
Liberadores de Fragmentos Imunomodulatórios por
Proteólise Direcionada pela Membrana**

Thiago Viana de Freitas

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de Brasília como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand

Co-orientadora: Prof. Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno

Área de concentração: Química Orgânica

Brasília - DF

31 de março de 2023

*A Deus, Senhor da minha vida;
aos meus pais, Aluízio e Maria Antônia,
a minha irmã, Talita, a minha sobrinha, Tácita,
e a minha esposa, Jamille
por estarem presentes em todos os momentos da minha vida,
sejam eles bons ou ruins. Amo vocês!*

Agradecimento

Ao Deus Criador, autor e consumidor da minha fé, a Quem devo perante, Sua graça, a minha vida.

A minha esposa, Jamille Vidal, por me apoiar, me compreender e me aguentar nos momentos de maior estresse; por estar comigo independente das circunstâncias e por me permitir amar uma pessoa tão meiga, simpática, carinhosa, forte e linda. Eu te admiro, meu amor, te amo!

Aos meus pais, Aluizio Fernandes e Maria Antônia Viana, por me apoiarem em cada decisão e estarem do meu lado em todos os momentos da minha vida, me proporcionando a forma mais nobre de amor e cuidado. Devo a eles o que sou hoje. Obrigado por tudo!

A minha irmã, Talita Viana, pelo companheirismo, amizade, “puxões de orelha” e por ser um exemplo de determinação e força que me inspiraram durante essa caminhada. Valeu maninha!

A minha sobrinha, Tácia Lacerda, que me fez aprender desde muito novo o que é se dedicar a alguém de todo coração, sem esperar nada em troca, e que me mostra todos os dias o que é o amor puro, sem timidez e sem julgamentos, o simples amor. Chêro!

Ao professor Dr. Guilherme Dotto Brand, pela oportunidade de adquirir tamanho aprendizado com o doutorado, pelo zelo e dedicação prestados durante a orientação, além de muita paciência e pela pessoa de fibra e inteligência que é e que me servirá sempre de exemplo, não só na minha vida acadêmica, mas para sempre. Minha gratidão eterna, professor!

A professora Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno, pela co-orientação, aprendizado e paciência, principalmente, durante os vários dias de revisão da estrutura do peptídeo e por sempre ouvir meus áudios enormes e me atender prontamente. Muito obrigado, professora!

A minha colega Dra. Michele Avila dos Santos, que por falar em estrutura do peptídeo, jamais ela teria ficado pronta se não fosse sua ajuda. Obrigado pela disponibilidade e paciência ao me ensinar a manipular os programas de análise do

RMN. E também a todos os colegas do LAQMOS: Thaíssa, Felipe, Luan, e Kadu, pelos momentos de desabafo e descontração nessa árdua jornada.

Aos colegas do grupo de pesquisa LSAB e do laboratório LITMO: João, Éder, Samuel, Fernanda, Marina, Gabriel, Júlia, Luís, Adolfo e Fernandinha pelas discussões acadêmicas e troca de experiências no cotidiano do laboratório. E um agradecimento mais que especial ao Saulo pelos conselhos passados e pela amizade construída que ultrapassa o ambiente de trabalho e ao meu amigo de longa data, Fernando Sá por sempre me salvar na hora do inglês.

Aos colegas do NuPMIA da Faculdade de Saúde: Wanessa, Daniel, Ariane e professor José Leite por toda atenção e prestatividade durante o uso do HPLC e de todo aparato necessário para o desenvolvimento do trabalho. Um agradecimento mais que especial a Dra. Andreanne Vasconcelos pelo tempo, paciência e cuidado disponibilizado, principalmente, durante os ensaios de digestão que não teriam acontecido sem o empenho dela. Finais de semana e altas horas da noite foram momentos comuns de trabalho. Brigadão, Andre!

Aos colegas da Universidade Católica de Brasília: Bianca Lira e professor Marcelo Ramada pelos ensaios biológicos. Também, aos colegas do LEM da Embrapa CENARGEN: José Cardoso-Fh e Carlos Bloch Jr. pela disponibilidade dos espectrômetros de massa e toda expertise. Assim como, ao pessoal do LIM1 do Instituto de Biologia da UnB, na pessoa da professora Kelly Magalhães pelo apoio nos testes biológicos.

Aos colegas do *Centre for Inflammation Research* de Edimburgo, Escócia: Marc Vendrell e Utsa Karmakar, pela idealização e execução dos ensaios de inflamação e confecção do artigo. *Thank you!*

Aos professores Dr. Nuno C. Santos, Dr. Rodrigo Moreira Verly, Dr. Mauro Vicentini Correia e Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado por aceitarem participar da Banca Examinadora.

A Universidade de Brasília e ao Instituto de Química pela infraestrutura necessária para desempenhar minha pesquisa.

E ao Instituto Federal de Brasília pelas horas disponibilizadas para a realização do doutorado e por me proporcionar o prazer de trabalhar em uma excelente instituição de ensino.

Sumário

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xiii
Lista de Anexos	xiv
Lista de Abreviaturas	xv
Resumo	xvii
Abstract	xix
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
3. Referencial Teórico	6
3.1 Peptídeos Intragênicos Antimicrobianos (IAPs)	6
3.2 Interação de Peptídeos com Membranas	9
3.3 Peptídeos membrano-ativos como agentes de acúmulo preferencial em sítios infeccionados	15
3.4 Determinação de estruturas peptídicas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	19
3.5 Peptídeos imunomoduladores mediante a ativação de receptores celulares .	24
3.6 O sítio de clivagem enzimática para a liberação da porção imunomoduladora	28
4. Metodologia	35
5. Resultados e Discussão	49
5.1 Síntese, purificação e identificação do peptídeo Chim2	49
5.2 Avaliação da estrutura secundária de Chim2 por Dicroísmo Circular (CD)	53
5.3 Determinação da estrutura tridimensional do peptídeo Chim2 em micelas de Dodecilsulfocolina (DPC-d38) por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	58
5.4 Ensaios de liberação do peptídeo agonista de FPR2 (Chim2c) mediante tripsinólise de Chim2 em ambiente enriquecido com vesículas fosfolipídicas	69
5.5 Atividade antimicrobiana do peptídeo Chim2	85
5.6 Estímulo dos macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (BMDM) pelo peptídeo WKYM-NH ₂ (Chim2c)	86

5.7 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (<i>ROS</i>) em neutrófilos humanos	89
6. Conclusões	98
7. Referências Bibliográficas	101
Anexos	113

Índice de Figuras

Figura 1. Modelos de interação de AMPs com membrana.	11
Figura 2. Transição de fase em membranas fosfolipídicas.	13
Figura 3. Classificação dos peptídeos em <i>Clusters</i> de acordo com as semelhanças apresentadas na perturbação da transição de fase principal das membranas modelo (vesículas) analisadas por DSC.	14
Figura 4. Gráfico de constelação dos resultados obtidos de HCA para os Hs IAPs junto aos 52 peptídeos estudados por Brand <i>et. al</i> ^{1, 3}	16
Figura 5. Estrutura da molécula CAP-UBI ₂₉₋₄₁	17
Figura 6. Imagens de fluorescência de infravermelho próximo dos ensaios de infecção de camundongos por bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e infecção estéril por LPS após injeção de ICG02 e ICG02-UBI ₂₉₋₄₁	18
Figura 7. Representação em fita da estrutura média restrita minimizada de: (A) CA(1-8) – MA(1-12) e (B) CA(1-8) – ME(1-12).	21
Figura 8. (a) Estrutura de menor energia de Hs02 representada em fita (esquerda) e sobreposição das 10 estruturas de menor energia de Hs02 (direita) na presença de micelas DPC- _{d38} . (b) Característica anfifílica do peptídeo Hs02.	22
Figura 9. Estrutura geral do complexo FPR2-WKYMVm. a. Visão lateral da estrutura do complexo FPR2-WKYMVm. b. Visão extracelular da estrutura do complexo FPR2-WKYMVm.	25
Figura 10. Transativação do EGFR dependente de FPR2 expostas ao WKYMVm nas células de CaLu-6.	27
Figura 11. A. Estrutura primária do peptídeo Chim2 e seu modo de ação esperado. b. Modo de ação do peptídeo Chim2.	31
Figura 12. Modelo proposto para a interação do peptídeo AgrD com a membrana. ⁵⁷ (A) Ancoragem no folheto interno da membrana. (B) Ancoragem através da membrana (transmembrantar).	33
Figura 13. (A) Sequência primária do peptídeo AgrD. (B) Esquema da proteólise de AgrD e da ativação da via de detecção por AIP.	33
Figura 14. Cromatograma da purificação do peptídeo Chim2.	50

Figura 15. Espectro de massa (MS) do peptídeo Chim2 após a purificação por CLAE ([M+H] ⁺ = 2939,704 Da).	51
Figura 16. Espectro de massa da fragmentação do íon precursor [M+H] ⁺ = 2939,704 Da do peptídeo Chim2.	52
Figura 17. (A) Espectros de dicroísmo circular (CD) do peptídeo Chim2 na presença de vesículas de DMPC em diferentes concentrações. (B) Espectros de dicroísmo circular (CD) do peptídeo Chim2 na presença de vesículas 2:1 de DMPC:DMPG em diferentes concentrações.	55
Figura 18. a. Espectros de dicroísmo circular (CD) do peptídeo Hs02 na presença de vesículas de DMPC em diferentes concentrações. b. Espectros de dicroísmo circular (CD) do peptídeo Hs02 na presença de vesículas 2:1 de DMPC:DMPG em diferentes concentrações. c. Helicidade percentual de Hs02 em função da concentração de vesículas (LUVs).	57
Figura 19. Região NH-H α do espectro de ¹ H- ¹ H TOCSY (roxo) e ¹ H- ¹ H NOESY (verde) do peptídeo Chim2 na presença de DPC- <i>d</i> ₃₈	60
Figura 20. Região NH-NH do espectro de ¹ H- ¹ H NOESY do peptídeo Chim2 na presença de DPC- <i>d</i> ₃₈	61
Figura 21. Padrão de conectividades de NOE e padrão de CSI de H α para o peptídeo Chim2 na presença de DPC- <i>d</i> ₃₈ . As intensidades dos NOEs são indicadas pela espessura das barras.	63
Figura 22. a) Representação em fita da estrutura de menor energia do peptídeo Chim2 (esquerda) e sobreposição das 10 estruturas de menor energia do peptídeo Chim2 (direita) na presença de micelas DPC- <i>d</i> ₃₈ . b) Característica hidrofóbica da superfície do peptídeo Chim2. A estrutura à direita mostra a molécula girada 180° em torno do seu eixo vertical.	65
Figura 23. Perfil de RMSD do peptídeo Chim2.	67
Figura 24. Gráfico Ramachandran do peptídeo Chim2.	68
Figura 25. Espectros de massa dos ensaios de digestão do peptídeo Chim2 no tempo de 0 minuto para: (A) Condição 1, (B) Condição 2 e (C) Condição 3.	70
Figura 26. Espectros de massa dos ensaios de digestão do peptídeo Chim2 no tempo de 60 minutos para: (A) Condição 1, (B) Condição 2 e (C) Condição 3.	71

Figura 27. Espectro de massa da fragmentação do peptídeo WKYM-NH ₂ [M+H] ⁺ = 626, 310 Da.	72
Figura 28. Espectro de massa da fragmentação do peptídeo GFISGGKR [M+H] ⁺ = 821,473 Da.	73
Figura 29. Espectro de massa da fragmentação do peptídeo FIKGFISGGKR, aproximadamente [M+H] ⁺ = 1209,7 Da.	74
Figura 30. Espectros de massa dos ensaios de digestão do peptídeo Chim2 no tempo de 120 minutos para: (A) Condição 1, (B) Condição 2 e (C) Condição 3.	75
Figura 31. Cromatograma do peptídeo padrão WKYM-NH ₂ na concentração de 100 µM.	76
Figura 32. Curva de calibração para o peptídeo WKYM-NH ₂	76
Figura 33. Cromatogramas dos ensaios de digestão do peptídeo Chim2 no tempo de 60 minutos para: a. Condição 1, b. Condição 2 e c. Condição 3.	77
Figura 34. Quantificação do peptídeo WKYM-NH ₂ (Chim2c) em função do tempo de reação de 0 a 240 minutos para as Condições 1, 2 e 3.	80
Figura 35. Concentração dos peptídeos Chim2 e Chim2c (WKYM-NH ₂) nos tempos de 0, 30, 60, 120, 240 e 480 minutos para a Condição 4 (25 µM de Chim2 em 1 mM de 2:1 DMPC:DMPG (razão de 1:40 peptídeo:vesículas)).	81
Figura 36. Espectro de massa do ensaio de digestão do peptídeo Chim2 para a Condição 4 (25 µM de Chim2 em 1 mM de 2:1 DMPC:DMPG (razão de 1:40 peptídeo:fosfolipídeos)) no tempo de 60 minutos.	82
Figura 37. Espectro de massa da fragmentação do peptídeo KWAVKIIRKFIKGFISGGKR [M+H] ⁺ = 2332,471 Da.	83
Figura 38. Espectro de massa da fragmentação do peptídeo KWAVKIIRKFIKGFISGGKRWK [M+H] ⁺ = 2646,453 Da.	83
Figura 39. Ilustração do comportamento de hidrólise de Chim2, por tripsina, na presença de vesículas.	84
Figura 40. Indução de corpúsculos lipídicos pelo peptídeo WKYM-NH ₂ (Chim2c) e LPS em BMDMs de camundongos.	87
Figura 41. Liberação de interleucinas em BMDMs de camundongos pelos peptídeos WKYM-NH ₂ (Chim2c) e Hs02 e LPS.	88

Figura 42. Viabilidade celular de neutrófilos humanos incubados com peptídeos avaliada por meio do ensaio de redução de MTT.	90
Figura 43. Coloração vivo/morto de neutrófilos humanos preparados com LPS após 30 minutos de incubação com peptídeos.	92
Figura 44. A. Viabilidade de fibroblastos humanos (Detroit 551) após 24 e 48 horas de exposição a várias concentrações do peptídeo Chim2. B. Efeito de Chim2 na hemólise de eritrócitos humanos após 1h de incubação com diferentes concentrações do peptídeo.	93
Figura 45. Produção total de ROS em neutrófilos humanos não induzidos com agentes pró-inflamatórios.	94
Figura 46. Produção total de ROS em neutrófilos humanos induzidos com LPS. ...	96

Índice de Tabelas

Tabela 1. Dados de helicidade percentual do peptídeo Chim2 na presença de LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG nas concentrações de 0 e 2 mM.	55
Tabela 2. Valores de deslocamentos químicos de ^1H (ppm) dos resíduos de aminoácido do peptídeo Chim2 na presença de DPC- d_{38}	61
Tabela 3. Estatísticas estruturais das 10 estruturas de menor energia do peptídeo Chim2 na presença de micelas de DPC- d_{38}	67
Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) de Chim2 e Hs02 para bactérias patogênicas humanas (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>).	85

Lista de Anexos

Anexo A. Espectros de massa dos ensaios de digestão do peptídeo Chim2 nos tempos de 30 e 240 minutos para as Condições 1, 2 e 3, na razão 1:10 peptídeo:fosfolípídeo.	113
Anexo B. Tabela dos aminoácidos com sua respectiva representação em uma letra, representação em três letras e sua massa monoisotópica e tabela dos fragmentos teóricos da hidrólise do peptídeo Chim2.	115
Anexo C. Cromatogramas, espectros de MS e espectros de MS/MS dos peptídeos alternativos da hidrólise de Chim2 (GFISGGKRWKYM-NH ₂ e GGKRWKYM-NH ₂).	117
Anexo D. Espectros de MS e MS/MS do peptídeo sintético WKYM-NH ₂	122
Anexo E. Curva de calibração do peptídeo Chim2.	124
Anexo F. Produção de ROS em neutrófilos humanos previamente incubados com TNF- α	125
Anexo G. Estrutura dos aminoácidos (em destaque, as cadeias laterais).	126

Lista de Abreviaturas

ACN	Acetonitrila
AIP	Peptídeo Auto Indutor
AMP	Peptídeo Antimicrobiano
BMRB	Banco de Dados Magnéticos Biológicos (<i>Biological Magnetic Data Bank</i>)
CAP	Cloranfenicol
CD	Dicroísmo Circular
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CSI	Índice de Deslocamento Químico
DCM	Diclorometano
DIC	N,N-diisopropilcarbodiimida
DMF	N,N – dimetilformamida
DMPC	Dimiristoil Fosfatidilcolina
DMPG	Dimiristoil Fosfatidilglicerol
DPC-d38	Dodecilsfosfocolina
DSC	Calorimetria de Varredura Diferencial
ECA	Enzima de Conversão Angiotensina I
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
Fmoc	Fluorenilmetiloxicarbonil
FPR2	Receptor Formil Peptídico 2
HCA	Análise Hierárquica de Agrupamento
IAP	Peptídeo Antimicrobiano Intragênico
KCN	Cianeto de Potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
LUV	Vesícula Unilamelar Grande
MRE	Elipcidade Residual Média
MS	Espectrometria de Massa
NOE	Efeito Nuclear <i>Overhauser</i>

NOESY	Espectroscopia de Efeito Nuclear <i>Overhauser</i> (<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
PAMP	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCA	Análise do Componente Principal
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvio Quadrático Médio (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
SPFS	Síntese de Peptídeo em Fase Sólida
STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>)
TFA	Ácido Trifluoroacético
Tm	Temperatura de Transição
TMSP-d4	3-trimetilsililpropionato de sódio
TOCSY	Espectroscopia de Correlação Total (<i>Total Correlation Spectroscopy</i>)
TR	Tempo de Retenção
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
UFC	Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

Peptídeos com características anfifílicas e catiônicas podem ser usados para o carregamento de fármacos conjugados para regiões acometidas por infecções bacterianas com o objetivo de potencializar sua ação antibiótica direta. Contudo, tão importante quanto esta ação, é também, a modulação da resposta imune do organismo hospedeiro frente o processo infeccioso neste microambiente. No presente trabalho, o peptídeo Chim2 (estrutura primária: KWAVKIIRKFIKGFISGGKRWKYM-NH₂) foi idealizado como uma quimera peptídica formada por um domínio que se liga preferencialmente a membranas de células procarióticas (Chim2a), um sítio de hidrólise enzimática (Chim2b) e um peptídeo agonista do receptor de formil peptídeos 2 (FPR2), chamado de Chim2c. Dessa maneira, o peptídeo adsorve preferencialmente em membranas de procariotos carregando uma porção capaz de ativar o sistema imune após hidrólise da molécula parental, Chim2, pelo arsenal enzimático local. Chim2 foi sintetizado e purificado. Sua estrutura foi investigada e determinada por dicróismo circular (CD) e ressonância magnética nuclear (RMN). A hidrólise de Chim2 livre e associado a membranas modelo foi analisada por espectrometria de massa (MS) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além disso, foram conduzidos ensaios de ativação de macrófagos peritoneais murinos (BMDM) e de produção de ROS em neutrófilos humanos para verificação do potencial imunomodulador tanto de Chim2, quanto de seu fragmento, Chim2c. Os dados demonstram que Chim2 é antimicrobiano e interage preferencialmente com vesículas de carga negativa estruturando-se em hélice- α de Ala3 a Phe14, expondo o restante de sua cadeia como uma cauda desestruturada, direcionando a hidrólise por enzimas e a liberação do fragmento agonista de FPR2. Foi demonstrado que este fragmento induziu o acúmulo de corpúsculos lipídicos em macrófagos de camundongos e a liberação de interleucinas imunomoduladoras. Estes dados indicam a viabilidade da estratégia do uso da adsorção em membranas como forma de indução de proteólise seletiva em peptídeos e provém informações acerca do desenho racional de fármacos que utilizem estratégia similar, demonstrando que peptídeos com atividades

antimicrobianas e imunomoduladoras podem ser grandes aliados no desenvolvimento de novos medicamentos.

Palavras-chave: Peptídeo Antimicrobiano (AMP); Interação Peptídeo-Membrana; Proteólise; Ressonância Magnética Nuclear (RMN); Antibiótico; Design de Fármacos; Imunologia.

ABSTRACT

Peptides with amphiphilic and cationic characteristics can be used to carry conjugated drugs to regions affected by bacterial infections in order to enhance their direct antibiotic action. However, the modulation of the immune response of the host organism against the infectious process in this microenvironment is also important. In this work, the Chim2 peptide (primary structure: KWAVKIIRKFIKGFISGGKRWKYM-NH₂) was idealized as a chimeric peptide composed of a domain which binds itself preferably to prokaryotic cell membranes (Chim2a); an enzymatic hydrolysis site (Chim2b); and an agonist peptide of the formyl peptide receptor 2 (FPR2), denominated Chim2c. Thus, Chim2 is preferentially adsorbed on prokaryotes' membranes, carrying a portion capable of activating the immune system after its hydrolysis by the local enzymatic arsenal. Chim2 was synthesized and purified, and its structure was determined by circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR). In addition, murine peritoneal macrophage activation (BMDM) and ROS production in human neutrophils assays were conducted to verify the immunomodulatory potential of both Chim2 and its fragment, Chim2c. Data demonstrate that Chim2 is antimicrobial and preferentially interacts with negatively charged vesicles, forming an α -helix from Ala3 to Phe14, exposing the rest of its chain as an unstructured tail, directing hydrolysis by enzymes and the release of the agonist fragment of FPR2. This fragment induced the accumulation of lipid droplets in mouse macrophages and the release of immunomodulatory interleukins. These data indicate the viability of the strategy of using membranes adsorption as a way of inducing selective proteolysis in peptides and provide information about the rational design of drugs that use a similar strategy, demonstrating that peptides with antimicrobial and immunomodulatory activities could be great allies on the development of new drugs.

Keywords: Antimicrobial Peptide (AMP); Peptide-Membrane Interaction; Proteolysis; Nuclear Magnetic Resonance (NMR); Antibiotic; Drug Design; Immunology.

1. Introdução

Algumas proteínas são fontes de peptídeos encriptados, que ao serem liberados de suas cadeias proteicas parentais, podem agir em diferentes alvos moleculares, apresentando variadas atividades biológicas, como atividade antimicrobiana. Esses peptídeos, chamados de peptídeos antimicrobianos intragênicos (*IAPs*, do inglês *Intragenic Antimicrobial Peptides*) por nosso grupo, apresentam propriedades físico-químicas semelhantes aos peptídeos antimicrobianos (*AMPs*) convencionais, e podem ser utilizados para diversos fins biotecnológicos como em saúde humana, agricultura e conservação de alimentos.^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7}

Os *IAPs* podem apresentar atividades diferentes de suas proteínas originais, ou seja, quando retirados de sua matriz proteica, podem desempenhar atividades distintas da proteína precursora, independentemente de sua origem.^{1, 2, 3, 4} Essas atividades são decorrentes de suas características físico-químicas, como anfifilicidade, hidrofobicidade, estrutura secundária, carga líquida e outras que norteiam a ação desses peptídeos frente a membranas celulares.^{1, 2, 3, 4} Tais características podem ser preditas em um *software* chamado Kamal, que busca em grandes bancos de dados de proteínas, possíveis *IAPs* que possam ser posteriormente sintetizados e testados para avaliação de suas atividades biológicas.^{1, 2, 3}

Um exemplo de *IAP* obtido por essa metodologia foi o Hs02 (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂), um peptídeo de carga líquida positiva originado da proteína miosina não convencional-1h, que apresenta significativa atividade anti-inflamatória e antimicrobiana e estruturação (em hélice- α) na presença de membranas.⁸ Membranas de células bacterianas apresentam carga líquida negativa, em função da presença de lipopolisacarídeos e ácido teicóico, além de fosfolípidos negativos, como fosfatidilserina e fosfatidilglicerol. Diferentemente, células de mamíferos apresentam membrana de carga neutra devido ao excesso de fosfolípidos zwitteriônicos como fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina.^{5, 9}

Dados anteriores obtidos por nosso grupo indicam que o peptídeo Hs02 interage preferencialmente com membranas de carga negativa e que essa

interação apesar de forte, é superficial.⁸ Essa característica faz com que o peptídeo possa ser usado como base para o desenvolvimento de um potencial carreador de fármacos ou de moléculas ativadoras do sistema imune, sendo direcionado para a região infeccionada, aumentando sua eficácia e minimizando efeitos colaterais indesejados e de resistência.^{10, 11}

Para isso, o peptídeo Hs02 teve sua estrutura modificada, sendo acrescido de dois domínios proteicos adicionais com objetivos distintos. O primeiro é um sítio de clivagem enzimática composto por resíduos de aminoácidos específicos para proteases com atividade do tipo tripsina. Além disso, foi introduzido um segmento que funciona como um “espaçador”, com capacidade de desestruturar o peptídeo, permitindo maior liberdade conformacional. Com isso, o sítio de clivagem fica, idealmente, livre para a ação enzimática.^{12, 13, 14} A ação da enzima no sítio de clivagem promove a liberação do segundo domínio proteico, o qual age como um ativador do sistema imune. Esse domínio é formado pelo peptídeo WKYM-NH₂, um agonista do receptor de formil peptídeo 2 (FPR2), receptor este que está envolvido em um grande número de respostas fisiológicas a patógenos, como a estimulação de leucócitos fagocitários, quimiotaxia, apoptose e liberação de citocinas.^{15, 16, 17}

Com esse tipo de construção em mente, um peptídeo de 24 aminoácidos foi obtido em laboratório por meio da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS)¹⁸: Chim2 (KWAVKIIRKFIKGFISGGKRWKYM-NH₂), o qual possui três regiões distintas que atuam, idealmente, em conjunto para proporcionar o estímulo do sistema imune em uma situação de infecção bacteriana através de uma proteólise seletiva induzida por membrana. A primeira região (Chim2a – KWAVKIIRKFIKGFIS-) é composta pelo peptídeo Hs02, sendo sua única diferença a troca da arginina 5, por uma lisina, e serve para direcionar o peptídeo à região infectada devido a sua interação preferencial com membranas bacterianas; a segunda (Chim2b - -GGKR-) é formada por uma região espaçadora e por um sítio de clivagem enzimática, permitindo maior liberdade conformacional e, portanto, livre acesso enzimático ao sítio hidrolítico que libera, por último, (Chim2c - -WKYM-NH₂) um peptídeo imunomodulador

capaz de ativar o sistema imune do organismo pela ativação do receptor de membrana do tipo FPR2.¹⁷

Com o peptídeo em mãos, diversos experimentos foram realizados para avaliar desde sua interação com membranas à liberação e quantificação da porção imunomodulatória; até a definição de sua estrutura tridimensional por RMN; à também, testes biológicos de ação inflamatória, antimicrobiana, concentração inibitória mínima (CIM) e obtenção de espécies reativas de oxigênio (*ROS*).

2. Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo geral sintetizar e caracterizar o peptídeo Chim2 para avaliação de sua ação antimicrobiana, de seu padrão de digestão enzimática e da capacidade imunomodulatória de seu fragmento peptídico Chim2c.

2.2 – Objetivos Específicos

1. Sintetizar, purificar e caracterizar o peptídeo Chim2.
2. Avaliar a estrutura secundária de Chim2 na presença de vesículas unilamelares (LUVs) compostas por dimiristroil fosfatidilcolina (DMPC) e 2:1 DMPC:DMPG (dimiristroil fosfatidilglicerol) por Dicroísmo Circular (CD).
3. Determinar a estrutura tridimensional de Chim2 por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).
4. Realizar ensaios de digestão enzimática do peptídeo Chim2 na ausência e presença de vesículas modelo (LUVs) de carga negativa e neutra para avaliação da liberação de Chim2c mediante tripsinólise.
5. Observar o padrão de digestão enzimática do peptídeo por Espectrometria de Massa (MS).
6. Quantificar a liberação do peptídeo Chim2c após hidrólise de Chim2 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
7. Avaliar a ação antimicrobiana do peptídeo Chim2 frente a diferentes cepas bacterianas.
8. Avaliar a capacidade inflamatória do peptídeo Chim2c através de testes de ativação de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de camundongos e liberação de interleucinas.
9. Estimar a viabilidade celular em neutrófilos humanos dos peptídeos Chim2, Chim2c e outros peptídeos fragmentos através do ensaio de redução de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio).

10. Quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio (*ROS*) em neutrófilos humanos pelos peptídeos Chim2, Chim2c e outros peptídeos fragmentos.

3. Referencial Teórico

3.1 – Peptídeos Intragênicos Antimicrobianos (IAPs)

Os peptídeos são biomoléculas formadas por resíduos de aminoácidos que se ligam por meio de ligação peptídica. Eles têm ocorrência natural em seres vivos, mas também podem ser sintetizados em laboratório. Os peptídeos exercem diversas funções no organismo, desde a atuação como hormônios até o papel de proteção e combate a doenças e organismos patogênicos.⁶

Dentre esses peptídeos, os chamados peptídeos antimicrobianos (AMPs), tem despertado o interesse dos pesquisadores devido às suas atividades antibiótica, anti-inflamatória, antiviral, antifúngica e também contra células cancerosas.^{5, 6, 7} Os AMPs são produzidos pelo organismo com função de defesa, combatendo diretamente os patógenos ou as células doentes, ou mesmo, estimulando o sistema imune para resposta contra a doença.⁷

Muitos desses AMPs são encontrados em sua forma madura, porém não são produtos gênicos diretos, advindo da proteólise de uma cadeia proteica parental. Essa observação motivou alguns pesquisadores a buscar em cadeias proteicas maduras segmentos que, quando retirados do contexto de suas proteínas parentais, apresentam também atividade antimicrobiana. Trata-se de um fenômeno conhecido, amplamente, como encriptação, não sendo esse restrito somente à atividade antimicrobiana, mas também à diversas outras atividades biológicas. Assim, quando liberados, esses peptídeos podem apresentar atividades biológicas diferentes de suas proteínas parentais.^{1, 2, 3, 4, 19, 20, 21, 22, 23, 24}

Os peptídeos antimicrobianos que se encontram encriptados em uma cadeia proteica e que, uma vez liberados, podem interagir com diversos alvos biomoleculares, são chamados de Peptídeos Antimicrobianos Intragênicos (IAPs).^{1, 2, 3} Essa nomenclatura será usada predominantemente no trabalho em questão, porém, outros nomes são encontrados na literatura para eles, como peptídeos crípticos,^{21, 23} criptoínas²¹ e criptídeos²². Os IAPs podem apresentar uma atividade distinta de sua cadeia proteica original, devido a características

físico-químicas específicas que governam os mecanismos de ação desses peptídeos, possibilitando assim, novas atividades que não eram manifestas quando restritos a estrutura da proteína parental.^{1, 2, 3, 4, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,}

28

Os IAPs se tornaram um grande campo de pesquisa no desenvolvimento de fármacos e produtos biotecnológicos. O leque de fontes proteicas para suas obtenções é vasto e explorar a enorme quantidade de proteínas conhecidas na busca por eles utilizando uma abordagem experimental seria extremamente trabalhoso, demandando grande quantidade de tempo e dinheiro.

Buscando uma maneira de facilitar essa busca, Brand e colaboradores descreveram uma nova metodologia para identificar supostos peptídeos antimicrobianos encriptados em proteínas a partir da similaridade físico-química destes segmentos proteicos específicos com AMPs α -helicoidais provenientes de bancos de dados.¹ Utilizando um *software* chamado Kamal, desenvolvido no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,²⁹ eles selecionaram e sintetizaram 15 peptídeos com características físico-químicas semelhantes a AMPs e os testaram para atividade antimicrobiana.^{1, 4} Os parâmetros foram sugeridos com base nas características físico-químicas necessárias para os AMPs interagirem com membranas celulares, como: número de resíduos, hidrofobicidade média, momento hidrofóbico, carga líquida, anfifilicidade, entre outras, parâmetros que norteiam os mecanismos de ação desses peptídeos e suas atividades.^{1, 2, 3, 4} Basicamente, o operador do software efetuou a busca de segmentos compatíveis em cadeias proteicas já conhecidas, nesse caso em proteínas da espécie *Glycine max* (soja), através de parâmetros físico-químicos estipulados, e então, dentro dessas cadeias de proteínas, foram sugeridas sequências peptídicas com essas características físico-químicas e provável atividade similar à AMPs. Dos 15 peptídeos sintetizados, 6 apresentaram atividade inibitória contra pelo menos um dos patógenos testados. Além disso, esses peptídeos foram testados frente a vesículas unilamelares grandes (LUVs), constituídas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), vesículas de carga neutra, e uma mistura 2:1 de dimiristoilfosfatidilcolina:dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPC:DMPG), vesículas carregadas negativamente, por calorimetria de

varredura diferencial (DSC) e dicroísmo circular (CD), para avaliação de sua interação com membranas, possibilitando a identificação de similaridades no modo de interação dos peptídeos.

O desenvolvimento de uma ferramenta capaz de prever *in silico* estruturas peptídicas baseadas em um banco de dados de proteínas é uma maneira prática de obter IAPs de diferentes fontes, ampliando e facilitando bastante o trabalho do pesquisador.

Ampliando o escopo de IAPs obtidos por essa metodologia, Ramada e colaboradores apresentaram a identificação e as atividades biológicas de diversos peptídeos intragênicos originais de proteínas de plantas de 4 diferentes espécies (*Theobroma cacao*, *Arabidopsis thaliana*, *Citrus sinensis* e *Gossypium raimondii*) através da busca orientada desenvolvida pelo software Kamal.² Da lista de peptídeos gerados, 21 foram escolhidos, sintetizados e testados para avaliação de sua atividade antimicrobiana e antifúngica e de interação com membranas celulares. A maioria dos peptídeos apresentou uma estrutura não definida na ausência de vesículas, mas na presença delas, praticamente todos se estruturaram em hélice- α , situação comumente observada para muitos AMPs.^{1, 9} Em relação a atividade biológica, 16 peptídeos demonstraram ação contra pelo menos um dos organismos avaliados entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos.

O desenvolvimento de ferramentas computacionais para descoberta de peptídeos encriptados de diferentes fontes proteicas ganhou popularidade e diferentes métodos têm sido estabelecidos por outros grupos de pesquisa para otimizar e aprimorar essa busca.

Pane e colaboradores²³ desenvolveram um método computacional para localizar peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs) contidos em estruturas proteicas, sendo assim chamados de peptídeos crípticos e analisar a estrutura interna de longos CAMPs, para definir com precisão um mapa das características moleculares determinantes de sua atividade antimicrobiana. De maneira resumida, o método consiste em, utilizando uma planilha criada pelos autores no Microsoft Excel, determinar “pontuações antimicrobianas” para peptídeos em cadeias proteicas através de fórmulas matemáticas que levam

em consideração a correlação entre a potência antimicrobiana de um CAMP e suas características físico-químicas como carga líquida, hidrofobicidade e tamanho (quantidade de resíduos). Em função da pontuação atingida, pode-se localizar e determinar a posição destes peptídeos antimicrobianos ocultos e incluindo variáveis específicas de cepas bacterianas, prever, semi-quantitativamente, a eficácia da atividade antimicrobiana destes peptídeos em qualquer cepa desejada.²³ Através do método, os autores identificaram dois novos peptídeos antimicrobianos: um derivado do fator de transcrição Stf76 de um plasmídeo do reino *Archea* e um da região interna da proteína apolipoproteína E humana.²³

Recentemente, Torres e colaboradores²⁴ apresentaram o uso de um *software* que, de maneira semelhante ao Kamal, utilizou as características físico-químicas necessárias para a ação de AMPs frente a membranas para identificar 2603 possíveis peptídeos antibióticos encriptados no proteoma humano derivados de proteínas não relacionadas ao sistema imune. Desses peptídeos, 55 foram sintetizados, caracterizados e testados para ação contra bactérias e 35 apresentaram, pelo menos, algum tipo de ação antibiótica, demonstrando a eficácia do método computacional e a relevância dessas características físico-químicas para a ação biológica dos peptídeos.²⁴

Esses dados demonstram que cadeias proteicas variadas de diferentes fontes podem fornecer IAPs com potencial diversificado e atividades biológicas diferentes de sua proteína-mãe por apresentarem características físico-químicas semelhantes à AMPs α -helicoidais, sendo, portanto, uma área de enorme potencial para pesquisa.

3.2 – Interação de Peptídeos com Membranas

As membranas plasmáticas são formadas, basicamente, por uma bicamada fosfolipídica anfifílica, na qual as regiões hidrofóbicas se unem e deixam os grupos hidrofílicos nas regiões interfaciais (para o interior ou exterior da célula).¹² Dentre os fosfolipídeos que podem compor essa membrana se destacam a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilcolina, ambos zwitteriônicos, que possuem carga líquida neutra, e o fosfatidilglicerol e a fosfatidilserina, os quais

apresentam carga negativa.⁹ Células eucarióticas saudáveis apresentam carga líquida neutra em sua membrana em função da composição majoritária de fosfolípídeos neutros, enquanto as membranas de microrganismos apresentam carga negativa, em função do grande percentual de fosfolípídeos carregados negativamente.^{9, 30, 31}

Embora existam exceções, uma carga líquida positiva é vista como primordial para a atividade antimicrobiana de AMPs e IAPs.^{1, 2, 3, 4, 5, 9, 32} Esses peptídeos costumam ser ricos em resíduos de aminoácidos catiônicos, como lisina e arginina, possuindo, portanto, uma carga líquida positiva que possibilita uma interação eletrostática com membranas negativas.⁹ Outros fatores, como a estrutura secundária do peptídeo e sua anfifilicidade e hidrofobicidade, também são relevantes à interação peptídeo-membrana.^{1, 2, 3, 4, 9}

Peptídeos podem mudar sua estrutura a partir de sua adsorção em membranas. As estruturas secundárias dos peptídeos capazes de interagir com membranas podem ser classificadas em dois grandes grupos: hélice- α e folha- β . Peptídeos que apresentam estrutura em hélice- α , geralmente, se encontram desestruturados em solução e somente se estruturam na presença de membranas celulares, diferentemente dos peptídeos em folha- β que são comumente mais ordenados tanto em solução, quanto na presença de membranas, devido a restrições impostas por ligações dissulfeto ou ciclização da estrutura do peptídeo.^{9, 33} A anfifilicidade faz com que os peptídeos catiônicos, ao interagirem eletrostaticamente com as membranas negativas, se estruturam de maneira que a porção hidrofílica do peptídeo fique em contato com a interface da membrana, enquanto sua porção hidrofóbica interage com a parte alquílica neutra da bicamada, possibilitando a permeação da membrana pelo peptídeo.^{9, 34} Já a hidrofobicidade média é relacionada a proporção de resíduos hidrofóbicos presentes na cadeia peptídica e é importante para gerar um equilíbrio de cargas no peptídeo, otimizando a atividade contra membranas de patógenos, gerando seletividade e menor toxicidade.^{9, 35}

Com base nesses conceitos, modelos teóricos de interação dos peptídeos com membranas são sugeridos na literatura, apresentando diferentes mecanismos de ação para permeabilização frente à bicamadas

lipídicas, os quais ressaltam a importância das características físico-químicas para essa interação (Figura 1).^{5,9}

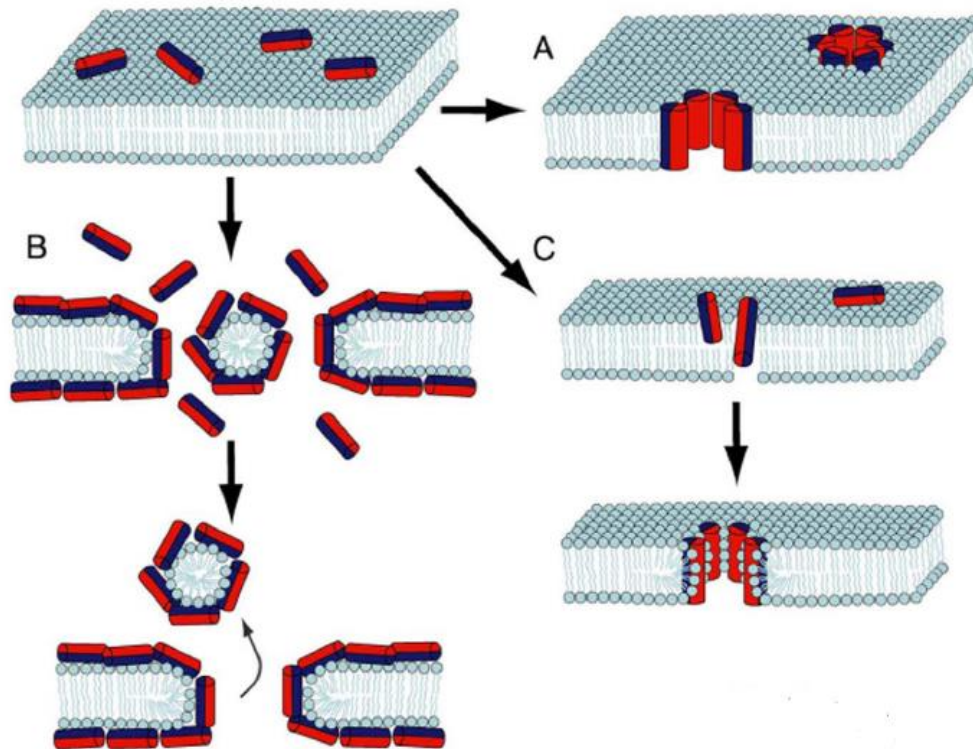


Figura 1. Modelos de interação de AMPs com membrana. Os peptídeos catiônicos interagem eletrostaticamente com a membrana negativa da célula por um mecanismo chamado *carpet model* (modelo “carpete” ou “tapete”) no qual, os peptídeos positivos se unem as “cabeças” negativas dos fosfolipídeos da membrana, recobrimo-a. Após atingirem uma concentração crítica, os peptídeos podem se inserir na membrana através dos modelos de: **(A)** bastão ou ‘*barrel-stave*’, **(B)** detergente ou ‘*detergent-like way*’ e **(C)** poro toroidal ou ‘*toroidal pore*’. A cor vermelha do peptídeo representa a parte hidrofílica, enquanto a cor azul, a parte hidrofóbica.^{5,9} (Figura modificada da ref. 9).

Na figura 1 é mostrado que AMPs catiônicos interagem com a membrana negativa eletrostaticamente, se unindo às “cabeças” carregadas dos fosfolipídeos. A partir daí, os peptídeos podem se inserir na membrana por diferentes mecanismos. No modelo bastão ou ‘*barrel-stave*’ (A), canais são formados através da membrana pelos peptídeos que permanecem em contato com a mesma através de sua região hidrofóbica, permitindo que o “buraco”

formado permaneça aberto. No modelo detergente ou '*detergent-like way*' (B), os peptídeos se intercalam com os grupos polares dos fosfolipídeos forçando uma curvatura da membrana e a posterior formação de micelas. No modelo poro toroidal ou '*toroidal pore*' (C) o peptídeo se insere na membrana através do dobramento da camada através da intercalação de peptídeos com a região polar dos fosfolipídeos formando um poro.^{5, 9}

Além desses modelos, existem outros propostos para os mecanismos de interação de peptídeos com membrana. Esses modelos são variáveis e o estudo é contínuo, pois dependem de fatores como composição da membrana e das relações molares entre peptídeos e fosfolipídeos.^{36, 37}

A fim de compreender a relação entre as propriedades físico-químicas dos peptídeos e suas interações com membrana, Brand e colaboradores³ evidenciaram a classificação dos peptídeos descritos em seus trabalhos anteriores^{1, 2} em determinadas categorias ou *clusters*. Esse estudo se dá relacionando os peptídeos em grupos que apresentam similaridades em sua interação com membranas modelo, por meio de dados obtidos por calorimetria diferencial de varredura (DSC) com posterior aplicação de métodos estatísticos multivariados.³

As bicamadas lipídicas (*L*) possuem uma estrutura ordenada na forma de gel (β), quando em temperatura baixa, inferior à temperatura de transição de seus fosfolipídeos constituintes (*T_m*). A interação da membrana com moléculas membrano-ativas, como os peptídeos antimicrobianos, altera essa estrutura para uma condição mais desordenada (estrutura líquido-cristalina, α), aumentando a fluidez da membrana. Essa transição, $P\beta \rightarrow L\alpha$, ocorre cooperativamente com temperatura de transição (*T_m*) e a variação de entalpia (ΔH) característica para cada fosfolipídeo (Figura 2). Esses parâmetros podem ser obtidos por DSC, logo a transição provocada pela interação peptídeo/membrana pode ser avaliada e fornecer informações de como se dá esse modo de interação.⁴

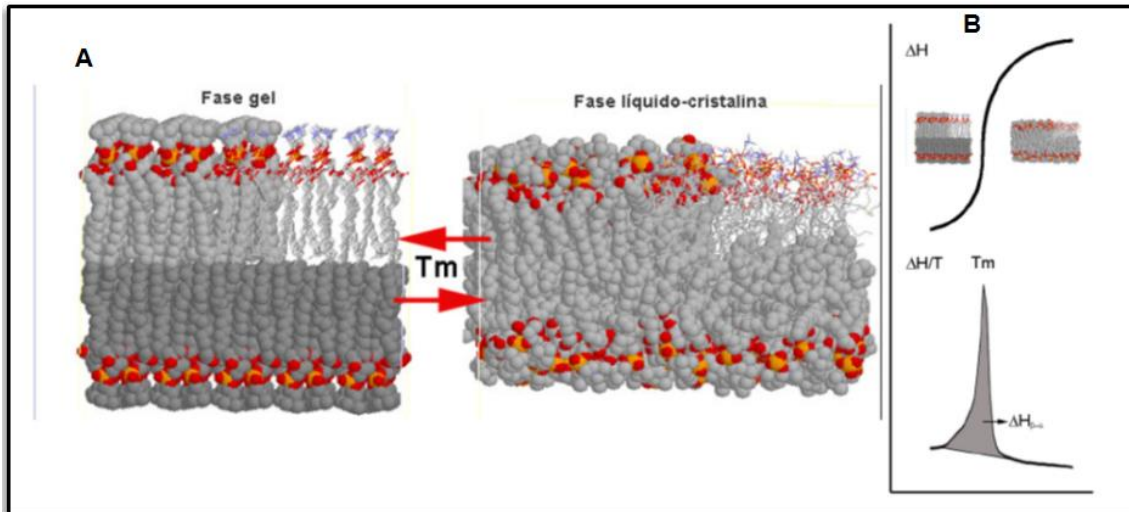


Figura 2. Transição de fase em membranas fosfolipídicas. (A) Mostra a diferença de organização entre a fase gel (β), mais ordenada, para a fase líquido-cristalina (α), menos ordenada. **(B)** Apresenta o esquema de transição de fase $P\beta \rightarrow L\alpha$ mostrando a temperatura de transição (T_m) e a variação de entalpia (ΔH) característicos para cada fosfolípido.⁴ (Figura modificada da ref. 4).

Os peptídeos causam, então, diferentes graus de perturbação na membrana. Efeitos semelhantes na transição da fase principal das membranas indicam um padrão de interação similar dos peptídeos e demonstram que esses têm propriedades físico-químicas análogas relevantes para essas interações. Logo, peptídeos que interagem com a membrana de formas parecidas podem ser classificados em grupos de acordo com a similaridade de suas propriedades.³

No referido trabalho de Brand e colaboradores³, os vinte e um peptídeos estudados no trabalho de Ramada e colaboradores² e mais outros seis AMPs conhecidos (DS01,³⁸ Mag-2a,³⁹ Nattererin-1,⁴⁰ Scaphin-08,⁴¹ PS-2⁴² e HSP-04¹) foram analisados por DSC na presença de LUVs de DMPC e uma mistura 2:1 de DMPC:DMPG e seus resultados submetidos aos métodos estatísticos de Análise do Componente Principal (PCA) seguido por uma Análise Hierárquica de Agrupamento ou '*Clustering*' (HCA) que definiu a classificação deles em 3 diferentes aglomerados ou *clusters* (Figura 3).³

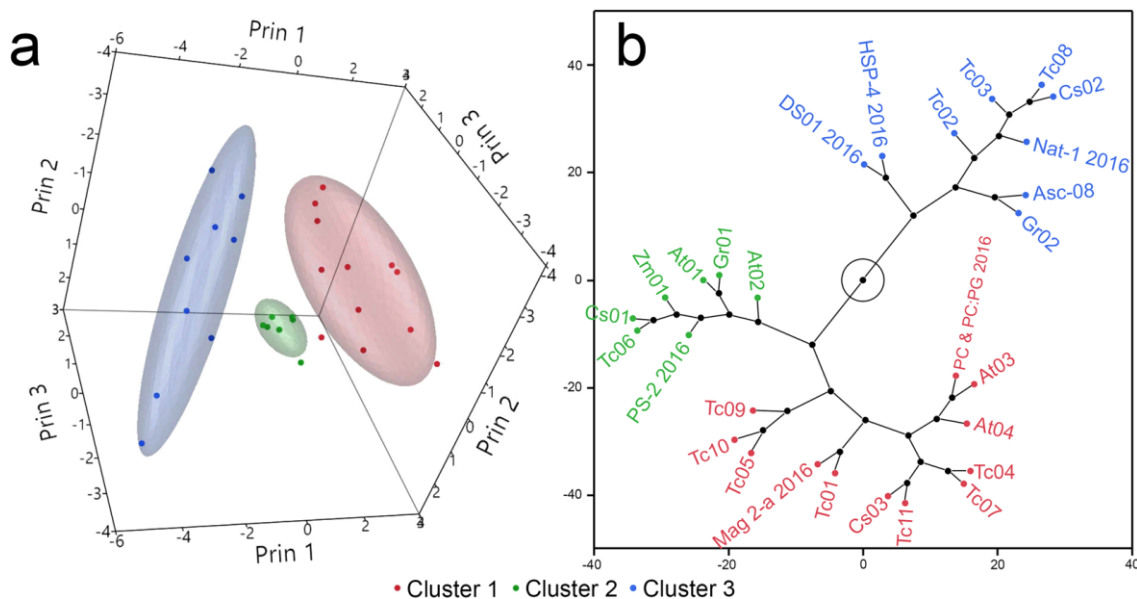


Figura 3. Classificação dos peptídeos em Clusters de acordo com as semelhanças apresentadas na perturbação da transição de fase principal das membranas modelo (vesículas) analisadas por DSC. O método de PCA foi aplicado aos dados de DSC e os cinco primeiros componentes principais, que descrevem, aproximadamente, 87% da variação dos dados, foram registrados. Um algoritmo de HCA foi aplicado nos cinco primeiros componentes principais. **(a)** Gráfico de dispersão 3D das posições dos peptídeos nos três primeiros componentes principais. Os *clusters* de peptídeos foram codificados por cores: Cluster 1 (vermelho), Cluster 2 (verde) e Cluster 3 (azul). **(b)** Gráfico de constelação dos resultados obtidos de HCA que categoriza os peptídeos em grupos discretos. As identidades dos clusters são representadas pelas mesmas cores.³(Figura retirada da ref. 3).

O cluster 1 compreende peptídeos que apresentaram a indução de pequenas alterações na transição da fase principal das vesículas de DMPC, porém, com perturbação significativa na transição de fase de vesículas 2:1 DMPC:DMPG. Já peptídeos dos clusters 2 e 3 apresentaram indução de alterações na transição de fase das vesículas de ambas composições, tendo um comportamento termotrópico semelhante, sendo sua diferença, o fato dos peptídeos do cluster 3 induzirem inserções mais profundas na parte hidrofóbica dos fosfolipídeos constituintes da membrana.³

Avaliados para a atividade antimicrobiana, o Cluster 1 não apresenta atividade detectável, enquanto os Clusters 2 e 3 apresentam atividade média independente dos tipos de microrganismos utilizados, sendo que 9 desses

IAPs, apresentaram resultados comparáveis ou até melhores do que os dos AMPs de referência.³

Todos esses dados apresentados demonstram correlação entre o padrão de interação de IAPs com membranas modelo e a atividade antimicrobiana desempenhada por esses peptídeos.

3.3 – Peptídeos membrano-ativos como agentes de acúmulo preferencial em sítios infeccionados

Com base nos estudos de interação de peptídeos com membrana e no método de agrupamento (“*clusterização*”) estabelecido pelo grupo de pesquisa, é constante a busca por novos IAPs e a avaliação da relação de suas características físico-químicas com suas atividades biológicas.

Em um trabalho mais recente, Brand e colaboradores demonstraram a robustez do software Kamal na busca *in silico* de IAPs provenientes de cadeias internas de proteínas humanas, chamados de *Homo sapiens* IAPs (Hs IAPs).⁸ A busca foi realizada em 160.000 proteínas e 4 peptídeos foram selecionados para síntese em laboratório (Hs01, Hs02, Hs03 e Hs04). Todos esses peptídeos são anfifílicos, foram avaliados estruturalmente por dicróismo circular (desestruturados em solução e estruturados em hélice- α na presença de vesículas) e tiveram sua interação com membranas investigada por DSC. Além disso, sua atividade antimicrobiana foi testada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos. Eles também foram avaliados quanto a toxicidade e exclusivamente o Hs02, quanto a sua capacidade anti-inflamatória.⁸

Dentre esses peptídeos destacou-se o Hs02 (estrutura primária: KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂), derivado da proteína miosina não convencional-1h. No estudo de interação com membranas por DSC, ele apresentou leves variações na transição de fase principal de LUVs de DMPC, mas perturbação mais significativa para as vesículas 2:1 DMPC:DMPG. Esse resultado, junto dos outros Hs IAPs, foram anexados aos dados obtidos para outros 52 peptídeos estudados nos trabalhos anteriores de Brand *et. al.*^{1, 3} e submetidos a uma análise de PCA, para avaliação mais ampla e quantitativa, buscando

mas afetam a transição de fase principal das vesículas de 2:1 DMPC:DMPG de maneira superficial, interagindo com a membrana sem causar grandes perturbações ou lise da mesma.^{8, 43}

Esse tipo de interação é interessante, pois demonstra preferência por estruturas fosfolipídicas de carga líquida negativa (LUVs 2:1 DMPC:DMPG), em função da diferença eletrostática proporcionada pela carga positiva do peptídeo. Ela permite também, um posicionamento superficial em relação a membrana fazendo com que porções do peptídeo se projetem para fora da região interfacial da mesma, e assim, o peptídeo possa servir de base para o desenvolvimento de carreadores de fármaco ou de moléculas imunomoduladoras, como demonstrado na literatura.^{10, 11, 12, 44}

Chen e colaboradores mostraram a utilização de um peptídeo antimicrobiano conhecido pela afinidade a bactérias denominado UBI₂₉₋₄₁, conjugado a um antibiótico (Cloranfenicol, CAP) (Figura 5), como carreador do fármaco. O direcionamento do peptídeo para a região infectada facilitou a entrega do medicamento, e conseqüentemente, aumentou a eficácia terapêutica e minimizou os efeitos colaterais indesejados.¹⁰

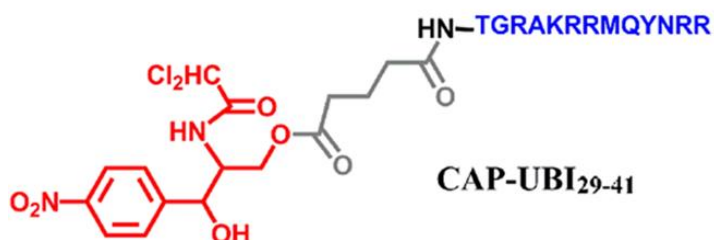


Figura 5. Estrutura da molécula CAP-UBI₂₉₋₄₁. Em vermelho, a estrutura do antibiótico Cloranfenicol; em azul a sequência primária do peptídeo UBI₂₉₋₄₁. (Figura modificada da referência 10).

Para investigar a capacidade de direcionamento do peptídeo para o sítio de infecção, os autores acoplaram ao mesmo um composto fluorescente detectado por infravermelho próximo (ICG02) e testaram em camundongos, *in vivo*, para diferentes infecções bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). A seletividade do peptídeo modificado (ICG02-UBI₂₉₋₄₁) frente a uma inflamação estéril (processo

inflamatório que não envolve agente microbiano) provocada por LPS (Figura 6) também foi avaliada.¹⁰

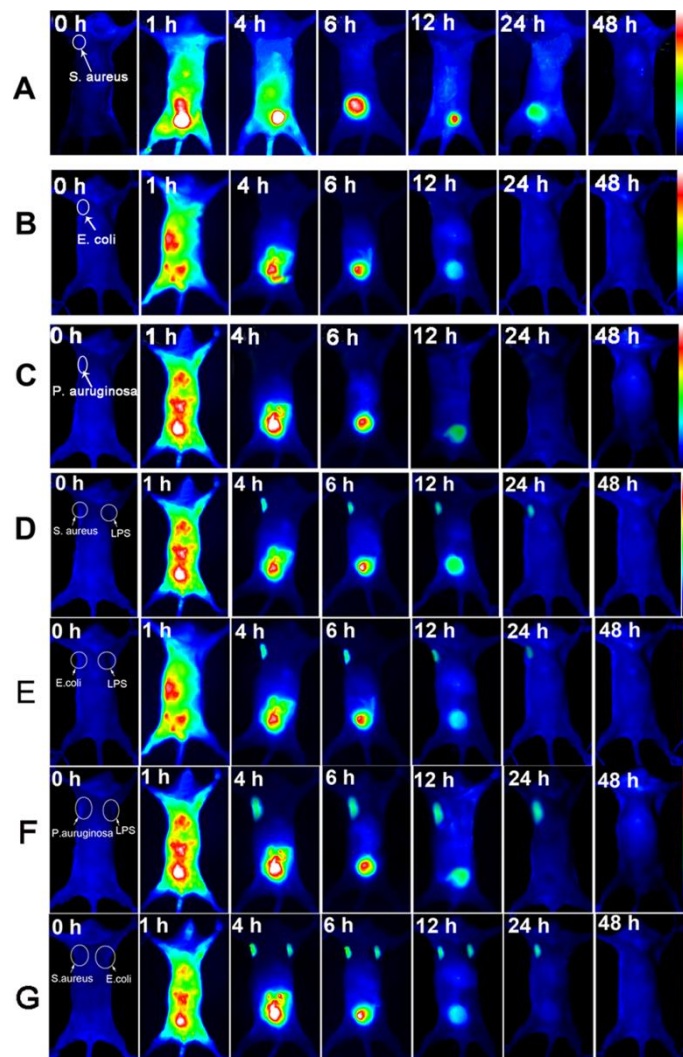


Figura 6. Imagens de fluorescência de infravermelho próximo dos ensaios de infecção de camundongos por bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e infecção estéril por LPS após injeção de ICG02 e ICG02-UBI₂₉₋₄₁. Biodistribuição de ICG02 em camundongos infectados: **(A)** com *S. aureus* (direita) e LPS (esquerda); **(B)** com *E. coli* (direita) e LPS (esquerda); **(C)** com *P. aeruginosa* (direita) e LPS (esquerda). Biodistribuição de ICG02-UBI₂₉₋₄₁ em camundongos infectados: **(D)** com *S. aureus* (direita) e LPS (esquerda); **(E)** com *E. coli* (direita) e LPS (esquerda); **(F)** com *P. aeruginosa* (direita) e LPS (esquerda); **(G)** com *S. aureus* (direita) e *E. coli* (esquerda).¹⁰ (Figura adaptada da ref. 10)

Na figura, as entradas de A a C mostram a injeção somente do fluoróforo, e não é observado nenhum acúmulo preferencial nas regiões tratadas com bactérias ou com LPS. Já as entradas de D à F, apresentam a adição do peptídeo acoplado ao composto fluorescente, mostrando que a partir de 1 hora a fluorescência é distribuída por todo o corpo e que às 4 horas, fica nítido o acúmulo na região que apresenta a infecção bacteriana, mostrando o direcionamento causado pelo peptídeo devido à interação específica deste com as membranas desse tipo de célula. A entrada G, mostra as duas regiões na presença de bactérias e o acúmulo do peptídeo modificado em ambas. Devido a seletividade, segundo os autores, o antibiótico acoplado ao peptídeo (CAP-UBI₂₉₋₄₁) apresentou menor toxicidade às células saudáveis e maior atividade antibacteriana quando comparado ao antibiótico sozinho.¹⁰

Levando em consideração o que foi mostrado no trabalho de Chen¹⁰ e Brand⁸, o peptídeo Hs02 apresenta uma particular forma de interação com membranas e, portanto, possibilidade de ser usado como um portador de fármacos ou de moléculas ativadoras do sistema imune, interagindo preferencialmente com células procarióticas.

3.4 – Determinação de estruturas peptídicas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A compreensão da estrutura adquirida pelo peptídeo após a interação com a membrana é de suma importância para entender a relação desta e as atividades biológicas acarretadas. Para elucidar melhor essa interação, conhecer a estrutura tridimensional do peptídeo é primordial. Para isso pode ser utilizada a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H), através de experimentos de duas dimensões: ¹H-¹H TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) e ¹H-¹H NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*), dos quais é possível observar interações intra- e interresiduais, por acoplamentos escalares e espaciais, que fornecem detalhes estruturais do peptídeo em solução de membranas miméticas através de relações estereoquímicas e conformacionais.⁴⁵ No experimento de ¹H-¹H TOCSY, é possível observar a interação entre átomos de hidrogênio do mesmo

aminoácido através de acoplamentos escalares entre os *spins* de cada átomo. Já no experimento de ^1H - ^1H NOESY, é possível observar interações entre átomos de hidrogênio do mesmo resíduo, assim como, entre átomos de hidrogênios de resíduos diferentes, com uma distância de até 5 Å, através de acoplamentos dipolares pelo espaço em função do Efeito Nuclear *Overhauser* (NOE).^{46, 47}

Um exemplo da utilização da RMN para elucidação da estrutura tridimensional de peptídeos foi mostrado por Oh e colaboradores.⁴⁸ Nesse trabalho eles apresentam a elucidação da estrutura tridimensional por RMN de dois peptídeos antimicrobianos híbridos CA(1-8) - MA(1-12) (estrutura primária - KWKLFFKKIGIGKFLHSAKKF-NH₂) e CA(1-8) – ME(1-12) (estrutura primária - KWKLFFKKIGIGAVLKVLTG-NH₂). A estrutura tridimensional desses peptídeos foi buscada para avaliar a relação da estrutura dos peptídeos com sua atividade antibiótica. Eles mostraram que o peptídeo CA(1-8) - MA(1-12) possui uma estrutura em hélice 3/10 com duas voltas combinadas com uma hélice- α curta na região N-terminal. Ele possui ainda uma região espaçadora no meio do peptídeo, funcionando como uma dobradiça (*hinge*), que faz com que essa região fique dobrada (Figura 7a). Essa estruturação parece essencial para a interação seletiva com células procarióticas, em detrimento do peptídeo CA(1-8) – ME(1-12), que possui interação tanto com células procarióticas, quanto eucarióticas, como as de eritrócitos humanos. Isso provavelmente se dá pela estrutura do peptídeo, que diferente do outro, possui estruturação em hélice- α na região C-terminal com cerca de três voltas e uma estrutura flexível com uma volta na região N-terminal, conectadas por uma região espaçadora, que nos dois peptídeos é formada pela sequência Gly9-Ile10-Gly11, e desestrutura a região que a possui (Figura 7b).

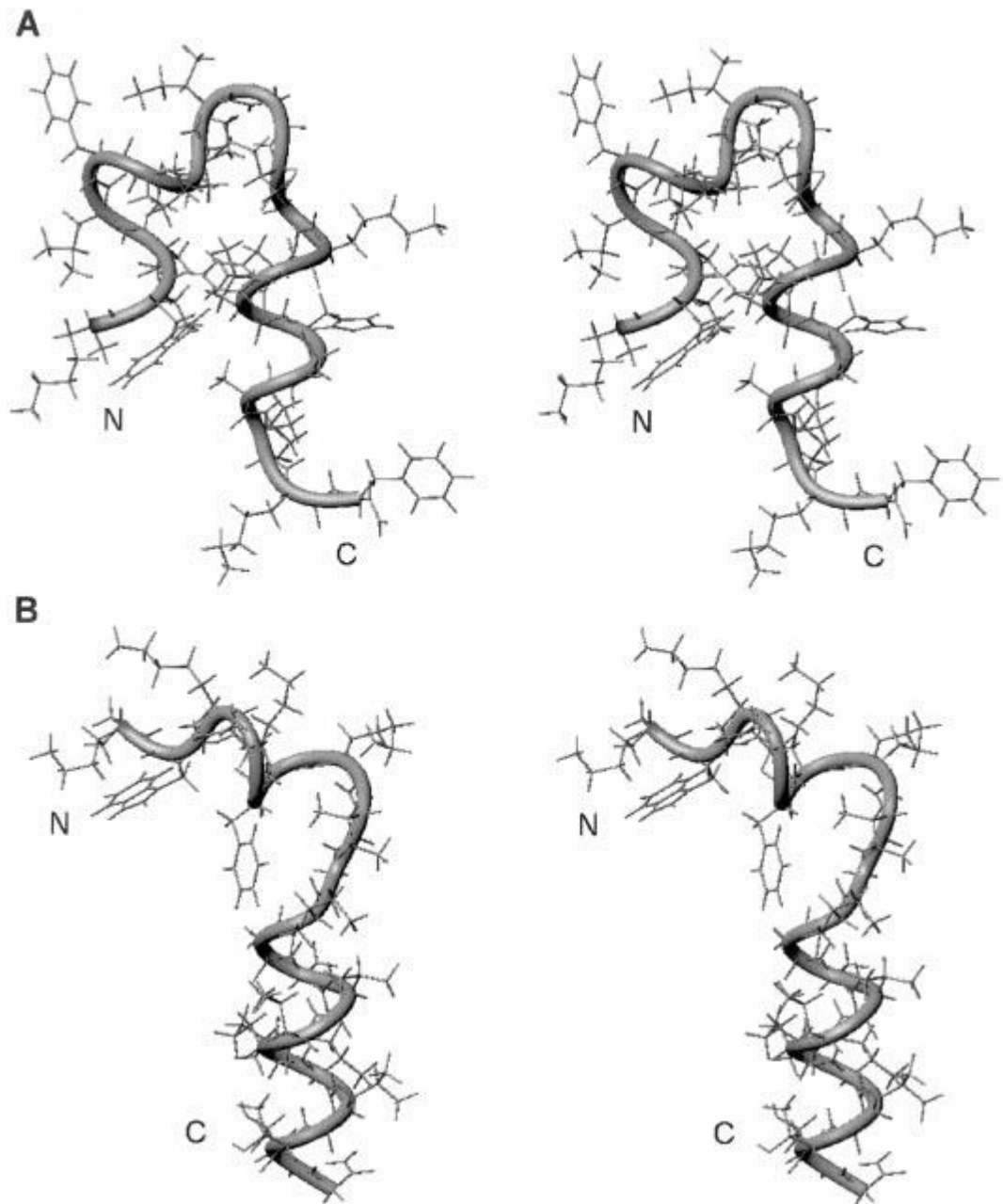


Figura 7. Representação em fita da estrutura média restrita minimizada de: (A) CA(1-8) – MA(1-12) e (B) CA(1-8) – ME(1-12).⁴⁸ (Figura retirada da ref. 48)

O trabalho de Brand e colaboradores⁸ traz a estrutura tridimensional por RMN do peptídeo Hs02 (Figura 8).

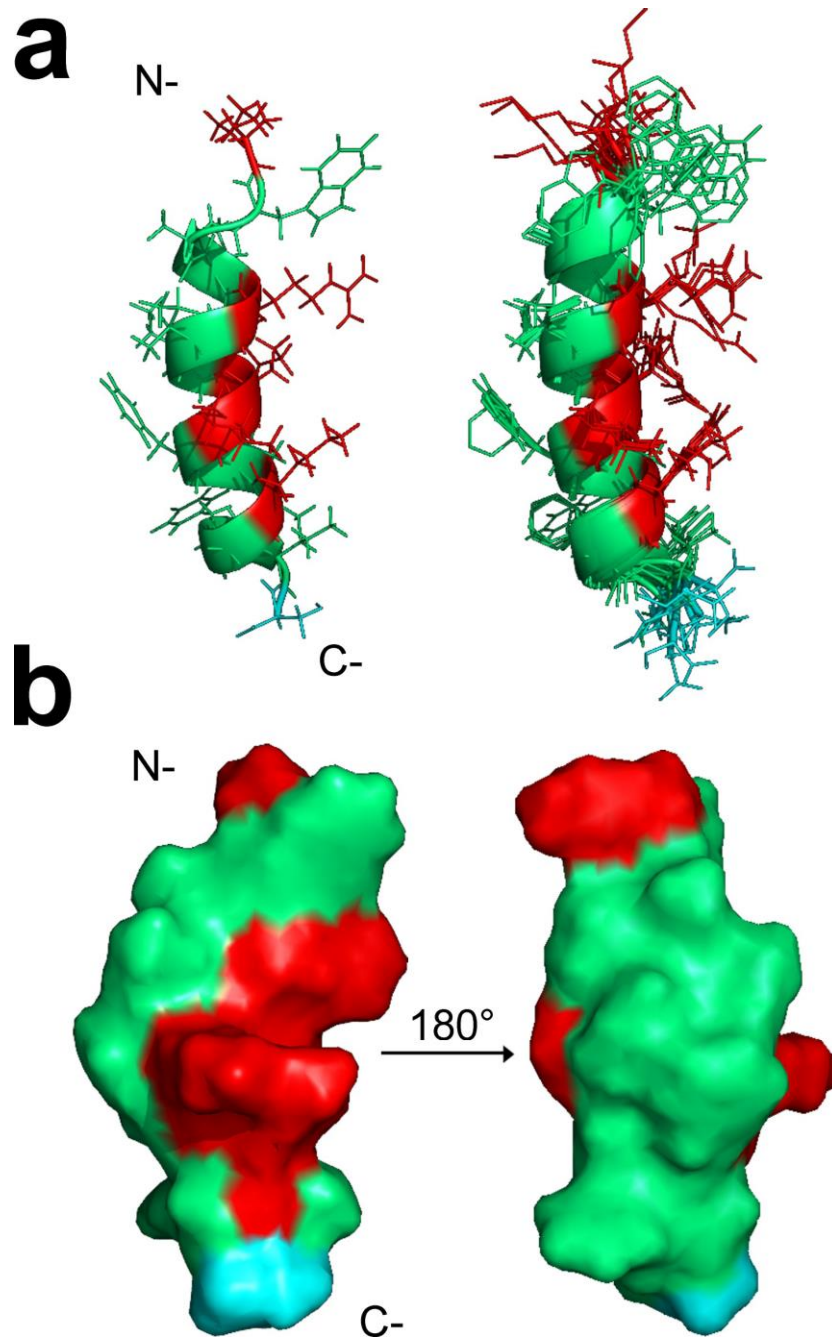


Figura 8. (a) Estrutura de menor energia de Hs02 representada em fita (esquerda) e sobreposição das 10 estruturas de menor energia de Hs02 (direita) na presença de micelas DPC-d38. (b) Característica anfifílica do peptídeo Hs02. As características eletrônicas dos aminoácidos da cadeia lateral são apresentadas nas cores: vermelho para os resíduos carregados positivamente; ciano para os resíduos polares e verde para os resíduos apolares.⁸ (Figura retirada da ref. 8)

A estrutura do peptídeo foi determinada na presença de micelas DPC-_{d38} (dodecilmfosfolina), e com exceção do primeiro resíduo de aminoácido (Lys1),

todos os outros resíduos tiveram seus deslocamentos químicos identificados. A partir dos cálculos do índice de deslocamento químico (em inglês, *CS*) para os H_{α} da cadeia principal, o peptídeo apresentou uma estrutura α -helicoidal anfifílica entre os resíduos Ala3-Phe14, destacando-se uma separação clara entre uma região carregada (formada pelos resíduos Arg5, Arg8, Lys9 e Lys12) e outra apolar; e as regiões N-terminal e C-terminal, desordenadas, indicando uma estrutura aleatória.⁸ Essas características estruturais de Hs02 (estruturação em hélice- α e anfifilicidade) se mostraram relevantes para a ação biológica do peptídeo que apresentou uma ampla e potente atividade antimicrobiana, além de atividade supressora de LPS e anti-inflamatória.⁸

Bessa e colaboradores⁴⁹ apresentaram a avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme do peptídeo Hs02 contra várias cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, inclusive, isolados multirresistentes (MDR). Para a atividade antimicrobiana, eles obtiveram valores de concentração inibitória mínima (CIM) na faixa de 2 a 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do peptídeo Hs02 contra todas as cepas, que são valores baixos e indicativos de ação antimicrobiana eficaz. Com relação à atividade antibiofilme, eles mostraram que, apesar de Hs02 não ser capaz de inibir a formação de biofilmes por algumas cepas, ele afetou biofilmes pré-formados (24 h) reduzindo a viabilidade celular das bactérias de uma espécie, e também, de duas espécies co-ocorrentes.⁴⁵ Além disso, o peptídeo induziu a rigidez da membrana celular de ambas as espécies bacterianas, semelhantemente ao antibiótico Daptomicina, que é usado em últimos casos para o tratamento de infecções causadas por patógenos Gram-positivos multirresistentes.^{49, 50, 51}

No geral, esses resultados sugerem a importância da caracterização da estrutura tridimensional do peptídeo, ao interagir com membranas, por sua relação direta com suas atividades biológicas. Especificamente, para o peptídeo Hs02, vimos que sua estrutura α -helicoidal anfifílica proporciona uma atividade antimicrobiana direta contra células procarióticas, em função de sua interação preferencial com membranas carregadas negativamente. Essa interação que é superficial, porém forte, faz com que o peptídeo possa ser usado como um módulo preliminar de direcionamento de membrana para o desenho racional de moléculas quiméricas. O direcionamento preferencial

dessas moléculas para regiões infeccionadas proporcionaria uma ação específica, aumentando a eficácia do tratamento e minimizando efeitos colaterais indesejados.

3.5 – Peptídeos imunomoduladores mediante a ativação de receptores celulares

Quando um organismo é acometido por uma infecção, o reconhecimento do patógeno se dá, inicialmente, pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que são receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como moléculas bacterianas secretadas ou ligadas à superfície das células.^{15, 16} A ativação destes PRRs leva a uma resposta inflamatória e a ativação do sistema imune.¹⁶ Os receptores de formil peptídeos (FPRs) são PRRs acoplados a proteína G (GPCR) localizados na superfície de variados tipos celulares de animais. Tal proteína faz parte de um grande número de respostas fisiológicas a patógenos.^{15, 16, 52} A ativação dos FPRs se dá por variados agonistas microbianos, estimulando os leucócitos fagocitários que se acumulam nos locais de infecção e combatem os microrganismos invasores.^{15, 53} Os seres humanos expressam três genes FPR: FPR1, FPR2 e FPR3, que podem apresentar variações em suas estruturas dependendo da região do corpo em que atuam (FPRL2, FPRh1, FPRh2, etc).^{15, 16, 52, 53}

O receptor FPR2 é ativado por uma série de ligantes, que incluem desde lipídeos estruturalmente não relacionados à agonistas peptídicos e proteicos, como o lipídeo anti-inflamatório, lipoxina A4 e diversos agonistas endógenos, como a amiloide sérica A (SAA) e a anexina 1. Ele é ativado também, por peptídeos mitocondriais, neuropeptídios e peptídeos antimicrobianos, como o AMP LL-37, que ao se ligarem com FPR2, resultam em diferentes respostas intracelulares de uma maneira específica de acordo com a relação ligante-receptor.¹⁶ Acionado pelos ligantes, o receptor FPR2 ativa seus domínios intracelulares que mediam a sinalização para as proteínas G, que por fim, acionam várias vias de defesa sinal-dependentes de agonistas como a fosforilação das tirosina quinases citosólicas, transativação do receptor da

tirosina quinase, fosforilação e translocação nuclear de fatores reguladores da transcrição, liberação de cálcio, produção de espécies oxidantes, entre outras.¹⁶

Os peptídeos da série W atuam como agonistas específicos para o receptor FPR2, sendo que estes peptídeos tem como estrutura base a sequência de aminoácidos WKYM, podendo ter modificações em sua cadeia com a inserção de outros aminoácidos.^{15, 16, 52, 53, 54, 55, 56, 57} Um potente agonista de FPR2 dos peptídeos da série W é o peptídeo WKYMVm, onde 'm' é o enantiômero *D*- do aminoácido *L*-metionina. Este peptídeo foi isolado de uma biblioteca de peptídeos sintéticos que é formada por sequências aleatórias de hexapeptídeos e se liga ao FPR2 com eficiência maior do que com os outros receptores (FPR1 e FPR3).^{15, 16, 54, 55, 58} Esse peptídeo ao se ligar com o FPR2, ativa as funções de neutrófilos e monócitos, incluindo quimiotaxia, liberação de citocinas e ativação da NADPH oxidase.¹⁶ A estrutura do receptor FPR2 ligada ao agonista WKYMVm já foi publicada (Figura 9).⁵⁸

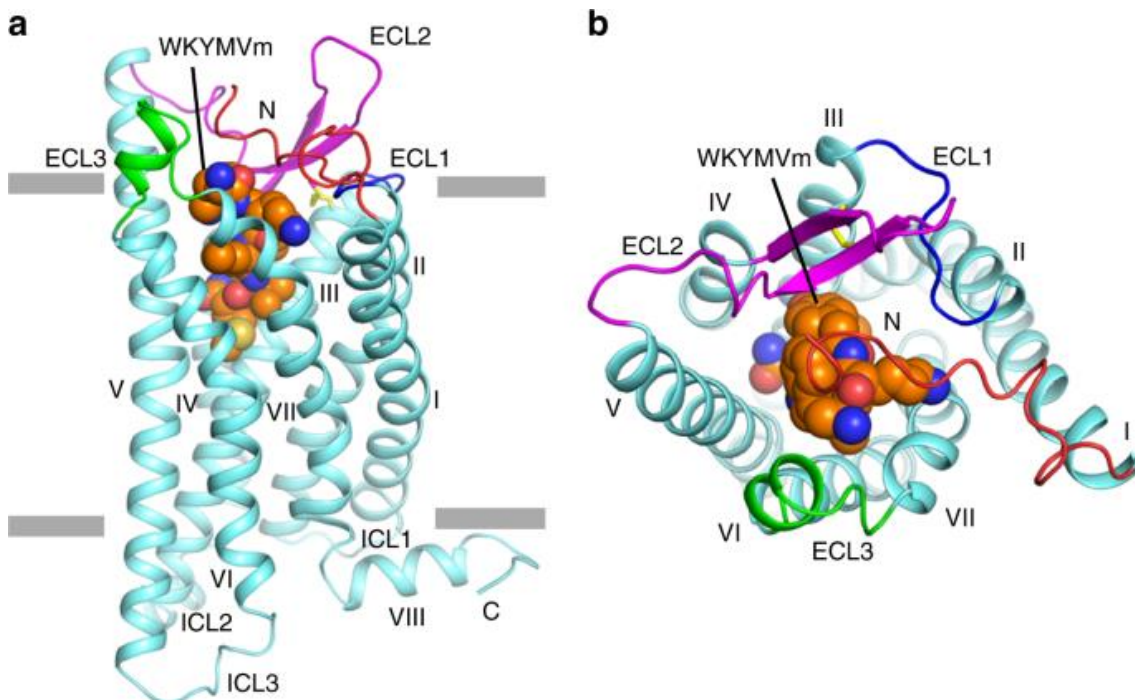


Figura 9. Estrutura geral do complexo FPR2-WKYMVm. a. Visão lateral da estrutura do complexo FPR2-WKYMVm. O receptor FPR2 é mostrado, em geral, na representação em fitas (ciano). Sua região N-terminal está colorido em vermelho, enquanto as alças extracelulares, ECL1, ECL2 e ECL3, estão em azul, magenta e

verde, respectivamente. O peptídeo WKYVMm é representado em modelo de esferas com os carbonos em laranja. A ligação dissulfeto é mostrada como bastões de cor amarela. Os limites da membrana são indicados por blocos de cor cinza. **b. Visão extracelular da estrutura do complexo FPR2-WKYVMm.**⁵⁸ (Figura retirada da referência 58).

O receptor FPR2 apresenta uma conformação estrutural canônica de sete hélices transmembranas (hélices I - VII) (Figura 9a). Além disso, apresenta uma ligação dissulfeto entre a hélice III e a segunda alça extracelular (ECL2) e uma conformação β -grampo dessa alça, que são estruturas compartilhadas por outras GPCRs de peptídeos resolvidos de classe A. Na região extracelular, referente principalmente a região N-terminal, a primeira alça extracelular (ECL1) e ECL2 é formado um tipo de conformação em “*lid*”, como uma tampa, que se fixa no topo da ligação do ligante de FPR2 (Figura 9b).⁵⁸

Um exemplo do agonismo de WKYVMm quando ligado ao receptor FPR2 é a indução da fosforilação da tirosina pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), geração de superóxido dependente de NADPH-oxidase e a atividade da c-Src quinase, em células de câncer de pulmão (Ca-Lu-6), fazendo com que os resíduos de fosfotirosina forneçam locais de ancoragem para o recrutamento e o desencadeamento da via STAT3 (via que controla o processo de proliferação celular) (Figura 10).^{16, 56}

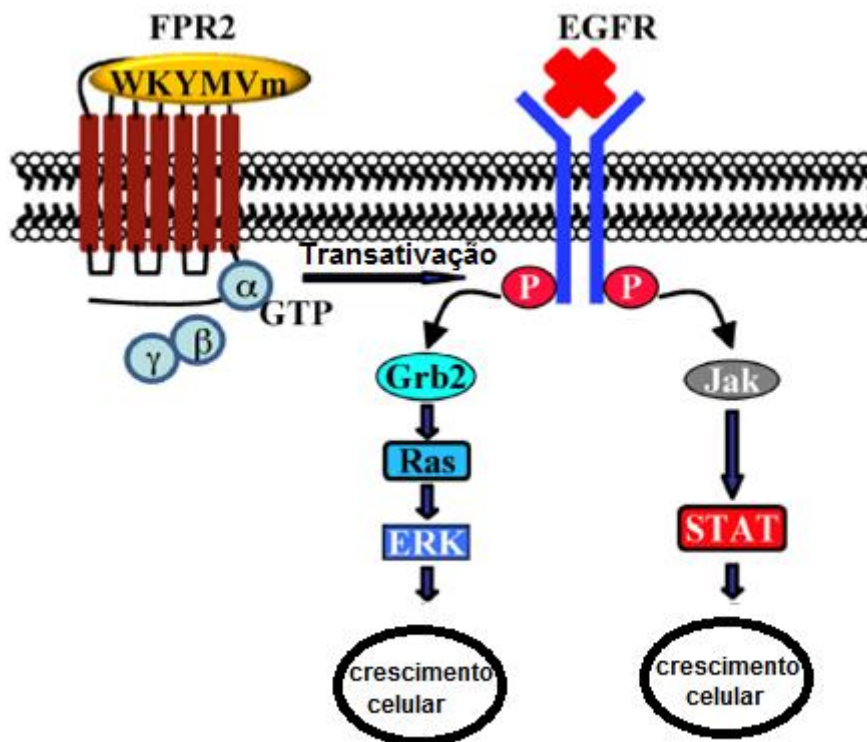


Figura 10. Transativação do EGFR dependente de FPR2 exposta ao peptídeo WKYMVm nas células de Ca-Lu-6. Essa ação resulta na fosforilação de resíduos de tirosina, que fornecem locais de ancoragem para recrutamento de moléculas e desencadeamento da via STAT3. A resposta celular à sinalização induzida por FPR2 é um aumento do crescimento celular.¹⁶ (Figura modificada da ref. 16).

Estudos mostram que essa interação entre os peptídeos da série W e o receptor FPR2 se dá em função da estrutura do peptídeo.^{15, 16, 52, 53, 54, 55, 56, 57}

Wan e colaboradores⁵⁷ sintetizaram diversos análogos do peptídeo WKYMVm e testaram suas atividades frente ao receptor FPR2, para avaliar a relação da estrutura do peptídeo com sua capacidade de ativação deste. Eles observaram que a retirada do aminoácido *d*-Met6 resulta em perda significativa de atividade, porém, se a remoção desse aminoácido for em conjunto com a Val5 o peptídeo restante (WKYM) retém a maioria das atividades relacionadas ao peptídeo original. A partir deste, os pesquisadores retiraram os resíduos N- e C-terminais (Trp1 e Met4) e constataram uma grande perda de atividade, concluindo que esses resíduos, nessas posições, desempenham um papel fundamental na interação com o ligante e na ativação do receptor. Além disso,

eles propuseram que as cadeias laterais dos resíduos Trp1 e Tyr3 tem um papel importantíssimo na interação com FPR2, pois se ligam ao receptor por meio de interações aromáticas. Com isso, constatou-se que o peptídeo WKYM é capaz de ativar seletivamente FPR2, em detrimento de outros receptores FPR, em concentrações nanomolares e que, portanto, representa uma estrutura central para a ativação deste tipo de receptor.⁵⁷

Bufe e colaboradores¹⁵ estudando também essa relação da estrutura dos peptídeos da série W e sua interação com FPR2, afirmaram que o receptor responde a variações do peptídeo WKYVM tolerando alongamentos no N-terminal em até três aminoácidos e perda em até dois resíduos sem uma forte diminuição da potência agonista. Porém, as perdas do terceiro (tirosina) e quarto (metionina) resíduos, reduz drasticamente a potência agonista ao FPR2, sugerindo que esses aminoácidos são necessários para a interação receptor-ligante. Além desses dois resíduos, a amidação do C-terminal influencia criticamente a interação, pois sua remoção diminuiu drasticamente a potência agonista.¹⁵

Esses dados nos mostram que os peptídeos da série W, estruturados basicamente como WKYM-NH₂, possuem uma interação específica com os receptores FPR2 responsáveis por respostas inflamatórias (pró- e anti-) e imunológicas no combate de infecções, em geral. Portanto, a utilização desse peptídeo para interação com FPR2 e ativação do sistema imune, produzindo ou reforçando um gradiente quimiotático para migração de leucócitos, através do seu carregamento seletivo para a região infeccionada, parece ser uma forma interessante de tratamento a processos infecciosos causados por bactérias.

3.6 – O sítio de clivagem enzimática para a liberação da porção imunomoduladora

A ideia do nosso trabalho é fazer com que o peptídeo agonista de FPR2 seja carregado pelo peptídeo Hs02 até o sítio da infecção, e lá seja liberado no microambiente, sendo necessário, portanto, que entre eles haja uma região de clivagem enzimática, ou seja, uma região propensa a sofrer proteólise.

Quando o organismo sofre uma infecção bacteriana, ele encaminha para a região infectada diversas células, como glóbulos brancos, a fim de combater o patógeno. Muitas enzimas estão envolvidas em cascatas ativadas pelo processo inflamatório, sendo então abundantes nesses locais de infecção.⁵⁹ As enzimas, com exceção de um pequeno grupo, são proteínas responsáveis por catalisar as reações das diversas etapas biomoleculares que mantêm um organismo vivo.¹² Elas são classificadas de acordo com a reação que catalisam. As enzimas chamadas 'proteases' catalisam a clivagem hidrolítica das ligações peptídicas. As proteases, assim como as demais enzimas, são específicas para os seus respectivos substratos, clivando ligações peptídicas entre determinados resíduos de aminoácidos, tornando previsível e reproduzível essa fragmentação.¹²

Ramachandran e colaboradores⁶⁰ apresentaram diversos exemplos de enzimas proteolíticas que agem durante processos inflamatórios em sítios característicos da enzima tripsina. A tripsina é uma enzima digestiva do tipo serino protease que hidrolisa especificamente as ligações peptídicas dos resíduos de aminoácido arginina e lisina.^{12, 61, 62} Enzimas que atuam nos mesmos sítios de clivagem da tripsina são conhecidas como enzimas do tipo *trypsin-like*.^{12, 62, 63, 64} A calicreína humana (KLK) e C3 convertase, enzimas envolvidas no processo inflamatório e do sistema complemento, necessárias a imunidade inata do organismo, são exemplos de enzimas que apresentam essa atividade do tipo triptase.^{65, 66} Um outro exemplo desse tipo de atividade foi apresentado por Loubakos e colaboradores⁶⁷ que mostraram que a enzima RgpB (uma cisteíno-protease específica para arginina) ativa receptores PAR-1 e PAR-2 (receptores ativados por protease) em células epiteliais orais (KB), causando uma mobilização intracelular de cálcio, que está relacionada a um processo inflamatório (no caso, causada pela bactéria *Porphyromonas gingivalis* – Periodontite), através da proteólise de um resíduo de arginina nos domínios extracelulares.⁶⁷ As bactérias responsáveis pelo processo infeccioso também podem contribuir com um arsenal enzimático no qual as enzimas podem apresentar esse tipo de atividade triptica como é o caso da protease OmpT, encontrada na membrana externa de enterobactérias Gram-negativas.^{68, 69, 70}

Os resíduos de aminoácidos lisina e arginina se mostram como regiões promissoras no desenho racional de moléculas, não só por enzimas *trypase-like*, mas também por outros tipos de proteases.^{64, 67, 71} Tian e colaboradores⁷¹ apresentam o estudo da clivagem oxidativa através da oxidação catalisada por metais (MCO) de proteínas do proteoma humano, além de compostos N-acetil e N-formilas, no qual foi demonstrado que as clivagens acontecem predominantemente, nos resíduos de lisina e arginina da cadeia peptídica no lado da carboxila dos resíduos. Eles sugerem que esses resultados demonstram que, em sistemas biológicos, a clivagem dessas moléculas não é dada de maneira aleatória, como se pensava, mas é provavelmente regulada por um mecanismo ainda desconhecido com características semelhantes à ação da tripsina.⁷¹

Percebe-se, portanto, que um sítio de clivagem enzimática formado por resíduos de lisina e arginina, parece ser um sítio prolífico para a ação de agentes proteolíticos que estão relacionados a processos inflamatórios para liberação de fragmentos peptídicos que estimulam o sistema imunológico.

Além da região de clivagem, uma região importante na construção do peptídeo do trabalho em questão, é a região que separa nosso módulo que interage com membranas do nosso peptídeo imonomodulador, funcionando como um espaçador que mantém essa região desestruturada e livre para receber o ataque enzimático.

A glicina é o único aminoácido que possui como cadeia lateral um átomo de hidrogênio, fazendo com que ela mantenha poucas interações com os outros aminoácidos em uma cadeia peptídica. Além disso, o volume reduzido da cadeia lateral permite que este apresente ângulos diedrais proibidos para outros resíduos. Logo, sua presença na cadeia peptídica costuma desfavorecer a estruturação da mesma, levando a uma região com grande liberdade conformacional.^{12, 13, 48, 72} A sequência de uma ou mais glicinas na estrutura do peptídeo pode cumprir o papel de espaçador desejado, assim como a presença de prolina, que é o único aminoácido com cadeia lateral cíclica mantendo a função amina do resíduo de aminoácido em uma configuração rígida, além de possuir uma barreira de transição da configuração *cis-trans* baixa, aumentando sua liberdade conformacional.^{12, 13}

Sendo assim, no presente trabalho, a construção do peptídeo Chim2 (KWAVKIIRKFIKGFISGGKRWKYM-NH₂) é dada como uma prova de conceito do desenho racional de peptídeos antimicrobianos e imunomodulatórios (Figura 11). Esta molécula foi desenhada racionalmente para sofrer proteólise enzimática de maneira preferencial em seu sítio de clivagem que se encontra na região desestruturada pelos aminoácidos espaçadores (-GGKR↓-, Chim2b), para que a liberação do peptídeo agonista de FPR2 (-WKYM-NH₂, Chim2c) ocorra de maneira seletiva após a interação entre o peptídeo, por meio da porção Chim2a (KWAVKIIRKFIKGFIS-) com a membrana de procaríotos. Ou seja, o impedimento estérico imposto pela interface da membrana ao domínio Chim2a, após sua adsorção em membrana, deve direcionar a ação enzimática para o sítio de hidrólise em Chim2b, liberando, por fim, Chim2c para o meio.

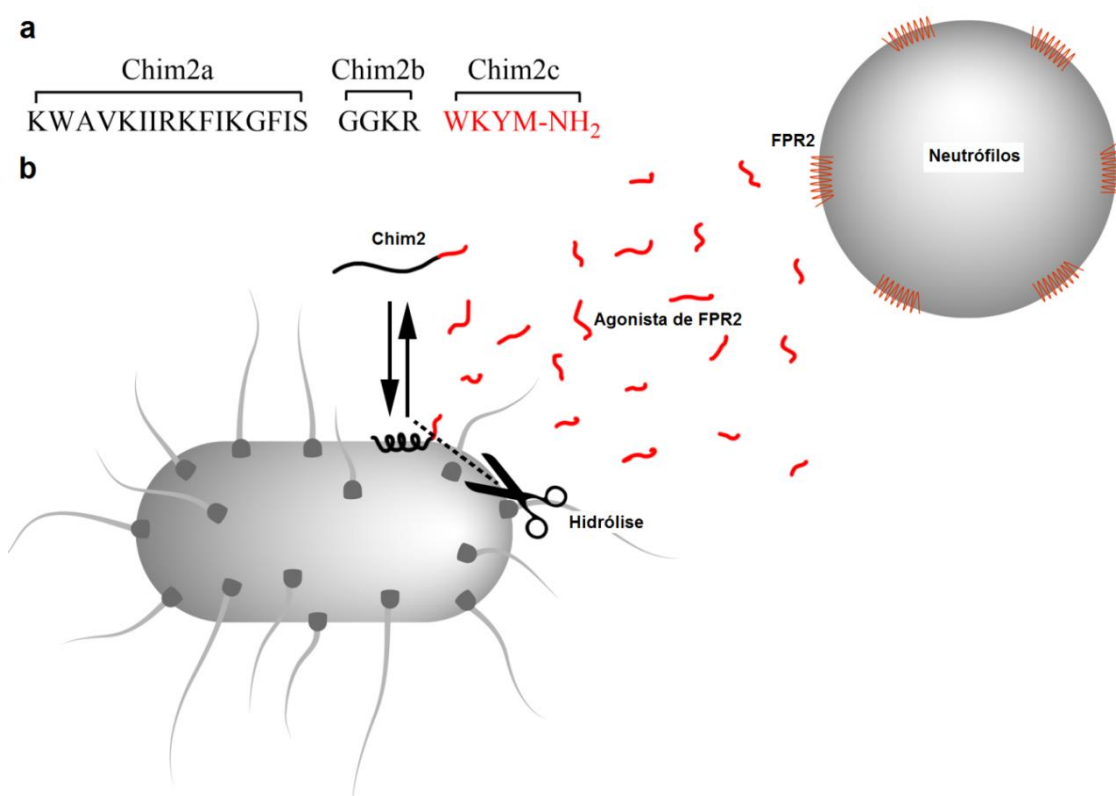


Figura 11. A. Estrutura primária do peptídeo Chim2 e seu modo de ação esperado. Chim2 (KWAVKIIRKFIKGFISGGKRWKYM-NH₂) foi racionalmente projetado como uma quimera formada por três módulos: um módulo N-terminal membrano-ativo, chamado Chim2a (KWAVKIIRKFIKGFIS-), um módulo espaçador também contendo um domínio de hidrólise de tripsina (-GGKR-), chamado Chim2b, e um módulo C-terminal (-WKYM-NH₂, em vermelho) consistido de um peptídeo

agonista de FPR2 (Chim2c). **b. Modo de ação do peptídeo Chim2.** Esse peptídeo foi projetado para se acumular preferencialmente na superfície das células bacterianas e passar por uma estruturação em hélice espiral no domínio Chim2a expondo o local de hidrólise não estruturado em Chim2b, que, após a clivagem, libera Chim2c, o agonista de FPR2 (em vermelho). O peptídeo agonista Chim2c deve se difundir do ponto focal bacteriano e ativar o FPR2 nos neutrófilos (receptores 7TM em vermelho nas células).

Um dos poucos exemplos desse tipo de proteólise enzimática direcionada pela interação do peptídeo com a membrana encontrado na literatura é relatado a seguir.

Em bactérias Gram-positivas, polipeptídeos são utilizados como precursores da formação de moléculas que funcionam como feromônios utilizados pelas bactérias para se comunicarem e regularem suas atividades como um grupo, processo chamado de *Quorum sensing*.⁷³ Na espécie *Staphylococcus aureus*, o peptídeo AgrD é o peptídeo precursor para um feromônio peptídeo autoindutor (AIP) que regula a expressão de genes de fatores de virulência, possibilitando a comunicação entre as células bacterianas.⁷³ O peptídeo AgrD se encontra aparentemente desestruturado em solução, porém, na presença de membranas, possui a região N-terminal anfifílica, composta por 18 resíduos de aminoácidos, estruturada em hélice- α .⁴⁴ Essa região interage com a membrana, como se ancorando a mesma e os outros 28 resíduos, desestruturados, ficam livres em conformação aleatória, como uma cauda (Figura 12a e b; Figura 13a).⁴⁴ Essa quebra de estruturação entre a porção associada a membrana e a cauda desestruturada se dá pela presença dos resíduos de isoleucina e glicina (Figura 13a). O peptídeo AgrD possui o feromônio AIP em sua cadeia peptídica entre a região N-terminal helicoidal e a região C-terminal conhecida como sequência de reconhecimento. A liberação do AIP se dá pela proteólise realizada pela protease AgrB que retira a sequência de reconhecimento como um peptídeo linear gerando uma tiolactona no fragmento N-terminal. Este intermediário tiolactônico é transportado através da membrana para a face exógena da bicamada e então, uma segunda clivagem libera o feromônio AIP (Figura 13b).⁴⁴

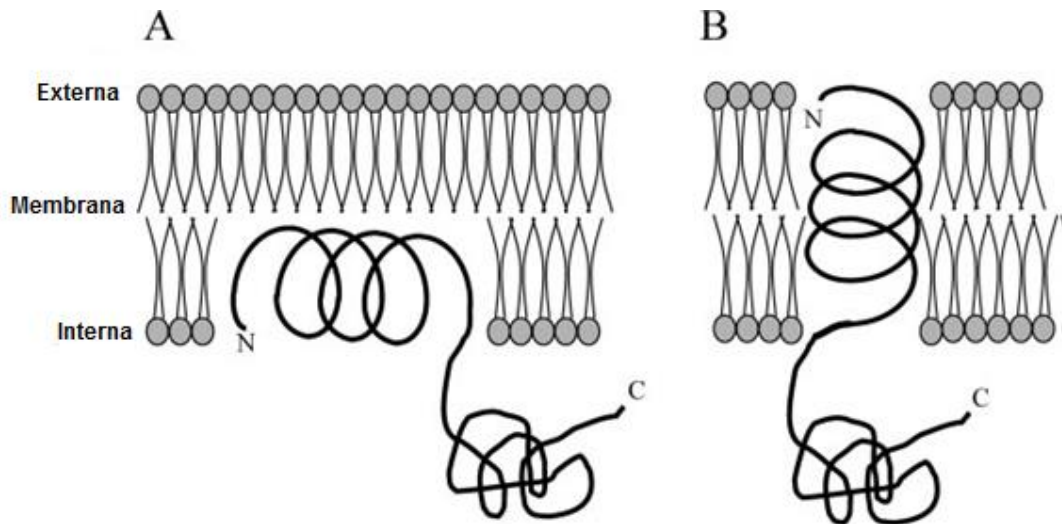


Figura 12. Modelo proposto para a interação do peptídeo AgrD com a membrana.⁷³ (A) Ancoragem no folheto interno da membrana. (B) Ancoragem através da membrana (transmembrantar). É observado que a região de α -hélice interage com a membrana deixando a sequência desestruturada livre para o ataque da enzima (Figura modificada da ref. 73).

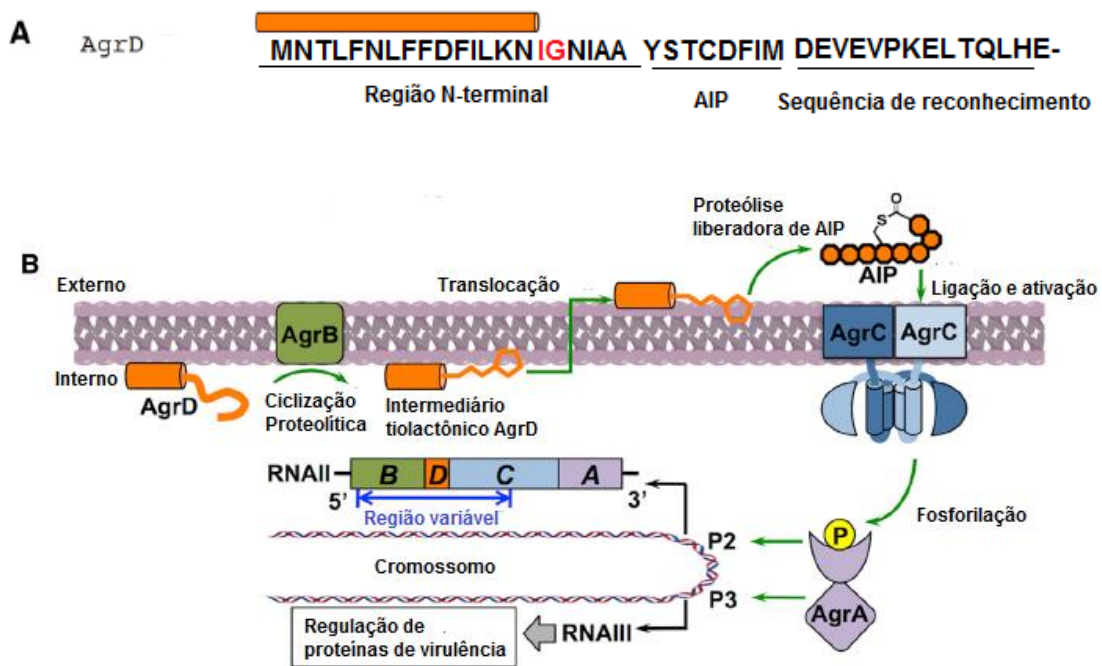


Figura 13. (A) Estrutura primária do peptídeo AgrD. Em vermelho, os resíduos de isoleucina e glicina que indicam a região de quebra de estruturação da cadeia. O cilindro alaranjado representa a sequência de hélice- α anfifílica. (B) Esquema da proteólise de AgrD e da ativação da via de detecção por AIP. AgrD está localizado

na face interna da membrana com a qual interage pela região anfifílica helicoidal, mantendo a região desestruturada livre. A enzima AgrB promove a proteólise de AgrD liberando a região C-terminal e ciclizando o AIP em uma tiolactona. O intermediário tiolactônico é translocado para a face externa da membrana sofrendo uma segunda proteólise e liberando o AIP. O AIP se liga ativando o receptor AgrC causando a fosforilação do regulador de resposta AgrA, o qual se liga ao promotor P2 que regula a transcrição de RNAlI e a produção de todas as quatro proteínas Agr, retomando a síntese do AIP, e também, ao promotor P3 que regula a produção do fator de virulência através da codificação de RNAlII.⁴⁴ (Figura modificada da referência 44).

Este trabalho apresenta uma nova estratégia na concepção de peptídeos antimicrobianos, abrangendo não apenas a atividade antimicrobiana direta por desestabilização da membrana procariota, mas também a exploração do meio enzimático local para a liberação de fragmentos imunomoduladores através de uma proteólise seletiva induzida pela interação preferencial do peptídeo com a membrana procariótica. A estratégia é semelhante aos conjugados de peptídeo ativado por elastase-colistina recentemente publicados⁵⁹, exceto que visa não apenas a eliminação bacteriana, mas a modulação da resposta imune no microambiente da infecção, semelhantemente a algumas pepducinas⁷⁴ ou mesmo a peptídeos de defesa do hospedeiro codificados por genes, como o peptídeo catelicidina multifuncional LL-37.⁷⁵

4. Metodologia

4.1 – Síntese do peptídeo Chim2

A síntese do peptídeo se deu pelo método da Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS) estabelecido por Chan e White.¹⁸

A síntese foi desenvolvida em uma seringa com uma placa sinterizada no fundo para impedir a perda de resina. À seringa, foram adicionados 220 mg de resina (Rink Amide AM resin – 0,7 mmol/g), a qual possibilita uma escala de síntese de 0,15 mmol. Essa resina é o suporte sólido no qual o peptídeo fica ancorado para sua síntese. Em seguida, foram adicionados 2 mL de dicloro metano (DCM), para inchaço da resina, sob agitação, durante 30 minutos. Em seguida, o solvente foi retirado por filtração à vácuo, deixando somente a resina inchada.

Após essa etapa, partiu-se para a etapa de desproteção, que é a remoção do grupo protetor da região N-terminal da resina (Fmoc), possibilitando que essa região fique livre para posterior acoplamento do Fmoc-aminoácido. Para a desproteção, foram adicionados 2 mL de uma solução 1:4 de 4-metil-piperidina em N,N-dimetilformamida (DMF). A mistura foi então agitada por 15 minutos e a fase líquida removida por filtração à vácuo. Foi adicionado, novamente, 2 mL dessa solução e o processo foi repetido, para garantir uma melhor eficiência na desproteção. A fase sólida foi então lavada com cerca de 4 mL de DMF, seguido de 4 mL de DCM, três vezes, de maneira alternada, sempre nessa ordem.

Para a confirmação da desproteção, foi feito um teste qualitativo chamado teste de Kaiser, que se baseia na coloração dos grãos após a mistura com alguns reagentes. O teste de Kaiser consiste na retirada de uma pequena alíquota da resina (alguns grãos) que são colocados em um tubo de ensaio. A esse são adicionadas 2 gotas de cada uma das seguintes soluções: 5% de nihindrina em etanol (m/v), 80% de fenol em metanol (m/v) e KCN em piridina (2 mL de 0,001 mM de KCN em 98 mL de piridina). Em seguida, o tubo é aquecido por 2 minutos em uma temperatura de 120 °C e verifica-se a mudança de coloração. Se a desproteção aconteceu, haverá a presença de

aminas livres na solução, o que faz com que os grãos fiquem, comumente, com uma coloração azulada bem escura. Se a desproteção não aconteceu, os grãos permanecerão com a coloração original, translúcidos.

É necessário lembrar que a síntese do peptídeo se dá, inicialmente, pela região C-terminal da cadeia, sendo iniciada pelo último aminoácido da sequência até o primeiro, na região N-terminal.

Após a desproteção, a próxima etapa consistiu no acoplamento do aminoácido. O acoplamento foi realizado pela rota sintética DIC/Oxima. Na seringa foram adicionados 4 equivalentes (0,6 mmol) do Fmoc-aminoácido em relação a resina, com uma massa específica para cada aminoácido. Todos os derivados de aminoácidos possuem o N-terminal protegido por um grupo Fmoc. Em seguida, foram acrescentados 85,3 g de *Oxyma Pure*, 2 mL de DMF e 93 µL de DIC (N,N-diisopropilcarbodiimida). A quantidade dos reagentes DIC e Oxima também correspondem a 4 equivalentes da quantidade de resina. A mistura foi então agitada por 1 hora e 30 minutos e a fase líquida removida por filtração à vácuo. Posteriormente, a fase sólida foi lavada exatamente como descrito para a etapa de desproteção. Após a lavagem, o teste de Kaiser também foi realizado em cada ciclo, como descrito para a etapa de desproteção, com a pequena diferença, de que nesta etapa é observado a presença de aminas livres, logo a coloração observada não será alterada.

Após o acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido são repetidas todas as etapas de: desproteção, lavagem, teste de Kaiser, acoplamento do próximo aminoácido, lavagem, teste de Kaiser, e assim por diante, até a inserção do último resíduo da sequência.

Após o último resíduo de aminoácido acoplado, a última etapa do processo de síntese é a clivagem. Nesta etapa foi realizada a retirada do peptídeo da resina. Para isso, é realizada novamente uma etapa de desproteção, para a retirada do grupo protetor do último resíduo acoplado, seguida da lavagem. A resina, ainda na seringa, foi então seca em uma bomba à vácuo durante, mais ou menos, 1 hora. Em seguida, foi adicionado à resina, em um tubo falcon de 50 mL, um “coquetel” de clivagem composto de: TFA/tioanisol/água/fenol/etanoditiol, nas razões, 82,5:5:5:2,5 (v/v). A mistura foi então agitada por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, o TFA foi evaporado em

fluxo de argônio na capela. Agora sem TFA na mistura, foi adicionado éter diisopropílico gelado, aproximadamente 20 mL, para precipitação do peptídeo. Para recolhimento da fase sólida (peptídeo + resina) foi utilizada filtração simples com descarte da fase etérea (líquida). A mistura sólida foi então lavada com uma solução de acetonitrila/água 1:1 (v/v), que solubiliza o peptídeo, deixando a resina retida no filtro.

Ao final de todo o processo, o peptídeo solubilizado foi liofilizado (no Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) para obtenção de um sólido branco.

4.2– Purificação do peptídeo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para garantir a pureza do peptídeo, eliminando possíveis resíduos e/ou produtos indesejados de síntese, o peptídeo foi purificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. A purificação foi realizada no cromatógrafo Shimadzu (Japão) com sistema de bombeamento binário (LC-20AR), detector de arranjo de diodo (DAD, SPD-M20A), injetor manual e sistema de análise e processamento de dados LabSolutions versão 5.92. Foi utilizada a coluna preparativa de fase reversa Jupiter C18 (250 x 21,2 mm, 10 µm, 300 Å) da Phenomenex. Foi utilizada a fase móvel composta de acetonitrila + 0,1% TFA e água + 0,1% TFA em um fluxo de 10 mL.min⁻¹. A concentração do peptídeo na solução era de 20 mg.mL⁻¹, sendo injetado 1 mL no aparelho. As corridas tiveram duração de 1 hora, com um gradiente de concentração variado de seguinte perfil: de 0 à 5 min (5% de ACN +TFA); de 5 à 45 min (5 - 95% de ACN +TFA); de 45 à 55 min (95 % de ACN +TFA); de 55 à 60 min (5% ACN +TFA). Nos detectores, foram utilizados os comprimentos de onda de 216 nm e 280 nm, para monitoramento do peptídeo, que correspondem ao comprimento de onda de absorção da ligação peptídica e de absorção do anel aromático das cadeias laterais, respectivamente. As frações com o peptídeo foram recolhidas e então, liofilizadas no LEM para obtenção de um sólido branco.

4.3– Determinação da estrutura primária do peptídeo por Espectrometria de Massa (MS)

O peptídeo foi analisado por MS para comprovação da identidade com base na razão massa/carga. Foi utilizado o Espectrômetro de Massa MALDI-TOF/TOF (UltraFlex 3, Bruker Daltonics) do Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa. O peptídeo foi misturado, na proporção 3:1, a uma solução matriz de 10 mg.mL⁻¹ de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% (v/v) de acetonitrila e 0,3% (v/v) de TFA. A mistura foi aplicada na placa de MALDI e seca a temperatura ambiente. O peptídeo foi analisado em modo refletor positivo e o íon precursor foi fragmentado, via LIFT, para a confirmação da sequência.

4.4– Quantificação do peptídeo

A quantificação do peptídeo foi realizada por espectroscopia UV-Vis com o auxílio do espectrofotômetro UV-1280 da SHIMADZU do Laboratório NuPMIA da Faculdade de Medicina da UnB. Uma quantidade do peptídeo foi solubilizada em 1 mL de água ultrapura (Milli-Q), e em seguida, 5 µL dessa solução foi diluída em 995 µL de água ultrapura. A diluição é feita com o intuito de manter os valores de absorvância dentro do limite superior da Lei de Beer-Lambert (0,7). Essa solução teve a leitura, em triplicata, obtida para o valor de absorvância no comprimento de onda de 280 nm. Para o cálculo da concentração, foi utilizado o valor de absorvância molar teórica para a estrutura primária do peptídeo no valor de 280 nm, obtido pela ferramenta ProtParam no site do ExPASy *Bioinformatic Resource Portal*⁷⁶, que é de 12490 M⁻¹cm⁻¹. Esse valor é o utilizado devido a presença de dois triptofanos na estrutura. A média dos valores obtidos no espectrofotômetro foi dividida pelo valor de referência para a obtenção da concentração em µM. Multiplicando-se essa concentração pelo valor de diluição da solução (200 vezes), a concentração em mM foi obtida.

4.5 – Obtenção e quantificação das vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG

As vesículas foram confeccionadas de acordo com o método apresentado por Brand⁴. Para as vesículas de DMPC (1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina), foi medido 20 mg do fosfolípido e solubilizado em 2 mL de clorofórmio (CHCl₃). Essa solução foi completada com mais 20 mL de CHCl₃ e seca em rotaevaporador até a formação de um filme translúcido. Esse filme foi seco por mais 3 h em bomba à vácuo. Após a secagem, o filme foi solubilizado em 2 mL de tampão PBS pH 7,4 (12,12 mM de fosfato de sódio dibásico, 7,88 mM de fosfato de sódio monobásico e 150 mM de cloreto de sódio) e levado para extrusão. A extrusão consiste na passagem forçada das vesículas por um filtro de polycarbonato. As vesículas foram extrusadas 19 vezes. Após a extrusão as vesículas foram quantificadas. A quantificação das vesículas foi baseada no método estabelecido por Stewart⁷⁷. Foi recolhido 20 µL da solução extrusada de vesículas, em triplicata. O solvente foi evaporado e as vesículas solubilizadas em 2 mL de CHCl₃. Foi adicionado 1 mL da solução de ferrotiocinato de amônio (27 g de cloreto férrico hexahidratado e 30 g de tiocianato de amônio em 1 L de água) e a mistura submetida a agitação em vórtex por 1 min. Em seguida, foi recolhida a fração orgânica e analisada no espectrofotômetro UV-1280 da SHIMADZU do Laboratório NuPMIA da Faculdade de Medicina da UnB no comprimento de onda de 488 nm. Os resultados foram aplicados a equação da reta, obtida previamente para a curva de calibração determinada para o fosfolípido nas concentrações de 0, 12,5, 25, 50, 100 e 150 µM para a determinação da concentração. Para as vesículas de 2:1 DMPC:DMPG (1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol), os procedimentos foram os mesmos com a diferença na quantidade de massa pesada, que levou em consideração o fato de que das 20 mg usadas, 66,6% devia ser de DMPC e 33,3% de DMPG. Os procedimentos de quantificação também foram idênticos com a diferença que a concentração foi determinada a partir da equação da reta obtida para uma curva de calibração criada para a razão 2:1 DMPC:DMPG, com os mesmos números de pontos para as mesmas concentrações.

4.6 – Avaliação da estrutura secundária de Chim2 por Dicroísmo Circular (CD)

A avaliação da estrutura secundária do peptídeo Chim2 foi feita por dicroísmo circular na presença de vesículas grandes unilamelares (LUVs) de dimiristroil fosfatidilcolina (DMPC) e uma mistura 2:1 de DMPC:DMPG (dimiristroil fosfatidilglicerol).

As vesículas foram usadas para induzir a estruturação do peptídeo. Para as análises, foram preparadas soluções contendo 40 μM do peptídeo em tampão PBS 20 mM em pH 7,4 com diferentes concentrações de vesículas: 0, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 e 2000 μM . As análises foram realizadas no espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco International Co., Japão) no LEM. Os espectros foram obtidos em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm, com janela espectral de 200 a 260 nm, em um intervalo de 0,2 nm e tempo de resposta de 0,5 s. O acúmulo de 4 varreduras foi utilizado para confecção dos espectros finais. A elipcidade residual média (MRE – $[\theta]$) foi calculada com base na seguinte fórmula:⁷⁸

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times \text{MM}}{c \times d \times n}$$

Onde θ está relacionado a elipcidade relativa ao comprimento de onda, MM é a massa molar do peptídeo, c é a concentração do peptídeo em mg.mL^{-1} , d é o caminho óptico e n o número de resíduos do peptídeo.

A helicidade percentual, que é referente a porcentagem do peptídeo que se estruturou em hélice- α , foi calculada com base na seguinte fórmula:^{4, 79}

$$\text{Helicidade (\%)} = \frac{([\theta]_{222} \text{ (amostra)} - [\theta]_{222} \text{ (branco)})}{-30300}$$

Onde $[\theta]_{222}$ é a elipicidade molar obtida no comprimento de onda de 222 nm.

4.7 – Ensaio de digestão do peptídeo Chim2

Os ensaios de digestão foram realizados para avaliar a clivagem do peptídeo pela enzima tripsina na ausência e presença de LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG.

Os ensaios foram realizados no aparelho Thermomixer (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a temperatura de 37 °C, sob agitação (400 rpm). Para a condição na ausência de vesículas (Condição 1), foi adicionado ao recipiente do ensaio 100 µM do peptídeo para um total de 1 mL de tampão TRIS (10 mM de TRIS-HCl, 100 mM de NaCl) em pH = 8,0, com posterior adição de 1 µL de uma solução de tripsina de pâncreas bovino da Sigma-Aldrich 2 mg.mL⁻¹, fazendo com que em solução tivessem 2 µg de tripsina. Na presença de vesículas de DMPC (vesículas de carga neutra), as quantidades dos reagentes permaneceram as mesmas com o acréscimo de 1 mM da solução de vesículas (Condição 2). Já na presença de vesículas de 2:1 DMPC:DMPG (vesículas de carga negativa), foram realizados dois tipos de experimentos: no primeiro, as quantidades dos reagentes permanecem iguais às condições sem vesícula, porém, com o acréscimo de 1 mM (razão de 10:1 fosfolipídeo:peptídeo) da solução de vesículas (Condição 3); e no segundo, foi realizado um ensaio com a mesma concentração de vesículas e as mesmas condições anteriores, porém, com 25 µM do peptídeo (razão de 40:1 fosfolipídeo:peptídeo) (condição 4). Os ensaios foram realizados, em triplicata, nos tempos de: 0, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos, para as condições 1, 2 e 3; e nos mesmos tempos, com o acréscimo do tempo de 480 minutos, para a condição 4. Para todas as condições era recolhida uma alíquota de 50 µL da solução e imediatamente, adicionados 10 µL de uma solução 3% de TFA em água para interrupção da ação hidrolítica da enzima.

4.8 – Análise da liberação da porção agonista de FPR2 do peptídeo Chim2 por MS

As amostras dos ensaios de digestão descritos no item 4.7 para todas as condições, em todos os tempos, foram analisadas por espectrometria de massa para comprovação da identidade dos fragmentos com base na razão massa/carga. Foi utilizado o MALDI-TOF/TOF (UltraFlex 3, Bruker Daltonics) do LEM, Embrapa. As amostras foram misturadas, na proporção 3:1, a uma solução matriz de 10 mg.mL⁻¹ de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% (v/v) de acetonitrila e 0,3% (v/v) de TFA. A mistura foi aplicada na placa de MALDI e seca a temperatura ambiente. As amostras foram analisadas em modo refletor positivo.

4.9 – Quantificação da liberação da porção agonista de FPR2 do peptídeo Chim2 por CLAE

O peptídeo WKYM-NH₂, agonista de FPR2, foi previamente sintetizado e purificado por nosso grupo de pesquisa (Anexo D – Figuras D1 e D2).

Foi criada uma curva de calibração para o peptídeo WKYM-NH₂, a fim de servir como referência para a resposta do método de digestão. As amostras de digestão foram, então, analisadas por CLAE para avaliar a quantificação do quanto foi liberado de WKYM-NH₂ após a clivagem pela enzima.

Tanto a curva, quanto as amostras foram analisadas no cromatógrafo Shimadzu (Japão) com sistema de bombeamento binário (LC-20AR), detector de arranjo de diodo (DAD, SPD-M20A), injetor manual e sistema de análise e processamento de dados LabSolutions versão 5.92 no Laboratório NuPMIA da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Foi utilizada a coluna analítica Vydac 218TP C18 (250 x 4,2 mm, 5 µm). A fase móvel era composta de acetonitrila + 0,1% TFA/água + 0,1% TFA em fluxo de 1 mL.min⁻¹.

Para a confecção da curva, foram estabelecidos 7 pontos com a injeção do peptídeo WKYM-NH₂ em 6 concentrações diferentes (um dos pontos é o ponto zero representado pelo branco – solução sem peptídeo): 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µM. Essas concentrações foram ajustadas para que o volume de amostra injetado no aparelho fosse de 50 µL. As corridas tiveram duração de 52 minutos, com um gradiente de concentração variado de seguinte perfil: de 0 à 5 min (5% de ACN + TFA); de 5 à 25 min (5 - 95% de ACN +

TFA); de 25 à 35 min (95 % de ACN + TFA); de 36 à 37 min (95 - 5% ACN + TFA) e de 37 à 52 min (5% de ACN + TFA). Nos detectores, foram utilizados os comprimentos de onda de 216 nm e 280 nm, para monitoramento do peptídeo, que correspondem ao comprimento de onda de absorção da ligação peptídica e de absorção do anel aromático das cadeias laterais, respectivamente.

4.10 - Determinação da estrutura tridimensional do peptídeo Chim2 na presença de micelas de DPC-_{d38} por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a análise de RMN o peptídeo Chim2 foi solubilizado em 50 mM de DPC-_{d38} em tampão PBS (pH = 7,0) e H₂O/D₂O (90:10, v/v) a uma concentração final de 2 mM. À solução, foi adicionado 0,5% de 2,2,3,3-d₄-3-trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-_{d4}) como padrão interno para referência de deslocamento químico (0 ppm). Os experimentos foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III HD 600 operado a 600 MHz (14 T) para ¹H, a 25 °C. Os sinais de ressonância do peptídeo foram atribuídos através de experimentos bidimensionais (2D): ¹H-¹H TOCSY e ¹H-¹H NOESY. Os espectros 2D foram adquiridos com 4096 pontos complexos e 512 incrementos τ_1 . O sinal da água foi atenuado com a sequência de pulso denominada *excitation sculpting*. Os espectros ¹H-¹H TOCSY foram obtidos com um tempo de mistura (*mixing time*) de 80 ms e os espectros ¹H-¹H NOESY, foram obtidos com um tempo de mistura de 200 ms. O processamento dos espectros foi realizado utilizando-se o *software* NMRFX⁸⁰ *processor* e a visualização dos mapas de contorno, utilizando-se o *software* CCPNMR⁸¹ (versão 2.4). Os deslocamentos químicos nos espectros foram atribuídos de acordo com os procedimentos padrões estabelecidos por Wutrich.⁴⁶ Os NOEs foram caracterizados com base na altura dos picos cruzados. As estruturas foram calculadas usando o *software* ARIA⁸² (versão 2.3.1) e CNS⁸³ (versão 1.2). Os cálculos no ARIA foram realizados utilizando protocolos padrão. Ao final de cada cálculo, as informações de violações eram analisadas. Quando os cálculos não apresentaram nenhuma violação, o conjunto das 10 estruturas de

menor energia foi escolhido para representar a estrutura 3D do peptídeo em solução.

4.11 – Avaliação da atividade antimicrobiana do peptídeo Chim2

Para a avaliação da atividade antimicrobiana de Chim2 foi utilizado, como referência, o protocolo M7-A10⁸⁴ do (CLSI) *Clinical & Laboratory Standards Institute*, mais especificamente, o teste de suscetibilidade de microrganismos diluídos em caldo. Foram utilizadas diferentes concentrações de peptídeos, em meio Mueller Hinton, variando de 0,5 a 128 µM. Estes foram testados em ensaios de diluição em caldo usando microplacas de 96 poços de fundo plano (placas de cultura de tecidos TPP, Merck) com 5×10^5 UFC.mL⁻¹ (unidade formadora de colônia) de bactérias (inóculo inicial) com incubação a 37 °C por 24 h. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração na qual nenhuma célula foi detectada em microscopia óptica após 20 a 24 h de incubação. Para determinação da concentração microbicida mínima (CMM), 10 µL do teste na concentração da CIM e duas concentrações mais altas foram transferidas para placas de ágar Mueller Hinton. Essas placas foram incubadas a 37 °C de 20 a 24 h. O CMM foi determinado como a concentração na qual nenhuma colônia foi detectada. Todos os testes consistiram em três repetições biológicas com 2 repetições técnicas cada. Para os testes, foram utilizadas as seguintes cepas de bactérias: *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. As cepas foram retiradas da biblioteca de microrganismos da Universidade Católica de Brasília (UCB) e todos os testes feitos no Laboratório de Análise de Biomoléculas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da UCB.

4.12 – Ensaios de viabilidade celular em neutrófilos humanos - MTT

O peptídeo Chim2 teve sua viabilidade celular testada em neutrófilos humanos. Essas células, a uma concentração de 10^7 células.mL⁻¹, foram estimuladas com LPS (50 ng.mL⁻¹) por 1 h a 37° C. As células foram então centrifugadas e adicionadas a tampão PBS contendo Ca²⁺ e Mg²⁺, a uma

concentração final de 5×10^6 células.mL⁻¹. Os peptídeos foram adicionados em diferentes concentrações e incubados por 2 h a 37 °C. Posteriormente, as células foram centrifugadas e foi adicionado 350 µL do reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) na razão de 1:10 em PBS contendo Ca²⁺ e Mg²⁺. As células foram então distribuídas em placas de 96 poços de fundo plano a 100 µL/poço. As amostras foram incubadas por 4 horas a 37 °C. O detergente foi adicionado a 100 µL/poço no topo das células e deixado durante a noite, no escuro, à temperatura ambiente. As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 570 nm e 640 nm usando um leitor de placas no dia seguinte. Os ensaios de MTT foram realizados em triplicata. O referido experimento obedeceu a todos os regulamentos éticos relevantes e teve seu consentimento obtido através da aprovação do protocolo de estudo pelo Comitê de Ética Regional Médica da Universidade de Edimburgo (referência número 21-EMREC-041).

4.13 – Ensaios de viabilidade de neutrófilos vivos/mortos

Os neutrófilos foram cultivados em IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Media*) com 10% de soro autólogo suplementado com penicilina, estreptomicina e L-glutamina. As células foram então incubadas com LPS (100 ng.mL⁻¹) por 1 hora a 37 °C antes da adição de estímulos, também por 1 hora. O peptídeo Chim2 foi pré-incubado com tripsina por 30 min a 37 °C para garantir a clivagem ideal do peptídeo. A viabilidade celular foi avaliada por citometria de fluxo (citômetro Attune NxT, Thermo Scientific) com coloração viva/morta de violeta *zombie* (Biolegend, 1:400).

4.14 - Ensaio de viabilidade celular em fibroblastos humanos e teste de hemólise em eritrócitos humanos

Para os ensaios de viabilidade celular em fibroblastos humano foi utilizado a célula de fibroblasto humano (Detroit 551) obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil). Essas células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbeco's Modified Eagle's Medium*, Gibco BRL, EUA)

suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Gibco, EUA), uma solução antibiótica a 1% (10.000 U.mL⁻¹ de penicilina e 10 mg.mL⁻¹ de estreptomicina, Sigma-Aldrich, EUA) a 37°C e com 5% de gás carbônico em atmosfera umidificada. As células foram cultivadas em placa de cultura de 96 poços em uma densidade de 3 × 10³ células/poço e mantidas por 24 h. Em seguida, essas células foram tratadas com peptídeo diluído em meio DMEM na faixa de concentração de 4 a 128 µM, em triplicata. Para controle, foram utilizados meio DMEM e 20% de DMSO (Dimetilsulfóxido). As placas foram incubadas por 24 e 48 horas e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do corante MTT (Sigma-Aldrich, EUA). Após o tempo de incubação, o meio foi removido e 100 µL de uma solução de MTT diluída em DMEM (0,75 mg.mL⁻¹) foram adicionados em cada poço e incubados por 2 horas a 37 °C. Para dissolver os sais de formazan produzidos pelas células vivas, foram adicionados 100 µL de DMSO nos poços. A absorbância foi medida usando-se um leitor de microplacas SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 595 nm.

Para a realização dos testes de hemólise, foi utilizado sangue periférico em EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (1,8 mg.mL⁻¹) obtido de um doador humano voluntário. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm e os eritrócitos foram lavados 3 vezes com solução tampão 1x PBS a 37 °C. Os eritrócitos suspensos foram ajustados para atingir 5% de células em 1x PBS. Na sequência, 80 µL dessa solução de eritrócitos foram adicionados a 20 µL de Chim2 diluído em 1x PBS, com concentrações variando de 1 a 128 µM. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C, até a interrupção da reação pela adição de 100 µL de 1x PBS. As amostras, então, foram centrifugadas por 5 minutos a 4700 rpm e o sobrenadante obtido teve sua absorbância medida por um leitor de microplacas SpectraMax® Plus 384 (Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 550 nm. Os controles negativo (ausência de hemólise) e positivo (100% de hemólise) foram fixados, respectivamente, com 1x PBS e Triton-X 100.

4.15 – Biogênese de gotículas lipídicas em macrófagos peritoneais murinos (BMDM) de camundongos

As gotículas lipídicas foram quantificadas por citometria de fluxo conforme descrito na literatura⁸. Macrófagos peritoneais murinos (BMDM) de camundongos C57BL/6 foram estimulados com Hs02 ou WKYM-NH₂ a 10 µM e incubados por 24 h. Após, as células foram dissociadas com tripsina (GIBCO), lavadas com tampão PBS e incubadas com o Bodipy (Sigma Aldrich, 50 nM) diluído em tampão PBS por 30 minutos a 4 °C no escuro. As células foram lavadas duas vezes com tampão PBS, ressuspendidas em 500 µL de PBS e armazenadas a 4 °C até a leitura por FACS Calibur usando o canal FITC. O software FlowJo foi usado para plotar os dados e determinar a intensidade de fluorescência mediana (MFI).

4.16 – Ensaios de detecção de interleucinas (IL-6 e IL-12) em BMDMs de camundongos

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram coletados sob licença do comitê de ética animal da Universidade de Brasília, nr. 17/2017. Os macrófagos foram isolados de acordo com a literatura⁸⁵ e estimulados com Hs02 ou WKYM-NH₂ a 10 µM e incubados por 24 h. Como controle positivo, as células foram estimuladas apenas com LPS (500 ng.ml⁻¹) durante 24 h. As concentrações de IL-6 e IL-12 (interleucinas 6 e 12) sobrenadantes foram detectadas por ELISA com um kit R&D Systems (EUA). As placas de microtitulação foram revestidas durante a noite à temperatura ambiente com anticorpo de captura e bloqueadas com Reagente Diluente durante 1 hora. Amostras diluídas em série foram adicionadas aos poços em triplicata e incubadas durante a noite a 4 °C. Após lavagem extensa, as células foram incubadas com anticorpo de detecção e depois com Estreptavidina-HRP. Após a lavagem, a solução de substrato foi adicionada e as placas foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a adição da solução de parada, as placas foram lidas no comprimento de onda de 450 nm usando espectrofotômetro SpectraMax M3 (*Molecular Devices*).

4.17 – Medição da atividade da NADPH oxidase em neutrófilos

A produção de espécies radicais de oxigênio (ROS – *Radical Oxygen Species*) foi medida indiretamente usando a produção de quimioluminescência de 5×10^5 neutrófilos por poço a 37 °C em placas de 96 poços com grau de luminescência (Nunc) em um leitor de placas Cytation (BioTek). Os neutrófilos foram primeiro induzidos com TNF- α (Sigma, 20 ng.ml⁻¹) ou LPS (Sigma, 50 ng.ml⁻¹) durante 1 hora em PBS⁺⁺ e depois misturados com 150 μ M de luminol e 18,75 U.ml⁻¹ de peroxidase de *horseradish* para a análise da produção total de ROS. Os estímulos foram adicionados às células e a luminescência foi registrada imediatamente. Os dados foram obtidos em unidades de luz por segundo para um total de 2 horas.

5. Resultados e Discussão

5.1 – Síntese, purificação e identificação do peptídeo Chim2

O peptídeo Chim2, de estrutura primária - KWAVKIIRKFIKGFISGGKRWKYM-NH₂ – foi sintetizado pelo método de síntese de peptídeos em fase sólida. A síntese do peptídeo começa pela região C-terminal, no qual o primeiro aminoácido é acoplado à resina e os outros são adicionados sequencialmente à cadeia peptídica, pela rota sintética DIC/Oxyma, até o último resíduo N-terminal. Alguns resíduos apresentaram certa dificuldade de acoplamento como o Ile15 e o Arg8, e foram reacoplados. O reacoplamento consiste na posterior tentativa de reinserção do resíduo que não mostrou um rendimento qualitativo apreciável (pelo teste de Kaiser) no acoplamento. Essa dificuldade se dá, possivelmente, por impedimento estérico, já que esses aminoácidos possuem cadeias laterais volumosas. Após a etapa de clivagem e liofilização do peptídeo, foi obtido um sólido branco com massa total de 189 mg.

O peptídeo sintético bruto foi levado então para a etapa de purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O cromatograma obtido pelo método preparativo apresentou um sinal intenso em um tempo de retenção (T.R.) de 27,5 minutos que foi recolhido e posteriormente, caracterizado como o peptídeo Chim2 (Figura 14). A presença de apenas um sinal de grande intensidade no cromatograma mostra que a síntese do peptídeo foi bem-sucedida, indicando que os acoplamentos tiveram alta eficiência de acoplamento, com poucos subprodutos e a obtenção do peptídeo com pureza relativa.

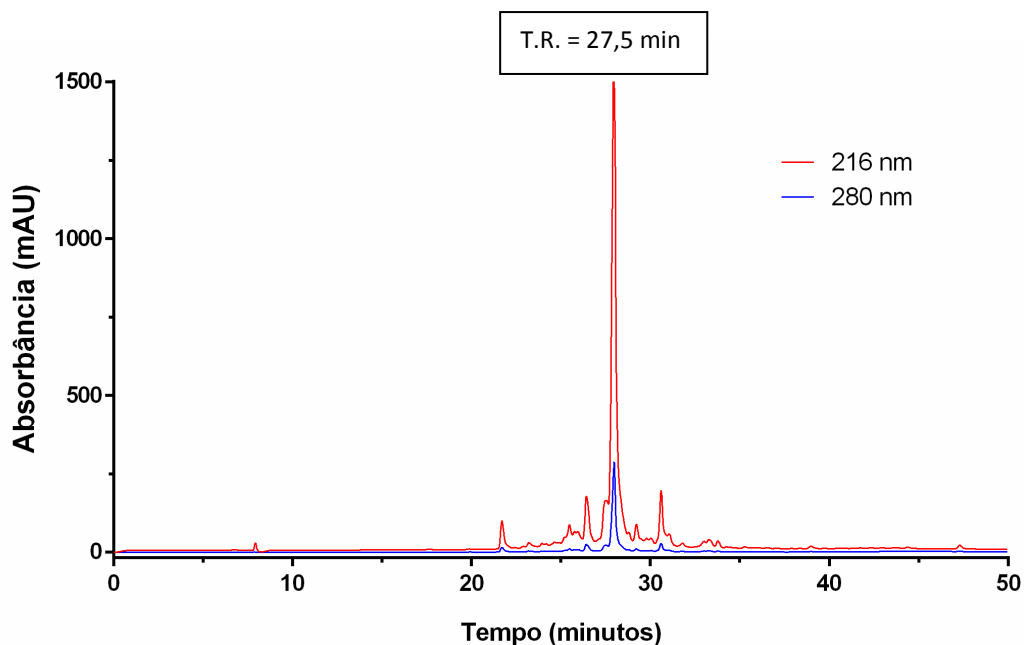


Figura 14. Cromatograma da purificação do peptídeo Chim2. O pico de absorbância referente ao peptídeo apresentou um tempo de retenção (T.R.) de 27,5 min. A fase móvel era composta de acetonitrila + 0,1% TFA/água + 0,1% TFA em um fluxo de 10 mL.min⁻¹. A corrida tinha duração de 1 hora, com um gradiente de concentração variando de 0 à 5 min (5% de ACN + TFA); de 5 à 45 min (5 - 95% de ACN + TFA); de 45 à 55 min (95 % de ACN + TFA); de 55 à 60 min (5% ACN + TFA).

Após a etapa de purificação, o peptídeo teve sua identidade confirmada por Espectrometria de Massa (MS) do tipo MALDI-TOF/MS. Foi observado que a massa do peptídeo corresponde a massa teórica esperada (Figura 15). A massa obtida para o íon precursor $[M+H]^+$ foi de 2939,704 Da, enquanto o valor teórico calculado é de 2939,69 Da, calculado pelo ProtParam.⁷⁶

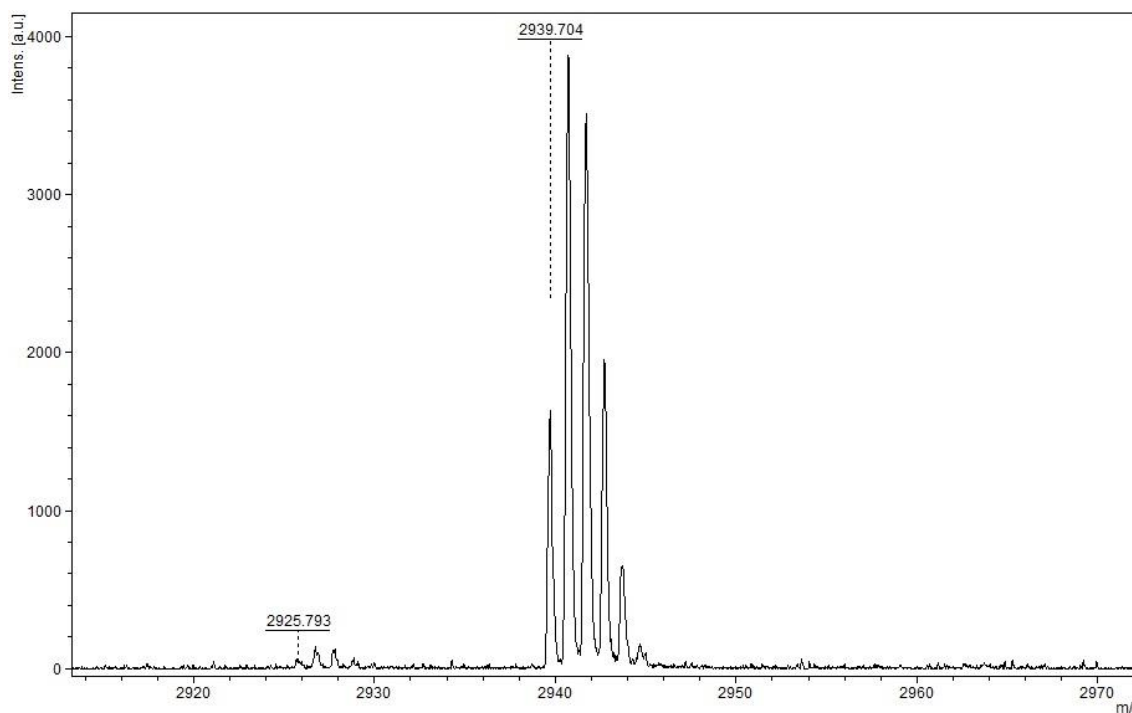


Figura 15. Espectro de massa (MS) do peptídeo Chim2 após a purificação por CLAE ($[M+H]^+ = 2939,704$ Da). A análise foi realizada usando-se um MALDI-TOF MS (Ultraflex III, Bruker Daltonics, Germany) operado em modo refletor positivo usando ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz.

O íon precursor $[M+H]^+$ foi fragmentado e através das séries complementares *y* e *b*, do perfil de fragmentação dos íons, a estrutura primária foi confirmada. Essas séries resultam da quebra da ligação peptídica e se diferem pela formação de íons que retêm de maneira diferente o próton H^+ : a série *b* retêm o próton na região N-terminal, enquanto a série *y*, retêm na região C-terminal.⁸⁶ A Figura 16 traz o espectro de fragmentação do peptídeo.

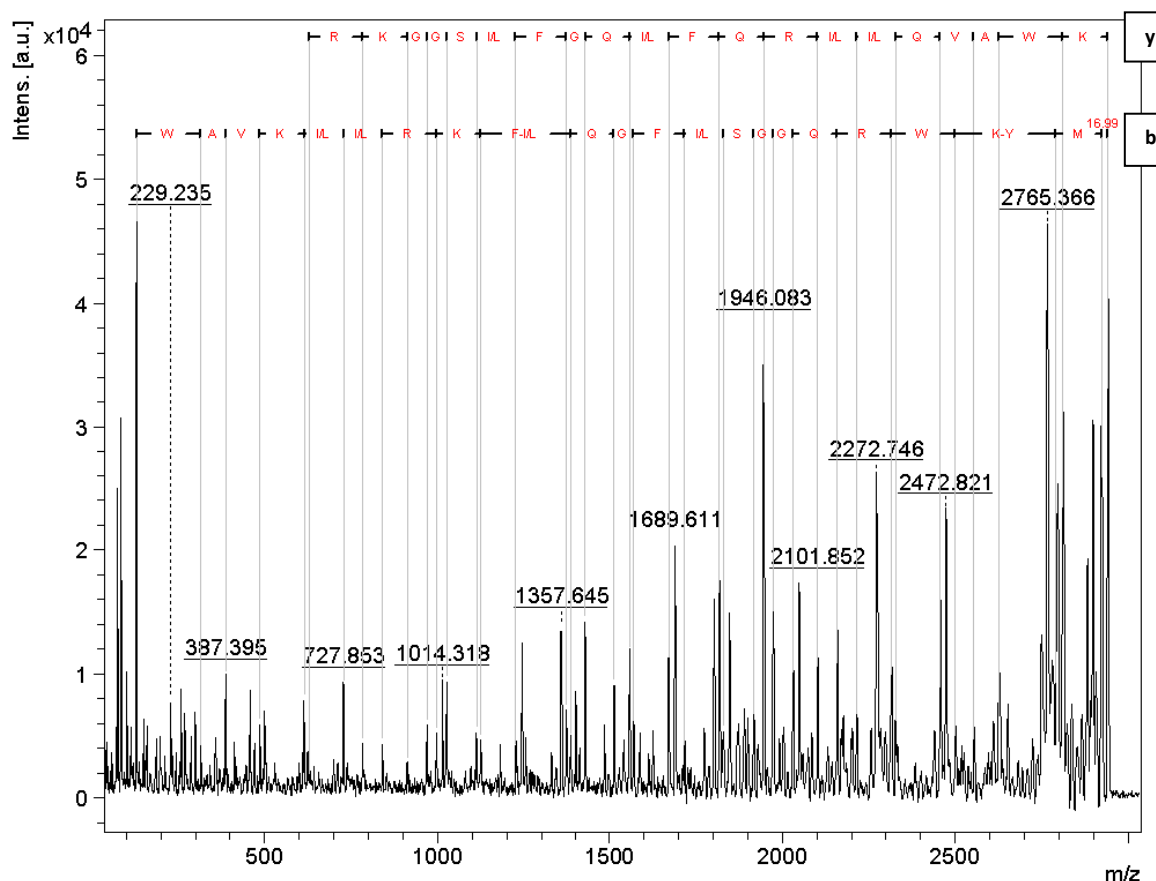


Figura 16. Espectro de massa da fragmentação do íon precursor $[M+H]^+ = 2939,704$ Da do peptídeo Chim2. A sequência de aminoácidos da parte superior se refere aos íons da série y, enquanto a da parte inferior se refere aos íons da série b.

É possível confirmar a estrutura primária de Chim2 pela presença dos íons relativos a fragmentação da ligação peptídica de cada resíduo de aminoácido presente na sequência através da série b. A série y apresenta os aminoácidos da cadeia até a Arg20. Isso se dá porque uma série pode reter o próton melhor do que a outra, fazendo com que alguns íons da série desfavorecida sejam suprimidos. Contudo, o espectro evidencia uma riqueza de íons tanto na porção N- quanto C-terminal, permitindo a verificação acurada da estrutura primária deste peptídeo.

Depois de sua identificação, o peptídeo foi quantificado por UV-Vis, através de cálculos baseados nas informações da ferramenta ProtParam,⁷⁶ descritos na metodologia. Para ensaios posteriores, foi feita uma solução estoque a uma concentração de 7,654 mM, a qual foi mantida congelada a -20 °C até a execução dos experimentos.

5.2– Avaliação da estrutura secundária de Chim2 por Dicroísmo Circular (CD)

Buscando compreender a estruturação do peptídeo Chim2 na presença de vesículas (LUVs de DMPC, carga neutra e 2:1 DMPC:DMPG, carga negativa), foram realizados experimentos de dicroísmo circular (CD). Vesículas dessas composições foram escolhidas pois servem de modelo para células eucarióticas (neutras) e procarióticas (negativas). A concentração de 40 μM do peptídeo foi usada para as condições na ausência e presença de vesículas. Na ausência de vesículas, o peptídeo não demonstrou estruturação, pois apresentou sinal negativo próximo a 200 nm, perfil característico de estruturas aleatórias⁷⁹ (Figura 17, linha marrom). Na presença de vesículas de 2:1 DMPC:DMPG, vesículas de carga negativa, o peptídeo apresentou estruturação na forma de uma hélice- α (Figura 17b). É possível observar essa estruturação pelo surgimento de mínimos em 208 e 222 nm, a partir da concentração de 1280 μM (linha roxa). A banda negativa no valor próximo de 208 nm, se refere a transição $\pi_0 \rightarrow \pi^*$, e a próxima a 222 nm, se refere a transição $n \rightarrow \pi^*$, que são bandas características de estruturas em hélice- α (Figura 17b).⁷⁹ Na presença de vesículas de DMPC, vesículas de carga neutra, não é possível observar alguma estruturação do peptídeo para as mesmas concentrações de vesículas (Figura 17a). Vê-se que todas as bandas do espectro, até mesmo as em altas concentrações, permanecem com o perfil semelhante a banda do peptídeo na ausência de vesículas (linha marrom), quando o peptídeo se encontra não estruturado em solução.

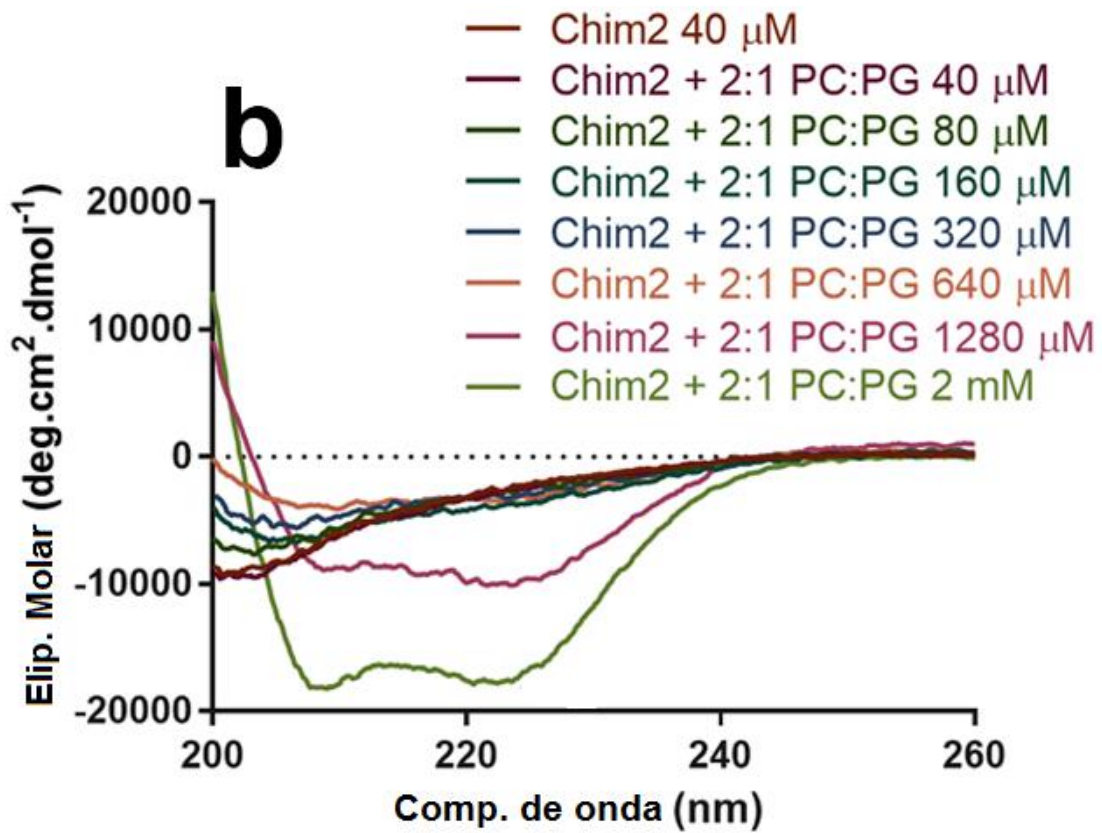
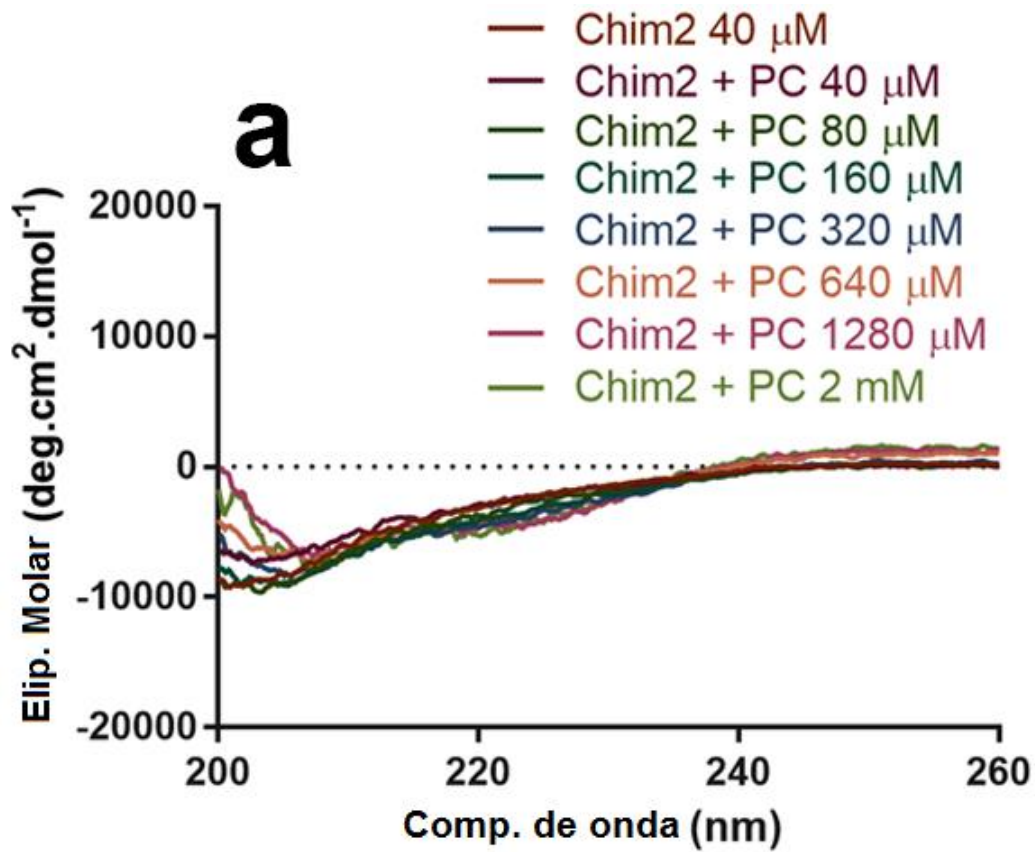


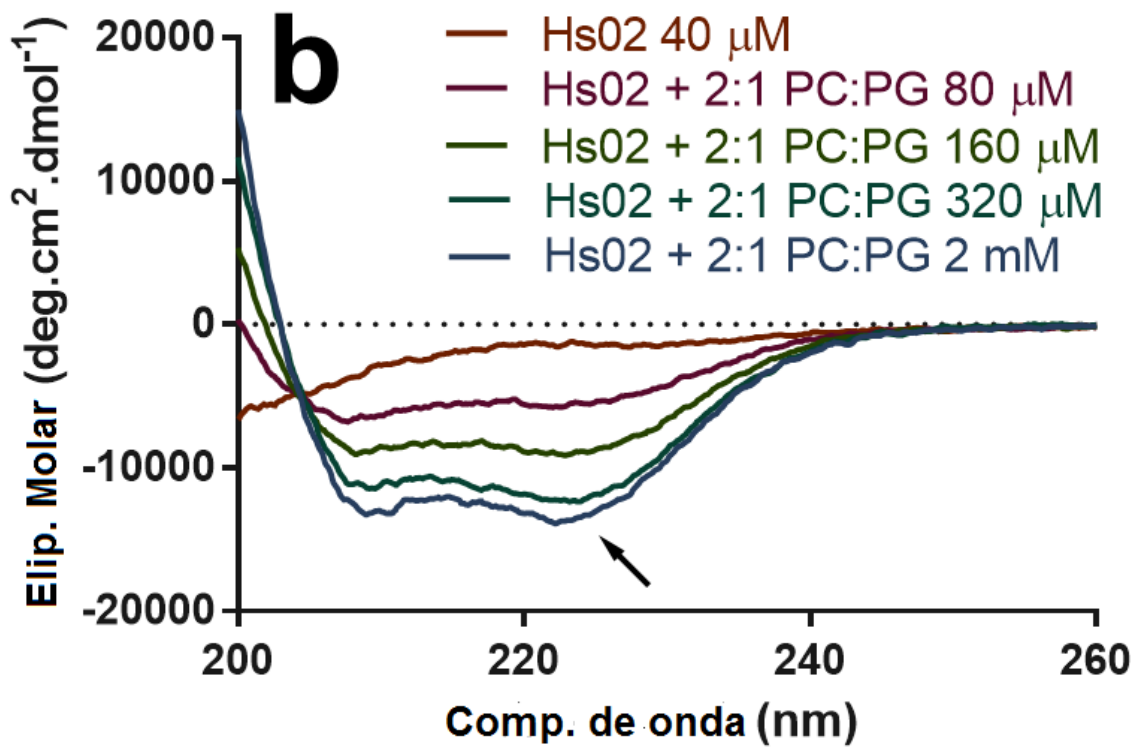
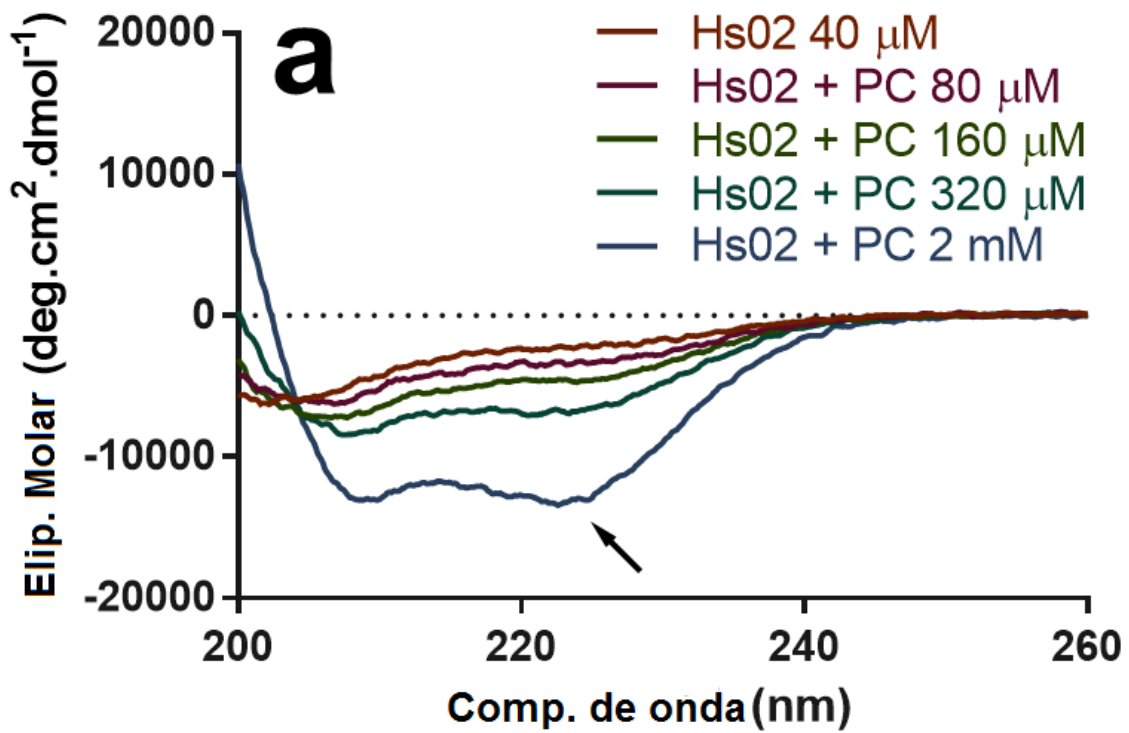
Figura 17. (A) Espectros de dicroísmo circular (CD) do peptídeo Chim2 na presença de vesículas de DMPC em diferentes concentrações. (B) Espectros de dicroísmo circular (CD) do peptídeo Chim2 na presença de vesículas 2:1 de DMPC:DMPG em diferentes concentrações. A legenda indica as diferentes concentrações de vesículas que foram utilizadas no teste e suas respectivas cores: 0 μM (marrom), 40 μM (violeta), 80 μM (verde), 160 μM (ciano), 320 μM (azul), 640 μM (bege), 1280 μM (roxo) e 2 mM (verde claro).

Esses resultados indicam que o peptídeo Chim2 interage, preferencialmente, com vesículas de carga negativa (2:1 DMPC:DMPG), demonstrando que essa interação apresenta forte componente eletrostático, o qual garante a adsorção preferencial do peptídeo neste tipo de vesícula. Essa conclusão é corroborada pelos dados de helicidade percentual obtido para o peptídeo em vesículas de ambas as composições estudadas (Tabela 1).

Tabela 1. Dados de helicidade percentual do peptídeo Chim2 na presença de LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG nas concentrações de 0 e 2 mM.

Conc. LUVs	0 mM	2 mM
Chim2 % Hélice (DMPC)	4	13
Chim2 % Hélice (2:1 DMPC:DMPG)	4	55

Na tabela, é possível observar que o peptídeo, na ausência de vesículas (concentração de 0 mM), apresenta um percentual de hélice pouco significativo em tampão, na faixa de 4%. Na presença de vesículas de DMPC a 2 mM, a estruturação permanece baixa atingindo 13% de hélice- α , mostrando que para esse tipo de vesículas neutras, a estruturação acontece, mas de maneira pouco pronunciada. Porém, para as vesículas de 2:1 DMPC:DMPG a 2 mM, é obtida uma estruturação de mais de 50% do peptídeo em hélice- α (55%), mostrando uma preferência pela estruturação na presença de vesículas com carga negativa. Isso vai ao encontro dos dados de dicroísmo circular e helicidade percentual do peptídeo Hs02 (Figura 18).



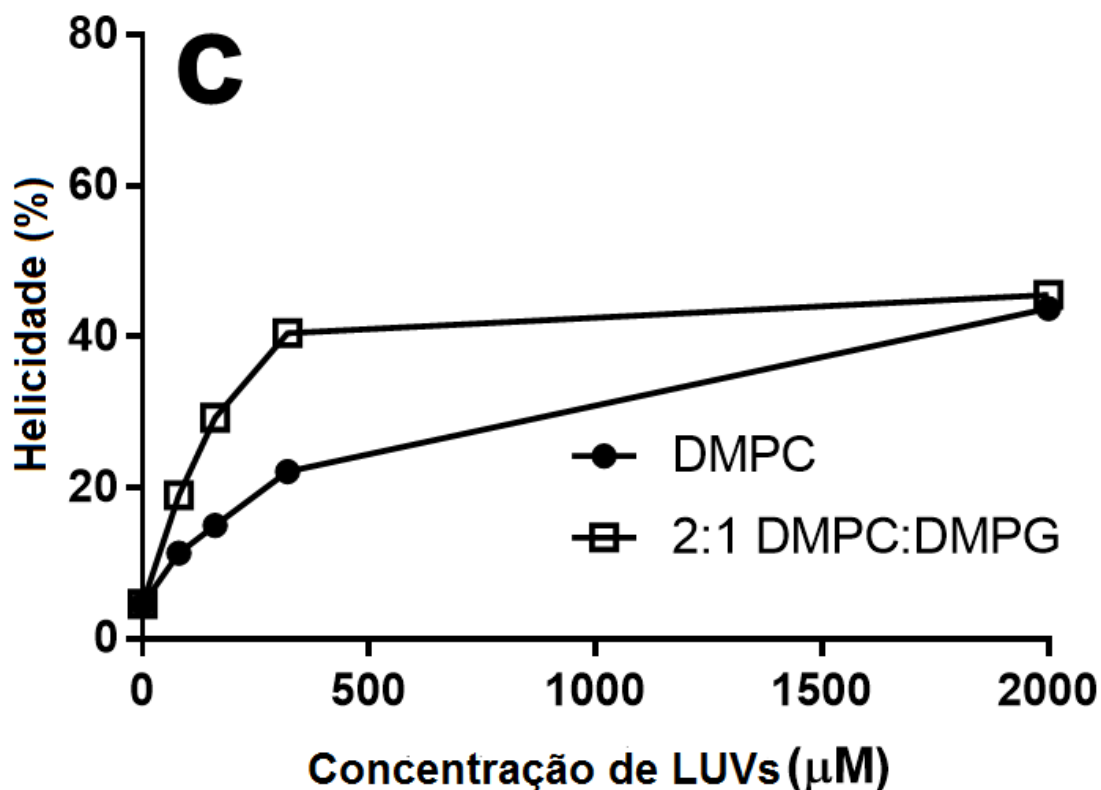


Figura 18. a. Espectros de dicroísmo circular (CD) do peptídeo Hs02 na presença de vesículas de DMPC em diferentes concentrações. b. Espectros de dicroísmo circular (CD) do peptídeo Hs02 na presença de vesículas 2:1 de DMPC:DMPG em diferentes concentrações. A legenda indica as diferentes concentrações de vesículas que foram utilizadas no teste e suas respectivas cores: 0 µM (marrom), 80 µM (violeta), 160 µM (verde), 320 µM (ciano) e 2 mM (azul). c. **Helicidade percentual de Hs02 em função da concentração de vesículas (LUVs).**

É possível observar que o peptídeo Hs02 não se estruturou na ausência de vesículas, porém, apresentou conformação α -helicoidal na presença dos dois tipos de vesículas, tanto as de carga neutra (DMPC), quanto as de carga negativa (2:1 DMPC:DMPG), com os sinais negativos característicos em 208 e 222 nm e o pico positivo em torno de 190 nm (Figuras 18a e 18b). Contudo, percebe-se que o peptídeo se estrutura mais na presença de vesículas de carga negativa do que neutras (Figura 18c). Por exemplo, na concentração de 320 µM de vesículas 2:1 DMPC:DMPG (8:1 relação lipídeo:peptídeo) quase 40% da estrutura α -helicoidal teórica máxima para Hs02 foi atingida, sendo que para vesículas feitas exclusivamente de DMPC na mesma concentração, apenas 22% (Figura 18c). Em proporções menores de lipídeo:peptídeo

(concentrações de 80 e 160 μM), essa preferência pela maior estruturação em vesículas negativas permanece. No entanto, após a adição de 2 mM de DMPC ou 2:1 DMPC:DMPG (50:1 razão lipídeo:peptídeo), o Hs02 se encontra aproximadamente 45% estruturado em hélice- α para ambas as composições de membrana, indicando que, para este peptídeo, a seletividade em relação às membranas carregadas negativamente pode ser perdida em proporções mais altas de lipídeos:peptídeos. Esses resultados sugerem, portanto, que Hs02 possui uma capacidade discriminatória dependente da concentração em relação a membranas carregadas negativamente e além disso, confirmam observações prévias de que Hs02 interage superficialmente com membranas⁸ e pode ser usado como um módulo preliminar de direcionamento de membrana para o desenho racional de moléculas quiméricas.

Sabendo que a região Chim2a (KWAVKIIRKFIKGFIS-) do peptídeo Chim2 é o peptídeo Hs02 (KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂), tendo apenas a troca Arg5Lys, a estruturação em hélice- α da cadeia de Chim2, provavelmente, acontece nessa região, fazendo com que a mesma possa interagir com a membrana, e o restante do peptídeo permaneça desestruturado. É interessante ressaltar que a introdução dessa “cauda”, equivalente as regiões Chim2b e Chim2c (-GGKRWKYM-NH₂) ao peptídeo Chim2a, gerando o peptídeo Chim2, aumentou, aparentemente, sua seletividade por membranas negativas em relação às neutras. Tal observação é fundamentada pela helicidade percentual baixa, de 13%, para esse peptídeo na presença de vesículas de DMPC na concentração de 2 mM, como mostrado na Tabela 1, diferentemente do peptídeo Hs02 que apresentou uma helicidade de ~45% nessa condição. Já para essa mesma concentração na presença de vesículas de 2:1 DMPC:DMPG, Chim2 teve uma helicidade percentual de 55% contra 45% de Hs02.

5.3 Determinação da estrutura tridimensional do peptídeo Chim2 em micelas de Dodecilsfosfolina (DPC-_{d38}) por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para obter uma melhor compreensão da interação a nível atômico do peptídeo Chim2 com membranas, estudos estruturais foram realizados por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), em solução. A resolução da estrutura tridimensional do peptídeo colabora para o entendimento do modo de interação com membranas, pois fornece dados sobre as possíveis conformações do peptídeo que são significativas para essa interação.^{45, 46}

Para a determinação da estrutura do peptídeo Chim2 foram obtidos os espectros de RMN 2D de ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^1H NOESY. As Figuras 19 e 20 apresentam, respectivamente, a região de impressão digital de sinais de correlação NH-H α e a região de sinais de correlação NH-NH, que são sinais relevantes do peptídeo e permitem a atribuição dos deslocamentos químicos dos hidrogênios de cada aminoácido.

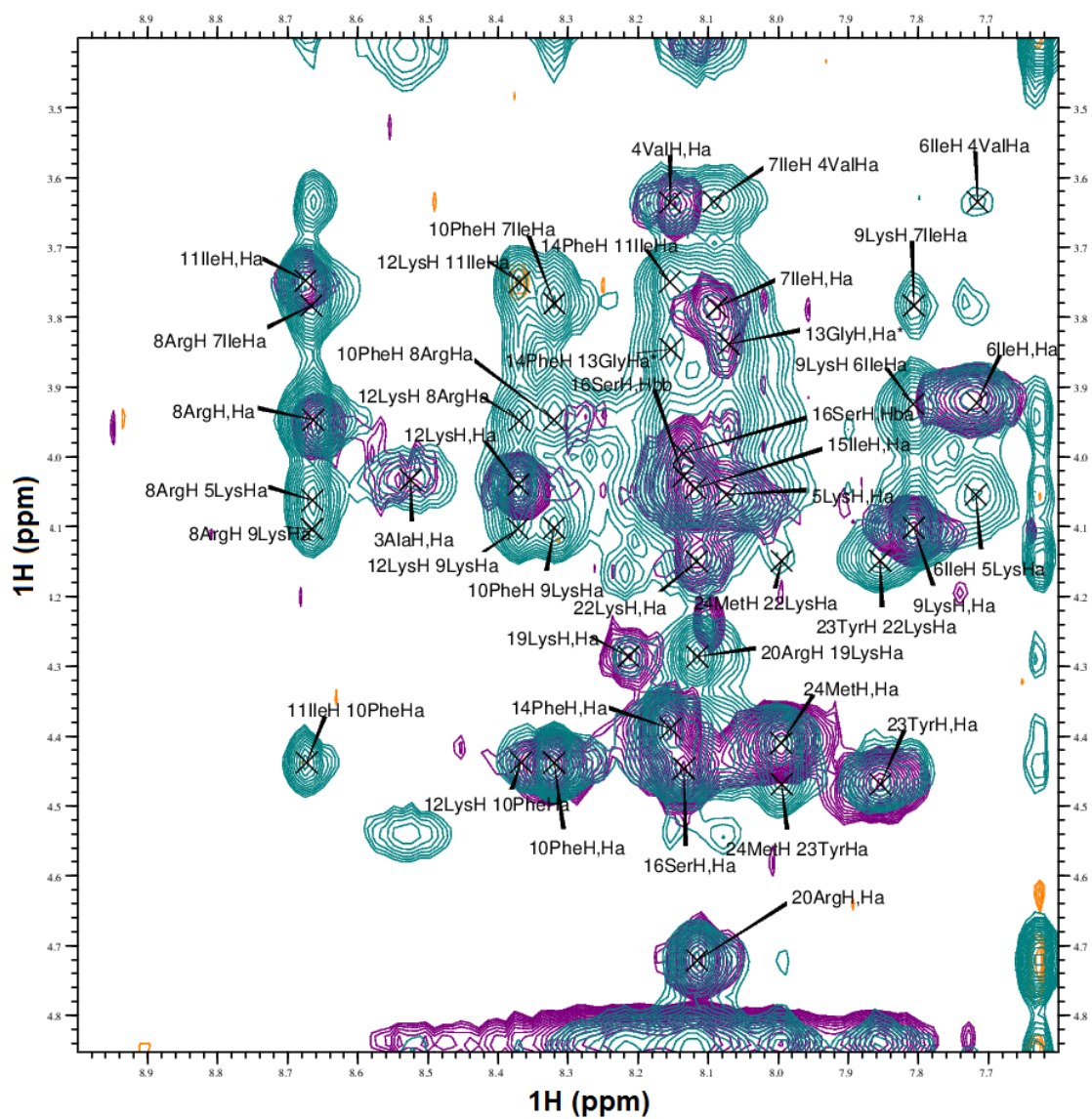


Figura 19. Região NH-H α do espectro de ^1H - ^1H TOCSY (roxo) e ^1H - ^1H NOESY (verde) do peptídeo Chim2 na presença de DPC-_{d38}.

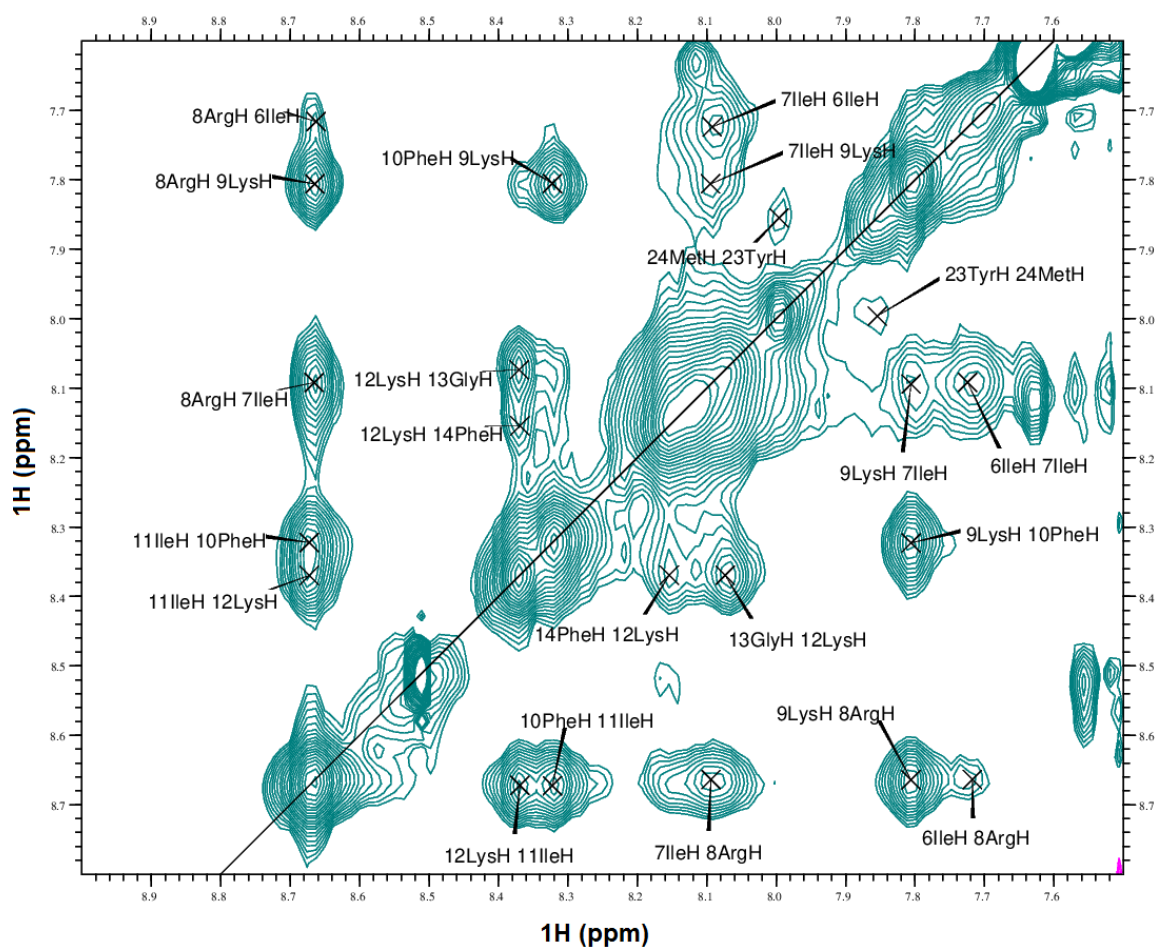


Figura 20. Região NH-NH do espectro de ^1H - ^1H NOESY do peptídeo Chim2 na presença de DPC- d_{38} .

Os valores dos deslocamentos químicos atribuídos a cada hidrogênio estão reunidos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de deslocamentos químicos de ^1H (ppm) dos resíduos de aminoácido do peptídeo Chim2 na presença de DPC- d_{38} .

Resíduos	δ_{NH}	$\delta_{\text{H}\alpha}$	$\delta_{\text{H}\beta}$	δ_{outros}
Lys 1	-	-	-	-
Trp 2	-	4,85*	-	δ 7,53; ϵ 10,81
Ala 3	8,52	4,03	1,31	-
Val 4	8,15	3,64	2,21	γ 1,06/1,14
Lys 5	8,07	4,06	2,01	δ 1,65/1,75; ϵ 3,03; γ 1,49
Ile 6	7,72	3,92	1,57	δ 0,90; γ 1,31/0,96

Ile 7	8,09	3,78	1,90	δ 0,90; γ 1,13/1,03
Arg 8	8,66	3,95	1,88	δ 3,29; γ 1,68
Lys 9	7,81	4,10	2,06	ϵ 3,03; γ 1,49
Phe 10	8,32	4,44	3,33	-
Ile 11	8,67	3,75	-	δ 0,95; γ 1,34/1,04
Lys 12	8,37	4,04	2,01	ϵ 3,03
Gly 13	8,07	3,84	-	-
Phe 14	8,15	4,39	2,93/3,11	-
Ile 15	8,12	4,05	-	δ 0,94; γ 1,39/1,02
Ser 16	8,14	4,44	4,00/4,03	-
Gly 17	-	-	-	-
Gly 18	-	-	-	-
Lys 19	8,21	4,29	1,77	δ 1,50/1,56; ϵ 3,12
Arg 20	8,11	4,72	-	δ 3,30/3,38
Trp 21	-	4,85*	-	δ 7,37; ϵ 10,58
Lys 22	8,12	4,15	1,69	ϵ 2,95; γ 1,16
Tyr 23	7,85	4,47	2,92/3,08	-
Met 24	8,00	4,41	2,08/2,18	γ 2,54/2,63

* Deslocamentos não encontrados no espectro da Figura 19.

Os resíduos de aminoácido Lys1, Gly17 e Gly18 não foram identificados, provavelmente, devido à sobreposição de sinais. Além disso, em função da Lys1 ser o primeiro resíduo e as glicinas possuírem como cadeia lateral somente um átomo de hidrogênio, eles estabelecem pouca interação interresidual, dificultando a detecção de seus sinais no espectro. Os valores de $H\alpha$ dos triptofanos foram estabelecidos com base na correlação com o sinal de $H\epsilon$. Os demais sinais foram atribuídos com base em valores de deslocamento químico esperados para os respectivos resíduos e as correlações entre os hidrogênios de sua cadeia principal e lateral e de aminoácidos vizinhos.^{46, 87}

Uma análise prévia da estrutura tridimensional pode ser obtida por meio do índice de deslocamento químico (CSI – *Chemical Shift Index*) dos átomos $H\alpha$ da cadeia principal e pelos padrões de conectividade dos mapas de contorno do espectro de NOESY (Figura 21).⁸⁸ O CSI é calculado a partir da

diferença do deslocamento químico médio do H α , em conformação aleatória e o valor obtido experimentalmente, sendo esperados valores negativos para uma estrutura helicoidal. Os padrões de conectividade demonstram que grandes quantidades de NOEs de médio alcance, referentes às interações de H α -HN ($i, i + 3$) e H α -HN ($i, i + 4$), indicam a presença de estrutura em hélice- α . Os resultados do CSI e o padrão de conectividade de NOES do peptídeo Chim2 estão apresentados na Figura 21.

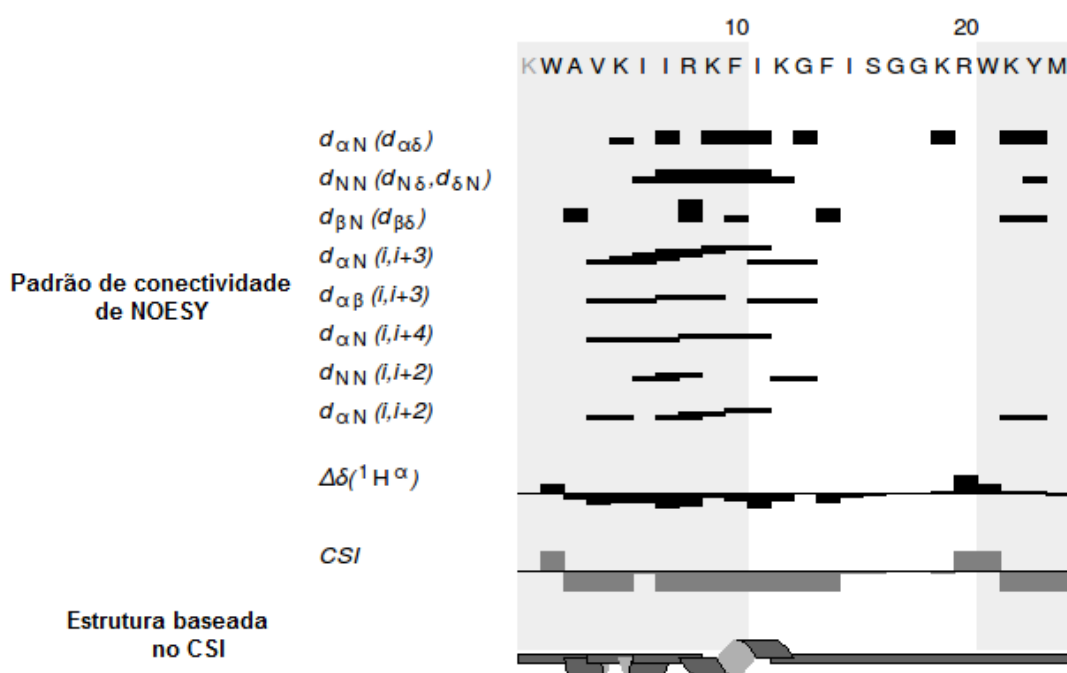


Figura 21. Padrão de conectividades de NOE e padrão de CSI de H α para o peptídeo Chim2 na presença de DPC- $d_{3\beta}$. As intensidades dos NOEs são indicadas pela espessura das barras.

A análise dos resultados de CSI para o peptídeo Chim2 indica que o peptídeo apresenta uma estrutura em hélice- α na região entre os resíduos Ala3-Phe14. Porém, de acordo com o CSI, essa estruturação se mostra de maneira descontínua, tendo a sequência helicoidal interrompida. A estrutura em hélice- α é indicada quando o CSI apresenta valores negativos para o cálculo, mostrando que os átomos de H α possuem valores de deslocamentos químicos menores do que os esperados para os aminoácidos em conformação aleatória. Essa situação é observada para a maioria dos aminoácidos dessa

região, contudo, é percebido para Ile6 a ausência desse sinal negativo causando essa descontinuidade na estrutura helicoidal.

O cálculo da estrutura do peptídeo foi realizado pelos programas ARIA/CNS com base nos dados de restrições de distâncias, obtidas pelas informações de volume de NOEs e de restrições angulares, obtidas a partir dos ângulos diedros calculados pelo programa CCPNMR. As restrições de distâncias foram analisadas a cada cálculo, a fim de identificar e corrigir possíveis violações. Após a análise, de aproximadamente 42 ciclos de cálculos, todas as violações de distância foram corrigidas e as 10 estruturas de menor energia do peptídeo foram selecionadas (Figura 22).

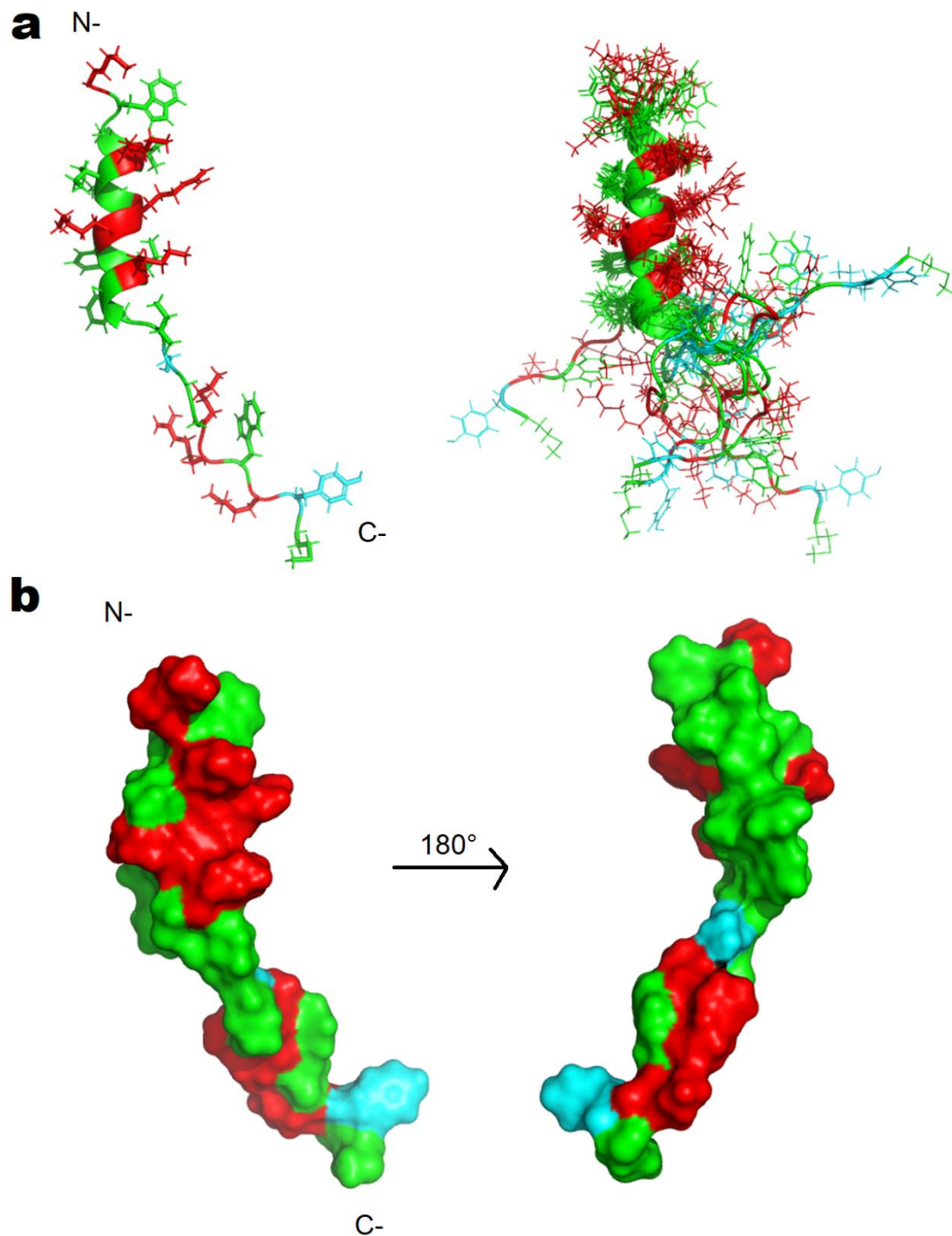


Figura 22. a) Representação em fita da estrutura de menor energia do peptídeo Chim2 (esquerda) e sobreposição das 10 estruturas de menor energia do peptídeo Chim2 (direita) na presença de micelas DPC-d38. b) Característica hidrofóbica da superfície do peptídeo Chim2. A estrutura à direita mostra a molécula girada 180° em torno do seu eixo vertical. As diferentes cores apresentam as características dos aminoácidos de cadeia lateral da seguinte maneira:

vermelho para os resíduos carregados positivamente, ciano para os resíduos polares e verde para os resíduos apolares.

É possível observar com as estruturas obtidas pelos resultados de RMN que a região compreendida entre os resíduos Lys1-Ser16 – Chim2a, apresenta uma porção estruturada em hélice- α , entre os resíduos Ala3-Phe14, assim como o peptídeo Hs02⁸, sendo a região que interage preferencialmente com a membrana celular de carga negativa de maneira superficial, porém, forte. Sua região N-terminal, composta pelos aminoácidos Lys1 e Trp2, se apresenta de forma desestruturada. Do Ile15 em diante, a cadeia se encontra desordenada, semelhante a uma cauda. Nela se encontra o módulo Chim2b formado pelos resíduos Gly17 e Gly18, sendo a região espaçadora do peptídeo que induz a desestruturação dessa parte da cadeia, fornecendo liberdade conformacional e permitindo com que o sítio de clivagem enzimática, formado pelos aminoácidos Lys19 e Arg20, fique livre para sofrer a hidrólise. Nela se encontra também, a sequência compreendida pelos resíduos Trp21-Met24 – Chim2c, equivalente ao peptídeo WKYM-NH₂ que funciona como agonista ao receptor de membrana FPR2 que desencadeia uma resposta imune do organismo. Além disso, a região de hélice- α do peptídeo apresenta uma característica anfifílica, com uma face polar formada por resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Lys5, Arg8, Lys9 e Lys12) e outra apolar, formada por resíduos apolares (Ala3, Val4, Ile6, Ile7, Phe10 e Ile11), como já demonstrado no trabalho de Brand⁸ et. al para o peptídeo Hs02, lembrando que a anfifilicidade é uma característica relevante à interação de peptídeos com membranas.

Para avaliação da qualidade das estruturas geradas, são utilizadas algumas análises estatísticas, como o cálculo de RMSD e o gráfico Ramachandran (Tabela 3, Figura 23 e Figura 24). Os valores de RMSD para a região estruturada em hélice- α entre os aminoácidos Ala3-Phe14 foram calculados, especificamente, pelo programa Molmol e compilados na Tabela 3. Como pode ser observado, o valor de RMSD para esta região é baixo ($0,44 \pm 0,18$ Å) o que sugere que as estruturas obtidas são convergentes e que ela é bem estruturada, devido a presença de NOEs de médio alcance, como previsto pelos dados de CSI. O cálculo de RMSD para o peptídeo completo também foi

obtido (Figura 23). Como era esperado, os primeiros resíduos da região N-terminal e a cauda da região C-terminal, que apresentam uma estrutura desordenada, em conformação aleatória, aumentaram significativamente os valores de RMSD para tais, quando comparadas a região estruturada.

Tabela 3. Estatísticas estruturais das 10 estruturas de menor energia do peptídeo Chim2 na presença de micelas de DPC-_{d38}.

Restrições de NOE	
Total de restrições de distâncias	343
Restrições intraresiduais	239
Restrições sequenciais ($i, i+1$)	66
Restrições de médio alcance ($(i, i+j)_{j=2,3,4}$)	38
Ângulos diedros	32
RMSD (Å) do segmento em hélice (Ala3-Phe14)	
Cadeia principal	$0,44 \pm 0,15$
Cadeia principal e lateral	$1,40 \pm 0,37$
Ramachandran	
Resíduos em regiões favorecidas	78,2%
Resíduos em regiões permitidas	18,2%
Resíduos em regiões proibidas	3,6%

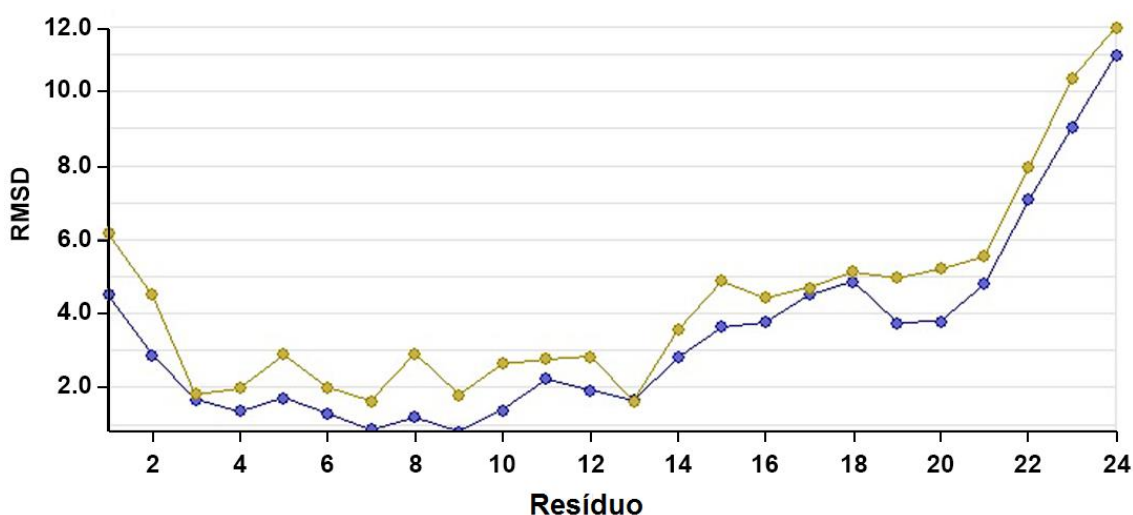


Figura 23. Perfil de RMSD do peptídeo Chim2. A linha azul se refere ao RMSD do esqueleto peptídico, sem as cadeias laterais. A linha amarela se refere ao RMSD de toda a cadeia peptídica, incluindo as cadeias laterais. Quanto menor o valor de RMSD, mais ordenada se encontra a região da cadeia peptídica. Os valores de RMSD para a

região α -helicoidal entre a Ala3-Phe14 se encontram abaixo de 4,0, enquanto para as demais regiões em conformação aleatória, desestruturadas se encontram acima de 4,0, atingido até o valor de RMSD de 12,0 para o último resíduo.

Além dos cálculos de RMSD, a análise do gráfico Ramachandran (Figura 24) mostrou que cerca de 78,2% de todos os resíduos estão nas regiões mais favorecidas do diagrama e 18,2% nas regiões permitidas, indicando uma qualidade estereoquímica dos modelos de RMN obtidos para o peptídeo. Os outros 3,6% são dos resíduos localizados em regiões não permitidas. Esse número se refere a resíduos que se encontram em porções desestruturadas como, por exemplo, os resíduos Gly17 e Gly18 e os resíduos Trp2 e Trp21.

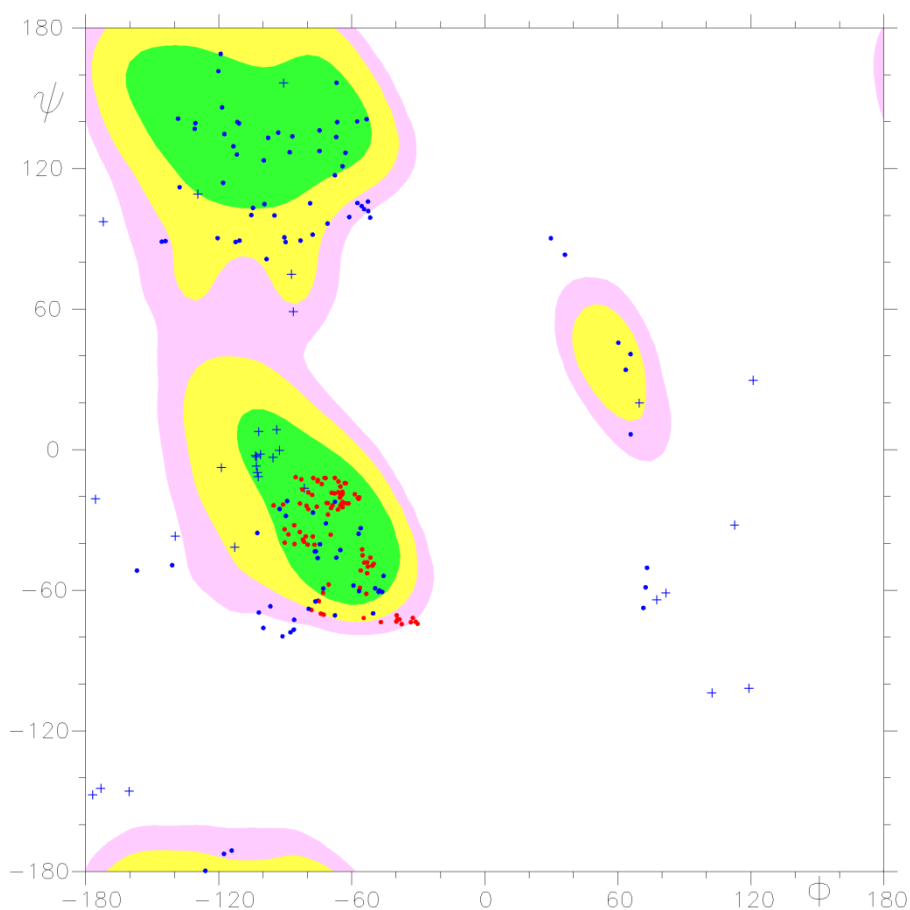


Figura 24. Gráfico Ramachandran do peptídeo Chim2. As regiões em verde se caracterizam por serem as regiões favorecidas; as rosas e amarelas são as regiões permitidas; fora dessas regiões, em branco, as regiões proibidas. Os pontos vermelhos se referem aos resíduos equivalentes a estrutura em hélice- α , da Ala3-

Phe14, as glicinas são representadas como cruces, enquanto os pontos azuis, são os demais aminoácidos.

A estrutura de Chim2 foi revisada e validada, e então, publicada no banco de dados BMRB (*Biological Magnetic Data Bank*) com o código de acesso 8EB1.

5.4– Ensaio de liberação do peptídeo agonista de FPR2 (Chim2c) mediante tripsinólise de Chim2 em ambiente enriquecido com vesículas fosfolipídicas

Foram realizados ensaios de hidrólise do peptídeo Chim2 na presença das vesículas fosfolipídicas neutras (DMPC) e negativamente carregadas (2:1 DMPC:DMPG), utilizadas como modelo de células eucarióticas e procarióticas, respectivamente, para verificar se a estruturação preferencial de Chim2 verificada em vesículas de carga negativa afeta seu padrão de tripsinólise. Os ensaios de digestão enzimática foram realizados conforme descrito na metodologia. Para a avaliação qualitativa e quantitativa da liberação do domínio Chim2c a partir de Chim2, foram utilizadas as técnicas de espectrometria de massa (MS) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), respectivamente. Essas técnicas foram empregadas como prova de conceito, levando-se em consideração a hipótese de que na ausência de vesículas o peptídeo ficaria livre em solução e a enzima teria liberdade para hidrolisar a cadeia peptídica como um todo. De maneira semelhante, na presença de vesículas de DMPC, com as quais o Chim2 apresenta baixa estruturação, novamente, ele estaria livre em solução para sofrer o ataque enzimático. Contudo, na presença de vesículas de 2:1 DMPC:DMPG, com as quais o peptídeo interage por meio de sua porção Chim2a (KWAVKIIRKFIKGFIS-), hipotetiza-se uma proteção pela membrana da região helicoidal. Assim a região desestruturada Chim2b (-GGKR-), na qual se encontra o sítio de clivagem, ficaria livre para o ataque da enzima, direcionando uma proteólise seletiva pela interação específica com a membrana e a liberação da porção imonomoduladora Chim2c (-WKYM-NH₂).

Utilizando-se a técnica de espectrometria de massa (MS) para análise qualitativa dos experimentos, os perfis de hidrólise do peptídeo na ausência e presença de vesículas unilamelares grandes (LUVs) neutras (DMPC) e negativas (2:1 DMPC:DMPG) foram avaliados. Como fonte de comparação, os fragmentos teóricos de Chim2, obtidos a partir de hidrólise triptica, foram compilados em uma tabela (Anexo B – Tabela B2) que foi gerada com base nos cálculos teóricos das fragmentações geradas pela clivagem da enzima tripsina em seus sítios preferidos, na função *PeptideMass* da ferramenta ProtParam no site do ExpASy *Bioinformatic Resource Portal*.⁸⁹

Os espectros de massa para os experimentos nas condições 1 (100 μ M de peptídeo Chim2 na ausência de vesículas), 2 (100 μ M de peptídeo Chim2 em 1 mM de vesículas neutras de DMPC) e 3 (100 μ M de peptídeo Chim2 em 1 mM de vesículas negativas de 2:1 DMPC:DMPG), razão de 1:10 peptídeo:fosfolípido, foram obtidos, primeiramente. Para demonstração dos resultados, foram usados como referência os tempos de 0, 60, 120 minutos. A Figura 25 apresenta essas três condições de digestão no tempo zero, experimento controle, no qual a enzima é colocada, mas tem sua ação imediatamente cessada para que não haja tempo hábil para começar a hidrólise.

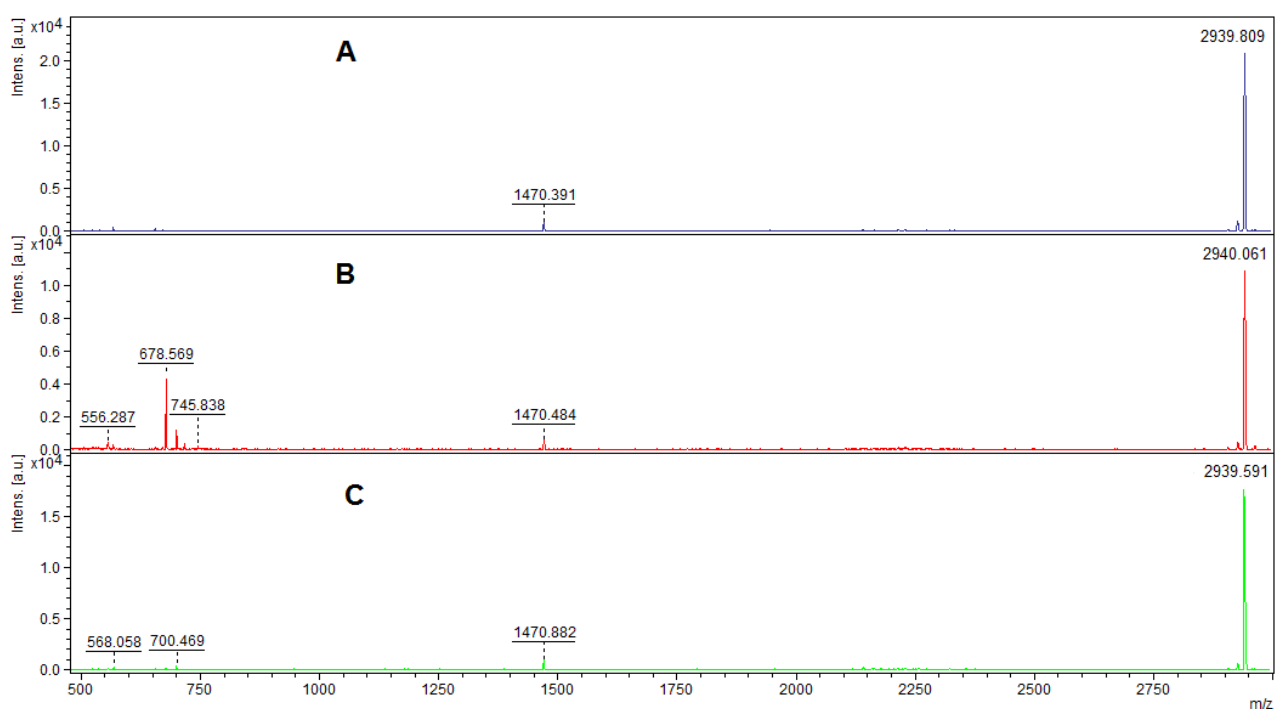


Figura 25. Espectros de massa dos ensaios de digestão do peptídeo Chim2 no tempo de 0 minuto para: (A) Condição 1, (B) Condição 2 e (C) Condição 3. O eixo y se encontra em unidades arbitrárias (a.u.).

No tempo 0 minuto, é obtido um espectro de massa muito semelhante para todas as condições. É possível observar que o sinal referente ao íon precursor de Chim2, equivalente a, aproximadamente, $[M+H]^+ = 2939,7$ Da, aparece intensamente para todas as condições, mostrando que como não houve tempo suficiente para a ação da enzima, não ocorre hidrólise do peptídeo. O outro íon que aparece nos espectros, de m/z 1470,8, aproximadamente, se refere a sua dupla carga ($[M+2H]^{2+} = 1470,882$ Da). Nas condições 2 e 3, os sinais que aparecem na região de baixa massa/carga são referentes aos fosfolípidos constituintes das vesículas.

Após a incubação da amostra com tripsina a $1 \mu\text{g/mL}$, passados 60 minutos (Figura 26), nas Condições 1 e 2 (Figura 26a e 26b), foi possível observar a hidrólise completa do peptídeo, pois há o desaparecimento do íon precursor, de aproximadamente, $[M+H]^+ = 2939,7$ Da e o surgimento de diversos íons referentes à sua hidrólise pela tripsina. É possível observar um íon de $[M+H]^+ = 626,310$ Da, compatível com o peptídeo WKYM-NH₂ (Chim2c - $[M+H]^+_{\text{teórico}} = 626,31$ Da⁸⁹). Esse íon foi submetido à experimentos de MS/MS para confirmação de sua identidade (Figura 27).

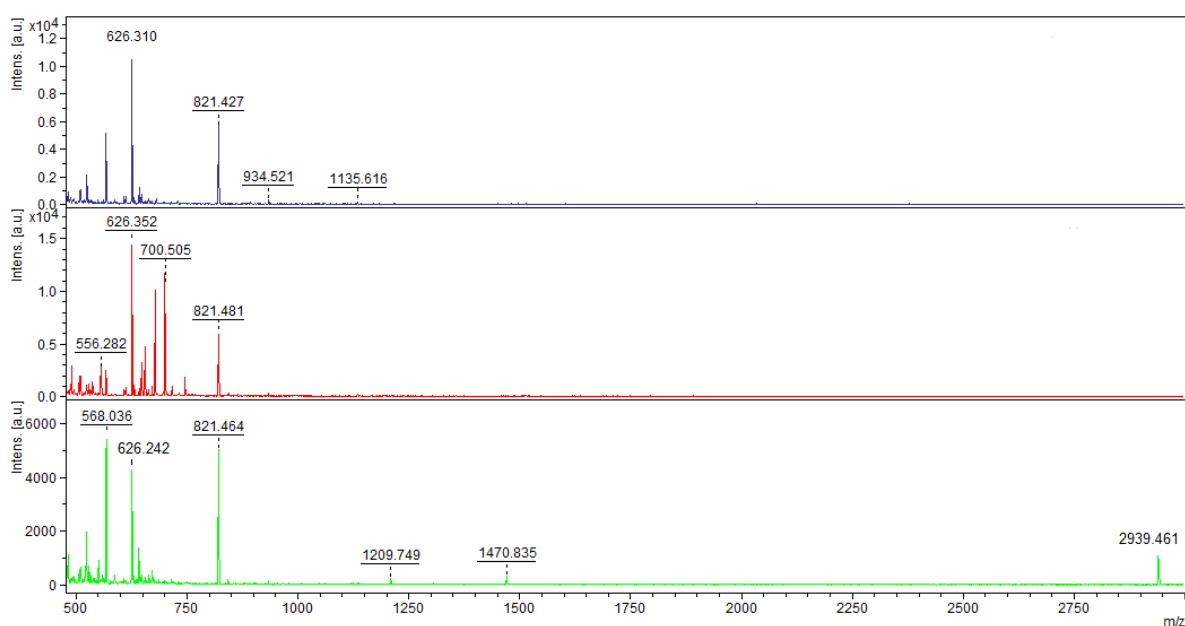


Figura 26. Espectros de massa dos ensaios de digestão do peptídeo Chim2 no tempo de 60 minutos para: (A) Condição 1, (B) Condição 2 e (C) Condição 3. O eixo y se encontra em unidades arbitrárias (a.u.).

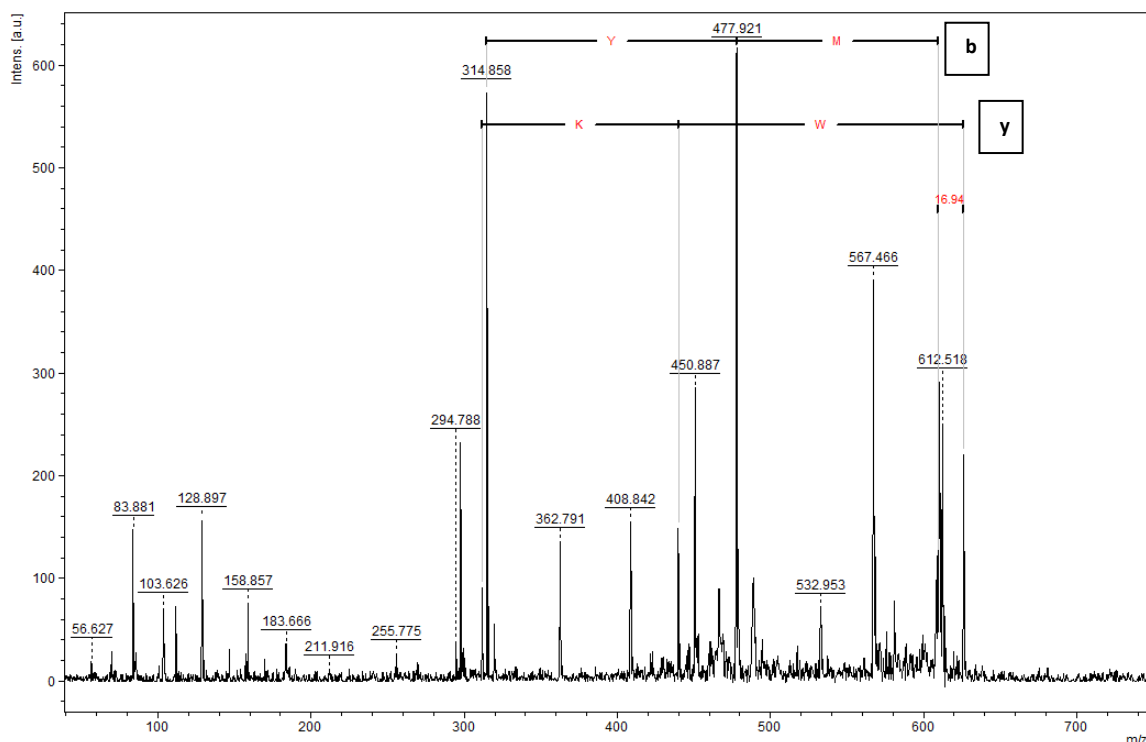


Figura 27. Espectro de massa da fragmentação do peptídeo WKYM-NH₂ [M+H]⁺ = 626,310 Da. A sequência de aminoácidos da parte superior se refere aos íons da série b, enquanto a da parte inferior, se refere aos íons da série y.

Vê-se também os íons de m/z 821,4 e 1209,7, aproximadamente, compatíveis com os produtos de hidrólise GFISGGKR, que é liberado após a hidrólise da cadeia entre a Lys12 e a Arg20 de Chim2, e FIKGFISGGKR, que é liberado após a hidrólise entre a Lys9 e a Arg20. Ambos foram também confirmados por meio de seus espectros de fragmentação, respectivamente (Figura 28 e Figura 29). Todos esses íons são originários da hidrólise de Chim2 em sítios preferidos pela enzima tripsina: os aminoácidos lisina e arginina. Foi observado, contudo, um comportamento diferente na condição 3, na qual o peptídeo foi incubado com LUVs de 2:1 DMPC:DMPG. Nesta condição (Figura 26c), o íon de Chim2 ainda é evidente, o que indica que o peptídeo fica protegido devido a interação eletrostática com as vesículas de carga negativa, evitando com que a enzima realize a proteólise completa do peptídeo. Contudo,

nesta condição, os íons $[M+H]^+ = 821,464$ Da e $[M+H]^+ = 1209,749$ Da ainda são encontrados, indicando ocorrência de hidrólise nos mesmos sítios da molécula de Chim2.

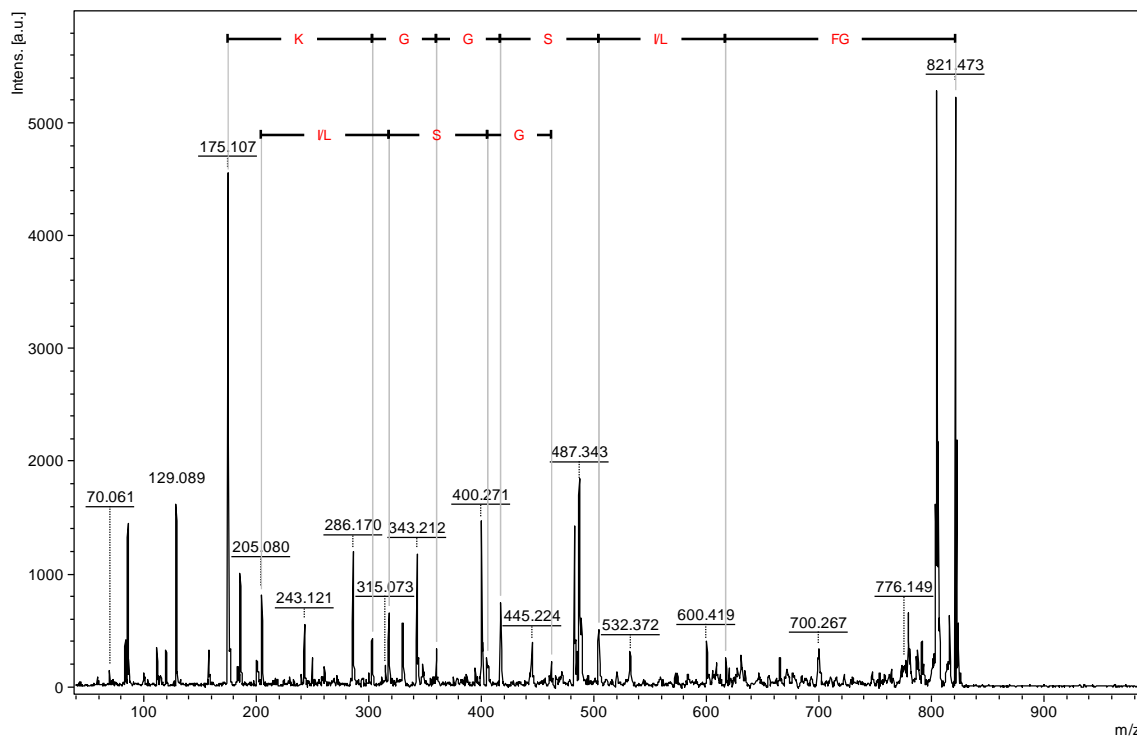


Figura 28. Espectro de massa da fragmentação do peptídeo GFISGGKR $[M+H]^+ = 821,473$ Da. A sequência de aminoácidos da parte superior se refere aos íons da série *b*, enquanto a da parte inferior, se refere aos íons da série *y*.

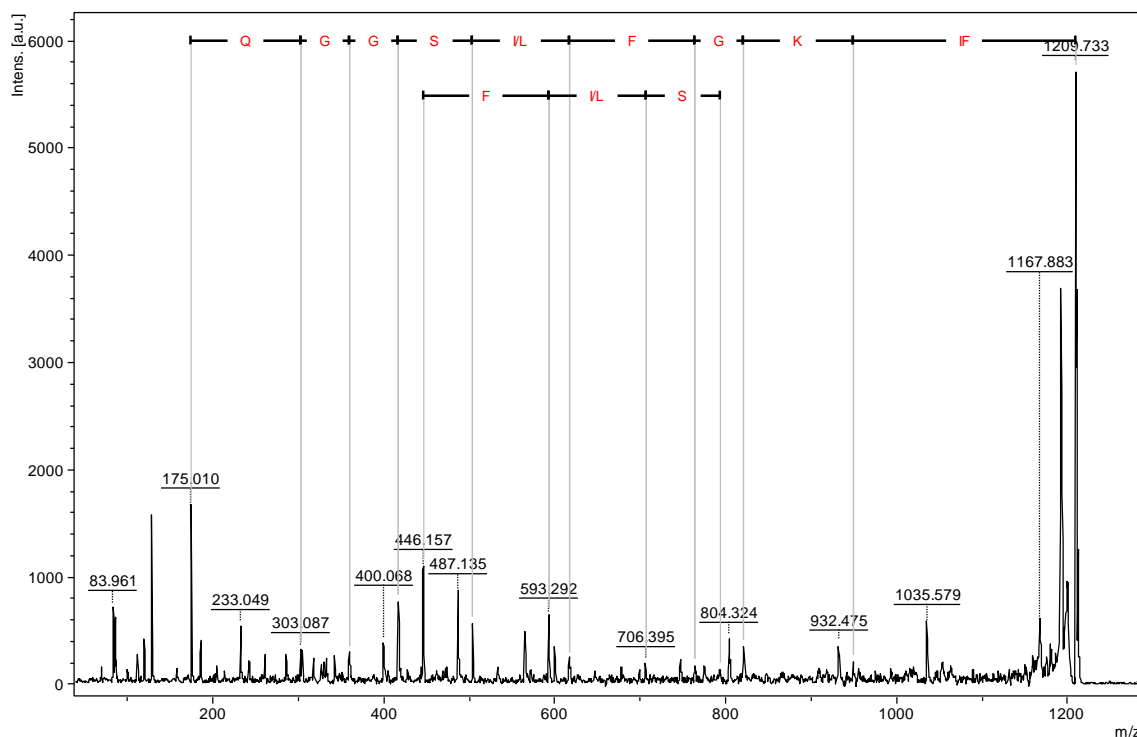


Figura 29. Espectro de massa da fragmentação do peptídeo FIKGFISGGKR, aproximadamente, $[M+H]^+ = 1209,7$ Da. A sequência de aminoácidos da parte superior se refere aos íons da série *b*, enquanto a da parte inferior, se refere aos íons da série *y*.

O padrão de hidrólise do peptídeo Chim2 para o tempo de 30 minutos foi similar ao tempo de 60 minutos para suas respectivas condições (Anexo A – Figura A1).

Para o tempo de 120 minutos (Figura 30), nas Condições 1 e 2 (Figura 30a e 30b), é observada a ausência do íon precursor e a permanência dos mesmos íons provenientes de hidrólise observados em tempos de incubação inferiores. Assim, são observados íons característicos da hidrólise da enzima em seus sítios de clivagem, como m/z 626,3; 821,4 e 1209,7, aproximadamente, além do íon 1135,651 Da compatível com o fragmento GFISGGKRWK (Anexo B – Tabela B2). Na Condição 3 (Figura 30c), com LUVs de 2:1 DMPC:DMPG, mesmo após 2h de incubação, é possível observar ainda, a presença do íon precursor em, aproximadamente, 2939,7 Da.

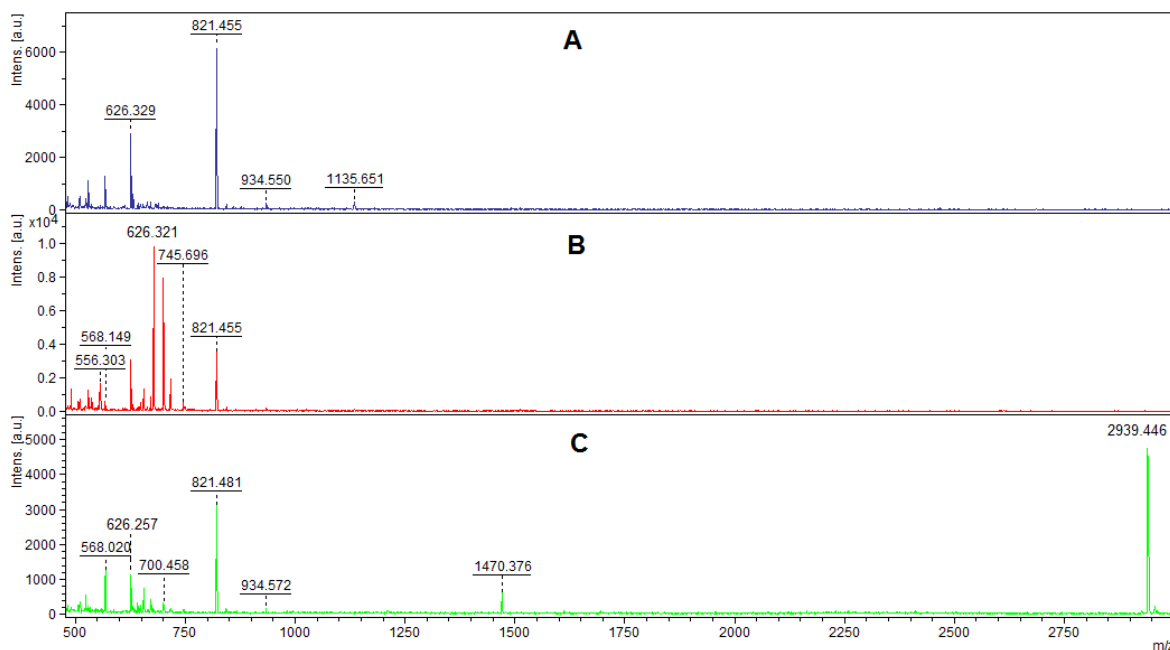


Figura 30. Espectros de massa dos ensaios de digestão do peptídeo Chim2 no tempo de 120 minutos para: (A) Condição 1, (B) Condição 2 e (C) Condição 3. O eixo y se encontra em unidades arbitrárias (a.u.).

Os padrões de hidrólise do peptídeo para o tempo de 240 minutos apresentaram um perfil semelhante ao tempo de 120 minutos para suas respectivas condições (Anexo A – Figura A2). Atenta-se, somente, que com o maior tempo de atuação da enzima, o íon m/z 626,4, aproximadamente, referente ao peptídeo Chim2c, praticamente não é percebido em todas as condições, provavelmente por sua hidrólise, já que possui um sítio de tripsinólise interno, (WK↓YM-NH₂). Contudo, na Condição 3 (Figura 30c), mesmo passadas 4 h de incubação com tripsina, ainda é possível observar o íon referente ao peptídeo Chim2 em $[M+H]^+ = 2939,503$ Da, mostrando que a interação deste com as membranas de carga negativa é capaz de prevenir sua hidrólise completa mesmo após longos tempos de incubação.

Para avaliar de forma quantitativa a liberação do peptídeo WKYM-NH₂ (Chim2c) a partir da hidrólise de Chim2, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi utilizada. Para referência e comparação com as amostras submetidas a tripsinólise, foi obtido um cromatograma da solução padrão do peptídeo WKYM-NH₂ na concentração de 100 μM, resultando em um tempo de retenção (T.R.) característico de 20,5 minutos (Figura 31). Além

disso, para quantificação de Chim2c liberado a partir da hidrólise de Chim2, foi feita uma curva de calibração para o peptídeo WKYM-NH₂, conforme descrito na metodologia (Figura 32).

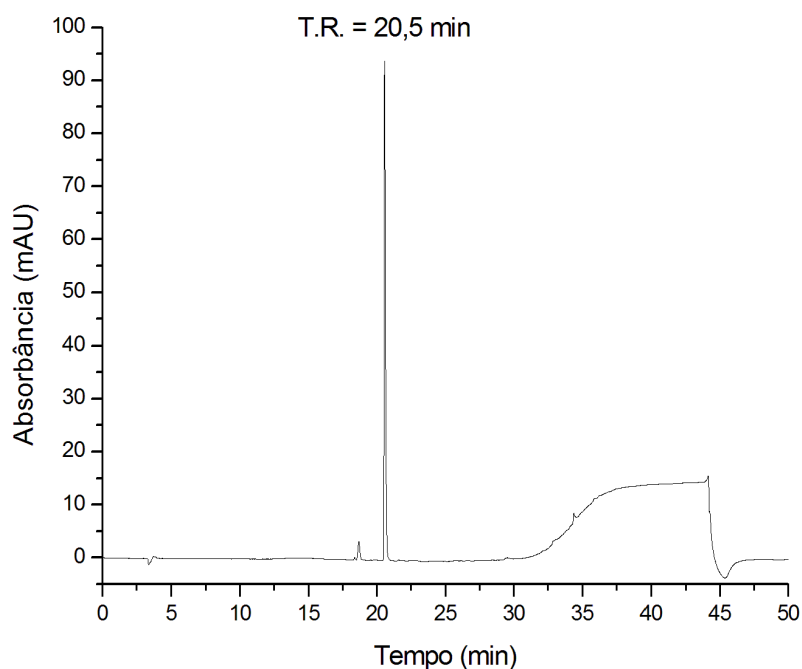


Figura 31. Cromatograma do peptídeo padrão WKYM-NH₂ na concentração de 100 μM. O tempo de retenção apresentado pelo peptídeo foi de 20,5 minutos.

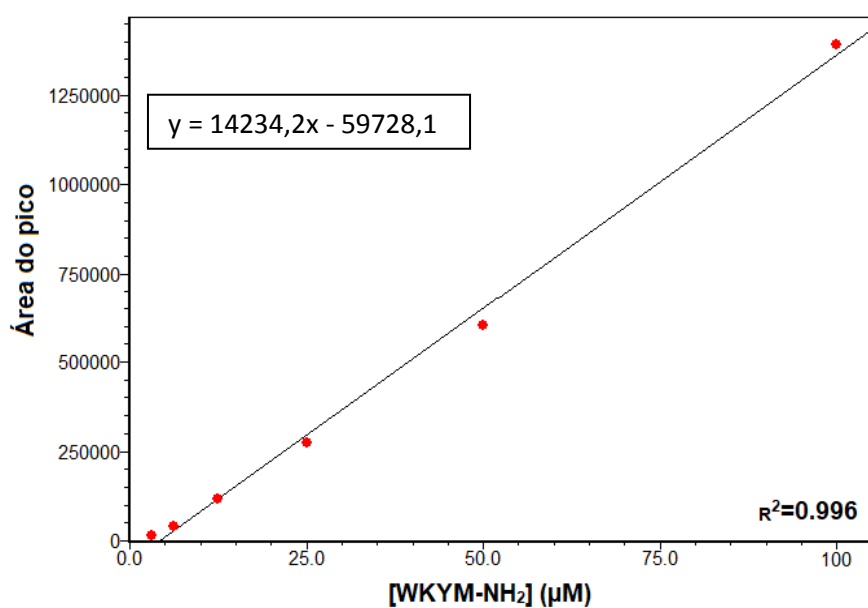
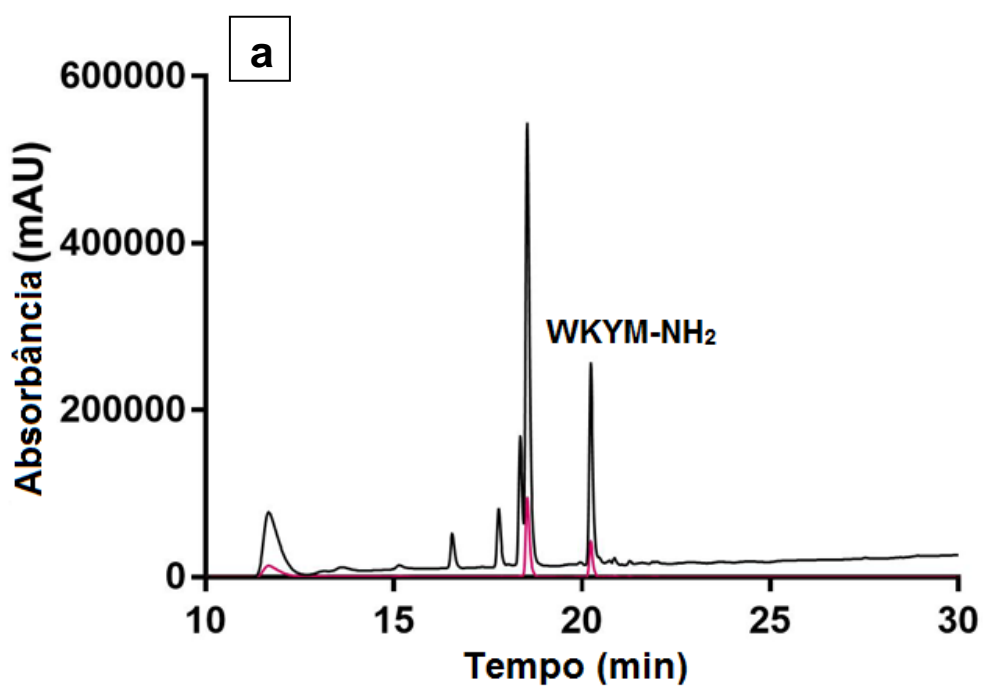


Figura 32. Curva de calibração para o peptídeo WKYM-NH₂. Para a confecção da curva foram utilizados 7 pontos com as concentrações do peptídeo de: 0, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µM, obtendo-se um $R^2 = 0,996$ e a equação da reta: $y = 14234,2x - 59728,1$. As medidas foram feitas em triplicata.

O tempo de 60 minutos foi escolhido como referência para representação dos cromatogramas obtidos a partir da injeção de amostras de Chim2 digeridas com tripsina na ausência e presença de vesículas modelo. Os cromatogramas obtidos para as Condições 1, 2 e 3 para este tempo estão apresentados abaixo (Figura 33).



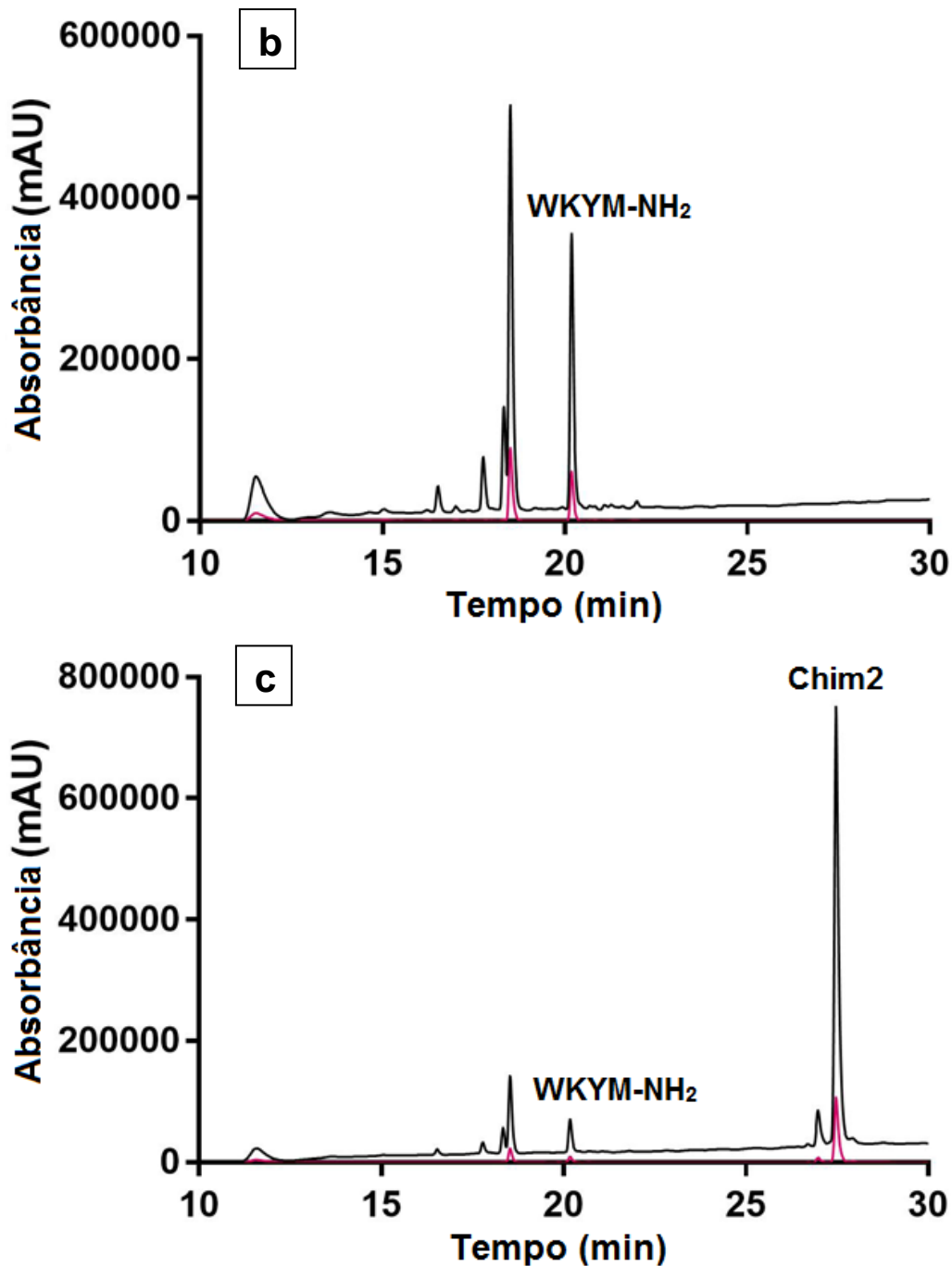


Figura 33. Cromatogramas dos ensaios de digestão do peptídeo Chim2 no tempo de 60 minutos para: a. Condição 1, b. Condição 2 e c. Condição 3. A linha preta corresponde à absorção no comprimento de onda de 216 nm, enquanto a linha vermelha, ao comprimento de onda de 280 nm. O tempo de retenção de WKYM-NH₂ é de 20,5 min, enquanto o de Chim2 é 27,5 min.

Como pode-se observar nas Figuras 33a e 33b (Condições 1 e 2 – na ausência de vesículas e presença de 1 mM de DMPC, respectivamente), aos

60 minutos, todo o peptídeo Chim2 foi hidrolisado, não havendo a presença do pico de absorbância no tempo de retenção de 27,5 minutos, diferentemente do que é mostrado na Figura 33c (Condição 3 – presença de 1 mM de 2:1 DMPC:DMPG) no qual o sinal é aparente e de grande intensidade. Com isso, assim como já também percebido pelos espectros de massa, concluímos que na presença de vesículas carregadas negativamente, o peptídeo Chim2 fica protegido por meio de sua adsorção na interface da membrana, fazendo com que perdure por mais tempo no sistema sem sofrer hidrólise.

Em todos os cromatogramas das amostras, têm-se um segundo sinal de intensidade significativa, com T.R. = 18,8 minutos, que não foi caracterizado.

As áreas dos picos obtidos para Chim2c nos diferentes tempos de incubação com tripsina para as diferentes composições de LUVs foram aplicados na equação da reta obtida pela curva de calibração e a concentração do peptídeo WKYM-NH₂ em cada tempo foi obtida (Figura 34). É possível observar que as Condições 1 e 2 possuem perfis muito semelhantes de liberação do peptídeo WKYM-NH₂ (Chim2c) ao longo do tempo de incubação, nos quais, já nos primeiros 30 minutos, uma grande quantidade do peptídeo é liberada (concentração aproximada de 75 µM para ambas condições) e depois diminui, vertiginosamente, até atingir valores próximos de 10 µM nos 240 minutos, possivelmente pela hidrólise do próprio peptídeo Chim2c pela tripsina. Já na Condição 3, a interação do peptídeo com as vesículas de carga negativa altera significativamente a cinética de liberação de Chim2c. Percebe-se que nos primeiros 30 minutos, apenas cerca de 25 µM de WKYM-NH₂ é liberado, três vezes menos do que nas condições anteriores e que nos minutos seguintes, essa quantidade não cai bruscamente, com o peptídeo sendo liberado paulatinamente até atingir uma concentração próxima, também, dos 10 µM no tempo final (240 minutos).

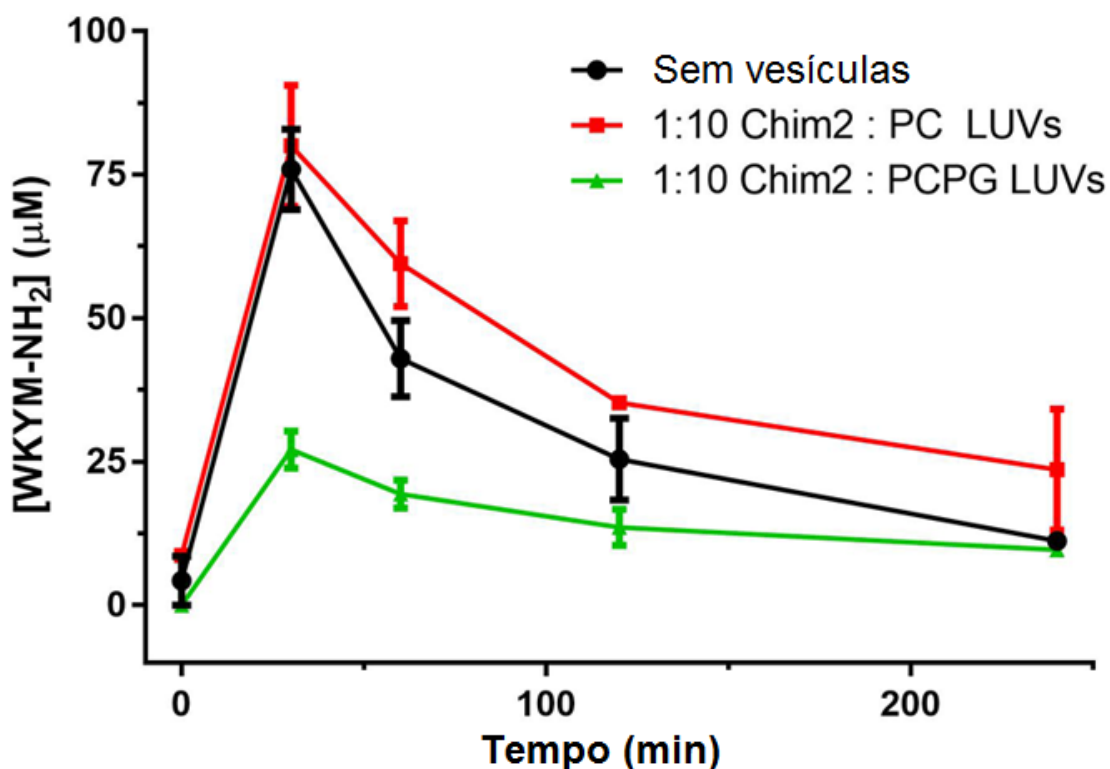


Figura 34. Quantificação do peptídeo WKYM-NH₂ (Chim2c) em função do tempo de reação de 0 a 240 minutos para as Condições 1, 2 e 3. Condição 1 (linha preta, 100 µM de peptídeo, sem vesículas), Condição 2 (linha vermelha, 100 µM de peptídeo, 1 mM de DMPC) e Condição 3 (linha verde, 100 µM de peptídeo, 1 mM de 2:1 DMPC:DMPG).

Um segundo experimento foi realizado utilizando-se 25 µM do peptídeo Chim2 para a mesma concentração de 1 mM de LUVs 2:1 DMPC:DMPG, tendo-se, agora, uma razão de 1:40 peptídeo:fosfolipídeo. Este experimento foi conduzido utilizando a mesma metodologia dos experimentos anteriores, porém, com o acréscimo do tempo de 480 minutos (de 0 a 480 minutos) (Figura 35). Esse aumento na proporção entre vesículas e peptídeo visa avaliar se Chim2 estava sendo hidrolisado pela enzima em solução ou enquanto adsorvido à membrana e como isso afetaria a cinética de liberação do peptídeo imunomodulador Chim2c (WKYM-NH₂). Foi feita uma curva de calibração para o peptídeo Chim2, nos moldes da curva para Chim2c, para permitir a também quantificação deste peptídeo neste experimento (Anexo E – Figura E1).

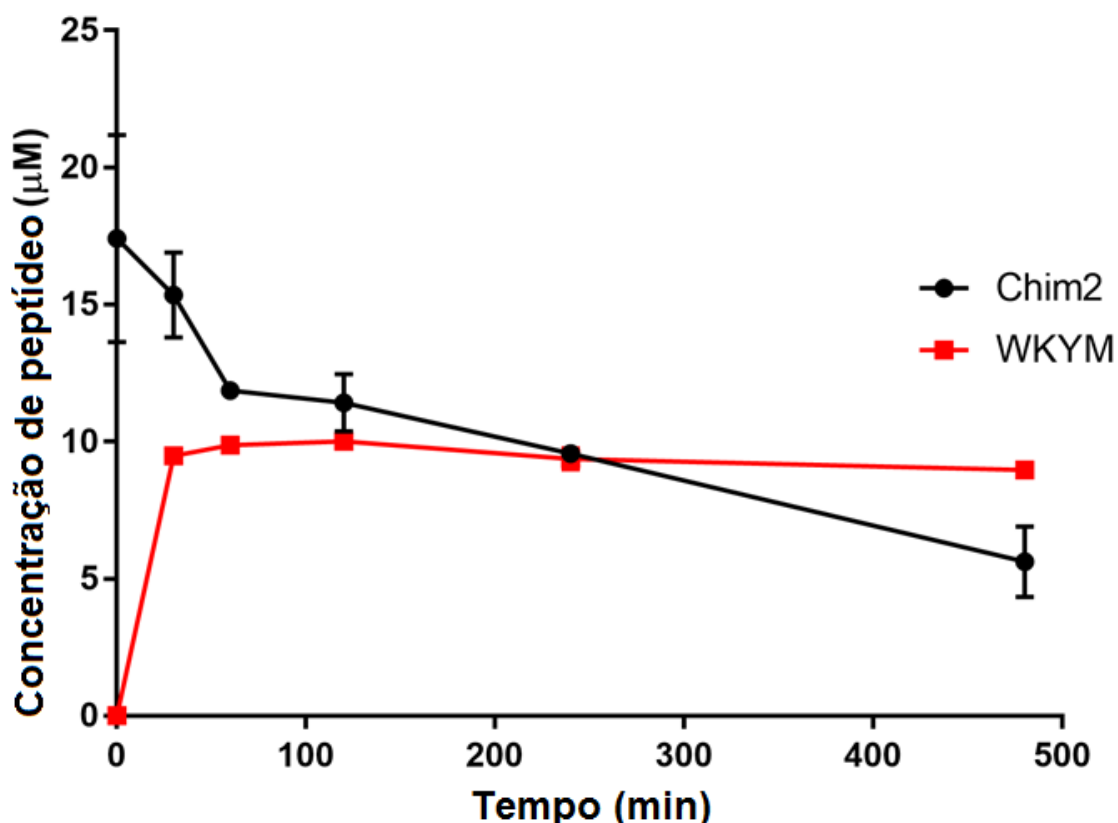


Figura 35. Concentração dos peptídeos Chim2 e Chim2c (WKYM-NH₂) nos tempos de 0, 30, 60, 120, 240 e 480 minutos para a Condição 4 (25 μM de Chim2 em 1 mM de 2:1 DMPC:DMPG (razão de 1:40 peptídeo:fosfolípídeos)). Linha preta referente ao peptídeo Chim2 e linha vermelha referente ao peptídeo Chim2c (WKYM-NH₂).

Os resultados sugerem que o peptídeo WKYM-NH₂ é liberado a uma concentração de aproximadamente 10 μM nos primeiros 30 minutos, cerca de 2,5 vezes menor do que na razão 1:10 peptídeo:fosfolípídeo e essa concentração se mantém, praticamente, constante até os 480 minutos finais (linha vermelha), com o peptídeo Chim2 sendo consumido de sua concentração inicial (25 μM) no tempo 0 minuto, até cerca de 5 μM no minuto final (linha preta), mostrando que mesmo após um longo período de digestão (8 horas), apesar da diminuição na quantidade, ainda há Chim2 em solução.

O espectro de massa dessa condição no tempo de 60 minutos (Figura 36) apresenta alguns íons que não são detectados no espectro da Condição 3 com a razão menor entre peptídeo e vesículas, para o mesmo tempo.

Contrariamente, alguns fragmentos peptídicos internos de Chim2 que antes eram detectados, agora estão ausentes.

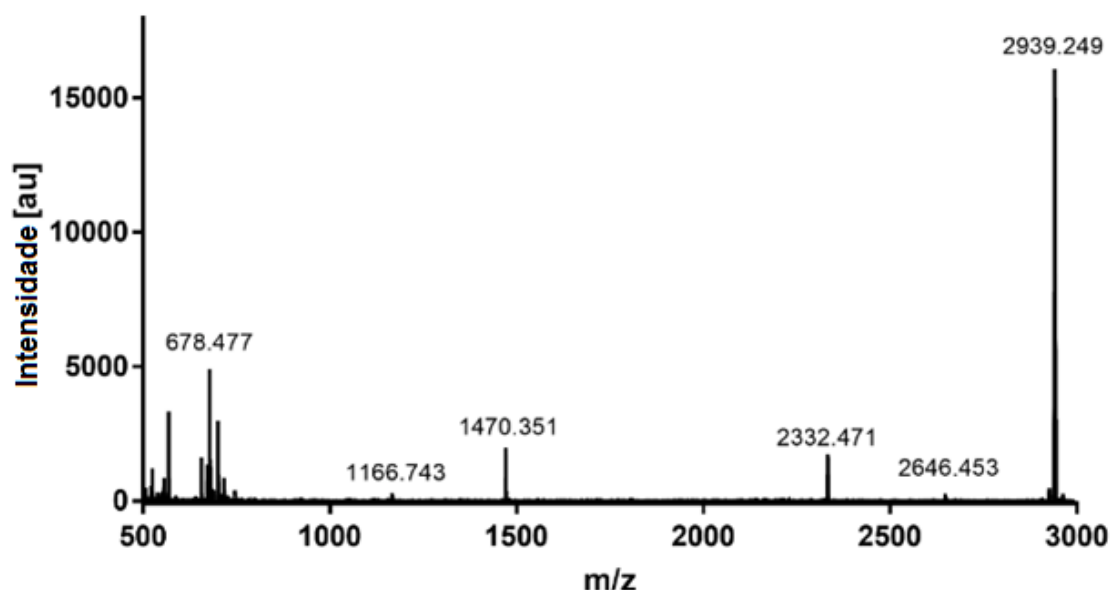


Figura 36. Espectro de massa do ensaio de digestão do peptídeo Chim2 para a Condição 4 (25 μ M de Chim2 em 1 mM de 2:1 DMPC:DMPG (razão de 1:40 peptídeo:fosfolípidos)) no tempo de 60 minutos.

O íon de $[M+H]^+ = 2332,471$ Da, que não aparecia na Condição 3, equivale a KWAVKIIRKFIKGFISGGKR (Figura 37), obtido pela clivagem do peptídeo Chim2 no sítio desejado Chim2b (Arg20) com concomitante liberação do peptídeo Chim2c. Sua dupla carga pode ser observada pelo íon $[M+2H]^{2+} = 1166,743$ Da. É importante salientar que os íons de m/z 821 e m/z 1209, aproximadamente, que são característicos da hidrólise de Chim2 na porção Chim2a, não foram encontrados nessa condição, provavelmente pela maior interação e consequente proteção da vesícula com o peptídeo, impedindo a ação da enzima na região α -helicoidal adsorvida. O segundo íon diferencial, de $[M+H]^+ = 2646,453$ Da, se refere a KWAVKIIRKFIKGFISGGKRWK (Figura 38), obtido pela clivagem do peptídeo Chim2 na Lys22, mostrando que a clivagem ocorre também, como já descrito anteriormente, no sítio de clivagem da enzima tripsina do peptídeo Chim2c, mesmo quando Chim2 está ancorado à membrana.

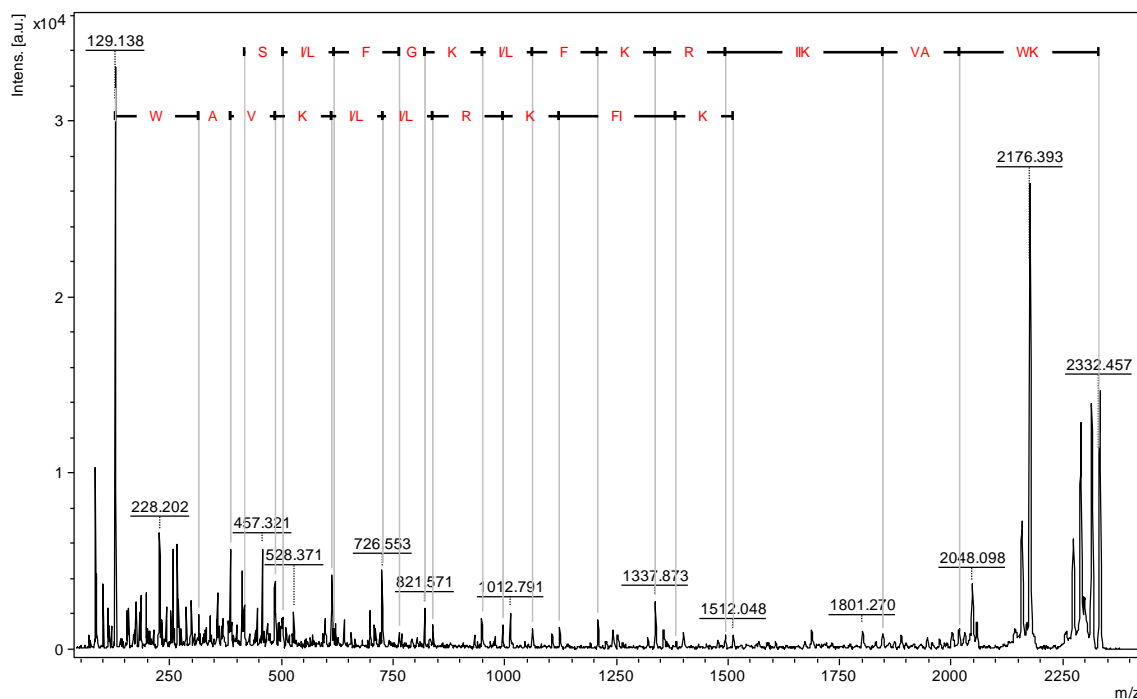


Figura 37. Espectro de massa da fragmentação do peptídeo KWAVKIIRKFIKGFISGGKR $[M+H]^+ = 2332,471$ Da. A sequência de aminoácidos da parte superior se refere aos íons da série *b*, enquanto a da parte inferior, se refere aos íons da série *y*.

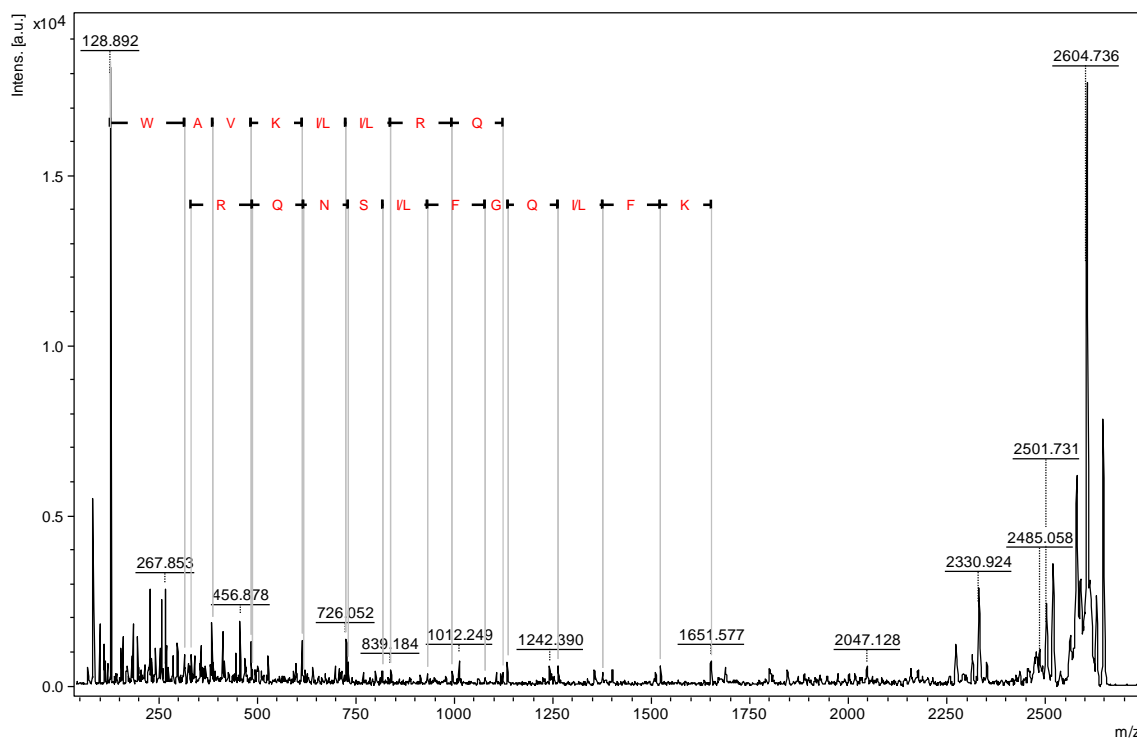


Figura 38. Espectro de massa da fragmentação do peptídeo KWAVKIIRKFIKGFISGGKRWK $[M+H]^+ = 2646,453$ Da. A sequência de aminoácidos

da parte superior se refere aos íons da série *b*, enquanto a da parte inferior, se refere aos íons da série *y*.

Esses resultados indicam que, nessa Condição 4 (razão 40:1 fosfolípido:peptídeo), Chim2 é hidrolisado quase que exclusivamente na região Chim2b desordenada com a coincidente liberação de Chim2c, o agonista de FPR2, no meio reacional. Portanto, o aumento na razão peptídeo:fosfolípido direcionou preferencialmente a hidrólise para o sítio de clivagem desejado, evitando o aparecimento de fragmentos indesejados e favorecendo a liberação do peptídeo imunomodulador. A dependência da cinética da hidrólise de Chim2 nas proporções molares de peptídeo:fosfolípido é ilustrada na Figura 39.

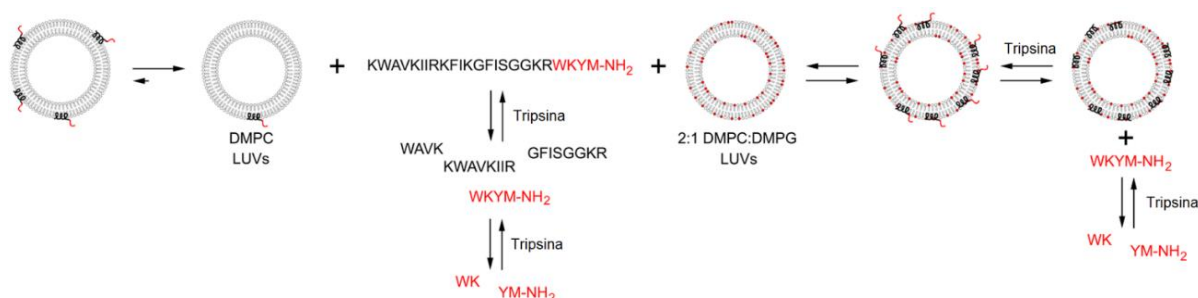


Figura 39. Ilustração do comportamento de hidrólise de Chim2, por tripsina, na presença de vesículas. Quando não ligado a vesículas, Chim2 é hidrolisado pela tripsina em vários sítios ao longo de sua estrutura primária, incluindo a região membrano-ativa Chim2a. Um dos produtos é o peptídeo Chim2c (WKYM-NH₂), que pode ser posteriormente hidrolisado pela própria tripsina para produzir os dipeptídeos WK e YM-NH₂. Após a adição de LUVs de DMPC, a cinética de hidrólise é semelhante ao peptídeo livre, pois o peptídeo não adsorve significativamente em vesículas de carga neutra. Já com a adição de LUVs de 2:1 DMPC:DMPG, Chim2 é adsorvido e, idealmente, apenas a parte C-terminal não estruturada (-GGKRWKYM-NH₂) fica acessível à enzima, sofrendo hidrólise no sítio desejado (Chim2b), com quase exclusiva liberação de WKYM-NH₂. Os dados indicam que quanto maior a razão peptídeo:fosfolípido, mais deslocado é o equilíbrio para a conformação na qual Chim2 se adsorve à membrana e, portanto, mais seletiva é a hidrólise em direção à parte C-terminal da molécula.

A abordagem apresentada e validada pelos experimentos discutidos acima é inédita na literatura. Alguns trabalhos apresentam hidrólise de AMPs, porém, sem correlacioná-la com o ambiente de membrana. Starr e colaboradores⁹⁰ mostram que alguns peptídeos são degradados em eritrócitos humanos sendo que essa atividade proteolítica ocorre somente no citosol da célula e não na região de membrana, apesar da interação dos peptídeos com a mesma.

5.5– Atividade antimicrobiana do peptídeo Chim2

O peptídeo Chim2 foi testado como agente antimicrobiano direto, dado que o módulo Chim2a tem por base o peptídeo Hs02, que comprovadamente, apresenta atividade antimicrobiana.⁸ Olhando a Tabela 4 é possível observar que Chim2 apresentou concentrações inibitórias mínimas (CIMs) inferiores a 5 µM contra todas as cepas bacterianas testadas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), demonstrando potente e ampla atividade antimicrobiana em concentrações relativamente baixas. Esses valores vão ao encontro com os de outros peptídeos antimicrobianos testados para variadas cepas.^{91, 92, 93, 94} Como exemplo, um peptídeo projetado e sintetizado por Thankappan *et al.*⁹⁴ (NH₂–GKLRLIKLLWVKKWKKKGWKA–CONH₂) apresentou uma atividade dual anticâncer e antimicrobiana, onde para essa última, foram obtidos CIMs inferiores a 5 µM (entre 2 e 4 µM) frente a bactérias do tipo *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e outras.

Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) de Chim2 e Hs02 para bactérias patogênicas humanas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*)

		Microrganismos		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Peptídeos				
Chim2	CIM (µM)	4 ± 0	3.33 ± 0.94	3.33 ± 0.94
	CBM (µM)	8.00 ± 5.66	8 ± 0	6.67 ± 1.89

Hs02	CIM (μM)	2 ± 0	2 ± 0	1.67 ± 0.57
	CBM (μM)	2 ± 0	4 ± 0	ND

ND = Não determinado

Porém, os valores obtidos para Chim2 foram maiores do que os apresentados pelo peptídeo Hs02, com CIMs na faixa de 2 μM , mostrando que Hs02 é mais potente do que Chim2. Ainda assim, Chim2 continua tendo uma potente ação antimicrobiana, retendo a maior parte dessa atividade, apesar da introdução dos domínios Chim2b e Chim2c.

5.6– Estímulo dos macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (BMDM) pelo peptídeo WKYM-NH₂ (Chim2c)

Para verificar o potencial do peptídeo Chim2c na ativação do receptor FPR2, o peptídeo foi testado como um ativador de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) de camundongos. Os BMDMs foram incubados com o peptídeo WKYM-NH₂ na concentração de 10 μM e os marcadores de ativação celular, corpúsculos lipídicos, foram quantificados por citometria de fluxo e comparados com células não estimuladas com o peptídeo. Como controle, as células foram incubadas com LPS e os corpúsculos lipídicos também foram quantificados. Os corpúsculos lipídicos são organelas celulares inerentes a resposta imunológica e inflamatória, utilizadas como marcadores de ativação celular.⁹⁵ O estabelecimento do estado inflamatório local pode ser avaliado através da modulação da biogênese destas organelas.⁹⁵ Ambos os tratamentos, com WKYM-NH₂ e LPS, desencadearam a ativação celular induzindo a geração de corpúsculos lipídicos em BMDMs (Figura 40).

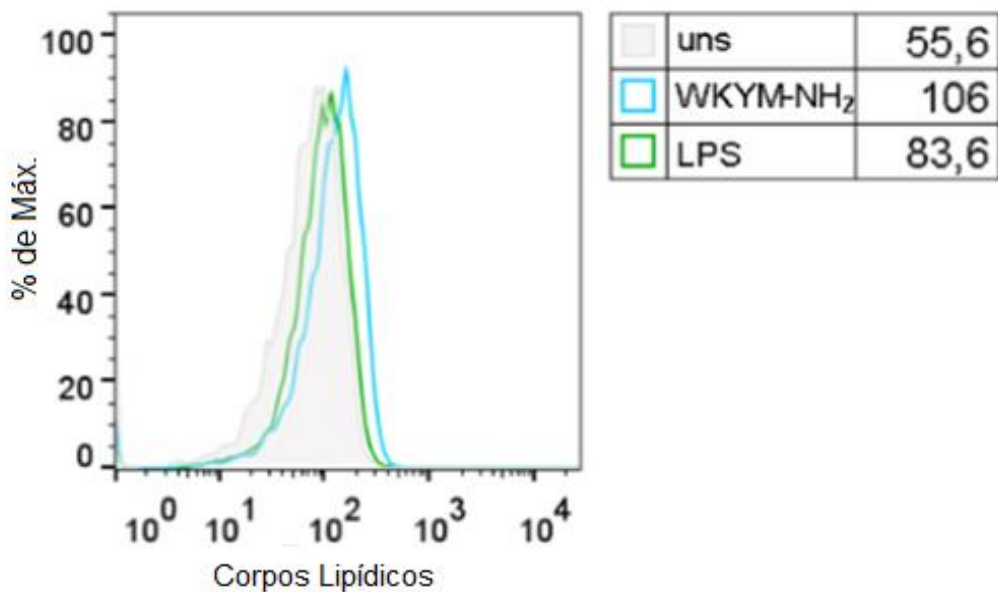


Figura 40. Indução de corpúsculos lipídicos pelo peptídeo WKYM-NH₂ (Chim2c) e LPS em BMDMs de camundongos. Os corpúsculos lipídicos foram quantificados em BMDMs não estimulados (*uns*, linha cinza), em células tratadas com LPS (linha verde) e com o peptídeo WKYM-NH₂ (linha azul).

É possível observar que o peptídeo Chim2c (linha azul) aumentou a biogênese de corpúsculos lipídicos em BMDM, aumentando a média de intensidade de fluorescência para 106 quando comparado a células estimuladas por LPS (linha verde) com um valor de 83,6 e sendo quase o dobro, em relação as células não estimuladas (linha branca) com um valor de 55,6. Isso mostra que WKYM-NH₂ funciona como um indutor do acúmulo de corpúsculos lipídicos e, portanto, possui uma preeminente característica pró-inflamatória (estudos demonstram que o aumento do número de corpúsculos lipídicos em macrófagos está naturalmente relacionado a processos inflamatórios)⁹⁶. Não conseguimos encontrar outros artigos que relatem variação em corpúsculos lipídicos induzidos por ligantes de FPR2.

Buscando avaliar melhor a atividade pró-inflamatória dos peptídeos, BMDMs foram estimulados com WKYM-NH₂ e Hs02, base do módulo Chim2a, ambos na concentração de 10 µM, para a quantificação de interleucinas-12 e -6 (IL-12 e IL-6) que são tipos de citocinas, proteínas que regulam a resposta imunológica do organismo frente a um processo inflamatório (Figuras 41). A IL-

12 atua como indutora de respostas imunes celulares por meio do aumento da atividade citolítica do interferon-gama (INF- γ) pelas células NK (*natural killer*) e T (linfócitos), levando a respostas citotóxicas que ajudam no combate a vírus e neoplasias, por exemplo.⁹⁷ Já a IL-6, atua na resposta inata e adaptativa do organismo, envolvida em diversas atividades imunológicas como a síntese de substâncias de fase aguda no fígado, sinalização diante danos teciduais e no processo de ruptura da placa de aterosclerose.⁹⁸ Novamente, o LPS foi usado como controle positivo.

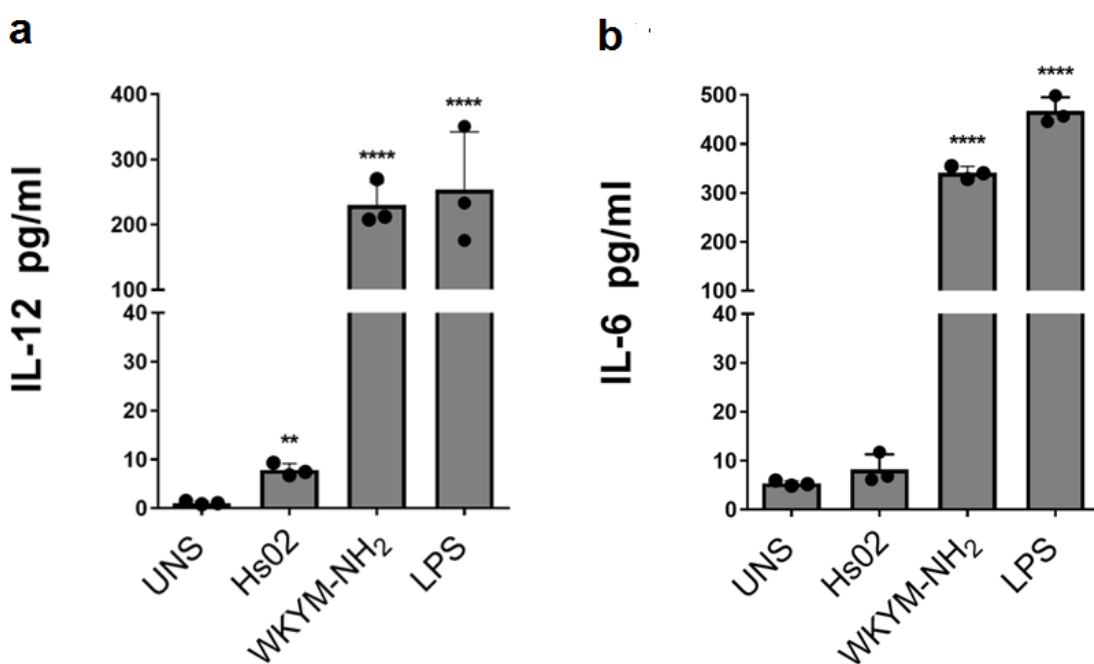


Figura 41. Liberação de interleucinas em BMDMs de camundongos pelos peptídeos WKYM-NH₂ (Chim2c) e Hs02 e LPS a. Quantificação de IL-12 e **b.** IL-6 por ELISA em células não estimuladas (*uns*) e em BMDMs estimulados com LPS (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 10 μM de Hs02 e 10 μM de WKYM-NH₂.

Como pode ser observado, a incubação de BMDMs com Hs02 provocou a liberação de uma pequena quantidade tanto de IL-12 (**a**), quanto de IL-6 (**b**), ambos na faixa aproximada de 10 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em contraste, as células incubadas com WKYM-NH₂ liberaram IL-12 e IL-6 em grandes quantidades (entre 200 e 300 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$), cerca de 20 a 30 vezes mais do que o Hs02 e em níveis semelhantes as incubadas com LPS (entre 200 e 400 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$), lipopolissacarídeo reconhecido por induzir a secreção de citocinas pró-

inflamatórias quando estimulados por patógenos microbianos.⁹⁶ Isso indica que o peptídeo Chim2c é realmente capaz de estimular a resposta pró-inflamatória em BMDMs de camundongos nas condições testadas e pode funcionar como um agente estimulante do sistema imune em situações de infecção.

5.7– Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) em neutrófilos humanos

Neutrófilos humanos foram purificados a partir de sangue total de doadores saudáveis e incubados com o peptídeo Chim2 e alguns de seus fragmentos trípticos, mais especificamente, Chim2c (WKYM-NH₂), e os produtos alternativos da hidrólise de Chim2, GFISGGKRWKYM-NH₂ (Anexo C – Figuras C1, C2 e C3) e GGKRWKYM-NH₂ (Anexo C – Figuras C4, C5 e C6), que foram sintetizados e caracterizados. Primeiramente, a viabilidade celular dos neutrófilos foi avaliada usando-se o ensaio de redução de MTT, no qual os neutrófilos foram incubados com os peptídeos nas concentrações de 1, 3,33 e 10 µM durante 2 horas (Figura 42). Além disso, a viabilidade celular também foi medida para neutrófilos não incubados com peptídeos (não tratado) e para uma amostra do peptídeo Chim2 a 10 µM na presença de tripsina a 1 µg.mL⁻¹.

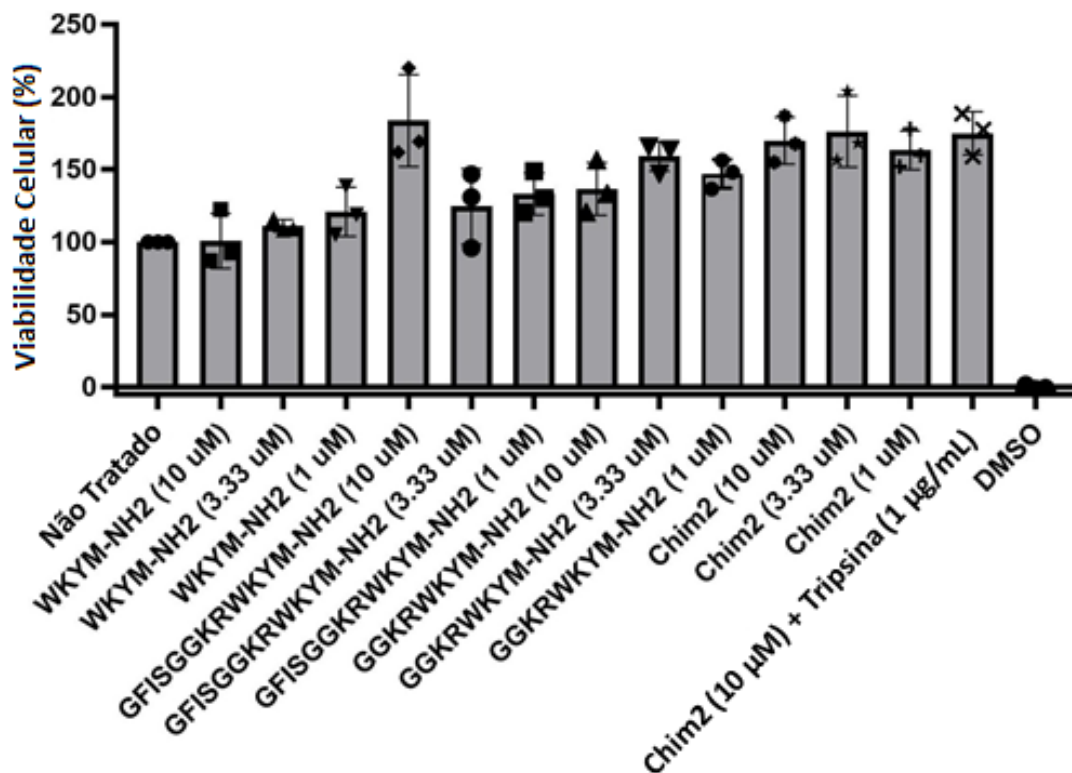


Figura 42. Viabilidade celular de neutrófilos humanos incubados com peptídeos avaliada por meio do ensaio de redução de MTT. Neutrófilos saudáveis foram isolados do sangue periférico de voluntários e depois incubados com os peptídeos Chim2, Chim2c, GGKRWKYM-NH₂ e GFISGGKRWKYM-NH₂ nas concentrações de 10, 3,33 e 1 µM e com uma mistura de Chim2 (10 µM) + Tripsina 1 µg.mL⁻¹. A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de redução de MTT, onde 30% de DMSO foi usado como controle positivo. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes e apresentados como média ± erro padrão.

As leituras de absorbância obtidas para os neutrófilos não tratados com peptídeo foram normalizadas para 100% e todos os outros valores foram comparados a estas. Com isso, é possível observar na figura que nenhum dos peptídeos ou condições testadas reduziu significativamente a viabilidade de neutrófilos. Pelo contrário, vários peptídeos resultaram em leituras que indicam viabilidade superior à do controle. Isso se dá, provavelmente, porque a ativação do FPR por essas espécies pode ter interferido na produção de ROS intracelulares e conseqüentemente na redução do MTT, levando à produção do formazan.⁹⁹ Não foram encontradas, na literatura, evidências de que a ativação de FPR2 leva a uma superestimação da viabilidade celular pelo ensaio de

MTT. Porém, alguns fatores como perturbações energéticas e metabólicas, alterações na atividade de oxidoreduções e tráfego intracelular podem interferir no ensaio de MTT.⁹⁹ A superestimação da viabilidade celular por esse ensaio pode acontecer devido à reprogramação metabólica adaptativa e mitocondrial de células sujeitas a estresse causado por tratamento medicamentoso e efeitos inibidores externos ao alvo.⁹⁹ Este comportamento pode ser semelhantemente observado em alguns fármacos como o Imatinibe, polipeptídeos e algumas moléculas antioxidantes, como o resveratrol, em determinadas condições experimentais.^{99, 100}

Para melhor compreender os dados de toxicidade celular dos peptídeos para neutrófilos humanos, foram executados ensaios de coloração vivo/morto (Figura 43). Esse ensaio foi feito para os mesmos peptídeos anteriores (Chim2, Chim2c, GGKRWKYM-NH₂ e GFISGGKRWKYM-NH₂), todos na concentração de 10 µM, e também, para duas misturas do peptídeo Chim2 na presença de tripsina a 1 µg.mL⁻¹, uma a 25 e outra a 40 µM, com tempo de incubação de 30 minutos. Em todos os ensaios foram utilizados neutrófilos incubados com LPS e um controle com células na ausência de peptídeos como referência. Observou-se que, exceto para o peptídeo Chim2, que reduziu a viabilidade celular para 64 ± 6%, todas as outras condições mantiveram valores iguais ao de referência, não apresentando redução da viabilidade celular.

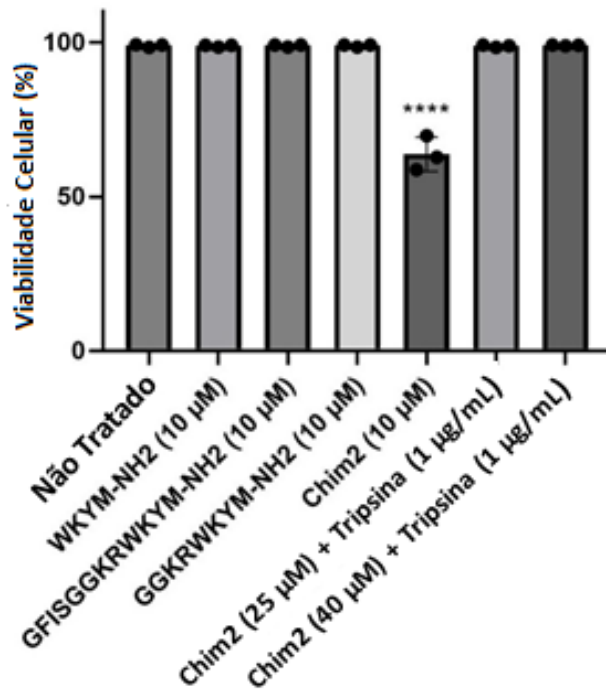


Figura 43. Coloração vivo/morto de neutrófilos humanos preparados com LPS após 30 minutos de incubação com peptídeos. Neutrófilos saudáveis foram isolados do sangue periférico de voluntários e depois incubados com diferentes peptídeos. A viabilidade celular foi medida usando citometria de fluxo após a adição de corante vivo/morto de cor violeta *zombie*. Os dados foram obtidos de três experimentos independentes e apresentados como média \pm erro padrão. **** = $P \leq 0,0001$.

Foram verificados os potenciais efeitos citotóxicos de Chim2 para outros tipos de células. A citotoxicidade do peptídeo foi testada em cultura de fibroblastos e eritrócitos humanos (Figura 44). Chim2 foi citotóxico para ambos os tipos celulares em concentrações similares às determinadas para neutrófilos humanos.

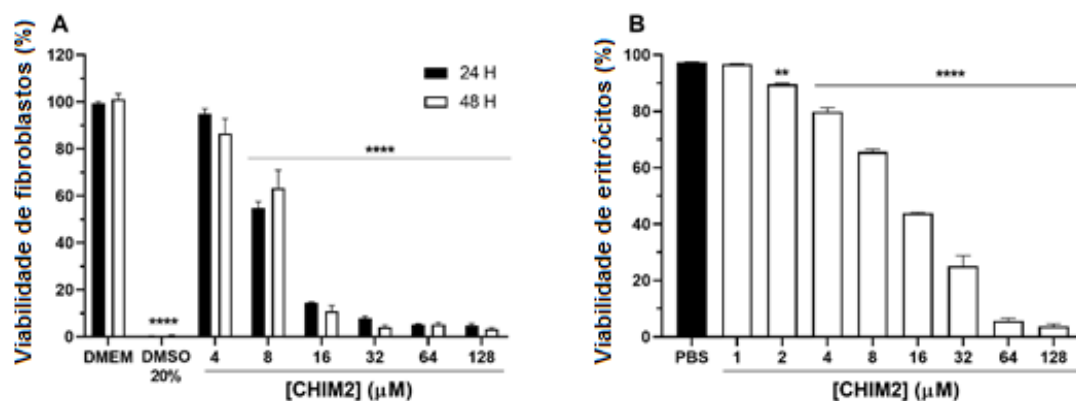


Figura 44. A. Viabilidade de fibroblastos humanos (Detroit 551) após 24 e 48 horas de exposição a várias concentrações do peptídeo Chim2. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão. **** $p < 0,0001$ versus grupo de controle DMEM. $IC_{50} = 8,08 \pm 0,08 \mu M$ por 24h e $8,24 \pm 0,11 \mu M$ por 48h. **B. Efeito de Chim2 na hemólise eritrócitos humanos após 1h de incubação com diferentes concentrações do peptídeo.** ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ versus grupo de controle PBS. $IC_{50} = 14,41 \pm 1,01 \mu M$.

É possível observar que o peptídeo Chim2 começa a apresentar citotoxicidade considerável para fibroblastos e eritrócitos a partir da concentração de 8 μM , reduzindo a viabilidade celular de ambos os tipos celulares para a faixa de 60%. Na concentração de 16 μM Chim2 é significativamente mais tóxico, reduzindo a viabilidade celular dos fibroblastos para abaixo de 20% e a de eritrócitos, para abaixo de 50%. Estes dados indicam que o peptídeo apresenta citotoxicidade considerável entre 8 e 16 μM , enquanto sua atividade antimicrobiana é observada por volta de 3 μM . Estes dados indicam uma janela terapêutica de 2 a 6 vezes, a qual é estreita e deve ser melhorada a partir de mutações pontuais em novos peptídeos da série Chim. Esta citotoxicidade de Chim2 em concentrações relativamente baixas é compatível com as obtidas para o peptídeo Hs02, indicando que a otimização da porção Chim2a é chave para a citotoxicidade dessas moléculas.⁸ Outro fato relevante é que por mais que Chim2 não tenha se estruturado de maneira significativa na presença de vesículas de DMPC, de carga neutra como as células eucarióticas, isso não foi preditivo em relação à citotoxicidade da molécula, ou seja, a não estruturação em DMPC não significou propriamente

ausência de citotoxicidade. Esse comportamento deverá ser tomado em consideração no aperfeiçoamento da molécula nas próximas gerações dos peptídeos Chim.

Após ensaios de determinação de citotoxicidade da amostra de Chim2 para os modelos celulares testados, procedemos para a quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em neutrófilos estimulados com os peptídeos aqui avaliados. A quantificação de ROS foi realizada imediatamente após a adição dos peptídeos aos neutrófilos em um intervalo de 2 horas. Foi observado que em neutrófilos não expostos previamente a um agente pró-inflamatório, Chim2 e Chim2c (WKYM-NH₂), em diferentes concentrações, não alteraram as quantidades de ROS produzidas em relação às células não tratadas com peptídeos, sugerindo que esses peptídeos são incapazes de modular a função de neutrófilos sem eventos prévios de indução, como incubação prévia com LPS ou fator de necrose tumoral (TNF- α) (Figura 45). É possível observar que todas as condições estabelecidas (WKYM-NH₂ 200 μ M - roxo, 100 μ M - verde e 50 μ M - vermelho, Chim2 100 μ M - preto e Chim2 + Tripsina a 1 μ g.mL⁻¹ - grená) mantém níveis de ROS praticamente iguais aos das células não tratadas com peptídeos (azul), em torno de 400, demonstrando que os peptídeos e condições testadas não causam efeito neste tipo de células quando não induzidas com agentes pró-inflamatórios, sendo então, provavelmente, inativos para elas fora de um contexto inflamatório.

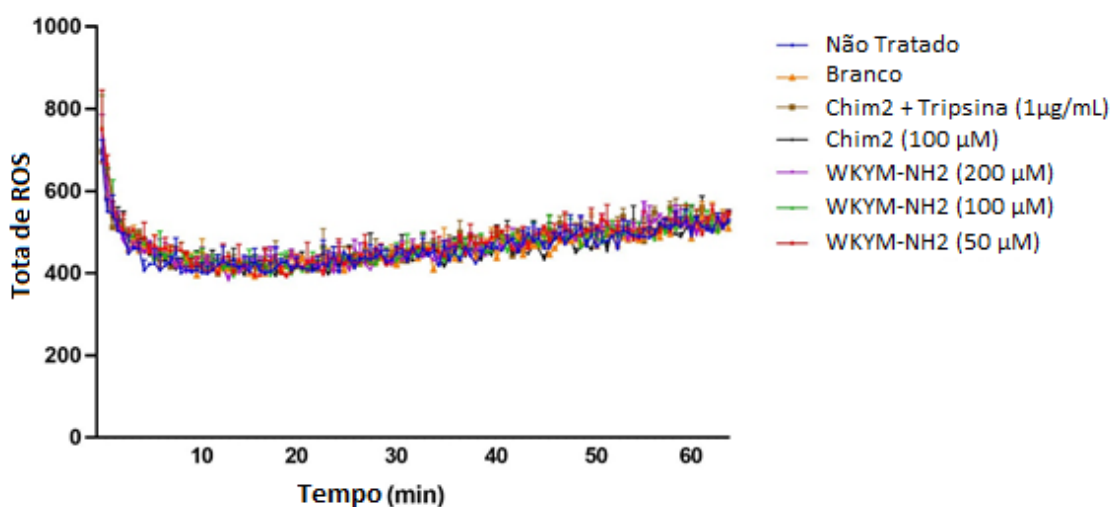


Figura 45. Produção total de ROS em neutrófilos humanos não induzidos com agentes pró-inflamatórios. Neutrófilos saudáveis foram isolados do sangue periférico de voluntários e depois incubados com os peptídeos WKYM-NH₂ nas concentrações de 200 µM (roxo), 100 µM (verde) e 50 µM (vermelho), Chim2 100 µM (preto) e Chim2 + Tripsina a 1 µg.mL⁻¹ (grená) e as concentrações de ROS foram monitoradas por 120 minutos. Além disso, o ROS foi medido para neutrófilos não tratados com peptídeos (azul) e para um branco (alaranjado). A quimioluminescência foi detectada usando um leitor de placas. Os resultados dos primeiros 60 minutos são mostrados em duplicata. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos.

No entanto, quando os neutrófilos foram pré-incubados por 1 hora com LPS, alguns peptídeos induziram aumento na produção de ROS nas concentrações testadas (Figura 46). Chim2 (preto) e seu fragmento GFISGGKRWKYM-NH₂ (roxo) induziram uma rápida produção de ROS em neutrófilos previamente incubados com LPS. Essa resposta rápida é consistente com a produção de ROS induzida por agonistas de FPR2 descritos na literatura.^{55, 101} No entanto, dado que Chim2 induziu a morte de neutrófilos nesta concentração, de acordo com ensaios de coloração vivos/mortos (Figura 43), sugere-se que um mecanismo misto de produção de ROS, englobando ativação de FPR2 e morte celular, seja provável.

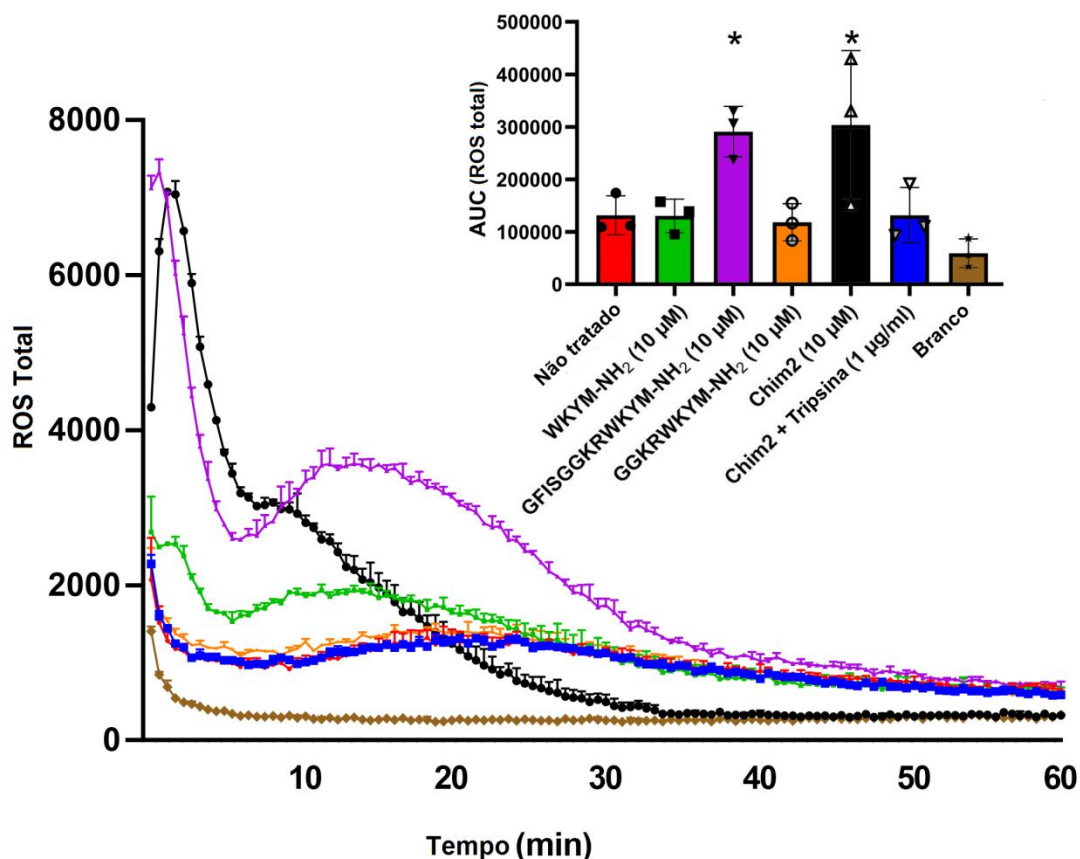


Figura 46. Produção total de ROS em neutrófilos humanos induzidos com LPS. Os neutrófilos humanos foram induzidos com LPS durante 1 hora e submetidos aos peptídeos WKYM-NH₂ (verde), GFISGGKRWKYM-NH₂ (roxo), GGKRWKYM-NH₂ (alaranjado) e Chim2 (preto) todos na concentração de 10 µM e à condição Chim2 + Tripsina a 1 µg.mL⁻¹ (azul) e ROS total foram quantificados em relação às células em branco (marrom) e não tratadas, células induzidas com LPS sem incubação de peptídeo (vermelho) durante 2 horas. As áreas de ROS para três experimentos independentes foram integradas durante o período de incubação e são mostradas como uma inserção (média ± erro padrão). * p <0,05 versus grupo não tratado.

Os peptídeos WKYM-NH₂ (verde) e GGKRWKYM-NH₂ (alaranjado), na concentração de 10 µM, induziram um leve aumento nos níveis de ROS nos primeiros 10 minutos após a incubação, indicando que essas moléculas são apenas indutores leves da produção de ROS em neutrófilos humanos, semelhantes aos peptídeos derivados da anexina I, como o Ac9-25¹⁰². Isso demonstra que o peptídeo WKYM-NH₂, embora capaz de aumentar os níveis de Ca²⁺ intracelular através da ativação de FPR2 em células transfectadas,⁵⁷ é

um fraco ativador do complexo NADPH oxidase em neutrófilos humanos. Este fato não é novo, dado que o aumento intracelular da concentração de Ca^{2+} , a indução da formação de ROS e a quimiotaxia de neutrófilos são alguns dos eventos que podem ser produzidos após a ativação do FPR2, e aparentemente não estão relacionados entre si¹⁰². Como exemplo, Bae e colaboradores mostram que os peptídeos HRYLPM-NH₂ e HEYLPM-NH₂ induzem quimiotaxia em neutrófilos humanos por meio da ativação de FPR2, mas apenas o primeiro induz um aumento nas concentrações de Ca^{2+} e a geração de superóxido no mesmo tipo de célula, sendo que a diferença entre eles é de uma única substituição de aminoácidos¹⁰³. Além disso, outra possibilidade é que WKYM-NH₂ seja mais eficiente na ativação de receptores Fpr de camundongos do que de FPR humano¹⁰⁴, uma vez que induziu a formação de corpúsculos lipídicos nos BMDMs de camundongos.

Por fim, enquanto a adição de tripsina ao Chim2 reverteu os efeitos na produção de ROS observados para este peptídeo, nenhum efeito particular na geração de ROS foi observado. Nesse cenário, o Chim2 hidrolisado deixou de ser citotóxico para neutrófilos, mas também não induziu uma produção significativa de ROS, em consonância com a baixa capacidade exibida pelo WKYM-NH₂ em induzir tal fenômeno. Alguns ensaios preliminares utilizando neutrófilos humanos induzidos com TNF- α foram realizados (Anexo F – Figura F1). É possível observar um panorama semelhante aos das células iniciadas com LPS e identificar que os peptídeos Chim2 e GFISGGKRWKYM-NH₂ foram, nessas condições, os mais potentes produtores de ROS.

Por último, é interessante observar que em BMDMs houve a indução de formação de corpúsculos lipídicos mesmo sem o estímulo com agentes inflamatórios como LPS ou TNF- α , diferentemente do que foi observado para a quantificação de ROS em neutrófilos. Isso pode refletir a biologia diferencial dos modelos utilizados, porém, são necessários mais ensaios para uma melhor compreensão deste fenômeno.

6. Conclusões

O processo de síntese, purificação e identificação do peptídeo Chim2 foi realizado com sucesso, obtendo-se o peptídeo desejado puro e pronto para a utilização nos demais experimentos.

A análise da estruturação do peptídeo Chim2 na presença de vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DMPC (carga neutra) e uma mistura 2:1 de DMPC:DMPG (carga negativa) por dicroísmo circular (CD) mostrou que o peptídeo teve uma estruturação em cerca de 55% na presença das membranas negativas, enquanto a estruturação após titulação com vesículas neutras foi na faixa de 13%. Sendo assim, conclui-se que essa estruturação de Chim2 possui dependência da interação eletrostática entre o peptídeo catiônico e a carga negativa das vesículas, o que confere maior seletividade. Além disso, quando comparado ao peptídeo Hs02, Chim2 apresentou uma maior seletividade em relação a membranas negativas, possivelmente pelo alongamento da cadeia na região C-terminal. Isso demonstra que esse peptídeo apresenta uma propensão maior de associar-se a células de caráter negativo, como células procarióticas e pode ser explorado no direcionamento específico para regiões infeccionadas.

A estrutura tridimensional do peptídeo Chim2 foi obtida por ressonância magnética nuclear (RMN). As informações obtidas pelos experimentos bidimensionais de ^1H - ^1H TOCSY e ^1H - ^1H NOESY permitiram identificar que o peptídeo Chim2 apresenta uma estrutura anfifílica em hélice- α compreendida entre os resíduos Ala3-Phe14 e uma “cauda” sem estrutura definida do Ile15 em diante. A estrutura de Chim2 está de acordo com o que fora planejado: o peptídeo ser formado por uma região estruturada, que interage seletivamente com membranas negativas, acompanhada de uma região desestruturada que fica conformacionalmente livre para sofrer proteólise e liberar o peptídeo imunomodulador.

Para os ensaios de digestão do peptídeo Chim2, a análise qualitativa por espectrometria de massa (MS) confirmou a seletividade dele pelas vesículas de carga negativa. Na presença dessas, na razão 1:10 peptídeo:fosfolipídeo, o peptídeo era lentamente clivado, apresentando ainda, para o tempo de 240

minutos, por exemplo, a presença do íon precursor, enquanto após 30 minutos de incubação, na presença de vesículas neutras, o peptídeo já havia sido totalmente hidrolisado. Com o aumento da razão peptídeo:fosfolípídeo para 1:40, foi observado um maior direcionamento da hidrólise para a região desejada em Chim2b, fazendo com que a hidrólise da cadeia acontecesse quase que exclusivamente neste sítio, diminuindo a geração de fragmentos indesejados e favorecendo a liberação concomitante de Chim2c (WKYM-NH₂). A quantidade do peptídeo imunomodulador Chim2c liberado foi estabelecida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e as concentrações do peptídeo foram obtidas por uma curva de calibração de padrão. Para a razão 1:10 peptídeo:vesícula, foram conseguidos valores na faixa entre 10 e 15 µM na presença de vesículas 2:1 de DMPC:DMPG, mostrando eficiência na liberação do peptídeo. Quando a razão foi aumentada (1:40 peptídeo:fosfolípídeo), a cinética de liberação foi melhorada com o peptídeo sendo liberado paulatinamente na faixa de concentração de 10 µM durante tempos longos, inclusive o de 480 min.

O peptídeo imunomodulador Chim2c (WKYM-NH₂) a 10 µM foi capaz de estimular a resposta pró-inflamatória em BMDMs de camundongos através da liberação de interleucinas dos tipos 6 e 12. Além disso, induziu uma leve produção de ROS em neutrófilos humanos previamente estimulados. Isso mostra que esse peptídeo pode ser usado como agonista de FPR2 para ativação do sistema imune.

O peptídeo Chim2 apresentou atividade antimicrobiana direta com amplo espectro de ação e em concentrações inibitórias mínimas satisfatórias. Ele também induziu rapidamente e em quantidades relevantes a produção de ROS em neutrófilos estimulados com LPS, indicando que Chim2 pode também funcionar como um agente direto no combate à infecções, além de seu papel quimérico.

Esses resultados indicam que o peptídeo Chim2 possivelmente pode ser utilizado no combate a infecções, interagindo preferencialmente com células bacterianas e funcionando como um agente antimicrobiano direto e também, como um carreador, liberando por uma proteólise de seu sítio de clivagem, o peptídeo imunomodulatório que ativa o sistema imune para auto combate à

doença. A estratégia aqui proposta é bastante complexa e para tal, algumas melhorias podem ser sugeridas. O módulo Chim2a, a parte que interage com a membrana, pode ser mais seletiva em relação a células procarióticas e menos citotóxico, quem sabe variando seu tamanho, introduzindo mudanças pontuais em sua estrutura e até utilizando outro peptídeo-base ao invés do Hs02. Algumas modificações já vêm sendo investigadas por nosso grupo de pesquisa. Chim2b pode ter seu tamanho alterado ou ter mudanças na sequência de aminoácidos da região espaçadora ou do sítio de clivagem. Outras sequências peptídicas, suscetíveis a outras enzimas, além da tripsina, podem ser exploradas sob a mesma estratégia, podendo ser adquirida maior especificidade para o sítio infeccionado. Já a parte Chim2c pode ser alterada alternativamente por módulos semelhantes como WKYMVM e WKYVM, que também atuam como agonistas de FPR2 e podem apresentar uma maior ação pró- ou mesmo anti-inflamatória, a depender de futuros resultados obtidos *in vivo*.

Além das possíveis alterações na estrutura de Chim2 na busca por melhorias em sua atuação, este trabalho traz como perspectivas aplicações, *in vivo*, do peptídeo. Dessa forma, será necessária a otimização de sua estabilidade no plasma sanguíneo para que uma fração deste resista à proteólise total no sangue antes de seu acúmulo em regiões ricas em bactérias. Para isso, podem ser estabelecidas possíveis modificações em sua estrutura, preservando suas características originais essenciais: a estrutura α -helicoidal anfifílica em Chim2a e a capacidade de se ligar e ativar FPR2 de Chim2c. Idealmente, após acumular nas membranas procarióticas, o peptídeo Chim2 deve comprometer a integridade da membrana bacteriana e/ou diminuir a contagem deste tipo de células enquanto ativa os neutrófilos no microambiente da infecção. Após a degradação do peptídeo nesse cenário, a porção Chim2c deve ser produzida pela hidrólise das enzimas *tryptase-like* e se difundir para longe da fonte, ativando leucócitos ao estimular o FPR2. A obtenção de moléculas prova de conceito capazes de seguir esse complexo roteiro é um objetivo que poderá ser alcançado a partir da otimização das futuras gerações de peptídeos da série Chim.

7. Referências Bibliográficas

1. Brand, G. D.; Magalhães, M. T. Q.; Tinoco, M. L. P.; Aragão, F. J. L.; Nicoli, J.; Kelly, S. M.; Cooper, A.; Bloch Jr., C.; Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. *PLoS One* **2012**, *7*, 9. DOI: 10.1371/journal.pone.0045848
2. Ramada, M. H. S.; Brand, G. D.; Abrão, F. Y.; Oliveira, M.; Cardozo Filho, J. L.; Galbieri, R.; Gramacho, K. P.; Prates, M. V.; Bloch Jr., C.; Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13263. DOI: 10.1038/s41598-017-13685-6
3. Brand, G. D.; Ramada, M. H. S.; Genaro-Mattos, T. C.; Bloch Jr., C.; Towards an Experimental Classification System for Membrane Active Peptides. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1194. DOI: 10.1038/s41598-018-19566-w
4. Brand, G. D. Estratégias Para Prospecção e Predição de Peptídeos Bioativos, Universidade de Brasília, **2007**.
5. Hoskin, D. H.; Ramanoorthy, A.; Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, *1778*, 357. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.008>
6. Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C.; Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 1. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
7. Ribeiro-Carmona, A. M.; Carrasco, L. D. M.; Novel Formulations for Antimicrobial Peptides. *Int J Mol Sci* **2014**, *15*, 18040. DOI: 10.3390/ijms151018040
8. Brand, G. D.; Ramada, M. H. S.; Manickchand, J. R.; Correa, R.; Ribeiro, D. J. S.; Santos, M. A.; Vasconcelos, A. G.; Abrão, F. Y.; Prates, M. V.; Murad, A. M.; Cardozo Fh, J. L.; Leite, J. R. S. A.; Magalhães, K. G.; Oliveira, A. L.; Jr, C. B.; Intragenic Antimicrobial Peptides (IAPs) from Human Proteins with Potent Antimicrobial and Anti-inflammatory Activity. *PLoS One* **2019**, *14*, e0220656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220656>
9. Travkova, O. G.; Moehwald, H.; Brezesinski, G.; The Interaction of Antimicrobial Peptides with Membranes. *Adv. Coll. Interf. Sci.* **2017**, *247*,

521. DOI: 10.3390/ijms151018040
10. Chen, H.; Liu, C.; Chen, D.; Madrid, K.; Peng, S.; Dong, X.; Zhang, M.; Gu, Y.; Bacteria-Targeting Conjugates Based on Antimicrobial Peptide for Bacteria Diagnosis and Therapy. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 2505. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00053
 11. Eskander, R. N.; Tewari, K. S.; Immunotherapy: An Evolving Paradigm in the Treatment of Advanced Cervical Cancer. *Clin. Ther.* **2015**, *37*, 20. DOI: 10.1016/j.clinthera.2014.11.010
 12. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*; 3rd ed.; Worth Publishers, **2000**.
 13. Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A.; Amphipathic, α -Helical Antimicrobial Peptides. *Biopolymers* **2000**, *55*, 4. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M)
 14. Chakraborti, S.; Chakraborti, T.; Dhalla, N. S.; Proteases in Wound Healing and Immunity. In *Proteases in human diseases*; Singapore: Springer, **2017**; pp. 147–70. ISBN: 978-981-10-3161-8, 978-981-10-3162-5. DOI:10.1007/978-981-10-3162-5_8
 15. Bufe, B.; Schumann, T.; Kappl, R.; Bogeski, I.; Kummerow, C.; Podgórska, M.; Smola, S.; Hoth, M.; Zufall, F.; Recognition of Bacterial Signal Peptides by Mammalian Formyl Peptide Receptors. *J. Biol. Chem.* **2015**, *209*, 7369. DOI: 10.1074/jbc.M114.626747
 16. Cattaneo, F.; Parisi, M.; Ammendola, R.; Distinct Signaling Cascades Elicited by Different Formyl Peptide Receptor 2 (FPR2) Agonists. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 7193. DOI:10.3390/ijms14047193
 17. Auclair, S. M.; Bhanu, M. K.; Kendall, D. A.; Signal peptidase I: Cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci.* **2012**, *21*, 13. DOI: 10.1002/pro.757
 18. Chan, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; 1st ed.; Oxford University Press: New York, **2000**.
 19. Meisel, H.; Bockelmann, W.; Bioactive Peptides Encrypted in Milk Proteins: Proteolytic Activation and Tropho-functional Properties. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1999**, *76*, 207. PMID: 10532380
 20. Meisel, H.; Multifunctional Peptides Encrypted in Milk Proteins. *BioFactors*

- 2004**, 21, 55. DOI: 10.1002/biof.552210111
21. Autelitano, D. J.; Rajic, A.; Smith, A. I.; Berndt, M. C.; Ilag, L. L.; Vadas, M.; The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities. *Elsevier* **2006**, 11, 306. DOI: 10.1016/j.drudis.2006.02.003
 22. Iavarone, F.; Desiderio, C.; Vitali, A.; Messina, I.; Martelli, C.; Castagnola, M.; Cabras, T.; Cryptides: latent peptides everywhere. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2018**. DOI: 10.1080/10409238.2018.1447543
 23. Pane, K.; Durante, L.; Crescenzi, O.; Cafaro, V.; Pizzo, E.; Varcamonti, M.; Zanfardino, A.; Izzo, V.; Di Donato, A.; Notomista, E.; Antimicrobial Potency of Cationic Antimicrobial Peptides can be Predicted from their Amino Acid Composition: Application to the Detection of “Cryptic” Antimicrobial Peptides. *J. Theor. Biol.* **2017**. DOI: 10.1016/j.jtbi.2017.02.012
 24. Torres, M. D. T.; Melo, M. C. R.; Crescenzi, O.; Notomista, E.; de la Fuente-Nunez, C.; Mining for Encrypted Peptide Antibiotics in the Human Proteome. *Nat. Biomed. Eng.* **2022**, 6, 67. DOI: 10.1038/s41551-022-00967-2
 25. Lemes, A. C.; Sala, L.; Ores, J. C.; Braga, A. R. C.; Egea, M. B.; Fernandes, K. F.; A Review of Latest Advances in Encrypted Bioactive Peptides from Protein Rich-Waste. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 950. DOI: 10.3390/ijms17060950
 26. Garcia, M. C.; Endermann, J.; Gonzalez-Garcia, E.; Marina, M. L.; HPLC-Q-TOF-MS Identification of Antioxidant and Antihypertensive Peptides Recovered from Cherry (*Prunus cerasus* L.) Subproducts. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 1514. DOI: 10.1021/jf505037p
 27. Sheih, I. C.; Fang, T. J.; Wu, T. K.; Lin, P. H.; Anticancer and Antioxidant Activities of the Peptide Fraction from Algae Protein Waste. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 1202. DOI: 10.1021/jf903089m
 28. Kang, T. H.; Ma, B.; Wang, C.; Wu, T. C.; Hung, C.; Targeted Coating With Antigenic Peptide Renders Tumor Cells Susceptible to CD8⁺ T Cell-mediated Killing. *Amer. Soc. Gene Cell Ther.* **2013**, 21, 542. DOI: 10.1038/mt.2012.233

29. Bloch JR, C.; Silva, L. P.; Magalhaes, B. S. Peptides and Polypeptides Identification Comprises Detection of Potential Functions DNA Fragments, for Genetic Engineering in Organisms. BR200506317, **2005**.
30. Utsugi, T.; Schroit, A. J.; Connor, J.; Bucana, C. D.; Fidler, I. J.; Elevated Expression of Phosphatidylserine in the Outer Membrane Leaflet of Human Tumor Cells and Recognition by Activated Human Blood Monocytes. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 3062. PMID: 2032247
31. Dobrzynska, I.; Szachowicz-Petelska, B.; Sulkowski, S.; Figaszewski, Z.; Changes in Electric Charge and Phospholipids Composition in Human Colorectal Cancer Cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2005**, *276*, 113. DOI: 10.1007/s11010-005-3557-3
32. Dathe, M.; Wieprecht, T.; Nikolenko, H.; Handel, L.; Maloy, W. L.; MacDonald, D. L.; Beyermann, M.; Bienert, M.; Hydrophobicity, Hydrophobic Moment and Angle Subtended by Charged Residues Modulate Antibacterial and Aemolytic Activity of Amphipathic Helical Peptides. *FEBS Lett.* **1997**, *403*, 208. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)00055-0
33. Doherty, T.; Waring, A. J.; Hong, M.; Peptide-lipid Interactions of the β -hairpin Antimicrobial Peptide Tachyplesin and its Linear Derivatives from Solid-state NMR. *Biochim Biophys Acta.* **2006**, *1758*, 1285. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.03.016
34. Kang, H.; Kim, C.; Seo, C. H.; Park, Y.; The Therapeutic Applications of Antimicrobial Peptides (AMPs): A Patent Review. *J. Microbiol.* **2017**, *55*, 1. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6452-1>
35. Zhang, S.-K.; Song, J.-W.; Gong, F.; Li, S.-B.; Chang, H.-Y.; Xie, H.-M.; Gao, H.-W.; Tan, Y.-X.; Ji, S.-P.; Design of an α -helical Antimicrobial Peptide with Improved Cellselective and Potent Anti-biofilm Activity. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27394. DOI: 10.1038/srep27394
36. Lim, K. J.; Sung, B. H.; Shin, J. R.; Lee, Y. W.; Kim, D. J.; Yang, K. S.; Kim, S. C.; A Cancer specific Cell-penetrating Peptide, BR2, for the Efficient Delivery of an scFv into Cancer Cells. *PLoS One* **2013**, *8*, e66084. DOI: 10.1371/journal.pone.0066084
37. Jobin, M.; Alves, I. D.; On the Importance of Electrostatic Interactions

- Between Cell Penetrating Peptides with Membranes: A Pathway Toward Tumor Cell Selectivity? *Biochimie* **2014**, *107*, 154. DOI: 10.1016/j.biochi.2014.07.022
38. Brand, G. D.; Leite, J. R. S. A.; Silva, L. P.; Albuquerque, S.; Prates, M. V.; Azevedo, R. B.; Carregaro, V.; Silva, J. S.; Sá, V. C. L.; Brandão, R. A.; Bloch Jr, C.; Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-Trypanosoma cruzi Activity Without Cytotoxicity to Mammalian Cells. *J Biol Chem.* **2002**, *277*, 49332. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209289200>
39. Zasloff, M.; Magainins, a Class of Antimicrobial Peptides from *Xenopus* skin: Isolation, Characterization of Two Active Forms, and Partial cDNA Sequence of a Precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 5449. DOI: 10.1073/pnas.84.15.5449
40. Barbosa, E. A.; Lembo, T.; Martins, G. R.; Silva, L. P.; Prates, M. V.; Andrade, A. C.; Bloch, C. J.; Skin Secretion Peptides: the Molecular Facet of the Deimatic Behavior of the Four-eyed Frog, *Physalaemus nattereri* (Anura, Leptodactylidae). *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* **2015**, *29*, 170. <https://doi.org/10.1002/rcm.7313>
41. Conlon, J. M.; Sonnevend, A.; Davidson, C.; David Smith, D.; Nielsen, P. F.; The Ascaphins: A Family of Antimicrobial Peptides from the Skin Secretions of the most Primitive Extant Frog, *Ascaphus truei*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 170. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.05.141
42. Leite, J. R. S. A.; Silva, L. P.; Rodrigues, M. I. S.; Prates, M. V.; Brand, G. D.; Lacava, B. M.; Azevedo, R. B.; Bocca, A. L.; Albuquerque, S.; Bloch Jr, C.; Phylloseptins: a Novel Class of Anti-bacterial and Anti-protozoan Peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides* **2005**, *26*, 565. DOI: 10.1016/j.peptides.2004.11.002
43. Seto, G. W. J.; Marwaha, S.; Kobewka, D. M.; Lewis, R. N. A. H.; Separovic, F.; McElhaney, R. N.; Interactions of the Australian Tree Frog Antimicrobial Peptides aurein 1.2, citropin 1.1 and maculatin 1.1 with Lipid Model Membranes: Differential Scanning Calorimetric and Fourier transform Infrared Spectroscopic Studies. *Biochim Biophys Acta.* **2007**,

1768, 2787. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.018>

44. Wang, B.; Muir, T. W.; Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 214. DOI: 10.1016/j.chembiol.2016.01.004
45. Haney, E. F.; Vogel, H. J.; Chapter 1 NMR of Antimicrobial Peptides. In *Annu. Reports NMR Spectrosc.* **2009**, *65*, 1-51. [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(08\)00201-9](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(08)00201-9)
46. Wuthrich, K. *Nmr Of Proteins And Nucleic Acids*; 1st ed.; John Wiley & Sons Inc., **1986**.
47. Huenges, M.; Kessler, H.; Structural Chemistry Using NMR Spectroscopy, Peptides. *Encycl. Spectrosc. Spectrom.* **2016**, *293*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00295-8>
48. Oh, D.; Shin, S. Y.; Kang, J. H.; Hahm, K. -S.; Kim, K. L.; Kim, Y.; NMR Structural Characterization of Cecropin A (1-8) – Magainin 2 (1-12) and Cecropin A (1-8) – Melittin (1-12) Hybrid Peptides. *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 578. DOI: 10.1034/j.1399-3011.1999.00067.x
49. Bessa, L. J.; Manickchand, J. R.; Eaton, P.; Leite, J. R. S. A.; Brand, G. D.; Gameiro, P.; Intragenic Antimicrobial Peptide Hs02 Hampers the Proliferation of Single- and Dual-Species Biofilms of *P. aeruginosa* and *S. aureus*: A Promising Agent for Mitigation of Biofilm-Associated Infections. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3604. DOI:10.3390/ijms20143604
50. Müller, A.; Wenzel, M.; Strahl, H.; Grein, F.; Saaki, T. N. V.; Kohl, B.; Siersma, T.; Bandow, J. E.; Sahl, H. G.; Schneider, T.; Daptomycin Inhibits Cell Envelope Synthesis by Interfering with Fluid Membrane Microdomains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, E7077. DOI: 10.1073/pnas.1611173113
51. Baltz, R. H.; Miao, V.; Wrigley, S. K.; Natural Products to Drugs: Daptomycin and Related Lipopeptide Antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 717. DOI: 10.1039/b416648p
52. Le, Y.; Yang, Y.; Cui, Y.; Yazawa, H.; Gong, W.; Qiu, C.; Wang, J. M.; Receptors for Chemotactic Formyl Peptides as Pharmacological Targets. *Int. Immunopharmacol.* **2002**, *2*, 1. DOI: 10.1016/s1567-5769(01)00150-3
53. Strouse, J. J.; Young, S. M.; Mitchell, H. D.; Ye, R. D.; Prossnitz, E. R.;

- Sklar, L. A.; Edwards, B. S.; A Novel Fluorescent Cross-Reactive Formylpeptide Receptor/Formylpeptide Receptor-Like 1 Hexapeptide Ligand. *Cytom. Part A* **2009**, *75*, 264. DOI: 10.1002/cyto.a.20670
54. Hu, J.; Li, X.; Chen, Y.; Han, X.; Li, L.; Yang, Z.; Duan, L.; Lu, H.; He, Q.; The Protective Effect of WKYMVm Peptide on Inflammatory Osteolysis Through Regulating NF- κ B and CD9/gp130/STAT3 Signalling Pathway. *J Cell Mol Med.* **2020**, *24*, 1893. DOI: 10.1111/jcmm.14885
55. Christophe, T.; Karlsson, A.; Dugavei, C.; Rabet, M.-J.; Boulay, F.; Dahlgren, C.; The Synthetic Peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ Specifically Activates Neutrophils through FPRL1/Lipoxin A4 Receptors and Is an Agonist for the Orphan Monocyte-expressed Chemoattractant Receptor FPRL2. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21585. DOI: 10.1074/jbc.M007769200
56. Eroglu, M.; Kokenek-Unal, T. D.; Akin-Bali, D. F.; Kirimlioglu, S. H.; STAT3 expression is correlated with pathological stage in luminal subtypes of breast carcinoma. *Bratisl Lek List.* **2020**, *121*, 51. DOI: 10.4149/BLL_2020_008
57. Wan, H.-X.; Zhou, C.; Zhang, Y.; Sun, M.; Wang, X.; Yu, H.; Yang, X.; Ye, R. D.; Shen, J.-K.; Wang, M.-W.; Discovery of Trp-Nle-Tyr-Met as a Novel Agonist for Human Formyl Peptide Receptor-like 1. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 317. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.04.016
58. Chen, T.; Xiong, M.; Zong, X.; Ge, Y.; Zhang, H.; Wang, M.; Han, G. W.; Yi, C.; Ma, L.; Ye, R. D.; Xu, Y.; Zhao, Q.; Wu, B.; Structural basis of ligand binding modes at the human formyl peptide receptor 2. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1208. DOI: 10.1038/s41467-020-15009-1
59. Tegge, W.; Guerra, G.; Hölte, A.; Schiller, L.; Beutling, U.; Harmrolfs, K.; Gröbe, L.; Wullenkord, H.; Xu, C.; Weich, H.; Brönstrup, M.; Selective Bacterial Targeting and Infection-Triggered Release of Antibiotic Colistin Conjugates. *Angew Chem Int* **2021**, *60*, 17989. DOI: 10.1002/anie.202104921
60. Ramachandran, R.; Altier, C.; Oikonomopoulou, K.; Hollenberg, M. D.; Proteinases, Their Extracellular Targets, and Inflammatory Signaling. *Pharmacol. Rev.* **2016**, *68*, 1110. DOI:10.1124/pr.115.010991

61. Santos, L. A. Estudo da Interação da Enzima Tripsina com Nanopartículas de Ouro, Universidade Federal de Goiás, **2020**.
62. Blodgett, D. M.; Graybill, C.; Carruthers, A.; Analysis of Glucose Transporter Topology and Structural Dynamics. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 36416. DOI: 10.1074/jbc.M804802200
63. Hernandez, C. A.; Nicolas, J. C.; Bioch, D.; Fernandez, J.; Pizarro, P.; Determination of Plasma Trypsin-Like Activity in Healthy Subjects, Patients With Mild to Moderate Alcoholic Chronic Pancreatitis, and Patients With Nonjaundice Pancreatic Cancer. *Dig Dis Sci.* **2005**, *50*, 2165. DOI: 10.1007/s10620-005-3026-6
64. Schillinga, O.; Biniosseka, M. L.; Mayer, B.; Elsasser, B.; Brandstetter, H.; Goettig, P.; Stenman, U.-H.; Koistinen, H.; Specificity profiling of human trypsin-isoenzymes. *Biol. Chem.* **2018**, *399*, 997. DOI: 10.1515/hsz-2018-0107
65. Nickel, K. F.; Renné, T.; Crosstalk of the Plasma Contact System with Bacteria. *Thromb Res.* **2012**, *130*, 78. DOI: 10.1016/j.thromres.2012.08.284
66. Weidmann, H.; Heikau, L.; Long, A. T.; Naudin, C.; Schlüter, H.; Renné, T.; The Plasma Contact System, a Protease Cascade at the Nexus of Inflammation, Coagulation and Immunity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 2118. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.07.009
67. Loubakos, A.; Potempa, J.; Travis, J.; D'Andrea, M. R.; Andrade-Gordon, P.; Santulli, R.; Mackie, E. J.; Pike, R. N.; Arginine-Specific Protease from *Porphyromonas gingivalis* Activates Protease-Activated Receptors on Human Oral Epithelial Cells and Induces Interleukin-6 Secretion. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 5121. DOI: 10.1128/iai.69.8.5121-5130.2001
68. McCarter, J. D.; Daren, S.; Shoemaker, K.; Rosenberg, S.; Kirsch, J. F.; Georgiou, G.; Substrate Specificity of the *Escherichia coli* Outer Membrane Protease OmpT. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5919. DOI: 10.1128/JB.186.17.5919-5925.2004
69. Hwang, B.-Y.; Varadarajan, N.; Li, H.; Rodriguez, S.; Iverson, B. L.; Georgiou, G.; Substrate Specificity of the *Escherichia coli* Outer Membrane Protease OmpP. *J. Bacteriol.* **2006**, *189*, 522. DOI:

10.1128/jb.01493-06

70. Hritonenko, V.; Stathopoulos, C.; Omptin Proteins: na Expanding Family of Outer Membrane Proteases in Gram-negative *Enterobacteriaceae* (Review). *Mol. Membr. Biol.* **2007**, *24*, 395. DOI: 10.1080/09687680701443822
71. Tian, C.; Liu, K.; Sun, R.; Fu, L.; Yang, J.; Chemoproteomics reveals unexpected lysine/arginine-specific cleavage of peptide chains as a potential protein degradation machinery. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 794. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03237
72. Shang, L.; Tucker, S. J.; Non-equivalent Role of TM2 Gating Hinges in Heteromeric Kir4.1/Kir5.1 Potassium Channels. *Eur. Biophys. J.* **2008**, *37*, 165. DOI: 10.1007/s00249-007-0206-7
73. Zhang, L.; Lin, J.; Ji, G.; Membrane Anchoring of the AgrD N-terminal Amphipathic Region Is Required for Its Processing to Produce a Quorum-sensing Pheromone in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 19448. DOI: 10.1074/jbc.M311349200
74. Malene, W.; Michael, G.; I, O. T.; Bodil, J.; Francois, B.; Johan, B.; Claes, D.; Huamei, F.; Antibacterial Activity of Pepducins, Allosterical Modulators of Formyl Peptide Receptor Signaling. *Antimicrob Agents Chemother* **2014**, *58*, 2985. DOI: 10.1128/AAC.02716-13
75. Vandamme, D.; Landuyt, B.; Luyten, W.; Schoofs, L.; Comprehensive Summary of LL-37, the Factoctum Human Cathelicidin Peptide. *Cell Immunol.* **2012**, *280*, 22. DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.11.009
76. Expasy/Protparam <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>. Acesso em 18 de fevereiro de 2020
77. Stewart, J. C. M.; Colorimetric Determination of Phospholipds with Ammonium Ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* **1980**, *104*, 10. DOI: 10.1016/0003-2697(80)90269-9
78. Corrêa, D. H. A.; Ramos, C. H. I.; The Use of Circular Dichroism Spectroscopy to Study Protein Folding, Form and Function. *African J. Biochem. Res.* **2009**, *3*, 164. <https://doi.org/10.5897/AJBR.9000245>
79. Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C.; How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2005**, *1751*, 119.

DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005

80. Norris, M.; Fetler, B.; Marchant, J.; Johnson, B. A.; NMRFX Processor: A Cross-Platform NMR Data Processing Program. *J. Biomol. NMR* **2016**, *65*, 205. <https://doi.org/10.1007/s10858-016-0049-6>
81. Skinner, S. P.; Goult, B. T.; Fogh, R. H.; Boucher, W.; Stevens, T. J.; Laue, E. D.; Vuister, G. W.; Structure Calculation, Refinement and Validation Using CcpNmr Analysis. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2015**, *71*, 154. <https://doi.org/10.1107/S1399004714026662>
82. Rieping, W.; Habeck, M.; Bardiaux, B.; Bernard, A.; Malliavin, T. E.; Nilges, M.; ARIA2: Automated NOE Assignment and Data Integration in NMR Structure Calculation. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 381. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl589>
83. Brünger, A. T.; Version 1.2 of the Crystallography and NMR System. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2728. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.406>
84. Patel, J. B. *et al.* CLSI M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **2015**, *35*, 1–87.
85. Marim, F. M.; Silveira, T. N.; Lima Jr., D. S.; Zamboni, D. S.; A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. *PLoS One* **2010**, *5*, e15263. DOI: 10.1371/journal.pone.0015263
86. Cantú, M. D.; Carrilho, E.; Wulff, N. A.; Palma, M. S.; Sequenciamento de Peptídeos Usando Espectrometria de Massas: Um Guia Prático. *Quim. Nov.* **2008**, *31*, 669. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000300034>
87. BMRB/Statsel http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statsel.htm. Acesso em 08 de fevereiro de 2020.
88. Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M.; The Chemical Shift Index: A Fast and Simple Method for the Assignment of Protein Secondary Structure through ⁶³C NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647. <https://doi.org/10.1021/bi00121a010>
89. Expasy/Peptide_mass https://web.expasy.org/cgi-bin/peptide_mass/peptide-mass.pl. Acesso em 18 de fevereiro de 2020

90. Starr, C. G.; Wimley, W. C.; Antimicrobial Peptides are Degraded by the Cytosolic Proteases of Human Erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2017**, *1859*, 2319. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.09.008
91. Li, D.; Yang, Y.; Li, R.; Huang, L.; Wang, Z.; Deng, Q.; Dong, S.; N-terminal acetylation of antimicrobial peptide L163 improves its stability against protease degradation. *J Pep Sci.* **2021**, e3337. DOI: 10.1002/psc.3337
92. Liu, Y.; Li, S.; Shen, T.; Chen, L.; Zhou, J.; Shi, S.; Wang, Y.; Zhao, Z.; Liao, C.; Wang, C.; N-terminal Myristoylation Enhanced the Antimicrobial Activity of Antimicrobial Peptide PMAP-36PW. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 450. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00450
93. Qi, R.; Zhang, N.; Zhang, P.; Zhao, H.; Liu, J.; Cui, J.; Xiang, J.; Han, Y.; Wang, S.; Wang, Y.; Gemini Peptide Amphiphiles with Broad-Spectrum Antimicrobial Activity and Potent Antibiofilm Capacity. *Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 17220–17229. DOI: 10.1021/acsami.0c01167
94. Thankappan, B.; Sivakumar, J.; Asokan, S.; Ramasamy, M.; Pillai, M. M.; Selvakumar, R.; Angayarkanni, J.; Dual antimicrobial and anticancer activity of a novel synthetic α -helical antimicrobial peptide. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2021**, *16*, 105784. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105784>
95. Bozza, P. T.; Magalhães, K. G.; Weller, P. F.; Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2009**, *1791*, 540. DOI: 10.1016/j.bbalip.2009.01.005
96. Mota, L. A. M. Indução de Corpos Lipídicos em Macrófagos por Soro de Camundongo e seus Efeitos na Infecção pelo *Toxoplasma gondii*, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, **2014**.
97. Del Vecchio, M.; Bajetta, E.; Canova, S.; Lotze, M. T.; Wesa, A.; Parmiani, G.; Anichini, A.; Interleukin-12: Biological Properties and Clinical Application. *Clin Cancer Res* **2007**, *13*, 4677. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0776
98. Gomes, M. A. M.; Neto, N. C. M.; Bispo, I. G. A.; Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. *Rev SOCERJ*, **2009**, *22*, 398. ID: lil-544643

99. Stepanenko, A. A.; Dmitrenko, V. V.; Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* **2015**. DOI: 10.1016/j.gene.2015.08.009
100. Bernhard, B.; Schwaiger, W.; Crazzolaro, R.; Tinhofer, I.; Kofler, R.; Csordas, A.; Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. *Cancer Lett.* **2003**, *195*, 193. DOI: 10.1016/s0304-3835(03)00157-5
101. Bae, Y.-S.; Park, J. C.; He, R.; Ye, R. D.; Kwak, J.-Y.; Suh, P.-G.; Ho Ryu, S.; Differential Signaling of Formyl Peptide Receptor-Like 1 by Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-CONH₂ or Lipoxin A₄ in Human Neutrophils. *Mol Pharmacol.* **2003**, *64*, 721. DOI: 10.1124/mol.64.3.721
102. Walther, A.; Riehemann, K.; Gerke, V.; A Novel Ligand of the Formyl Peptide Receptor: Annexin I Regulates Neutrophil Extravasation by Interacting with the FPR. *Mol Cell.* **2000**, *5*, 831. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80323-8
103. Bae, Y.-S.; Yi, H. J.; Lee, H.-Y.; Jo, E. J.; Kim, J. I.; Lee, T. G.; Ye, R. D.; Kwak, J.-Y.; Ryu, S. H.; Differential Activation of Formyl Peptide Receptor-Like 1 by Peptide Ligands. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 6807. DOI: 10.4049/jimmunol.171.12.6807
104. Winther, M.; Dahlgren, C.; Forsman, H.; Formyl Peptide Receptors in Mice and Men: Similarities and Differences in Recognition of Conventional Ligands and Modulating Lipopeptides. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2018**, *122*, 191. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12903>

Anexo A

Espectros de massa dos ensaios de digestão do peptídeo Chim2 nos tempos de 30 e 240 minutos para as Condições 1, 2 e 3, na razão 1:10 peptídeo:fosfolipídeo.

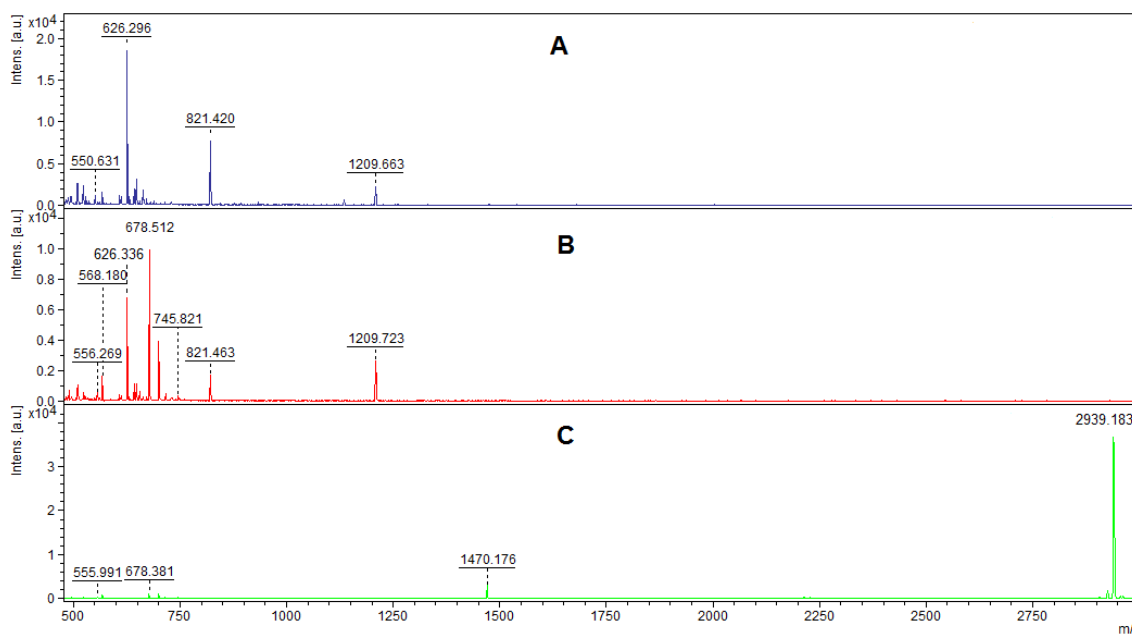


Figura A1. Espectros de massa dos ensaios de digestão do peptídeo Chim2 no tempo de 30 minutos para: (A) Condição 1, (B) Condição 2 e (C) Condição 3. O eixo y se encontra em unidades arbitrárias (a.u.).

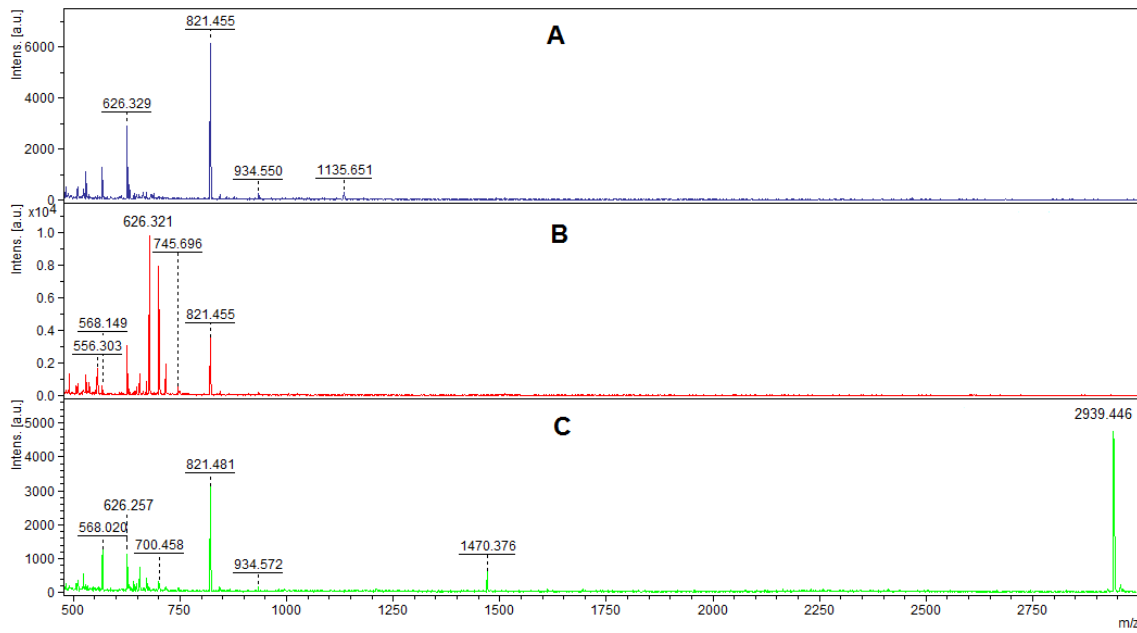


Figura A2. Espectros de massa dos ensaios de digestão do peptídeo Chim2 no tempo de 240 minutos para: (A) Condição 1, (B) Condição 2 e (C) Condição 3. O eixo y se encontra em unidades arbitrárias (a.u.).

Anexo B

Tabela dos aminoácidos com sua respectiva representação em uma letra, representação em três letras e sua massa monoisotópica e tabela dos fragmentos teóricos da hidrólise do peptídeo Chim2.

Tabela B1. Tabela dos aminoácidos com sua respectiva representação em uma letra, representação em três letras e sua massa monoisotópica.

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

Tabela B2. Estrutura primária, posição dos resíduos na cadeia e a massa dos fragmentos do peptídeo Chim2 obtidos teoricamente para tripsinólise.

Massa	Posição dos resíduos	Sequência do peptídeo
2204,3542	2-20	WAVKIIRKFIKGFISGGKR
2176,3480	1-19	KWAVKIIRKFIKGFISGGK
2048,2531	2-19	WAVKIIRKFIKGFISGGK
2034,2487	6-22	IIRKFIKGFISGGKRWK
1945,0833	9-24	KFIKGFISGGKRWKYM
1816,9883	10-24	FIKGFISGGKRWKYM
1720,0744	6-20	IIRKFIKGFISGGKR
1651,9794	9-22	KFIKGFISGGKRWK
1563,9733	6-19	IIRKFIKGFISGGK
1530,0042	1-12	KWAVKIIRKFIK
1523,8845	10-22	FIKGFISGGKRWK
1428,7409	13-24	GFISGGKRWKYM
1401,9092	2-12	WAVKIIRKFIK
1337,8052	9-20	KFIKGFISGGKR
1209,7102	10-20	FIKGFISGGKR
1181,7041	9-19	KFIKGFISGGK
1141,7568	1-9	KWAVKIIRK
1135,6370	13-22	GFISGGKRWK
1053,6091	10-19	FIKGFISGGK
1013,6618	1-8	KWAVKIIR
1013,6618	2-9	WAVKIIRK
917,6294	6-12	IIRKFIK
885,5668	2-8	WAVKIIR
821,4628	13-20	GFISGGKR
782,3970	20-24	RWKYM
665,3617	13-19	GFISGGK
631,3926	1-5	KWAVK
626,2959	21-24	WKYM
535,3602	9-12	KFIK
529,3820	6-9	IIRK
503,2976	2-5	WAVK

Anexo C

Cromatogramas, espectros de MS e espectros de MS/MS dos peptídeos alternativos da hidrólise de Chim2 (GFISGGKRWKYM-NH₂ e GGKRWKYM-NH₂)

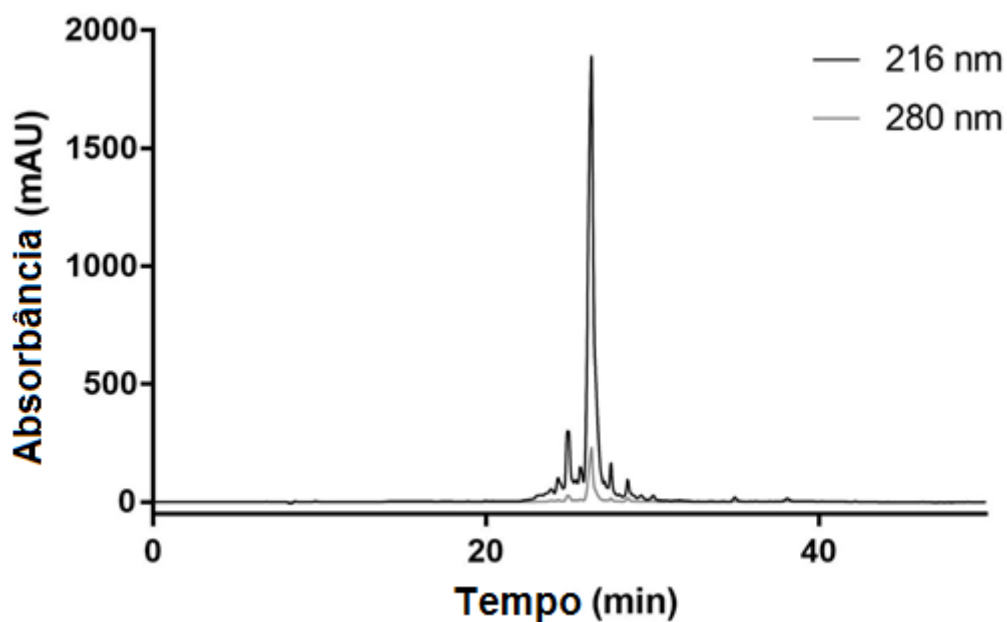


Figura C1 – Cromatograma do peptídeo GFISGGKRWKYM-NH₂. O experimento foi realizado com 15 mg do peptídeo em coluna preparativa Júpiter C18 acoplada a um LC-20 Prominence (Shimadzu Co.) submetida a um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (linha preta) em água + 0,1% TFA a uma taxa de fluxo de 10 ml/min. A absorbância da amostra foi monitorada a 216 nm (linha preta) e a 280 nm (linha cinza). O peptídeo corresponde à fração principal.

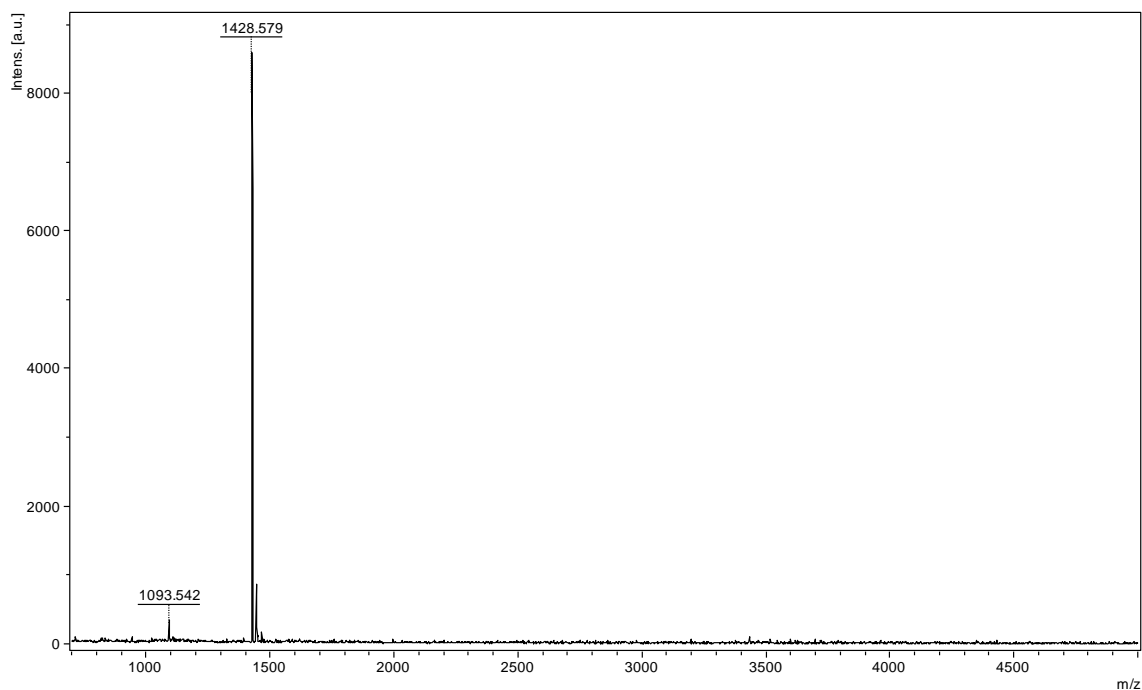


Figura C2 – Espectro de massa do peptídeo GFISGGKRWKYM-NH₂. Análise MS do extrato bruto obtido a partir da síntese química do peptídeo usando um MALDI-TOF MS (Ultraflex III, Bruker Daltonics, Alemanha) operando no modo refletor positivo usando ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz. $[M+H]^+$ teórico = 1428,757 Da.

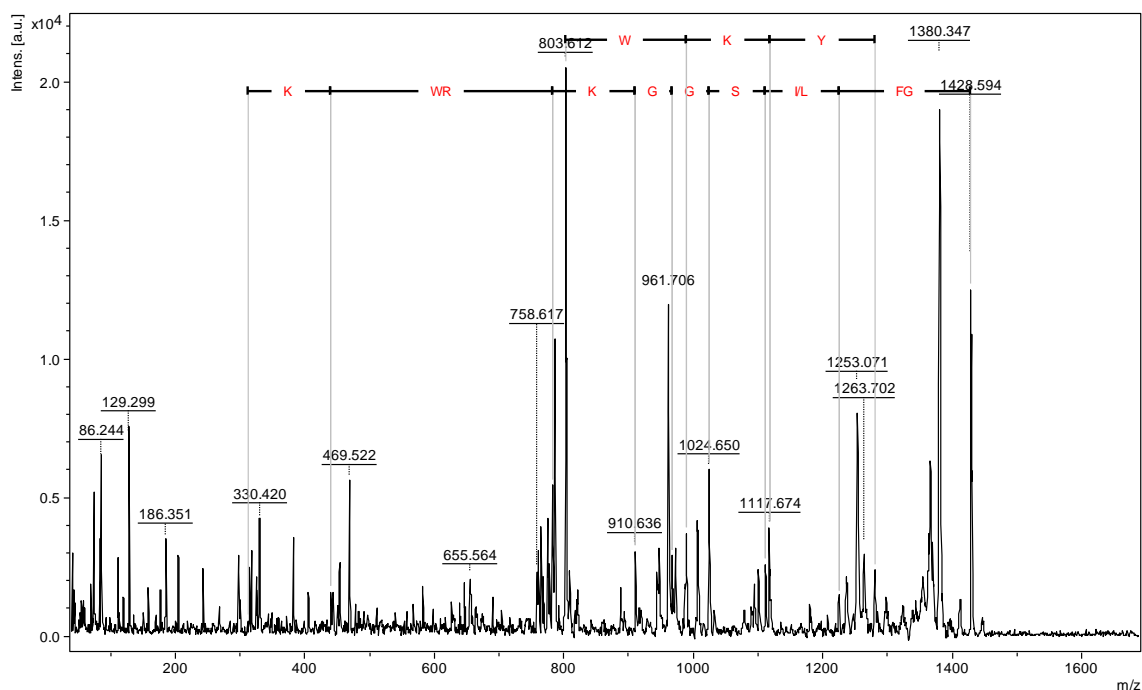


Figura C3 – Espectro de MS/MS do peptídeo GFISGGKRWKYM-NH₂. Espectro de fragmentação do peptídeo em modo LIFT usando um MALDI-TOF MS (Ultraflex III,

Bruker Daltonics, Alemanha). Os resíduos de aminoácidos das séries de íons *y* e *b* estão representados em vermelho.

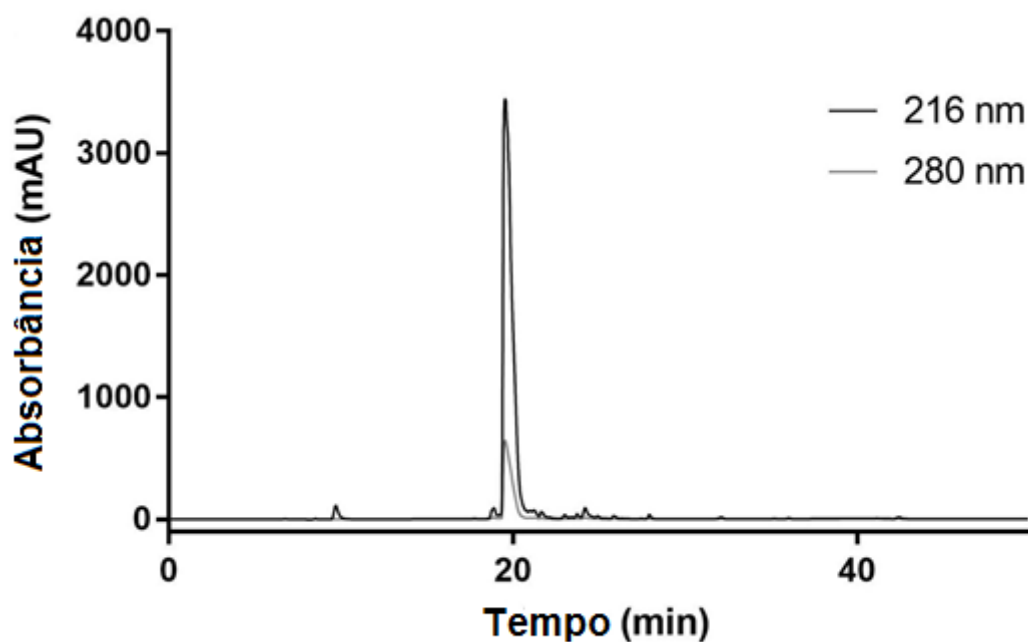


Figura C4 – Cromatograma do peptídeo GGKRWKYM-NH₂. O experimento foi realizado com 15 mg do peptídeo em coluna preparativa Júpiter C18 acoplada a um LC-20 Prominence (Shimadzu Co.) submetida a um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (linha preta) em água + 0,1% TFA a uma taxa de fluxo de 10 ml/min. A absorbância da amostra foi monitorada a 216 nm (linha preta) e a 280 nm (linha cinza). O peptídeo corresponde à fração principal.

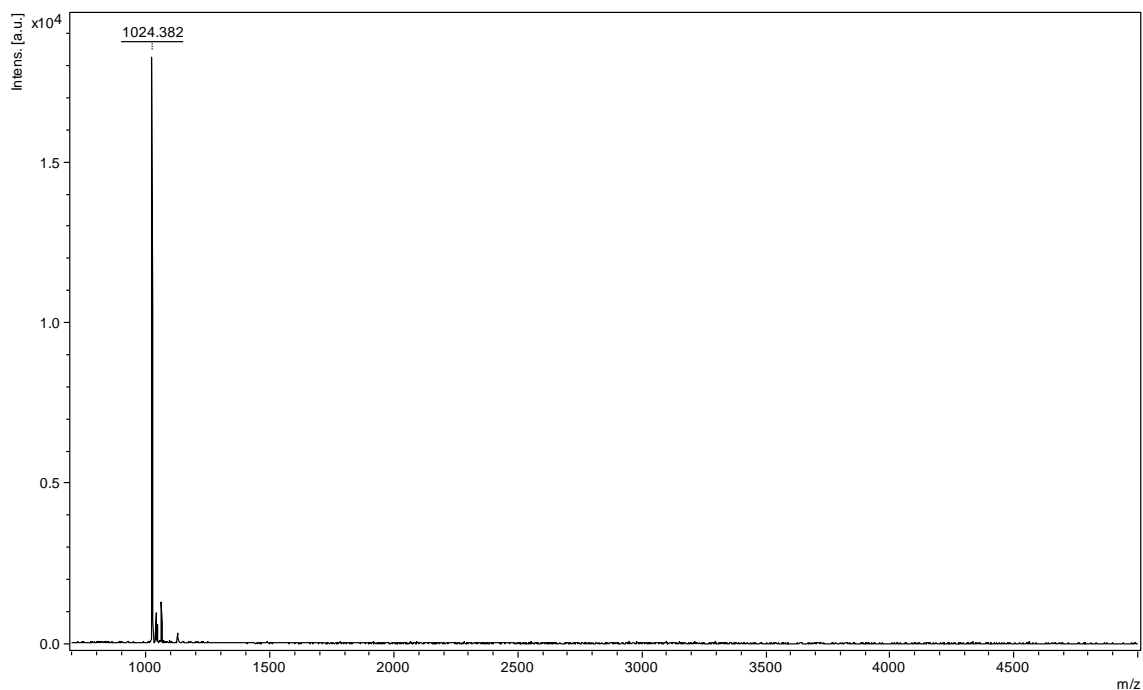


Figura C5 – Espectro de massa do peptídeo GGKRWKYM-NH₂. Análise MS do extrato bruto obtido a partir da síntese química do peptídeo usando um MALDI-TOF MS (Ultraflex III, Bruker Daltonics, Alemanha) operando no modo refletor positivo usando ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico como matriz. $[M+H]^+$ _{teórico} = 1024,551 Da.

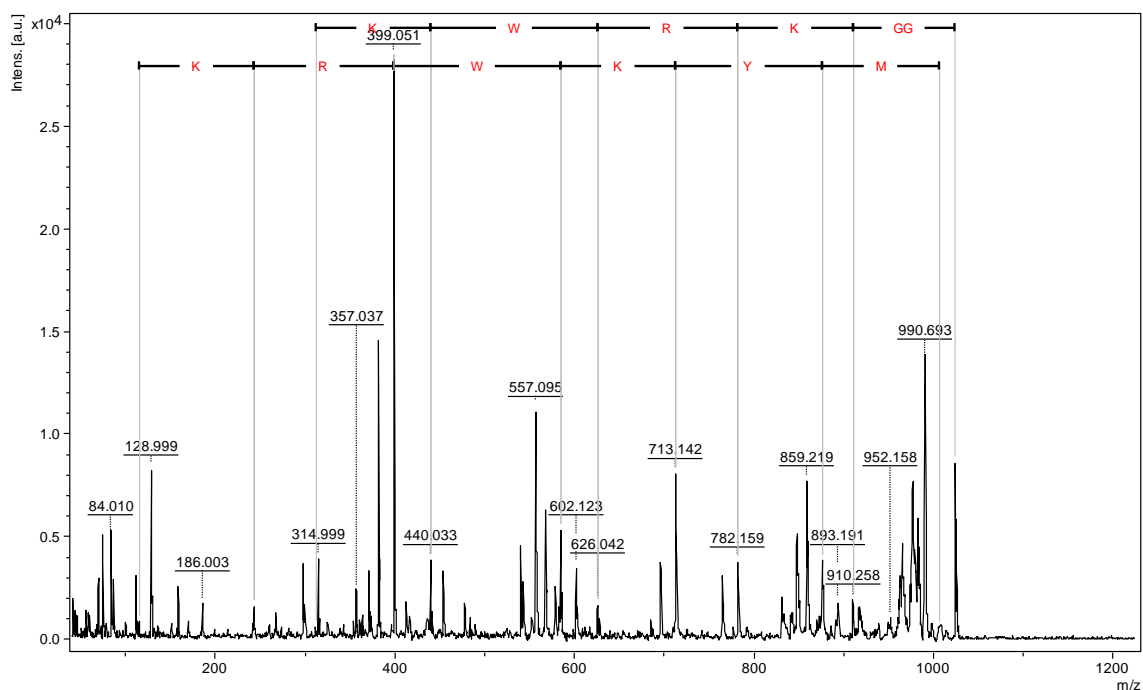


Figura C6 – Espectro MS/MS do peptídeo GGKRWKYM-NH₂. Espectro de fragmentação do peptídeo em modo LIFT usando um MALDI-TOF MS (Ultraflex III,

Bruker Daltonics, Alemanha). Os resíduos de aminoácidos das séries de íons *y* e *b* estão representados em vermelho.

Anexo D

Espectros de MS e MS/MS do peptídeo sintético WKYM-NH₂

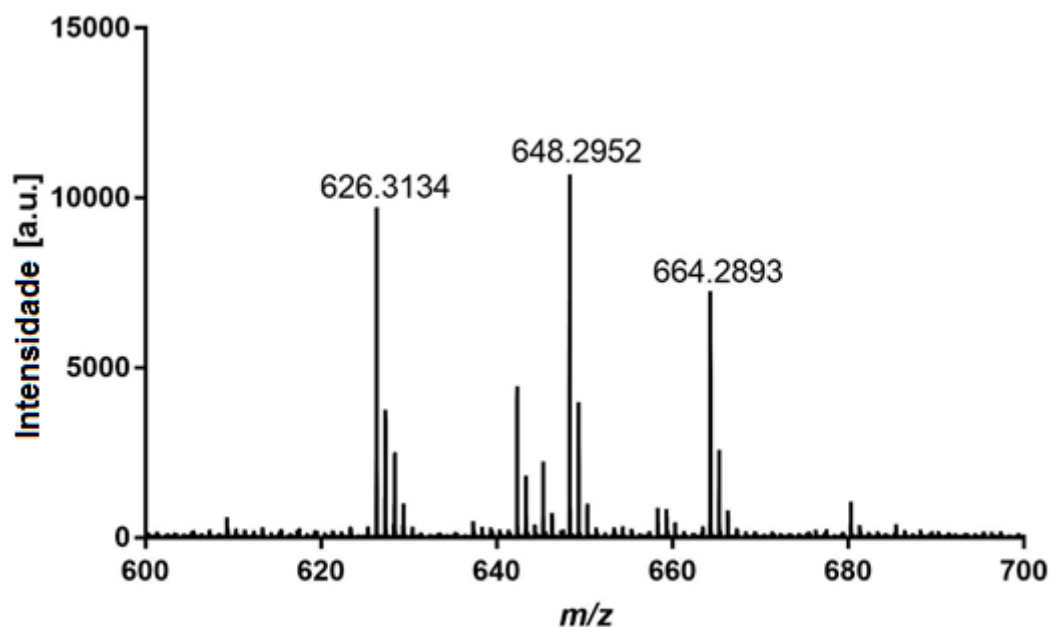


Figura D1 – Espectro de massa do peptídeo WKYM-NH₂. Análise MS do extrato bruto obtido a partir da síntese química do peptídeo utilizando um Triple ToF 5600+ (Sciex, Framingham, EUA) operando em modo refletor positivo. $[M+H]^+_{\text{teórico}} = 626,312$ Da.

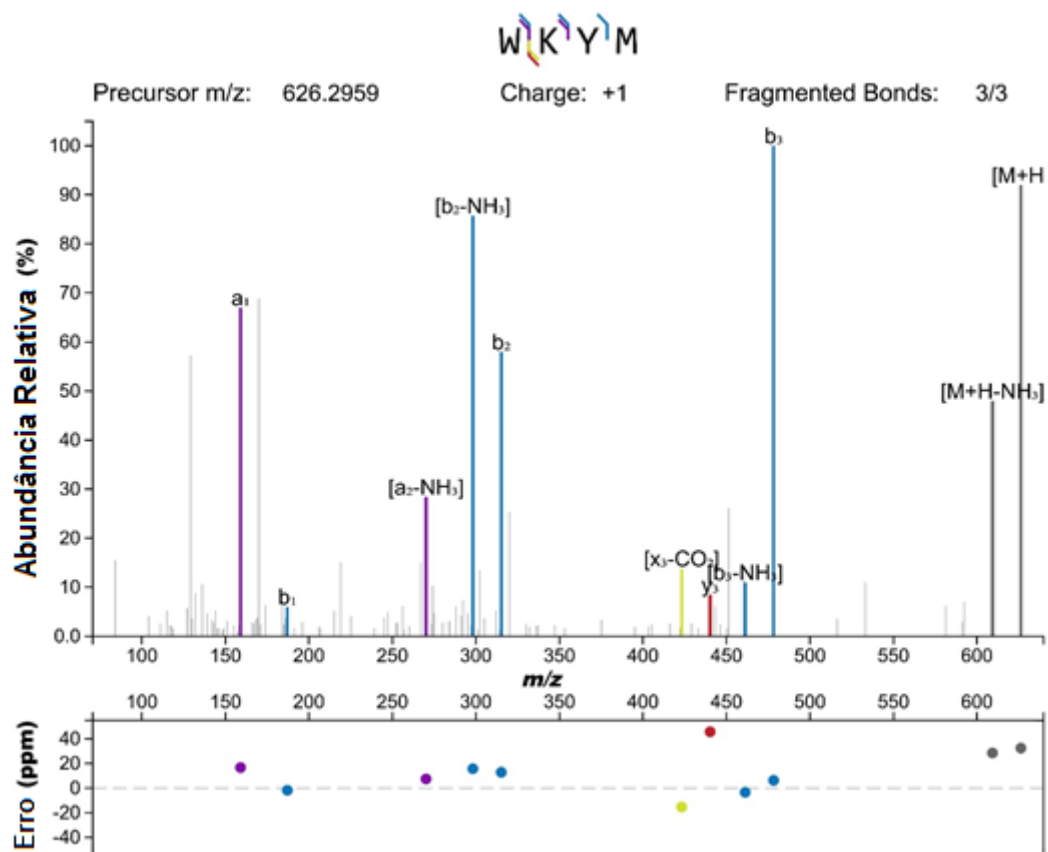


Figura D2 – Espectro de MS/MS do peptídeo WKYM-NH₂. Espectro de fragmentação de WKYM-NH₂ obtido em Triple ToF 5600+ (Sciex, Framingham, EUA). Gráfico gerado usando a ferramenta online ISPA: <http://www.interactivepeptidespectralannotator.com/PeptideAnnotator.html>.

Anexo E

Curva de calibração do peptídeo Chim2

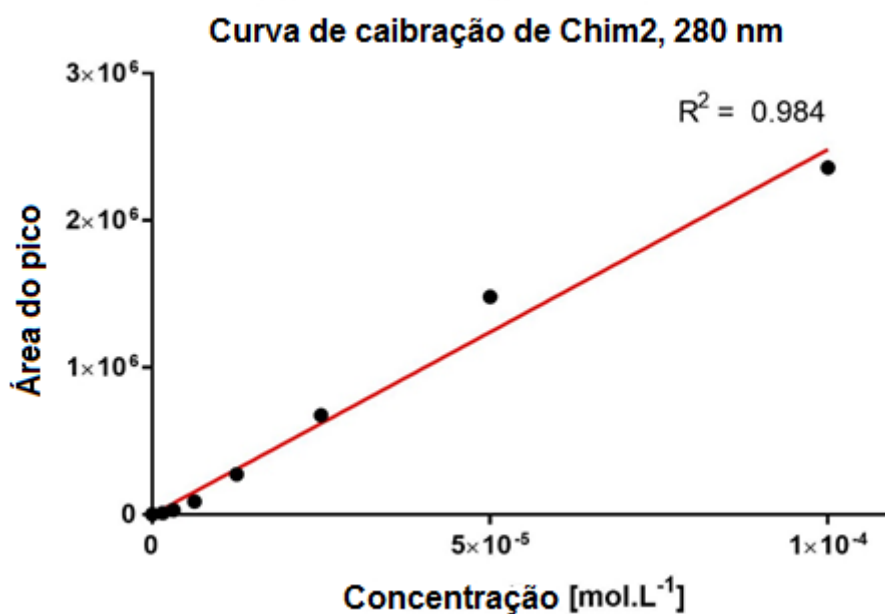


Figura E1. Curva de calibração para o peptídeo WKYM-NH₂. Para a confecção da curva foram utilizados 7 pontos com as concentrações do peptídeo de: 0, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 μ M, obtendo-se um $R^2 = 0,984$ e a equação da reta: $y = 24874,7x - 3954.86$.

Anexo F

Produção de ROS em neutrófilos humanos previamente incubados com TNF- α

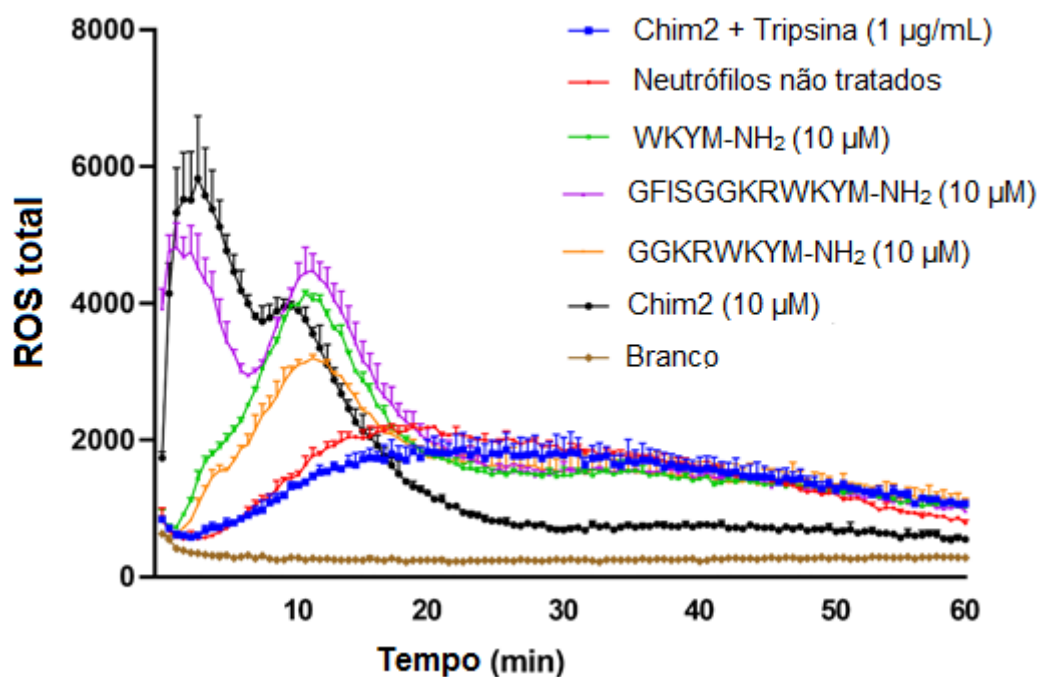
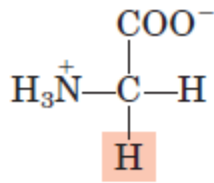


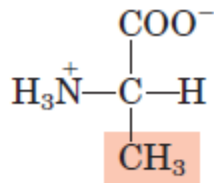
Figura F1. Produção de ROS total em neutrófilos humanos induzidos com TNF- α . Neutrófilos saudáveis foram isolados do sangue periférico de voluntários e incubados com TNF- α por 1 hora. Em seguida, foram adicionados, às células, peptídeos na concentração de 10 μ M e a quantidade de ROS foi monitorada por 2 horas. A quimioluminescência foi detectada utilizando-se um leitor de placas. Os resultados dos primeiros 60 minutos são mostrados em duplicatas.

Anexo G

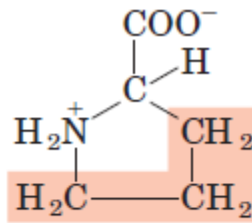
Estrutura dos aminoácidos (em destaque, as cadeias laterais).



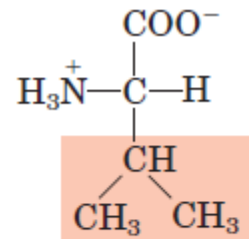
Glicina



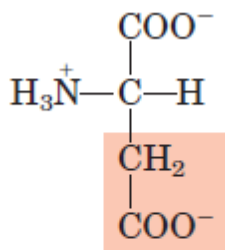
Alanina



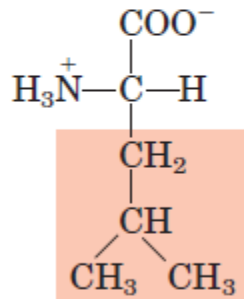
Prolina



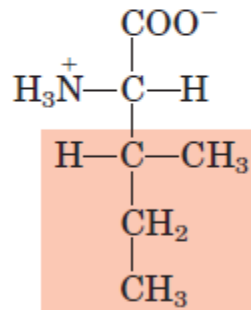
Valina



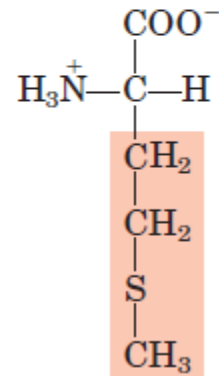
Aspartato



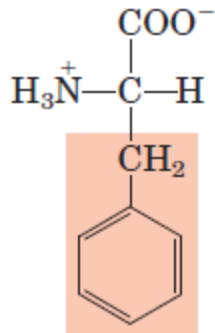
Leucina



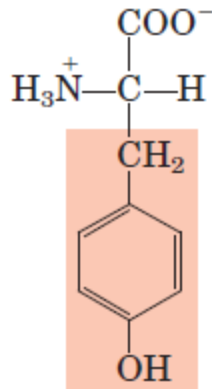
Isoleucina



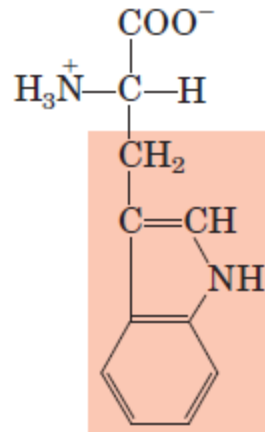
Metionina



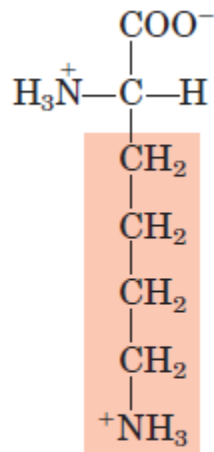
Fenilalanina



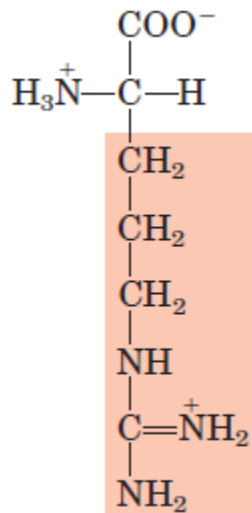
Tirosina



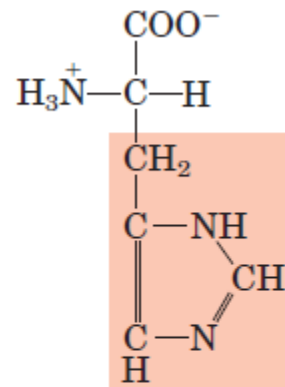
Triptofano



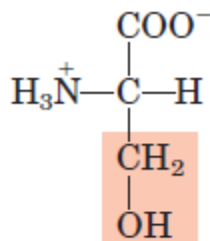
Lisina



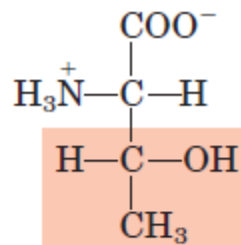
Arginina



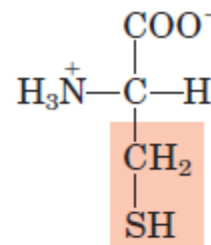
Histidina



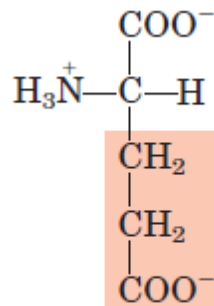
Serina



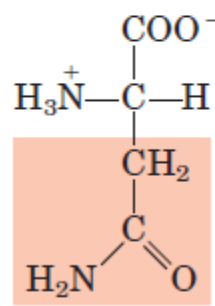
Treonina



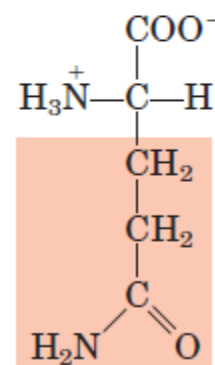
Cisteína



Glutamato



Asparagina



Glutamina


Retirado de: Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd ed.; Worth Publishers, 2000.

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE DOUTORADO

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

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

Brasília, 20 de abril de 2023.

Documento assinado digitalmente
 THIAGO VIANA DE FREITAS
Data: 20/04/2023 14:51:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do/a discente: _____

Programa: Programa de Pós-Graduação em Química _____

Nome completo: Thiago Viana de Freitas _____

Título do Trabalho: Desenho Racional de Peptídeos Membrano-
ativos Liberadores de Fragmentos Imunomodulatórios por
Proteólise Direcionada pela Membrana

Nível: () Mestrado (X) Doutorado

Orientador/a: Guilherme Dotto Brand _____