



Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Dissertação de Mestrado

**Desenho racional de peptídeos análogos ao Hs02 com
ampliação de seletividade como agentes antimicrobianos**

João Bueno Nunes

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand

Coorientadora: Prof. Dra. Aline Lima de Oliveira Paterno

Brasília, Distrito Federal

2023

“Maravilhar-se é o primeiro passo para o descobrimento”

– Louis Pasteur

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Marcus e Roberta. Sou eternamente grato pelo constante incentivo e apoio, e por me guiarem em todas as minhas decisões, sempre como exemplos de responsabilidade e retidão.

Ao meu irmão Pedro, por todo apoio, pelos conselhos e momentos de descontração. Sua ajuda foi uma bênção inestimável durante todas as etapas da minha jornada.

À minha avó Vitória, agradeço profundamente pelo amor e carinho, demonstrado por meio de abraços, beijos e canecas de café durante toda o desenvolvimento desse trabalho.

À minha avó Cecília e ao meu falecido avô, José, agradeço por todo o amor que me deram e pelas minhas primeiras aulas de desenho e xadrez.

À minha namorada Sarah, toda a minha gratidão pelo incentivo constante, compreensão e apoio vitais que me permitiram a completa dedicação a este trabalho. Quero também agradecer à minha sogra, Andréa, pelo acolhimento caloroso, amor e carinho durante o período do meu mestrado.

Ao meu orientador, Guilherme, sou profundamente grato por sua paciência e compromisso com a minha formação. Obrigado por todos os ensinamentos e “puxões de orelha” durante o desenvolvimento desse trabalho e pelas valiosas lições que moldaram minha evolução como pesquisador. Agradeço também a professora Aline, pela orientação no trabalho e por todo apoio e auxílio no desenvolvimento do projeto. Se com esse trabalho eu consegui “carregar o piano” em um projeto, tenho certeza de que foi graças ao trabalho desses excelentes pesquisadores, professores e amigos.

Aos meus amigos Bambirra, Abdalla, Ghiggi e Victor Dantas, agradeço por compartilhar risadas, momentos de descontração e por todo apoio nos momentos difíceis. Também quero estender minha gratidão a eles e aos meus amigos de Dungeons & Dragons, Luís “Mochileiro”, André, Tomé e nosso excepcional mestre, Francisco, que juntos, enfrentamos os campos de batalha de Barovia contra o diabo Strahd. Que nossa próxima campanha termine antes da minha defesa de doutorado.

Aos colegas de laboratório, Samuel, Saulo, Adolfo, Fernanda, Pedro Beck, Matheus França, João Gabriel, Thiago Vianna, Tiago Junot, Andrea, Tatá, Luan, Felipe, e todos do LaQMOS e LITMO por compartilharem conhecimento, desafios e risadas.

Também estendo minha gratidão aos amigos Éder, Adolfo, Thiago Vianna, Samuel e Saulo, por terem me ensinado grande parte do que sei sobre as metodologias, protocolos e condutas no laboratório.

Aos amigos do NuPMIA, Ariane, Miguel e Wanessa, minha gratidão pela ajuda nos experimentos e por estarem sempre prontos para auxiliar no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus amigos de trabalho: Eduardo, João Augusto, Guilherme Choairy, Guilherme Caldas, Alexandre e Isaac, minha gratidão por transformarem ambientes estressantes em espaços descontraídos, mantendo sempre o profissionalismo. E um agradecimento especial a Liège, por liderar nossa equipe com competência e paciência, mesmo quando essa descontração não é passageira.

Ao professor Dr. José Roberto Leite que me orienta desde a graduação, expresso minha gratidão pelo papel fundamental em minha jornada de crescimento como pesquisador. Também agradeço à Dra. Andreanne Gomes pelo apoio e confiança nos congressos e eventos em que participei.

À Dra. Izadora Cristina, expresso minha gratidão pela paciência e confiança ao ensinar a técnica do Dicroísmo Circular, além do apoio no processamento dos dados. À professora Dra. Sonia Freitas, meu agradecimento pela colaboração e permissão para usar os equipamentos do Laboratório de Biofísica Molecular do Instituto de Biologia da UnB.

Agradeço ao professor Dr. Marcelo Ramada pela colaboração na liofilização dos peptídeos e nos experimentos de atividade antimicrobiana realizados na Universidade Católica de Brasília.

Aos membros da banca, Dr. Angelo Machado, Dra. Karin Riske e Dr. Gabriel Vignolli, minha sincera apreciação por concordarem em participar da minha banca de defesa de mestrado e pelas valiosas contribuições que estou certo de que farão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| Lista de Abreviaturas | vii |
| Tabela de aminoácidos | ix |
| Índice de Figuras | x |
| Índice de Tabelas | xiv |
| Resumo | xv |
| Abstract | xvi |
| 1. Introdução teórica | 1 |
| 1.1. Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) | 1 |
| 1.1.1. Diversidade de Peptídeos Antimicrobianos | 2 |
| 1.1.2. Mecanismos de ação dos AMPs | 3 |
| 1.1.3. Relação estrutura-função | 4 |
| 1.2 AMPs, citotoxicidade e seletividade na ação antimicrobiana | 7 |
| 1.3. Lipopolissacarídeos bacterianos e seu estímulo ao processo inflamatório | 10 |
| 1.4. Peptídeos com ação antimicrobiana e anti-inflamatória | 11 |
| 1.5. Peptídeos Intragênicos Antimicrobianos (IAPs) | 14 |
| 1.5.1. Conceito Geral | 14 |
| 1.5.2. Hs02, antimicrobiano e Anti-inflamatório | 15 |
| 1.5.3. Análogos de Hs02 e sua atividade antimicrobiana | 16 |
| 1.6. Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS) de AMPs | 17 |
| 1.6.1. Resinas e <i>Linkers</i> | 18 |
| 1.6.2. Grupos de Proteção | 19 |
| 1.6.3. Acoplamentos | 21 |
| 1.6.4. Teste de Kaiser | 23 |
| 1.6.5. Clivagem | 24 |
| 2. Objetivos | 27 |
| 2.1. Objetivos Gerais | 27 |
| 2.2. Objetivos específicos | 27 |
| 3. Metodologia | 28 |
| 3.1. Síntese de peptídeos | 28 |
| 3.2. Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3. Identificação e caracterização dos peptídeos por espectrometria de massas..... | 30 |
| 3.4. Quantificação dos peptídeos. | 31 |
| 3.5. Preparação de vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DMPC e DMPC/DMPG..... | 32 |
| 3.6. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) | 33 |
| 3.7. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade..... | 34 |
| 3.8. Avaliação das Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) dos peptídeos contra bactérias. | 36 |
| 4. Resultados e discussão..... | 37 |
| 4.1 Avaliação da estrutura secundária de Hs02 e seus análogos após titulação com vesículas grandes unilamelares (LUVs) pela técnica de dicroísmo circular..... | 38 |
| 4.2. Avaliação da estrutura secundária do Hs02 e seus análogos após titulação com com LPS..... | 47 |
| 4.3 Ensaios de citotoxicidade do Hs02 e análogos..... | 49 |
| 4.4. Síntese, caracterização e purificação da segunda geração de análogos de Hs02..... | 53 |
| 4.4.1. Síntese dos peptídeos em fase sólida (SPFS)..... | 55 |
| 4.4.2. Purificação dos peptídeos sintetizados por SPFS..... | 57 |
| 4.4.3. Caracterização e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas. | 59 |
| 4.5. Avaliação da estrutura secundária da segunda geração de análogos do Hs02, por Dicroísmo Circular em concentrações crescentes de vesículas unilamelares grandes (LUVs). | 65 |
| 4.6. Avaliação da estrutura secundária por Dicroísmo Circular dos análogos 16.1, 16.2 e 16.3 na presença de Lipopolissacarídeo. | 70 |
| 4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana dos análogos 16.1, 16.2 e 16.3..... | 72 |
| 4.8. Ensaios de viabilidade celular dos análogos 16.1, 16.2 e 16.3..... | 74 |
| 5. Conclusões..... | 82 |
| Referências..... | 84 |
| Anexo 1: Fórmulas estruturais dos peptídeos utilizados no trabalho..... | 93 |
| Anexo 2 – Resultados das análises da ferramenta online BeStSeL..... | 97 |

Lista de abreviaturas:

- AA** – Ácido araquidônico
- AMP** – Peptídeos antimicrobianos (antimicrobial peptides)
- CD** – Dicroísmo circular (circular dichroism)
- DIC** – *N* – diisopropilcarbodiimida
- DMF** – *N, N* – Dimetilformamida
- DMPC** – Dimiristoil fosfatidilcolina
- DMPG** - Dimiristoil fosfatidilglicerol
- DPC** - Dodecilsfosfolina
- Fmoc** – Fluorenilmetiloxycarbonil
- HDP** – *Host defense peptides*
- HPLC** – Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
- IAP** – Peptídeos Antimicrobianos Intragênicos (Intragenic Antimicrobial Peptides)
- IDA** - *Information dependent acquisition*
- IL** – Interleucinas
- LBP** – Proteína ligante a LPS (LPS binding protein)
- LC-MS** – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
- LPC** - Lisofosfatidilcolina
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- LT** – Leucotrienos
- LUV** – Vesículas unilamelares grandes (Large unilamellar vesicle)
- MAPK** – Proteína-quinases ativadas por mitógenos (Mitogen activated protein kinases)
- MIC** – Concentração inibitória mínima (Minimal inhibitory concentration)
- MLV** – Vesículas multilamelares (Multilamellar vesicle)
- MTT** – Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
- NF-κB** – Fator nuclear κB
- PBS** – Tampão fosfato-salino (Phosphate buffer saline)
- PG** – Prostaglandinas
- RMN** – Ressonância magnética nuclear
- SUV** – Vesículas unilamelares pequenas (Small unilamellar vesicle)
- TFA** – Ácido trifluoracético (Trifluoroacetic acid)
- TNF-α** – Fator necrótico tumoral α

TRL4 – Receptor “Toll-Like” 4 (Toll-Like Receptor 4)

UV – Ultravioleta

TABELA DE AMINOÁCIDOS

| Aminoácido | Símbolo de três letras | Símbolo de uma letra | Massa monoisotópica |
|-------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Alanina | Ala | A | 71.037 |
| Cisteína | Cys | C | 103.009 |
| Ácido aspártico | Asp | D | 115.026 |
| Ácido Glutâmico | Glu | E | 129.042 |
| Fenilalanina | Phe | F | 147.068 |
| Glicina | Gly | G | 57.021 |
| Histidina | His | H | 137.058 |
| Isoleucina | Iso | I | 113.084 |
| Lisina | Lys | K | 128.094 |
| Leucina | Leu | L | 113.084 |
| Metionina | Met | M | 131.04 |
| Asparagina | Asn | N | 114.042 |
| Prolina | Pro | P | 97.052 |
| Glutamina | Glu | Q | 128.058 |
| Arginina | Arg | R | 156.101 |
| Serina | Ser | S | 87.032 |
| Treonina | Thr | T | 101.047 |
| Valina | Val | V | 99.068 |
| Triptofano | Trp | W | 186.079 |
| Tirosina | Tyr | Y | 163.063 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Diferentes morfologias de fosfolipídios e consequentes curvaturas geradas em bicamadas lipídicas..... | 4 |
| Figura 2: Representação de um AMP estruturado em α -hélice. | 5 |
| Figura 3: Representação das frequências de características dos aminoácidos em uma α -hélice de AMP..... | 6 |
| Figura 4: Tomografia de um paciente com infecção bacteriana em uma das mãos, submetido ao tratamento com o peptídeo UBI 29-41-99mTc. | 8 |
| Figura 5: Representação das membranas de células de a) bactérias Gram-negativas, b) Gram-positivas e c) humanas. | 9 |
| Figura 6: Esquema estrutural do Lipopolissacarídeo (LPS) constituinte das membranas de bactérias Gram-negativas. | 10 |
| Figura 7: Principais mecanismos propostos para a ação anti-inflamatória dos AMPs. | 12 |
| Figura 8: Estrutura do Hs02 obtida através de análises de Ressonância Magnética Nuclear em vesículas DPC-d38..... | 15 |
| Figura 9: Quatro resinas comercialmente disponíveis para a Síntese de Peptídeos em fase Sólida. | 19 |
| Figura 10: Mecanismo de desproteção do nitrogênio do aminoácido pela 4-metilpiperidina. | 20 |
| Figura 11: Grupos de Proteção de nucleófilos das cadeias laterais de aminoácidos comumente utilizados na SPFS. | 21 |
| Figura 12: Reagentes ativadores de carbonila comumente utilizados na SPFS. | 22 |
| Figura 13: Mecanismo de ativação da carbonila pelos reagentes de acoplamento DIC e Oxima®. | 22 |
| Figura 14: Mecanismo da reação da ninhidrina com a amina livre..... | 24 |
| Figura 15: Mecanismo de clivagem ácida de um peptídeo sintetizado com resina Rink Amide...25 | 25 |
| Figura 16: Scavengers utilizados na clivagem para retirar os carbocátions gerados no processo...26 | 26 |
| Figura 17: Perfil do gradiente de Acetonitrila (ACN) + 0,1% Ácido Trifluoroacético (TFA) em água deionizada + 0,1% TFA utilizado na purificação..... | 30 |
| Figura 18: Fórmula estrutural do aminoácido Triptofano..... | 31 |

| | |
|---|----|
| Figura 19: Conversão do 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazan. | 35 |
| Figura 20: Projeções helicoidais dos peptídeos Hs02 e análogos. | 37 |
| Figura 21: Fórmulas estruturais dos fosfolipídios Dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) e Dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG). | 39 |
| Figura 22: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo Hs02, a 40µM, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. | 40 |
| Figura 23: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo 13.1, a 40µM, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. | 41 |
| Figura 24: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo 13.2, a 40µM, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. | 42 |
| Figura 25: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo 10.0, a 40µM, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. | 43 |
| Figura 26: Espectros de Dicroísmo Circular de 40µM de Hs02 e seus 3 análogos em 2000µM de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. | 43 |
| Figura 27: Porcentagens de Hélice para o Hs02, 13.1, 13.2 e 10.0, a 40µM, nas concentrações de 40µM, 80µM, 160µM, 320µM, 640µM, 1280µM e 2000µM de DMPC. | 45 |
| Figura 28: Espectros de Dicroísmo Circular dos peptídeos A) Hs02 e B) 13.1, a 40µM, em concentrações crescentes de LPS. | 47 |
| Figura 29: Espectros de Dicroísmo Circular dos peptídeos A) 13.2 e B) 10.0, a 40µM, em concentrações crescentes de LPS. | 48 |
| Figura 31: Espectros de Dicroísmo Circular dos peptídeos Hs02, 13.1, 13.2 e 10.0, a 40µM, em 14.24 µM de LPS. | 49 |
| Figura 32: Placas de 96 poços utilizadas para a avaliação de viabilidade celular dos peptídeos analisados. | 50 |
| Figura 33: Dados de citotoxicidade celular CC50 em ensaio de viabilidade celular com MTT. | 51 |
| Figura 35: Fórmulas estruturais da Glicina e Alanina. | 53 |
| Figura 36: Projeções helicoidais dos análogos da segunda geração. | 55 |
| Figura 37: Fotos dos fundos de tubos de ensaio utilizados para realização do teste de Kaiser. | 56 |
| Figura 38: Cromatograma de purificação do análogo 16.1 com gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (linha azul) e água + 0,1% TFA. | 57 |
| Figura 39: Cromatograma de purificação do análogo 16.2 com gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (linha azul) e água + 0,1% TFA. | 58 |

| | |
|---|----|
| Figura 40: Cromatograma de purificação do análogo 16.3 com gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (linha azul) e água + 0,1% TFA..... | 58 |
| Figura 41: Espectros de massas adquiridos por Electrospray (ESI) do peptídeo 16.1, com os íons (A) $[M+2H]^{2+}$, íon molecular com dupla carga; e (B) $[M+3H]^{3+}$, íon molecular com tripla carga..... | 60 |
| Figura 42: Espectros de fragmentação (MS/MS), obtidos por ESI em modo Information Dependent Acquisition (IDA) do íon $[M+3H]^{3+}$ do análogo 16.1. | 61 |
| Figura 43: Espectros de massas adquiridos por Electrospray do peptídeo 16.2, com os íons (A) $[M+2H]^{2+}$, íon molecular com dupla carga; e (B) $[M+3H]^{3+}$, íon molecular com tripla carga..... | 62 |
| Figura 44: Espectros de fragmentação (MS/MS), obtidos por ESI em modo Information Dependent Acquisition (IDA) do íon $[M+2H]^{2+}$ do análogo 16.2. | 62 |
| Figura 45: Espectros de massas adquiridos por Electrospray do peptídeo 16.1, com os íons (A) $[M+2H]^{2+}$, íon molecular com dupla carga; e (B) $[M+3H]^{3+}$, íon molecular com tripla carga..... | 63 |
| Figura 46: Espectros de fragmentação (MS/MS), obtidos por ESI em modo Information Dependent Acquisition (IDA) do íon $[M+3H]^{3+}$ do análogo 16.3..... | 63 |
| Figura 47: Séries de fragmentação da cadeia principal dos peptídeos..... | 64 |
| Figura 48 - Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo 16.1, a 40 μ M, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1..... | 65 |
| Figura 49: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo 16.2, a 40 μ M, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1..... | 66 |
| Figura 50: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo 16.3, a 40 μ M, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1..... | 67 |
| Figura 51: Espectros de Dicroísmo Circular de 40 μ M de Hs02 e seus 6 análogos em 2000 μ M de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1..... | 68 |
| Figura 52: Porcentagens de Hélice para o Hs02, 16.1, 16.2 e 16.3, a 40 μ M, nas concentrações de 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M, 640 μ M, 1280 μ M e 2000 μ M de DMPC..... | 69 |
| Figura 53: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo A) Hs02 e B) 16.1, a 40 μ M, em concentrações crescentes de LPS..... | 70 |
| Figura 54: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo A) 16.2 e B) 16.3, a 40 μ M, em concentrações crescentes de LPS..... | 71 |
| Figura 55: Espectros de Dicroísmo Circular de 40 μ M de Hs02 e seus 3 análogos em 14.24 μ M de LPS..... | 71 |

| | |
|---|----|
| Figura 56: Placas de 96 poços utilizadas para a avaliação de viabilidade celular dos peptídeos analisados..... | 75 |
| Figura 57: Dados de citotoxicidade celular CC50 em ensaio de viabilidade celular com MTT..... | 76 |
| Figura 58: Índices Terapêuticos dos peptídeos da segunda geração de análogos do Hs02 nas bactérias testadas..... | 79 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Estruturas primárias do Hs02 e seus 3 análogos. | 16 |
| Tabela 2: Média dos MICs do Hs02 e seus 3 análogos contra 3 bactérias..... | 17 |
| Tabela 3: Parâmetros Físico-Químicos dos peptídeos avaliados pelo software KAMAL..... | 38 |
| Tabela 4: Constantes de Dissociação dos peptídeos Hs02, 13.1, 13.2 e 10.0 em DMPC e DMPC/DMPG..... | |
| Tabela 5: Concentrações de CC ₅₀ dos 4 peptídeos avaliados nos experimentos de viabilidade celular. | 52 |
| Tabela 6: Estruturas primárias da segunda geração de análogos do peptídeo Hs02..... | 55 |
| Tabela 7: Parâmetros Físico-Químicos dos peptídeos da segunda geração avaliados pelo <i>software</i> KAMAL..... | 55 |
| Tabela 8: Constantes de Dissociação dos peptídeos Hs02, 16.1, 16.2 e 16.3 em DMPC e DMPC/DMPG..... | |
| Tabela 9: Valores de MIC (μM) referente a ação dos peptídeos Hs02 e as duas gerações de análogos contra cepas de bactérias <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> | 75 |
| Tabela 10: Valores de MIC (μM) referente a ação dos peptídeos 16.1, 16.2 e 16.3 contra cepas de bactérias <i>K. pneumoniae</i> e <i>A. baumannii</i> | 76 |
| Tabela 11: Concentrações de CC ₅₀ dos 3 peptídeos avaliados nos experimentos de viabilidade celular, e do Hs02..... | 80 |
| Tabela 12: Índices Terapêuticos (TI) dos peptídeos testados..... | 81 |

RESUMO

Peptídeos membrano-ativos (MAPs) possuem amplo potencial biotecnológico, tanto como alternativas a fármacos convencionais no combate a microrganismos multirresistentes (MDR), quanto como carreadores de fármacos conjugados. Contudo, sua aplicação depende da seletividade com que essas moléculas reconhecem seus alvos, as membranas procarióticas, em relação às membranas dos hospedeiros. Peptídeos antimicrobianos (AMPs) e peptídeos intragênicos antimicrobianos (IAPs), esses últimos encontrados na estrutura primária de proteínas diversas, são frequentemente pouco seletivos, sendo tanto antimicrobianos quanto citotóxicos. O peptídeo Hs02 é um exemplo de IAP, com 16 resíduos de aminoácidos, carga líquida positiva e que se estrutura em α -hélice ao adsorver em membranas. Muito embora o Hs02 seja um amplo e potente agente antimicrobiano, apresenta seletividade moderada em relação a células eucarióticas. Com o objetivo de melhorar a seletividade desse IAP, duas gerações de análogos do Hs02 foram sintetizadas, purificadas e caracterizadas. Em uma dessas séries, foram sintetizados três análogos de tamanho reduzido e posteriormente outros três com modificações pontuais em sítios críticos. A avaliação de suas estruturas foi feita por meio de espectroscopia de dicroísmo circular, na presença de vesículas unilamelares grandes (LUVs) com cargas neutras e negativas, bem como do lipopolissacarídeo (LPS). Posteriormente, as atividades antimicrobianas foram testadas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e as citotoxicidades foram medidas por ensaios de viabilidade celular com MTT utilizando células micróglia BV-2 como modelo. Os resultados obtidos demonstraram um aumento significativo no índice terapêutico (TI) de todos os análogos da segunda geração contra as bactérias Gram-negativas testadas, especialmente no caso do 16.3. No caso das bactérias Gram-positivas, os análogos desenvolvidos apresentaram uma diminuição em seu TI, sugerindo que a composição da parede celular dessas bactérias pode dificultar a travessia de peptídeos antimicrobianos catiônicos. Apesar dessa redução, o 16.3 apresentou um aumento de quase 5 vezes no índice terapêutico contra *E. coli* e *P. aeruginosa*, decorrente da redução da citotoxicidade e da manutenção da atividade antimicrobiana em relação ao peptídeo original. Os achados desse estudo indicam que o equilíbrio entre a cationicidade e hidrofobicidade mínima do Hs02 foi otimizado e que esses parâmetros alteraram significativamente o TI desse MAP.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos intragênicos; Ampliação de seletividade; Síntese de peptídeos; dicroísmo circular;

ABSTRACT

Membrane-active peptides (MAPs) exhibit a broad biotechnological potential, both as alternatives to conventional drugs in combating multidrug-resistant microorganisms (MDR), and as carriers of conjugated drugs. However, their application relies on the selectivity with which these molecules recognize their targets, prokaryotic membranes, in relation to host membranes. Antimicrobial peptides (AMPs) and intragenic antimicrobial peptides (IAPs), the latter found in the primary structure of various proteins, are often poorly selective, being both antimicrobial and cytotoxic. The peptide Hs02 is an example of an IAP, consisting of 16 amino acid residues, a positive net charge, and an α -helix structure when adsorbed onto membranes. Nonetheless, while Hs02 is a potent and broad-spectrum antimicrobial agent, it exhibits moderate selectivity towards eukaryotic cells. With the purpose of enhancing this IAP's selectivity, two generations of Hs02 analogs were synthesized, purified, and characterized. In one of these series, three shortened analogs were synthesized, followed by three others with point mutations at critical sites. The evaluation of their structures was carried out through Circular Dichroism spectroscopy, in the presence of large unilamellar vesicles (LUVs) with neutral and negative charges, as well as lipopolysaccharides (LPS). Furthermore, antimicrobial activities were tested against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and cytotoxicities were measured using MTT cell viability assays with BV-2 microglial cells as a model. The obtained results demonstrated a significant increase in the therapeutic index (TI) of all second-generation analogs against the tested Gram-negative bacteria, particularly in the case of 16.3. Regarding Gram-positive bacteria, the developed analogs exhibited a decrease in their TI, suggesting that the cell wall composition of these bacteria might hinder the passage of cationic antimicrobial peptides. Despite this reduction, 16.3 showed an almost 5-fold increase in the Therapeutic Index against *E. coli* and *P. aeruginosa*, attributed to reduced cytotoxicity and maintained antimicrobial activity compared to the original peptide. The findings of this study indicate that the balance between Hs02's cationicity and minimal hydrophobicity was optimized, significantly altering the TI of this MAP.

Key-words: Intragenic Antimicrobial Peptides; Selectivity improvement; Peptide Synthesis; Circular Dichroism.

1. Introdução teórica

1.1. Peptídeos antimicrobianos (AMPs)

A natureza é uma prolífica fonte de moléculas bioativas, como antibióticos, anti-inflamatórios, antioxidantes, entre outras. O crescente surgimento de bactérias multirresistentes a antibióticos (bactérias MDR) ameaça o combate a doenças causadas por esses agentes patogênicos e estimula a busca por novas moléculas antimicrobianas. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês *antimicrobial peptides*) estão amplamente distribuídos pela natureza e consistem em uma das primeiras linhas de defesa do sistema imune inato de inúmeros organismos¹.

Os AMPs podem ser encontrados nos mais variados organismos, desde os procariontes aos eucariontes, e mais de 5000 peptídeos dessa natureza foram identificados e/ou sintetizados até o momento². Essas moléculas podem variar de 10 a 50 resíduos de aminoácidos, e apresentar diversas estruturas secundárias, como α -hélices, folhas- β , *loops* e estruturas estendidas indefinidas³. Apesar da diversidade estrutural, a maioria dos AMPs apresenta algumas características em comum: a abundância de resíduos hidrofóbicos e cargas positivas em pH fisiológico, conferindo caráter anfifílico e catiônico⁴. No entanto, apesar dos AMPs serem frequentemente catiônicos, alguns peptídeos aniônicos também podem apresentar atividade antimicrobiana, como é o caso do Maximin-H5, molécula extraída da pele de um anfíbio⁵, e que apresenta atividade inibitória para bactérias Gram-positivas.

É sugerido que o primeiro AMP descoberto foi a Lisozima, em 1922, quando Alexander Fleming isolou uma solução bactericida do muco de pacientes resfriados⁶. Posteriormente, foram descobertos a Tirocidina e a Gramicidina, ambos obtidos da Tirotricina, um extrato de bacilos esporulados, solúvel em álcool e insolúvel em água⁷. Ambos os peptídeos apresentam ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, e apenas a Tirocidina contra Gram-negativas⁷. No entanto, apesar de atuar como bactericida, a Tirocidina apresenta alta toxicidade frente a células de tecido animal e seu uso intravenoso é contraindicado pois pode gerar necrose no fígado, leucocitose transiente e até morte⁸.

1.1.1. Diversidade de peptídeos antimicrobianos

A rica diversidade de peptídeos antimicrobianos dificulta sua classificação. Os principais grupos de AMPs podem ser definidos de acordo com suas fontes, atividades, características estruturais e riqueza de determinados resíduos de aminoácido⁹.

Peptídeos antimicrobianos já foram isolados das mais diversas fontes, desde microrganismos a insetos, mamíferos, anfíbios, animais aquáticos e plantas. Dentre as principais famílias de AMPs presentes em mamíferos, estão as Catelicidinas e as Defensinas, classes essenciais para o combate de patógenos pelo sistema imune inato¹. As Catelicidinas englobam uma série de moléculas que possuem em sua estrutura primária uma região semelhante à da proteína do porco, cathelin, um inibidor de cisteíno-protease, e possuem os mais variados tamanhos e estruturas secundárias¹⁰. Apenas uma catelicidina é expressa em humanos, o LL-37¹¹. Seu nome faz referência às duas leucinas que iniciam a sequência de 37 aminoácidos e sua síntese ocorre a partir da hidrólise *in vivo* da proteína de 18kDa, a hCAP-18¹². O LL-37 possui um amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo efetivo contra bactérias Gram-positivas e -negativas¹³, incluindo bactérias MDR, além de demonstrar atividade anti-biofilme¹⁴. Já as Defensinas são uma família de peptídeos catiônicos com uma estrutura secundária base de folha- β ¹⁵ com 3 ligações dissulfeto.

Em termos de atividade, são reportados AMPs antibacterianos, antifúngicos, antitumorais, antivirais, antiparasíticos, anti-HIV, anti-inflamatórios, entre outros^{9,16}. Cerca de 84% são bactericidas, com amplo espectro de atividade, inibindo o crescimento de bactérias de Gram-positivas e Gram-negativas. Já 5,8% possuem atividade antiviral, classe que ganhou ainda mais atenção devido a recente pandemia de COVID-19¹⁶. Muitos deles apresentam potente atividade contra uma grande variedade de vírus comuns, e atuam através da inibição da replicação, inibição da fusão da membrana viral, e destruição do envelope^{16,9,17}. Os ACPs, peptídeos com ação anticâncer, representam 7,7% da população desses peptídeos e são moléculas de grande interesse entre os AMPs. Com as características de indução de apoptose das células de câncer, inibição da angiogênese e modulação da expressão gênica, esses peptídeos são promissores candidatos a fármacos no combate aos diferentes tipos de câncer^{9,18}.

Peptídeos ricos em um determinado aminoácido como a Prolina, Arginina, Triptofano e Histidina, representam outra classificação importante dos AMPs. Os peptídeos apolares ricos em

Prolina tem como alvo o ribossomo e adentram a célula bacteriana através do transportador SbmA^{9,19,20}. Já os peptídeos ricos em Arginina e Triptofano apresentam caráter anfifílico e carga positiva, características essenciais para a ligação com a membrana carregada negativamente das bactérias^{9,21}.

1.1.2. Mecanismos de ação dos AMPs

Uma das principais características dos peptídeos antimicrobianos é sua capacidade de adsorção em membranas fosfolipídicas, especialmente aquelas que apresentam cargas negativas. Nos AMPs, a presença de carga líquida positiva, atribuída às lisinas e argininas, combinada com a hidrofobicidade de alguns resíduos da estrutura primária, possibilita a estruturação da molécula em estruturas anfipáticas, como α -hélices e folhas- β , com uma face hidrofóbica e outra hidrofílica²². O peptídeo pode então se inserir na bicamada lipídica que forma a membrana celular do patógeno, interagindo simultaneamente com a região externa, polar, e o interior apolar da bicamada²³. Uma vez inseridos na membrana dos patógenos, acredita-se que os AMPs possam agir por diversos mecanismos, desde a desestabilização da membrana^{23,24} até mecanismos intracelulares.

Em mecanismos de desestabilização da membrana, a agregação da molécula na bicamada lipídica passa então a aumentar até que atinja uma concentração crítica, causando a ampliação da curvatura positiva na região das cabeças dos fosfolipídios, e posterior formação de poros e/ou micelas²². No entanto, foi observado que na presença de fosfolipídios, como a fosfatidiletanolamina (PtdEtn), que possuem cabeças polares menores, a formação de poros em alguns peptídeos é impedida. Acredita-se que a reduzida cabeça polar do PtdEtn induza uma curvatura negativa na membrana, o que não permite a formação de poros²⁵. Outra hipótese é que a presença de uma amina primária na região polar do PtdEtn possa realizar ligações de hidrogênio com os oxigênios do grupo fosfato dos lipídios, exigindo maior energia para a inserção do peptídeo entre as cabeças fosfolipídicas e, conseqüentemente, dificultando a formação de poros. Essas duas hipóteses são plausíveis e sugerem que a interação entre os AMPs e as membranas é complexa e dependente das características específicas dos lipídios presentes²⁶. A figura 1 ilustra como as diferentes morfologias de fosfolipídeos alteram a curvatura da membrana.

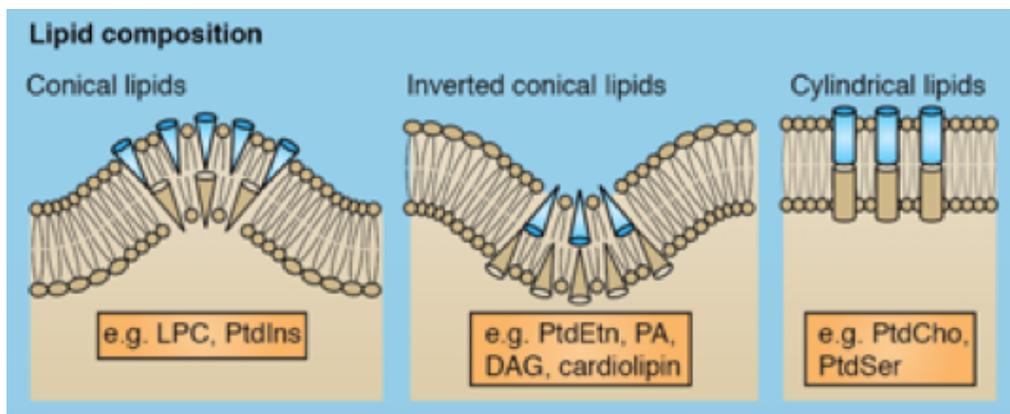


Figura 1: Diferentes morfologias de fosfolipídios e consequentes curvaturas geradas em bicamadas lipídicas. A figura ilustra como as membranas são afetadas por lipídeos que possuem morfologia cônica, cônica invertida e cilíndrica. Os fosfolipídeos com cabeça polar mais largas que as cadeias alquílicas (lisofosfatidilcolina (LPC) e os fosfatos fosfatidilinositol (PtdIns)) produzem uma curvatura positiva na membrana. Por outro lado, os que possuem essa característica invertida fosfatidiletanolamida (PtdEtn), ácido fosfático (PA), diacilglicerol (DAG) e cardiolipin) induzem uma curvatura negativa. Por fim, a imagem relaciona a presença de fosfatidilcolina e fosfatidilserina (PtdCho e PtdSer, na imagem) com a ausência de curvatura local na membrana. Figura retirada da referência 27.

A respeito da inserção na membrana, diversos modelos são propostos para explicar a desestabilização da bicamada causada pelos peptídeos antimicrobianos. No entanto, é importante destacar que há uma grande variedade de fatores que influenciam esses mecanismos, tais como a composição da estrutura primária do peptídeo, seu tamanho, a composição dos lipídeos presentes na membrana, a carga do peptídeo, sua hidrofobicidade, entre outros²⁷. Além disso, é provável que a atividade dos AMPs não ocorra de forma exclusiva por um único mecanismo, uma vez que diferentes composições de bicamadas lipídicas podem estimular diferentes mecanismos de inserção²⁸.

1.1.3. Relação estrutura-função

Peptídeos antimicrobianos podem se estruturar principalmente em α -hélices e folhas- β . As defensinas são boas representantes de AMPs com folhas- β nos humanos e mamíferos, e atuam a partir dos mesmos princípios que as hélices: presença de anfifilicidade em estruturas com faces hidrofílicas e hidrofóbicas, e cationicidade. As α -hélices consistem em estruturas secundárias

helicoidais, com uma média de 3,6 resíduos de aminoácidos por volta e cerca de 100 graus entre os aminoácidos²². A figura 2 apresenta os esquemas de uma α -hélice nas visões superiores e laterais.

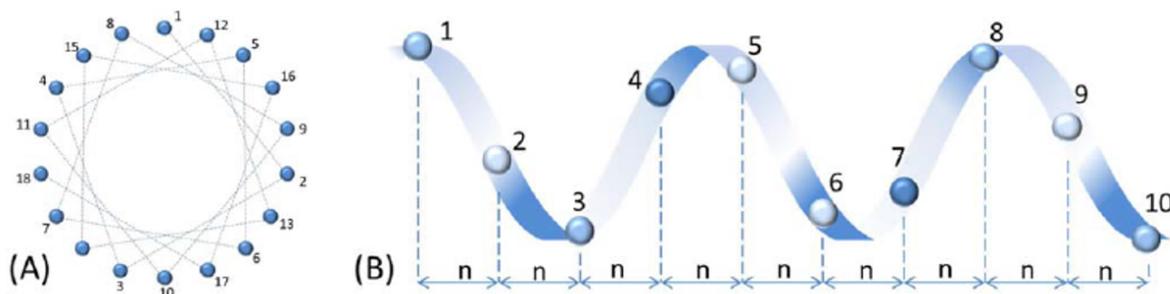


Figura 2: Representação de um AMP estruturado em α -hélice. Em (A) é representada uma roda helicoidal de uma hélice peptídica, também chamada de representação radial. O ângulo entre dois aminoácidos consecutivos é de cerca de 100 graus, e a distancia aproximada entre dois aminoácidos consecutivos é de $n = 0.15\text{nm}$ (B) Figura retirada e adaptada da referência 22²².

A periodicidade típica entre os resíduos hidrofóbicos e carregados positivamente na estrutura primária de peptídeos antimicrobianos é um dos fatores essenciais em moléculas membrano-ativas. Além disso, outros parâmetros físico-químicos exercem influência no enovelamento e na atividade antimicrobiana, como tamanho, hidrofobicidade global, carga, angulação da estrutura secundária, entre outros²⁹. A figura 3 traz a representação radial de uma hélice anfifílica e as frequências com que cada tipo de aminoácido está presente nas diferentes posições da estrutura primária e secundária.

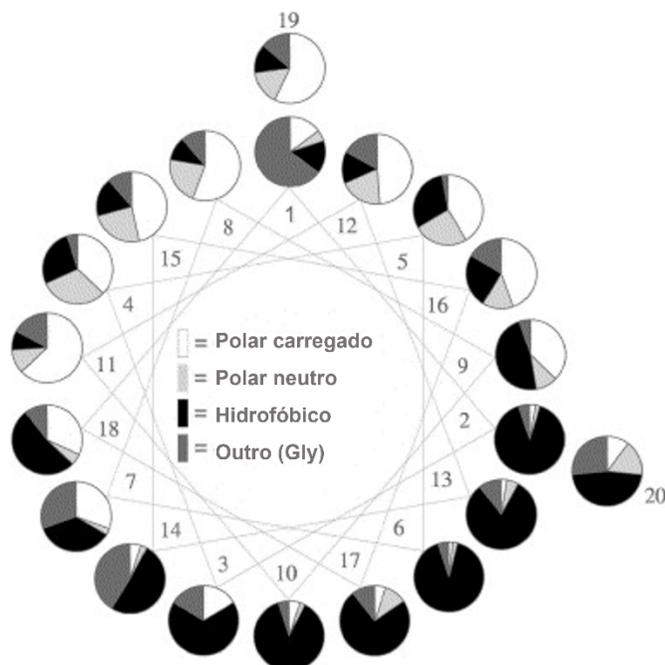


Figura 3: Representação das frequências de características dos aminoácidos em uma α -hélice anfifílica de AMP. Projeção radial de uma hélice peptídica em que cada posição apresenta o gráfico de frequência de aminoácidos e sua polaridade. Na parte superior é possível observar uma alta frequência de resíduos polares carregados e na parte inferior, alta frequência de resíduos hidrofóbicos. Figura retirada da referência 29²⁹.

O número de resíduos é também relevante para a formação de estruturas secundárias anfifílicas com ação em membranas. No APD³⁰, banco de dados de peptídeos antimicrobianos, há apenas 5 AMPs helicoidais com menos de 10 aminoácidos na estrutura primária, mas cerca de 52 com comprimento variando de 10 a 13 resíduos de aminoácidos. Ao comparar os MICs reportados para os peptídeos avaliados, as menores estruturas apresentam atividade em média 50% menor em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, comparado aos peptídeos maiores que 10 aminoácidos. Isso demonstra que o tamanho mínimo de 10 a 13 aminoácidos é característica importante para o enovelamento em α -hélice e conseqüentemente para os mecanismos antimicrobianos. Além da importância para os mecanismos, estudos mostraram que o número de resíduos de uma cadeia peptídica pode determinar a citotoxicidade do AMP, sendo um importante fator a se atentar no design de novos peptídeos com propriedades antimicrobianas e baixa citotoxicidade^{31,32}.

1.2. AMPs, citotoxicidade e seletividade na ação antimicrobiana.

Apesar de se apresentarem como potenciais candidatos ao desenvolvimento de novos antibióticos, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) frequentemente apresentam características que dificultam suas aplicações como fármacos, tais como a alta susceptibilidade a proteases, elevada toxicidade frente a células eucarióticas e altos custos de produção³³.

Uma forma de avaliar a relação entre a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade dos AMPs, é utilizando o índice terapêutico (TI), que consiste na razão entre a mínima concentração tóxica às células eucarióticas e a concentração mínima em que o peptídeo apresenta atividade microbicida (MIC)³⁴. No entanto, a falta de uniformidade na determinação das concentrações tóxicas mínimas utilizadas para avaliar a citotoxicidade de um peptídeo dificulta a comparação dos valores encontrados na literatura²⁶. Além disso, estudos revisados por Bobone e Stella²⁶ também apontam que os MICs variam de acordo com as diferentes cepas utilizadas nos testes, o que torna ainda mais complexa a comparação e determinação dos fatores que afetam a seletividade dos AMPs.

Um dos obstáculos associados à utilização dos AMPs como fármacos reside na citotoxicidade significativa apresentada por certos peptídeos dessa classe. É sugerido que os mecanismos de desestabilização de membrana, que são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana dessas substâncias, possam também estar relacionados com a lise de células eucarióticas³⁵. Entretanto, testes de atividade antimicrobiana realizados em culturas que contêm tanto bactérias quanto células eucarióticas indicam que, apesar da alta citotoxicidade observada em tais moléculas, ainda existe uma preferência por membranas dos patógenos.³⁶ Devido a essa propriedade, vários estudos têm explorado o uso de AMPs como carreadores de moléculas marcadoras para infecções bacterianas em modelos *in vitro* e *in vivo*, incluindo experimentos com camundongos e até seres humanos. Um exemplo notável é o trabalho de Aktar et al³⁷, no qual o peptídeo UBI 29-41 foi marcado com ^{99m}Tc, um isótopo metaestável do Tecnécio, para ser utilizado como marcador de infecção bacteriana. Com sucesso, os pesquisadores conseguiram identificar a presença de infecção em um paciente por meio de tomografia. A figura 4 apresenta as imagens produzidas pelo trabalho de Aktar et al³⁷.

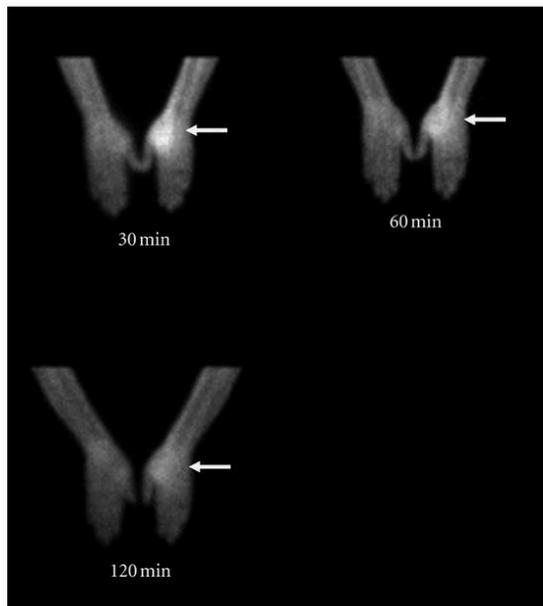


Figura 4: Tomografia de um paciente com infecção bacteriana em uma das mãos, submetido ao tratamento com o peptídeo UBI 29-41-^{99m}Tc. As tomografias foram realizadas por meio de câmeras-gama que detectam a radiação gama emitida pelo radioisótopo ^{99m}Tc complexado com o peptídeo. Na imagem, é possível visualizar a região afetada pela infecção bacteriana, bem como a diminuição progressiva das emissões de radiação ao longo do tempo. Figura retirada da referência 37³⁷.

As bactérias podem ser divididas em dois grupos principais: Gram-positivas e Gram-negativas, baseado no protocolo de coloração de Gram, uma técnica utilizada para visualização de microrganismos em microscópios ópticos. As bactérias Gram-positivas exibem uma coloração roxa devido à presença de uma camada espessa de peptidoglicanos (20-80 nm) que retém o corante utilizado na técnica³⁸. Por outro lado, as bactérias Gram-negativas possuem uma camada interna, mais fina de peptidoglicanos (~8nm)³⁹, o que impossibilita a retenção do corante. A composição das membranas de ambos os grupos bacterianos é heterogênea, mas ambas contêm uma alta proporção de fosfolipídios carregados negativamente, como o fosfatidilglicerol (PG) e a cardiolipina (CL), além dos lipopolissacarídeos nas bactérias Gram-negativas³⁹. Além disso, ambas as classes também apresentam fosfolipídios zwitteriônicos, como a fosfatidiletanolamina (PE).

Em contraste, as células eucarióticas possuem uma membrana plasmática composta por uma bicamada de fosfolipídios, com a presença de colesterol. Ao contrário das bactérias, as

membranas das células eucarióticas possuem poucos fosfolipídios carregados negativamente na superfície externa, sendo composta principalmente por fosfolipídios neutros, como a fosfatidilcolina (PC), esfingomiéline (SM), e fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) na monocamada interna. A figura 5 contém representações simplificadas das composições das membranas das bactérias Gram-negativas, -positivas e células humanas.

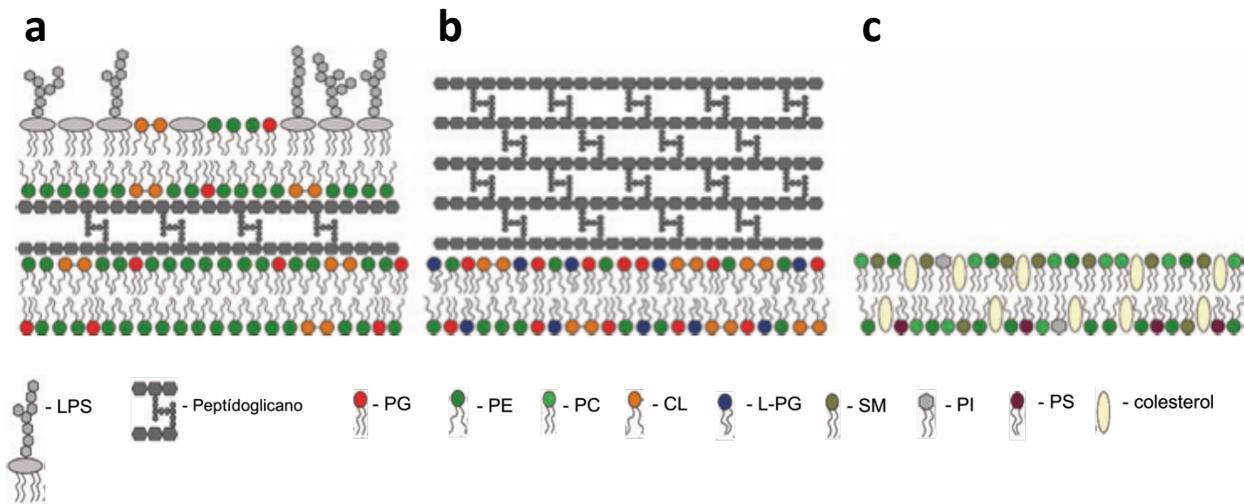


Figura 5: Representação das membranas de células de a) bactérias Gram-negativas, b) Gram-positivas e c) humanas. As abreviações utilizadas significam: LPS – Lipopolissacarídeo; PG – fosfatidilglicerol; PE – fosfatidiletanolamina; PC – fosfatidilcolina; CL – cardiolipin; L-PG – L-lisil fosfatidilglicerol; SM – esfingomiéline; PI – fosfatidilinositol; PS – fosfatidilserina. Figura retirada e adaptada da referência 26²⁶.

Conforme mencionado anteriormente, a principal diferença na composição das membranas celulares humanas e bacterianas é a presença de fosfolipídios negativos e lipopolissacarídeos nas bactérias. Como resultado, os peptídeos antimicrobianos catiônicos apresentam interações eletrostáticas preferenciais com membranas bacterianas em relação às membranas eucarióticas, explicando a seletividade observada por essas moléculas.

Outro aspecto relevante é o empacotamento das membranas eucarióticas, que é mais denso devido à presença de uma maior proporção de fosfolipídios com morfologia cilíndrica⁴⁰. Por outro lado, nas bactérias, o empacotamento é mais caótico e com diferentes morfologias²⁶. É proposto que a presença de colesterol na membrana de células eucarióticas promove o empacotamento e organização das porções alquílicas dos fosfolipídios, aumentando a rigidez da membrana e a

deixando menos suscetível a mudanças de curvatura. Esse fato pode sugerir que os peptídeos antimicrobianos tenham maior facilidade em se inserir em membranas mais caóticas, como a das bactérias, uma vez que a estrutura desorganizada pode facilitar tal inserção.

1.3. Lipopolissacarídeos bacterianos e seu estímulo ao processo inflamatório

As bactérias Gram-negativas possuem a parte externa de sua parede celular constituída de aproximadamente 90% de lipopolissacarídeo (LPS). Nas camadas mais internas a composição varia entre fosfolipídios e peptidoglicanos³⁹. Assim como os AMPs, o LPS possui caráter anfifílico, com porções hidrofílicas variadas, compostas por polissacarídeos (Núcleo e porção externa), e uma região hidrofóbica, denominada de Lipídeo A, predominantemente conservada nas bactérias Gram-negativas³⁹. Além de manter a integridade estrutural da membrana bacteriana, o LPS representa uma barreira protetora contra agentes nocivos, utilizando sua porção polissacarídica como um escudo hidrofílico contra substâncias hidrofóbicas³⁹. A Figura 6 representa a estrutura do lipopolissacarídeo bacteriano⁴¹:

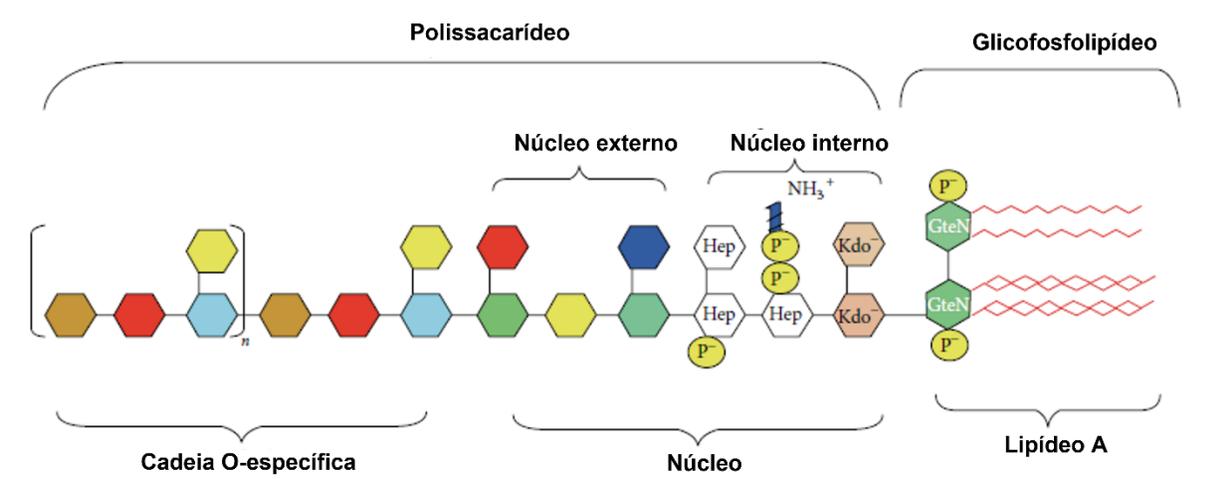


Figura 6: Esquema estrutural do Lipopolissacarídeo (LPS) constituinte das membranas de bactérias Gram-negativas. As siglas utilizadas na figura são: Hep, *L*-glicero-*D*-manno-heptose; P, fosfato; Kdo, ácido 2-ceto-3-desoxi-octulosônico; e GlcN, *D*-glucosamina. Retirada da referência 41⁴¹.

Ainda que a membrana bacteriana seja a interface entre o microrganismo e o meio, a atividade do LPS não é somente estrutural. O lipopolissacarídeo é capaz de gerar resposta imune em um hospedeiro mesmo dissociado da membrana, ao se ligar às Proteínas Ligantes a LPS (LBP, do inglês *LPS Binding Protein*), responsáveis pela transferência do lipopolissacarídeo ao receptor

primário da glicoproteína de membrana CD14. A ativação de macrófagos ou neutrófilos pelo complexo LBP-CD14 se dá mediante interação com o receptor *Toll-like* 4 (TLR4), iniciando um processo que desencadeia a produção de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α ⁴², que aumentam a atividade fagocitária⁴³. É importante ressaltar, no entanto, que a transferência ao TLR4 mediada pelo CD14 não é condição *sine qua non* para a ativação da via inflamatória, mas sim uma potencializadora do processo⁴⁴. Tal acréscimo em atividade é importante para o início da cascata inflamatória local, quando controlada. Contudo, a presença de bactérias na corrente sanguínea ativa fagócitos descontroladamente e inicia uma alta produção de tais citocinas, levando a ocorrência de choque séptico, com falha sistêmica de órgãos e possivelmente morte⁴⁵.

O uso de antibióticos leva, muitas vezes, ao controle das bactérias nocivas ao hospedeiro, mas a morte do patógeno pode não representar o fim da patogenicidade bacteriana. A alta liberação de LPS desencadeada pela morte das bactérias continua ativando a cascata inflamatória nos macrófagos e desencadeando, potencialmente, sepse⁴⁴. Portanto, é evidente a necessidade de agentes antimicrobianos que além de atuar como microbicidas, atuem também no controle inflamatório posterior a morte bacteriana.

1.4. Peptídeos com ação antimicrobiana e ação anti-inflamatória

Além da vasta atividade antimicrobiana característica dos AMPs, algumas sequências peptídicas também apresentam potentes atividades de controle inflamatório através de mecanismos que são pouco conhecidos. Diversos trabalhos já demonstraram a habilidade de peptídeos catiônicos naturais e sintéticos de bloquear a liberação de citocinas induzidas pela ativação de macrófagos por LPS^{46,47}. O fato de ambos, os AMPs e o LPS, serem anfífilos sugere que os mecanismos envolvidos na inibição da inflamação, por esses peptídeos, não são específicos³⁹. Alguns dos mecanismos propostos para a atividade anti-inflamatória estão apresentados na figura 7.

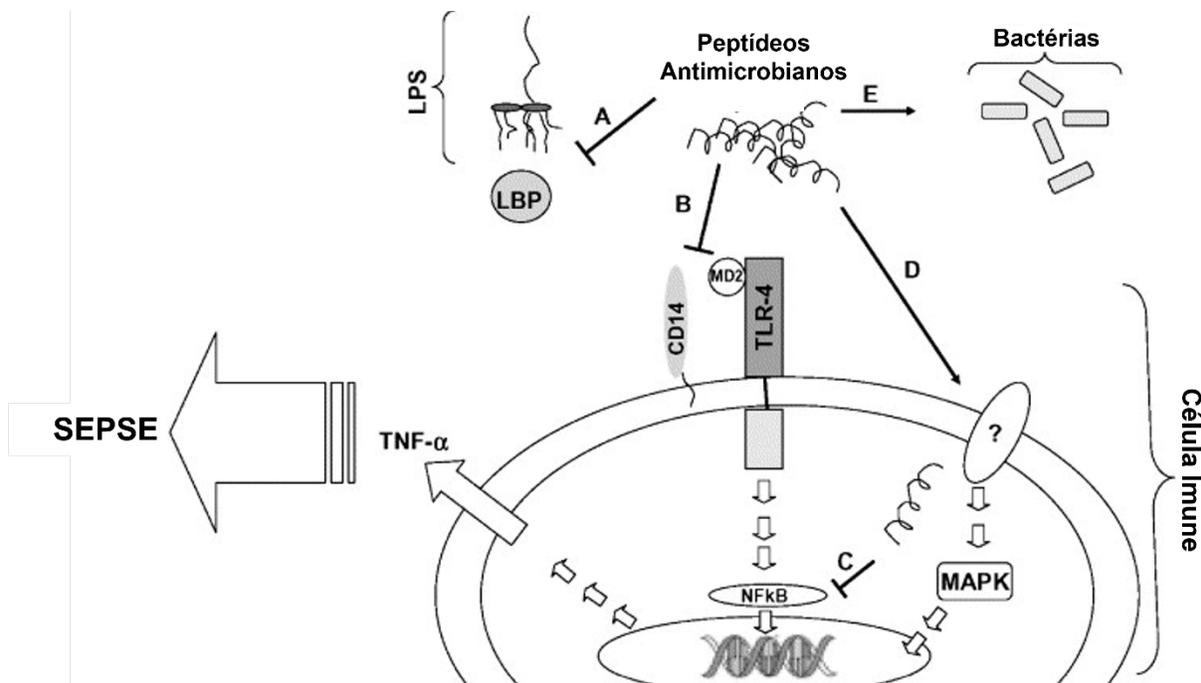


Figura 7: Principais mecanismos propostos para a ação anti-inflamatória dos AMPs. Os AMPs podem agir através da (A) ligação com o LPS, tornando-o indisponível para a transferência a proteína ligante a LPS, LBP; (B) competição com o LPS pelo sítio de ligação dos receptores TLR; (C) inibição do fator nuclear NF- κ B e consequente inibição da expressão de diversos genes inflamatórios; (D) alterando a expressão desses genes através da ativação da via MAPK; e (E) desestabilização da membrana e consequente lise das células bacterianas. Figura retirada e adaptada da referência 48⁴⁸.

Com o objetivo de elucidar o mecanismo anti-inflamatório dos peptídeos catiônicos, Buurman *et al* avaliaram a ligação do LPS a proteínas LBP immobilizadas em placas de ELISA. Paralelamente foram realizados ensaios de liberação de TNF- α induzida por LPS, com macrófagos murinos, e os resultados foram correlacionados. Dos peptídeos testados, o CP29 (KWKSFIKKLTTAVKKVLTGLPALIS), com estrutura secundária em α -hélice, apresentou tanto inibição da liberação de TNF- α , quanto a inibição da ligação do LPS a LBP⁴⁹. Além desse, outro peptídeo, o Bac-2A-NH₂ (RLARIVVIRVAR-NH₂), com estrutura secundária linear, também apresentou atividade de inibição em ambos os ensaios, e corrobora com a hipótese de que a atividade anti-inflamatória ocorre, majoritariamente, a partir do impedimento da ligação do lipopolissacarídeo bacteriano à proteína LBP dos macrófagos^{39, 49}. Finalmente, o pesquisador

conclui que há uma relação quantitativa entre a inibição da transferência de LPS a LPB e a inibição de inflamação, e de que esse é o mecanismo ação desses peptídeos.

A alta afinidade dos AMPs por membranas carregadas negativamente é decorrência direta de sua hidrofobicidade limítrofe, cationicidade e anfifilicidade. Mesmo os mecanismos de ação dos AMPs variando entre extra e intracelular, a boa interação com as membranas é condição essencial para a inserção da molécula no patógeno. Nas bactérias Gram-negativas, o LPS representa um recurso estrutural de grande importância, constituindo a membrana externa e, através de sua porção sacarídica, protegendo o patógeno de ameaças hidrofóbicas externas. Além disso, indícios apontam que a modificação do LPS por meio de expressão gênica bacteriana seja responsável por gerar resistência a alguns AMPs³⁹. Assim, é evidente que para a ação antimicrobiana do peptídeo ser eficiente, ele deve se ligar diretamente ao LPS da membrana, mesmo que sua atividade dependa de alvos intracelulares, impedindo que o lipopolissarídeo induza resposta inflamatória. A anfifilicidade desses peptídeos e do LPS sugere que a interação entre os dois seja principal motivo que torna os AMPs peptídeos anti-inflamatórios.

Os chamados *Host defense peptides* (HDPs) são um dos responsáveis pelas primeiras linhas de defesa do sistema imune inato contra infecções e invasores, como bactérias, vírus, fungos, entre outros. Acredita-se que tais peptídeos atuem como agentes antimicrobianos de ação direta e indireta, orquestrando uma resposta imune complexa a infecção e presença do patógeno⁵⁰. As diferenças nos MICs *in vitro* e *in vivo* dos HDPs demonstram que a sinergia entre as moléculas expressadas pelo sistema imune é essencial para a eficiência desses peptídeos⁵⁰. Por exemplo, o LL-37 apresenta um MIC de 2µg/ml *in vivo* contra *E. coli*, valor 16 vezes inferior ao MIC *in vitro* de 32 µg/ml, evidência do complexo arranjo produzido pelo sistema imune. Portanto, essas e outras evidências apontam para a ideia de que os HDPs funcionam como potentes imunomoduladores, promovendo cicatrização, expressão de genes e citocinas pró- e anti-inflamatórias, estimulando células T ou dendríticas, entre outros⁵⁰.

Assim, é natural concluir que além das semelhanças em anfifilicidade entre AMPs e LPS, a capacidade de orquestrar uma resposta imune complexa *in vivo*, é essencial para a modulação da inflamação e está diretamente ligada com os mecanismos dessas moléculas. Isso confere aos AMPs uma atuação que não se limita a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória direta.

1.5. Peptídeos intragênicos antimicrobianos (IAPs)

Na busca por novos peptídeos bioativos, algumas estratégias de prospecção foram desenvolvidas como forma de obter *insights* acerca de estruturas químicas biologicamente ativas. Dentre esses *insights* está a ideia de reconhecer padrões físico-químicos em cadeias polipeptídicas de forma a encontrar peptídeos encriptados como parte de uma sequência proteica maior^{51,52}. Tal abstração se fundamenta em proteínas parentais que geram sequências menores a partir da clivagem da estrutura primária inicial, como é o caso da única Catelicidina humana, de 37 resíduos, LL-37, que é produzida a partir da hidrólise *in vivo* da proteína de 18kDa, hCAP-18¹².

Outra estratégia engenhosa é a identificação de porções peptídicas responsáveis pela ligação à bicamada lipídica de uma proteína de membrana da bactéria, com o objetivo de produzir peptídeos passíveis de adsorção, e possível desestabilização da membrana, e ao mesmo tempo resistentes a hidrólise pelas enzimas da bactéria. Saikia, K. et al, demonstrou que o isolamento dos 9 últimos resíduos do C-terminal amidado da proteína de membrana MreB da *E. coli*, possui potente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, -positivas e fungos⁵³.

Empregando esse esforço de reconhecimento de padrões, e inspirados pela atuação dos HDPs, Brand et al^{51,52} buscaram a identificação de AMPs Intragênicos (IAPs) a partir de proteínas humanas, chamando-as de Hs IAPs (Peptídeos Antimicrobianos Intragênicos de *Homo sapiens*). O conceito de peptídeos Intragênicos está intimamente ligado ao de peptídeos encriptados. Apesar de IAPs também derivarem de sequências proteicas maiores, o fato de não sofrerem hidrólise ou processamento *in vivo* difere essa categoria dos peptídeos encriptados^{54,55}.

1.5.1. Conceito geral

A prospecção de peptídeos antimicrobianos intragênicos (IAPs) em bancos de dados de proteínas através da identificação de padrões físico-químicos em segmentos protéicos encriptados em proteínas parentais, possibilitou a descoberta de uma série de moléculas bioativas com diversas atividades e mecanismos de ação. Os Hs IAPs foram identificados anteriormente por nosso grupo de pesquisa utilizando o software Kamal, sendo posteriormente sintetizados e testados quanto a suas atividades antimicrobiana e anti-inflamatória⁵².

Os resultados para os 4 primeiros peptídeos identificados e sintetizados (Hs01, Hs02, Hs03 e Hs04) a partir do proteoma humano foram promissores e demonstraram ampla atividade

antimicrobiana contra patógenos que afetam comumente os humanos. Dentre os 4, o peptídeo Hs02 apresentou ótimos resultados, com ampla atividade antimicrobiana e foi levado a diante para análise estrutural e atividade anti-inflamatória. Análises de dicroísmo circular (CD) com titulação de vesículas de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 demonstraram a estruturação em α -hélice, assim como a análise de RMN com micelas deuteradas DPC-d₃₈⁵². A Figura 8 apresenta os resultados das análises de RMN:

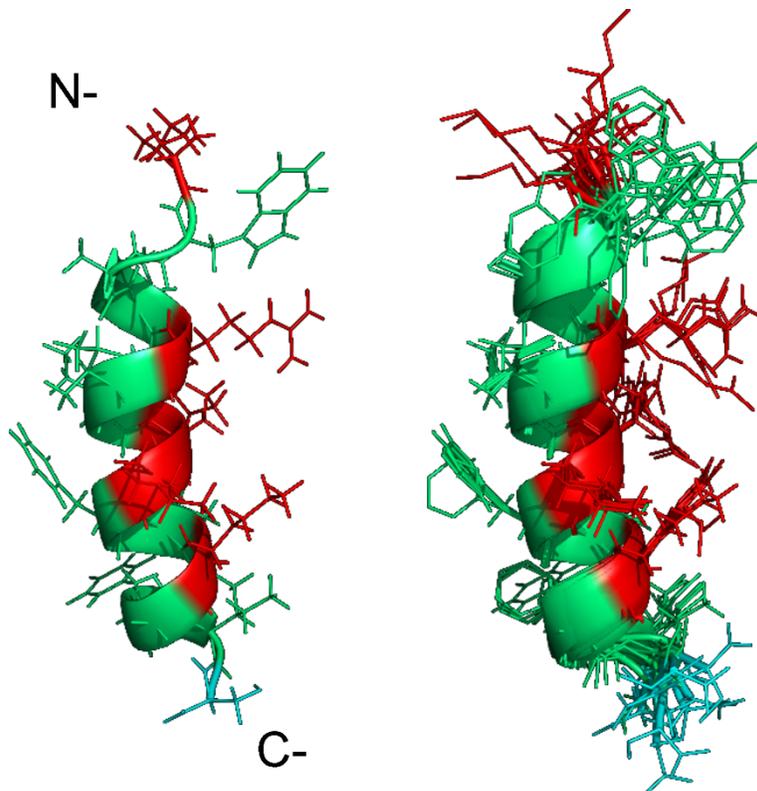


Figura 8: Estrutura do Hs02 obtida através de análises de Ressonância Magnética Nuclear em vesículas DPC-d₃₈. A imagem da esquerda apresenta a estrutura de menor energia do Hs02 em fita, e a da direita, a sobreposição das 10 estruturas de menor energia, ambas obtidas na presença micelas de DPC-d₃₈. A região em verde da hélice representa a face hidrofóbica enquanto a vermelha, a face com resíduos carregados positivamente. A região em azul representa os resíduos polares. Figura retirada e adaptada da referência 61.

1.5.2. Hs02, antimicrobiano e anti-inflamatório

Com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana dos Hs IAPs, ensaios de determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) foram realizados com uma ampla variedade de

microrganismos, entre eles, *C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *P. aeruginosa*⁵². Como controle, dois peptídeos de anfíbios foram utilizados como referência, assim como agente antifúngico e antibiótico comerciais. Os IAPs Hs02 e Hs04 apresentaram valores de MIC semelhantes aos peptídeos controle, mas apenas o Hs02 demonstrou atividade contra a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*.

Além da avaliação estrutural e antimicrobiana, o peptídeo Hs02 foi submetido a testes de atividade anti-inflamatória a partir da avaliação da liberação do fator necrótico tumoral α , TNF- α , em macrófagos peritoneais de camundongos. O tratamento das células com o lipopolissacarídeo bacteriano induziu expressiva produção de TNF- α , e o tratamento dessas células com Hs02 apresentou supressão da produção do fator necrótico mesmo na menor concentração testada, de $0,1\mu\text{M}$ ⁵².

1.5.3. Análogos de Hs02 e sua atividade antimicrobiana

Em outro esforço anterior⁵⁶, nosso grupo de pesquisa buscou avaliar a estrutura primária do Hs02 de modo a produzir análogos a fim de entender a importância de cada terminação da sequência. Três análogos foram sintetizados e tiveram suas atividades antimicrobianas testadas contra uma variedade de micro-organismos (Tabela 1). Cada análogo teve 3 resíduos retirados de cada ponta (13.1, -3 resíduos no N-terminal; 13.2, -3 resíduos no C-terminal; e 10.0, -3 resíduos em ambas as pontas). A retirada de três resíduos em cada análogo está relacionada à redução das α -hélices em, aproximadamente, uma volta. A tabela 1 apresenta as estruturas primárias do Hs02 e os 3 análogos.

TABELA 1: Estruturas primárias do Hs02 e seus 3 análogos.

| Peptídeo | Sequência | Massa monoisotópica (Da) |
|-------------|------------------------------------|--------------------------|
| Hs02 | KWAVRIIRKFIKGFIS - NH ₂ | 1960.214 |
| 13.1 | VRIIRKFIKGFIS - NH ₂ | 1575.003 |
| 13.2 | KWAVRIIRKFIKG - NH ₂ | 1613.030 |
| 10.0 | VRIIRKFIKG - NH ₂ | 1227.818 |

A fim de avaliar as diferenças nas atividades antimicrobianas do Hs02 e os análogos, 3 bactérias e duas leveduras foram utilizadas para determinação de seus MICs. A tabela 2 apresenta os resultados desses ensaios.

Tabela 2: Média dos MICs do Hs02 e seus 3 análogos contra 3 bactérias:

| Peptídeo | Concentrações Inibitórias Mínimas (μM) | | | | |
|-------------|---|----------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. neoformans</i> |
| Hs02 | 1 | 2 | 1.67 | 8 | 1 |
| 13.1 | 64 | 16 | 21.33 | >128 | 32 |
| 13.2 | 32 | 16 | 16 | 128 | 8 |
| 10.0 | >128 | >128 | >128 | >128 | >128 |

Em todos os ensaios de MIC, a atividade do Hs02 foi de, no mínimo, 8 a 64 vezes superior à de seus análogos, o que sugere uma dependência estrutural para a atividade antimicrobiana. Os resultados levantam a hipótese de que a atividade antimicrobiana do Hs02 está correlacionada com o seu tamanho, já que todos os análogos apresentaram aumento nos valores de MIC. Dessa forma, a análise da estrutura secundária desses peptídeos poderá esclarecer se os mecanismos de ação do Hs02 se baseiam ou não em sua estrutura helicoidal⁶⁶

1.6. Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS) de AMPs.

O interesse na utilização dos peptídeos nas mais diversas áreas de pesquisa fomentou o desenvolvimento de métodos de obtenção dessas moléculas que não necessitassem da extração natural e que possibilitassem o desenvolvimento de estruturas inéditas⁵⁷. Entre esses métodos estão desde a síntese química em solução até a utilização de modificações genéticas em bactérias e outros microrganismos para a síntese biológica dessas moléculas⁵⁸. No entanto, o desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos representa uma dificuldade para essa última linha de métodos devido a sua ação microbicida. Desse modo, o avanço no uso dos peptídeos como potenciais fármacos está diretamente relacionado ao desenvolvimento de metodologias de síntese química adequadas.

A primeira síntese química de peptídeo relatada foi responsável por criar o termo 'peptídeo' e produziu um dipeptídeo de glicina⁵⁹. Essa metodologia utilizava haletos de acila dos aminoácidos desejados para formar as ligações peptídicas. A segunda metodologia relatada⁶⁰ para a síntese de dipeptídeos, moléculas formadas por dois aminoácidos, empregava grupos de proteção reversíveis na amina do aminoácido, além da ativação do C-terminal para a adição de apenas um aminoácido, seguida pela remoção do grupo de proteção. Somente em 1953, a síntese de um polipeptídeo⁶¹, o

octapeptídeo oxitocina, foi obtida através de várias etapas de acoplamento e purificação de cadeias peptídicas menores, em processos de síntese em solução. Apesar da possibilidade de obtenção por essas metodologias, o extenso processo de isolamento e purificação dos intermediários necessários dificultava a produção em série desses produtos.

Em 1963, utilizando o conceito de proteger a amina dos aminoácidos para evitar polimerizações indesejadas, uma nova metodologia é reportada por Merrifield⁶². A denominada síntese de peptídeos em fase sólida introduziu a utilização de um suporte polimérico, sólido insolúvel, para os acoplamentos dos aminoácidos presentes em uma fase líquida, com as respectivas aminas e cadeias laterais protegidas. Os peptídeos são sintetizados ligados a fase sólida, que funciona como uma âncora e o impede a passagem do produto pelo filtro presente no recipiente reacional, permitindo a adição e lavagem dos solventes e soluções contendo os reagentes de interesse. Após cada etapa, a mistura reacional pode ser filtrada e o peptídeo acoplado à fase sólida, lavados, para retirar-se qualquer resquício indesejado de reagente.

Para impedir a adição de múltiplos aminoácidos iguais ao peptídeo na mesma reação de acoplamento, utiliza-se, atualmente, grupos de proteção na amina do aminoácido, como o 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) e o t-butoxicarbonil (Boc). Esses grupos impedem a polimerização descontrolada da cadeia peptídica por diminuírem a basicidade do nitrogênio do aminoácido, indisponibilizando seu par não ligante⁶³. Tais grupos podem ser retirados em condições brandas pela reação com 4-metilpiperidina e ácido trifluoracético (TFA), respectivamente. Desse modo, a síntese ocorre a partir de reações alternadas entre a desproteção do resíduo anterior e consecutivo acoplamento do aminoácido seguinte. As seções a seguir apresentam as principais etapas presentes na SPFS no chamado método Fmoc/tBu.

1.6.1. Resinas e *linkers*

Um dos pontos cruciais da SPFS é a escolha da resina utilizada como fase sólida. Existem diversas resinas disponíveis comercialmente, e suas diferenças estão no linker, que é a molécula responsável por ligar o peptídeo ao polímero utilizado. Na figura 9, estão apresentados alguns dos linkers disponíveis comercialmente.

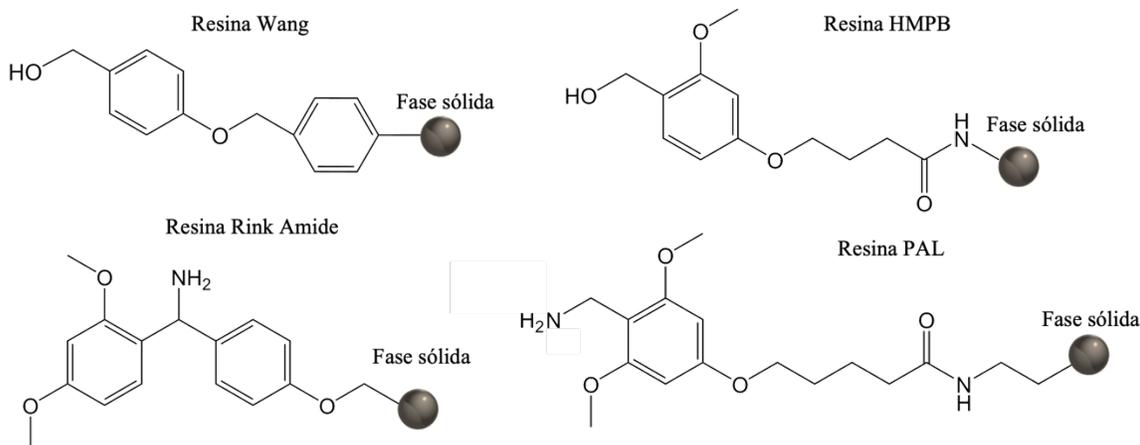


Figura 9: Quatro resinas comercialmente disponíveis para a Síntese de Peptídeos em fase Sólida.

A seleção adequada do *linker* é decisiva em uma síntese, pois determina as condições utilizadas durante os acoplamentos e a clivagem, bem como a característica do C-terminal após a clivagem. *Linkers*, como o presente na resina de Wang e 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenox)butiril (HMPB), possuem hidroxilas que atuam como nucleófilos e promovem a esterificação do primeiro aminoácido acoplado. Por outro lado, as resinas Rink Amide e 5-(4-N-aminometil-3,5-dimetoxifenox)valeril (PAL) possuem aminas primárias que reagem com a carbonila do primeiro aminoácido, formando uma amida. Conseqüentemente, após a clivagem, esses dois tipos de resina resultam em peptídeos com C-terminal ácido e amidado, respectivamente.

1.6.2. Grupos de proteção

A Síntese de Peptídeos em Fase Sólida é baseada no acoplamento sequencial de aminoácidos em uma matriz polimérica insolúvel. Para evitar a polimerização descontrolada dos aminoácidos durante a etapa de acoplamento, são adicionados grupos protetores, como o 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc) e o t-butoxicarbonil (Boc), ao grupo amino ($-NH_2$) do resíduo selecionado. Embora o uso do grupo protetor Boc tenha sido pioneiro na SPFS, ele requer uma dinâmica de acidez gradual para a desproteção e clivagem do peptídeo, o que representa o uso frequente de ácidos como TFA e HF⁵⁷. Por outro lado, a química do Fmoc é mais suave em comparação com a do Boc, o que resultou em avanços nos rendimentos das sínteses dos peptídeos⁶⁴. Além disso, a remoção do grupo Fmoc é realizada com o uso de bases, como a 4-

metilpiperidina, o que confere uma característica ortogonal em relação à clivagem do peptídeo, que é realizada em condições ácidas.

O mecanismo proposto para a retirada do grupo protetor Fmoc envolve a remoção do hidrogênio do carbono sp^3 terciário do Fmoc pela 4-metilpiperidina, resultando na formação de uma base conjugada estabilizada por ressonância e a aromaticidade do sistema. Em seguida, ocorre a formação de um alceno, que provoca a eliminação de CO_2 e a desproteção do grupo $-NH_2$ do último aminoácido acoplado, que é comercializado já protegido pelo Fmoc. A figura 10 ilustra o mecanismo proposto para a retirada do grupo de proteção Fmoc durante a etapa de desproteção.

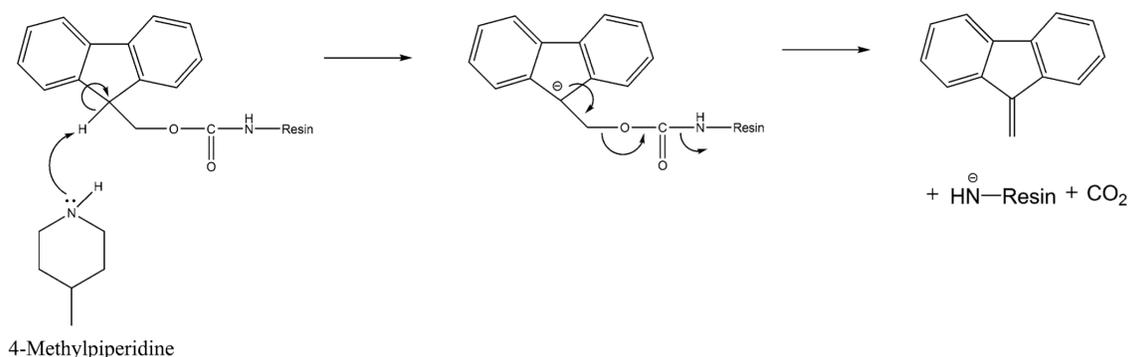


Figura 10: Mecanismo de desproteção do nitrogênio do aminoácido pela 4-metilpiperidina. Figura retirada da referência 49⁴⁹.

Além da importância dos grupos protetores na eficácia da SPFS, a diversidade de cadeias laterais dos aminoácidos utilizados nas sínteses demanda uma igual diversidade de grupos de proteção que evitem reações indesejadas durante os acoplamentos. Dentre esses grupos estão o tritil (Trt) para os aminoácidos Asn, Cys, Gln, His; terc-butila (t-Bu) para Asp, Glu, Ser, Thr e Tyr; Boc para Lys e Trp; e o pentametil-2,3-dihidrobenzofuran-5-sulfonila (Pbf) para a Arg.

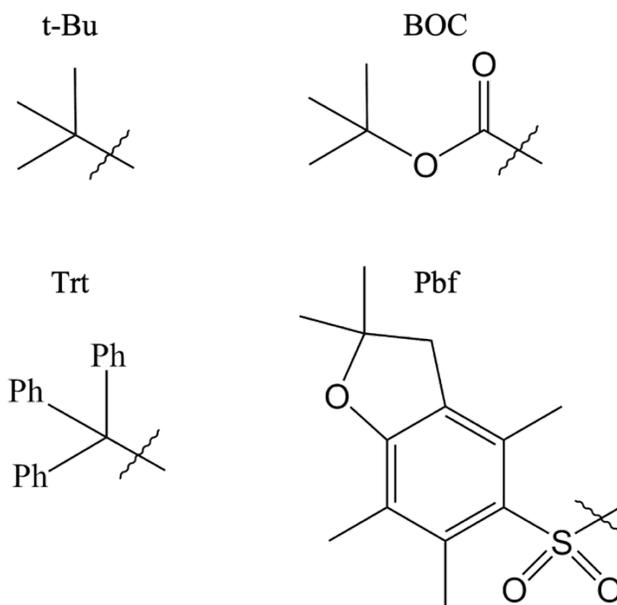


Figura 11: Grupos de Proteção de nucleófilos das cadeias laterais de aminoácidos comumente utilizados na SPFS.

1.6.3. Acoplamento

Após a etapa de desproteção do N-terminal do último aminoácido adicionado ser bem-sucedida, inicia-se a etapa de acoplamento do próximo resíduo da estrutura primária. Os acoplamentos são realizados através de reações de ativação da carbonila do aminoácido a ser acoplado, aumentando sua eletrofilicidade e o tornando suscetível a receber um ataque nucleofílico do nitrogênio recém desprotegido. Para ampliar a reatividade da carbonila, diversos reagentes podem ser utilizados, e a escolha depende das características desejadas para o produto da síntese. A figura 12 contém alguns desses reagentes de acoplamentos utilizados na SPFS.

As etapas iniciais envolvem a geração de ésteres ativados, utilizando os reagentes de acoplamento mencionados, para facilitar a formação da ligação peptídica através do ataque nucleofílico do nitrogênio no N-terminal. Como ilustração, o mecanismo proposto para o acoplamento com DIC e Oxima® está apresentado na Figura 13, evidenciando a dinâmica de criação desses ésteres para favorecer o acoplamento.

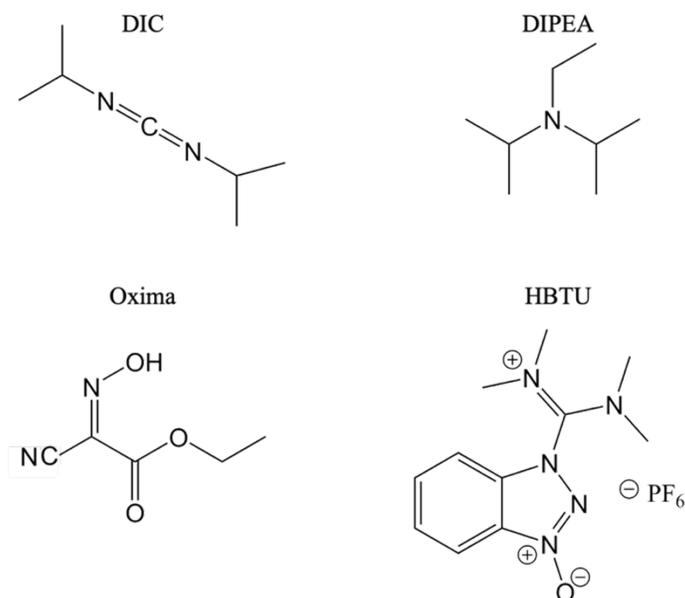


Figura 12: Reagentes ativadores de carbonila comumente utilizados na SPFS.

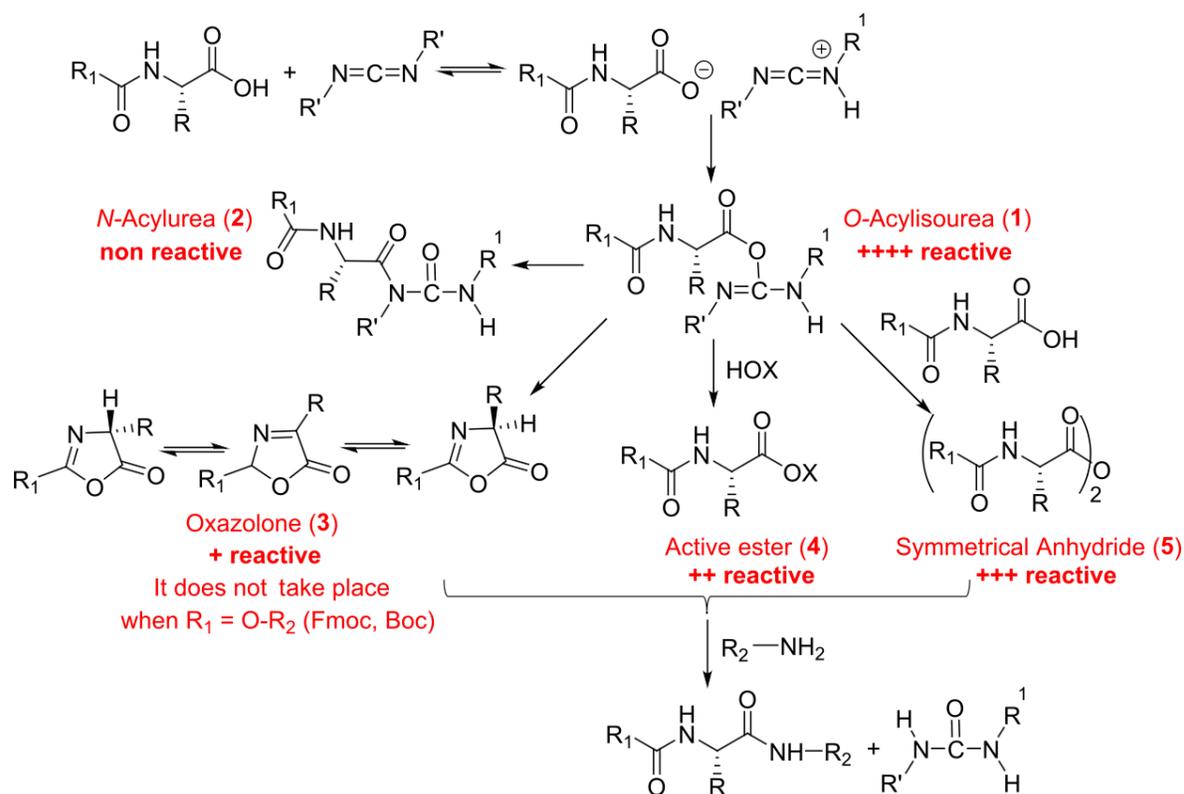


Figura 13: Mecanismo de ativação da carbonila pelos reagentes de acoplamento DIC e Oxima®. Figura retirada da referência 65⁶⁵.

1.6.4. Teste de Kaiser

Para maximizar o rendimento da síntese, é fundamental monitorar todas as etapas do processo. A ineficiência na desproteção, por exemplo, reduz o rendimento geral da síntese, pois impede que algumas cadeias em construção realizem o acoplamento do aminoácido desejado na posição correta. Da mesma forma, acoplamentos com baixo rendimento diminuem a quantidade final de peptídeos com a estrutura primária desejada.

Para avaliar a ocorrência dessas reações, utiliza-se um teste colorimétrico conhecido como teste de Kaiser, que permite avaliar o sucesso tanto da desproteção quanto do acoplamento. Nesse teste, ocorre a reação entre a ninhidrina e a amina presente no último aminoácido adicionado. Para realizá-lo, retira-se alguns grãos da resina utilizada e os adiciona em um tubo de ensaio contendo soluções de KCN em piridina (2 mL de KCN 0,001 M em 98 mL de piridina), fenol em etanol (80% m/v) e ninhidrina em etanol (5% m/v). O tubo é aquecido a 110°C por 3-5 minutos. Após esse tempo, a presença de coloração azulada ou amarronzada indica a presença de amina desprotegida⁶⁶.

Esse teste é versátil e pode ser utilizado tanto após a desproteção (grãos de resina com coloração indicam o sucesso da desproteção) quanto após os acoplamentos (grãos incolores indicam acoplamento bem-sucedido, com o N-terminal das cadeias em construção protegido pelo acoplamento com um aminoácido protegido).

A proposta de mecanismo responsável pela formação do produto que apresenta coloração no teste de Kaiser é ilustrada a seguir.

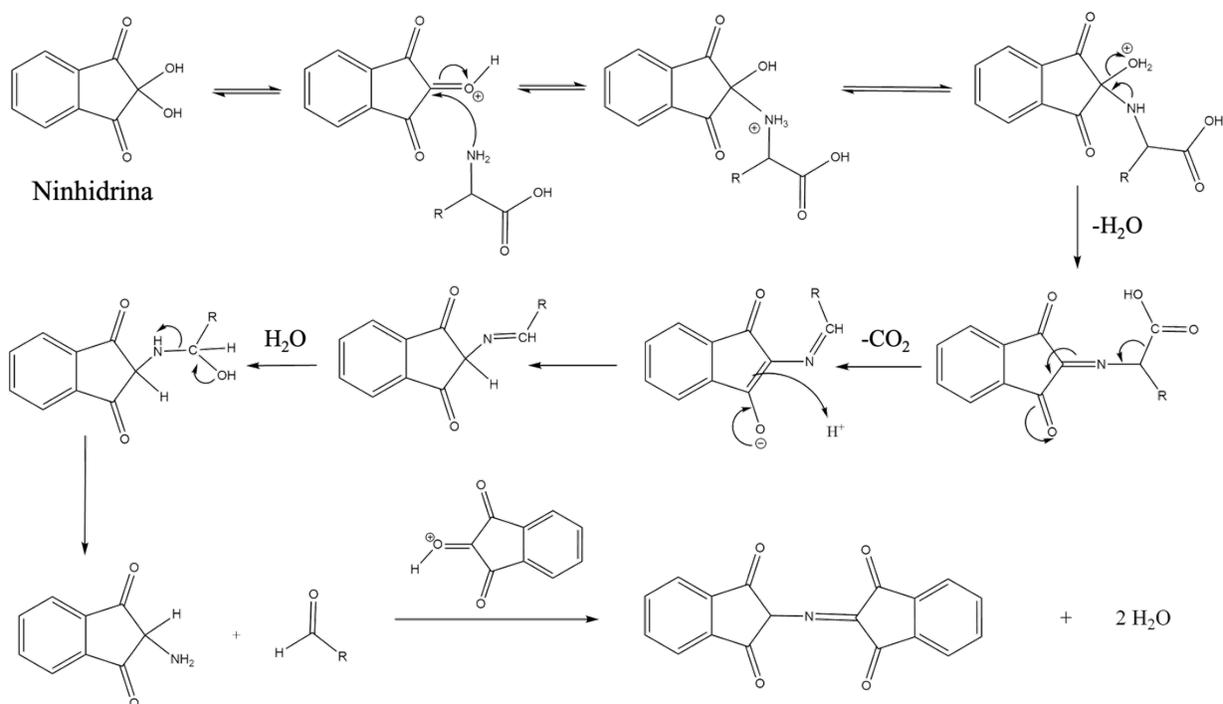


Figura 14 – Proposta de mecanismo da reação da ninhidrina com a amina livre.

1.6.5. Clivagem

A etapa final da síntese de peptídeos em fase sólida é a retirada do peptídeo da resina utilizada. Esse processo é denominado de clivagem e é realizado a partir da aceção de um próton pelo oxigênio carbonílico do C-terminal, ligado ao linker da fase sólida, e posterior eliminação do peptídeo em um intermediário imina.

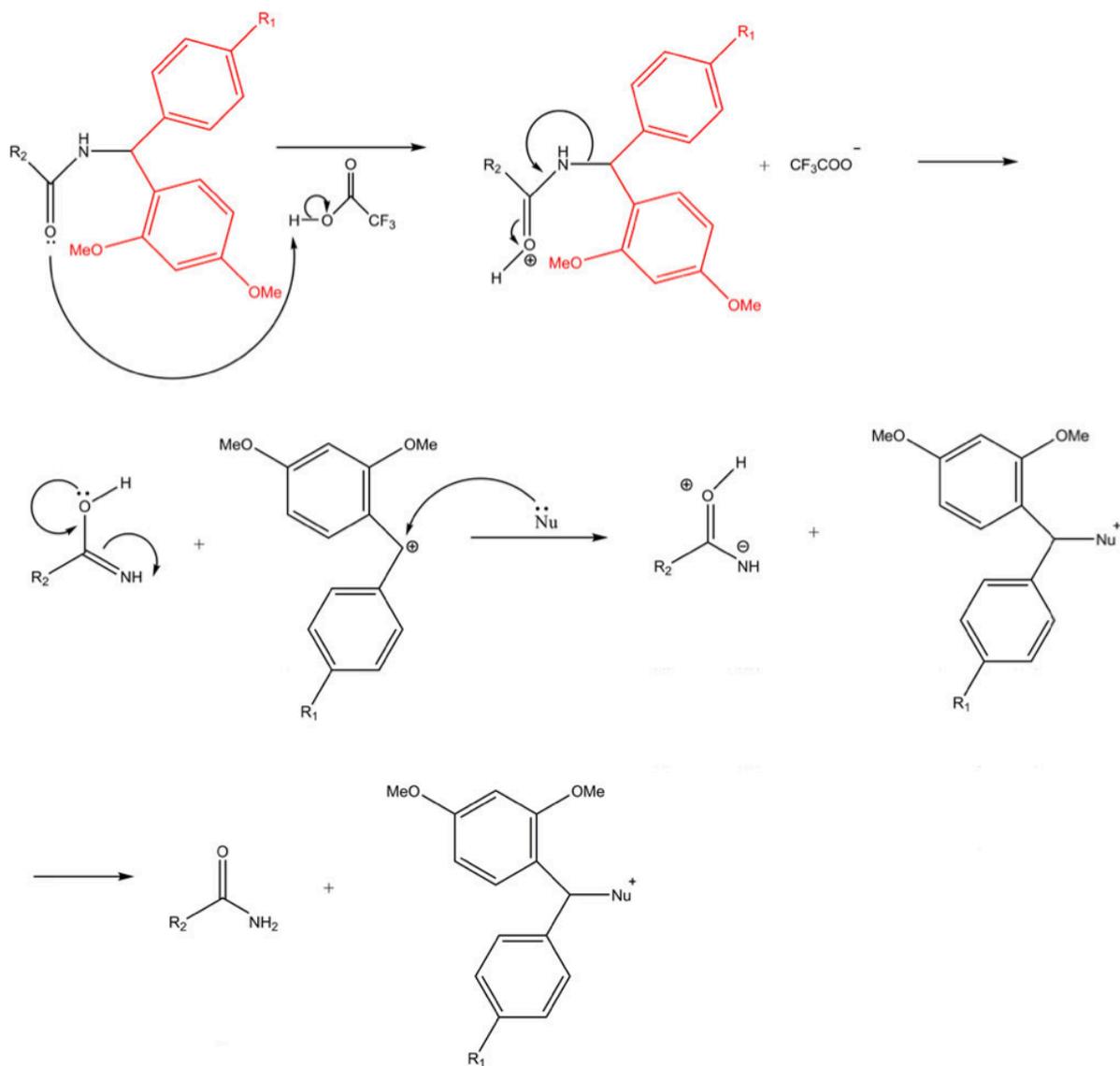


Figura 15: Mecanismo de clivagem ácida de um peptídeo sintetizado com resina Rink Amide.

Retirado da referência 66⁶⁶

O ácido trifluoroacético utilizado para a clivagem também é responsável pela desproteção dos aminoácidos que contêm nucleófilos em suas cadeias laterais. Essas reações também ocorrem através da protonação do oxigênio carbonílico do C-terminal do peptídeo e, assim como na clivagem, resultam na formação de carbocátions estáveis. No entanto, a presença desses intermediários pode levar à alquilação dos nucleófilos presentes nas cadeias laterais, gerando subprodutos indesejados.

Para evitar a formação dessas moléculas indesejadas, são adicionados *scavengers*, nucleófilos responsáveis por "sequestrarem" os carbocátions reativos e reduzirem a ocorrência de reações indesejadas⁶³. Alguns exemplos desses *scavengers* incluem o Etanoditiol (EDT), Tioanisol, Fenol, Triisopropilsilano (TIS), e suas estruturas estão apresentadas abaixo.

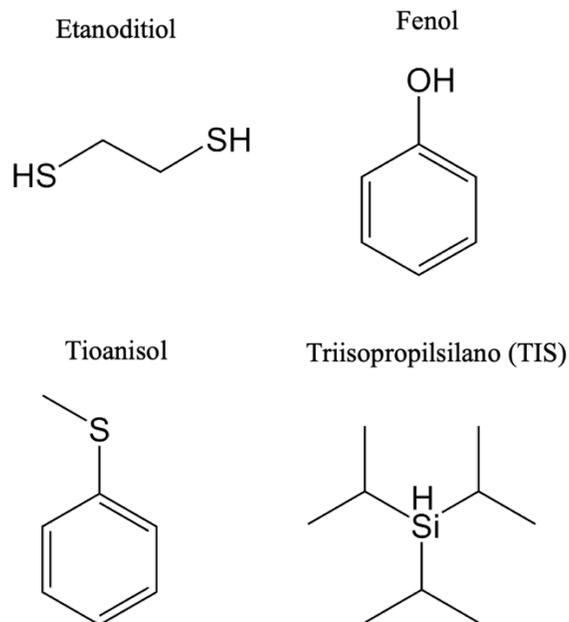


Figura 16: *Scavengers* utilizados na clivagem para retirar os carbocátions gerados no processo

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

O trabalho tem como objetivo otimizar o índice terapêutico (relação entre a atividade antimicrobiana e citotoxicidade) do Hs02 a partir do desenho racional de análogos de tamanho reduzido e estruturas primárias modificadas.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a estrutura secundária do Hs02 e seus 3 análogos de tamanho reduzido a partir de sua titulação com LUVs de DMPC, DMPC:DMPG (2:1) e LPS, por dicroísmo circular (CD).

2. Medir a citotoxicidade da primeira geração de análogos a partir de ensaios de MTT para células de micróglia BV-2.

3. Sintetizar, por meio de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida, um conjunto de novos análogos do Hs02 com o objetivo de melhorar o índice terapêutico desse IAP.

4. Avaliar a estrutura secundária do segundo grupo de análogos de Hs02 também a partir da titulação com LUVs de DMPC, DMPC/DMPG (2:1) e LPS, por dicroísmo circular (CD).

5. Determinar as atividades antimicrobianas dos análogos através de ensaios de avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) contra determinados microrganismos.

6. Avaliar a citotoxicidade dos análogos desenvolvidos por ensaios de MTT para células de micróglia BV-2.

3. Metodologia

3.1. Síntese dos peptídeos

Os peptídeos selecionados para as análises foram sintetizados pela metodologia de síntese em fase sólida⁶⁷ utilizando resina Rink Amide (100-200 mesh, Novabiochem, Merck) com densidade de *linkers* de 0,62 mmol/g. A massa de resina contendo 0,15 mmol de *linker* foi pesada e inchada com diclorometano por 30 minutos sob agitação, antes de iniciada a síntese. Após esse processo a amina protegida pelo grupo protetor 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc), foi submetida a desproteção com 20% de 4-metilpiperidina em dimetilformamida (DMF), por 15 minutos, duas vezes para assegurar o máximo de rendimento. Para confirmar a desproteção utilizou-se o teste de Kaiser, que consiste em uma pequena parte da resina em presença 1-2 gotas de ninhidrina 5% em etanol (m/v), fenol 80% em etanol (m/v), e KCN 0,001 M 2% v/v em piridina sob aquecimento (~130 °C). O teste qualitativo indica a presença de amina livre caso haja mudança de cor da resina, de translúcida para roxo/lilás. Posterior à confirmação da desproteção, foram adicionadas as massas do aminoácido desejado (protegidos por Fmoc), com excesso de 4 equivalentes estequiométricos, da Oxima® (Novabiochem, Merck) e aproximadamente 2mL de DMF. A mistura foi homogeneizada e a ela adicionado o *N, N* - diisopropilcarbodiimida (DIC, Sigma-Aldrich) para 1h30 de reação. Passados os 90 minutos, mais um teste de Kaiser foi realizado para verificação qualitativa do acoplamento. Após confirmação de que o aminoácido havia sido acoplado, a desproteção foi realizada novamente, assim como o teste de Kaiser. A repetição dos ciclos de desproteção/acoplamento seguiu até o término da sequência primária dos peptídeos.

Posterior às reações de acoplamento, a clivagem ácida do peptídeo foi realizada com o objetivo de retirá-lo da resina. Após a desproteção do último aminoácido acoplado, a resina ainda com o peptídeo foi adicionada a uma solução de clivagem com TFA, tianisol, água, fenol e etanoditiol na proporção 82,5:5:5:5:2,5 (v/v). Após 1h30min de reação, o TFA foi evaporado sob fluxo de argônio e éter diisopropílico gelado adicionado para precipitar o peptídeo e possibilitar a separação da resina. A mistura foi filtrada a vácuo com um funil com placa sinterizada e a massa retida na placa foi lavada com mais éter gelado. Finalmente, o peptídeo preso ao funil foi eluído em uma mistura de acetonitrila e água (1:1, v/v), separando-o da resina. As frações coletadas foram congeladas e submetidas ao vácuo para sublimação dos solventes e concentração do peptídeo, em um processo denominado de liofilização. As sínteses foram realizadas no Instituto de Química da

Universidade de Brasília e as liofilizações na Universidade Católica de Brasília, em conjunto com o grupo de pesquisa do professor Dr. Marcelo H. S. Ramada.

A descrição completa das reações e mecanismos envolvidos na síntese é apresentada na introdução desse trabalho.

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

Os peptídeos sintetizados pela metodologia de síntese em fase sólida foram purificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em um cromatógrafo Shimadzu (Japão) do laboratório de Anatomia Molecular e Nanomedicina da Faculdade de Medicina da UnB. Foi utilizado uma coluna preparativa de fase reversa Jupiter C18 (250 x 21,2 mm, 10 um, 300 A) da phenomenex, sistema binário de bombeamento (LC-20AR), detector de arranjo de diodo (DAD, SPD-M20A) e sistema de análise e processamento de dados LabSolutions versão 5.92. As amostras foram injetadas manualmente, sob fluxo de 10mL/min de fase móvel (acetonitrila (ACN) + 0,1% de TFA/água + 0,1% de TFA). Cada purificação foi realizada com 1 ml de soluções a 20 mg/mL de peptídeo bruto, previamente liofilizado.

O gradiente de fase móvel utilizado foi:

0 – 5 min – 5% de Acetronila + 0,1% TFA;

5 – 50 min - 5% - 95% de Acetonitrila + 0,1%TFA;

50 – 55 min – 95% de Acetonitrila + 0,1%TFA;

55 – 56 min – 95% - 5% de Acetonitrila + 0,1%TFA;

56 – 60 min - 5% de Acetronila + 0,1% TFA;

A figura 17 contém, graficamente, o gradiente de ACN + 0,1% TFA utilizado:

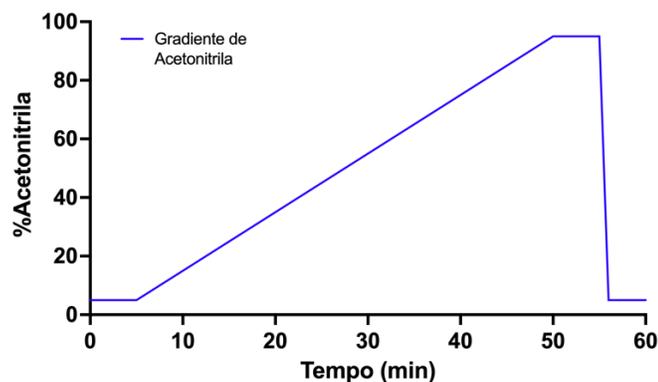


Figura 17: Perfil do gradiente de Acetonitrila (ACN) + 0,1% Ácido Trifluoroacético (TFA) em água deionizada + 0,1% TFA utilizado na purificação. O processo de purificação teve início com uma concentração de 5% de ACN por 5 minutos, seguido por um gradiente de 5% a 95% de ACN em 35 minutos, seguido por 5 minutos de ACN a 95%, e finalmente, a concentração foi reduzida e estabilizada em 5% nos últimos 5 minutos.

Os comprimentos de onda monitorados foram de 216 nm e 280 nm, correspondentes a absorção pela ligação peptídica e pela cadeia lateral do aminoácido triptofano (anel indól), respectivamente.

Os cromatogramas foram continuamente analisados durante as purificações e as frações de interesse coletadas de forma manual em tubos do tipo *Falcon*, para posterior liofilização e análise.

3.3. Identificação e caracterização dos peptídeos por espectrometria de massas

Com o objetivo de confirmar as estruturas dos peptídeos sintetizados e purificados, as frações coletadas após a purificação por CLAE foram liofilizadas e submetidas a análise por espectrometria de massas. As análises foram conduzidas em um espectrômetro de alta resolução TripleTOF 5600+ (Sciex, Ontário, Canadá), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI - Electrospray Ionization), analisador triplo quadrupolo, e um cromatógrafo líquido (Eksigent UltraLC 100, Sciex), da Central Analítica do Instituto de Química da UnB (CAIQ - UnB). O espectrômetro foi ajustado para o modo positivo utilizando o modo IDA (*Information Dependent Acquisition*), no qual espectros de fragmentação de cada íon (MS/MS) são adquiridos de acordo com parâmetros pré-estabelecidos.

Para a análise, as soluções foram preparadas utilizando 1 mg da amostra em 500 μ L de água deionizada. Em seguida, 5 μ L dessa solução foram ressolubilizados em 995 μ L de metanol

contendo 0,1% de ácido fórmico, como fonte de prótons para a detecção de íons $[M+nH]^{+n}$, em que M representa a massa monoisotópica do íon e n o número de cargas positivas no íon.

Os espectros de MS obtidos foram analisados através do software PeakView v2.1, e os de MS/MS através da ferramenta *online, Interactive Peptide Spectral Annotator*⁶⁸.

3.4. Quantificação dos peptídeos

A quantificação das soluções de peptídeo previamente sintetizados, purificados e identificados foi realizada por espectroscopia do ultravioleta e visível (UV-Vis) em um espectrofotômetro, e uma cubeta com 1cm de caminho óptico. Para o Hs02 e o 13.2, que possuem Triptofano (W), a absorvância em 280nm, típica da cadeia lateral do aminoácido, foi utilizada como referência para o uso da lei de Beer-Lambert (Equação 1), na qual c representa a concentração do peptídeo em mol/L ([peptídeo]):

$$A_{280} = \epsilon \cdot c \cdot l$$

A absorvância molar (ϵ) utilizada foi de $5500 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, referente ao W, e obtida a partir da ferramenta online ProtParam, do servidor ExPASy⁶⁹

e o caminho óptico (l) 1cm.

A figura 18 contém a estrutura molecular do aminoácido triptofano com sua cadeia lateral destacada em vermelho.

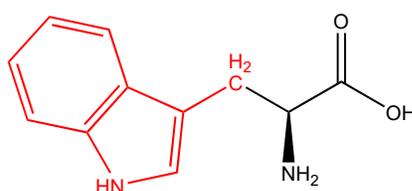


Figura 18: Fórmula estrutural do aminoácido Triptofano. A cadeia lateral do Triptofano, destacada em vermelho, apresenta um grupo indol (estrutura bicíclica composta por um pirrol e um benzeno), responsável pela absorção em 280 nm (transição $\pi \rightarrow \pi^*$).

Para os análogos que não possuem Triptofano, a seguinte equação foi utilizada^{70,71}:

$$[\text{peptídeo}](\mu\text{g/mL}) = \frac{(C1+C2).FD}{2}$$

Na qual,

$$C1 = A_{205}.31$$

$$C2 = (A_{215} - A_{225}). 144$$

Sendo FD, o fator de diluição, e A_x o valor de absorvância no comprimento de onda de X nm.

A utilização dessas equações tem como objetivo estimar a concentração dos peptídeos em solução com base nas absorvâncias entre 205 e 225 nm, faixa de comprimentos de onda de absorção das ligações peptídicas. As equações foram determinadas empiricamente, conforme reportado à literatura^{70,71}.

3.5. Preparação de vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DMPC e DMPC/DMPG

Para a preparação das vesículas unilamelares grandes (LUVs) pesou-se 20mg de DMPC e 20 mg de DMPC/DMPG 2:1 m/m (13,33 mg de DMPC e 6,67 mg de DMPG). Os lipídeos liofilizados (Avanti Polar Lipids, CA, USA) foram então, solubilizados em 2mL de clorofórmio em um balão de fundo redondo e submetidos a evaporação pelo rotaevaporador até a formação de um filme translúcido no fundo do balão, composto da deposição dos lipídeos utilizados. Após a formação de tal filme, o balão foi submetido a vácuo por 3h para retirar o máximo de clorofórmio presente. Posteriormente, adicionou-se 3mL de tampão fosfato (PBS, 20 mM de fosfato com NaCl a 150 mM, pH 7,4, força iônica de 150 mM, corrigida com NaOH e HCl) e a solução resultante foi submetida a um processo de extrusão através de uma membrana de policarbonato com poros de 100nm de diâmetro, para conversão das vesículas multilamelares (MLVs) em LUVs. O processo foi realizado 19 vezes para cada solução.

A quantificação da concentração de fosfolipídios nas LUVs foi realizada por espectroscopia do UV-Vis através de uma reação de complexação entre o oxigênio desprotonado do grupo fosfato dos fosfolipídeos e átomos de ferro de uma solução de ferrotiocianato de amônio, $[\text{Fe}(\text{SCN})(\text{H}_2\text{O})_5]^{+2}$ (27 g de $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ e 30 g de NH_4SCN em 1 L de água). Para a complexação, foi retirado 10 μL de uma solução contendo as LUVs, que foi então adicionada a um tubo de ensaio para que o solvente fosse evaporado. Em seguida, os solutos foram ressolubilizados em

clorofórmio e adicionada a solução de ferrotiocianato para permitir a complexação dos fosfolipídeos. A adição da solução aquosa de ferrotiocianato ao clorofórmio resultou na formação de um sistema bifásico. Após a agitação das duas fases, a fase orgânica contendo os complexos formados foi separada e utilizada para análise no espectrofotômetro.

Os valores de absorvância das soluções, em 488nm, foram aplicados em uma curva analítica previamente realizada nas concentrações 12,5, 25, 50, 100 e 150 mg/L, de cada solução de LUVs.

3.6. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

A determinação das estruturas secundárias dos peptídeos foi realizada através de espectroscopia de Dicroísmo Circular utilizando um espectropolarímetro J-815 (Jasco Analytical Instruments, Tokyo, Japão) conectado a um sistema de controle de temperatura Peltier e bomba d'água (Jasco Analytical Instruments, Tokyo, Japão), do Laboratório de Biofísica Molecular do Departamento de Biofísica Celular, Instituto de Biologia, UnB. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato (PBS) pH 7.4, 20 mM de fosfato e 150 mM NaCl, com 40µM de cada peptídeo em 5 concentrações diferentes de LPS extraído de *E. coli* O55:B5 (Sigma): 3.56, 5.34, 8.9, 12.46 e 14.24 µM. Para os experimentos com LUVs, 40µM de peptídeo foi utilizado em 7 concentrações de DMPC, e DMPC/DMPG (Avanti Polar Lipids, CA, USA): 40, 80, 160, 320, 640, 1280 e 2000 µM. Foi utilizado uma cubeta de quartzo, com 0.1 cm de caminho óptico, e aquisição dos espectros feita na faixa do UV visível distante, de 200 a 260 nm, com velocidade de escaneamento de 100nm/min. A utilização de quartzo como material das cubetas é importante para evitar interferências nas absorções abaixo de 350 nm, característica do vidro. Para cada espectro foram acumuladas 5 leituras a 25°C. As elipticidades obtidas foram convertidas para elipticidade molar e plotadas em função dos comprimentos de onda.

As porcentagens de hélice para cada peptídeo em cada concentração testada foram calculadas utilizando a plataforma online *BeStSel*. Esse algoritmo estima a estruturação dos peptídeos por meio da combinação linear de um grupo de estruturas base⁷².

O ajuste não-linear para cálculo da constante de equilíbrio de dissociação (K_D) foi calculado com base na equação:

$$\%hélice = \frac{B_{max} \cdot [LUV]}{K_D + [LUV]} + Branco$$

Onde Bmax é o valor máximo de hélice previsto para cada peptídeo obtido através de algoritmo de ajuste não-linear, e Branco é o valor quando [LUV] =0.

3.7. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade.

Os ensaios de viabilidade celular dos quatro peptídeos foram conduzidos em sextuplicata, utilizando células de micróglia BV-2, provenientes de camundongos. As concentrações dos peptídeos variaram de 128 a 1 μM , com diluições de 2 em 2 (128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 μM), seguindo os protocolos descritos na literatura^{73,74}. Foram utilizadas sete placas de 96 poços, cada poço contendo $5 \cdot 10^4$ células, cuja contagem foi realizada através de uma câmara de Neubauer, uma lâmina de microscópio utilizada para visualizar e contar as células presentes em um determinado volume de meio de cultura. As células foram adicionadas em 150 μL de meio suplementar DMEM com 10% de soro fetal bovino e 1% de mistura *penicillin-streptomycin*, para prevenir contaminações bacterianas. Para os ensaios, adicionou-se 50 μL de cada peptídeo em tampão fosfato (PBS) pH 7.4, em concentrações 4 vezes maiores do que as desejadas, para atingir um volume final de 200 μL por poço. Como controle positivo, foram adicionados 50 μL de DMSO 100% às células, também resultando em um volume final de 200 μL . O branco consistiu apenas na adição de 50 μL de tampão PBS, e essa medida também foi utilizada como controle negativo. As células foram cultivadas e incubadas em estufa umidificada a 37°C e atmosfera de 5% CO₂. Após adição dos peptídeos, as placas foram incubadas por 24h nas mesmas condições anteriormente citadas. Passadas as 24h, 20 μL de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) 5 mg/ml foram adicionados a cada poço das placas, as quais foram novamente incubadas por mais 4h. A adição do MTT permite monitorar a atividade mitocondrial, uma vez que essa substância é convertida em cristais de formazan na mitocôndria, por meio da ação do NADH. Portanto, quanto maior a quantidade de formazan produzido após 4 horas, maior será a quantidade de células vivas presentes naquele poço. A figura 19, a seguir, contém as estruturas moleculares do MTT e do formazan.

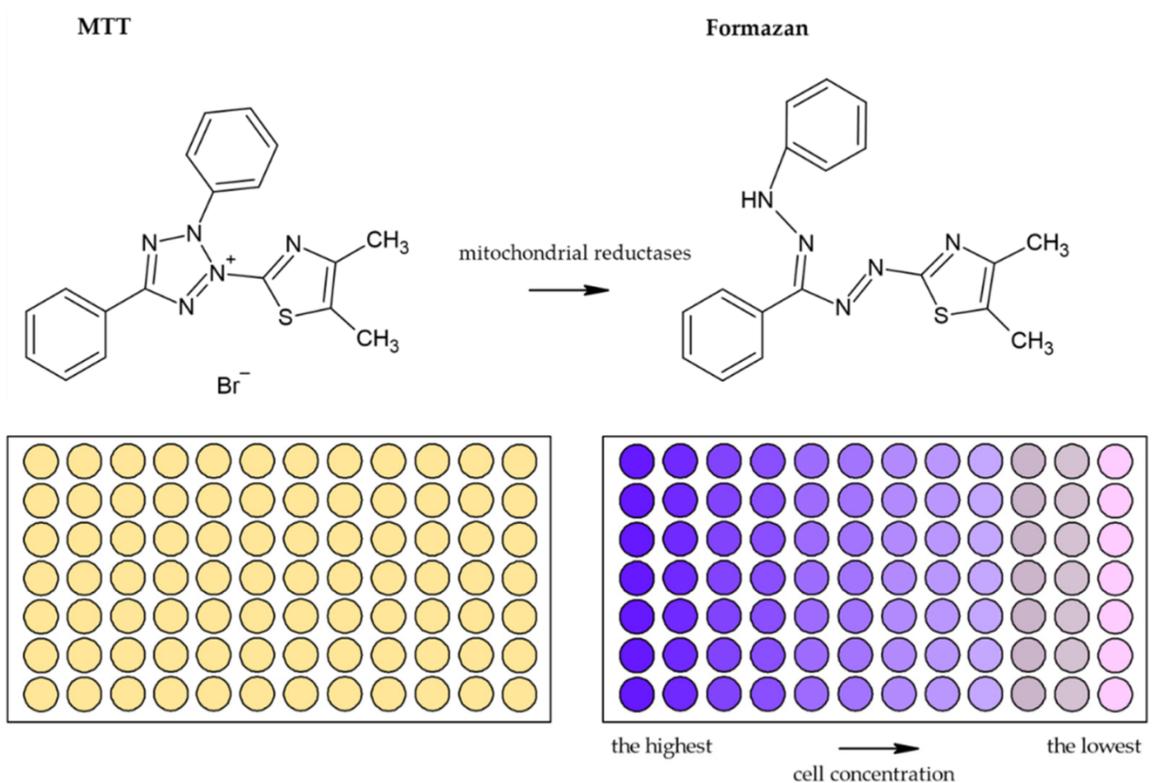


Figura 19: Conversão do 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em formazan.

A atividade mitocondrial é responsável pela conversão do MTT, de coloração amarelada, em formazan, coloração roxa/lilás. Quanto maior a concentração de células nos poços, maior é a quantidade de MTT convertido em formazan e mais intensa a coloração roxa. Figura retirada da referência 75⁷⁵.

Após as 4 horas, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi retirado. Em seguida, adicionou-se 100 µL de DMSO 100% para romper as células e solubilizar os cristais de formazan formados. Posteriormente, os poços foram homogeneizados e submetidos a leitura espectroscópica em um espectrofotômetro em dois comprimentos de onda, 570 nm e 650 nm, com o objetivo de garantir que as leituras em 570 nm (comprimento de onda com absorção característica do formazan) não fossem afetadas pela turbidez da solução. O CC₅₀ do Hs02 e seus análogos foi calculado através do ajuste não linear para uma curva de 4 parâmetros, utilizando a seguinte equação:

$$Y = \frac{Bottom + (Top - Bottom)}{1 + \frac{CC_{50}^{HillScope}}{X^{HillScope}}}$$

Onde, *Bottom* e *Top* são os mínimos e máximos valores de % de viabilidade celular, respectivamente; *HillSlope* um coeficiente adimensional gerado para o ajuste não linear; e CC_{50} a concentração de peptídeo que reduz a viabilidade celular a 50%.

3.8. Avaliação das Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) dos peptídeos contra bactérias.

Com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana dos análogos do Hs02 utilizados nesse trabalho, testes de suscetibilidade de microrganismos foram realizados. Os protocolos M7-A10, M27-A3 e M38-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) foram seguidos para assegurar a reprodutibilidade dos resultados. Os testes foram realizados no Laboratório de Análise de Biomoléculas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, UCB, em conjunto com o grupo de pesquisa do professor Dr. Marcelo H. S. Ramada.

Os microrganismos escolhidos para os testes foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* ATCC 13883 e *A. baumannii* ATCC 13304 todos retirados do acervo da Universidade Católica de Brasília (UCB).

Os peptídeos foram incubados por 24 horas a 37°C em meio de cultura líquido, com concentrações variando de 128 µM a 0,25 µM (128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 µM), e as bactérias em concentrações de 5×10^5 células/mL, em meio Mueller-Hinton (Himedia). Como controle positivo, utilizou-se o agente microbicida gentamicina, em uma faixa de concentração de 20 µM a 0,039 µM. Como controle negativo utilizou-se apenas os microrganismos em seus respectivos meios de cultura. A avaliação de inibição do crescimento bacteriano causada pelos peptídeos foi realizada visualmente, e caso houvesse dúvida na aferição, utilizou-se um microscópio óptico.

4. Resultados e discussão

A figura 20, a seguir, apresenta as projeções em roda helicoidal dos 4 peptídeos utilizados na primeira etapa do trabalho. Os 4 foram previamente sintetizados e purificados pelo grupo⁵⁶, fazendo parte do acervo do laboratório. As sequências seguem um padrão de ausência do N-terminal (13.1), do C-terminal (13.2) e ambas as extremidades (10.0), conforme apresentado na legenda da figura.

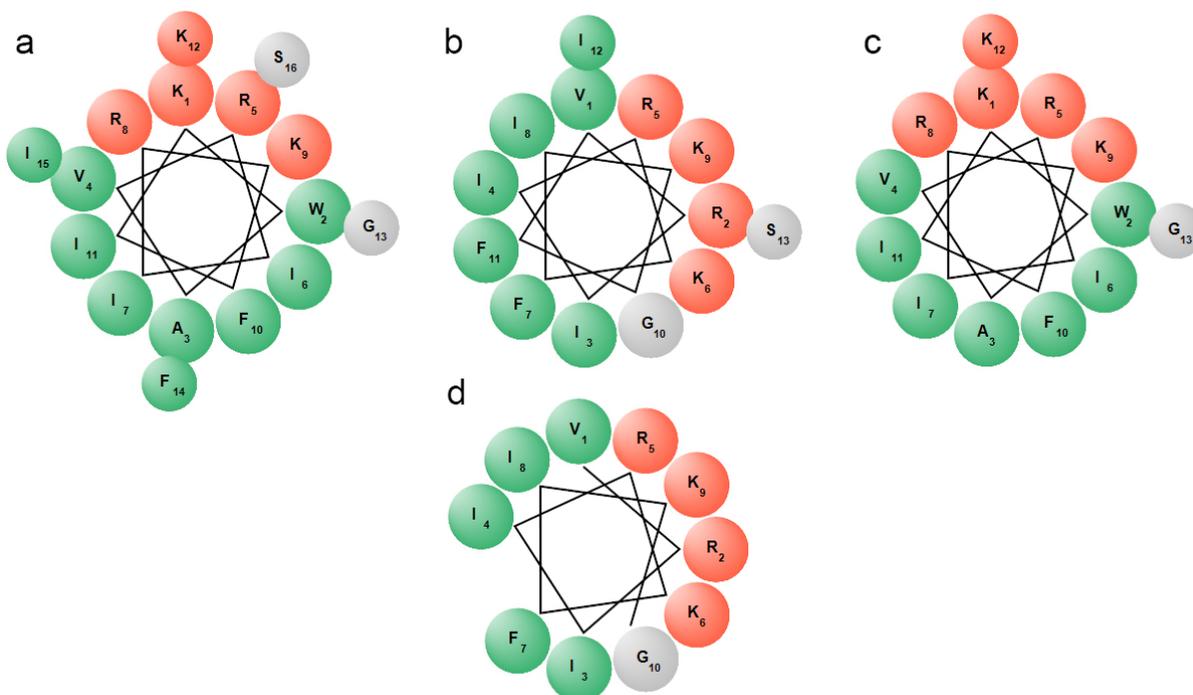


Figura 20 – Projeções helicoidais dos peptídeos Hs02 e análogos. a) Hs02 (KWAVRIIRKFIKGFIS - NH₂), b) 13.1 (VRIIRKFIKGFIS - NH₂), c) 13.2 (KWAVRIIRKFIKG - NH₂) e d) 10.0 (VRIIRKFIKG - NH₂). Em verde estão representados os aminoácidos hidrofóbicos e em vermelho os polares carregados positivamente.

Os parâmetros físico-químicos dos peptídeos, como carga líquida, hidrofobicidade, momento hidrofóbico, e outros, foram calculados pelo *software* KAMAL e estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros Físico-Químicos dos peptídeos avaliados pelo software KAMAL.

| | Hs02 | 13.1 | 13.2 | 10.0 |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Massa | 1961,209 | 1575,998 | 1614,025 | 1228,814 |
| Número de Resíduos | 16 | 13 | 13 | 10 |
| Carga Líquida | 5 | 4 | 5 | 4 |
| Hidrofobicidade* | -0,064 | 0,04 | -0,342 | -0,29 |
| Momento Hidrofóbico* | 1,201 | 1,305 | 1,343 | 1,474 |
| Ponto Isoelétrico | 12,024 | 12,011 | 12,024 | 12,011 |
| Agregação[#] | 39,595 | 44,278 | 31,985 | 35,79 |

* Calculado de acordo com a escala de tendência transmembranar, introduzida na referência ⁷⁶

[#] parâmetro Na4vSS do algoritmo Aggrescan⁷⁷

4.1. Avaliação da estrutura secundária de Hs02 e seus análogos após titulação com vesículas unilamelares grandes (LUVs) pela técnica de dicroísmo circular.

As estruturas secundárias do Hs02 e seus análogos foram avaliadas na presença de vesículas fosfolipídicas pela técnica de Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) para uma melhor compreensão de sua interação com membranas microbianas e avaliação de seletividade. Foram utilizadas duas composições de vesículas unilamelares grandes (LUVs): Dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC); e Dimiristoil fosfatidilcolina/Dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPC/DMPG), na proporção de 2:1 m/m. Esses fosfolipídios foram escolhidos pois são reportados como completamente miscíveis entre si⁷⁸.

O Dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) possui uma carga positiva no nitrogênio da colina (que possui uma amina quaternária) e uma carga negativa no grupo fosfato, resultando em uma carga líquida igual a zero. Essa característica permite a criação de vesículas neutras a partir de DMPC, e possibilita mimetização de membranas eucarióticas. Já o DMPG possui apenas carga negativa no grupo fosfato, tornando possível a utilização de LUVs de DMPC/DMPG para mimetizar membranas com carga negativa, como as encontradas em patógenos, células cancerosas

e outros tipos celulares³⁵. A utilização desses fosfolipídios proporciona um cenário adequado para a avaliação preliminar de seletividade das interações dos peptídeos com diferentes tipos de membranas. A figura 21 contém as fórmulas estruturais do Dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) e do Dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG).

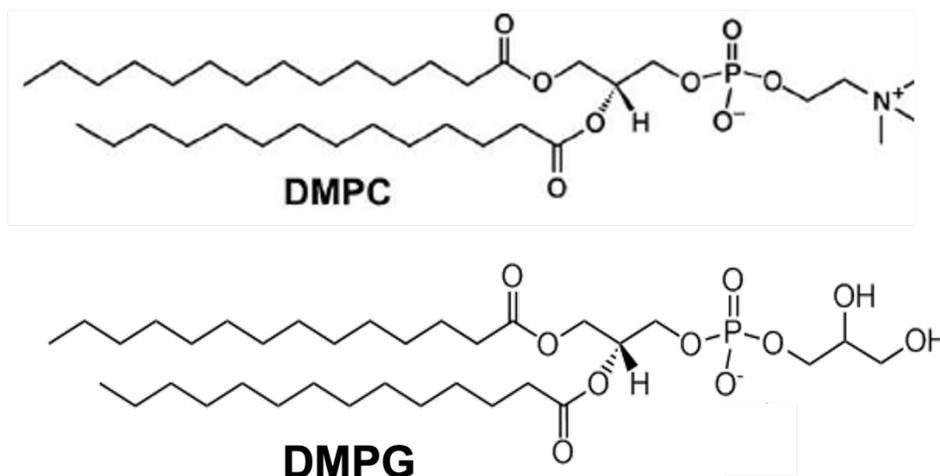


Figura 21: Fórmulas estruturais dos fosfolipídios Dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) e Dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG). Em ambas as estruturas dessas moléculas é possível observar a presença de uma carga negativa no grupo fosfato, porém apenas no DMPC há a presença de uma carga positiva, na amina quaternária da colina.

As análises foram feitas a partir de titulação das LUVs em soluções com concentração peptídica constante de 40 μ M. Foram adquiridos espectros para os peptídeos puros em tampão fosfato (PBS, pH 7.4, 150mM NaCl) e em concentrações crescentes de cada vesícula: 40, 80, 160, 320, 640, 1280 e 2000 μ M.

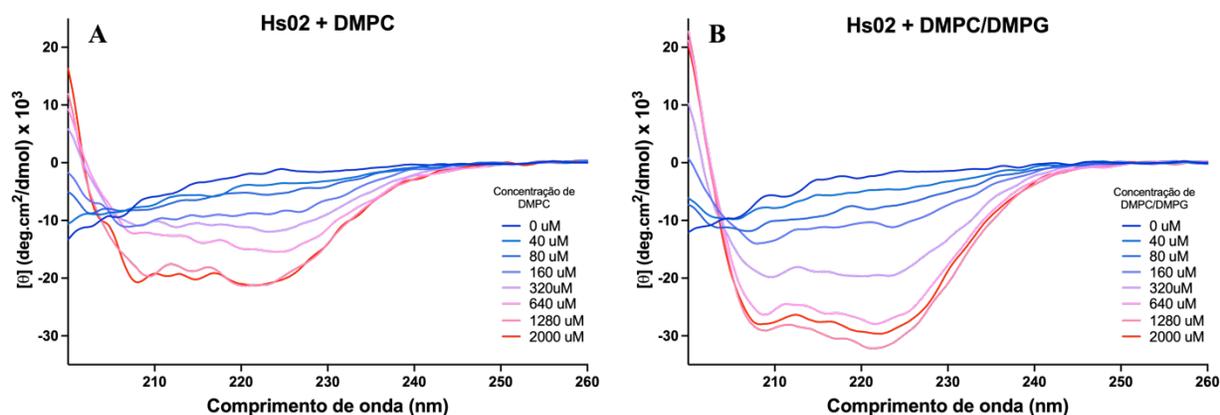


Figura 22 - Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo Hs02, a 40 μ M, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. As curvas representam os espectros adquiridos em concentrações crescentes de cada LUV: 0 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M, 640 μ M, 1280 μ M e 2000 μ M.

Como observado na Figura 22, que contém os espectros do Hs02 em concentrações crescentes de DMPC e DMPC/DMPG, nas soluções sem vesículas, o peptídeo apresentou estrutura aleatória, apenas com sinais negativos na faixa de 200nm. Em concentrações baixas de LUV (até 640 μ M de DMPC e 320 μ M de DMPC/DMPG), o Hs02 continuou sem estrutura definida, com sinal negativo em 200nm, e ausência de mínimos em 222nm e 208nm, comprimentos de onda característicos de transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ com deslocamentos hipso e batocrômico causados pela estruturação em α -hélice. Ainda para o Hs02, em concentrações mais altas de vesículas, os mínimos em 222nm e 208nm aparecem e ficam mais pronunciados em 1280 e 2000 μ M de LUVs. Com DMPC, vesícula de carga neutra, a estruturação aparenta ser menos acentuada comparada às LUVs de DMPC/DMPG, de carga negativa. Essa diferença sugere que a interação do Hs02 com as membranas é sensível a efeitos eletrostáticos entre a membrana carregada negativamente e o peptídeo catiônico.

A diferença entre o Hs02 e seus análogos está na ausência de 3 resíduos de aminoácido no N- e/ou no -C terminal. O peptídeo 13.1, de estrutura primária VRIIRKFIKGFIS – NH₂, difere do Hs02 pelo N-terminal, com a ausência de uma lisina (K), triptofano (W) e alanina (A). Os resultados de CD para o 13.1 estão apresentados na Figura 23.

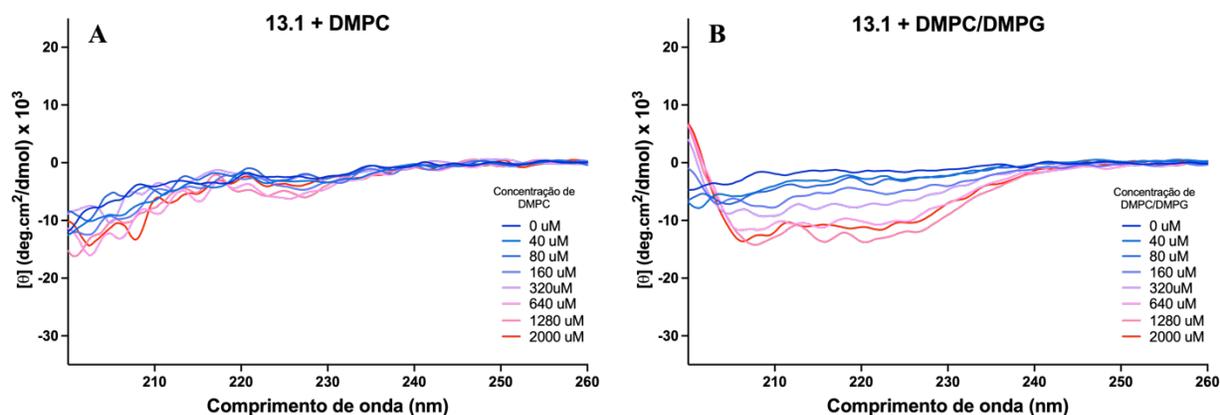


Figura 23 - Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo 13.1, a 40 μ M, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. As curvas representam os espectros adquiridos em concentrações crescentes de cada LUV: 0 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M, 640 μ M, 1280 μ M e 2000 μ M.

A figura 23a contém os dados de CD para o 13.1 na presença de concentrações crescentes de DMPC, vesícula zwitteriônica de carga neutra, e a 23b na presença de DMPC/DMPG, vesícula com carga líquida negativa. É possível observar que, em DMPC, o peptídeo não apresenta estrutura definida pois não apresenta mínimos ou máximos significativos, além dos mínimos em 200nm. Já na presença de DMPC/DMPG, LUVs com carga negativa, pode ser observada estruturação em concentrações mais altas de vesícula. A comparação dos resultados do 13.1 com os espectros do Hs02 sugere que a retirada dos 3 aminoácidos do N-terminal foi determinante para a ausência de estrutura definida da molécula na presença das vesículas. Os motivos dessas variações podem estar relacionados tanto com a redução do tamanho do peptídeo, quanto com a redução de hidrofobicidade e cationicidade da molécula, através da retirada de um aminoácido com carga positiva, como a Lisina (K).

Para verificar a influência do N-terminal do Hs02 em sua estrutura secundária, o peptídeo análogo 13.2 foi utilizado e apresenta os 3 aminoácidos ausentes no 13.1, mas sem os 3 resíduos do C-terminal. Sua estrutura primária é KWAVRIIRKFIKG – NH, e seus resultados de CD em ambas as vesículas testadas estão apresentados na figura 24.

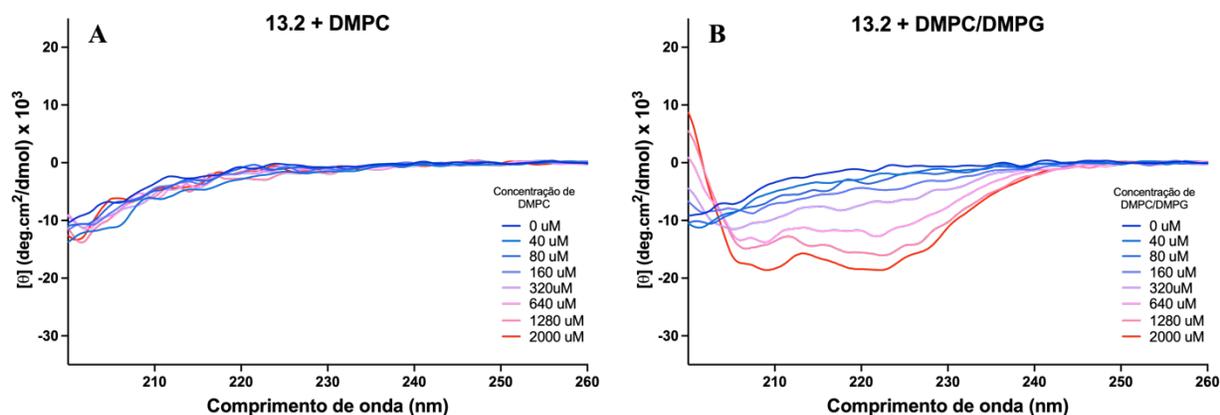


Figura 24 - Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo 13.2, a 40 μ M, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. As curvas representam os espectros adquiridos em concentrações crescentes de cada LUV: 0 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M, 640 μ M, 1280 μ M e 2000 μ M.

A avaliação da influência das terminações é de grande importância para o desenvolvimento de novos análogos do Hs02 e compreensão dos fatores que promovem a interação com membranas. Na Figura 24a, estão apresentados os espectros do análogo 13.2 na presença de DMPC. Assim como o 13.1, este análogo não apresenta estrutura definida na presença de vesículas zwitteriônicas e pode indicar que não somente a composição dos aminoácidos da estrutura primária é essencial para a interação com membranas neutras, mas também seu tamanho. A figura 24b contém os espectros de CD na presença de LUVs de carga negativa. Os mínimos negativos em 208 e 222nm, nas maiores concentrações de vesícula, sugerem uma estruturação em α -hélice em DMPC/DMPG. A posterior determinação de porcentagens de hélice de cada peptídeo pode trazer conclusões importantes a respeito da influência da Lisina do N-terminal na carga do peptídeo e sua interação com a membrana.

Em contraste com os peptídeos 13.1 e 13.2, o análogo 10.0 foi sintetizado sem os 3 aminoácidos iniciais e os 3 finais do Hs02 (VRIIRKFIKG – NH₂). Os resultados de CD para esse peptídeo, nas duas LUVs testadas, estão apresentados na Figura 25.

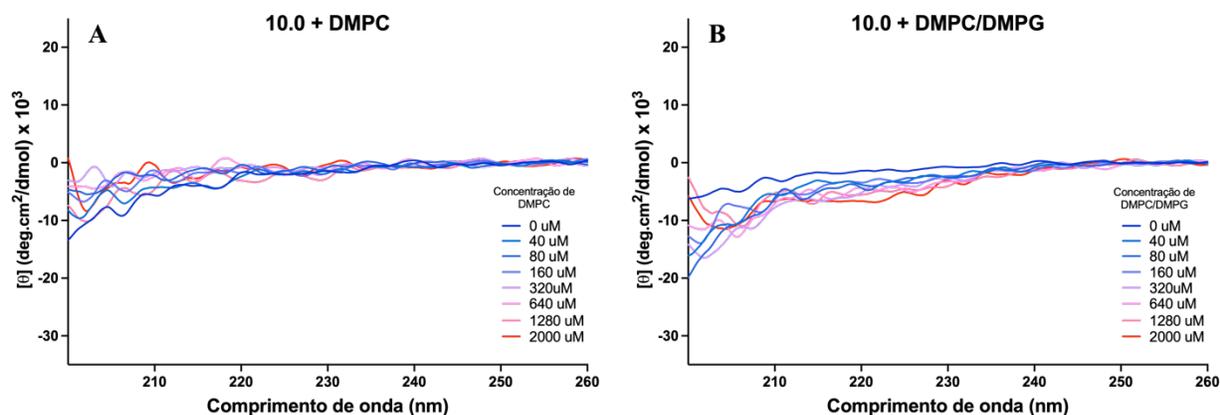


Figura 25 - Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo 10.0, a 40 μ M, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. As curvas representam os espectros adquiridos em concentrações crescentes de cada LUV: 0 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M, 640 μ M, 1280 μ M e 2000 μ M.

Em comparação com os espectros dos dois outros análogos, o peptídeo 10.0 foi o que menos apresentou indícios de estruturação a partir da titulação com ambas as vesículas. Tanto em DMPC quanto em DMPC/DMPG, o análogo com ausência dos terminais não apresentou mínimos significativos, além de mínimos em 200nm. Isso corrobora às hipóteses levantadas anteriormente sobre a importância do tamanho desse IAP, que demonstra ser um fator crucial na estruturação. A figura 26 contém uma comparação entre os espectros do Hs02 e seus análogos em 2000 μ M de cada vesícula.

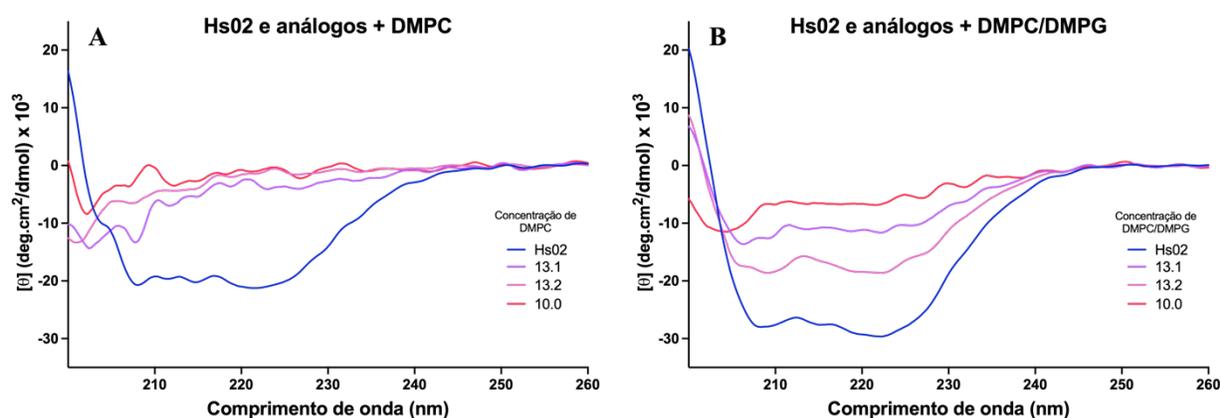


Figura 26 - Espectros de Dicroísmo Circular de 40 μ M de Hs02 e seus 3 análogos em 2000 μ M de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. As curvas representam os espectros de CD do Hs02 (linha azul), 13.1 (linha lilás), 13.2 (linha rosa) e 10.0 (linha vermelha).

A análise dos espectros dos peptídeos nas concentrações mais elevadas de LUVs testadas revela uma correlação entre a estruturação dos peptídeos e suas atividades antimicrobianas. Conforme mencionado anteriormente na seção de Introdução, os peptídeos análogos utilizados neste estudo exibem diferentes atividades antimicrobianas. A Tabela 4 na Introdução apresenta as concentrações inibitórias mínimas (MICs) correspondentes a cada peptídeo, previamente medidas⁵⁶. As variações observadas nas estruturações dos peptídeos após saturação com LUVs de 2:1 DMPC:DMPG estão alinhadas com as atividades antimicrobianas dos análogos do Hs02. Notavelmente, o análogo 13.2, que possui um espectro mais próximo ao do peptídeo original, exibe o menor MIC entre todos os análogos, frente a todos os microrganismos testados.

AMPs possuindo entre 10 e 13 resíduos de aminoácidos com potente atividade antimicrobiana são incomuns. O peptídeo BP100 é um exemplo de molécula pequena e potente. Este AMP possui 11 resíduos e apresenta um MIC na faixa entre 2,5 e 5 μ M contra bactérias Gram-negativas^{79,80}. A avaliação do extravasamento de vesículas com diferentes concentrações de PG demonstrou que quanto maior a razão PG/PC em um modelo de membrana, menor é a quantidade desse peptídeo necessária para a ruptura da membrana⁸⁰. É proposto que esse efeito se deve ao fato de que os mecanismos de ação dependam da hidrofobicidade da alfa-hélice anfipática e sua cationicidade.

Para melhor avaliar a estruturação dos peptídeos ao interagir com membranas, as porcentagens de hélice de cada peptídeo em tampão e nas 7 concentrações de vesícula foram calculadas utilizando a metodologia descrita na seção 3.6. A figura 27 contém os valores de porcentagens de hélice, e a tabela 4 os resultados dos cálculos das constantes de dissociação (K_D) de cada um dos peptídeos.

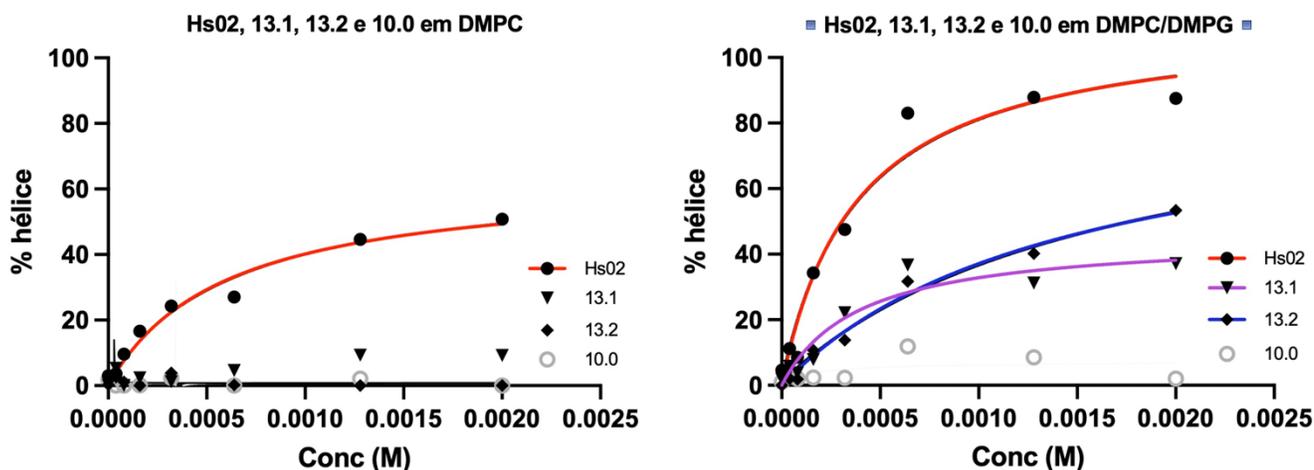


Figura 27: Porcentagens de Hélice para o Hs02, 13.1, 13.2 e 10.0, a 40 μ M, nas concentrações de 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M, 640 μ M, 1280 μ M e 2000 μ M de DMPC e DMPC/DMPG. As porcentagens de hélice foram calculadas utilizando a plataforma online *BeStSel*, assim como descrito na metodologia.

Tabela 4: Constantes de Dissociação dos peptídeos Hs02, 13.1, 13.2 e 10.0 em DMPC e DMPC/DMPG

| Peptídeos | Constante de Dissociação ($K_{D, app}$) em μ M | |
|-----------|--|----------------|
| | DMPC | DMPC/DMPG |
| Hs02 | 590 \pm 157 | 391 \pm 116 |
| 13.1 | - | 424 \pm 199 |
| 13.2 | - | 1640 \pm 508 |
| 10.0 | - | - |

Os dados de porcentagem de hélice calculados para os peptídeos nas diversas concentrações de DMPC evidenciam as diferenças na estruturação do Hs02 e seus análogos em vesículas zwitteriônicas. O único peptídeo a apresentar porcentagens significativas de hélice nesse tipo de LUVs foi o Hs02 e seu $K_{D, app}$ foi de $5,9 \times 1,6 \cdot 10^{-4}$ M.

Em contraste com os dados de DMPC, na presença de vesículas com carga negativa (2: DMPC/DMPG), os dois análogos do Hs02 com 13 aminoácidos apresentaram considerável estruturação. Em relação às constantes de equilíbrio de dissociação aparentes, $K_{D, app}$, o análogo 13.1 apresentou afinidade por LUVs de DMPC/DMPG similar à apresentada pelo Hs02 ($4,2 \times 2,0$

10^{-4} M e $3,9 \times 1,2 \cdot 10^{-4}$ M, respectivamente), diferente do 13.2 que apresentou uma afinidade menor ($1,6 \times 0,5 \cdot 10^{-3}$ M). A queda na afinidade do 13.2 pela vesícula pode ser atribuída à retirada dos três resíduos C-terminais, com os aminoácidos fenilalanina e isoleucina, e consequente diminuição na hidrofobicidade da molécula. A escala de hidrofobicidade transmembrana (TM) dos aminoácidos⁷⁶, evidencia que a retirada dos aminoácidos Phe (1.98) e Ile (1.97, Phe + Ile + Ser = 3.42) altera mais a hidrofobicidade média da molécula que a retirada da Lys (-3.46) e Trp (1.53, Lys + Trp + Ala = -1.55) no 13.1. Tal observação fica evidente na tabela 3, apresentada no início da seção de Resultados, a qual informa a hidrofobicidade média de cada peptídeo e permite observar que a este valor para 13.2 é menor que a para 13.1.

Em um trabalho reportado na literatura⁸¹, o AMP Pep 8 (RIVQRILKWLKKWYKLGK), foi desenvolvido pela substituição de duas lisinas por tirosina e leucina nas posições 7 e 14 do peptídeo Pep 5 (RIVQRIKKWLLKWKKLGY), e mostrou-se como o peptídeo com maior toxicidade nos ensaios de hemólise. Além disso, este análogo apresentou a menor concentração inibitória para *P. aeruginosa*, uma bactéria Gram-negativa. A avaliação das suas constantes de dissociação por meio de dicroísmo circular em presença de LUVs de DMPC e DMPC/DMPG revelou a maior afinidade por ambas as vesículas entre os três peptídeos testados no estudo. Para as vesículas neutras, o valor do seu K_D foi de 400 μ M, enquanto para as vesículas negativas foi de 180 μ M. Esses resultados demonstram que a afinidade com vesículas neutras pode estar correlacionada com a citotoxicidade de um AMP, assim como valores baixos de K_D podem estar associados a atividade antimicrobiana desses peptídeos⁷⁶. No que se refere aos K_D 's, o peptídeo 13.2 demonstra uma menor afinidade em relação às vesículas carregadas negativamente, quando comparado ao Hs02 e 13.1. Contudo, seu percentual de hélice é o maior, dentre os análogos de Hs02, após titulação com as LUVs. No entanto, é importante ressaltar que o peptídeo 13.2 exibe a atividade antimicrobiana mais potente entre todos os análogos. Esses dados indicam que a atividade antimicrobiana dessa série de peptídeos está melhor correlacionada com a extensão da estruturação após a titulação com vesículas (percentual de hélice) do que com a afinidade aparente entre essas.

4.2. Avaliação da estrutura secundária do Hs02 e seus análogos após titulação com LPS

Experimentos de Dicroísmo Circular também foram realizados na presença de LPS, pois acredita-se que as conclusões retiradas de tais dados podem fornecer informações acerca da relação entre estruturação e atividade anti-inflamatória de análogos de Hs02, e posteriormente, entre atividade anti-inflamatória e antimicrobiana.

Os experimentos para determinação de estrutura secundária foram realizados com 40 μ M de cada peptídeo em soluções acrescidas de cinco concentrações de LPS (3,56 μ M, 5,34 μ M, 8,9 μ M, 12,46 μ M e 14,24 μ M) e livre de LPS, todas em tampão fosfato (PBS) pH 7,4, 150mM NaCl. A figura 28 e 29 contém os dados obtidos para os 4 peptídeos.

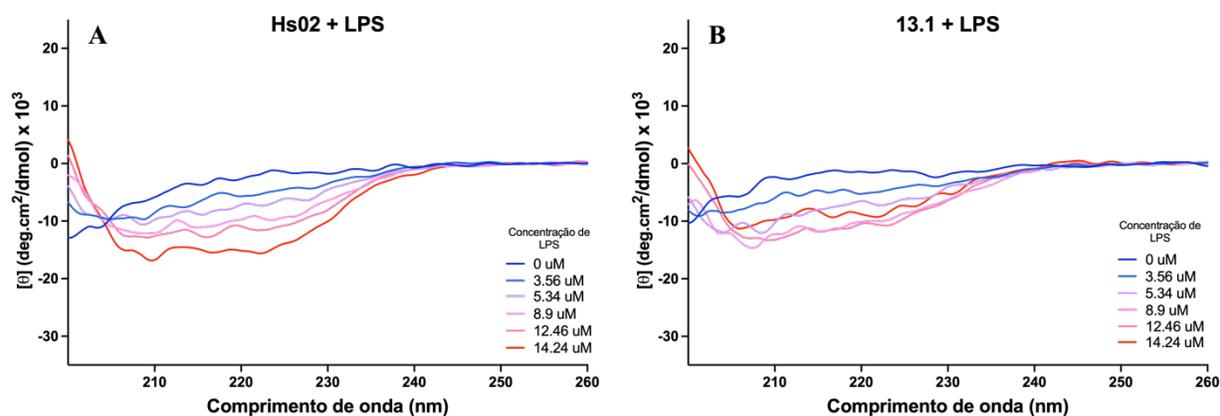


Figura 28: Espectros de Dicroísmo Circular dos peptídeos A) Hs02 e B) 13.1, a 40 μ M, em concentrações crescentes de LPS. As curvas representam os espectros adquiridos com as concentrações 0 μ M, 3,56 μ M, 5,34 μ M, 8,9 μ M, 12,46 μ M e 14,24 μ M, de lipopolissacarídeo.

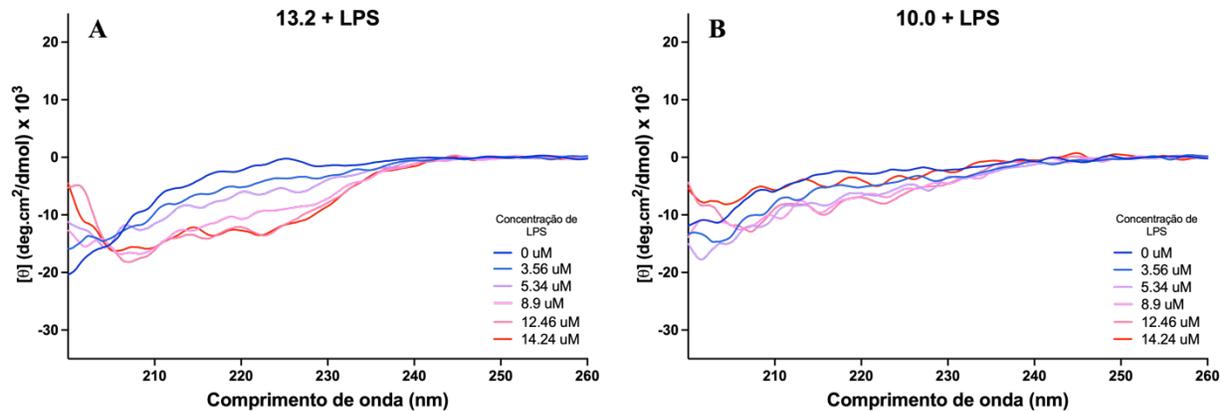


Figura 29: Espectros de Dicroísmo Circular dos peptídeos A) 13.2 e B) 10.0, a 40 μ M, em concentrações crescentes de LPS. As curvas representam os espectros adquiridos com as concentrações 0 μ M, 3,56 μ M, 5,34 μ M, 8,9 μ M, 12,46 μ M e 14,24 μ M, de lipopolissacarídeo.

Nas soluções com apenas peptídeo e tampão PBS, as moléculas não apresentaram estrutura secundária definida, assim como nos espectros obtidos para os experimentos com DMPC e DMPC/DMPG. Em concentrações abaixo de 3,56 μ M de LPS, nenhum dos 4 peptídeos apresentou indícios de estruturação, com ausência das bandas negativas em 208 e 222nm. Em contraste, nas soluções mais concentradas de LPS, o Hs02 apresentou as duas bandas negativas de forma pronunciada, assim como o 13.2. O peptídeo 13.1 aparenta apresentar menor estruturação em alfa-hélice que o Hs02 e 13.2, repetindo o comportamento observado nos experimentos com LUVs. Já o 10.0 não apresentou indícios de estruturação em nenhuma concentração de LPS. Os resultados de CD adquiridos para esses análogos convergem com as conclusões dos experimentos anteriores, utilizando LUVs de fosfolipídeos. Isso implica que, independentemente do ligante, o peptídeo 10.0 possui tamanho inferior ao limite necessário para a formação e estabilização de uma α -hélice. Essa observação está de acordo com a literatura, de forma que peptídeos estruturados de tamanho tão reduzido, são exceções, tal qual o BP100⁷⁹.

Ao comparar os dados obtidos para cada um dos 4 peptídeos nas soluções com maior concentração de LPS, ficam claras as diferenças na estruturação secundária de cada um deles. A figura 14 traz os espectros dos 4 peptídeos em 14,24 μ M de LPS, a concentração máxima utilizada nos ensaios.

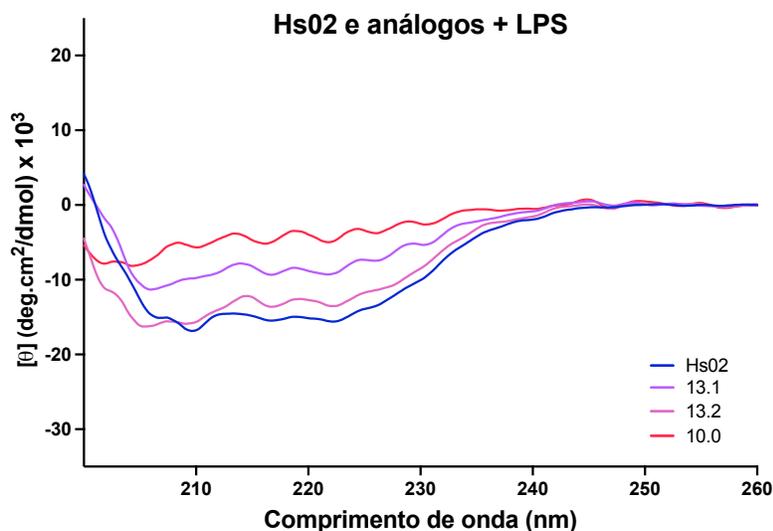


Figura 31: Espectros de Dicroísmo Circular dos peptídeos Hs02, 13.1, 13.2 e 10.0, a 40 μ M, em 14.24 μ M de LPS. As curvas representam os espectros adquiridos com a concentração de 14.24 μ M de Hs02, 13.1, 13.2 e 10.0.

Para o Hs02, as bandas negativas bem pronunciadas representam um padrão de absorção de α -hélice bem definida. Já em relação aos análogos, o 13.2 (ausência do C-terminal) apresentou maior estruturação, seguido do 13.1 (ausência do N-terminal) e por último o 10.0 (ausência de ambas as extremidades). Ao relacionar os resultados com as estruturas primárias dos peptídeos e os resultados dos experimentos com as LUVs de DMPC e DMPC/DMPG, as estruturações dos análogos sugerem ser atribuídas tanto à cationicidade dos peptídeos em um microambiente com carga negativa, quanto ao tamanho do peptídeo.

4.3. Ensaio de toxicidade do Hs02 e análogos.

Após os experimentos de espectroscopia do Dicroísmo Circular realizados com os análogos 13.1, 13.2 e 10.0, ensaios de viabilidade celular por avaliação da atividade mitocondrial foram realizados. Os peptídeos foram adicionados, em 8 concentrações diferentes (128 a 1 μ M, diluições de 2 a 2), a poços contendo células micróglia BV-2. Poços contendo apenas células foram utilizados como controle e suas absorbâncias foram consideradas como 100% de viabilidade celular. Adicionalmente, cada placa continha poços com DMSO para controle negativo, e as absorbâncias obtidas através do controle representaram o nível mínimo de viabilidade celular. Os peptídeos foram incubados com as células por 24h a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂ em uma estufa umidificada. Decorrido o tempo de incubação, adicionou-se MTT para uma incubação de

mais 4h, e finalmente a adição de DMSO, homogeneização, centrifugação e leitura das absorvâncias de cada poço.

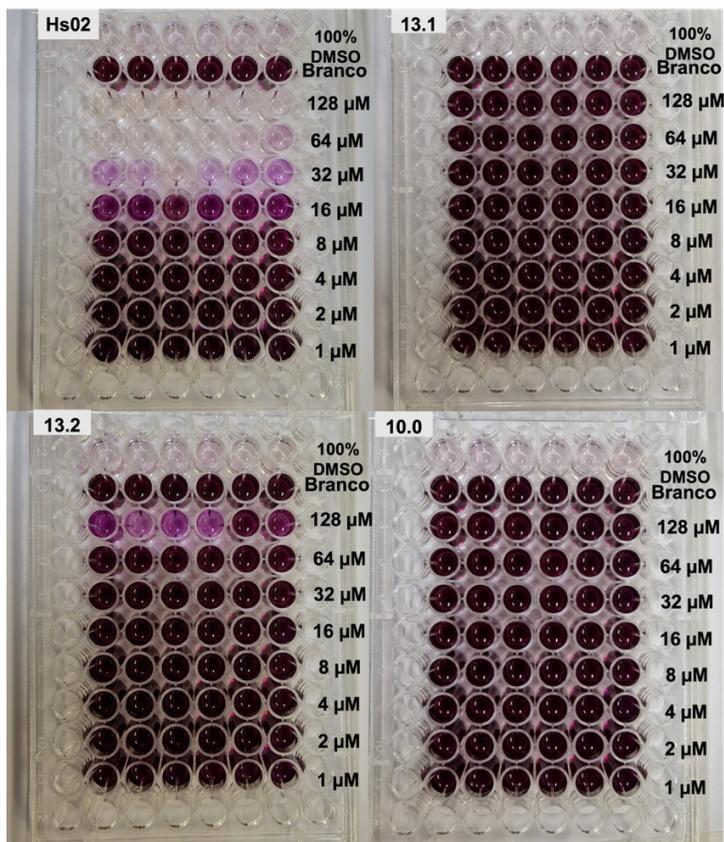


Figura 32: Placas de 96 poços utilizadas para a avaliação de viabilidade celular dos peptídeos analisados. As fotos mostram as placas utilizadas para cada peptídeo nos ensaios de MTT. Os experimentos foram realizados em 6 replicatas (linhas verticais) e com 8 concentrações de peptídeos (linhas horizontais). A intensidade da cor roxa é proporcional a conversão do MTT a formazan pelas mitocôndrias e indica indiretamente a quantidade de células que sobreviveram as 24h de incubação com os peptídeos.

Após a homogeneização dos poços, cada placa foi submetida à leitura das absorvâncias nos comprimentos de 570nm e 650nm. Esses comprimentos de onda foram utilizados pois o formazan formado absorve caracteristicamente em 570nm, mas não em 650 nm. Assim, qualquer variância causada pela turbidez dos poços afetará também as medidas em 650nm, sendo descontada das absorvâncias em 570nm.

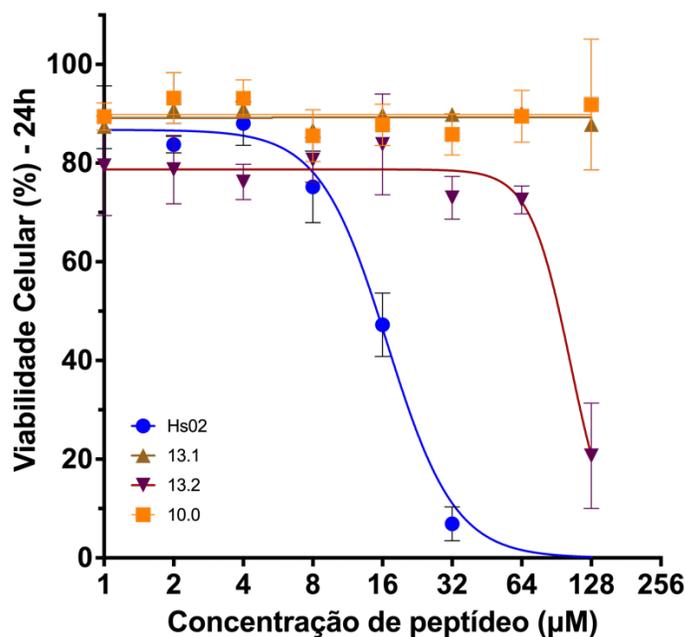


Figura 33: Dados de citotoxicidade celular CC₅₀ em ensaio de viabilidade celular com MTT. Os símbolos representam as porcentagens de células vivas 24h após a incubação com os peptídeos testados, para cada concentração testada. As barras presentes em cada símbolo representam os erros nas porcentagens calculados para cada concentração.

Tabela 5 – Concentrações de CC₅₀ dos 4 peptídeos avaliados nos experimentos de viabilidade celular.

| Peptídeo | CC ₅₀ (µM) |
|-------------|-----------------------|
| Hs02 | 16,80 ± 0,65 |
| 13.1 | >128 |
| 13.2 | 104,0 ± N.D. |
| 10.0 | >128 |

N.D. = Desvio padrão não pôde ser determinado

As absorvâncias medidas em cada poço da placa utilizada foram comparadas com as absorvâncias das soluções com células isentas da adição de qualquer peptídeo e assim se obteve os dados de porcentagem de células por poço. O Hs02 apresentou CC₅₀, concentração de peptídeo que reduziu em 50% a viabilidade celular, igual a 16,80 ± 0,65 µM. Já em relação aos análogos, apenas o 13.2 mostrou toxicidade suficiente para induzir 50% de mortalidade celular durante os ensaios, mas em uma concentração mais de 5 vezes maior do que a do Hs02. Isso representa uma

redução significativa da citotoxicidade nos análogos pela retirada de uma ou ambas as terminações do Hs02.

Para contextualização destes resultados, podemos comparar Hs02 ao peptídeo LL-37, a única catelicidina humana¹². Avaliações de viabilidade celular com a utilização de MTT em uma série de linhas de células demonstraram que esse AMP apresenta valores de CC_{50} na faixa entre 1,7 e 9 μM ⁸². Ao comparar esses resultados com os achados deste estudo, nota-se que mesmo o Hs02 apresenta níveis de citotoxicidade inferiores àqueles exibidos pelo peptídeo do sistema imune inato. Estes dados também revelam que é natural que AMPs possuam alguma citotoxicidade em concentrações micromolares.

A partir da comparação dos resultados dos testes de viabilidade celular com os dados de CD e atividade antimicrobiana dos peptídeos, é viável estabelecer uma correlação entre a ausência de estruturação em vesículas neutras e a redução da citotoxicidade em todos os análogos. Dentre os 4 peptídeos examinados, somente o Hs02 demonstrou estruturação em vesículas de DMPC, e posteriormente demonstrou o valor mais baixo de CC_{50} . Além disso, os menores valores de MIC também são atribuídos ao Hs02, peptídeo que adquiriu o maior percentual de hélice em vesículas de DMPC/DMPG. Com base nesses achados, é possível estabelecer, para o Hs02 e seus análogos, uma conexão entre a estruturação exclusiva em vesículas negativas e a ausência de citotoxicidade, bem como a atividade antimicrobiana, em um grau similar à quantidade de hélice em LUVs negativas.

Apesar de exibirem seletividade, os três análogos revelaram uma diminuição na potência de ação antimicrobiana. A redução no tamanho desses peptídeos em comparação com o Hs02 levanta a hipótese de que o tamanho desempenha um papel importante tanto na citotoxicidade quanto na atividade antimicrobiana. O peptídeo Anoplin, extraído da vespa *Anoplius samariensis*, consiste em um decapeptídeo (GLLKAIKTLL-NH₂), estruturado em alfa-hélice, baixa atividade hemolítica e valores de MIC acima de 50 μM para *E. coli* e 20 μM para *S. aureus*⁸³. Essas características refletem os resultados dos análogos do Hs02, que também possuem tamanho reduzido e maior seletividade que Hs02, mas com menor potência como agentes antimicrobianos.

Com base nessas relações, o peptídeo 13.2 será utilizado como modelo de otimização do Hs02 para o desenho e síntese de novos análogos. Por apresentar uma redução na atividade antimicrobiana, que pode estar associada à diminuição do tamanho do peptídeo original, os novos

análogos serão desenvolvidos com o tamanho original de 16 aminoácidos, mas com redução da hidrofobicidade do C-terminal por meio da substituição de resíduos da estrutura primária por aminoácidos menos hidrofóbicos, uma vez que há na literatura correlações entre hidrofobicidade, citotoxicidade e atividade antimicrobiana⁸⁴.

É esperado que os análogos produzidos a partir dessas modificações continuem com a atividade antimicrobiana direta do Hs02, mas sejam mais seletivos, como o 13.2, e consequentemente menos citotóxicos.

4.4. Síntese, caracterização e purificação da segunda geração de análogos de Hs02

A elevada hidrofobicidade e momento hidrofóbico dos AMPs está relacionada com o aumento na atividade antimicrobiana e citotoxicidade^{81,84}. Com o objetivo de examinar a influência da hidrofobicidade do Hs02 em sua potência e citotoxicidade, foram sintetizados três análogos desta molécula com modificações nos resíduos F14 e I15, presentes na estrutura primária do peptídeo original. Esses resíduos possuem os maiores valores de hidrofobicidade transmembrana (TM) na escala, correspondentes a 19,8 e 19,7, respectivamente.

As substituições realizadas tiveram como objetivo reduzir essa característica, e, para isso, optou-se por utilizar o aminoácido alanina, que possui apenas um grupo metila como cadeia lateral e, portanto, não confere ao aminoácido ampla liberdade de ângulos diedrais, como a glicina. Essa estratégia é semelhante a ‘varredura de alanila’, metodologia de substituição sistemática de todos os resíduos, um a um, de uma proteína para a avaliação da influência de cada resíduo em sua atividade⁸⁵. As fórmulas estruturais dos aminoácidos citados, assim como as estruturas primárias dos novos análogos, estão apresentadas na figura 35, e tabela 6, a seguir.

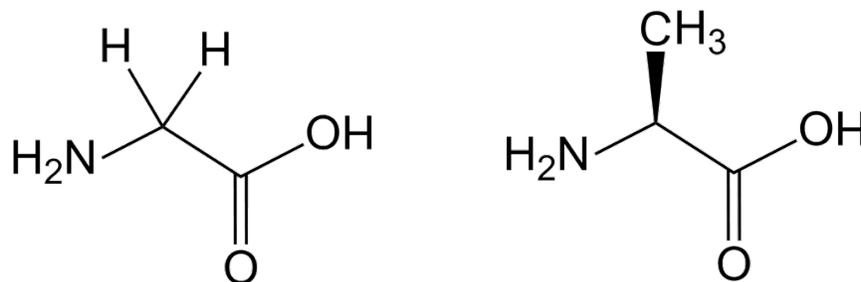


Figura 35: Fórmulas estruturais da Glicina e Alanina. A presença de apenas hidrogênios (e NH₂) no carbono alfa a carbonila desse aminoácido, confere a ele maior liberdade de ângulos diedrais.

Tabela 6: Estruturas primárias da segunda geração de análogos do peptídeo Hs02.

| Nome | Sequência | Massa Monoisotópica (Da) |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Hs02 | KWAVRIIRKFIKGFIS - NH ₂ | 1960,2250 |
| 16.1 | KWAVRIIRKFIKGAIS - NH ₂ | 1884,1937 |
| 16.2 | KWAVRIIRKFIKGFAS - NH ₂ | 1918,1780 |
| 16.3 | KWAVRIIRKFIKGAAAS - NH ₂ | 1842,1467 |

Com as modificações realizadas, seria possível avaliar a influência da hidrofobicidade na seletividade dos AMPs, o que traria informações relevantes ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos no futuro. A tabela 7, a seguir, apresenta as características físico-químicas dos análogos desenvolvidos para a segunda fase do trabalho.

Tabela 7: Parâmetros Físico-Químicos dos peptídeos da segunda geração avaliados pelo software KAMAL.

| | Hs02 | 16.1 | 16.2 | 16.3 |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Massa | 1961,209 | 1885,178 | 1919,162 | 1843,131 |
| Número de Resíduos | 16 | 16 | 16 | 16 |
| Carga Líquida | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Hidrofobicidade* | -0,064 | -0,164 | -0,164 | -0,264 |
| Momento Hidrofóbico* | 1,201 | 1,102 | 1,232 | 1,134 |
| Ponto Isoelétrico | 12,024 | 12,024 | 12,024 | 12,024 |
| Agregação[#] | 39,595 | 28,407 | 30,305 | 19,117 |

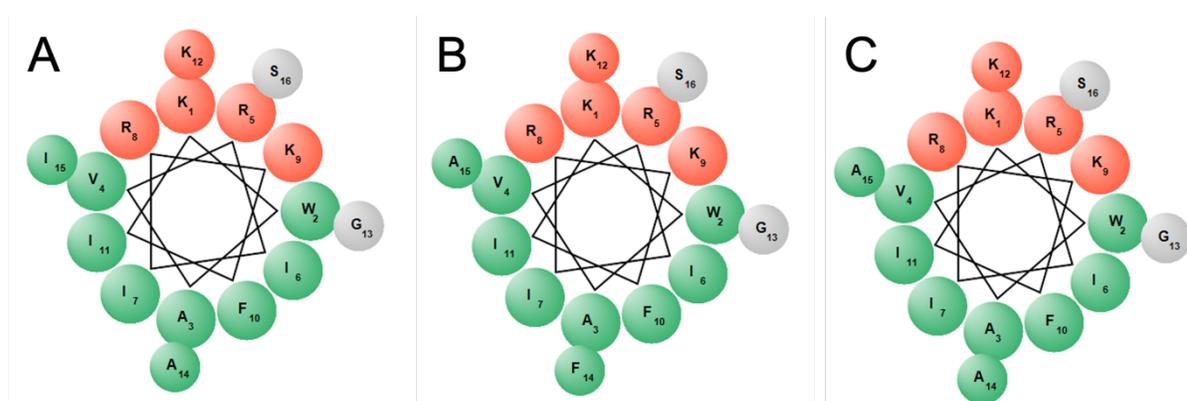


Figura 36 – Projeções helicoidais dos análogos da segunda geração. a) 16.1 (KWAVRIIRKFIKGAIS - NH₂), b) 16.2 (KWAVRIIRKFIKGFAS - NH₂), e c) 16.3 (KWAVRIIRKFIKGAAS - NH₂. Em verde estão representados os aminoácidos hidrofóbicos, em vermelho os polares carregados positivamente e em cinza os aminoácidos polares e/ou neutros.

4.4.1. Síntese dos peptídeos em fase sólida (SPFS)

A síntese em fase sólida dos peptídeos foi realizada apenas para os análogos da segunda geração, pois os análogos 13.1, 13.2 e 10.0 já haviam sido produzidos para trabalhos anteriores do laboratório. Os novos análogos foram sintetizados por meio de síntese em fase sólida utilizando resina Rink Amide como suporte e Oxima®/DIC como agentes de acoplamento para os aminoácidos protegidos por Fmoc. Após cada etapa de acoplamento, foram realizadas desproteções utilizando 20% de 4-metilpiperidina, e todos os procedimentos foram monitorados por meio do teste de Kaiser, conforme previamente descrito neste estudo.

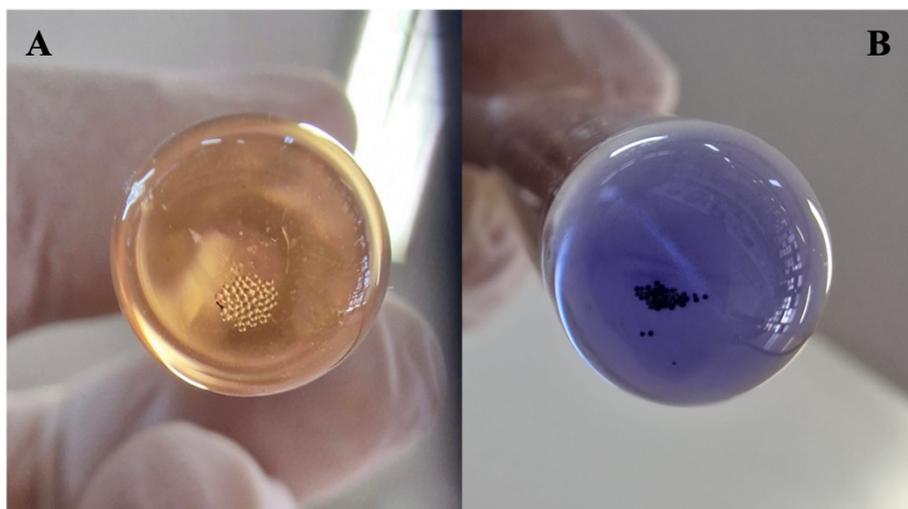


Figura 37: Fotos dos fundos de tubos de ensaio utilizados para realização do teste de Kaiser. Os tubos possuem grãos de resina utilizados na síntese em presença de solução de 5% de ninhidrina em etanol (m/v), 80% de fenol em etanol (m/v) e KCN em piridina. Em A) é possível observar que os grãos de resina continuam translúcidos, indicando que a amina do N-terminal do produto continua protegida. Esse resultado é o esperado para reações de acoplamento. Em B), os grãos estão coloridos com uma coloração roxa, indicando a reação da amina com a ninhidrina. Esse resultado indica a desproteção da amina e é esperado para reações de desproteção.

Após a conclusão de todos os acoplamentos, foi empregada uma solução contendo TFA/Água/Tianisol/Fenol/Etanoditiol (82,5/5/5/5/2,5%; v/v) para a clivagem do peptídeo da resina. Os reagentes utilizados, exceto o TFA, foram escolhidos para evitar reações secundárias dos grupos de proteção recentemente removidos com os aminoácidos do peptídeo. Por sua vez, o TFA foi utilizado para clivar o peptídeo da resina e desproteger os grupos funcionais das cadeias laterais de determinados aminoácidos, tais como lisina, arginina, triptofano, entre outros. As reações de clivagem foram realizadas por 1h30, seguidas de um fluxo de argônio para evaporação do TFA e lavagem com éter diisopropílico gelado, com o objetivo de precipitar o peptídeo. A mistura peptídeo + resina foi submetida a uma filtração utilizando um funil com placa sinterizada. Para extrair o peptídeo, foi adicionada uma solução de acetonitrila/água na proporção de 1:1 (v/v). As amostras foram coletadas em tubos do tipo Falcon e, em seguida, submetidas ao processo de liofilização.

4.4.2. Purificação dos peptídeos sintetizados por SPFS.

Ao finalizar as sínteses dos peptídeos 16.1, 16.2 e 16.3, 20 mg do sólido obtido após a liofilização foram solubilizados em 1 mL de água e introduzidos manualmente no cromatógrafo utilizado para a purificação dos produtos das sínteses. Os cromatogramas foram continuamente monitorados nos comprimentos de onda de 216 nm e 280 nm, e a cada pico observado, alíquotas foram coletadas manualmente para posterior análise espectrométrica. As figuras 38, 39 e 40 exibem os cromatogramas dos análogos sintetizados, destacando os picos de maior intensidade, juntamente com o gradiente de solvente utilizado

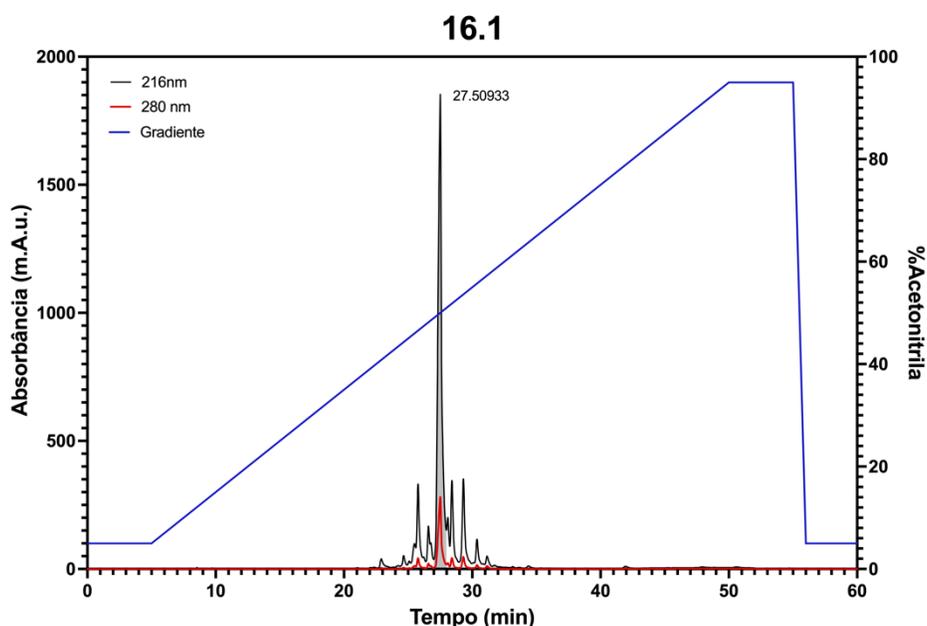


Figura 38: Cromatograma de purificação do análogo 16.1 com gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (linha azul) e água + 0,1% TFA. Os comprimentos de onda monitorados foram 216 nm (linha preta) e 280 nm (linha vermelha), correspondentes a absorção da ligação peptídica e cadeia lateral do Triptofano (W), respectivamente. O pico destacado em cinza representa a provável eluição do peptídeo, em $t = 27,51$ min.

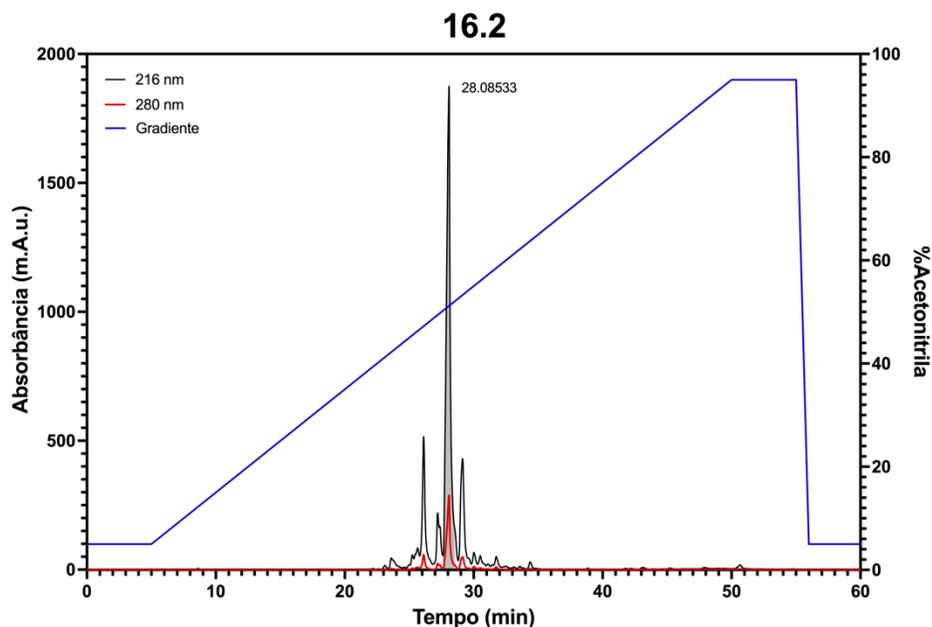


Figura 39: Cromatograma de purificação do análogo 16.2 com gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (linha azul) e água + 0,1% TFA. Os comprimentos de onda monitorados foram 216 nm (linha preta) e 280 nm (linha vermelha), correspondentes a absorção da ligação peptídica e cadeia lateral do Triptofano (W), respectivamente. O pico destacado em cinza representa a provável eluição do peptídeo, em $t = 28,085$ min.

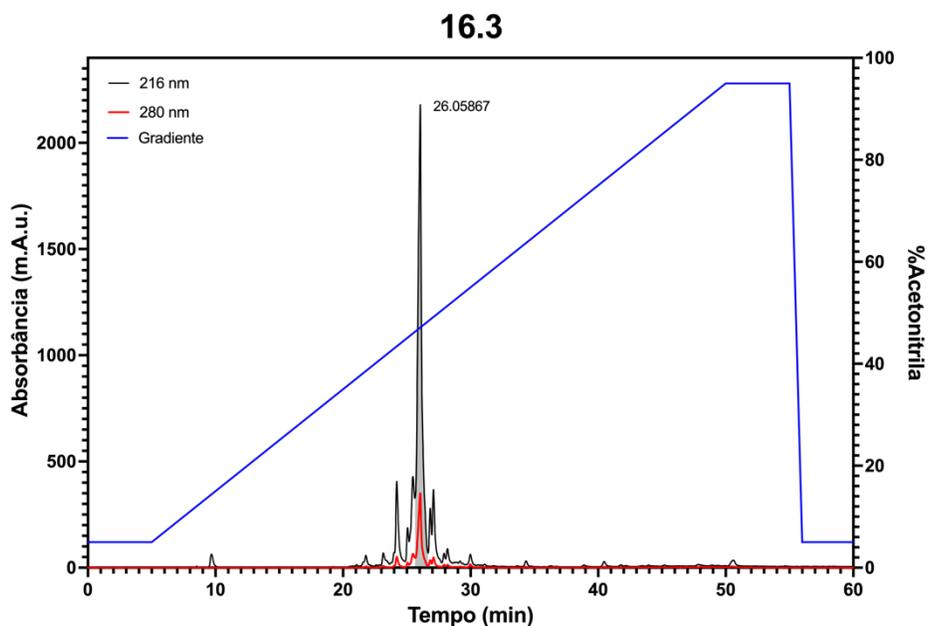


Figura 40: Cromatograma de purificação do análogo 16.3 com gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (linha azul) e água + 0,1% TFA. Os comprimentos de onda monitorados foram 216

nm (linha preta) e 280 nm (linha vermelha), correspondentes a absorção da ligação peptídica e cadeia lateral do Triptofano (W), respectivamente. O pico destacado em cinza representa a provável eluição do peptídeo, em $t = 26,06$ min.

A cromatografia de fase reversa permite a separação dos compostos presentes em uma solução com base nas diferentes afinidades desses compostos pela fase estacionária. Essa abordagem faz com que os compostos mais hidrofóbicos, que possuem maior afinidade pela fase estacionária, levem mais tempo para serem eluídos pelo solvente polar e deixarem a coluna. Para o presente trabalho, uma coluna com sílica C18 (sílica acoplada a cadeias alifáticas e saturadas de 18 carbonos) e um gradiente de água e acetonitrila foram utilizados como fase estacionária e fase móvel, respectivamente.

Os resultados das purificações indicam que as diferenças nos tempos de retenção das frações de interesse correspondem com as modificações realizadas na estrutura primária do peptídeo. De acordo com os cálculos do KAMAL, os peptídeos 16.1 e 16.2 exibem valores iguais de hidrofobicidade, ambos a $-0,164$. Os tempos de retenção dos maiores picos nas purificações desses dois peptídeos divergem pouco (16.1: $t = 27,5$ min; 16.2: $t = 28,1$ min). Por outro lado, o peptídeo 16.3, a molécula sintetizada com menor hidrofobicidade ($-0,264$), deve apresentar a menor afinidade pela fase estacionária e, conseqüentemente, apresentou um pico de eluição com o menor tempo ($t = 26,06$ min). Esses resultados representam evidências de que os análogos produzidos possuem pequenas diferenças nas suas interações com a fase estacionária da coluna, indicando potenciais alterações em suas afinidades com outros substratos apolares ou anfifílicos, como lipídeos.

Após coletar as frações de interesse, o solvente de cada uma foi removido novamente através do processo de liofilização. Em seguida, parte das amostras foram ressolubilizadas para a análise e caracterização por espectrometria de massas.

4.4.3. Caracterização e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas.

Com o intuito de confirmar o êxito das sínteses e purificações realizadas, as frações coletadas e liofilizadas foram submetidas à análise em um espectrômetro de massas equipado com ionização por *Electrospray (ESI)* e analisador do tipo Q-ToF. As razões teóricas m/z dos peptídeos foram calculadas por meio da ferramenta online *Peptide Mass Calculator* (<http://rna.rega.kuleuven.be/masspec/pepcalc.htm>).

As figuras 41, 43 e 45 apresentam os picos referentes às razões massa/carga (m/z) dos peptídeos analisados a partir de íons com dupla e tripla carga. Os erros foram calculados em ppm e também estão apresentados nas figuras a seguir.

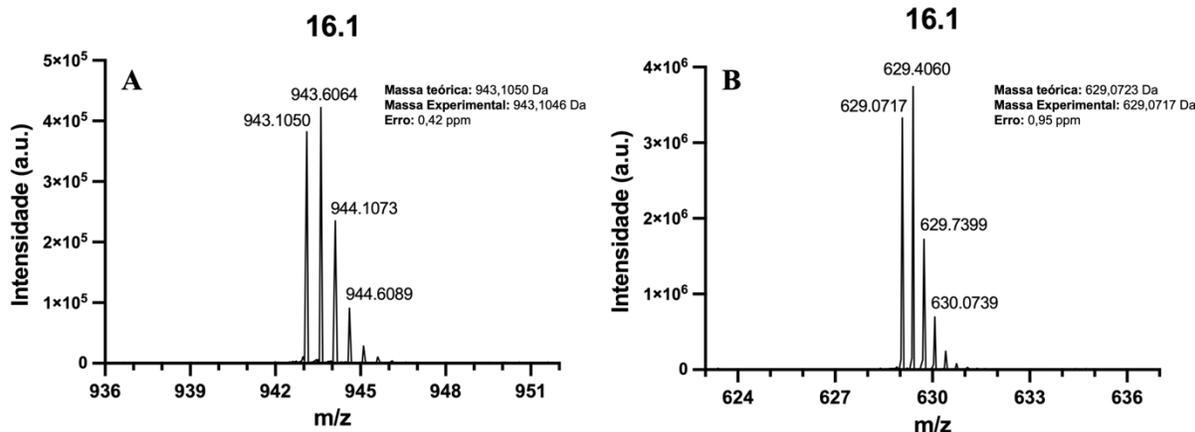


Figura 41: Espectros de massas adquiridos por Electrospray (ESI) do peptídeo 16.1, com os íons (A) $[M+2H]^{2+}$, íon molecular com dupla carga; e (B) $[M+3H]^{3+}$, íon molecular com tripla carga. A série de picos em cada espectro indica uma série isotópica dos íons moleculares identificados. A diferença de 0,5 Da em A, entre as razões massa/carga (m/z), e em B de aproximadamente 0,333 Da, aponta a presença de íons moleculares com duas e três cargas, respectivamente. Isso ocorre pois o segundo pico indica a presença de um isótopo com acréscimo de 1 Da nos íons moleculares, assim como o terceiro indica a presença de dois, e assim por diante. A presença de duas cargas divide essa diferença entre as razões m/z por dois, e a de 3 a torna um terço da original.

Para avaliar as estruturas secundárias dos íons analisados, selecionaram-se esses íons utilizando o modo IDA, a fim de submetê-los à fragmentação em um experimento MS/MS. As figuras 42, 44 e 46 exibem os dados obtidos por meio desses experimentos e posteriormente processados pela plataforma online *Interactive Peptide Spectral Annotator*.

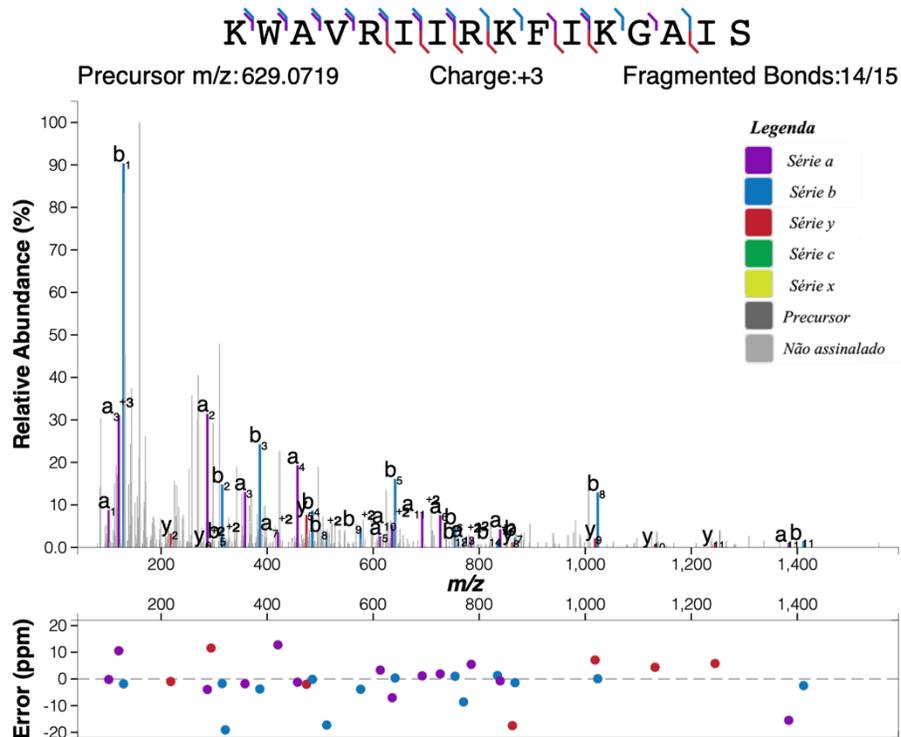


Figura 42: Espectros de fragmentação (MS/MS), obtidos por ESI em modo Information Dependent Acquisition (IDA) do íon $[M+3H]^{3+}$ do análogo 16.1. O processamento do espectro foi realizado através da plataforma online *Interactive Peptide Spectral Annotator*. A figura apresenta, na parte superior, a estrutura primária do peptídeo analisado com a relação de cada série de fragmentação (legenda) e os respectivos picos do espectro. Na região inferior da figura estão representados os erros associados a cada fragmento identificado no experimento de MS/MS

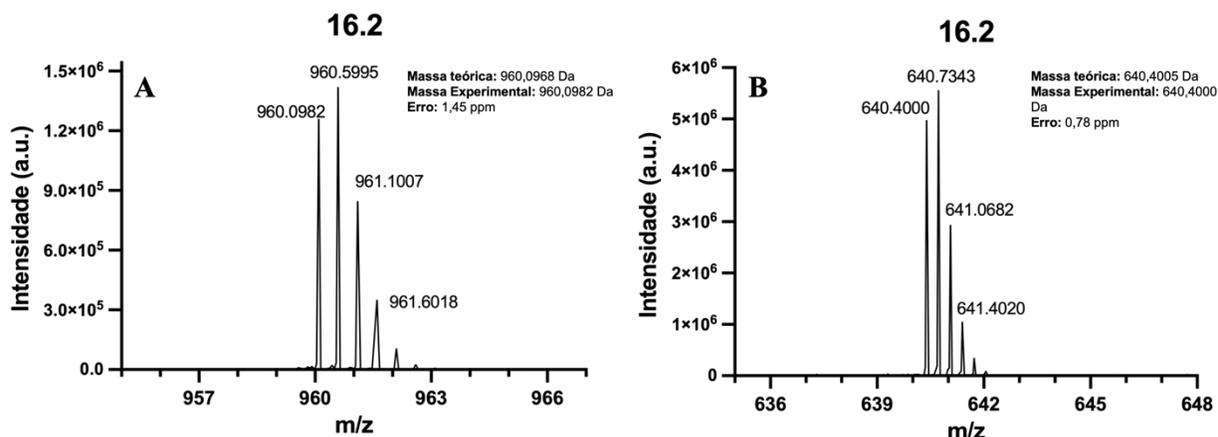


Figura 43: Espectros de massas adquiridos por Electrospray do peptídeo 16.2, com os íons (A) $[M+2H]^{2+}$, íon molecular com dupla carga; e (B) $[M+3H]^{3+}$, íon molecular com tripla carga.

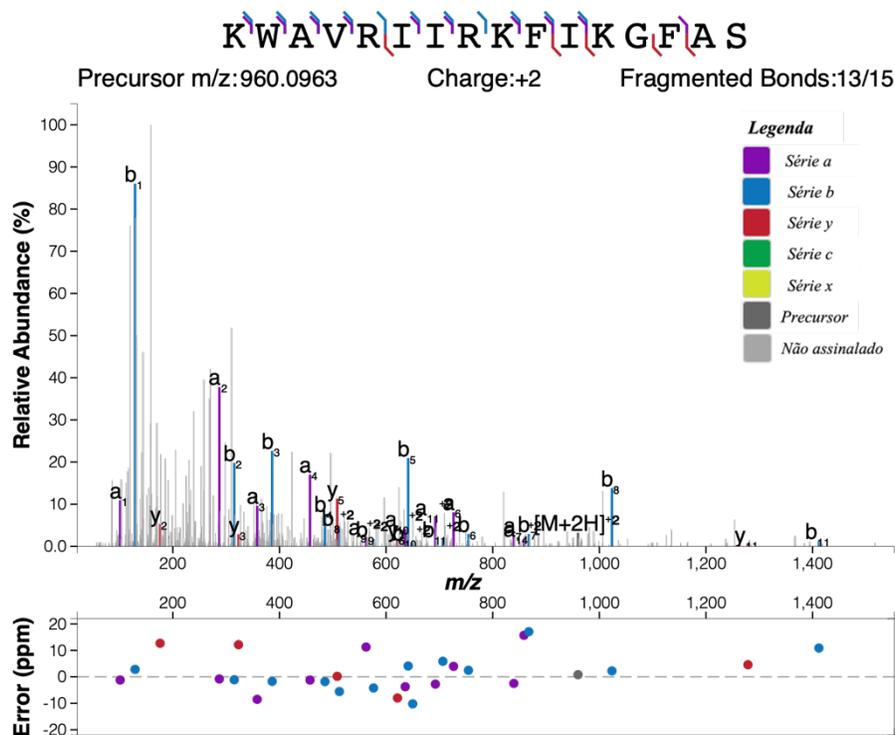


Figura 44: Espectros de fragmentação (MS/MS), obtidos por ESI em modo Information Dependent Acquisition (IDA) do íon $[M+2H]^{2+}$ do análogo 16.2. A figura apresenta, na parte superior, a estrutura primária do peptídeo analisado com a relação de cada série de fragmentação (legenda) e os respectivos picos do espectro. Na região inferior da figura estão representados os erros associados a cada fragmento identificado no experimento de MS/MS

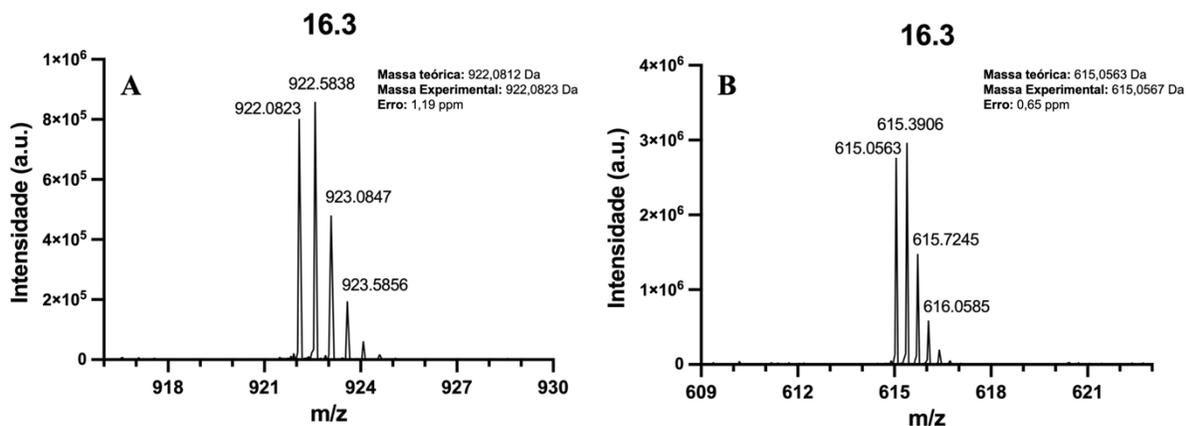


Figura 45: Espectros de massas adquiridos por Electrospray do peptídeo 16.1, com os íons (A) $[M+2H]^{2+}$, íon molecular com dupla carga; e (B) $[M+3H]^{3+}$, íon molecular com tripla carga.

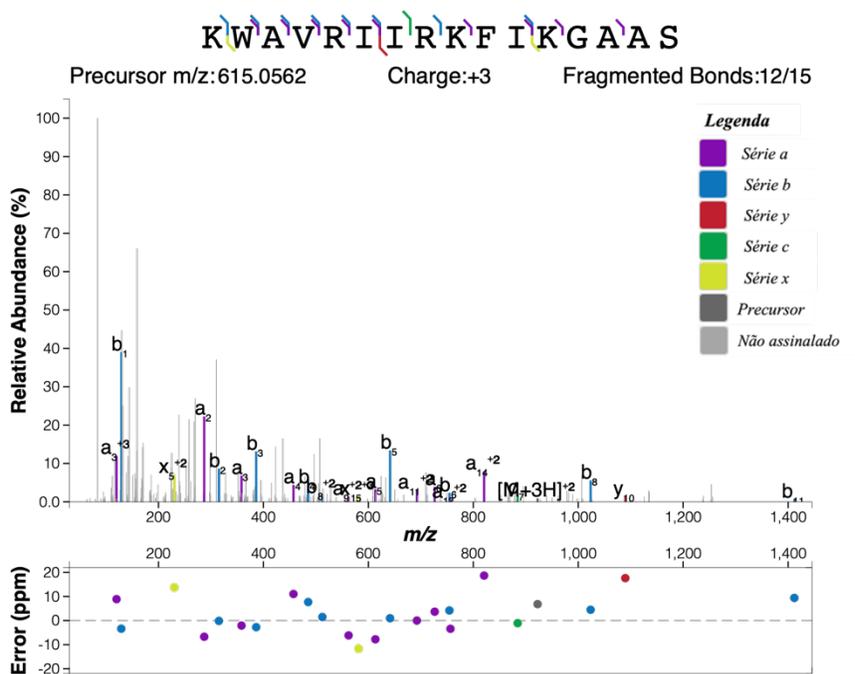


Figura 46: Espectros de fragmentação (MS/MS), obtidos por ESI em modo Information Dependent Acquisition (IDA) do íon $[M+3H]^{3+}$ do análogo 16.3. A figura apresenta, na parte superior, a estrutura primária do peptídeo analisado com a relação de cada série de fragmentação (legenda) e os respectivos picos do espectro. Na região inferior da figura estão representados os erros associados a cada fragmento identificado no experimento de MS/MS

As séries de fragmentação utilizadas para elucidar a estrutura dos íons analisados representam padrões de quebras que ocorrem na cadeia principal dos peptídeos. Por exemplo, as séries b e y representam fragmentações da molécula a partir da quebra da ligação peptídica entre um aminoácido e outro. A figura 47 foi incluída a seguir como uma ilustração das várias séries de fragmentação observadas nas proteínas.

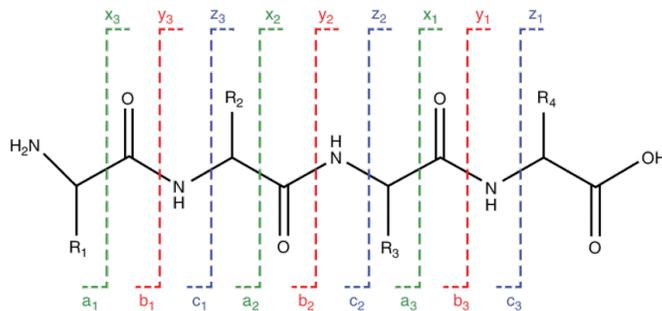


Figura 47: Séries de fragmentação da cadeia principal dos peptídeos. As linhas tracejadas indicam a localização da quebra de ligação para cada tipo de série. Em verde, as séries *x* e *a* representam fragmentos do peptídeo com a quebra da ligação entre o carbono alfa e o carbono carbonílico. Em vermelho, temos a quebra da ligação peptídica nas séries *y* e *b*. Por fim, em azul, temos a separação do nitrogênio amídico e o carbono alfa nas séries *z* e *c*. É importante ressaltar que cada par de série é complementar entre si e representa a mesma fragmentação, mas com a carga em lados opostos da quebra. Figura retirada da referência 86⁸⁶.

Em relação às séries de fragmentação, é comum não identificar todos os fragmentos possíveis da estrutura peptídica, assim como nem todos os íons presentes no espectro pertencem às séries apresentadas. Frequentemente, as fragmentações podem ocorrer em conjunto com as cadeias laterais dos aminoácidos, resultando em massas diferentes das características de cada série. Além disso, é importante notar que as fragmentações podem ocorrer com múltiplas cargas. Isso implica que o *software* pode não identificar fragmentos com carga dupla caso tenhamos selecionado a opção de fragmentação com carga tripla, por exemplo. Portanto, as informações obtidas a partir das análises espectrométricas dos peptídeos confirmam o sucesso das sínteses realizadas assim como identificam os produtos presentes nas frações de interesse obtidas por cromatografia.

Após a conclusão da síntese, purificação e identificação dos análogos da segunda geração, foi possível prosseguir com a realização dos experimentos para avaliação das modificações

efetuadas. Dessa forma, pôde-se examinar se houve alguma alteração na seletividade dos peptídeos para células procarióticas.

4.5. Avaliação da estrutura secundária da segunda geração de análogos do Hs02, por Dicroísmo Circular em concentrações crescentes de vesículas unilamelares grandes (LUVs).

Com o intuito de avaliar a estrutura secundária dos peptídeos da segunda geração de análogos em presença de Vesículas Unilamelares Grandes (LUVs), foram realizadas titulações dos peptídeos com dois tipos de LUVs: Dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC); e Dimiristoil fosfatidilcolina/Dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPC/DMPG), na proporção de 2:1 m/m. As concentrações utilizadas foram 0, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 e 2000 μM , e os resultados estão apresentados nas figuras 48, 49 e 50.

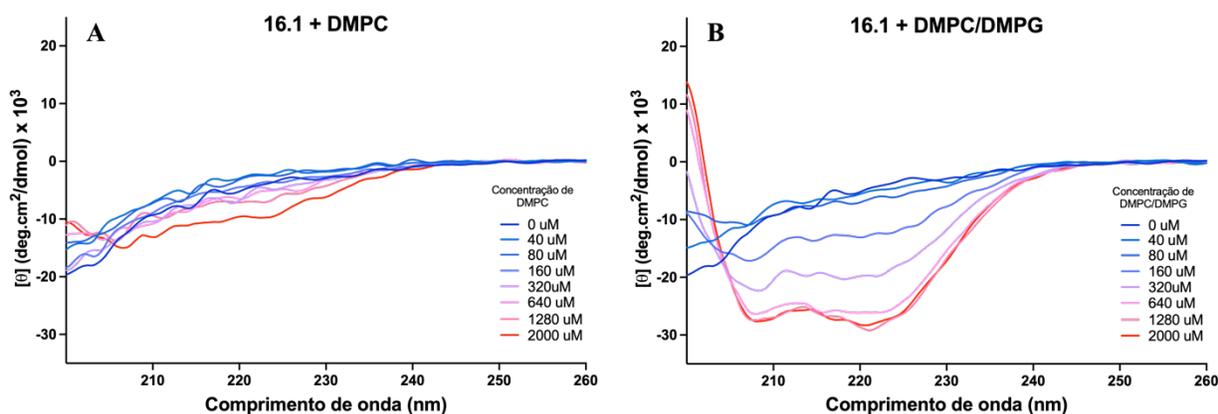


Figura 48: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo 16.1, a 40 μM , em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. As curvas representam os espectros adquiridos em concentrações crescentes de cada LUV: 0 μM , 40 μM , 80 μM , 160 μM , 320 μM , 640 μM , 1280 μM e 2000 μM .

Os resultados das titulações de LUVs de DMPC e DMPC/DMPG em soluções de concentração constante do peptídeo 16.1 são apresentados na figura 48. Na figura 48A, observa-se que, assim como os análogos da primeira geração, não houve estruturação definida em nenhuma das 6 primeiras concentrações de LUVs, apenas na concentração de 2000 μM . Por outro lado, na figura 48B, o espectro de Dicroísmo Circular do peptídeo em presença de concentrações crescentes de vesículas negativas (DMPC/DMPG) revelou a estruturação gradual em alfa-hélice de acordo com a adição de LUVs. Esses resultados contrastam com os espectros obtidos para o peptídeo original Hs02 e sugerem que a modificação na hidrofobicidade da molécula, gerada pela troca de

apenas um resíduo de aminoácido, já é suficiente para alterar significativamente a afinidade da molécula por vesículas neutras.

A Figura 49, a seguir, apresenta os espectros de CD para o segundo análogos sintetizado, o 16.2.

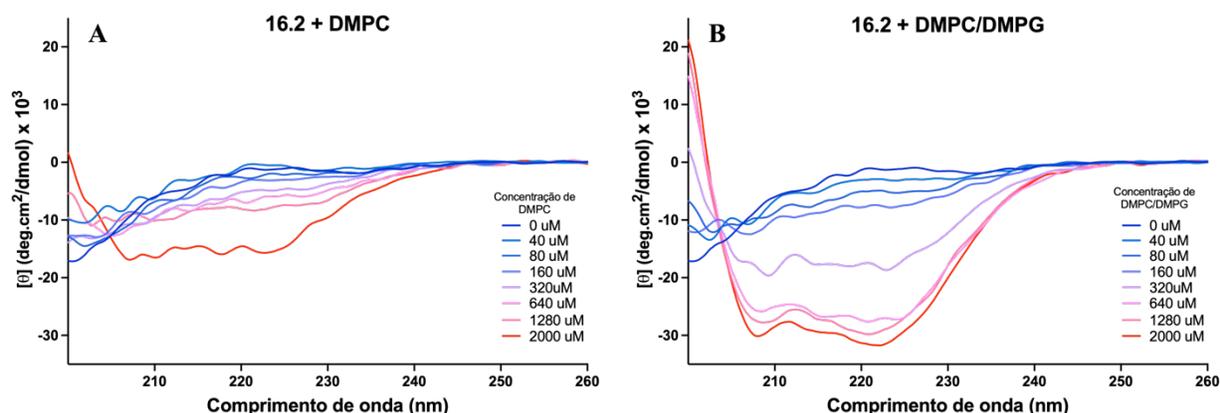


Figura 49: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo 16.2, a 40 μ M, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. As curvas representam os espectros adquiridos em concentrações crescentes de cada LUV: 0 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M, 640 μ M, 1280 μ M e 2000 μ M.

Conforme observado no peptídeo 16.1, o segundo análogo apresentou resultados semelhantes nas concentrações iniciais de DMPC. Contudo, para a concentração de 2000 μ M de LUVs, o espectro revelou mínimos próximos aos comprimentos de onda característicos da hélice, sugerindo maior estruturação em concentrações elevadas de LUVs neutras. Esses resultados corroboram a hipótese de que a estruturação do Hs02 em vesículas neutras é principalmente influenciada pela hidrofobicidade da molécula, uma vez que a alteração de cada um dos dois resíduos hidrofóbicos reduziu a estruturação em DMPC.

Adicionalmente, a diferença na estruturação apresentada pelo peptídeo 16.2 sugere que o anel aromático da cadeia lateral da fenilalanina (F14) se insere entre os fosfolipídios⁸⁷, resultando em uma aproximação do peptídeo a um ambiente anfifílico e conseqüentemente promovendo sua estruturação. Essa interação é inexistente no peptídeo 16.1, que possui substituição do resíduo F14 por alanina, o que pode explicar a diferença em sua estruturação na presença de LUVs.

Para avaliar a influência dos resíduos F14 e I15 na estrutura primária do Hs02, o peptídeo 16.3 foi sintetizado com a substituição de ambos os resíduos da última volta de hélice por Alanina. Os espectros de dicroísmo circular desse análogo em presença de vesículas neutras e negativas estão apresentados na figura 50.

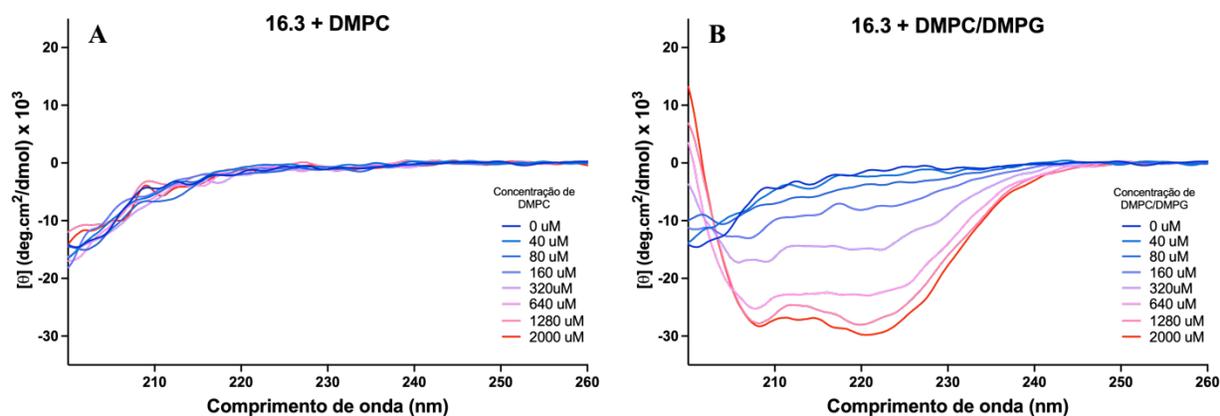


Figura 50: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo 16.3, a 40 μ M, em concentrações crescentes de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. As curvas representam os espectros adquiridos em concentrações crescentes de cada LUV: 0 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M, 640 μ M, 1280 μ M e 2000 μ M.

Ao contrário dos dados obtidos para os outros dois análogos, o espectro de CD para o peptídeo 16.3 em DMPC (Figura 50A) não sugere estruturação definida nem nas maiores concentrações de LUVs neutras. Em vesículas negativas, assim como os outros análogos da segunda geração, o espectro do terceiro análogo sintetizado contém mínimos em 208 e 222 nm, típicos de estruturas helicoidais. Esse fato sugere que a formação de estruturas secundárias no Hs02 e seus análogos 16.1, .2 e .3 é determinada principalmente pelas forças eletrostáticas, considerando a elevada cationicidade das moléculas e a carga negativa presente no fosfato das vesículas de DMPG.

O aumento no momento hidrofóbico de um peptídeo através da troca de resíduos é reportado na literatura^{81,84}, e está correlacionado com o aumento na afinidade dos peptídeos por vesículas neutras. Os resultados obtidos a partir da espectroscopia de Dicroísmo Circular concordam em parte com essa correlação, uma vez que o peptídeo 16.2 possui o maior momento hidrofóbico entre os três análogos da segunda geração, e conseqüentemente a maior afinidade com

LUVs de DMPC. No entanto, o peptídeo 16.3, apesar de apresentar um momento intermediário, foi o que demonstrou menor estruturação em LUVs neutras. Essa discrepância pode estar relacionada ao fato de que as hidrofobicidades dos três peptídeos são diferentes, o que dificulta a comparação de mudanças nas afinidades baseadas apenas em uma única variável.

Os espectros de Dicroísmo Circular adquiridos para esses peptídeos em presença de vesículas unilamelares grandes indicam que a alteração de dois dos 3 aminoácidos do C-terminal (peptídeo 16.3) foi a modificação que mais alterou a afinidade da molécula por LUVs neutras. Em relação às vesículas carregadas negativamente, os 3 análogos apresentaram comportamento semelhante ao do Hs02 e, a figura 51 contém a comparação entre os 7 peptídeos utilizados no trabalho, nas maiores concentrações de vesículas testadas.

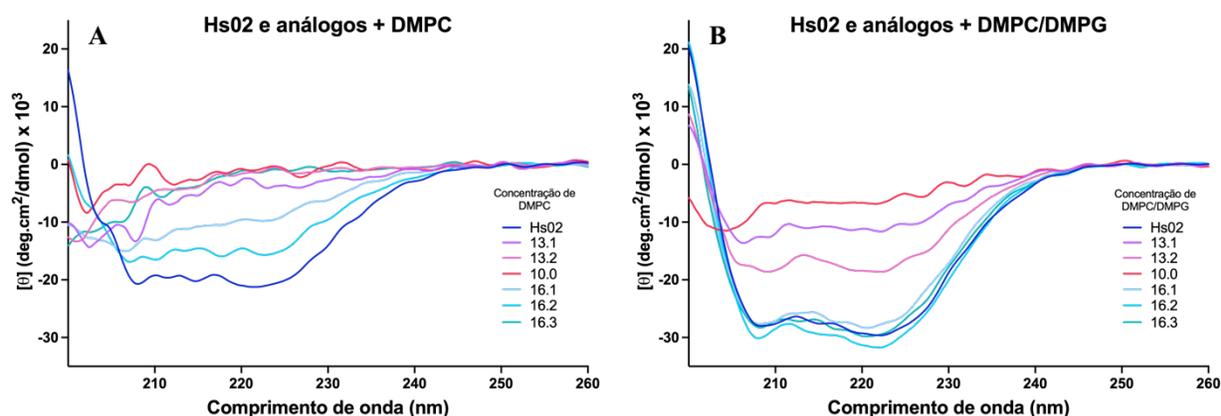


Figura 51: Espectros de Dicroísmo Circular de 40 μ M de Hs02 e seus 6 análogos em 2000 μ M de A) DMPC e B) DMPC/DMPG 2:1. As curvas representam os espectros de CD do Hs02 (linha azul), 13.1, 13.2, 10.0; e 16.1, 16.2 e 16.3.

A comparação entre os espectros de todos os peptídeos avaliados evidencia as diferenças em suas estruturações decorrentes das alterações realizadas. Esses resultados demonstram que a elevada hidrofobicidade do Hs02 desempenha um papel fundamental na interação e subsequente formação de uma alfa-hélice anfipática, estrutura responsável pela introdução do peptídeo nas bicamadas fosfolipídicas neutras. A realização de ensaios de viabilidade celular com esses novos análogos permitirá determinar a real influência da formação de hélices na mortalidade de células eucarióticas, mimetizadas pelas vesículas de DMPC.

Com o objetivo de obter dados quantitativos a respeito da estruturação dos peptídeos da segunda geração de análogos, os espectros de cada concentração de cada peptídeo em cada uma

das vesículas foram carregados na plataforma online *BeStSel*. O algoritmo utilizado pela plataforma estima as porcentagens de estrutura presente em uma solução peptídica a partir do ajuste de curva com oito parâmetros referentes a diferentes estruturas secundárias⁷². Os resultados gerados pela entrada dos espectros na plataforma estão apresentados na integra no anexo 2, e a compilação das porcentagens de hélice para cada peptídeo são apresentadas na figuras 52, assim como os resultados dos cálculos da constante de dissociação aparente do peptídeo com a vesícula ($K_{d,app}$) então apresentados na Tabela 8.

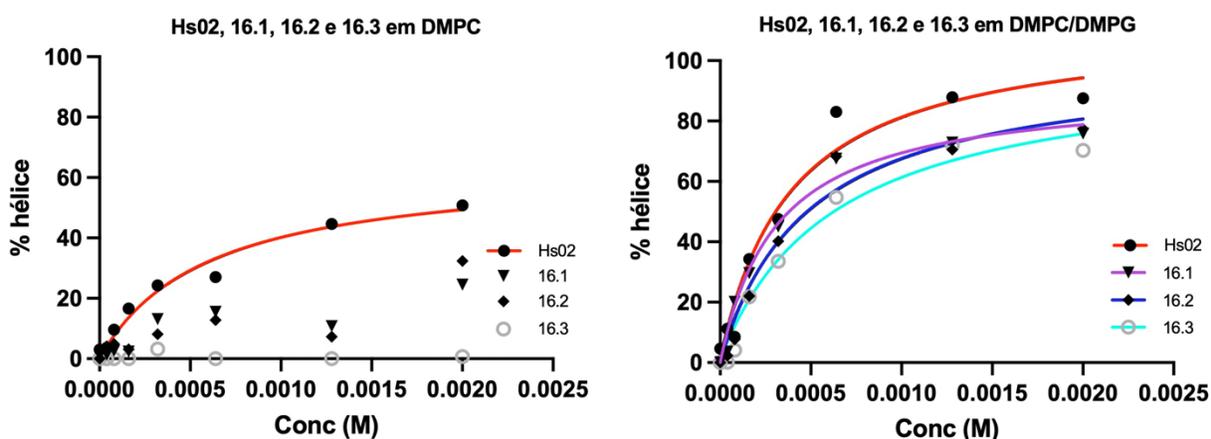


Figura 52: Porcentagens de Hélice para o Hs02, 16.1, 16.2 e 16.3, a 40 μ M, nas concentrações de 40 μ M, 80 μ M, 160 μ M, 320 μ M, 640 μ M, 1280 μ M e 2000 μ M de DMPC e DMPC/DMPG. As porcentagens de hélice foram calculadas utilizando a plataforma online *BeStSel*, assim como descrito na metodologia.

Tabela 8: Constantes de Dissociação dos peptídeos Hs02, 16.1, 16.2 e 16.3 em DMPC e DMPC/DMPG

| Peptídeos | Constante de Dissociação ($K_{D,app}$) em μ M | |
|-------------|---|---------------|
| | DMPC | DMPC/DMPG |
| Hs02 | 590 \pm 157 | 391 \pm 116 |
| 16.1 | - | 325 \pm 61 |
| 16.2 | - | 497 \pm 148 |
| 16.3 | - | 631 \pm 187 |

As porcentagens de hélice calculadas para os análogos da segunda geração na presença de LUVs de DMPC são semelhantes aos dados obtidos para os peptídeos 13.1, 13.2 e 10.0, em que

ambos os grupos não apresentaram menor e/ou nenhuma estruturação após titulação com vesículas neutras. Esses resultados indicam uma perda de afinidade dos novos análogos aos fosfolipídios neutros, e considerando que as modificações realizadas afetaram as estruturas primárias das moléculas, sugere-se que a hidrofobicidade do Hs02 é o principal fator responsável pela estruturação do peptídeo em ambiente anfifílico neutro.

Entre os 3 análogos da segunda geração, todos apresentaram constantes de dissociação aparentes próximas ao do Hs02 para vesículas de DMPC/DMPG. Enquanto Hs02 teve $K_{d,app}$ $3,9 \times 1,2 \cdot 10^{-4}$ M, os valores foram $3,2 \times 0,6 \cdot 10^{-4}$ M, $5,0 \times 1,5 \cdot 10^{-4}$ M e $6,3 \times 1,9 \cdot 10^{-4}$ M para 16.1, 16.2 e 16.3, respectivamente. Essa observação indica que as substituições feitas em Hs02 impactaram mais em sua afinidade por LUVs de DMPC do que por LUVs de DMPC/DMPG.

4.6. Avaliação da estrutura secundária por Dicroísmo Circular dos análogos 16.1, 16.2 e 16.3 na presença de Lipopolissacarídeo.

As estruturas secundárias dos análogos da segunda geração do Hs02 foram também avaliadas na presença de concentrações crescentes de LPS. As concentrações testadas variaram entre 3,56 μ M e 14,24 μ M de lipopolissacarídeo em presença de 40 μ M de cada peptídeo. Os resultados estão apresentados nas Figuras 53 e 54.

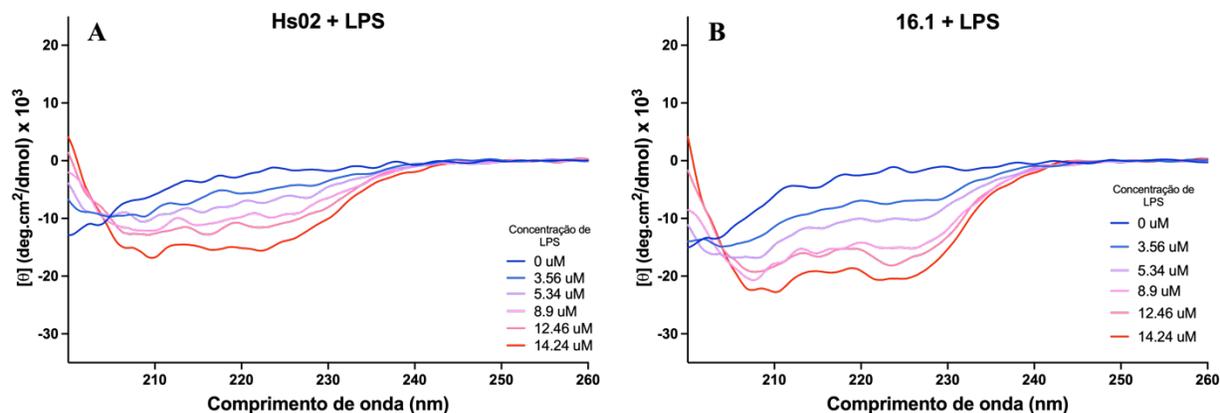


Figura 53: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo A) Hs02 e B) 16.1, a 40 μ M, em concentrações crescentes de LPS. As curvas representam os espectros adquiridos em concentrações crescentes de LPS: 0 μ M, 3.56 μ M, 5.34 μ M, 8.9 μ M, 12.46 μ M e 14.24 μ M.

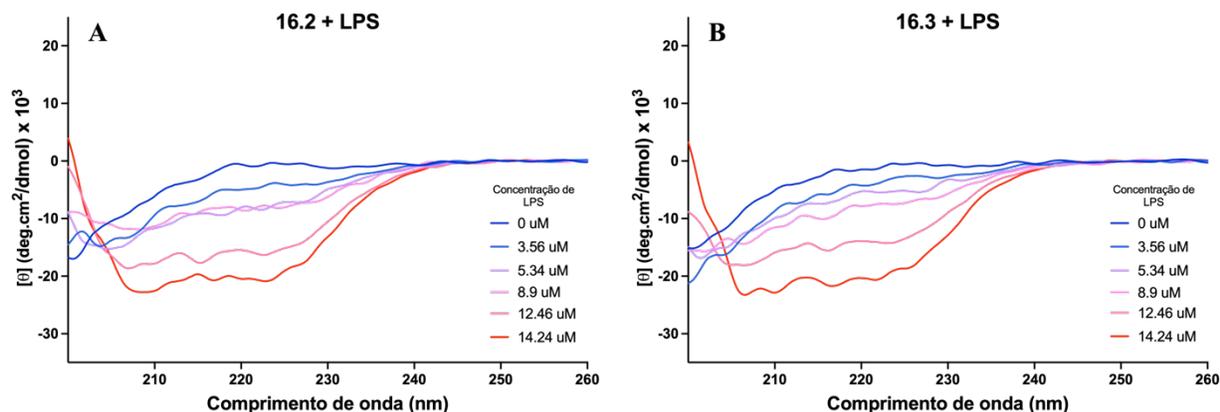


Figura 54: Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo A) 16.2 e B) 16.3, a 40 μ M, em concentrações crescentes de LPS. As curvas representam os espectros adquiridos em concentrações crescentes de LPS: 0 μ M, 3.56 μ M, 5.34 μ M, 8.9 μ M, 12.46 μ M e 14.24 μ M.

A estruturação dos 3 análogos seguiu um padrão com o máximo de estruturação em 14,24 μ M de LPS. No entanto, a comparação dos espectros obtidos para esses peptídeos e para o Hs02 evidencia que o IAP original não estruturou tanto quanto seus análogos. A Figura 55 contém apenas as curvas obtidas por CD para a maior concentração de cada peptídeo.

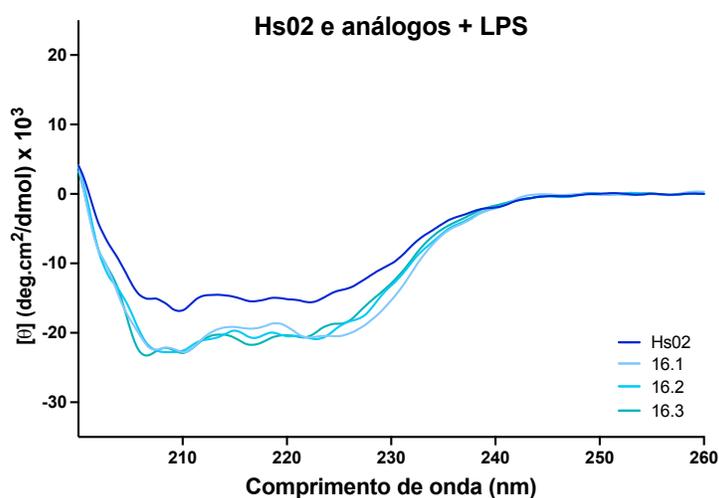


Figura 55: Espectros de Dicroísmo Circular de 40 μ M de Hs02 e seus 3 análogos em 14.24 μ M de LPS. As curvas representam os espectros de CD do Hs02, 16.1, 16.2 e 16.3.

O Hs02 é um IAP que exibe uma potente atividade anti-inflamatória⁵². Seu mecanismo de ação é supostamente mediado pelo sequestro de LPS, o que por sua vez impede a transferência dessa molécula para a proteína LPB, evitando assim a deflagração da resposta inflamatória⁴⁹. Nesse contexto, as estruturações observadas nos análogos indicam que essas moléculas possuem uma afinidade ainda mais acentuada pelo LPS, sugerindo assim um potencial aumento da atividade anti-inflamatória.

Tanto nos análogos da primeira, quanto segunda geração, não foi possível calcular a afinidade deles pelo K_D, pois as concentrações de LPS empregadas nos experimentos não foram suficientes para induzir a estruturação máxima dos peptídeos. Para uma determinação quantitativa precisa da afinidade dessas substâncias, novos experimentos deverão ser conduzidos com níveis mais elevados de Lipopolissacarídeo.

4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana dos análogos 16.1, 16.2 e 16.3.

O Hs02 é um peptídeo intragênico e apresenta um amplo espectro de atividade antimicrobiana⁵². Para avaliar como as mutações introduzidas no C-terminal dos análogos de Hs02 afetaram sua atividade antimicrobiana, foram realizados ensaios de determinação de Concentrações Inibitórias Mínimas com 5 bactérias e entre elas, as três primeiras bactérias listadas na Tabela 2, da seção de Introdução. O objetivo é comparar as atividades do peptídeo original e todos os seus análogos utilizados neste trabalho. Os resultados dos experimentos estão apresentados na tabela 9, a seguir.

Tabela 9: Valores de MIC (µM) referente a ação dos peptídeos Hs02 e as duas gerações de análogos contra cepas de bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

| Peptídeos | Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) (µM) | | |
|-------------|--|---------------------------------|-----------------------------|
| | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |
| Hs02 | 1 | 2 | 1,67± 0,6 |
| 13.1 | 64 | 16 | 21,33 ± 9,23 |
| 13.2 | 32 | 16 | 16 |
| 10.0 | >128 | >128 | >128 |
| 16.1 | 2,3 ± 0,7 | 2 | 2 |
| 16.2 | 2,3 ± 0,7 | 2,3 ± 0,7 | 2,7 ± 0,9 |
| 16.3 | 3 ± 1 | 3,7 ± 0,7 | 8 |

Obs.: Quando não apresentados, os desvios padrões são iguais a zero.

Os MICs obtidos indicam que as alterações nos resíduos do C-terminal do Hs02 afetaram pouco sua atividade antimicrobiana, diferentemente do que ocorreu com a primeira geração de análogos. Os três peptídeos apresentaram atividades semelhantes frente a *E. coli* e *P. aeruginosa*, enquanto o 16.3 apresentou a menor potência frente a *S. aureus*.

Além das determinações de MIC com *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, os ensaios de avaliação de atividade antimicrobiana também foram realizados com outras duas bactérias Gram-negativas adicionais, *K. pneumoniae* e *A. baumannii*. Os resultados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Valores de MIC (μM) referente a ação dos peptídeos 16.1, 16.2 e 16.3 contra cepas de bactérias *K. pneumoniae* e *A. baumannii*.

| Peptídeos | Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) (μM) | |
|-----------|---|--------------------------------|
| | <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883 | <i>A. baumannii</i> ATCC 13304 |
| 16.1 | 2 | 2,3 \pm 0,7 |
| 16.2 | 3 \pm 1 | 3,7 \pm 0,7 |
| 16.3 | 9,3 \pm 2,9 | 5 \pm 2,2 |

As atividades antimicrobianas dos análogos frente às duas bactérias Gram-negativas testadas seguem o mesmo padrão observado nos MICs contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os peptídeos 16.1 e 16.2 apresentam maior atividade microbicida em comparação com o 16.3. Esses dados convergem com os resultados de Dicroísmo Celular obtidos na presença de LUVs negativas, nos quais o 16.3 apresentou a maior constante de dissociação aparente (embora a diferença não seja significativa), ou seja, menor afinidade por vesículas negativas. Essa diferença entre os análogos pode ser atribuída à maior hidrofobicidade dos dois primeiros análogos em comparação com o terceiro. Novamente, é indicado que a hidrofobicidade ideal para um AMP seletivo não possa ser excessivamente baixa, uma vez que essa característica parece desempenhar um papel crucial nos mecanismos de ação antimicrobiana. Isso é exemplificado pelo estudo realizado pelo grupo de Chen⁸⁸, no qual foram projetados 26 análogos do peptídeo V13K_L com diferentes níveis de hidrofobicidade. Através de experimentos de determinação dos valores de MIC contra várias cepas de *P. aeruginosa* e ensaios de atividade hemolítica, os pesquisadores concluíram que um aumento na hidrofobicidade está associado ao aumento da toxicidade dos

peptídeos. Entretanto, valores extremamente baixos ou altos de hidrofobicidade reduzem a atividade antimicrobiana dos peptídeos. Portanto, é sugerido que exista uma “janela” de hidrofobicidade ótima para uma atividade antimicrobiana eficaz, na qual valores específicos de hidrofobicidade não levem à citotoxicidade do AMP.

Para obter melhores conclusões em relação aos resultados, é importante considerar as características de cada bactéria. As bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *A. baumannii* são Gram-negativas e contêm como principal componente estrutural de sua membrana externa o lipopolissacarídeo (LPS). Já a *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, cuja parede celular é composta principalmente por peptidoglicanos, apresentando ácido teicóico. Os resultados da espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) na presença de LPS demonstram que os três peptídeos desenvolvidos na segunda geração de análogos apresentam estruturação similar na presença de LPS. Essas evidências podem justificar a maior potência apresentada frente a bactérias Gram-negativas.

Adicionalmente, os três peptídeos da segunda geração exibiram uma estruturação similar ao Hs02 na presença de LUVs negativas, enquanto somente o 16.3 não se estruturou, nem mesmo residualmente, em vesículas neutras. Este mesmo peptídeo demonstrou os valores mais altos de MIC para todas as bactérias avaliadas, o que ressalta a relevância da hidrofobicidade desses AMPs na atividade antimicrobiana. Mesmo que a diminuição não tenha sido tão acentuada quanto na primeira geração de análogos, essa observação realça a importância da hidrofobicidade na eficácia antimicrobiana dessas moléculas.

4.8. Ensaio de viabilidade celular dos análogos 16.1, 16.2 e 16.3.

A avaliação da citotoxicidade da segunda geração de análogos é de grande importância para a verificação da seletividade dessas moléculas e suas viabilidades como ferramentas biotecnológicas. Os experimentos de avaliação da citotoxicidade dos peptídeos foram realizados novamente com células micróglia BV-2, de camundongos, e concentrações variáveis de peptídeo, em tempo de incubação de 24h, assim como descrito anteriormente para os análogos 13.1, 13.2 e 10.0. A avaliação da atividade mitocondrial pode fornecer a informação de mortalidade celular e indica em quais concentrações os peptídeos apresentam alta toxicidade às células.

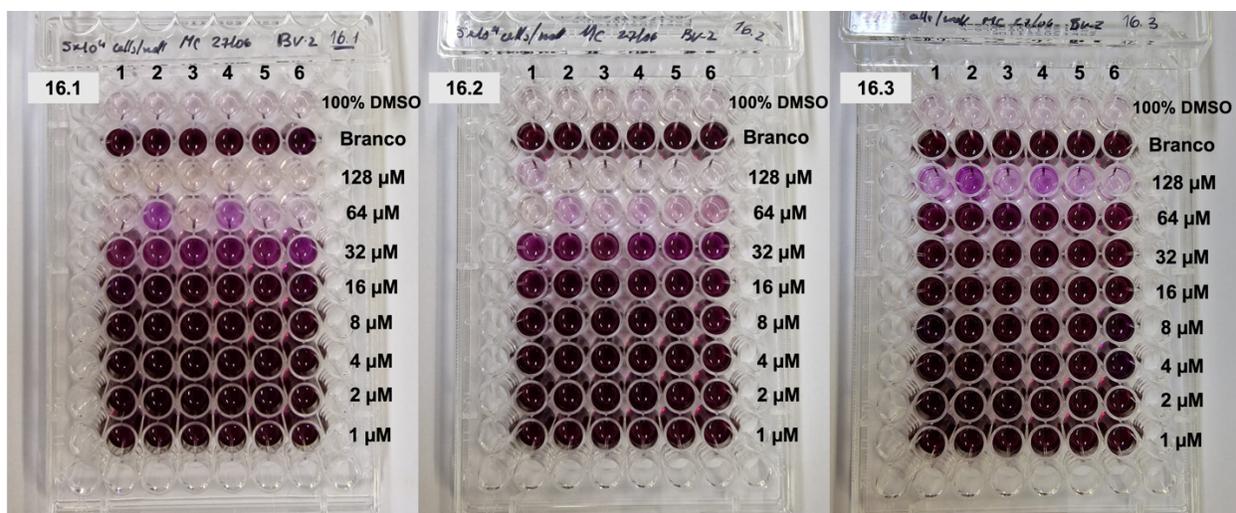


Figura 56: Placas de 96 poços utilizadas para a avaliação de viabilidade celular dos peptídeos analisados. As fotos mostram as placas utilizadas para cada peptídeo nos ensaios de MTT. Os experimentos foram realizados em 6 replicatas (linhas verticais) e com 8 concentrações de peptídeos (linhas horizontais). A intensidade da cor roxa é proporcional a conversão do MTT a formazan pelas mitocôndrias e indica indiretamente a quantidade de células que sobreviveram as 24h de incubação com os peptídeos.

Após as etapas de homogeneização e centrifugação, as placas foram submetidas a avaliação de absorbância em 570nm e 650nm, este segundo para reduzir as possíveis variações na absorbância causada pela turbidez da solução. Os valores obtidos para cada poço foram adquiridos e processados utilizando a equação apresentada na seção de metodologia. A figura 57, a seguir, contém os resultados e o ajuste calculado para cada peptídeo, e a tabela 11, logo após, os valores de CC_{50} calculado para cada peptídeo.

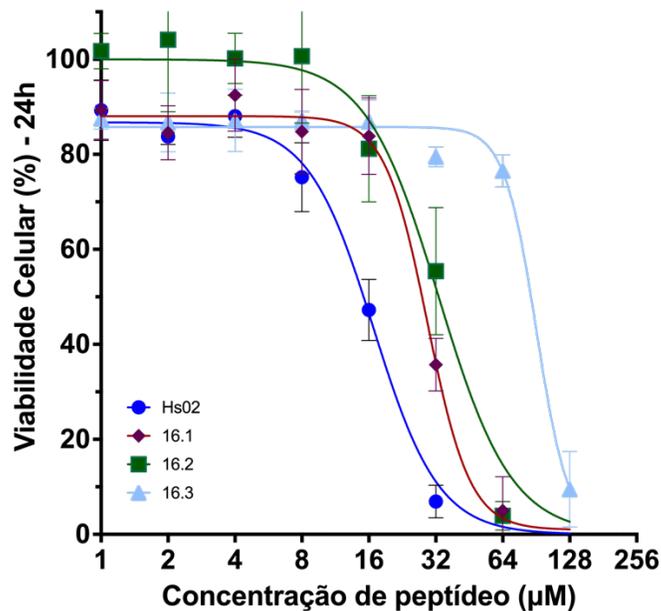


Figura 57: Dados de citotoxicidade celular CC50 em ensaio de viabilidade celular com MTT. Os símbolos representam as porcentagens de células vivas 24h após a incubação com os peptídeos testados, para cada concentração testada. As barras presentes em cada símbolo representam os erros nas porcentagens calculados para cada concentração.

Na figura 59 é possível observar que Hs02 reduz a viabilidade celular em menores concentrações de peptídeo, seguido do 16.1, 16.2 e por fim, o 16.3. Desse modo, preliminarmente, o peptídeo 16.3 apresentou a menor citotoxicidade entre as 4 moléculas testadas.

Mais adiante, para determinar quais foram as concentrações necessárias para matar 50% das células, a equação apresentada na seção de metodologia foi utilizada com o objetivo de ajustar uma curva aos pontos obtidos e calcular o CC_{50} . Os resultados estão apresentados na tabela 11, a seguir.

Tabela 11: Concentrações de CC₅₀ dos 3 peptídeos avaliados nos experimentos de viabilidade celular, e do Hs02.

| Peptídeo | CC₅₀ (μM) |
|-----------------|-----------------------------|
| Hs02 | 16.80 ± 0.65 |
| 16.1 | 29.36 ± 1.00 |
| 16.2 | 32.95 ± 2.76 |
| 16.3 | 90.71 ± N.D. |

N.D. = Desvio padrão não pôde ser determinado

A diferença nos valores de CC₅₀ entre os análogos 16.1 e 16.2 foi pequena, e ambos apresentaram resultados semelhantes, dentro da margem de erro. No entanto, o análogo 16.3 mostrou uma CC₅₀ significativamente maior em relação aos outros dois peptídeos, sendo aproximadamente 3 vezes maior que os análogos 16.1 e 16.2, e mais de 5 vezes menos citotóxico que o Hs02.

Esses resultados apoiam a hipótese de que a elevada citotoxicidade do Hs02 está diretamente relacionada à sua alta hidrofobicidade, visto que as únicas modificações feitas nos análogos foram a substituição dos resíduos F14 e I15 da molécula original por alaninas. Além disso, os ensaios de viabilidade celular apresentaram correlações com os resultados obtidos por Espectroscopia de Dicroísmo Circular em presença de LUVs de DMPC. Isso indica que a diminuição ou ausência de estruturação em hélice em vesículas neutras está associada à menor citotoxicidade das moléculas, como reportado pelo grupo de Giangaspero⁸⁹. Em seu trabalho, diversos peptídeos com estruturas primárias semelhantes foram sintetizados e avaliados em ensaios de determinação de MIC e % de hemólise. Os resultados demonstram que a redução na estruturação em hélice desses peptídeos afeta não só a atividade antimicrobiana como também a capacidade de gerar hemólise, diminuindo a citotoxicidade dos AMPs.

Posteriormente, ao relacionar os dados de CC₅₀ com os resultados dos ensaios de determinação das concentrações inibitórias mínimas, é possível determinar os Índices Terapêuticos (TI) de todos os peptídeos utilizados no trabalho. Os valores de TI de cada peptídeo são obtidos pela razão entre os valores de CC₅₀ e os MICs medidos para cada microrganismo testado. A tabela 12 contém os TI cálculos com base nos experimentos realizados.

Tabela 12: Índices Terapêuticos (TI) dos peptídeos testados.

| | Índice Terapêutico (CC50/MIC) | | |
|-------------|-------------------------------|---------|---------------|
| | S. aureus | E. coli | P. aeruginosa |
| Hs02 | 16.80 | 8.40 | 10.06 |
| 13.1 | >2.00 | >8.00 | >6.00 |
| 13.2 | 3.79 | 7.58 | 7.58 |
| 10 | - | - | - |
| 16.1 | 14.68 | 12.58 | 14.68 |
| 16.2 | 12.20 | 14.12 | 14.14 |
| 16.3 | 11.34 | 30.24 | 24.52 |

- Valores de TI indeterminados para o 10.0 pois esse análogo não apresentou atividade antimicrobiana em nenhuma concentração testada.

Ao analisar os Índices Terapêuticos (TI) dos análogos, nota-se que a maioria apresentou valores maiores do que o TI do Hs02 em relação à maioria dos microrganismos testados. O cálculo do TI é uma métrica utilizada para estimar a seletividade de um AMP, e o aumento desses valores sugere um aumento na seletividade. Isso ocorre porque um aumento na razão entre as concentrações tóxicas e as concentrações antimicrobianas indica uma maior diferença entre a toxicidade para células eucarióticas e a atividade antimicrobiana do peptídeo³⁴. O peptídeo 13.1 apresenta apenas valores mínimos pois não apresentou citotoxicidade em nenhuma concentração testada, mas possui MIC contra as 3 bactérias. Já o 10.0 não possui valores de TI pois não apresentou citotoxicidade nem atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações em que foi testado.

Os resultados das avaliações realizadas na primeira parte do trabalho permitiram a comparação da segunda geração de análogos com o peptídeo 13.2, que foi o ponto de partida para o esforço de otimização. Essa comparação revelou que, na maioria dos casos, a adição de mais 3 resíduos no C-terminal aumentou o TI em 3 a 4 vezes em relação à molécula com 13 resíduos. Essa melhoria pode ser interpretada como um aumento na atividade antimicrobiana devido ao aumento no tamanho da hélice por pelo menos mais uma volta, causado pelos 3 aminoácidos adicionais.

Como revisado por Bobone e Stella²⁶, vários estudos demonstram o desempenho de peptídeos como agentes antimicrobianos seletivos, e calculam seus índices terapêuticos. No entanto, a comparação desses valores é delicada devido à falta de padronização na determinação

dos valores de MIC e CC₅₀. Apesar disso, o uso do índice terapêutico como métrica para avaliar o aumento da seletividade no desenho de análogos mais seletivos é válido e pode auxiliar na avaliação do sucesso na melhoria da seletividade da molécula.

Contudo, na tentativa de relacionar os resultados com a literatura, a análise dos Índices Terapêuticos calculados com base em valores relatados^{82,90} revela que o LL-37, um AMP humano encriptado, exibe um Índice Terapêutico de 3,33 a 6,9 contra *E. coli* em comparação com fibroblastos dérmicos, HDFa, e apenas 0,125 contra *S. aureus* comparado à mesma linhagem celular. A comparação dos Índices Terapêuticos deste relevante peptídeo do sistema imune inato com o Hs02 revela que, mesmo mantendo sua citotoxicidade original, o IAP já demonstra um comportamento mais seletivo em relação a LL-37. Adicionalmente, os Índices Terapêuticos dos análogos de segunda geração exibem valores consideravelmente superiores aos do LL-37 contra *E. coli*.

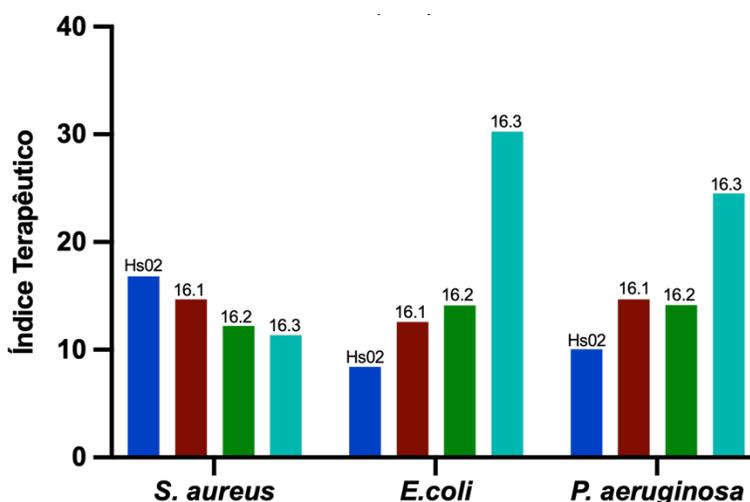


Figura 58: Índices Terapêuticos dos peptídeos da segunda geração de análogos do Hs02 nas bactérias testadas. As barras correspondem a cada um dos 4 peptídeos utilizados na avaliação dos Índices Terapêuticos (TI). Quanto maior o TI de um peptídeo antimicrobiano, maior a diferença entre as concentrações que apresentam citotoxicidade a atividade antimicrobiana, conseqüentemente, maior a seletividade do AMP.

A Figura 58 contém um gráfico em barras com os Índices Terapêuticos do Hs02 e os 3 análogos desenvolvidos para a segunda parte do trabalho. É possível identificar que o peptídeo

16.3 apresentou melhora no TI para as duas bactérias Gram-negativas testadas, mas perdeu seletividade para *S. aureus*, bactéria Gram-positiva.

A parede celular das bactérias Gram-positivas possui, entre outras moléculas, o ácido lipoteicoico (LTA). O LTA pode ser caracterizado como um poliglicerolfosfato com cadeia de glicolípídios responsáveis pela interação da molécula com a membrana bacteriana⁹¹. Um estudo mostra que a adição dessas moléculas em vesículas de POPG foi suficiente para diminuir o vazamento provocado por diferentes AMPs⁹². É sugerido que a existência dos grupos fosfato no LTA, levando a uma carga líquida negativa, possa atrair os AMPs catiônicos e, dessa forma, impedir sua concentração nas membranas das bactérias Gram-positivas. No âmbito deste estudo, a redução da hidrofobicidade realizada nos análogos e as análises de estruturação na presença de vesículas lipídicas neutras e negativas indicaram uma diminuição na afinidade dessas moléculas com as membranas neutras, e aumento na afinidade por bicamadas negativas. Isso sugere que a força principal responsável pela atração desses peptídeos às membranas é de natureza eletrostática. Portanto, a gradual diminuição dos Índices Terapêuticos (TIs) reforça a hipótese de que o LTA possa atuar como uma espécie de "armadilha" para os AMPs catiônicos.

Os peptídeos desenvolvidos nesse trabalho podem ser classificados como Peptídeos Membrano-ativos, devido às suas características e interações com as membranas de microrganismos. O uso desses peptídeos como carreadores de fármacos aproveita essa seletividade e o fato de ser difícil criar resistência, uma vez que essas moléculas atuam em uma estrutura crucial, como a membrana⁹³. O Hs02 já foi estudado como carreador de um peptídeo imunomodulador por nosso grupo⁹⁴, no entanto, a citotoxicidade apresentada por essa molécula tem sido um obstáculo no desenvolvimento desses conjugados e tem motivado a busca por uma solução com maior seletividade.

Dentre os três análogos desenvolvidos na segunda parte deste estudo, o peptídeo 16.3 se destacou como um agente antimicrobiano seletivo contra bactérias Gram-negativas em comparação com o IAP Hs02. Os índices terapêuticos calculados para essa molécula mostram que a diferença entre os valores de atividade antimicrobiana e citotoxicidade foi ampliada para as bactérias Gram-negativas, mas reduzida para Gram-positivas, tornando-a uma opção promissora como agente antimicrobiano ou carreador seletivo de fármacos para bactérias desse grupo, devido às suas características membrano-ativas seletivas. Além disso, os resultados apresentados nesse trabalho

levantam a hipótese de que é possível utilizar a espectroscopia do Dicroísmo Circular como um modelo de avaliação para prever a possível atividade microbicida e seletividade dessa classe de peptídeos com afinidade por membrana.

5. Conclusões

O peptídeo antimicrobiano intragênico (IAP) Hs02 possui amplo espectro de atividade antimicrobiana contra uma série de patógenos. Esse IAP apresenta como características físico-químicas principais, alta hidrofobicidade e cationicidade, além de apresentar, em ambiente anfifílico, estruturação em uma alfa-hélice anfipática, com um lado hidrofílico e outro hidrofóbico. Apesar de um potente agente antimicrobiano, a inespecificidade de seus mecanismos de ação o torna um peptídeo pouco seletivo, com alta citotoxicidade em modelos celulares *in vitro*.

O presente trabalho buscou a determinação dos principais fatores responsáveis pela baixa seletividade do Hs02, através de avaliações de tamanho mínimo e de regiões essenciais para a estruturação do peptídeo. As moléculas da primeira geração de análogos foram avaliadas por espectroscopia do Dicroísmo Circular na presença de concentrações crescentes de vesículas unilamelares grandes (LUVs) de DMPC e DMPC/DMPG 2:1 m/m, e lipopolissacarídeo (LPS) para determinação da estruturação dos peptídeos em modelos que mimetizam membranas biológicas. Paralelamente, ensaios de viabilidade celular buscaram a avaliação da citotoxicidade dos peptídeos modificados em células eucarióticas, com objetivo de identificar quais variações aumentam a seletividade das moléculas.

Observou-se que a retirada do C-terminal do Hs02, no peptídeo 13.2, foi a modificação que menos alterou a estruturação em vesículas negativas, e que apresentou redução considerável na citotoxicidade da molécula. O peptídeo 13.2, no entanto, ainda apresentava uma atividade antimicrobiana baixa, em comparação com o peptídeo original.

Com base nesses dados, uma nova geração de análogos foi sintetizada com o objetivo de aumentar a atividade microbiana do 13.2, mantendo a seletividade apresentada por esse análogo. Essa segunda geração de peptídeos apresenta 3 moléculas com 16 aminoácidos na estrutura primária, assim como o Hs02, e alterações dos resíduos F14 e I15 originais, por alaninas (**F14 ->A14** no 16.1; **I15 ->A15**, no 16.2; e **F14->A14 e I15->A15** no 16.3).

Os peptídeos selecionados foram sintetizados por Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS) e purificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para serem utilizados

nos experimentos de Dicroísmo Circular (CD), Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Viabilidade Celular (CC_{50}).

Os espectros de CD obtidos pela titulação de LUVs e LPS demonstraram que as moléculas sintetizadas não perderam a afinidade por vesículas com carga negativa, mas sim por vesículas neutras, indicando ganho de seletividade. Atribui-se a baixa estruturação dos peptídeos 16.1, 16.2 e 16.3, em LUVs neutras, à queda na hidrofobicidade em comparação com o Hs02. As avaliações das atividades antimicrobianas dos peptídeos sintetizados, através da determinação de seus MICs, diferem das concentrações apresentadas pelo 13.2, e demonstram que o tamanho e a hidrofobicidade do peptídeo são essenciais para a atividade microbicida. Simultaneamente, a avaliação dos dados de MICs e viabilidade celular indicam ganho de seletividade com retenção da atividade antimicrobiana, com consequente aumento no índice terapêutico (CC_{50}/MIC) dos peptídeos contra a maioria das bactérias testadas.

Os resultados apresentados nesse trabalho indicam a otimização do peptídeo antimicrobiano intragênico Hs02 e sugerem que o peptídeo 16.3 é um candidato promissor ao uso como carregador seletivo de fármacos com as mais diversas atividades.

Referências

1. Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A. & Kisich, K. O. The Roles of Antimicrobial Peptides in Innate Host Defense. *Curr Pharm Des* **15**, 2377 (2009).
2. Zhao, X., Wu, H., Lu, H., Li, G. & Huang, Q. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *PLoS One* (2013) doi:10.1371/journal.pone.0066557.
3. JP, P. & RE, H. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides (N.Y.)* **24**, 1681–1691 (2003).
4. S, O., S, B. & SA, Z. Antimicrobial Activity of Cationic Antimicrobial Peptides against Gram-Positives: Current Progress Made in Understanding the Mode of Action and the Response of Bacteria. *Front Cell Dev Biol* **4**, (2016).
5. Lai, R., Liu, H., Hui Lee, W. & Zhang, Y. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 796–799 (2002).
6. Fleming, A. Lysozyme: <http://dx.doi.org/10.1177/003591573202600201> (2016) doi:10.1177/003591573202600201.
7. Dubos, R. J. & Hotchkiss, R. D. THE PRODUCTION OF BACTERICIDAL SUBSTANCES BY AEROBIC SPORULATING BACILLI. *J Exp Med* **73**, 629 (1941).
8. Rammelkamp, C. H. & Weinstein, L. Toxic Effects of Tyrothricin, Gramicidin and Tyrocidine. *J Infect Dis* **71**, 166–173 (1942).
9. Huan, Y., Kong, Q., Mou, H. & Yi, H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol* **11**, (2020).
10. Kościuczuk, E. M. *et al.* Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep* **39**, 10957 (2012).
11. Dürr, U. H. N., Sudheendra, U. S. & Ramamoorthy, A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* vol. 1758 1408–1425 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.030> (2006).

12. Sørensen, O., Cowland, J. B., Askaa, J. & Borregaard, N. An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J Immunol Methods* **206**, 53–59 (1997).
13. Neshani, A. *et al.* LL-37: Review of antimicrobial profile against sensitive and antibiotic-resistant human bacterial pathogens. *Gene Rep* **17**, 100519 (2019).
14. Kang, J., Dietz, M. J. & Li, B. Antimicrobial peptide LL-37 is bactericidal against *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS One* **14**, e0216676 (2019).
15. Xu, D. & Lu, W. Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity. *Front Immunol* **11**, 764 (2020).
16. Wang, G., Li, X. & Wang, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res* **44**, D1087–D1093 (2016).
17. Jung, Y. *et al.* Envelope-deforming antiviral peptide derived from influenza virus M2 protein. *Biochem Biophys Res Commun* **517**, 507–512 (2019).
18. Wu, D. *et al.* Peptide-based cancer therapy: opportunity and challenge. *Cancer Lett* **351**, 13–22 (2014).
19. Mattiuzzo, M. *et al.* Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Mol Microbiol* **66**, 151–163 (2007).
20. Seefeldt, A. C. *et al.* The proline-rich antimicrobial peptide Onc112 inhibits translation by blocking and destabilizing the initiation complex. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 470–475 (2015).
21. Walrant, A. *et al.* Ionpair- π interactions favor cell penetration of arginine/tryptophan-rich cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1862**, (2020).
22. Bahar, A. A. & Ren, D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* **6**, 1543–1575 (2013).
23. Travkova, O. G., Moehwald, H. & Brezesinski, G. The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Adv Colloid Interface Sci* **247**, 521–532 (2017).
24. A, D. *et al.* Mechanistic Insights into the Leishmanicidal and Bactericidal Activities of Batroxicidin, a Cathelicidin-Related Peptide from a South American Viper (*Bothrops atrox*). *J Nat Prod* **84**, 1787–1798 (2021).

25. Lee, M. T., Hung, W. C., Chen, F. Y. & Huang, H. W. Many-Body Effect of Antimicrobial Peptides: On the Correlation Between Lipid's Spontaneous Curvature and Pore Formation. *Biophys J* **89**, 4006–4016 (2005).
26. Bobone, S. & Stella, L. Selectivity of antimicrobial peptides: A complex interplay of multiple equilibria. *Adv Exp Med Biol* **1117**, 175–214 (2019).
27. Li, S. *et al.* The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. *Trends Food Sci Technol* **109**, 103–115 (2021).
28. Harmouche, N. & Bechinger, B. Lipid-Mediated Interactions between the Antimicrobial Peptides Magainin 2 and PGLa in Bilayers. *Biophys J* **115**, 1033–1044 (2018).
29. Igor Zelezetsky & Alessandro Tossi. Alpha-helical antimicrobial peptides—Using a sequence template to guide structure–activity relationship studies - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273606001088>.
30. Antimicrobial Peptide Database. <https://aps.unmc.edu/>.
31. Park, Y. *et al.* Structure-activity relationship of HP (2-20) analog peptide: enhanced antimicrobial activity by N-terminal random coil region deletion. *Biopolymers* **88**, 199–207 (2007).
32. Subbalakshmi, C., Nagaraj, R. & Sitaram, N. Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity. *FEBS Lett* **448**, 62–66 (1999).
33. Han, Y., Zhang, M., Lai, R. & Zhang, Z. Chemical modifications to increase the therapeutic potential of antimicrobial peptides. *Peptides (N.Y.)* **146**, 170666 (2021).
34. Muller, P. Y. & Milton, M. N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 751–761 (2012).
35. Matsuzaki, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1788**, 1687–1692 (2009).
36. Imura, Y., Choda, N. & Matsuzaki, K. Magainin 2 in Action: Distinct Modes of Membrane Permeabilization in Living Bacterial and Mammalian Cells. *Biophys J* **95**, 5757 (2008).

37. Akhtar, M. S., Imran, M. B., Nadeem, M. A. & Shahid, A. Antimicrobial peptides as infection imaging agents: Better than radiolabeled antibiotics. *Int J Pept* **2012**, (2012).
38. Erikson, E. & Feltham, E. Structure. *Research Handbook on Analytical Sociology* 220–232 (1996) doi:10.7591/9781501717994-008.
39. A, G., G, P. & AC, R. Antimicrobial peptides: the LPS connection. *Methods Mol Biol* **618**, 137–154 (2010).
40. McMahon, H. T. & Boucrot, E. Membrane curvature at a glance. *J Cell Sci* **128**, 1065–1070 (2015).
41. Sun, Y. & Shang, D. Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Mediators Inflamm* **2015**, (2015).
42. B, B., K, H., X, D. & RJ, U. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* **74**, 479–485 (2003).
43. FX, Z. *et al.* Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* **274**, 7611–7614 (1999).
44. Willis, L. M. & Whitfield, C. Capsule and lipopolysaccharide. *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis: Second Edition* 533–556 (2013) doi:10.1016/B978-0-12-397048-0.00017-6.
45. Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002 420:6917 **420**, 885–891 (2002).
46. Kirikae, T. *et al.* Protective effects of a human 18-kilodalton cationic antimicrobial protein (CAP18)-derived peptide against murine endotoxemia. *Infect Immun* **66**, 1861–1868 (1998).
47. Gough, M., Hancock, R. E. & Kelly, N. M. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect Immun* **64**, 4922–4927 (1996).
48. Rosenfeld, Y. & Shai, Y. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1758**, 1513–1522 (2006).

49. Buurman, R. E. W., Hancock, M. R., Gold, M. G., Scott, A. C. E. & Vreugdenhil, W. A. Protein Lipopolysaccharide (LPS) to LPS Binding Peptides Block the Binding of Cutting Edge: Cationic Antimicrobial. *J Immunol* **164**, 549–553 (2022).
50. Y, L. & RL, G. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* **30**, 131–141 (2009).
51. Brand, G. D. *et al.* Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. *PLoS One* **7**, e45848 (2012).
52. GD, B. *et al.* Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. *PLoS One* **14**, (2019).
53. Saikia, K., Sravani, Y. D., Ramakrishnan, V. & Chaudhary, N. Highly potent antimicrobial peptides from N-terminal membrane-binding region of E. coli MreB. *Sci Rep* **7**, (2017).
54. Autelitano, D. J. *et al.* The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities. *Drug Discov Today* **11**, 306–314 (2006).
55. Samir, P. & Link, A. J. Analyzing the Cryptome: Uncovering Secret Sequences. *AAPS J* **13**, 152 (2011).
56. Pires, P. V. B. da C. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO MÍNIMO DO PEPTÍDEO HS02 COM MANUTENÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA - INSTITUTO DE QUÍMICA - Trabalho de conclusão de curso. (2018).
57. Stawikowski, M. & Fields, G. B. Introduction to Peptide Synthesis. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.] CHAPTER*, Unit (2002).
58. De Luca, C. *et al.* Downstream Processing of Therapeutic Peptides by Means of Preparative Liquid Chromatography. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 4688 **26**, 4688 (2021).
59. Fischer, E. Ueber die Ester der Aminosäuren. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **34**, 433–454 (1901).
60. Bergmann, M. & Zervas, L. Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **65**, 1192–1201 (1932).

61. Du Vigneaud, V. *et al.* The Synthesis of an Octapeptide Amide With The Hormonal Activity of Oxytocin. *J Am Chem Soc* **75**, 4879–4880 (1953).
62. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **85**, 2149–2154 (1963).
63. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis - W. C. Chan; Peter D. White - Oxford University Press. <https://global.oup.com/academic/product/fmoc-solid-phase-peptide-synthesis-9780199637249?cc=us&lang=en&>.
64. FIELDS, C. G., FIELDS, G. B., NOBLE, R. L. & CROSS, T. A. Solid phase peptide synthesis of 15N-gramicidins A, B, and C and high performance liquid chromatographic purification. *Int J Pept Protein Res* **33**, 298–303 (1989).
65. Manne, S. R. *et al.* Understanding OxymaPure as a Peptide Coupling Additive: A Guide to New Oxyma Derivatives. *ACS Omega* **7**, 6007–6023 (2022).
66. Arantes, D., Pires, T., Porto Bemquerer, M., Claudia, • & Do Nascimento, J. Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. doi:10.1007/s10989-013-9366-8.
67. Chan, W. & White, P. Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis* (1999) doi:10.1093/OSO/9780199637256.001.0001.
68. Brademan, D. R., Riley, N. M., Kwiecien, N. W. & Coon, J. J. Interactive Peptide Spectral Annotator: A Versatile Web-based Tool for Proteomic Applications. *Mol Cell Proteomics* **18**, S193–S201 (2019).
69. Gasteiger, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook* 571–607 (2005) doi:10.1385/1-59259-890-0:571.
70. Scopes, R. K. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal Biochem* **59**, 277–282 (1974).
71. Waddell, W. J. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. *J Lab Clin Med* **48**, 311–314 (1956).
72. Micsonai, A. *et al.* Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E3095–E3103 (2015).

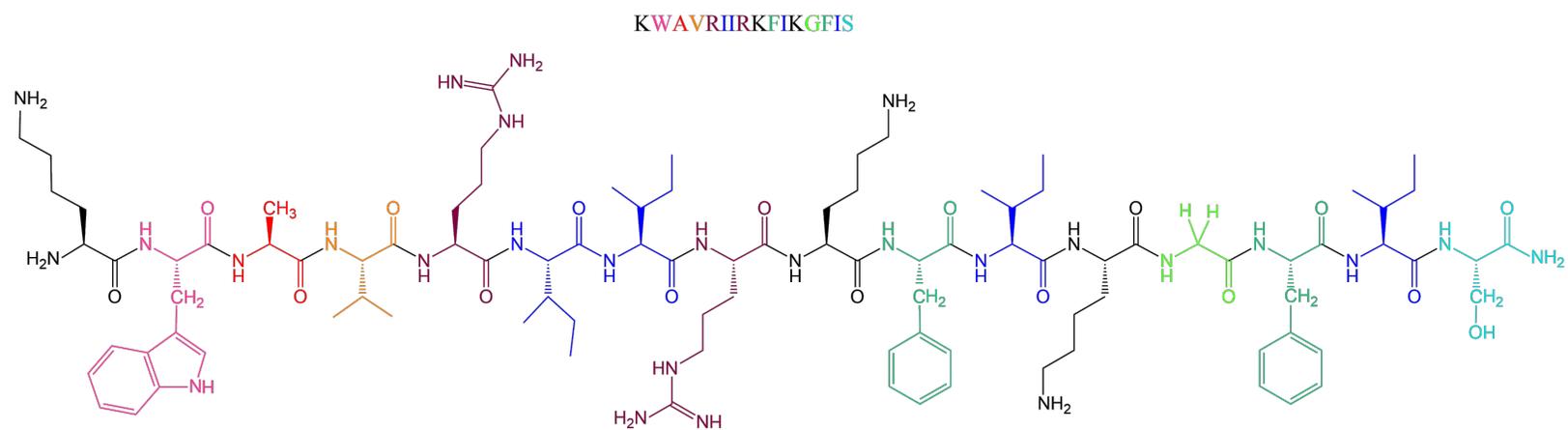
73. Plácido, A. *et al.* The Antioxidant Peptide Salamandrin-I: First Bioactive Peptide Identified from Skin Secretion of Salamandra Genus (*Salamandra salamandra*). *Biomolecules* (2020) doi:10.3390/biom10040512.
74. Dematei, A. *et al.* Mechanistic Insights into the Leishmanicidal and Bactericidal Activities of Batroxicidin, a Cathelicidin-Related Peptide from a South American Viper (*Bothrops atrox*) . *J Nat Prod* (2021) doi:10.1021/acs.jnatprod.1c00153.
75. Ligasová, A. & Koberna, K. DNA Dyes—Highly Sensitive Reporters of Cell Quantification: Comparison with Other Cell Quantification Methods. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 5515 **26**, 5515 (2021).
76. Zhao, G. & London, E. An amino acid ‘transmembrane tendency’ scale that approaches the theoretical limit to accuracy for prediction of transmembrane helices: relationship to biological hydrophobicity. *Protein Sci* **15**, 1987–2001 (2006).
77. Conchillo-Solé, O. *et al.* AGGREGSCAN: A server for the prediction and evaluation of ‘hot spots’ of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics* **8**, 1–17 (2007).
78. Garidel, P. & Blume, A. Miscibility of phospholipids with identical headgroups and acyl chain lengths differing by two methylene units: Effects of headgroup structure and headgroup charge. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1371**, 83–95 (1998).
79. Manzini, M. C. *et al.* Peptide:lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. (2014) doi:10.1016/j.bbamem.2014.04.004.
80. Alves, C. S. *et al.* Escherichia coli cell surface perturbation and disruption induced by antimicrobial peptides BP100 and pepR. *J Biol Chem* **285**, 27536–27544 (2010).
81. Hollmann, A. *et al.* Role of amphipathicity and hydrophobicity in the balance between hemolysis and peptide–membrane interactions of three related antimicrobial peptides. *Colloids Surf B Biointerfaces* **141**, 528–536 (2016).
82. Svensson, D., Wilk, L., Mörgelin, M., Herwald, H. & Nilsson, B. O. LL-37-induced host cell cytotoxicity depends on cellular expression of the globular C1q receptor (p33). *Biochem J* **473**, 87–98 (2016).

83. Konno, K. *et al.* Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. *Biochim Biophys Acta* **1550**, 70–80 (2001).
84. Wieprecht, T. *et al.* Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. *FEBS Lett* **417**, 135–140 (1997).
85. Cunningham, B. C. & Wells, J. A. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* **244**, 1081–1085 (1989).
86. Hao, Z., Hong, Q., Zhang, F., Wu, S. L. & Bennett, P. Current Methods for the Characterization of Posttranslational Modifications in Therapeutic Proteins Using Orbitrap Mass Spectrometry. *Protein Analysis using Mass Spectrometry: Accelerating Protein Biotherapeutics from Lab to Patient* 21–34 (2017) doi:10.1002/9781119371779.CH3.
87. Adamczewski, P. & Tsoukanova, V. Phenylalanine intercalation parameters for liquid-disordered phase domains – a membrane model study. *BMC Biophys* **11**, (2018).
88. Chen, Y. *et al.* Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1398–1406 (2007).
89. Giangaspero, A., Sandri, L. & Tossi, A. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *Eur J Biochem* **268**, 5589–5600 (2001).
90. Travis, S. M. *et al.* Bactericidal Activity of Mammalian Cathelicidin-Derived Peptides. *Infect Immun* **68**, 2748 (2000).
91. Percy, M. G. & Gründling, A. Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **68**, 81–100 (2014).
92. Malanovic, N. *et al.* Phospholipid-driven differences determine the action of the synthetic antimicrobial peptide OP-145 on Gram-positive bacterial and mammalian membrane model systems. *Biochim Biophys Acta* **1848**, 2437–2447 (2015).
93. Avcı, F. G., Akbulut, B. S. & Ozkirimli, E. Membrane Active Peptides and Their Biophysical Characterization. *Biomolecules* **8**, (2018).

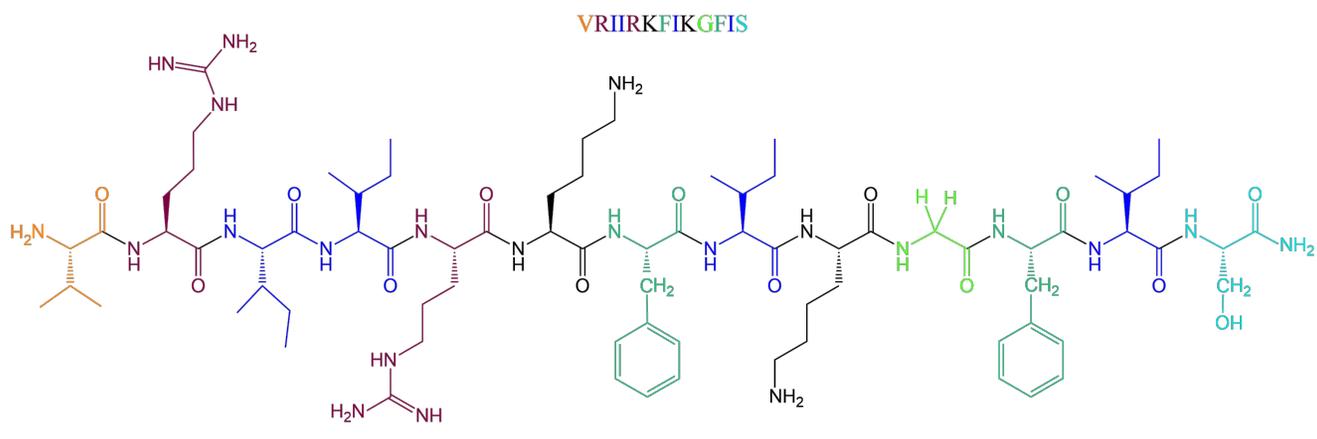
94. Viana de Freitas, T. *et al.* Release of immunomodulatory peptides at bacterial membrane interfaces as a novel strategy to fight microorganisms. *Journal of Biological Chemistry* **299**, 103056 (2023).

Anexo 1: Fórmulas estruturais dos peptídeos utilizados no trabalho.

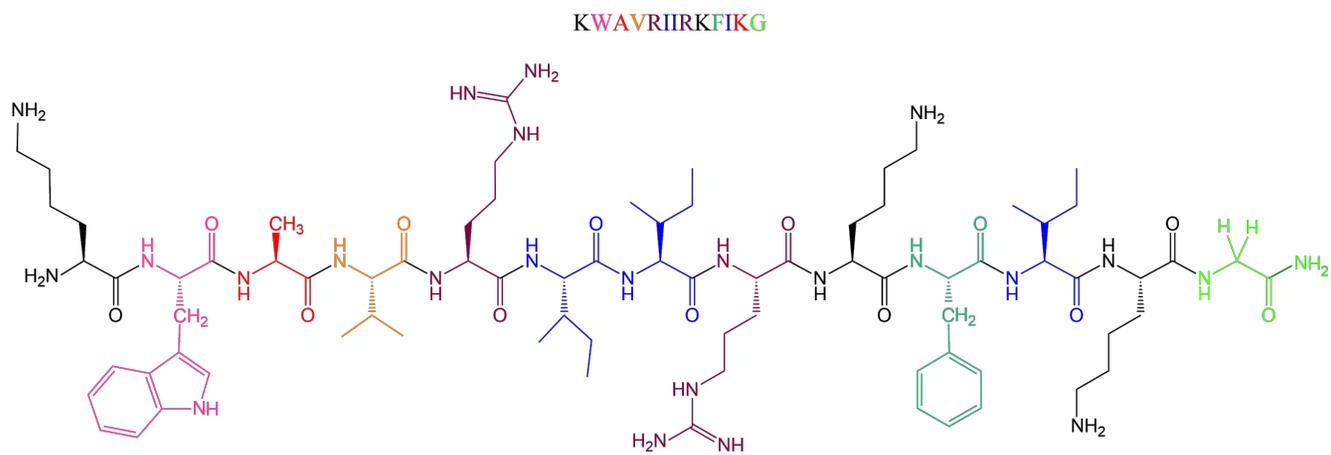
Hs02



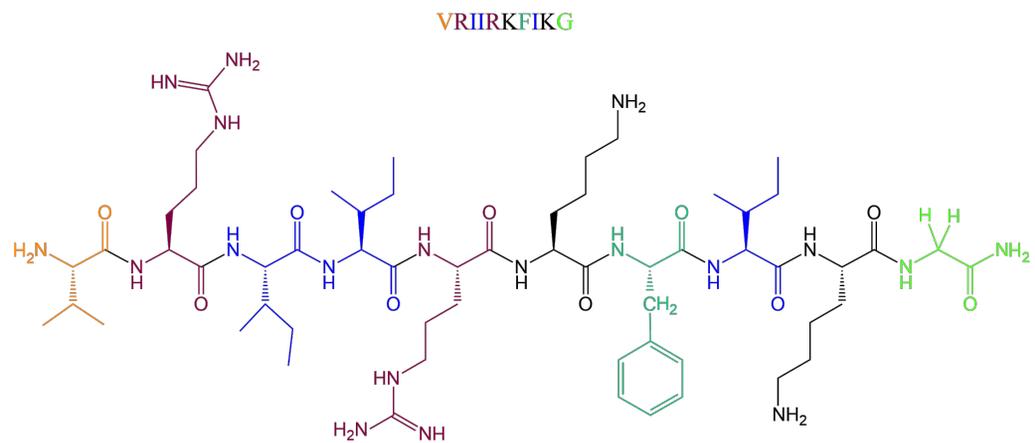
13.1



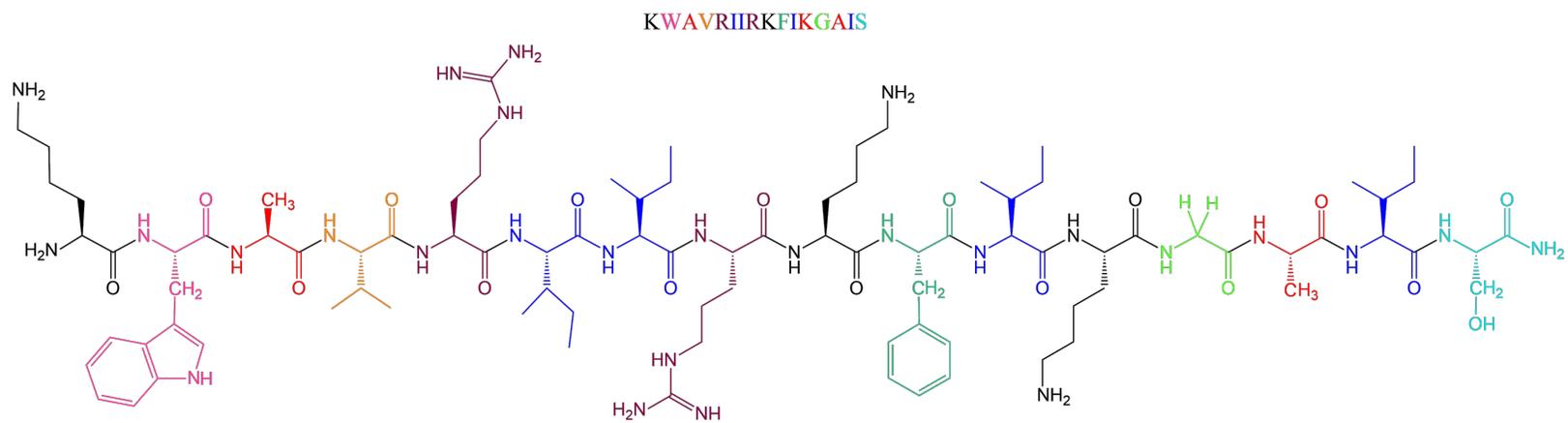
13.2



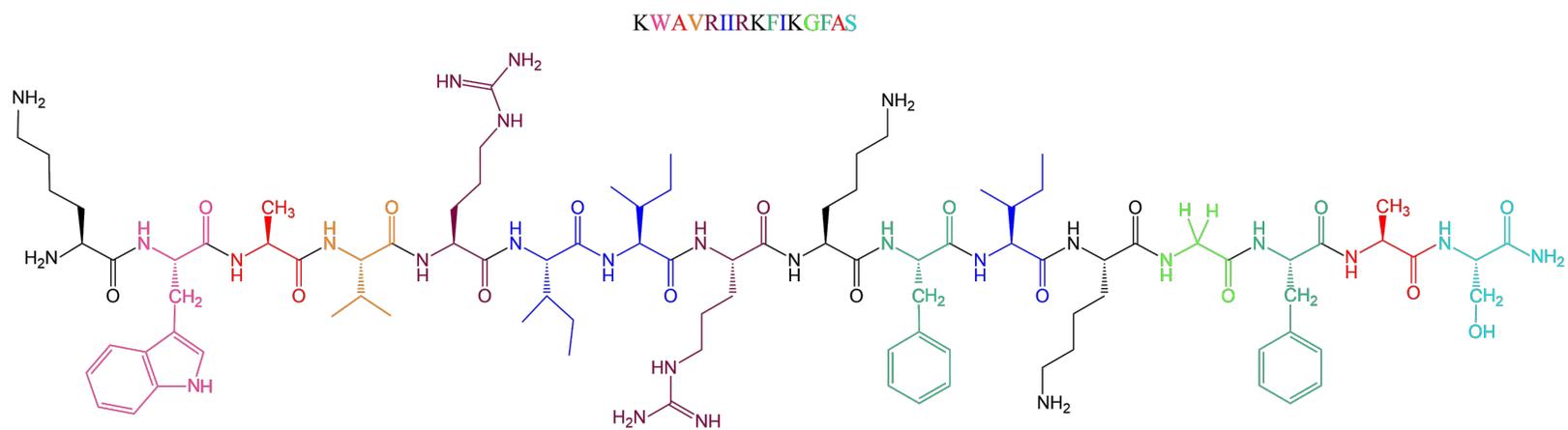
10.0



16.1

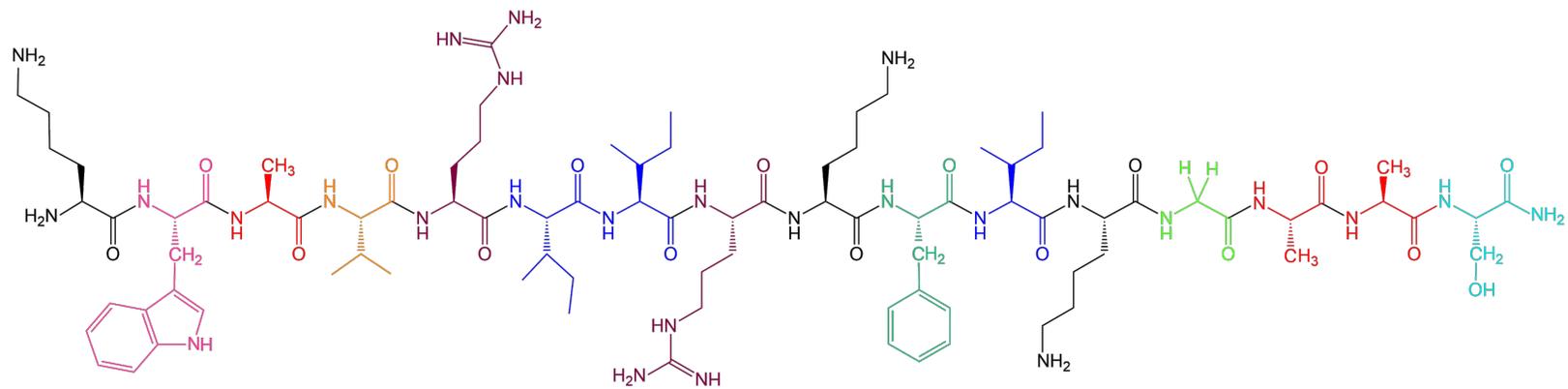


16.2



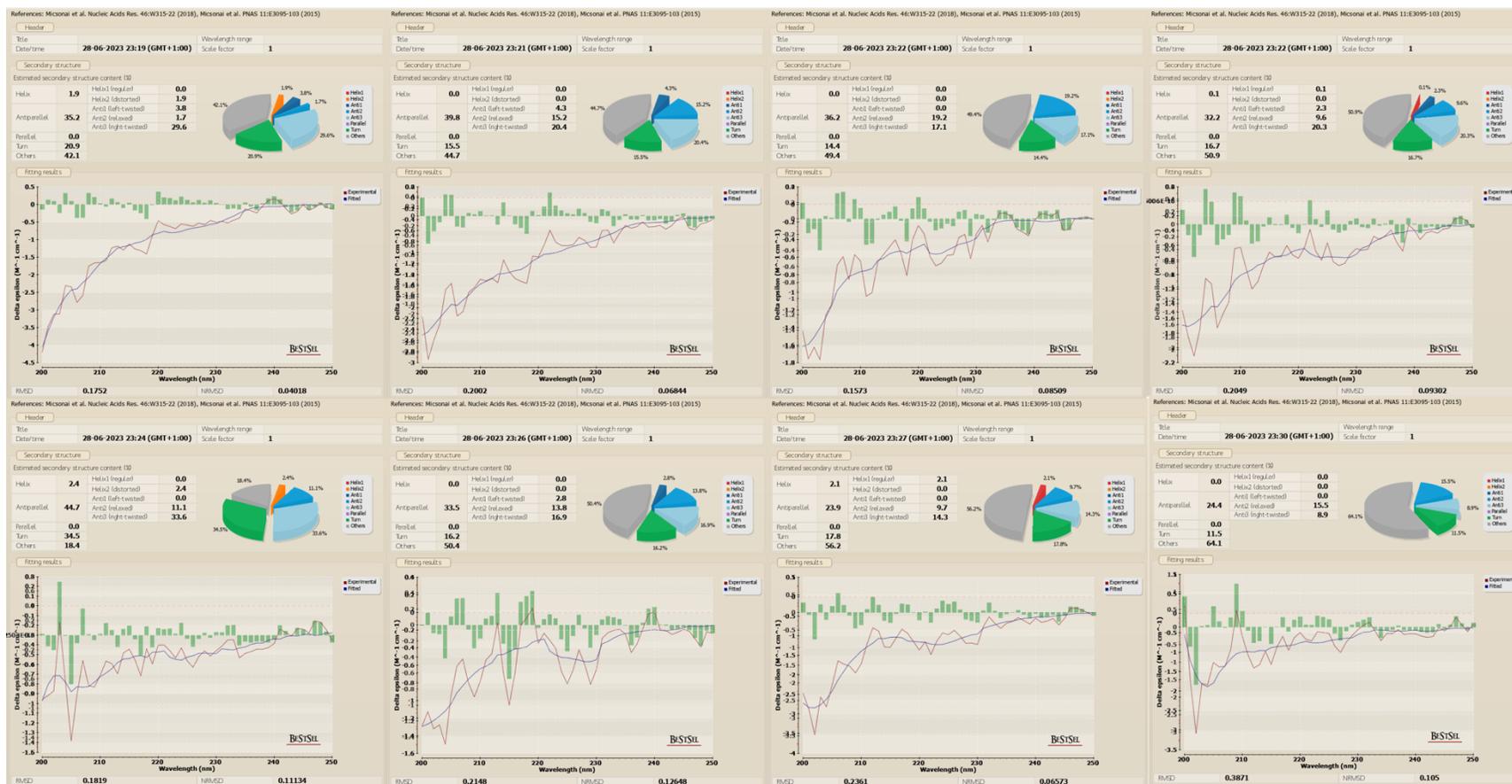
16.3

KWAVRIIRKFIKGAAS

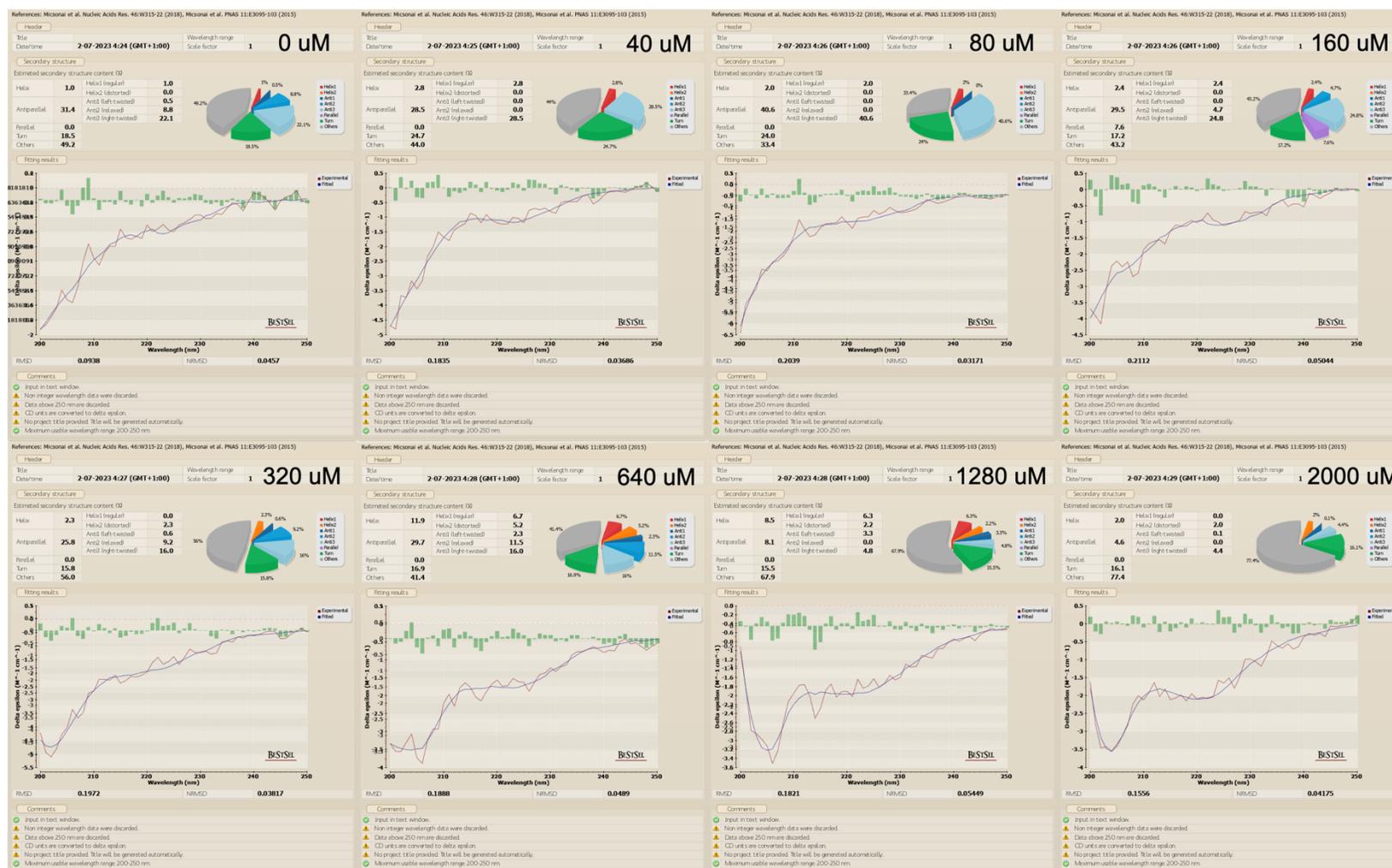


Anexo 2 – Resultados das análises da ferramenta online BeStSel.

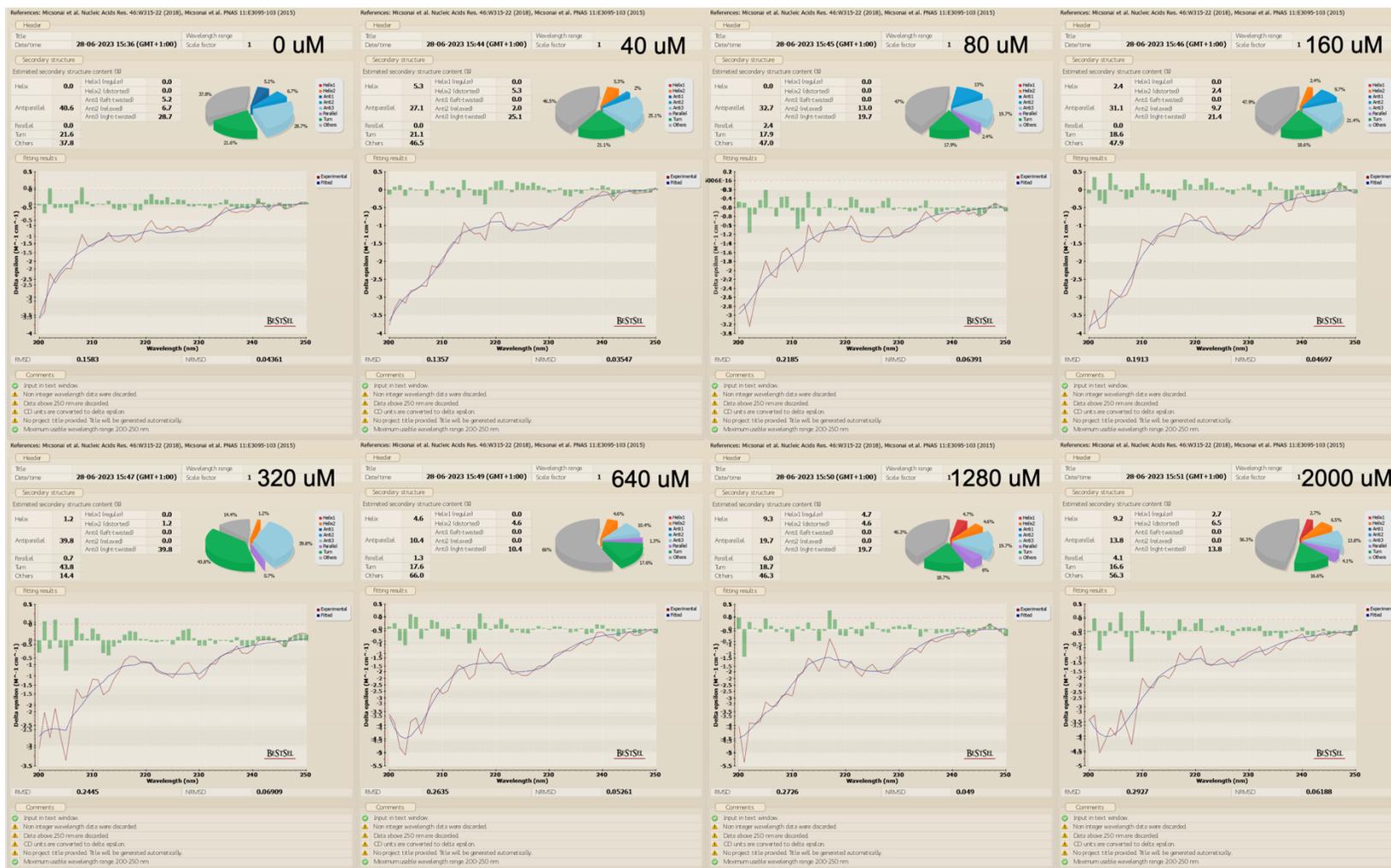
Peptídeo 10.0 + DMPC



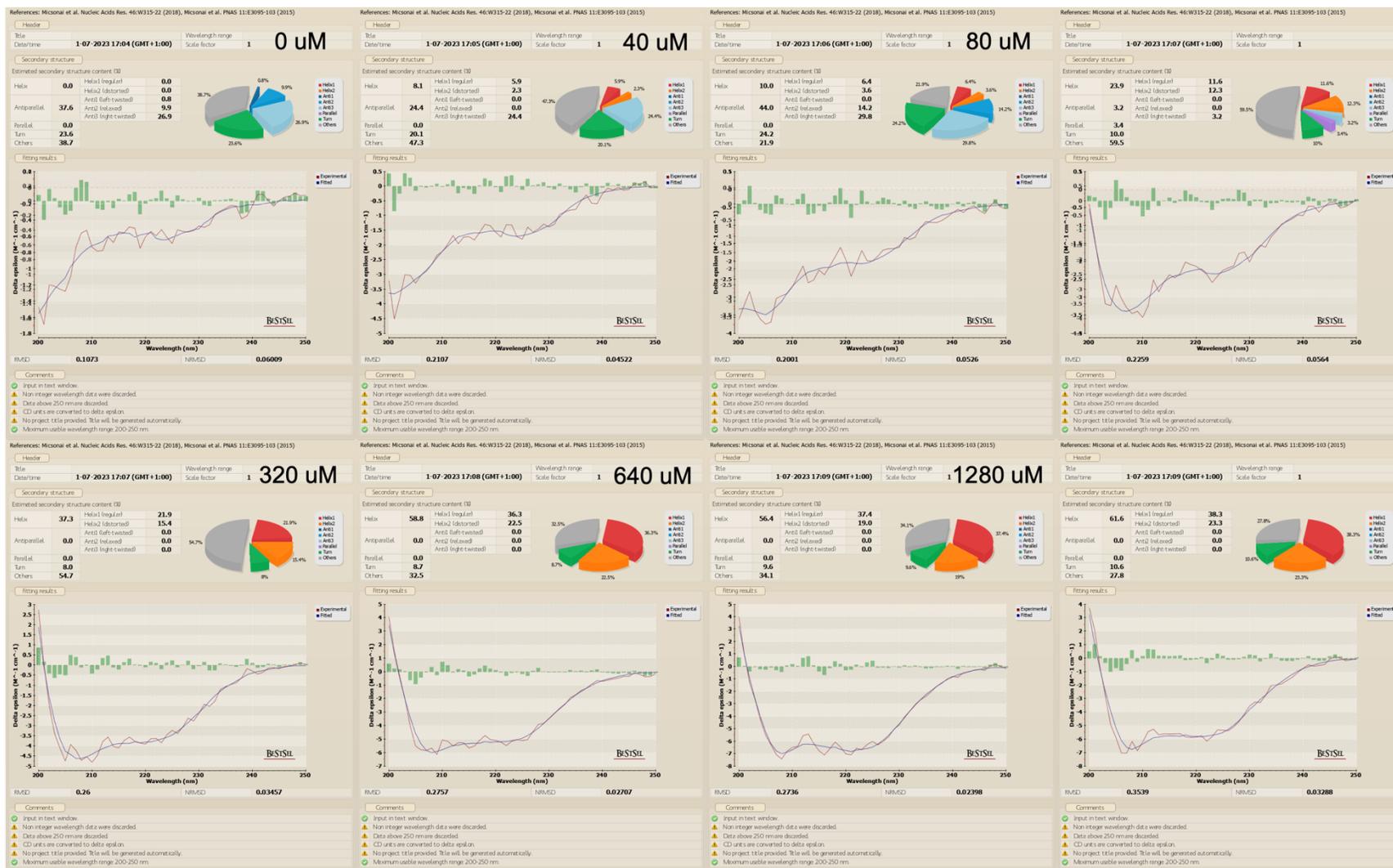
10.0 + DMPC/DMPG



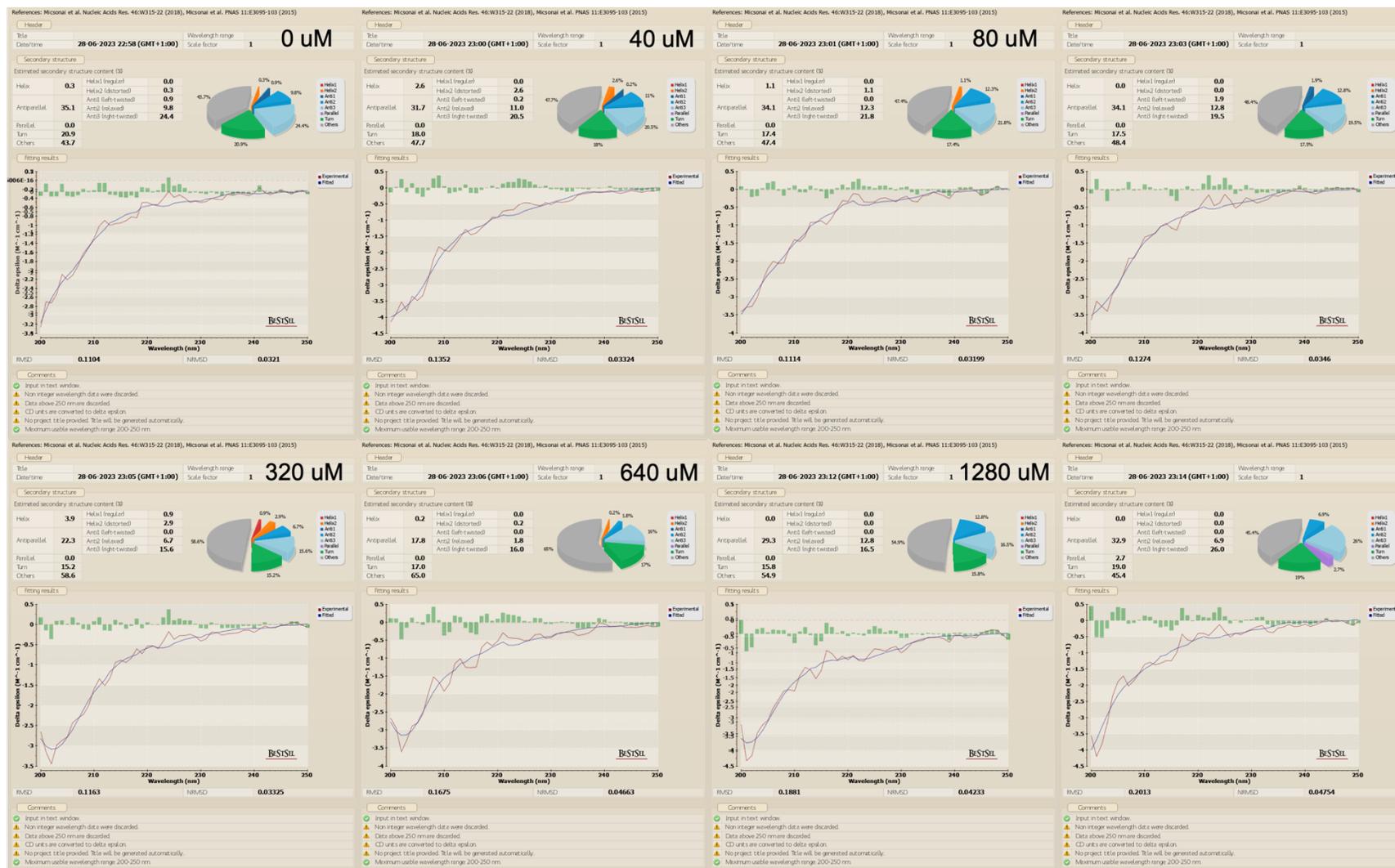
13.1 + DMPC



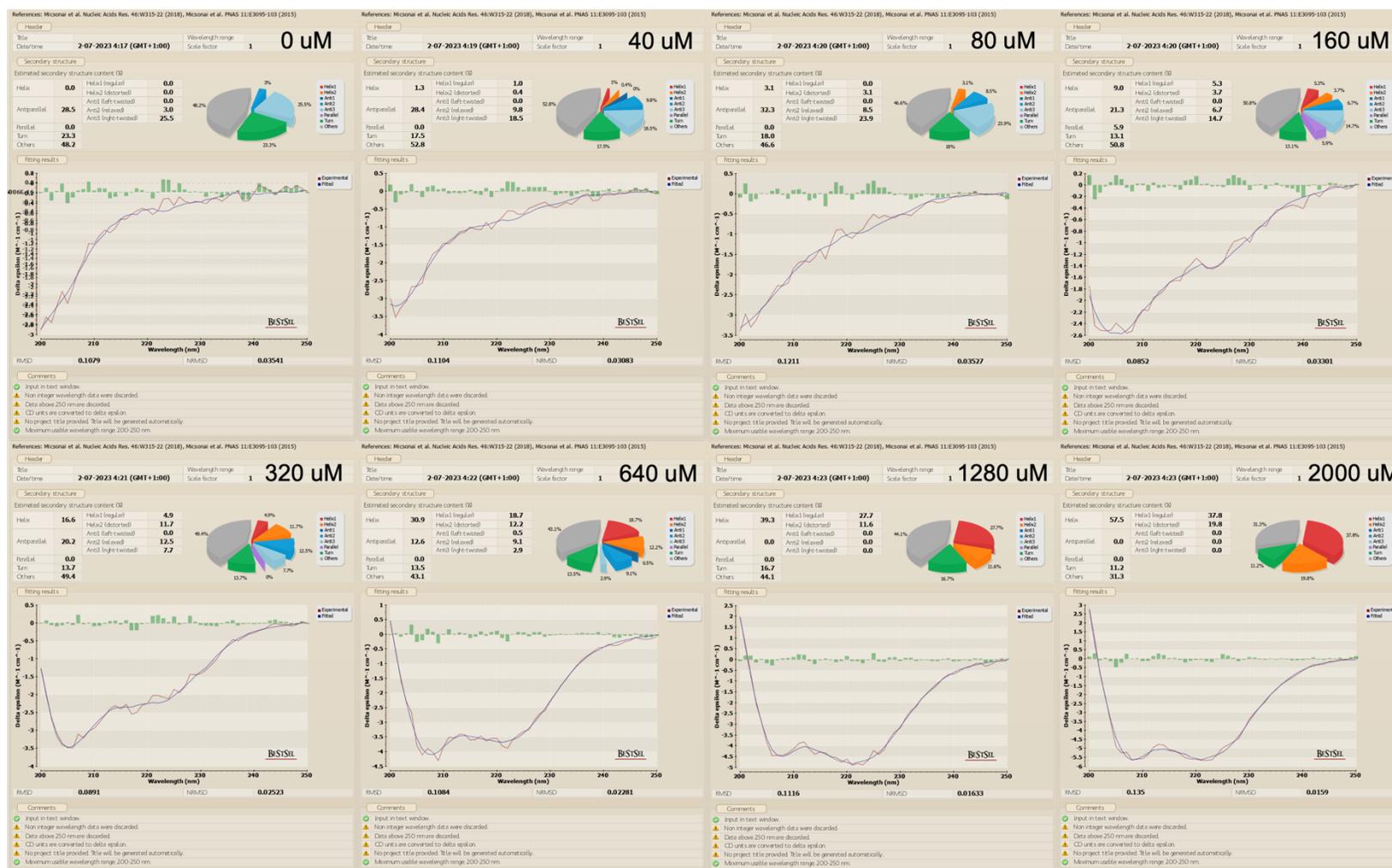
13.1 + DMPC/DMPG



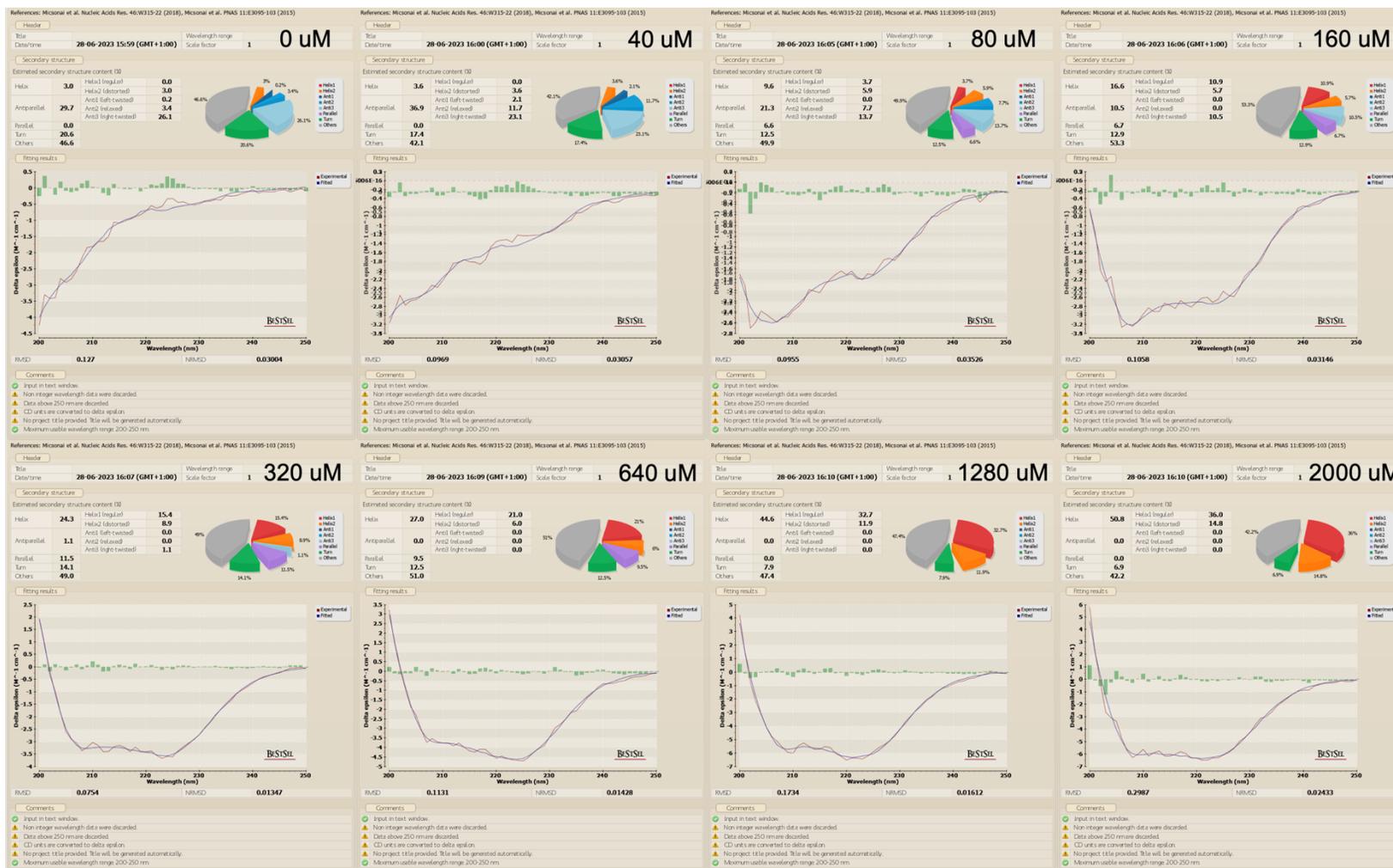
13.2 + DMPC



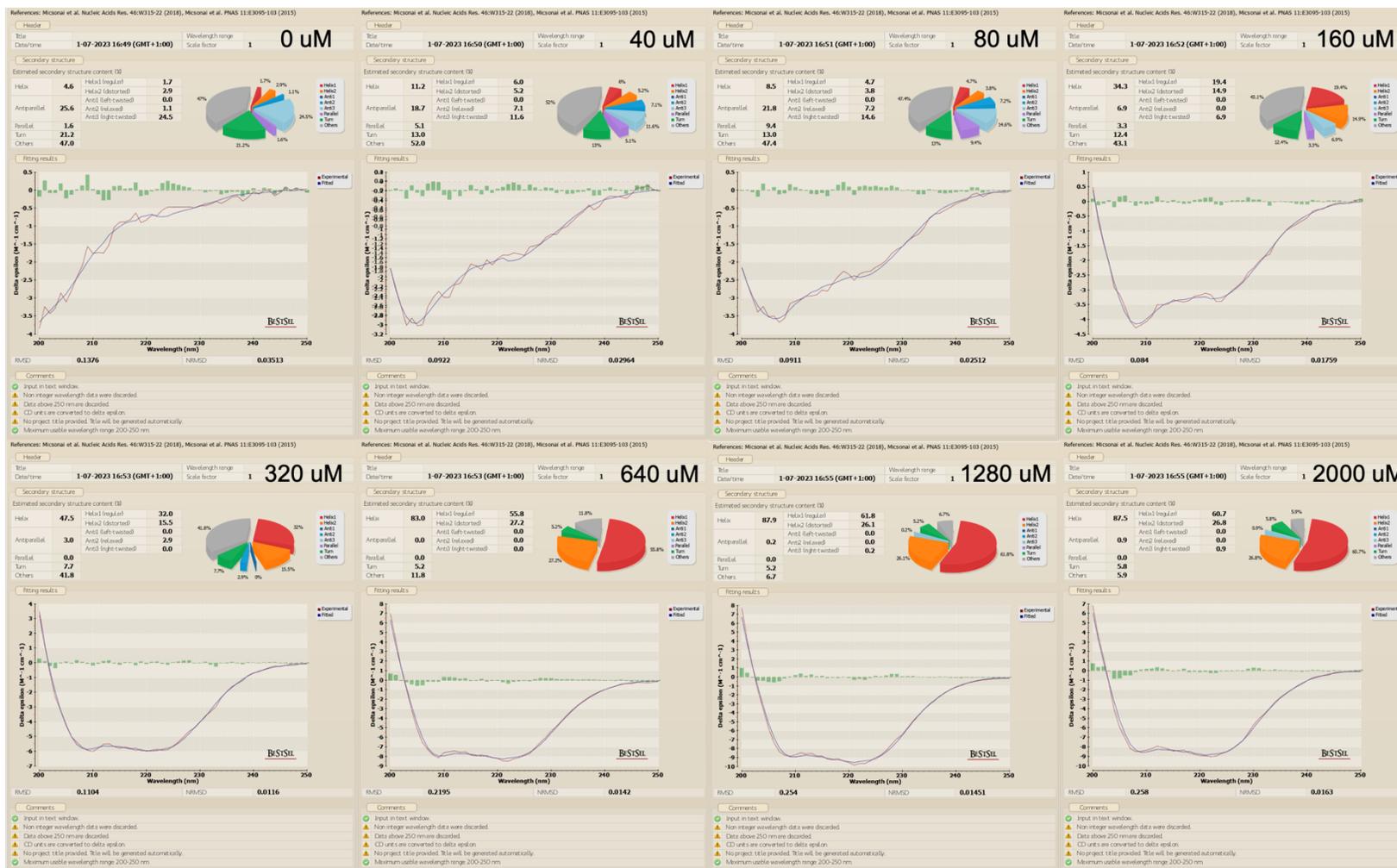
13.2 + DMPC/DMPG



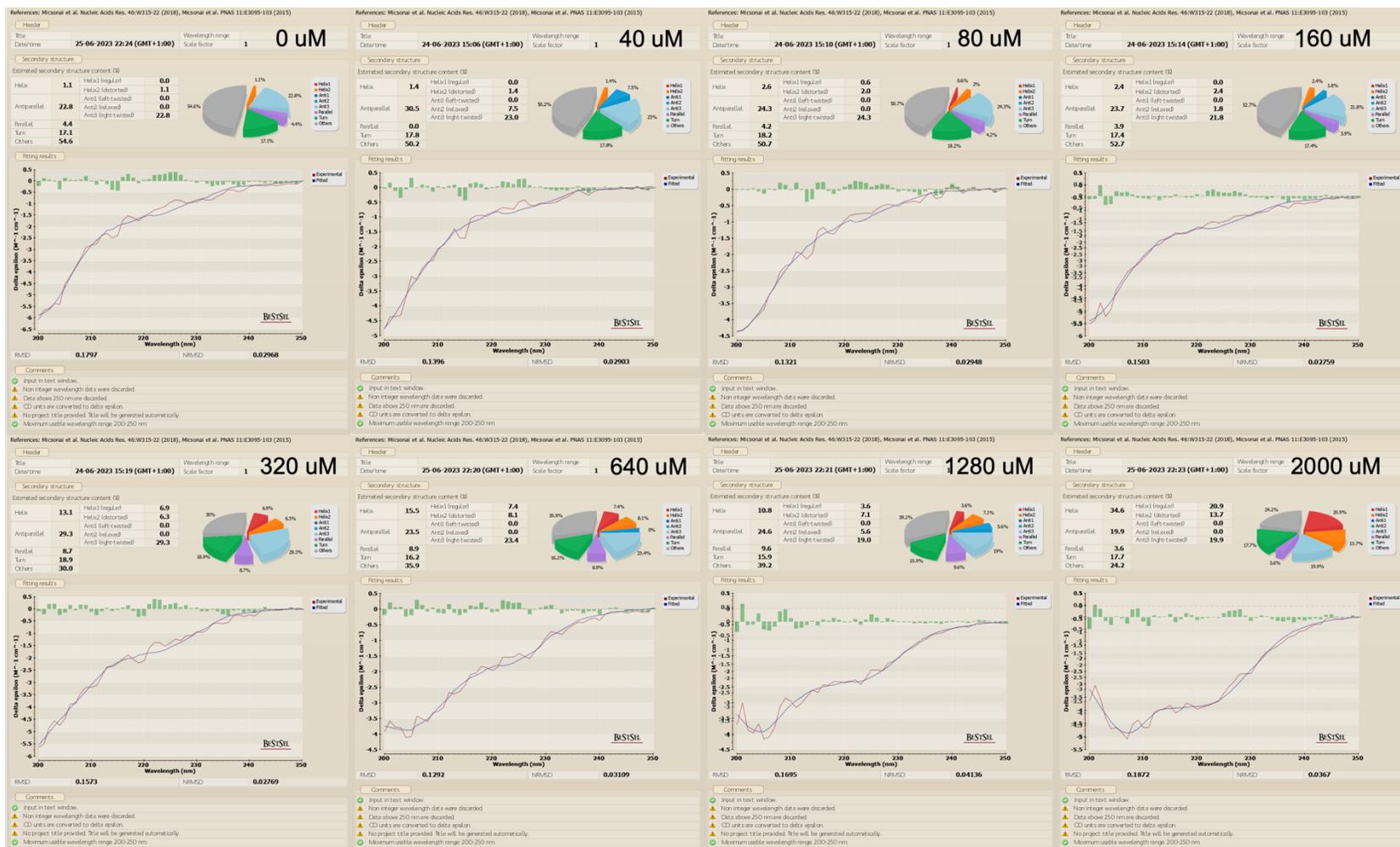
Hs02 + DMPC



Hs02 + DMPC/DMPG



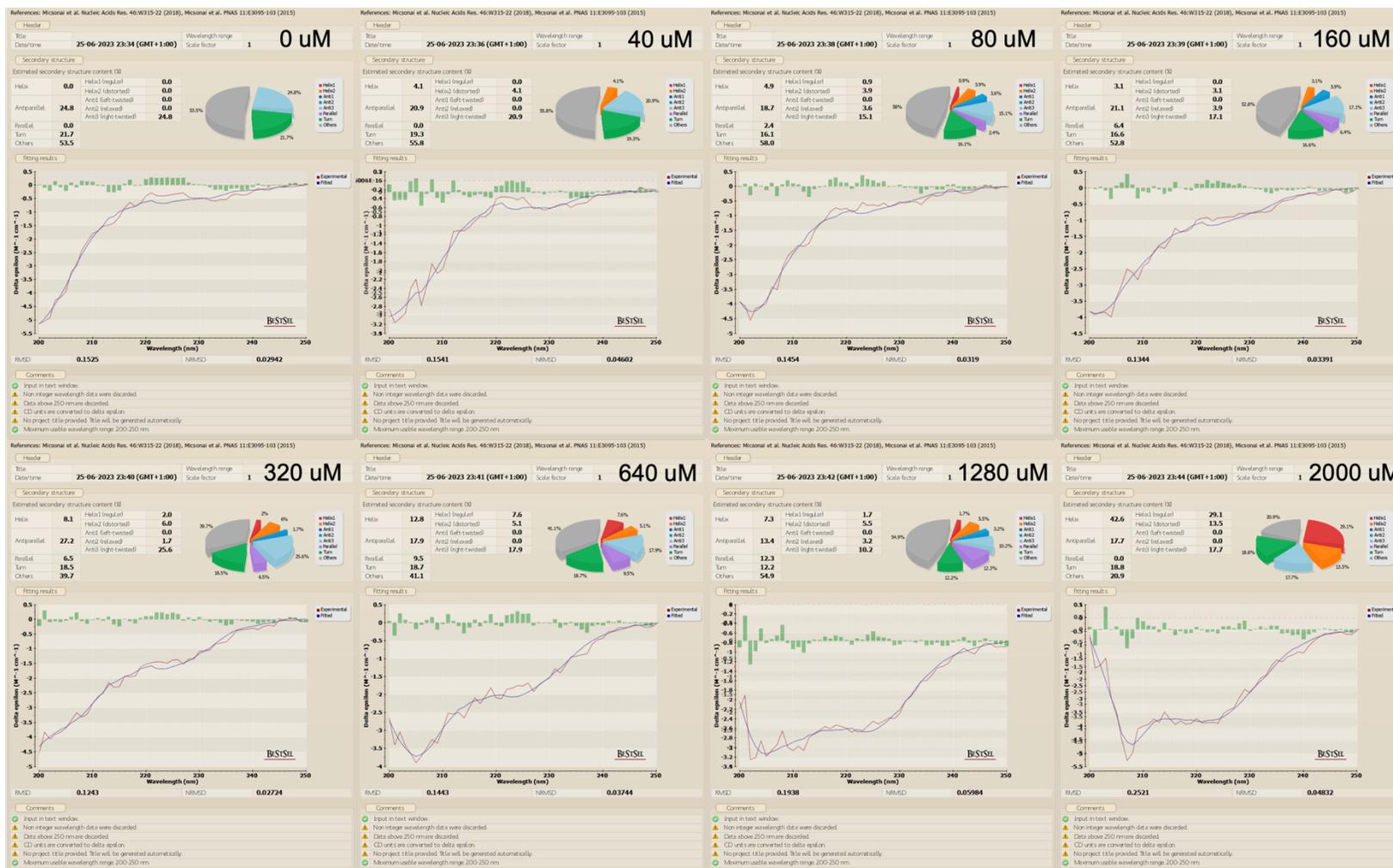
16.1 + DMPC



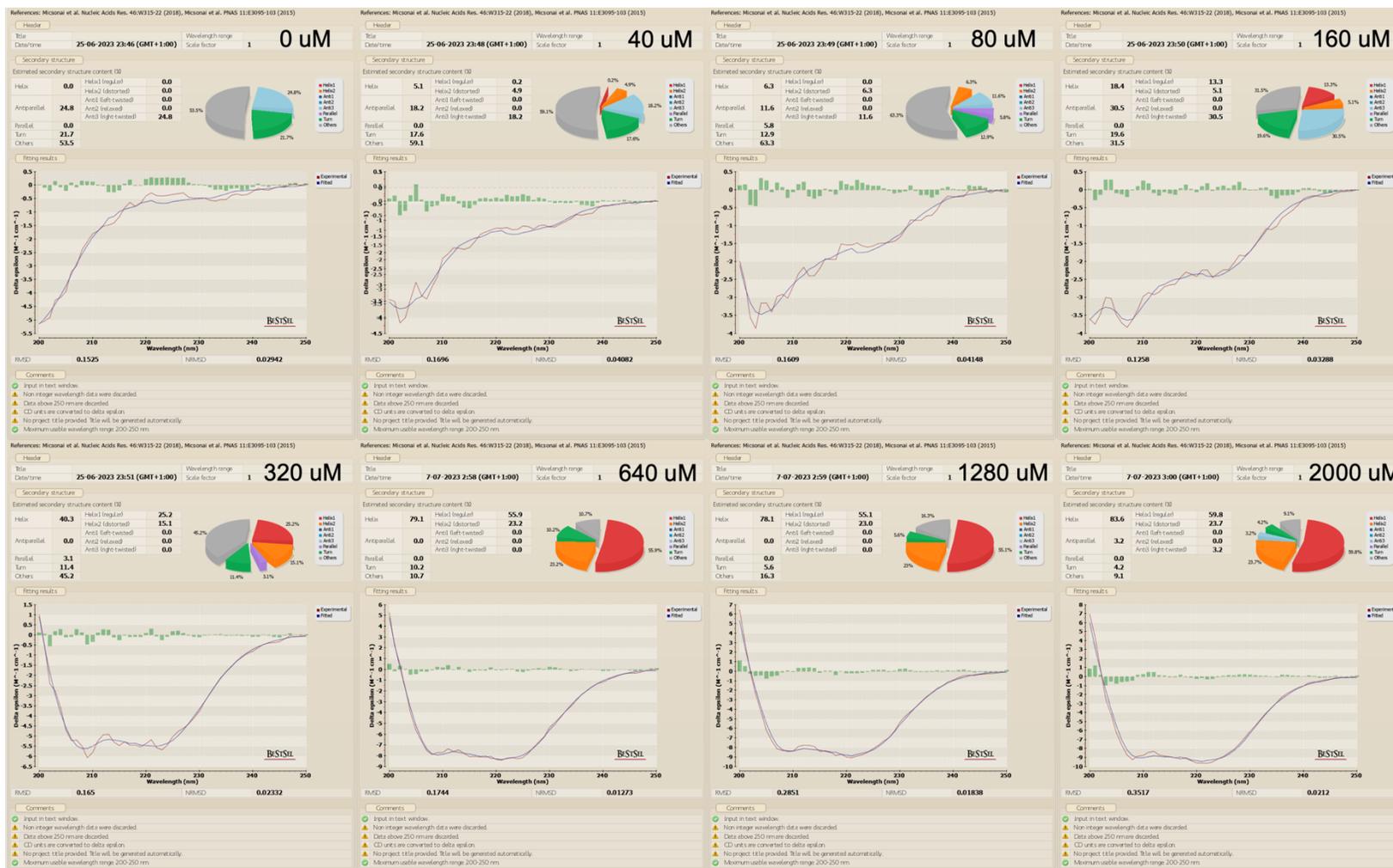
16.1 + DMPC/DMPG



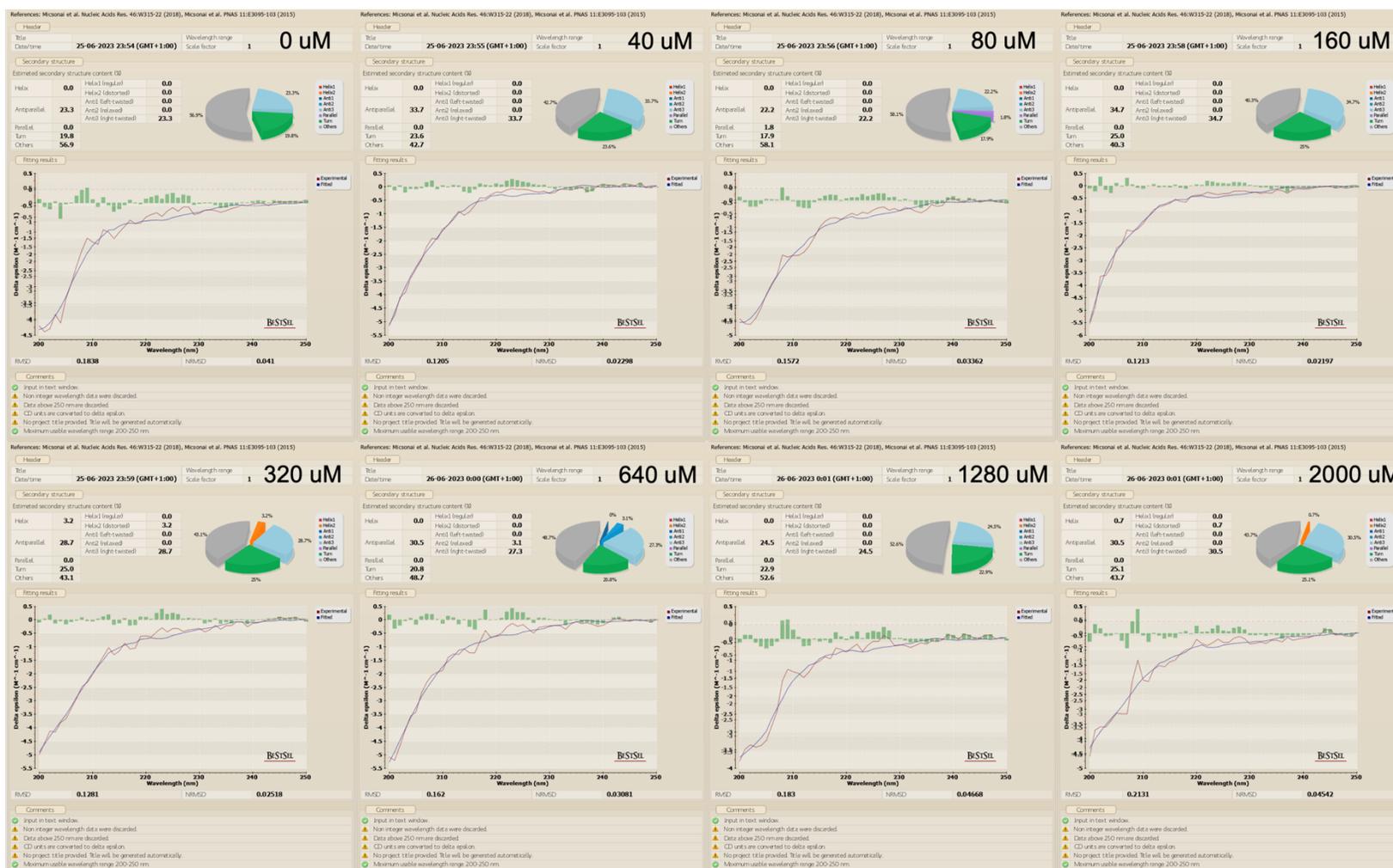
16.2 + DMPC



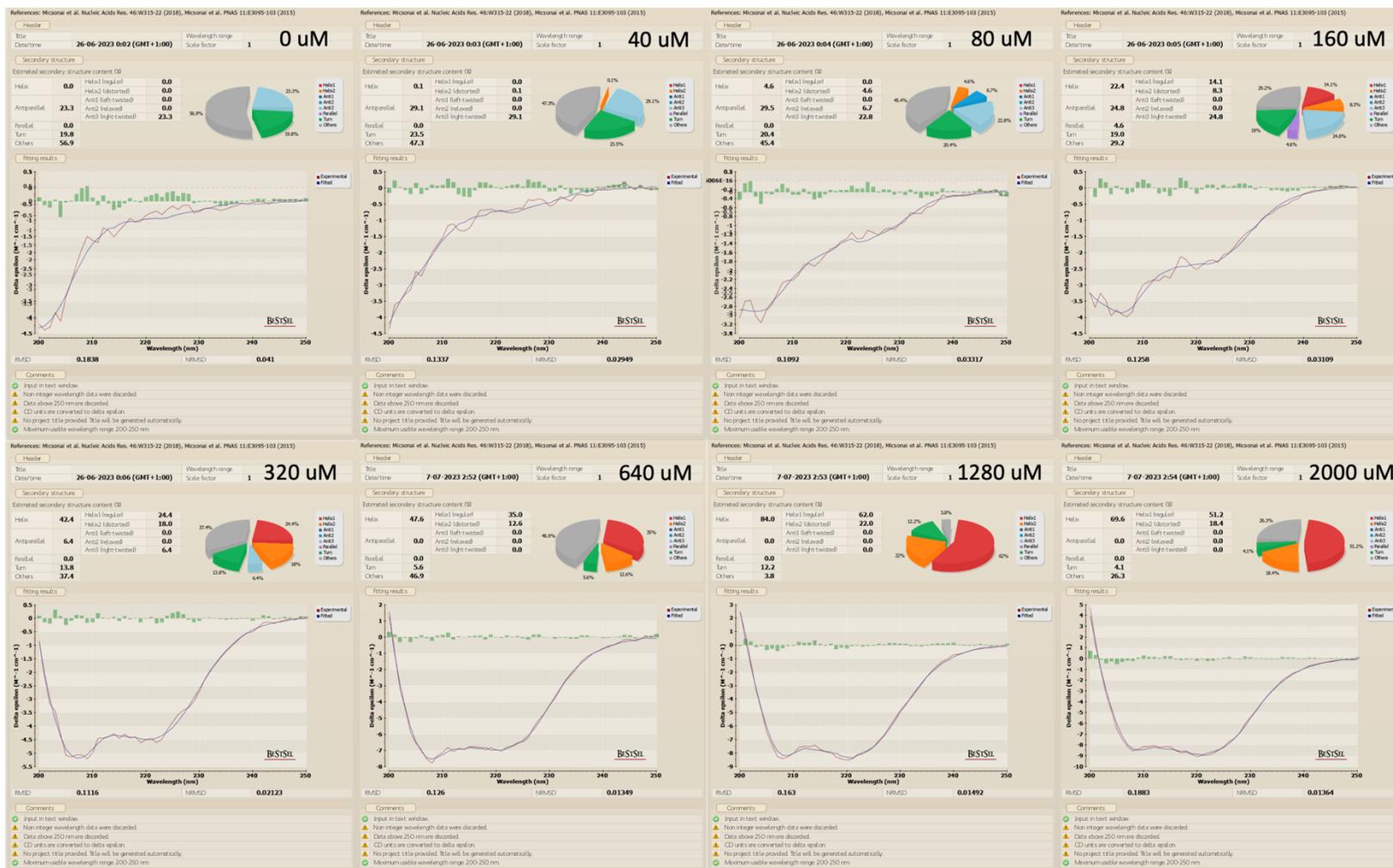
16.2 + DMPC/DMPG



16.3 + DMPC



16.3 + DMPC/DMPG



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 identifico 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, (dia) de (mês) de (ano).

Assinatura do/a discente: João Bueno Nunes

Programa: Programa de Pós-Graduação em Química

Nome completo: João Bueno Nunes

Título do Trabalho: Desenho Racional de peptídeos análogos ao

H₂O₂ com ampliação de seletividade como agentes antimicrobianos

Nível: Mestrado () Doutorado

Orientador/a: _____



Documento assinado digitalmente

GUILHERME DOTTO BRAND

Data: 11/09/2023 10:09:56-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>