



Universidade de Brasília - UnB

Instituto de Química - IQ

Programa de Pós Graduação em Química

Dissertação de Mestrado

Prospecção, síntese e avaliação de Peptídeos Intragênicos  
Antimicrobianos curtos derivados de proteínas humanas como  
agentes antimicrobianos e anti-inflamatórios

Fernanda Leonel Silva

Brasília, DF

Setembro/2022



Universidade de Brasília - UnB

Instituto de Química - IQ

Programa de Pós Graduação em Química

Fernanda Leonel Silva

Prospecção, síntese e avaliação de Peptídeos Intragênicos  
Antimicrobianos curtos derivados de proteínas humanas como  
agentes antimicrobianos e anti-inflamatórios

Dissertação apresentada à Universidade de Brasília, como parte dos requisitos  
necessários para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand

Brasília, DF

Setembro/2022

## **Agradecimentos**

Primeiramente, a minha família, minha mãe Zilma e meu pai Paulo por sempre respeitarem os meus sonhos e acreditarem em mim, mesmo sem compreenderem muito bem o que eu estou fazendo. Sem vocês, nada disso seria possível.

Ao Dr. Guilherme Dotto Brand por aceitar me orientar neste mestrado, mesmo não me conhecendo no primeiro momento. Obrigada por acreditar no meu potencial, por todo conhecimento passado e paciência nessa fase. Você é um grande exemplo de pessoa, profissional na pesquisa científica, professor, e, em especial, orientador.

Ao meu companheiro João Felipe que está do meu lado desde o TCC, apoia essa minha trajetória na área acadêmica e mostra que amar é leve. A minha sogra Simone que me acolheu muito bem na casa dela na fase de pandemia.

As minhas amigas Ray e Anna por todas as conversas em momentos desesperadores como nos de alegria.

Aos meus amigos, tanto da área acadêmica quanto fora, que ajudam de todas as formas possíveis.

A professora Dra. Kelly Grace Magalhães pela colaboração nos ensaios com células. Em especial, a pós-doutoranda Raquel Almeida pela realização dos experimentos e disponibilidade de ensinar e explicar.

Aos amigos de laboratório, Michele, Samuel, João Bueno, Saulo, Thiago e outros, que estiveram comigo desde o início do mestrado, ensinando a sintetizar, trabalhando e sofrendo juntos.

Ao Adolfo por me ajudar na realização dos experimentos de MS e me passar todo conhecimento que tinha sobre o assunto.

A todos do laboratório de Anatomia Molecular e Nanomedicina da Faculdade de Medicina, em especial a Wanessa, o Daniel, o Zé e a Andreeanne. Vocês sempre me receberam e auxiliaram muito bem no laboratório.

A professora Dra. Aline Lima de Oliveira pela ajuda nos ensaios de RMN e auxílio na análise dos dados.

Aos alunos da católica, Bianca e Stefan, na parte de liofilização de amostras e ensaios de MIC.

A Universidade de Brasília, ao Programa de Pós Graduação em Química e as agências de fomento FAPDF e CNPq.

A todos que fizeram parte dessa fase, mesmo que minha memória tenha falhado, meus mais sinceros agradecimentos.

## SÚMARIO

Índice de figuras .....	vi
Índice de tabelas .....	x
Lista de abreviatura .....	xi
Resumo .....	xiv
Abstract .....	xv
1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	4
2.1. Objetivos gerais .....	4
2.2. Objetivos específicos .....	4
3. Referencial teórico.....	5
3.1. Peptídeos antimicrobianos .....	5
3.2. Peptídeos curtos do tipo folha- $\beta$ .....	9
3.3. Composição de membrana de microrganismos .....	12
3.4. Mecanismo de ação dos AMPs.....	15
3.5. atividade anti-Inflamatória de peptideos.....	20
3.6. Peptídeos intragênicos antimicrobianos.....	22
3.6.1. Prospecção de peptídeos bioativos encriptados em proteínas humanas .....	23
3.7. Síntese em fase sólida .....	27
3.8. Ressonância magnética para a determinação de estruturas peptídicas. ....	30
4. Metodologia.....	33
4.1. Seleção de peptídeos intragênicos antimicrobianos (IAPs) .....	33
4.2. Síntese dos peptídeos.....	33
4.3. Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	35
4.4. Análise de peptídeos por espectrometria de massa .....	36
4.4.1. Elétron spray MS e MS/MS .....	37
4.4.2. Análise MALDI-ToF MS .....	37
4.5. Quantificação dos peptídeos.....	38
4.6. Avaliação da concentração mínima inibitória dos peptídeos contra bactérias 39	
4.7. Ressonância Magnética Nuclear.....	40

4.8.	Diferenciação de macrófagos murinos derivados da medula óssea (BMDM)	41
4.9.	Ensaio de viabilidade celular – MTT	41
4.10.	Dosagem de citocinas	42
4.11.	Biogênese de corpúsculos lipídicos	42
4.12.	Análises estatísticas	43
5.	Resultados e discussão	44
5.1.	Busca de potenciais IAPs no proteoma humano	44
5.2.	Síntese em fase sólida e purificação de peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência	48
5.3.	Confirmação da estrutura primária dos IAPs por Espectrometria de massa	52
5.4.	Quantificação	57
5.5.	Avaliação da concentração inibitória mínima dos IAPs versus bactérias patogênicas	58
5.6.	Efeito dos IAPs curtos na viabilidade de macrófagos murinos	61
5.7.	Quantificação de Corpúsculos lipídicos em BMDM após tratamento com peptídeos	64
5.8.	Dosagem de citocinas em BMDM tratados com os peptídeos e estimulados com LPS	70
5.9.	Avaliação preliminar da interação do peptídeo Hs11 com lipopolissacarídeos por ressonância magnética nuclear	74
6.	Conclusão	77
7.	Bibliografia	79
	Anexo 1	89
	Anexo 2	90
	Anexo 3	93
	Anexo 4	94
	Anexo 5	97

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação em cartoon das estruturas secundárias mais comuns em AMPs. (A) Conformação de $\alpha$ -helice (representada na cor laranja), estrutura observada no AMP LL-37 ao estar em presença de micelas; (B) Conformação estendida, estrutura observada quando os AMPs não adotam conformação 3D definida, como a Indolicidina; (C) Conformação fita- $\beta$ (representado na cor verde), normalmente favorecida pela presença de ligações de dissulfeto (representado na cor amarela), por exemplo, peptídeo da aranha gomesina derivado de um gancho-beta. (D) Conformação com junção das estruturas anteriores, por exemplo, o peptídeo de inseto CS $\alpha\beta$ defensina formicina que contém elementos de $\alpha$ -helice e fita- $\beta$ ; Imagem extraída de Koehbach & Craik, 2019.....	7
Figura 2 – Representação de AMPs e sua conformação anfifílica, especificando as regiões hidrofílica e hidrofóbica. A) Corresponde a representação de roda helicoidal do peptídeo AR-22. Os resíduos representados como losangos são hidrofóbicos e os resíduos hidrofílicos são círculos. Os resíduos carregados positivamente são pentágonos (Zhang et al., 2016); B) Corresponde ao peptídeo Protegrin 2, que apresenta estrutura secundária de folha beta (estrutura primária = RGGRLCYCRRRFCICV), em vermelho estão representados os resíduos hidrofóbicos e em azul os resíduos hidrofílicos.....	9
Figura 3 - R Representação da estrutura do LPS em bactéria Gram-negativa. A) Micrografia eletrônica da célula bacteriana de E. Coli; B) Representação esquemática da parede celular bacteriana e demonstração da localização do LPS; C) Arquitetura da estrutura do LPS; D) Estrutura do Lipídeo A, o centro tóxico do LPS. GlcN: D-glucosamina; Hep: L-glicero-D-mano-Heptose; Kdo: ácido 2-ceto-3-desoxi-octolosônico; P: fosfato. Imagem extraída e adaptada de Giuliani, 2010. ....	14
Figura 4 - Estrutura de bactérias Gram-positivas; A) Micrografia eletrônica de varredura da célula bacteriana S. aureus; B) micrografia eletrônica de transmissão mostrando a parede celular; C) Esquema da parede celular de bactérias Gram-positivas; Imagem adaptada de Brock et al., 2015. (Brock et al., 2015).....	15
Figura 5 - Representação dos mecanismos de ação dos AMPs em membranas. (A) Modelo Barrel stave: o AMPs interagem com a membrana formando poros, do tipo canais transmembrânicos revertidos por peptídeos; (B) Modelo de poro toroidal: o AMP interage eletrostaticamente com a membrana se inserindo nela, o que induz o fosfolipídio da monocamada lipídica superior a dobrar-se e forma uma intercalação de moléculas de AMPs com as cabeças polares dos fosfolipídeos; (C) Modelo Carpete: os peptídeos se acumulam na superfície da membrana, atraídos eletrostaticamente pelas cargas negativas dos fosfolipídeos; (D) Modelo tipo detergente: quando os AMPs causam um efeito em desintegração e formam micelas; Em laranja estão representados os AMPs e em cinza a camada lipídica. Imagem retirada e adaptada de Kumar et al., 2018. ....	18
Figura 6 – Representação da estrutura do peptídeo Hs02 em alfa-hélice a partir da interação com micelas de DPC-d38. Onde é demonstrado em vermelho resíduos de	

carga positiva e em verde os resíduos hidrofóbicos. (Guilherme D. Brand et al., 2019) .....	24
Figura 7 - Exemplos de resinas utilizadas na SPFS, imagem adaptada do Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach (W. C. Chan and P. D., 2000) .....	27
Figura 8 - Desproteção do N-terminal (W. C. Chan and P. D., 2000).....	28
Figura 9 - Rota para síntese utilizando DIC/Oxyma (W. C. Chan and P. D., 2000)...	29
Figura 10 - Rota de síntese utilizando HBTU/DIPEA (W. C. Chan and P. D., 2000).	30
Figura 11 - Representação esquemática para a prospecção de potenciais IAPs, podendo começar tanto com resíduos de aminoácidos polares (representados em vermelho/círculos) e resíduos de aminoácidos apolares (representado em verde/losangos).....	44
Figura 12 - Histogramas representando a distribuição das propriedades físico-químicas para todas as moléculas. A) Massa dos fragmentos; B) Hidrofobicidade média; C) Momento hidrofóbico D) Carga líquida E) Agregação Na <sub>4</sub> vSS;.....	45
Figura 13 - Cromatograma correspondente a purificação do peptídeo Hs11 com utilização de um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA e água + 0,1% TFA (representado pela linha preta) e monitoramento do comprimento de onda em 216nm (representado pela linha vermelha) e 280nm (representado pela linha verde), onde o peptídeo eluiu em um tempo de retenção de 20,53 min.....	49
Figura 14 - Cromatograma correspondente a purificação do peptídeo Hs12 com utilização de um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA e água + 0,1% TFA (representado pela linha preta) e monitoramento do comprimento de onda em 216nm (representado pela linha vermelha) e 280nm (representado pela linha verde), onde o peptídeo eluiu em um tempo de retenção de 24,14 min .....	49
Figura 15 - Cromatograma correspondente a purificação do peptídeo Hs13 com utilização de um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA e água +0,1% TFA (representado pela linha preta) e monitoramento do comprimento de onda em 216 nm (representado pela linha vermelha) e 280nm (representado pela linha verde), onde o peptídeo eluiu em um tempo de retenção de 18,48 min.....	50
Figura 16 - Cromatograma correspondente a purificação do peptídeo Hs14 com utilização de um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA e água + 0,1% TFA (representado pela linha preta) e monitoramento do comprimento de onda em 216nm (representado pela linha vermelha) e 280nm (representado pela linha verde), onde o peptídeo eluiu em um tempo de retenção de 17,36 min. ....	50
Figura 17 - Cromatograma correspondente a purificação do peptídeo HsCtrl1 com utilização de um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA e água + 0,1% TFA (representado pela linha preta) e monitoramento do comprimento de onda em 216nm (representado pela linha vermelha) e 280nm (representado pela linha verde), onde o peptídeo eluiu em um tempo de retenção de 18,66 min.....	51
Figura 18 - Espectro de MS do peptídeo HsCtrl1, com [M+H] <sup>+</sup> = 877,498 Da e o espectro de fragmentação do íon. Espectro obtidos a partir de um ESI-MS.....	52
Figura 19 - Espectro de MS do produto bruto da síntese de Hs11 obtido em modo refletor positivo em um MALDI-TOF MS no range de m/z de 800 a 1600.....	53

Figura 20 - Espectro de MS/MS do peptídeo Hs11 obtido em modo LIFT em um MALDI-TOF MS com o assinalamento dos íons das séries y e b (em vermelho). ....	53
Figura 21 - Espectro de MS do produto bruto da síntese de Hs12 obtido em modo refletor positivo em um MALDI-TOF MS no range de m/z de 800 a 1600.....	54
Figura 22 - Espectro de MS/MS do peptídeo Hs12 obtido em modo LIFT em um MALDI-TOF MS com o assinalamento dos íons das séries y e b (em vermelho). ....	54
Figura 23 - Espectro de MS do produto bruto da síntese de Hs13 obtido em modo refletor positivo em um MALDI-TOF MS no range de m/z de 800 a 1600.....	55
Figura 24 - Espectro de MS/MS do peptídeo Hs13 obtido em modo LIFT em um MALDI-TOF MS com o assinalamento dos íons das séries y e b (em vermelho). ....	55
Figura 25 - Espectro de MS do produto bruto da síntese de Hs14 obtido em modo refletor positivo em um MALDI-TOF MS no range de m/z de 800 a 1600.....	56
Figura 26 - Espectro de MS/MS do peptídeo Hs14 obtido em modo LIFT em um MALDI-TOF MS com o assinalamento dos íons das séries y e b (em vermelho). ....	56
Figura 27 - Ensaio de viabilidade celular MTT para verificar o efeito dos peptídeos A)Hs11, B)Hs12, C)Hs13, D)Hs14 e E)HsCtrl1 em células de macrófagos murinos após exposição de 24H e 48H. Os asteriscos (*), (**) e (***) representam p<0,05, P<0,01, e P<0,0001, respectivamente. NE corresponde às células não estimuladas. ....	63
Figura 28 - Análise do efeito do peptídeo Hs11 na indução da biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos por Bodipy A) histograma em relação ao percentual da média de células B) Representação do tipo Dotplot.....	65
Figura 29 - Análise do efeito do peptídeo Hs12 na indução da biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos por Bodipy A) histograma em relação ao percentual da média de células B) Representação do tipo Dotplot.....	66
Figura 30 - Análise do efeito do peptídeo Hs13 na indução da biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos por Bodipy A) histograma em relação ao percentual da média de células B) Representação do tipo Dotplot.....	67
Figura 31 - Análise do efeito do peptídeo Hs14 na indução da biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos por Bodipy A) histograma em relação ao percentual da média de células B) Representação do tipo Dotplot;.....	68
Figura 32 - Análise do efeito do peptídeo HsCtrl1 na indução da biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos por Bodipy A) histograma em relação ao percentual de média de células B) Representação do tipo Dotplot.....	69
Figura 33 - A Análise da modulação da secreção de citocinas de macrófagos murinos por ELISA, após incubação com os peptídeos Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 e HsCtrl1, e com LPS. Dosagem de A) TNF- $\alpha$ e B) IL-6; NE corresponde a células não estimuladas, ou seja, livre de peptídeo ou LPS; Os asteriscos (**), (***) e (****) correspondem a p<0,01, p<0,001 e p<0,0001, respectivamente; ns corresponde a não significativo; A significância disposta sobre as barras é relativa a testes versus o grupo NE. ....	71
Figura 34 – Análise do efeito do peptídeo Hs11 sobre a secreção de citocinas (A) TNF- $\alpha$ e (B) IL-6 de macrófagos BMDM estimulados com LPS por ELISA. Este	

experimento é representativo de triplicatas. Asterisco (\*\*) representa  $P < 0,01$ ; ns corresponde a não significativo. ....72

Figura 35 - Análise do efeito dos peptídeos (A)Hs12, (B)Hs13, (C)Hs14 e (D)HsCtrl1 sobre a secreção de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 de macrófagos BMDM estimulados com LPS por ELISA. Estes experimentos são representativos de triplicatas;.....73

Figura 36 - Espectros de RMN de uma dimensão demonstrando a interação entre o LPS e o peptídeo Hs11utilizando o espectrômetro Bruker Avance III HD 600 operando a 600 MHz (14 T) para  $^1\text{H}$ , a 25 °C. A) Espectros completos de uma dimensão B) Zoom nos espectros entre 10 – 6 ppm; Em roxo corresponde o espectro com o peptídeo puro a 2 mM. Em verde corresponde ao espectro de Hs11 nesta mesma concentração com 10  $\mu\text{M}$  de LPS. Em vermelho, Hs11 com 20  $\mu\text{M}$  de LPS e em azul, Hs11 com 30  $\mu\text{M}$  de LPS. ....75

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (MIC) de peptídeos sintéticos curtos (mg/L), retirados de Ong et al., 2013.....	11
Tabela 2 - Relação de bactérias utilizadas no ensaio de avaliação da concentração mínima inibitória dos peptídeos.....	40
Tabela 3 - Relação de potenciais IAPs selecionados para síntese química .....	47
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas dos peptídeos selecionados para síntese em fase sólida. ....	47
Tabela 5 - Relação do peptídeo controle .....	48
Tabela 6 - Relação de comparação entre massa calculada e a massa obtida experimentalmente.....	57
Tabela 7 - Leitura dos comprimentos de onda de 205nm, 215nm, 225nm e 280nm no UV-VIS para cada peptídeo e o valor calculado para suas concentrações .....	58
Tabela 8 - Concentração inibitória mínima (MIC), dado em $\mu\text{M}$ , para em bactérias patogênicas humanas .....	59
Tabela 9 - Concentração inibitória mínima (MIC), dado em $\mu\text{M}$ , para os peptídeos testados pelo trabalho de Ong et al., 2013.....	60

## LISTA DE ABREVIATURA

ACN: Acetonitrila

AMP: Peptídeos antimicrobianos

BMDM: Bone marrow-derived macrophage

BSA: Bovine serum albumine

CAIQ: Central Analítica do Instituto de Química

CL: Corpúsculo lipídico

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CP: Concentração de peptídeo

DAPI: 4',6 diamidino-2-fenilidola

DCM: Dicloro metano

CD14 : Cluster of Differentiation 14

DIC: N,N'-diisopropilcarbodiimina

DIPEA: N-N'-diisopropiletilamina

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMF: N,N-dimetilformamida

ELISA: Enzyme-linked immuno sorbent assay

Esl: Electrospray

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonil

FBS: Fetal Bovine Serum

GlcN: D-glucosamina

HBTU: 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroicohexafluorofosfato

HCCA: Ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxicinâmico

HDP: Peptídeos de defesa de hospedeiro

Hep: L-glicero-D-mano-Heptose

IAP: Peptídeos antimicrobianos intragênico

IL: Interleucina

IR: Razão da infecção

KCN: Cianeto de potássio

Kdo: ácido 2-ceto-3-desoxi-octolosônico

LIMI: Laboratório de imunologia e inflamação

LPB: LPS binding protein

LPS: Lipopolissacarídeos

M<sub>H</sub>: Momento hidrofóbico.

MICs: Concentração mínima inibitória

MOI: Multiplicidades de infecção

MRSA: Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*

NF-κB: Fator nuclear κB

NOE: Nuclear Overhauser effect

NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

Oxyma: Acetato de etil 2-ciano-2- (hidroxiimino)

P: Fosfato

PBS: Tampão fosfato salino

PFU: Formação de unidades de placa

RMN: Ressonância magnética nuclear

SPFS: Síntese de peptídeos em fase sólida

TFA: ácido trifluoroacético

TLR4: Receptor do tipo 4

TM: Tendência transmembrana

TMSP: 2,2,3,3-d4-3-trimetilsililpropionato de sódio

TNF-α: Fator alfa de necrose de tumor

TOCSY: Total correlation Spectroscopy

UCB: Universidade Católica de Brasília

UnB: Universidade de Brasília

## RESUMO

Algumas proteínas podem apresentar segmentos internos com forma e propriedades físico-químicas compatíveis com peptídeos antimicrobianos (AMPs), de tal maneira que, quando sintetizados como entes individuais, podem apresentar atividades biológicas similares a este grupo de moléculas. Normalmente a prospecção destes segmentos protéicos é feita utilizando AMPs helicoidais como molde, o que pode resultar na identificação de  $\alpha$ -hélices catiônicas e anfifílicas. O presente trabalho se propõe a explorar um novo molde para peptídeos antimicrobianos encriptados em proteínas com base em fitas- $\beta$  catiônicas anfifílicas e a avaliar a ação antibacteriana e anti-inflamatória de algumas moléculas. Para tal, 6 potenciais peptídeos antimicrobianos intragênicos (IAPs) curtos foram prospectados do proteoma humano pelo software Kamal, sendo 4 destes sintetizados e purificados com êxito, o Hs11, Hs12, Hs13 e Hs14. Um peptídeo controle, o HsCtrl1, foi também sintetizado. Os peptídeos Hs11 e Hs12 apresentaram atividade antimicrobiana ampla contra bactérias, com concentração inibitória mínima variando entre 8 e 128  $\mu$ M. Além disso, foi verificado que estes mesmos peptídeos não reduziram a viabilidade celular de macrófagos murinos (BMDM) após 24 horas de incubação até a concentração de 100 $\mu$ M. Todos os peptídeos reduziram, em graus variados, a biogênese de corpúsculos lipídicos em BMDM tratados ou não com lipopolissacarídeos (LPS) e Hs11, Hs12, Hs13 e Hs14 diminuíram a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 em BMDM não estimulados com LPS. O peptídeo Hs11 reduziu a secreção de TNF- $\alpha$  ao nível basal em células incubadas previamente com LPS. Por fim, estudos de ressonância magnética nuclear permitiram verificar interação do peptídeo Hs11 com agregados de LPS. O estudo destes peptídeos curtos anfifílicos mostra-se promissor por prover novas moléculas pequenas, de 8 a 9 resíduos de aminoácidos, com ação antibacteriana comparável a AMPs conhecidos e com ação anti-inflamatória. A metodologia aqui descrita tem potencial na geração de alternativas no combate a infecções bacterianas causadas por microrganismos resistentes, as quais devem vitimar mais pessoas que o câncer por ano em 2050.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobiano/ Anti-inflamatória / Kamal

## ABSTRACT

Some proteins may present internal segments with shape and physical-chemical properties compatible with antimicrobial peptides (AMPs), such that, when synthesized as individual entities, they could present similar biological activities. Normally, the prospection of those is done based on helical AMPs, which could result in the identification of protein segments compatible with cationic and amphiphilic  $\alpha$ -helices. The present work explores a new form for encrypted antimicrobial peptides in proteins based on cationic and amphiphilic  $\beta$ -sheets and aims to evaluate their activity as antibacterial and anti-inflammatory molecules. For such, 6 putative short intragenic antimicrobial peptides (IAPs) were prospected from the human proteome by the software Kamal, and 4 of these were synthesized and purified with success, named Hs11, Hs12, Hs13, Hs14. One control peptide, the HsCtrl1, also was synthesized. Peptides Hs11 and Hs12 presented wide antimicrobial activity against bacteria, presenting a minimum inhibitory concentration between 8 and 128  $\mu$ M. Furthermore, it was verified that none of the tested peptides reduced the cellular viability of murine macrophages (BMDM) after 24 hours of incubation in concentrations up to 100  $\mu$ M. All the peptides reduced, in different ways, the biogenesis of lipid bodies in BMDM treated or not with lipopolysaccharides (LPS). Hs11, Hs12, Hs13 and Hs14 decreased the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-6 in BMDM not stimulated with LPS. The peptide Hs11 reduced the secretion of TNF- $\alpha$  to basal levels in cells that were previously incubated with LPS. At last, nuclear magnetic resonance studies were conducted to investigate the interaction between LPS aggregates and the peptide Hs11. In conclusion, short amphiphilic peptides ranging from 8 to 9 amino acid residues are interesting new small molecules, as they present antibacterial and anti-inflammatory activity that is comparable to previously known AMPs. The methodology described herein has the potential to generate alternatives in the combat of bacterial infections caused by resistant microorganisms, which are expected to victimize more people than cancer per year by 2050.

Keywords: Antimicrobial peptides / Anti-inflammatory/ Kamal

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, uma das maiores preocupações relacionadas à saúde pública está no surgimento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos. Estima-se que em 2050 morram mais pessoas por infecções causadas por bactérias resistentes do que por câncer, caso não se encontre novas soluções (Shankar, 2016; Wenzel et al., 2014). Com isso, a procura de alternativas para o tratamento de infecções bacterianas vem se intensificando. Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são uma alternativa promissora a estes antibióticos convencionais, pois eles não só apresentam um amplo espectro de ação contra diversos tipos de bactérias, como também possuem ação antifúngica e/ou antiviral (Mahlapu et al., 2016). Estas moléculas apresentam também frequentemente ação anti-inflamatória e sinergismo com outras drogas, além de baixa propensão ao desenvolvimento de resistência (Kang et al., 2017; Mishra et al., 2017; Zhong et al., 2017).

Algumas características específicas são observadas em alguns AMPs conhecidos, como uma carga líquida positiva, hidrofobicidade limítrofe e composição anfifílica. A carga líquida positiva tem como função ajudar na interação eletrostática com a membrana dos patógenos, já que geralmente essas são ricas em grupos aniônicos. A hidrofobicidade contribui para a penetração celular e indução da lise da membrana. A anfifilicidade, por sua vez, proporciona à molécula uma conformação adequada para que as duas ações anteriores ocorram simultaneamente (Kang et al., 2017; Mishra et al., 2017).

Estudos recentes têm demonstrado que determinados fragmentos internos de proteínas com propriedades físico-químicas específicas, quando isolados e sintetizados como entes individuais, podem apresentar atividade antimicrobiana, atividade que não exibiam quando estavam integradas às suas proteínas precursoras. Estes peptídeos com atividade antimicrobiana foram denominados peptídeos intragênicos antimicrobianos (IAPs). Estes IAPs apresentam um espectro de atividades biológicas semelhantes aos AMPs, podendo ter uma seletividade comparável e amplo espectro de ação antimicrobiana (Brand et al., 2012; Ramada et al., 2017).

Para prospectar tais fragmentos foi criado o software Kamal. O programa consiste em um algoritmo voltado para a busca de fragmentos internos de proteínas que apresentam propriedades físico-químicas compatíveis com AMPs. O Kamal, até o momento, estava sendo utilizado para prospectar IAPs com características compatíveis com  $\alpha$ -hélices anfifílicas, pois este tipo de conformação molecular vem se mostrando eficaz na obtenção de potentes inibidores no crescimento de microrganismos, e também de anti-inflamatórios capturadores de lipopolissacarídeos (LPS) (Bessa et al., 2019; Giuliani et al., 2010; Ramada et al., 2017).

Contudo, hipotetiza-se a existência de outros potenciais “moldes” moleculares encriptados em proteínas, os quais apresentam como base não  $\alpha$ -hélices, mas sim fitas  $\beta$  anfifílicas. Tentativamente, estes peptídeos apresentam uma periodicidade do tipo X1Y1X2Y2..., onde X corresponde a resíduos de aminoácidos hidrofílicos e Y resíduos hidrofóbicos, e seu tamanho varia entre 5 a 11 resíduos com carga superior a +2. Dados anteriores do grupo demonstram que estes peptídeos podem ser uma alternativa, pois embora não apresentem a potência e nem o amplo espectro de ação encontrado em  $\alpha$ -hélices, apresentam menor citotoxicidade contra células de mamíferos do que as  $\alpha$ -hélices (dos Santos, 2022). Além disso, estes IAPs são menores e assim de menor custo para síntese química.

A inflamação é a uma resposta sistêmica do organismo para combater e limitar infecções (Giuliani et al., 2010). Altos níveis de mediadores lipídicos, estímulos à liberação de citocinas e anticorpos são lançados no corpo como agentes pro-inflamatórios (Dadar et al., 2019; Hyldahl et al., 2013; Inohara & Nuñez, 2003). Em processos inflamatórios também é observado o aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos, que são organelas celulares responsáveis por controlar sítios de síntese e armazenamento de citocinas, apresentando uma relação direta com a secreção destas moléculas, regulação da sinalização e ativação de mediadores inflamatórios (D’Avila et al., 2008). No caso de bactérias, os primeiros estímulos ao sistema imune estão associados à parede celular destes patógenos. Em bactérias gram-negativas, o LPS, principal componente da camada externa de sua parede celular, é o responsável em ativar defesas antibacterianas e desencadear inflamação (Giuliani et al., 2010).

Às vezes, estas respostas imunológicas se tornam exacerbadas, levando a disfunção e falha de múltiplos órgãos, a sepse. Os IAPs podem ser uma alternativa para se evitar o choque séptico, pois estes peptídeos apresentam características semelhantes aos AMPs. Uma molécula da classe de IAPs curtos, prospectada pelo nosso grupo e nomeada de Hs10 interagiu com agregados de LPS, causando o aumentando de seu tamanho. Esse comportamento contrastou com o do Hs02, outro peptídeo prospectado pelo grupo, o qual também interagiu com LPS, porém causou a diminuição do tamanho dos seus agregados (Silva, 2019).

Assim, este trabalho tem como objetivo a prospecção, síntese e avaliação de alguns IAPs curtos filtrados pelo programa KAMAL em proteínas humanas, com objetivo de avaliar sua ação antibacteriana e anti-inflamatória. O trabalho também se propõe a verificar o efeito destes peptídeos em cultura de células como possíveis agentes anti-inflamatórios em macrófagos murinos estimulados com lipopolissacarídeos, como um simulador da infecção bacteriana.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVOS GERAIS**

Este trabalho tem como objetivo geral prospectar, sintetizar, caracterizar quimicamente e avaliar a atividade biológica de peptídeos intragênicos curtos provenientes de proteínas humanas.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Prospecção de IAPs curtos provenientes do proteoma humano pelo software Kamal;
- Síntese em fase sólida dos peptídeos selecionados;
- Purificação e caracterização espectrométrica dos produtos de síntese;
- Determinação de concentração inibitória mínima (MIC) dos Hs IAPs sintéticos para diferentes microrganismos;
- Avaliação da capacidade dos IAPs de atuarem como agentes anti-inflamatórios em macrófagos peritoneais murinos estimulados por LPS;
- Avaliação da interação dos peptídeos com agregados de LPS pela técnica de ressonância magnética nuclear;

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS**

Peptídeos são pequenas cadeias de aminoácidos unidos covalentemente por ligações peptídicas. O tamanho dessas moléculas pode variar de dois a centenas de resíduos de aminoácidos e apresentar massa molecular inferior a 10000 Da (Nelson, David L.; Cox, 2014). Entretanto, a depender da área de estudo, este limite de massa pode ser ainda menor. Os peptídeos podem apresentar diversas atividades biológicas importantes para os seres vivos, podendo ser produzidos de forma natural ou sintetizados artificialmente em laboratório.

Peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês antimicrobial peptides) ou peptídeos de defesa de hospedeiro (HDPs, inglês host defense peptides) são parte dos mecanismos de defesa do sistema imune de diversos seres vivos, incluindo os seres humanos (Torres & Sothiselvam, 2019). Estes peptídeos são expressos naturalmente no organismo do hospedeiro como forma de combate de patógenos (Mishra et al., 2017). Eles apresentam composição heterogênea, variando em número de resíduos e estrutura. AMPs podem exercer atividade antimicrobiana, antibacteriana, antiviral e/ou antifúngica, e seu modo de ação pode ser por ação direta ou como mediador do sistema imune (Mahlapuu et al., 2016). Estas biomoléculas, além de apresentarem alta capacidade de lise contra diversos microrganismos e cepas bacterianas, também podem agir sinergisticamente com outras drogas (Kang et al., 2017; Mishra et al., 2017; Zhong et al., 2017). Com isso, cresceu o interesse sobre esta classe de peptídeos, que vem demonstrando ser uma promissora alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos.

AMPs apresentam alta variabilidade de estruturas primárias. Entretanto, para que apresentem ação antimicrobiana e certa seletividade, três propriedades físico-químicas são comumente observadas, tais como cationicidade em pH fisiológico, uma considerável hidrofobicidade e conformação anfifílica (Kang et al., 2017; Mahlapuu et al., 2016; Mishra et al., 2017). Tipicamente, estas moléculas apresentam cargas líquidas positivas variando de +2 a +13, proveniente da presença de alguns resíduos como lisina,

arginina e algumas vezes histidina. Esta carga é responsável pelo primeiro contato com bactérias, pois os microrganismos apresentam normalmente uma carga líquida negativa em suas membranas (Torres & Sothiselvam, 2019). A presença de glicolipídeos aniônicos, como lipopolissacarídeos (LPS), possibilita a adsorção dos AMPs por interação eletrostática da carga positiva com a negativa. Esta eletroafinidade é fundamental para a atividade antimicrobiana, tendo papel importante na seletividade destas moléculas (Margitta; Dathe & Wieprechet, 1999). Contudo, um excesso de carga pode reduzir a ação dos AMPs, pois pode causar interações improdutivas com componentes de membrana e também causar uma redução de sua estruturação por conta da repulsão de cargas (Margitta; Dathe & Wieprechet, 1999).

Já a hidrofobicidade limítrofe, proveniente da presença de aproximadamente 50% de resíduos hidrofóbicos em suas estruturas primárias, como valina, leucina, isoleucina, alanina, metionina, fenilalanina, tirosina e triptofano, possibilita a inserção do peptídeo na membrana do patógeno. Esta propriedade físico-química tem importante papel como modulador na interação do peptídeo com membranas (Margitta; Dathe & Wieprechet, 1999). A hidrofobicidade deve ser mantida dentro dos limites, pois ela deve ser suficiente para que os AMPs sejam solúveis em meios aquosos e também permitir a interação com as porções hidrofóbicas das membranas (Margitta; Dathe & Wieprechet, 1999). A anfifilicidade está relacionada com a estruturação dos peptídeos a partir da interação com membranas, ocorrendo uma polarização entre os resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos (Yeaman & Yount, 2003). Esta característica está diretamente relacionada à atividade antimicrobiana. Entretanto, um alto grau de anfifilicidade pode causar um aumento na citotoxicidade dos AMPs ao interagirem com células compostas por fosfolipídeos neutros (Eisenberg, 1984). Para se mensurar polarização do peptídeo, um dos parâmetros utilizados é o momento hidrofóbico ( $M_H$ ) onde se calcula a soma de vetores de hidrofobicidade de cada resíduo de aminoácido normalizando para uma  $\alpha$ -hélice perfeita. Dathe e Wieprecht demonstraram que peptídeos antimicrobianos tendem a ter momentos hidrofóbicos altos e hidrofobicidades moderadas (Margitta; Dathe & Wieprechet, 1999). Porém, acredita-se que para uma atividade antimicrobiana ótima, as propriedades

físico-químicas não se encontram em seus extremos (Gaidukov et al., 2003; Rotem et al., 2006).

Subsequentemente à interação com a membrana, os peptídeos tendem a se organizar em um processo de minimização energética, fazendo com que essas moléculas apresentem estruturas secundárias variadas de acordo com sua composição e/ou suas interações intra e inter-residuais, adquirindo as características de  $\alpha$ -hélices (figura 1-a), fitas  $\beta$  (figura 1-c), randômicas e/ou estendidas (aleatórias) (figura 1-b), ou uma mistura delas (figura 1-d).

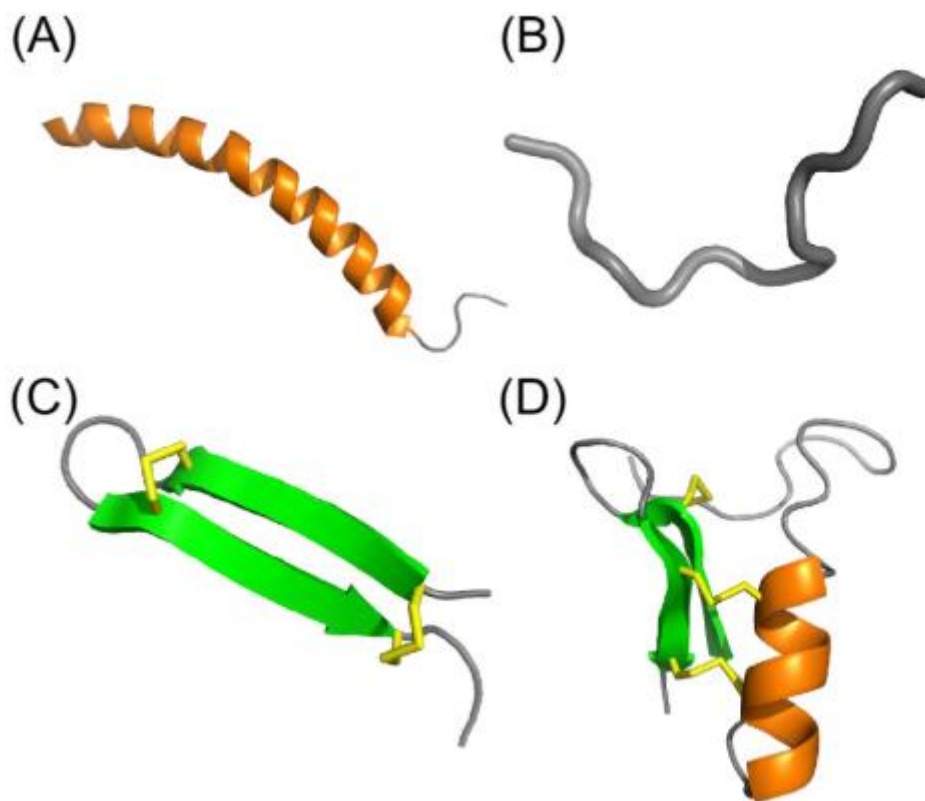


Figura 1 - Representação em cartoon das estruturas secundárias mais comuns em AMPs. (A) Conformação de  $\alpha$ -hélice (representada na cor laranja), estrutura observada no AMP LL-37 ao estar em presença de micelas; (B) Conformação estendida, estrutura observada quando os AMPs não adotam conformação 3D definida, como a Indolicidina; (C) Conformação fita- $\beta$  (representado na cor verde), normalmente favorecida pela presença de ligações de dissulfeto (representado na cor amarela), por exemplo, peptídeo da aranha gomesina derivado de um gancho-beta. (D) Conformação com junção das estruturas anteriores, por exemplo, o peptídeo de inseto CS $\alpha\beta$  defensina formicina que contém elementos de  $\alpha$ -hélice e fita- $\beta$ ; Imagem extraída de Koehbach & Craik, 2019.

Muitos dos peptídeos com atividade antimicrobiana são helicoidais, estrutura abundantemente observada em AMPs obtidos a partir de fluidos extracelulares de insetos e anfíbios. Logo, essa é a classe de moléculas mais estudada (Koebach & Craik, 2019; Torres & Sothiselvam, 2019). Estas moléculas apresentam conformação aleatória em meios aquosos e estruturam-se em  $\alpha$ -hélice a partir do contato com solventes orgânicos ou membranas plasmáticas (Yeaman & Yount, 2003). Foi comprovado que a inserção de resíduos de prolina e D-aminoácidos nas estruturas primárias destas moléculas pode romper a estruturação de hélice (Papo & Shai, 2004). Com esta alteração da estrutura primária, é possível observar uma diminuição da atividade antimicrobiana, demonstrando então que a ação destas moléculas está diretamente relacionada com a estrutura secundária. Alguns autores sugerem que a estrutura helicoidal é ótima para a interação peptídeo/membrana, desestabilizando a bicamada lipídica e/ou penetrando no interior da célula (Tossi et al., 2000). Isso ocorre porque esta interação com membrana promove separação de uma face hidrofóbica e uma hidrofílica de carga positiva, e assim, faz com que a molécula se estruture em uma conformação de caráter anfifílico (figura 2-A). A periodicidade dos resíduos polares e apolares deve ser de 3-4 resíduos, desta forma, há uma separação ótima das faces opostas pela estrutura helicoidal.

Os AMPs estruturados em folhas- $\beta$  apresentam uma estrutura primária variada, todavia, é observado que a composição anfifílica é mantida. Estas moléculas, ao formarem estruturas secundárias e terciárias, apresentam a aproximação de resíduos que antes estavam distantes, e assim ocorre uma separação de cargas, como demonstrado na figura 2-B (Dennison et al., 2005). A estrutura de folha- $\beta$  é estabilizada por ligações de hidrogênio e por interações hidrofóbicas do lado da cadeia, assim como as estruturas de  $\alpha$ -hélices. Grande parte dos peptídeos com esta estruturação apresentam resíduos de cisteína em sua composição, tais como as defensinas, e estes resíduos apresentam enxofre que realizam entre si ligações intramoleculares de dissulfeto e proporcionam às moléculas uma maior estabilidade estrutural e minimização de degradação por proteases (Gallo & Braff, 2006; Kumar et al., 2018).

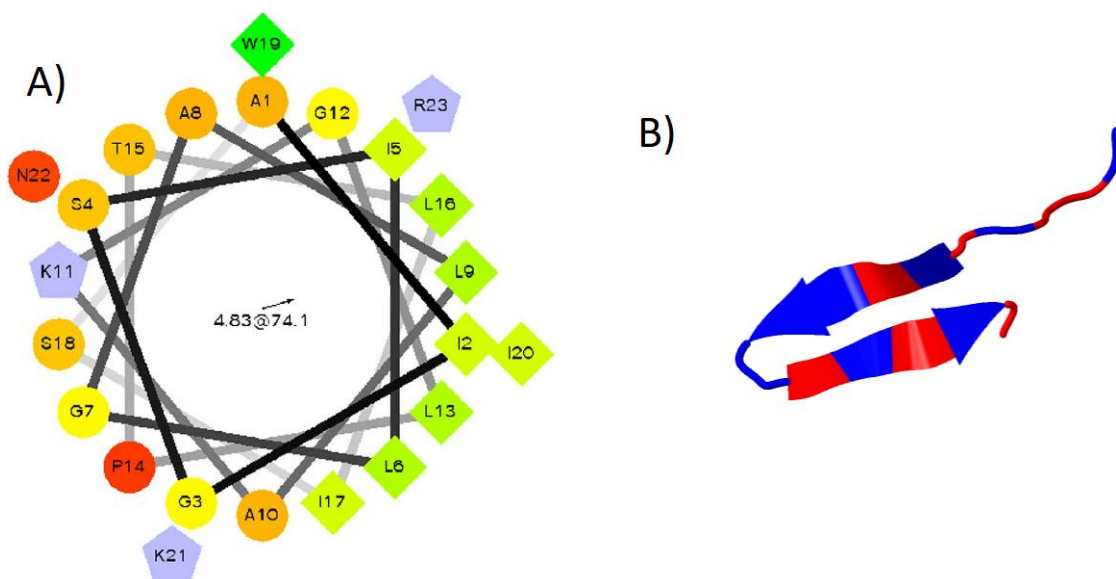


Figura 2 – Representação de AMPs e sua conformação anfifílica, especificando as regiões hidrofílica e hidrofóbica. A) Corresponde a representação de roda helicoidal do peptídeo AR-22. Os resíduos representados como losangos são hidrofóbicos e os resíduos hidrofílicos são círculos. Os resíduos carregados positivamente são pentágonos (S. K. Zhang et al., 2016); B) Corresponde ao peptídeo Protegrin 2, que apresenta estrutura secundária de folha beta (estrutura primária = RGGRLCYCRRRFCICV), em vermelho estão representados os resíduos hidrofóbicos e em azul os resíduos hidrofílicos.

Por sua vez, alguns peptídeos desestruturados podem se tornar anfifílicos ao entrar em contato com a membrana, mesmo não apresentando uma estrutura secundária bem definida. Existem também estruturas diferentes das apresentadas acima que também se organizam em estruturas anfifílicas, como por exemplo, peptídeos ricos em prolina e arginina ou triptofano, os quais formam estruturas secundárias em formato de hélice de poli-polina tipo II (Dennison et al., 2005). Na literatura, também foi reportado uma associação da alta atividade antimicrobiana destes AMPs com a presença de C-terminal amidado. A amidação aumenta a interação eletrostática entre a parte positiva do peptídeo e a porção de carga negativa das membranas das bactérias (Kumar et al., 2018).

### 3.2. PEPTÍDEOS CURTOS DO TIPO FOLHA-B

Como citado anteriormente, alguns AMPs se estruturam em forma de folhas- $\beta$  ao entrar em contato com membranas biológicas. Alguns destes

peptídeos apresentam resíduos de cisteína em sua estrutura primária, os quais se ligam intramolecularmente e formam ligações dissulfeto. Este tipo de ligação proporciona à molécula uma maior rigidez, com isso, é possível observar alguns peptídeos com uma estrutura já formada até mesmo em meio aquoso. Esse fenômeno não é observado em moléculas do tipo  $\alpha$ -hélice, pois estas dependem da interação com membranas ou outras moléculas indutoras para que ocorra a sua estruturação (Kumar et al., 2018).

Contudo, existem também alguns peptídeos que não se estruturam em folha- $\beta$  em solvente, pois não apresentam ligações dissulfeto. Estes peptídeos possuem um pequeno número de resíduos de aminoácidos. Em meio aquoso, apresentam uma estrutura aleatória, mas ao encontrarem um ambiente com presença de membrana, tendem a se organizar em uma estrutura secundária de folha- $\beta$ . Acredita-se que este tipo de estrutura facilite a interação com membranas e sua subsequente ruptura (Zhong et al., 2017)

Estudos vem demonstrando que peptídeos curtos com até 12 resíduos de aminoácidos e carregados positivamente também podem apresentar atividade antimicrobiana (Oshiro et al., 2019; Samantha Ng et al., 2018; Zhong et al., 2017). Por exemplo, podemos citar alguns peptídeos curtos sintéticos que apresentaram eficácia *in vitro* contra uma ampla variedade de microrganismos patogênicos, como bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas e fungos (Ong et al., 2013, 2014). Estes AMPs foram desenvolvidos a partir de pequenas repetições de um conjunto de aminoácidos, usando como inspiração as folhas- $\beta$  que apresentam caráter anfifílico, ou seja, repetições de  $(X1Y1X2Y2)_n$ , em que X seriam resíduos hidrofóbicos (Val e Ileu ou Phe ou Trp), Y resíduos catiônicos (Arg e Lys) e n o número de repetições realizadas (n=2 ou 3). Estes peptídeos foram sintetizados com o seu C-terminal amidado, pois isto fornece à molécula um reforço do caráter catiônico, ao remover a carga negativa do carboxiterminal, o que resulta em um aumento da atividade antimicrobiana (Nguyen et al., 2010; Ong et al., 2013). Os ensaios de determinação de concentração inibitória mínima (MIC) demonstraram a ação antimicrobiana de muitos dos peptídeos testados em comparação com polimixina B, um lipopeptídeo antibiótico usado clinicamente. A tabela 1 demonstra estes valores de MIC.

**Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (MIC) de peptídeos sintéticos curtos (mg/L), retirados de Ong et al., 2013.**

Peptídeos	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
(VRVK) <sub>2</sub>	62,5	>500	250	>500	15,6
(IRIR) <sub>2</sub>	3,9	31,3	7,8	7,8	15,6
(IKIK) <sub>2</sub>	2,0	125	31,3	31,3	2,0
(IRIK) <sub>2</sub>	3,9	62,5	15,6	31,3	3,9
(IRVK) <sub>2</sub>	7,8	250	62,5	62,5	7,8
(FRFK) <sub>2</sub>	7,8	250	15,6	62,5	62,5
(WRWK) <sub>2</sub>	7,8	62,5	15,6	125	250
(VRVK) <sub>3</sub>	1,0	62,5	15,6	62,5	31,3
(IRIK) <sub>3</sub>	1,0	62,5	125	500	125
(IRVK) <sub>3</sub>	2,0	31,3	15,6	62,5	125
Polimixina B	15,6	125	2,0	2,0	62,5

No final de 2014, Lau e colaboradores publicaram um estudo envolvendo a síntese de 30 pequenos peptídeos com número de aminoácidos variando de 3 a 9 resíduos (Hill & Chia, 2015). A partir destes peptídeos eles averiguaram qual seria o AMP mais potente a partir de ensaios de determinação de MIC em relação a dois tipos de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (Hill & Chia, 2015). Os peptídeos com 3 e 4 resíduos não foram efetivos contra os microrganismos testados, enquanto alguns peptídeos com 6 resíduos apresentaram atividade contra os MRSA e foram inativos ou com atividade fraca para *P. aeruginosa* e *C. albicans* (Hill & Chia, 2015). Já os peptídeos com 8 resíduos de aminoácidos foram os que apresentaram melhor atividade contra todos os patógenos (Hill & Chia, 2015). Este trabalho é interessante para se averiguar o amplo espectro de ação destes AMPs curtos e para entender as preferências de interação destas moléculas, pois elas apresentam ação comparável com medicamentos comerciais contra MRSA, como também apresentam ação contra bactéria gram-negativas e fungos. Entretanto, este trabalho também mostra que o tamanho do peptídeo é importante para que estas moléculas tenham atividade antimicrobiana. Observações similares, de que existe um tamanho mínimo para a manutenção de atividade antimicrobiana, também foram feitas para peptídeos estruturados em  $\alpha$ -hélice. Por meio da síntese de análogos truncados de Hs02, um IAP helicoidal de atividade antimicrobiana e anti-inflamatória potente, Pires

demonstrou que a redução do tamanho de 16 para 13 resíduos de aminoácidos era acompanhada de significativa perda de atividade antimicrobiana, levando a sua completa inativação em um análogo de 10 resíduos (Pires, 2018).

A forma heterogênea dos alvos e a compreensão incompleta da maneira com que estas moléculas interferem no metabolismo de microrganismos são alguns dos motivos que dificultam compreensão da atividade antimicrobiana dos AMPs (Brogden, 2005; Dennison et al., 2005). Todavia, os estudos com AMPs também têm outras limitações como a dificuldade na administração sistêmica devido a susceptibilidade à degradação enzimática e rápida eliminação pelos rins (Andersson & Hughes, 2016; Haney & Hancock, 2013; Jenssen et al., 2006; Vaara, 2009).

Logo, o estudo destes peptídeos curtos anfifílicos, com até 12 resíduos, é de grande importância, pois é necessário compreendê-los para que apresentem boa seletividade, bom custo/benefício, de forma que seja factível sua utilização na saúde humana a partir da sua produção em larga escala (Zhong et al., 2017).

### **3.3. COMPOSIÇÃO DE MEMBRANA DE MICRORGANISMOS**

A composição de membrana dos microrganismos, na natureza, é variada, podendo ser composta por fosfolipídeos, esteroides, proteínas, glicoproteínas, entre outras substâncias (Gennis, 1989). Esta composição varia de acordo com cada organismo e o seu estágio de desenvolvimento (Blom et al., 2001). As membranas de células eucarióticas tendem a ser neutras, compostas por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e colesterol (Yeaman & Yount, 2003). Já os microrganismos, de forma geral, são compostos por uma estrutura fluida de fosfolipídeos com presença de fosfatidiglicerol, cardiolipina e fosfatidilserina, o que proporciona a esta membrana um caráter eletronegativo (Yeaman & Yount, 2003). De fato, a carga líquida negativa é determinante na relevante a seletividade de peptídeos com atividade antimicrobiana (Guilherme D Brand et al., 2002; Tossi et al., 2000).

As bactérias apresentam uma membrana composta por fosfolipídeos, entretanto, são divididas em duas categorias, as gram-positivas, que tem uma camada peptidoglicana espessa e com afinidade com o reagente de Gram. Já as Gram-negativas apresentam uma camada delgada de peptidoglicano pouco corada pelo reagente de Gram (Brock et al., 2015). Esta camada peptidoglicana tem uma função estrutural para as membranas das bactérias, o que confere a elas certa rigidez (Brock et al., 2015).

As bactérias Gram-negativas possuem uma segunda membrana, chamada membrana externa. Esta membrana é constituída por uma dupla camada lipoproteica de lipopolissacarídeos (LPS), principalmente lipídeo A, estrutura representada na figura 3. A membrana externa forma uma barreira de permeabilidade para macromoléculas, sendo que sua estabilidade depende dos cátions  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  que se ligam aos grupos fosfato do núcleo interno do LPS. Estes LPS também recebem o nome de endotoxinas, pois estas moléculas são responsáveis por choques sépticos que muitas vezes levam à morte dos pacientes (Brock et al., 2015). Sabe-se que AMPs possuem normalmente afinidade por LPSs, pois estes são lipídios aniônicos, sendo assim um dos meios de ação anti-bacteriana, e foco para estudos de interação de AMPs e bactérias Gram-negativas (Allende & McIntosh, 2003; Schmidtchen & Malmsten, 2015).

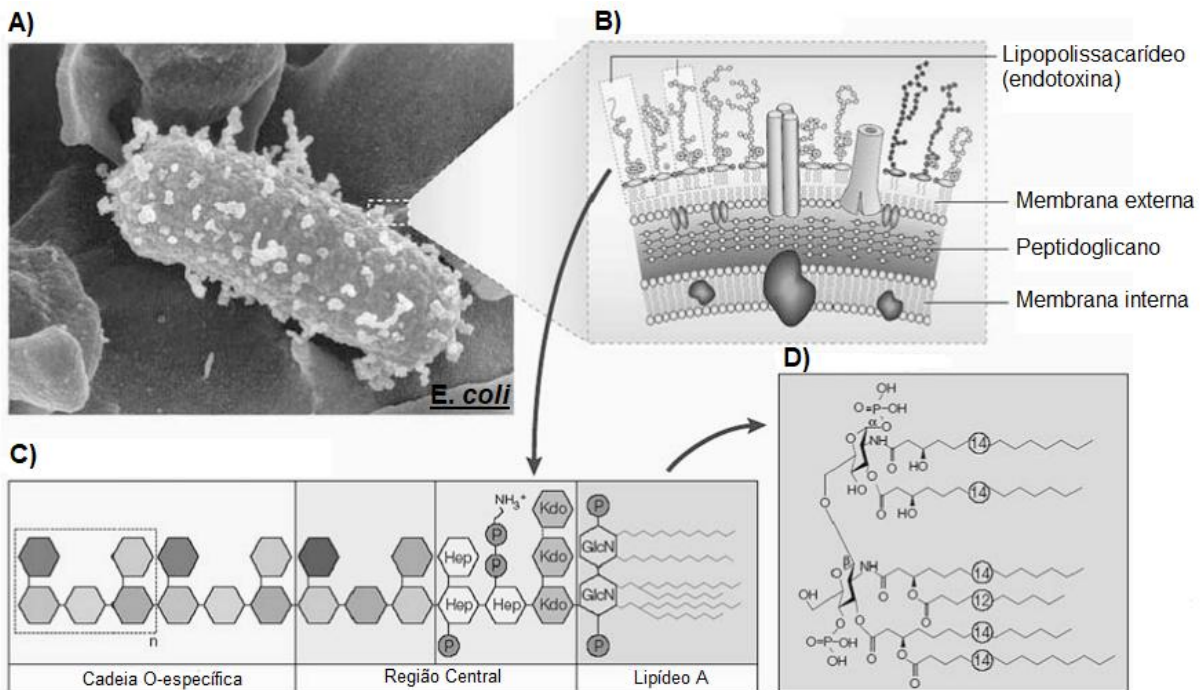


Figura 3 - R Representação da estrutura do LPS em bactéria Gram-negativa. A) Micrografia eletrônica da célula bacteriana de *E. Coli*; B) Representação esquemática da parede celular bacteriana e demonstração da localização do LPS; C) Arquitetura da estrutura do LPS; D) Estrutura do Lipídeo A, o centro tóxico do LPS. GlcN: D-glucosamina; Hep: L-glicero-D-mano-Heptose; Kdo: ácido 2-ceto-3-desoxi-octolosônico; P: fosfato. Imagem extraída e adaptada de Giuliani, 2010.

As bactérias Gram-positivas, por sua vez, não apresentam esta segunda camada de membrana, mas são compostas majoritariamente por peptidoglicanos, que podem apresentar também ácidos teicóicos, polímeros de ribitol-fosfato ou glicerol-fosfato, estrutura apresentada na figura 4 (Brock et al., 2015). O sítio de interação dos AMPs, neste tipo de bactéria, são os ácidos teicóicos e os lipoteicóicos, que conferem à superfície da membrana plasmática externa também uma carga aniônica (Yeaman & Yount, 2003). Contudo, essa composição forma uma rede bastante densa, fazendo com que moléculas de alta massa não consigam transpassar a membrana. Isto pode dificultar a atividade antimicrobiana dos AMPs, pois influencia tanto na inibição de aproximação dos peptídeos, quanto na indução de lise, que é um mecanismo comum de peptídeos antimicrobianos (Yeaman & Yount, 2003).

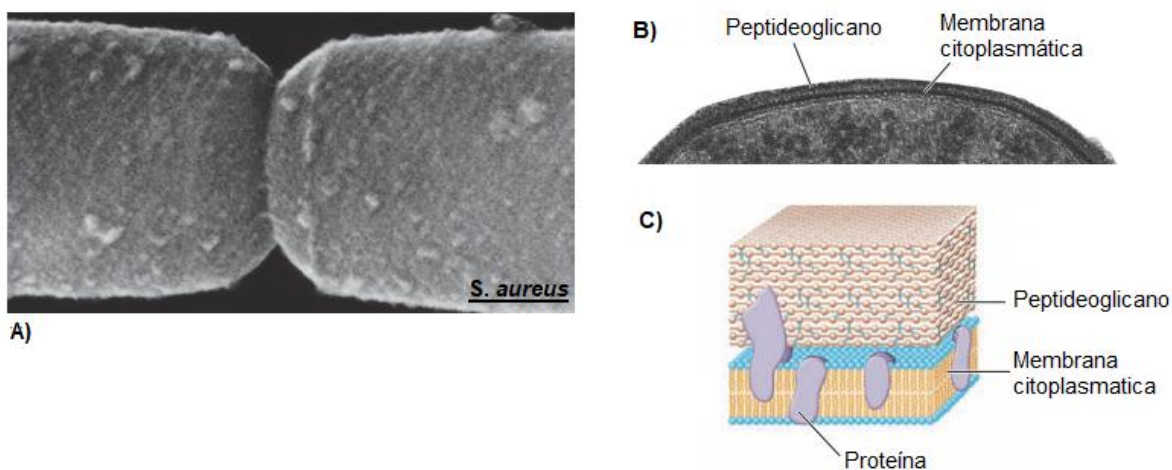


Figura 4 - Estrutura de bactérias Gram-positivas; A) Micrografia eletrônica de varredura da célula bacteriana *S. aureus*; B) micrografia eletrônica de transmissão mostrando a parede celular; C) Esquema da parede celular de bactérias Gram-positivas; Imagem adaptada de Brock et al., 2015. (Brock et al., 2015)

### 3.4. MECANISMO DE AÇÃO DOS AMPS

Os mecanismos de ação dos AMPs são divididos em duas classes: indução de morte direta e ação imunomodulatória. Os peptídeos causadores de morte direta podem apresentar ainda como alvo as membranas ou ainda apresentar alvos secundários intracelulares (Kumar et al., 2018).

Muitos AMPs têm como alvo a membrana, não apresentando uma interação específica com um receptor. A superfície de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas apresentam, respectivamente, lipopolissacarídeos (LPS) e ácido teicóico, o que confere uma carga negativa na superfície das mesmas e o que proporciona uma forte interação eletrostática a porção catiônica característica dos AMPs (Shai, 2002; Yeaman & Yount, 2003). Contudo, não é só a carga de membrana que importa para a primeira interação, outras propriedades também são necessárias avaliar como a curvatura de membrana (Drin & Antonny, 2010; Matsuzaki et al., 1998; Schmidt & Wong, 2013; Wenzel et al., 2014).

Depois da interação eletrostática e hidrofóbica inicial, os AMPs se acumulam na superfície da membrana até atingir uma concentração crítica (Andersson & Hughes, 2016; Epand et al., 2016). A partir deste momento

existem alguns modelos que são utilizados para explicar o mecanismo de ação dos AMPs, sendo estes divididos em: Modelos de poros na membrana e modelo de não-formação de poros. O Modelo Barrel-stave (Figura 5-a) é um modelo de formação de poros, em que monômeros de AMPs são orientados paralelamente na membrana, mas eventualmente inseridos perpendicularmente na bicamada lipídica. Isso irá promover uma interação lateral entre os peptídeos, pois enquanto a porção hidrofóbica interage com os lipídeos da membrana, os resíduos hidrofílicos formam os canais/poros aquosos, que permite o fluxo de solventes e pequenas moléculas (Breukink & Kruij, 1999; Brogden, 2005; Ehrenstein & Lecar, 1977; Shai, 2002). Subsequentemente à inserção dos peptídeos na porção hidrofóbica da membrana, eles vão recrutando mais AMPs que causam o aumento do diâmetro dos poros (Shai, 2002). Dentre os AMPs conhecidos com este modelo de ação então o SK84, Hf-1 e Ctx-Ha (Y. Li et al., 2012). No modelo de poro toroidal (Figura 5-b), que também é um modelo de formação de poros, os peptídeos se inserem perpendicularmente à bicamada lipídica como no modelo Barrel-stave, entretanto, a interação entre os peptídeos não é observada (Wimley, 2010). Ao invés disso, os peptídeos induzem uma curvatura local da bicamada lipídica com os poros parcialmente formados pelos AMPs e parcialmente pelos grupos cabeça de fosfolipídeos. Essa dinâmica transitória supramolecular peptídeo-lipídeo é chamada de poro toroidal. O modelo toroidal possui como características uma íon seletividade, uma vida útil finita, um tamanho discreto e uma relação inversa entre estabilidade e carga do peptídeo (Yeaman & Yount, 2003). Em comparação com o modelo Barrel-stave, em que o arranjo hidrofóbico e hidrofílico com os lipídeos é mantido, no modelo de poros toroidais ele é rompido. Ambos os modelos promovem despolarização da membrana e perturbação da mesma, assim a eventual morte do microrganismo. Os peptídeos Magainin-2, aurein3.3, aurein 2.2, lacticin Q e arenicin apresentam sua atividade mediada a formação de poros toroidais (Y. Li et al., 2012). Estruturas anfifílicas, tanto  $\alpha$ -hélices quanto fitas- $\beta$ , são essenciais para o mecanismo de formação de poros, pois a região hidrofóbica interage com a membrana lipídica e os resíduos hidrofílicos são responsáveis pela formação dos poros.

Outro modelo de ação dos AMPs é o modelo carpete (Figura 5-c), onde os AMPs são adsorvidos paralelamente à bicamada camada lipídica até atingir uma concentração que irá recobrir a superfície da membrana, formando um 'carpete' (Lee et al., 2016; Shai, 2002; Yeaman & Yount, 2003). Isso provoca interações desfavoráveis para a membrana, e conseqüentemente, perda da sua integridade, desintegrando-a, produzindo uma espécie de efeito detergente, formando algo parecido com micelas e levando ao colapso de toda a célula. Este último efeito é conhecido como modelo do tipo detergente (Figura 5-d). O modelo carpete não precisa de uma interação específica peptídeo-peptídeo dos monômeros de peptídeos ligados a membrana, e também não exige que o peptídeo se insira no interior da parte hidrofóbica para formar canais transmembranas ou uma estrutura específica do peptídeo (Yeaman & Yount, 2003). Este modelo de ação é um dos mais comumente observados em AMPs, e compreende moléculas estruturadas tanto em alfa-hélice quanto folha beta, e dentre eles estão os peptídeos LL-37, cecropina, indolicidina e aurein1.2 (Kumar et al., 2018; Y. Li et al., 2012; Shai, 2002).

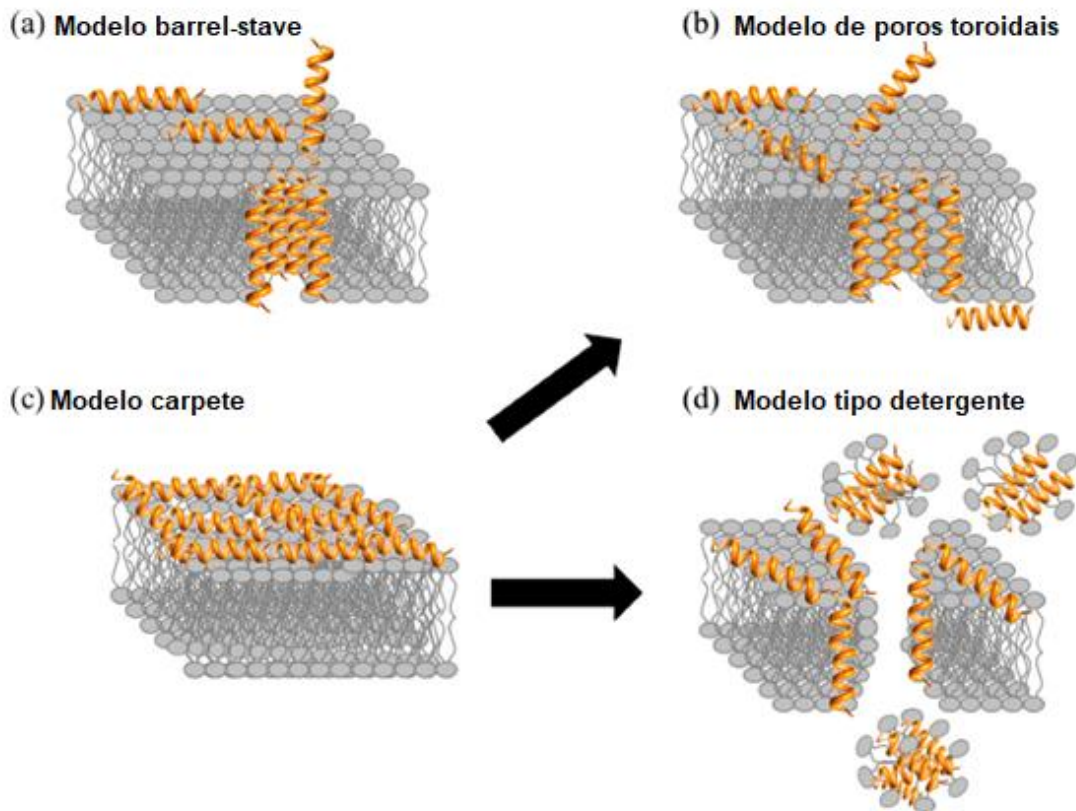


Figura 5 - Representação dos mecanismos de ação dos AMPs em membranas. (A) Modelo Barrel stave: o AMPs interagem com a membrana formando poros, do tipo canais transmembrânicos revertidos por peptídeos; (B) Modelo de poro toroidal: o AMP interage eletrostaticamente com a membrana se inserindo nela, o que induz o fosfolípido da monocamada lipídica superior a dobrar-se e forma uma intercalação de moléculas de AMPs com as cabeças polares dos fosfolípidos; (C) Modelo Carpete: os peptídeos se acumulam na superfície da membrana, atraídos eletrostaticamente pelas cargas negativas dos fosfolípidos; (D) Modelo tipo detergente: quando os AMPs cansam um efeito em desintegração e formam micelas; Em laranja estão representados os AMPs e em cinza a camada lipídica. Imagem retirada e adaptada de Kumar et al., 2018.

Existem também modelos mais específicos como o Modelo Shai-Huang-Matsuzaki, modelo de atividade interfacial e modelo de eletroporação (Lee et al., 2016). Acredita-se também que os modelos de interação não sejam tão específicos e/ou diretos como demonstrado acima. Por exemplo, para ocorrer o modelo toroidal, primeiramente, deve ocorrer a interação do modelo tipo carpete (Lee et al., 2016).

Os mecanismos de ação de morte direta são subdivididos em aqueles onde o alvo é a membrana da bactéria e aqueles em que o alvo é intracelular. Este tipo de proposta é diferente, pois o alvo não é a membrana, como os

abordados anteriormente. Os AMPs, assim como muitos antibióticos convencionais, se ligam às proteínas e a precursores moleculares que estão envolvidos na síntese da parede celular, como ácidos nucleicos, proteínas e enzimas. Assim, atuam de maneira similar a antibióticos conhecidos, como a penicilina, onde o AMP inibe a síntese da parede celular (Kumar et al., 2018). Por conta dessa dada interação formada entre o peptídeo com a parede celular, é possível, subsequentemente, formar poros, e conseqüentemente, causar o rompimento da membrana com posterior morte bacteriana. Há também alguns AMPs que apresentam alvos intracelulares sem que haja permeabilização da membrana em sua concentração mínima de efeito, mas ainda sim causam morte bacteriana (Brogden, 2005). Mecanicamente, estes AMPs interagem primeiro com a membrana citoplasmática e depois acumulam intracelularmente, onde podem bloquear processos celulares críticos (Brogden, 2005). Por exemplo, o peptídeo Buforina II que demonstra ter uma grande afinidade por sequências de DNA de dupla hélice, inibido a síntese proteica (Kobayashi et al., 2004). Enquanto isso, quando testados frente a membranas de espécies Gram-negativas, este peptídeo foi inativo. Com isso, é possível inferir que seu mecanismo de ação esteja relacionado a funções intracelulares e seu alvo seja o DNA e/ou o RNA (Y. Li et al., 2012). Contudo, existem aqueles AMPs que têm alvos intracelulares e funcionalidade dupla, por que conseguem desestabilizar a membrana, mas também em concentrações sub-liticas alteram funções metabólicas vitais importantes (Patrzykat et al., 2002).

Por fim, existe também o mecanismo de ação do tipo imunomodulatório (Hilchie et al., 2013), em que os AMPs podem matar diretamente os micróbios como também podem recrutar e ativar células imunes, o que aumenta sua efetividade contra microrganismos e também controla efeitos inflamatórios, como o peptídeo LL-37 (Afacan et al., 2012; Charles et al., 2006; Hilchie et al., 2013; Xhindoli et al., 2015). Algumas moléculas podem produzir várias respostas imunes como ativação, atração e direcionamento de células do sistema imune, estimulação de antígenos, redução e controle da inflamação pela diminuição da expressão de quimiocinas pró-inflamatórias e reativando espécies de oxigênio/nitrogênio (Afacan et al., 2012; Hancock et al., 2012; Hilchie et al., 2013; Lai & Gallo, 2009; Nijnik & Hancock, 2009).

### 3.5. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE PEPTIDEOS

A inflamação é a primeira resposta do sistema imune diante um hospedeiro ou doença para combater e limitar uma infecção. Em alguns casos, estas infecções podem desencadear uma resposta imunológica descontrolada, o que pode causar disfunção e falência de múltiplos órgãos, e conseqüentemente, levar a morte. Esta situação é conhecida como choque séptico ou sepse (Giuliani et al., 2010). Inúmeros agentes podem induzir estas inflamações excessivas e prolongadas em um organismo, tais como danos físicos e químicos, quimioterapias, bactérias e vírus. Algumas doenças também podem ser fatores causadores de inflamação como diabetes, problemas renais e respiratórios, cânceres, alergias, distúrbios neurológicos (exemplo a Alzheimer) e até problemas no coração (Dadar et al., 2019).

O organismo, durante uma reação inflamatória, é estimulado a liberar vários tipos de componentes celulares, como interleucina (IL), fator alfa de necrose de tumor (TNF- $\alpha$ ), e componentes humorais, como anticorpos e imunoglobinas (Hyldahl et al., 2013; Inohara & Nuñez, 2003). Primeiramente, altos níveis de mediadores lipídicos são lançados no corpo para exercer função tanto pro-inflamatória quanto anti-inflamatória (Dadar et al., 2019). Organelas celulares chamadas corpúsculos lipídicos (CL) controlam sítios de síntese e armazenamento de citocinas, apresentando uma relação direta com a secreção destas moléculas, regulação da sinalização e ativação de mediadores inflamatórios (D'Avila et al., 2008). A relação entre a secreção de citocinas e hormônios induzidos e a biogênese de corpúsculos lipídicos é observada tanto em ensaios *in vitro* como em *in vivo* (D'Avila et al., 2008). Já sobre as citocinas diante uma resposta inflamatória, é visto que o TNF- $\alpha$  tem a habilidade de induzir apoptose e morte celular (Horiuchi et al., 2010). Enquanto o IL-6 dentre vários modos de ação durante uma inflamação, destaca-se pela sua sinalização diante danos teciduais (Nishimoto et al., 1989).

Em infecções bacterianas, os estímulos ao sistema imune do hospedeiro estão diretamente associados à composição das paredes celulares destes patógenos. Em bactérias Gram-positivas, os estímulos são causados pelos peptidoglicanos e ácidos lipoteicoicos que as compõem. Já em Gram-

negativas, a ação inflamatória está ligada a presença dos lipopolisacarídeos (LPS) que constituem majoritariamente a camada externa destas bactérias. O organismo, ao perceber a presença de LPS, produz uma proteína sinalizadora no fígado, o LPB (do inglês, LPS-binding protein) (Giuliani et al., 2010). Esta proteína se liga a superfície da bactéria e as transportam até macrófagos e neutrófilos que apresentam uma proteína vinculada à membrana, o CD14 (do inglês, Cluster of Differentiation 14). A ligação de LPB a CD14 ativa o receptor do tipo 4 (TLR4) que desencadeia a síntese de potentes citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, que aumentam a atividade fagocitária (Giuliani et al., 2010; F. X. Zhang et al., 1999). Contudo, essa ativação de TLR4 por CD14 não é uma condição indispensável pro processo inflamatório e sim um potencializador, para dar início a cascata inflamatória local (Willis & Whitfield, 2013). Devido ao LPS também é possível observar a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos, ativados pela cooperação de TLR4 e CD14 e apresentando uma dose e tempo dependência de LPS em contato com o organismo (D'Avila et al., 2008). Entretanto, quando há uma produção exacerbada destas citocinas e o hospedeiro perde o controle dos mediadores inflamatórios o organismo pode ser levado a sepse (Giuliani et al., 2010).

Estudos vêm demonstrando o uso de peptídeos antimicrobianos (AMP) como uma potencial alternativa contra inflamações. Os AMPs, além de apresentarem atividade anti-infecciosa contra bactérias e outros micro-organismos, também podem servir como agentes neutralizadores de endotoxinas, devido sua capacidade de se ligar ao LPS. Isso ocorre devido a capacidade de interações eletrostáticas entre a parte catiônica dos peptídeos e a aniônica do LPS, como também interações hidrofóbicas, que pode levar à quebra dos agregados de LPS em pequenas partículas, indisponibilizando sua interação com a LPB (Giuliani et al., 2010). Assim, os AMPs conseguem sequestrar o LPS antes mesmo que ele induza o organismo a choque séptico. O LPS também consegue ativar o sistema imune mesmo desconectado da parede celular da bactéria. Desta maneira, Yosef e colaboradores propuseram um trabalho onde um peptídeo se ligou diretamente ao LPS e o deixou indisponível para se ligar ao LBP, ocorrendo uma competição entre ele e a interação LBP e CD14 (Rosenfeld & Shai, 2006). Assim, esses pesquisadores

demonstraram como peptídeos podem ser usados como agentes anti-endoxina e conseqüentemente, anti-inflamatórios.

A interação de peptídeos com outros mediadores pro-inflamatórios também pode ser explorada na busca de outros agentes anti-inflamatórios. Por exemplo, a interação de peptídeos com o fator nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), interferindo na translocação destes para o núcleo e impedindo a expressão de genes inflamatórios. Este é o mecanismo de ação do peptídeo AIP-6, um penta peptídeo (RLRWR) com aminoácidos alternados entre hidrofóbicos e hidrofílicos e estrutura semelhante aos que serão apresentados neste trabalho, que conseguiu inibir a atividade transcricional de NF- $\kappa\text{B}$  e apresentou atividade anti-inflamatória significativa *in vitro* e *in vivo* (Wang et al., 2009). *In vitro*, este peptídeo conseguiu inibir a ligação desta molécula com DNA e subsequentemente sua atividade transcricional ao interagir com uma subunidade específica do NF- $\kappa\text{B}$ , como também inibiu a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos estimulados (Wang et al., 2009). *In vivo*, ratos estimulados com zymosan, foram tratados com administração local com o peptídeo, e foi observada uma inibição do processo inflamatório (Wang et al., 2009). Outros peptídeos também já demonstraram esta ação anti-inflamatória a partir da interação com NF- $\kappa\text{B}$ , como a Lactoferrina humana ou o Mastoparan, um peptídeo extraído do veneno de vespa (Håversen et al., 2002; Yibin et al., 2005).

Portanto, peptídeos antimicrobianos, em geral, podem ser considerados novas alternativas farmacológicas, visto que algumas destas moléculas podem interagir com LPS, um mediador inflamatório e de sepse, e assim modular a resposta imune durante processos inflamatórios.

### **3.6. PEPTÍDEOS INTRAGÊNICOS ANTIMICROBIANOS**

Alguns estudos demonstram a presença de sequências de aminoácidos encriptadas em proteínas de diversos organismos, que ao serem retiradas de sua proteína parental, podem interagir com variados alvos biomoleculares (Guilherme D. Brand et al., 2019; Ramada et al., 2017). Estas sequências,

quando sintetizadas como entes individuais, podem apresentar atividade antimicrobiana, atividade esta que não era manifesta enquanto estes segmentos eram encontrados como partes estruturais em suas proteínas de origem. Estes segmentos protéicos encriptados em proteínas apresentam diferentes denominações na literatura, como criptídeos, porém, seguindo a linha desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa, aqueles que apresentam atividade antimicrobiana são denominados de peptídeos intragênicos antimicrobianos (IAP, inglês *Intragenic Antimicrobial Peptides*) (G. D. Brand et al., 2012; G D Brand et al., 2018; Ramada et al., 2017). Para buscar estes segmentos em bancos de dados de proteínas/genomas, utiliza-se como base moldes estruturais e algumas propriedades físico-químicas comumente observadas em AMPs, como moléculas de conformação anfifílica, cationicidade e uma considerável hidrofobicidade. Ao identificar e sintetizar estes IAPs como espécies individuais, estes são testados e é verificado se apresentam as atividades biológicas desejadas tais como ampla ação antimicrobiana, principalmente contra cepas de bactérias resistentes, capacidade de atuar como agentes anti-inflamatórios, exercer efeito quimioatrativo para células do sistema imune e interromper a formação de biofilmes (Giuliani et al., 2010; Pfalzgraff et al., 2018; Pletzer et al., 2016).

Os IAPs vêm mostrando ação antimicrobiana em concentração micromolar, apresentando também grande amplitude de alvos e boa seletividade, podendo ser comparável ao AMPs conhecidos. Logo, a prospecção de IAPs é uma alternativa para se encontrar novos agentes antimicrobianos.

### **3.6.1. PROSPECÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS ENCRYPTADOS EM PROTEÍNAS HUMANAS**

Nas últimas décadas, diversas estratégias vêm sendo desenvolvidas na busca de novos AMPs, dentre elas a prospecção de peptídeos com atividade antimicrobiana encriptados em proteínas (G. D. Brand et al., 2012; Ramada et al., 2017; Torres & Sothiselvam, 2019). Brand *et al* demonstraram que o peptídeo Hs02 (figura 6), um IAP identificado como um segmento da proteína humana miosina não-convencional-1h, apresentou ação antibacteriana com

ação direta causando ruptura da membrana citoplasmática (Guilherme D. Brand et al., 2019). O Hs02 também desacelerou a proliferação e diminuiu a viabilidade de biofilme de dois patógenos, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. (Bessa et al., 2019). Ele também apresentou ação anti-inflamatória, pois o Hs02 mesmo em concentrações mais baixas (0,1  $\mu$ M) conseguiu inibir significativamente o aumento de TNF- $\alpha$  em macrófagos de ratos estimuladas por LPS (Guilherme D. Brand et al., 2019). Já Ramada et al demonstraram a presença de IAPs em plantas, que apresentaram ação parecida com AMPs conhecidos contra patógenos humanos e/ou de vegetais. Estes IAPs apresentaram amplo espectro de ação e uma baixa ação hemolítica (Mariano et al., 2021; Ramada et al., 2017).



Figura 6 – Representação da estrutura do peptídeo Hs02 em alfa-hélice a partir da interação com micelas de DPC-d38. Onde é demonstrado em vermelho resíduos de carga positiva e em verde os resíduos hidrofóbicos. (Guilherme D. Brand et al., 2019)

Estes trabalhos de prospecção de novos IAPs, citados acima, foram realizados a partir da busca por segmentos com propriedades físico-químicas similares a AMPs já conhecidos, como moléculas com estruturas anfifílicas, carga líquida positiva e uma certa hidrofobicidade (Bessa et al., 2019; Ramada

et al., 2017). Para automatizar este tipo de busca, foi criado um software, denominado Kamal (<http://www.cenargen.embrapa.br/kamal/>). Neste software é possível analisar fragmentos internos de proteínas levando em conta o molde de hélice catiônica anfifílica, de forma que o usuário define quais os resíduos de aminoácidos que serão permitidos em cada face. Por exemplo, a face hidrofóbica permite somente resíduos de aminoácidos como alanina, fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, valina e triptofano. Já para a face hidrofílica, se fixa a existência de resíduos de aminoácidos como cisteína, ácido aspártico, ácido glutâmico, glicina, histidina, lisina, asparagina, serina, treonina e tirosina. Estes aminoácidos devem estar dispostos a uma periodicidade de 3 a 4 resíduos para conferir a molécula helicoidal o caráter anfifílico desejado e conseguir a separação de parte polar e apolar. Para melhorar a varredura por  $\alpha$ -hélices anfifílicas, o software permite variação nos ângulos polares, que são de  $128^\circ$ ,  $160^\circ$  e  $192^\circ$ . Por fim, se determina quantos resíduos de aminoácidos deverão ter os potenciais IAP e os limites de suas cargas líquidas, normalmente entre +2 e +6.

Entretanto, outras formas para prospecções também são observadas na literatura. Como a utilização linguagem *Python script* para a varredura de bancos de dados de proteínas (Torres et al., 2022). O algoritmo utilizado, neste trabalho, foi determinado a partir de propriedades físico-química determinante de AMPs, como carga líquida, hidrofobicidade média e comprimento da sequência de aminoácidos, obtendo a identificação de 2603 peptídeos encriptados em proteínas com funções biológica não relacionada ao sistema imunológico (Pane et al., 2017; Torres et al., 2022). Mas também é observada a utilização de servidores na web como AVPpred e DBAASP para realizar consultas dentro de bancos de dados, classificado e indo em busca destes peptídeos (Thakur et al., 2012; Vishnepolsky et al., 2018). Contudo, todas estas plataformas bioinformáticas apresentam como base de busca as propriedades físico-químicas de interesse do estudo e comparáveis aos AMPs conhecidos.

Ao utilizar o software Kamal, após uma varredura são fornecidos potenciais IAPs com ação antimicrobiana. Por se tratar normalmente de uma lista extensa, o usuário pode escolher, manualmente, os peptídeos de interesse de acordo com as suas propriedades, como a estrutura primária, massa

molecular, carga líquida, hidrofobicidade média, momento hidrofóbico, ponto isoelétrico e a proteína de origem. Entretanto, é importante salientar que este molde irá permitir somente o reconhecimento de segmentos helicoidais em proteínas, sendo essencialmente cego a todos os outros potenciais antimicrobianos de estrutura secundária diversa.

Contudo, proteínas também apresentam folhas- $\beta$  anfifílicas em sua composição. Estas estruturas proteicas são compostas por uma combinação de várias regiões polipeptídicas. Estas regiões são constituídas tipicamente por 5 a 10 resíduos de aminoácidos de comprimento em cada fita, e que estão expostos de forma estendida. Estas fitas se alinham adjacientemente uma à outra, formando ligações de hidrogênio entre os grupos CO de uma fita e NH de outra, e podendo se organizar de forma paralela ou antiparalela (Branden & Tooze, 1999). Estas folhas- $\beta$ , em geral, apresentam a porção de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos não expostos e as porções laterais expostas ao solvente. Isso acontece, pois existe uma alternância entre resíduos hidrofóbicos com resíduos polares ou hidrofílicos carregados em sua sequência de aminoácidos.

Logo, a prospecção de novos peptídeos curtos anfifílicos também pode ser feita com base nas características apresentadas por folhas- $\beta$  anfifílicas encontradas em proteínas. Assim, no software Kamal, são utilizados filtros para a procura destas características, como estabelecimento de uma estrutura disposta por X1Y1X2Y2..., onde X corresponde a resíduos hidrofóbicos e Y corresponde a resíduos hidrofílicos, tamanho variando de 5 a 10 aminoácidos e existência de carga líquida superior a 2+ para contribuir para a interação de membranas.

Em um trabalho do grupo submetido para publicação (revista BBA – General subjects, 2022, esta sob revisão), o peptídeo Hs10 foi prospectado seguindo os parâmetros especificados acima, tendo como estrutura primária KFDLKVTIK-NH<sub>2</sub>. Este IAP apresenta uma carga líquida de +2, alternância entre resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos e caráter anfifílico. Esta molécula apresentou seletividade por bactérias Gram-negativas, baixa citotoxicidade,

estruturaco de forma similar a fitas- $\beta$  diante de membranas biomiméticas aninicas e interao com agregados de LPS.

### 3.7. STESE EM FASE SÓLIDA

Após a obteno da estrutura primária do IAP desejado,  necessário fazer a escolha de um método de produo para estes peptídeos. O método mais utilizado nessa situao  a síntese química denominada síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Este método foi desenvolvido pelo químico Robert Bruce Merrifield, o qual foi agraciado com um prmio Nobel do ano de 1983. Este tipo de síntese , a princípio, aplicável a qualquer sequência, e utilizado em diversos laboratórios (Machado et al., 2004).

SPFS  realizada sobre um suporte polimérico, no caso uma resina (figura 7), constituída por 1% de divinilbenzeno reticulado com poliestireno. Este tipo de síntese geralmente ocorre no sentido do C-terminal para o N-terminal, ou seja, o C-terminal  o primeiro a ser acoplado na resina.

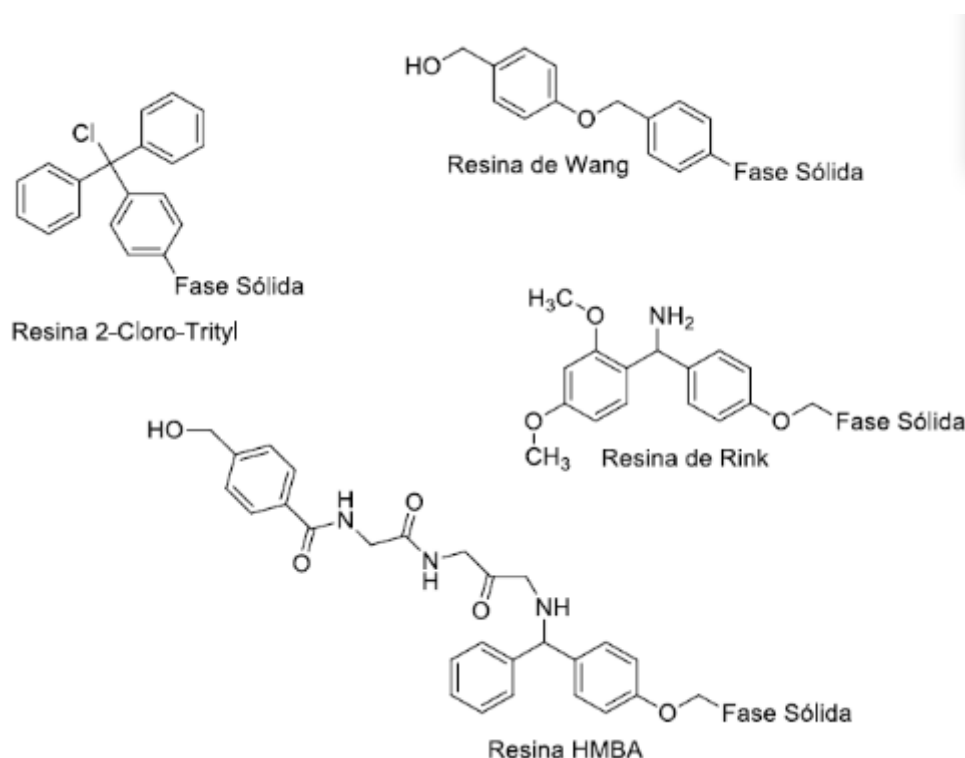


Figura 7 - Exemplos de resinas utilizadas na SPFS, imagem adaptada do Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach (W. C. Chan and P. D., 2000)

A resina de Rink é utilizada geralmente para peptídeos amidados e nela há a presença de um grupo de proteção Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil) no seu N-terminal, que deve ser retirado, processo chamado de desproteção, para que ocorra o acoplamento do C-terminal do primeiro aminoácido do peptídeo. A reação de desproteção (figura 8) é normalmente feita utilizando 20-50% v/v de piperidina em dimetilformamida (DMF) (W. C. Chan and P. D., 2000). Este processo envolve um mecanismo de  $\beta$ -eliminação, em que um hidrogênio lábil pode ser retirado da posição  $\beta$  pela 4-metilpiperidina. Isso acontece, pois o hidrogênio do grupo Fmoc é mais ácido que um hidrogênio benzílico um vez que o ânion formado é aromático, o que facilita sua formação (de Sá, 2018). O processo chave para se iniciar a desproteção consiste em transformar o anel de fluoreno para gerar uma espécie intermediária de um ciclopentano aromático (W. C. Chan and P. D., 2000).

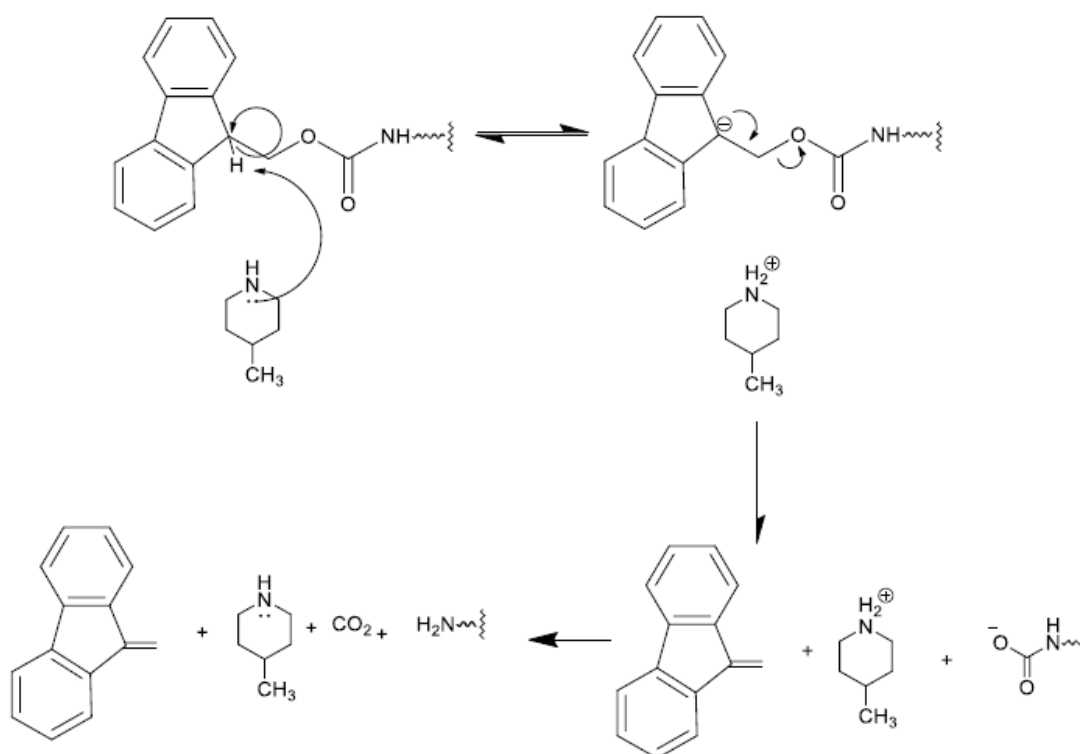


Figura 8 - Desproteção do N-terminal (W. C. Chan and P. D., 2000)

Ao fim deste processo, a resina fica com o N-terminal livre para o acoplamento do primeiro Fmoc-aminoácido, que será feito a partir de seu grupo carboxil e que pode ser realizado utilizando DIC/Oxyma ou HBTU/DIPEA. Estas reações são processadas a partir de ésteres ativados. No caso da reação utilizando DIC/Oxyma (figura 9), a Oxyma Pure (acetato de etil 2-ciano-2-

(hidroxiimino) reage com o C-terminal na presença de carbodiimida formando o desejado intermediário éster ativado. Esta reação envolve a síntese de um éster de aminoácido que atua como um eletrófilo para o ataque nucleofílico do grupo amina preso a resina. Assim, a ligação amida é formada, ou seja, ocorre o acoplamento.

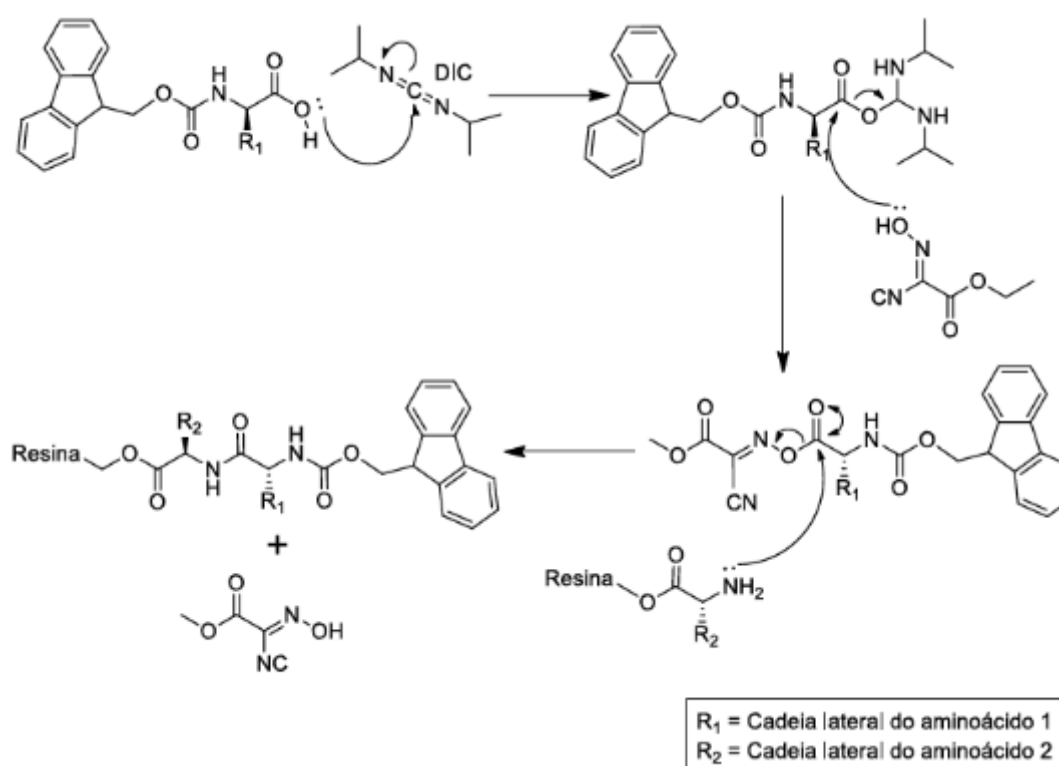


Figura 9 - Rota para síntese utilizando DIC/Oxyma (W. C. Chan and P. D., 2000).

No caso da reação de acoplamento utilizando HBTU/DIPEA (figura 10), ele também utiliza um mecanismo de formação de um éster intermediário. Neste caso, o reagente HBTU (2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurôniohexafluorofosfato) na presença de amina terciária DIPEA (N,N'-diisopropiletilamina) converte o Fmoc-Aminoácido em seu correspondente éster OBt, o intermediário ativado Benzotriazolil, que sofre o ataque nucleofílico do grupo amina do N-terminal livre e forma a ligação peptídica.

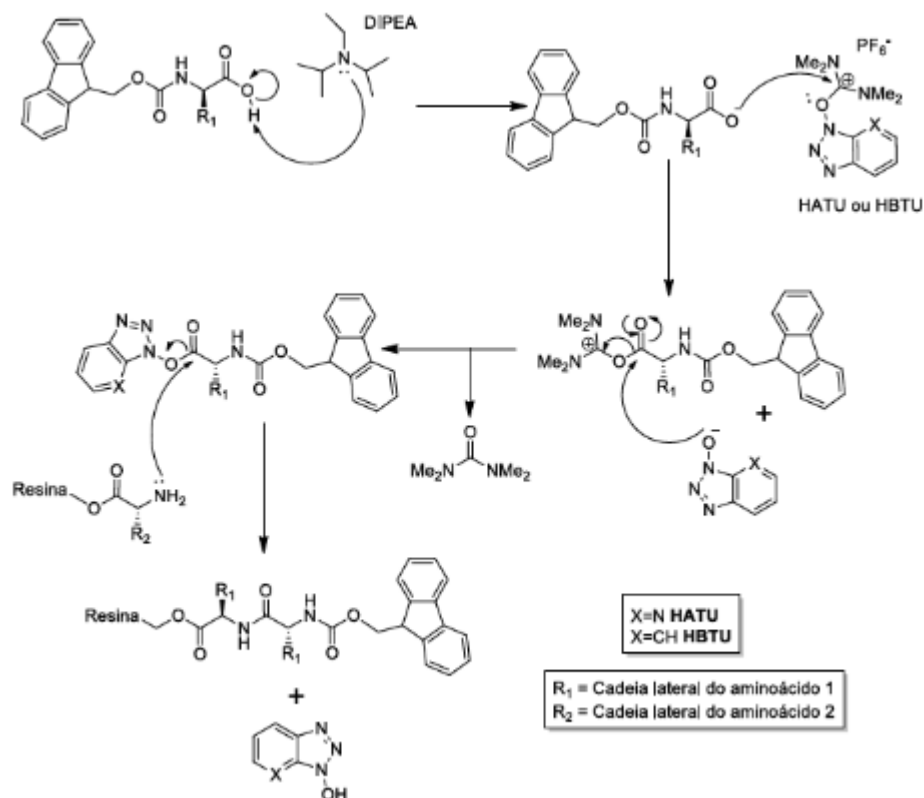


Figura 10 - Rota de síntese utilizando HBTU/DIPEA (W. C. Chan and P. D., 2000)

Após o acoplamento do aminoácido, o processo é repetido, pois cada aminoácido apresenta um grupo Fmoc presente nele, logo deve se fazer a desproteção e em seguida o acoplamento do próximo aminoácido, e refazer este processo até concluir a sequência de formação do peptídeo desejado.

### 3.8. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE ESTRUTURAS PEPTÍDICAS.

As interações dos peptídeos com membrana são resultado de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, e isso depende da conformação da molécula como um todo, tais como estruturação secundária, hidrofobicidade, momento hidrofóbico, carga, anfifilicidade (Margitta; Dathe & Wieprechet, 1999; Margitta Dathe et al., 1997). A ressonância magnética nuclear (RMN) é um método capaz de determinar a conformação de peptídeos e proteínas por meio das proximidades espaciais entre os núcleos da mesma molécula ou até entre moléculas, em especial os prótons (Claridge, 2016; Wüthrich, 1986). O RMN se

destaca, pois este método consegue demonstrar dados da estruturação de macromoléculas em solução (Veglia & Ramamoorthy, 2010). Desta forma, é possível avaliar a interação dos peptídeos com ligantes-alvo e/ou membranas, e assim, obter maior confiabilidade das estruturas (Lucas & Larive, 2004; Santana et al., 2016). Isso é possível porque os aminoácidos são ricos em hidrogênio e o RMN  $^1\text{H}$  torna-se uma alternativa interessante que permite estudar as estruturas composta por eles, tais como os peptídeos.

Para o estudo e resolução de estruturas bidimensionais utiliza-se normalmente os métodos *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY) e a *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (NOESY). No TOCSY é possível obter a interação de sistema de spins de cada aminoácido, o que pode definir como cada grupo de *spin* está ligado via acoplamento escalar. Ou seja, é possível observar as interações intra-residuais entre cada átomo de hidrogênio, de cada resíduo de aminoácido. No NOESY é obtido interações de *spin* por meio de acoplamento dipolar através do espaço entre dois núcleos, podendo ser avaliado a interação em distâncias de 5Å, em virtude do Efeito Nuclear *Overhauser* (*nuclear Overhauser effect* ou NOE), mas variando um pouco dependendo da programação do sistema. Este pode determinar disposições geométricas dos átomos nas estruturas, por que é possível visualizar interações intra-residuais quanto inter-residuais (Haney & Vogel, 2009; Huenges et al., 2017; Wüthrich, 1986). O conjunto destas informações bidimensionais permite obter informações das conectividades dos hidrogênios, que se restringem a distâncias geométricas e ângulos de diedros. Estas restrições em relação a distância estão ligadas com as intensidades de NOE, e que são proporcionais a  $r^6$ , onde  $r$  corresponde a distância entre dois spins que estão interagindo. Enquanto os ângulos são proporcionais aos valores de deslocamento químico que pertencem a cadeia principal de aminoácidos (Huenges et al., 2017; Skinner et al., 2015; Wüthrich, 1986).

Ghosh e colaboradores utilizaram a análise por RMN com o intuito de compreender o mecanismo molecular envolvido na interação de 2 peptídeos antimicrobianos e micelas de LPS (A. Ghosh et al., 2016). Um dos peptídeos foi extraído da secreção da pele do sapo *Rana esculenta*, denominado Esculentina -1a(1-21)NH<sub>2</sub> [Esc(1–21), GIFSKLAGKKIKNLLISGLKG-NH<sub>2</sub>], pois

este demonstrou ser um AMP com rápida atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas. O outro peptídeo seria um isômero do Esc(1-21), em que se substituiu os L-aminoácidos pelo seus enantiômeros correspondentes nas posições 14 e 17, nomeado Esc(1-21)-1c. Este peptídeo demonstrou também ter atividade contra *P. aeruginosa*, e ambos apresentam atividade de desagregação de LPS. Os dados de RMN mostraram o modo em que os peptídeos se ligam ao LPS de *P. aeruginosa*, demonstrando a estruturação de cada um em relação às micelas. Assim, o RMN é uma técnica informativa na verificação da interação entre AMPs e LPS.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS INTRAGÊNICOS ANTIMICROBIANOS (IAPS)**

O proteoma humano referência foi obtido a partir do site do EMBL-EBI ([https://www.ebi.ac.uk/reference\\_proteomes/](https://www.ebi.ac.uk/reference_proteomes/)). As estruturas primárias destas proteínas foram submetidas ao software Kamal (<http://www.cenargen.embrapa.br/kamal/>) visando identificar peptídeos encriptados que apresentem propriedades físico-químicas que os predisponham a ter atividade antimicrobiana. O programa Kamal foi atualizado e configurado para identificar, desta lista de proteínas, sequências peptídicas com 7 a 11 resíduos de aminoácidos alternados entre resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos. Ou seja, foram buscadas sequências com periodicidade do tipo X1Y1X2Y2X3Y3... ou Y1X1Y2X2Y3X3..., em que X representa resíduos hidrofílicos (Cys, Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr e Tyr) e Y resíduos hidrofóbicos (Ala, Phe, Ile, Leu, Met, Val, Trp e Tyr), usando como referência a escala de hidrofobicidade do anexo 3. Por fim, foi adicionado ao Kamal o parâmetro para selecionar peptídeos com carga líquida superior a +2. As propriedades físico-químicas dos potenciais IAPs foram calculadas pelo software Kamal. Agradecemos ao Dr. André Melro Murad da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela atualização do software.

### **4.2. SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS**

Os peptídeos foram sintetizados em Fase sólida (SPFS) seguindo utilizado como base o protocolo descrito por W. C. Chan e P. D. White (W. C. Chan and P. D., 2000) em uma escala de 0,15 mmol. Neste tipo de síntese, o peptídeo foi preparado sobre uma resina e seguiu um protocolo de 4 fases, sendo elas:

Fase 1: Preparo da resina

Para se iniciar o processo de síntese foi necessário fazer o inchaço da resina. Para isso, foi utilizada uma seringa com filtro sinterizado no fundo na qual foram adicionados 215 mg de resina (Rink Amide AM resin – 0,7 mmol/g) e aproximadamente 2 mL de dicloro metano (DCM). A seringa contendo a

resina foi submetida à agitação por 30 minutos a 200 rpm. Ao final desse tempo, a resina já se apresentava inchada e o solvente foi retirado com auxílio de uma bomba de vácuo. Esta parte do procedimento de síntese foi feita apenas uma vez, no início da mesma. E de forma sequencial, são realizadas as fases 2 e 3 até o último aminoácido.

#### Fase 2: Desproteção

Esta fase foi repetida toda vez que fosse necessário acoplar um novo aminoácido e/ou antes de clivar, pois ela remove o grupo de proteção Fmoc do N-terminal. Para a desproteção foram adicionados 2 mL de 4-metil-piperidina em N,N-dimetilformamida (DMF) (proporção 1:4) na seringa contendo a resina e deixando agitar por 15 minutos a 200 rpm. Retirou-se o solvente e repetiu o procedimento mais uma vez, com o intuito de garantir uma maior eficácia. Em seguida, foi feita a lavagem do sólido presente na seringa, em triplicata, com cerca de 4 mL de DMF, e em seguida, a lavagem com 4 mL DCM. Para a confirmação da desproteção, foi feito o teste de Kaiser em uma pequena alíquota do material. Este teste é uma avaliação qualitativa para verificar se o processo foi realizado de forma efetiva ou não, e que esta explicado detalhadamente mais a frente.

#### Fase 3: Acoplamento

Com sólido constituído por resina devidamente desprotegido, o aminoácido foi acoplado seguindo a rota de DIC/Oxyma, que consistiu em adicionar 4 equivalentes (0,6 mmol) da quantidade de resina utilizada do aminoácido com o N-terminal protegido. Em seguida, foram acrescentados 4 equivalentes de acetato de etil 2-ciano-2-(hidroxiimino) (oxyma Pure) (85,3mg), 2 mL de DMF e 93 µL de N,N'-diisopropilcarbodiimina (DIC) (que também correspondem a 4 equivalentes da quantidade de resina). Depois, esta suspensão foi colocada sob agitação a 200 rpm por 1 hora e 30 minutos. Ao fim desse tempo, foi feita a lavagem, três vezes, do sólido com cerca de 4 mL de DMF, seguido de 4 mL DCM. Para a confirmação do acoplamento, foi também feito o teste de Kaiser de uma pequena alíquota do material.

#### Fase 4: Clivagem

Após acoplar o último aminoácido, foi preciso realizar o processo de clivagem para retirar o peptídeo 'grudado' na resina. Primeiro foi realizada a desproteção do sólido resultante (peptídeo+resina). Em seguida, preparou-se o 'coquetel' de clivagem, composto por ácido trifluoroacético (TFA)/tioanisol/água/fenol/etanoditiol na proporção 82,5:5:5:5:2,5 (v/v) (Chan W. C., et al 2000). Adicionou-se o sólido seco dentro do coquetel e o agitou por 1 hora e 30 minutos a 200 rpm. Após o tempo determinado, o TFA foi removido com o auxílio de um fluxo de argônio. Ao retirar o TFA, utilizou-se éter diisopropílico gelado para precipitar o peptídeo e a resina, com posterior filtração e descarte da fase etérea, já que o peptídeo e a resina ficam retidos no filtro. Em seguida, o peptídeo foi solubilizado com uma mistura de metanol/água ou acetonitrila/água 1:1 (v/v), ficando retido no filtro apenas a resina. Posteriormente, o peptídeo solubilizado foi liofilizado no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Teste de Kaiser:

Este teste apresenta um caráter qualitativo, no qual apresenta uma coloração azul escuro da solução quando existirem aminas livres em solução. Ou seja, no caso da desproteção, a resina ficou azul e depois dos acoplamentos não houve mudança de coloração da resina. O teste foi realizado com uma pequena alíquota retirada da seringa e adicionada a uma mistura de soluções que continha uma gota de solução 5% de ninidrina em etanol (m/v), 80% de fenol em etanol (m/v) e cianeto de potássio (KCN) em piridina (2 mL 0,001 mM KCN em 98 mL de piridina). Em seguida, esta solução foi aquecida a 120 °C por aproximadamente 2 minutos e verificada a coloração.

#### **4.3. PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

Para eliminar eventuais produtos secundários de síntese, os peptídeos sintetizados foram purificados por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE) no laboratório de Anatomia Molecular e Nanomedicina da Faculdade de Medicina da UnB. A purificação foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu

(Japão) equipado com um sistema binário de bombeamento (LC-20AR), detector de arranjo de diodo (DAD, SPD-M20A), injetor manual e sistema de análise e processamento de dados LabSolutions versão 5.92. A coluna utilizada foi uma coluna preparativa de fase reversa Jupiter C18 (250 x 21,2 mm, 10 µm, 300 Å) da phenomenex. A fase móvel foi acetonitrila (ACN) + 0,1% de TFA/ água + 0,1% de TFA a 10 mL/min. O gradiente utilizado apresentou o seguinte perfil:

- 0-5min: 5% de ACN+TFA;
- 5-40min: 5%-100% de ACN+TFA;
- 40-45min:100% de ACN+TFA;
- 45-46min:100%-5% de ACN+TFA;
- 46-55min:5% de ACN+TFA;

Ao sistema do CLAE foram injetados manualmente uma solução contendo 20 mg/mL do peptídeo sintetizado liofilizado solubilizado em água. Para a detecção, foram monitorados os comprimentos de onda de 216 nm e 280 nm que correspondem aos comprimentos de onda da absorção da ligação peptídica e da absorção de cadeias laterais de moléculas aromáticas, respectivamente. Ao analisar o cromatograma continuamente foram coletadas frações, de forma manual, que contêm o peptídeo puro, que em seguida, foram liofilizadas no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

#### **4.4. ANÁLISE DE PEPTÍDEOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA**

Para a confirmação da estrutura do peptídeo sintetizado, o produto final da purificação por CLAE já liofilizado foi submetido à análise por espectrometria de massas, em que foi analisado o produto com relação a sua massa/carga.

#### 4.4.1. ELÉTRON SPRAY MS E MS/MS

Cerca de 1mg dos peptídeos sintetizados foi solubilizado em 500 µL de água ultrapura. Em seguida, 3 µL desta solução foi retirada e solubilizada em 997 µL de água e ácido fórmico. Esta amostra solubilizada foi analisada em um espectrômetro de massa de alta resolução presente no instituto de química da Universidade de Brasília. Este espectrômetro de massas é do modelo Triple ToF 5600+ (Sciex, Ontario, Canadá) que foi acoplado a um cromatógrafo líquido (Eksigent UltraLC 100, Sciex) que tem a função de injetar a amostra em uma vazão de 0.3mL/min. A fonte de ionização é do tipo electrospray (Esl, do inglês ion spray) e os espectros de massa foram adquiridos em modo positivo com valores de massa entre 100 a 2000 Da, juntamente a utilização de uma calibração externa. Os parâmetros de aquisição foram: TEM 450 (Temperatura da fonte), GS1 45 (Gás de nebulização), CUR 25 (Gás de cortina, contracorrente), GS2 50 (Gás de dessolvatação), ISVF 5500 (voltagem aplicada a *probe*) e DP 140 (potencial de declusterização de íons). Os produtos de íons escaneados foram adquiridos com CE 45 e CES 20, parâmetros relacionados a extensão de fragmentação do precursor. Por fim, os dados obtidos foram analisados com a utilização do software PeakView v2.1.

#### 4.4.2. ANÁLISE MALDI-TOF MS

Da solução anterior de 1 mg peptídeo solubilizado em 500 µL de água ultrapura, retirou-se 5 µL para a análise no espectrômetro de massa do tipo MALDI-ToF (Ultraflex III Bruker Daltonic) do Laboratório de Toxicologia do Instituto de Biologia da UnB. A amostra foi co-precipitada em uma placa de MALDI em uma proporção 3:1 de matriz e amostra, sendo uma solução a matriz de ionização ácido  $\alpha$ -ciano 4-hidroxicinâmico (sigla em inglês HCCA) a 10mg/mL em 50% (v/v) de acetonitrila e 0,3% (v/v) de TFA. Em seguida, a mistura secou em temperatura ambiente na placa. Foram então adquiridos os espectros de MS e de MS/MS pela fragmentação dos íons precursores, por LIFT para confirmação da sequência, utilizando MALDI-TOF no modo refletor, positivo, com range de 600 a 1500. A calibração foi feita com calibrantes externos (Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics) e a análise de cada peptídeo foi feita utilizando o programa FlexAnalysis v3.1 (Bruker Daltonics).

#### 4.5. QUANTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

A quantificação dos peptídeos sintetizados foi feita por espectrometria UV-Vis com o auxílio do espectrofotômetro UV-1280 da SHIMADZU do Laboratório de Anatomia Molecular e Nanomedicina da Faculdade de Medicina da UnB. Uma alíquota do peptídeo puro e liofilizado (aproximadamente 3 mg) foi solubilizado em 500 µL de água ultrapura (solução 1). Em seguida, retirou-se 2µL dessa solução 1 e solubilizou em 998 µL de água ultrapura. Esta diluição é necessária para se manter os valores de absorvância medidos abaixo do limite superior da Lei de Beer-Lambert (0,7 u.a) (Scopes, 1974 ; Weddel, 1956 ).

Essa segunda solução foi inserida no espectrofotômetro para a leitura do valor de absorvância nos comprimentos de onda de 205 nm, 215 nm, 225 nm e 280 nm (comprimento de onda usado na equação de peptídeos que apresentem aminoácidos com resíduos aromáticos em sua composição). Para o cálculo da concentração, foram utilizadas duas formulas distintas, uma para peptídeos em geral e outra para quando há a presença de aminoácidos com cadeia lateral aromática na composição do peptídeo.

- Formula geral:

$$CP(\mu\text{g/mL}) = \frac{(x+y).FD}{2}$$

$$X = A_{205} \times 31 \text{ (Scopes, 1974)}$$

$$Y = (A_{215} - A_{225}) \times 144 \text{ (Tombs et al., 1959)}$$

- Formula para peptídeos com aminoácidos aromáticos:

$$CP(\text{g/mL}) = \frac{A_{280}.FD}{5690} \text{ (Kirschenbaum, 1979)}$$

Em que:

FD = Fator de diluição;

$A_{205}$  = Absorbância obtida no espectrofotômetro à 205 nm, em uma cubeta de 1 cm;

$A_{215}$  = Absorbância obtida no espectrofotômetro à 215 nm, em uma cubeta de 1 cm;

$A_{225}$  = Absorbância obtida no espectrofotômetro à 225 nm, em uma cubeta de 1 cm.

$A_{280}$  = Absorbância obtida no espectrofotômetro à 280 nm, em uma cubeta de 1 cm.

#### **4.6. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DOS PEPTÍDEOS CONTRA BACTÉRIAS**

Com o intuito de avaliar o potencial antimicrobiano dos peptídeos selecionados (Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 e HsCtrl1) foi realizado o teste de suscetibilidade de microrganismo em diluição em caldo conforme os protocolos M7-A10, M27-A3 e M38-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Para isso, foram selecionados 4 microrganismos (Tabela 2) obtidos a partir da biblioteca de microrganismos da Universidade Católica de Brasília (UCB) e os testes foram realizados no Laboratório de Análise de Biomoléculas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da UCB em colaboração com o grupo de pesquisa do professor Dr. Marcelo H. S. Ramanda e realizado pela Mrs Bianca Oliveira. Os peptídeos em uma faixa de concentração de 128  $\mu\text{M}$  a 0,25  $\mu\text{M}$  foram incubados por 24 horas a 37°C em um meio de cultura líquido com bactérias nas concentrações finais  $5 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>. Este procedimento foi realizado em meio Mueller-Hinton (Himedia). Para controle positivo foi utilizado gentamicina em uma faixa de concentração de 20  $\mu\text{M}$  a 0,039  $\mu\text{M}$ . Como controle negativo foi utilizado os microrganismos em seus respectivos meios de cultura.

**Tabela 2 - Relação de bactérias utilizadas no ensaio de avaliação da concentração mínima inibitória dos peptídeos**

<b>Gram-positiva</b>	<b>Gram-negativa</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883

#### **4.7. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Este ensaio foi realizado em colaboração com a professora Dra. Aline Lima de Oliveira do Instituto de Química da Unb. O peptídeo Hs11 liofilizado foi solubilizado em água ultrapura para uma concentração final de 2mM. Para o ajuste do pH foi utilizado o pHmetro (HI 2221 pH/ORP meter – HANNA Instruments) e se adicionou HCl diluído a solução, para atingir o pH próximo a 4. E foi adicionado a solução 0,5% de 2,2,3,3-d4-3-trimetilsililpropionato de sódio (TMSP-d<sub>4</sub>), substância que serviu como padrão interno para referência de deslocamento químico (0 ppm). Foi preparado também uma solução estoque de LPS (Sigma-Aldrich, USA) em água ultrapura com concentração final de 0,5 mM, de onde será retirada as devidas quantidades para se obter as concentrações de 10 µM, 20 µM e 30 µM para realização do ensaio de interação com o peptídeo.

Todos os experimentos de RMN de <sup>1</sup>H foram realizados no espectrômetro Bruker Avance III HD 600 operando a 600 MHz (14 T) para <sup>1</sup>H, a 25 °C situado na Central Analítica do Instituto de Química (CAIQ) da UnB. O sinal da água foi atenuado com a sequência de pulso denominada *excitation sculpting*.

#### **4.8. DIFERENCIAÇÃO DE MACROFAGOS MURINOS DERIVADOS DA MEDULA OSSEA (BMDM)**

As células de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) foram obtidas a partir de camundongos machos C57/BL6 com aproximadamente 8 a 12 semanas de idade. Os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética animal da Fundação Oswaldo Cruz (SEI n. 23106.068588/2022-30) e realizados pelo Laboratório de Imunologia e Inflamação (LIMI) no Instituto de Biologia da UnB, orientado pela professora Dra. Kelly Grace Magalhães e realizados pela pós-doutoranda Raquel Almeida.

O processo de diferenciação foi realizado plaqueando as células retiradas da medula óssea em placas de petri com meio de cultura R20/30 (50% RPMI 1640-Gibco®, 20% de Soro Fetal Bovino-Gibco®, e 30% LCCM, 1% de gentamicina). Após o sétimo dia as células foram diferenciadas e deixadas descansando por 48 horas a 37°C com 5 % de CO<sub>2</sub>.

Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 24 poços tendo 5x10<sup>5</sup> células por poço com 500 µL de meio de cultura R 10/5 (50% de RPMI 1640, 10% SFB, 5 % LCCM) mantidas a 37°C com 5 % de CO<sub>2</sub> e realizando os ensaios em sequência.

#### **4.9. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR – MTT**

A viabilidade celular em relação aos peptídeos Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 e HsCtrl1 foram testadas em células BMDM. Para este experimento, as células foram plaqueadas em placa de cultura de 96 poços, tratadas por 24 horas e 48 horas com cada peptídeo em diferentes concentrações (0,1 µM, 1 µM, 10 µM e 100 µM). Após os tempos de estímulo, o sobrenadante foi substituído por uma solução de 10% de reagente MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio brometo) (Sigma-Aldrich, USA) 5mg/mL diluído no próprio meio de cultura celular. Em seguida, a placa foi incubada por 4h protegida da luz na estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan formados foram diluídos em 100µL de DMSO. A absorbância lida foi de 570nm no espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA). Para o cálculo da

viabilidade, as células não estimuladas foram consideradas como 100% viáveis e os demais estímulos foram calculados proporcionalmente.

#### **4.10. DOSAGEM DE CITOCINAS**

As células BMDM depois de diferenciadas e plaqueadas foram estimuladas pelos peptídeos Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 e HsCtrl1 na concentração de 1 $\mu$ M. Após o período de 24 horas, as citocinas provenientes do sobrenadante livre de células foram analisados pelo método de enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), utilizando-se kits comerciais (eBioscience e R&D System). O ensaio foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante e os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL). Foram dosadas as citosinas IL-6 e TNF- $\alpha$ . A absorbância foi lida a 570nm no espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, USA).

#### **4.11. BIOGENESE DE CORPUSCULOS LIPIDICOS**

Para analisar e quantificar a biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs) foi utilizado uma sonda fluorescente lipofílica, Bodipy 493/503 (Life Technologies), para a identificação de lipídios neutros intracelulares (triglicerídeos e ésteres de colesterol) presentes em grandes quantidades em CLs.

Para a quantificação de CL por citometria de fluxo, células BMDM foram estimulados com LPS ou com os peptídeos Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 e HsCtrl1 a 1 $\mu$ M ou LPS (500 ng/mL) + peptídeo (Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 e HsCtrl1) por 24 horas. Após o estímulo, as células foram incubadas com uma solução de Bodipy/PBS na concentração de 1/5000 por 30 minutos a 4°C protegido da luz. Após esse período as mesmas foram lavadas com PBS 3 vezes e feita a leitura imediatamente por citometria de fluxo (FACS Calibur). O *gate* para a análise foi plotado a partir da população de células viáveis, excluindo-se os debris celulares da análise. Os histogramas e médias de intensidade de fluorescência (MFI) foram feitos no software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

#### **4.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc). Os testes utilizados foram two-way ANOVA para comparação de médias, seguido do pós-teste de Turkey ou para test t student não pareado utilizou-se o teste Kruskal-wallis. A significância estatística foi assumida com valor de  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. BUSCA DE POTENCIAIS IAPS NO PROTEOMA HUMANO

O software Kamal inspecionou o proteoma humano referência, que continha aproximadamente 20.600 proteínas, por segmentos com periodicidade alternada de resíduos hidrofóbicos/hidrofílicos e de carga positiva com o objetivo de encontrar novos potenciais IAPs. O padrão de busca foi determinado para sequências peptídicas onde há uma alternância de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, podendo começar com um aminoácido hidrofílico ou começar com um aminoácido hidrofóbico (figura 11). Dentre os parâmetros, também se determinou que as sequências deveriam ter de 7 a 11 resíduos de aminoácidos e que estas sequências apresentassem uma carga líquida igual e superior a +2.

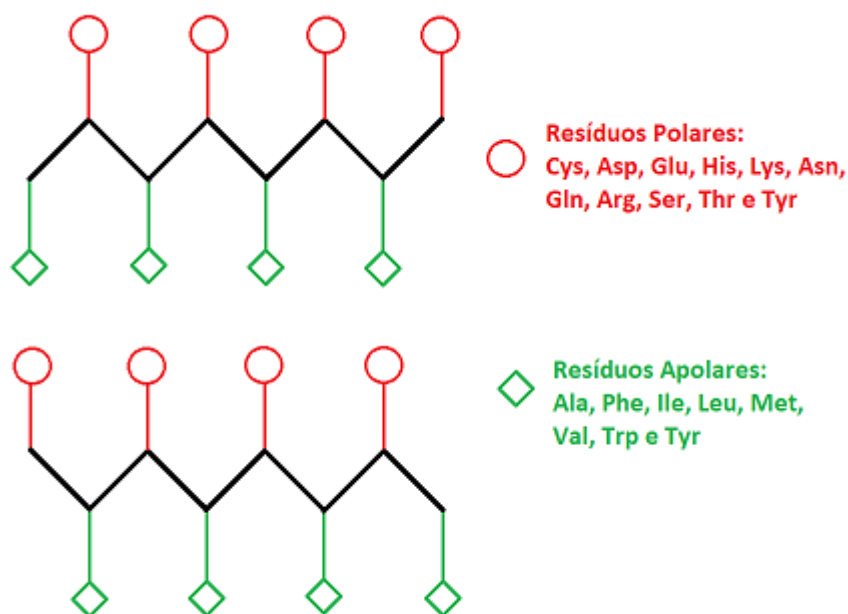


Figura 11 - Representação esquemática para a prospecção de potenciais IAPs, podendo começar tanto com resíduos de aminoácidos polares (representados em vermelho/círculos) e resíduos de aminoácidos apolares (representado em verde/losangos).

Após o processamento dessas informações no software Kamal, foram encontrados 12783 potenciais IAPs provenientes de proteínas do proteoma humano, sendo 8167 iniciando com aminoácidos hidrofílicos e 4616 iniciando com aminoácidos hidrofóbicos. Isso corresponde a aproximadamente 0,023%

de todos os segmentos internos de proteínas humanas com 7 a 11 resíduos de aminoácidos e as características estipuladas no programa. Em média, os fragmentos filtrados pelo Kamal tiveram massa molecular de  $963 \pm 138$  Da, carga líquida  $2,2 \pm 0,5$ , momento hidrofóbico  $1,30 \pm 0,26$ , hidrofobicidade média  $-0,48 \pm 0,34$  e índice de agregação Na4vSS =  $-2,0 \pm 22,4$ . Os histogramas representando a distribuição dessas propriedades para todas as moléculas encontradas podem ser encontrado na figura 12.

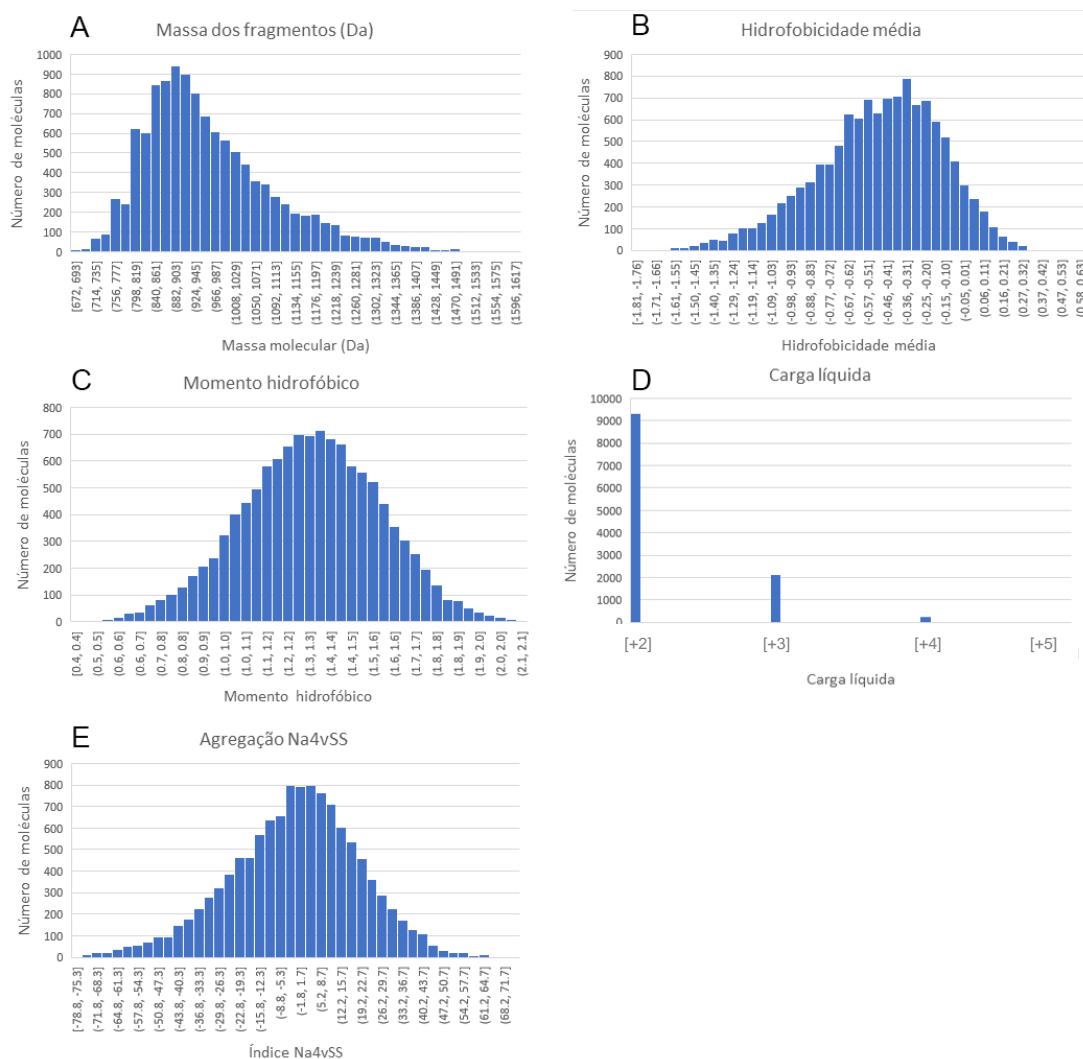


Figura 12 - Histogramas representando a distribuição das propriedades físico-químicas para todas as moléculas. A) Massa dos fragmentos; B) Hidrofobicidade média; C) Momento hidrofóbico D) Carga líquida E) Agregação Na4vSS;

Ao analisar o histograma, é possível verificar algumas tendências dentre os fragmentos expostos pelo software Kamal. A maior parte dos peptídeos têm massa entre 825 Da a 1101 Da. Quanto a hidrofobicidade média, sabe-se que

quanto mais negativo o seu valor, menor será a hidrofobicidade, e foi observada uma variação de -0,62 a -0,14, um valor negativo. Isso indica que, na média, os segmentos filtrados são hidrofílicos, mesmo tendo vários resíduos hidrofóbicos em sua composição. Isso se dá porque ao limitar/fixar a carga para maior e igual a +2, o software seleciona moléculas que apresentam lisina e arginina em sua composição, sendo esses aminoácidos muito hidrofílicos (Simm et al., 2016; Zhao & London, 2006). O momento hidrofóbico variou entre 1,2 a 1,5 em um ângulo de rotação de 160 graus, próprio para folhas- $\beta$ , o que demonstra que mesmo sendo hidrofílicas em média, as moléculas apresentam separação de carga, sendo assim anfifílicas. Quanto à carga líquida, é possível ver uma preferência de carga para +2, seguida da +3, provavelmente por uma questão estatística, já que é mais provável a existência de estruturas com menor número de cargas. E por fim, o índice Na4avSS, que é um valor mensurado pelo algoritmo Aggrescan, que serve para prever propriedades de agregação em variadas sequências polipeptídicas (Conchillo-Solé et al., 2007). Valores negativos de índice de Na4avSS correspondem a uma baixa propensão a agregação das sequências de aminoácidos dos peptídeos fornecidos ao programa. No atual trabalho, o índice de agregação Na4avSS variou entre valores de -24,4 a 20,4, o que indica que as sequências polipeptídicas prospectadas apresentam uma ampla variância em termos de propensão de agregação (Conchillo-Solé et al., 2007).

A partir da análise das propriedades físico-químicas e de estrutura primária das 12783 possibilidades para peptídeos encriptados, foram selecionados de forma manual e aleatória 6 potenciais IAPs curtos. Esta é uma quantidade de moléculas dentro da realidade de produção do laboratório e tempo para realização do trabalho. Esse número de peptídeos escolhidos também representa diferentes propriedades físico-químicas, e conseqüentemente variação em suas composições, o que permite comparações dentre os segmentos de aminoácidos escolhidos. Os 6 peptídeos para síntese estão apresentados abaixo, na Tabela 3:

**Tabela 3 - Relação de potenciais IAPs selecionados para síntese química**

Nome do peptídeo	Estrutura primária	Proteína de origem*
Hs11	LRVRARLRL-NH <sub>2</sub>	Proteína transmembrana 200B (Q69YZ2)
Hs12	KLRWYFKL-NH <sub>2</sub>	Proteína 1 de ativação de guanilil-ciclase (P43080)
Hs13	RAKVKFNVN-NH <sub>2</sub>	Proteína nucleolar 56 (O00567)
Hs14	KVRVKASVT-NH <sub>2</sub>	Proteína de ubiquitina-ligase (O95714)
Hs15	KFRVKVRVK-NH <sub>2</sub>	Repetição contendo a repetição do tipo Sushi (P78539)
Hs16	KVKVKVRVN-NH <sub>2</sub>	Proteína 4L de choque térmico de 70kDa (O95757)

\*Informações fornecidas pelo software Kamal

A tabela 4 destaca algumas propriedades físico-químicas dos peptídeos selecionados.

**Tabela 4 - Propriedades físico-químicas dos peptídeos selecionados para síntese em fase sólida.**

Peptídeo	Nº de Resíduos	Massa molecular	Carga líquida	MH	Hidrofobicidade média	pl
Hs11	9	1151,773	4	1,214	-0,331	12,476
Hs12	8	1152,681	3	1,276	-0,231	10,288
Hs13	9	1074,63	3	1,364	-0,828	11,163
Hs14	9	986,624	3	1,199	-0,62	11,163
Hs15	9	1158,771	5	1,452	-1,018	12,024
Hs16	9	1068,713	4	1,487	-0,97	11,259

\*Dados retirados do software KAMAL

Como o objetivo do trabalho é prospectar peptídeos antimicrobianos curtos com potencial estruturação em fitas- $\beta$  anfífilas a partir da interação com membranas, foram escolhidas moléculas que apresentam em torno de 9 resíduos de aminoácidos, com exceção do peptídeo Hs12 que apresenta 8 resíduos. A carga líquida destes peptídeos têm um valor entre +3 e +5, sendo o peptídeo Hs15 o que apresenta a maior carga líquida, com valor de +5, e os peptídeos Hs12, Hs13 e Hs14 com menor carga, de valor de +3. O peptídeo Hs16 apresenta o maior momento hidrofóbico, com valor de 1,487, enquanto o

peptídeo Hs11 apresenta o menor, um valor de 1,214. Quanto à hidrofobicidade, o peptídeo Hs15 apresenta a menor hidrofobicidade média, com um valor de -1,018, enquanto o Hs12 apresenta a maior, sendo um valor médio de -0,231.

Para fins de comparação, foi criado e sintetizado um peptídeo, o HsCtrl1, que não segue o padrão, ou seja, ele é desprovido do padrão de alternância hidrofóbico/hidrofílico e não apresenta carga positiva na sua composição. Este peptídeo foi inspirado na estrutura primária do peptídeo Hs14, mas sem sua periodicidade e os resíduos carregados substituídos por treonina.

**Tabela 5 - Relação do peptídeo controle**

<b>Nome do peptídeo</b>	<b>Sequência primária</b>	<b>Número de resíduos</b>	<b>Massa molecular*(Da)</b>
HsCtrl1	VTASTVVTT-NH <sub>2</sub>	9	876,4916

\*Massa calculada por: <http://rna.rega.kuleuven.be/masspec/pepcalc.htm>.

## **5.2. SÍNTESE EM FASE SÓLIDA E PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dos potenciais IAPs encontrados pelo software Kamal, seis foram selecionados e sintetizados em fase sólida, onde se produziu peptídeos amidados, pois estes apresentam maior resistência à proteólise e são de obtenção mais fácil por vias de síntese química. A rota de síntese utilizada foi com Oxima/DIC devido a sua eficiência nos acoplamentos dos aminoácidos. Após a síntese, os peptídeos foram clivados das suas respectivas resinas e liofilizados.

Em sequência, os peptídeos foram purificados por cromatografia de alta eficiência. Os tempos de retenção para os peptídeos Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 e HcCtrl1 foram: 20,53; 24,14; 18,48; 17,36; 18,66 minutos, respectivamente. Os cromatogramas de purificação de cada um desses peptídeos podem ser conferidos nas Figuras 9-13.

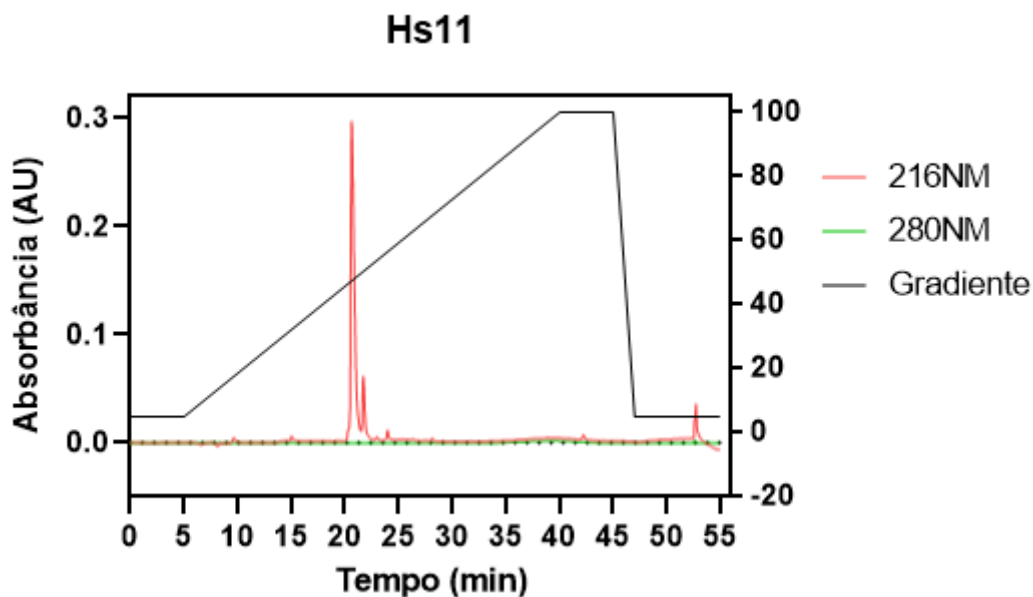


Figura 13 - Cromatograma correspondente a purificação do peptídeo Hs11 com utilização de um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA e água + 0,1% TFA (representado pela linha preta) e monitoramento do comprimento de onda em 216nm (representado pela linha vermelha) e 280nm (representado pela linha verde), onde o peptídeo eluiu em um tempo de retenção de 20,53 min

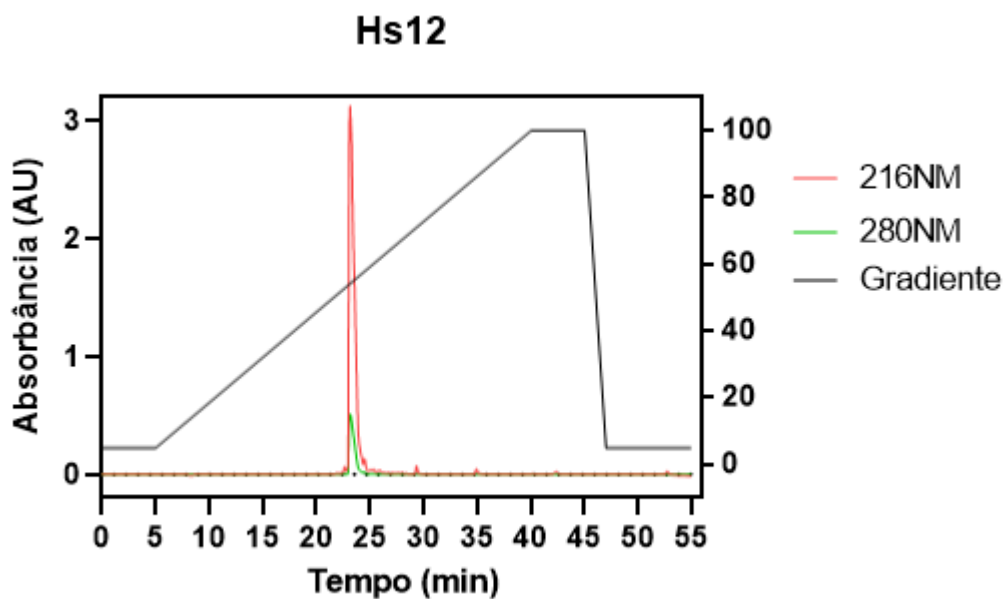


Figura 14 - Cromatograma correspondente a purificação do peptídeo Hs12 com utilização de um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA e água + 0,1% TFA (representado pela linha preta) e monitoramento do comprimento de onda em 216nm (representado pela linha vermelha) e 280nm (representado pela linha verde), onde o peptídeo eluiu em um tempo de retenção de 24,14 min

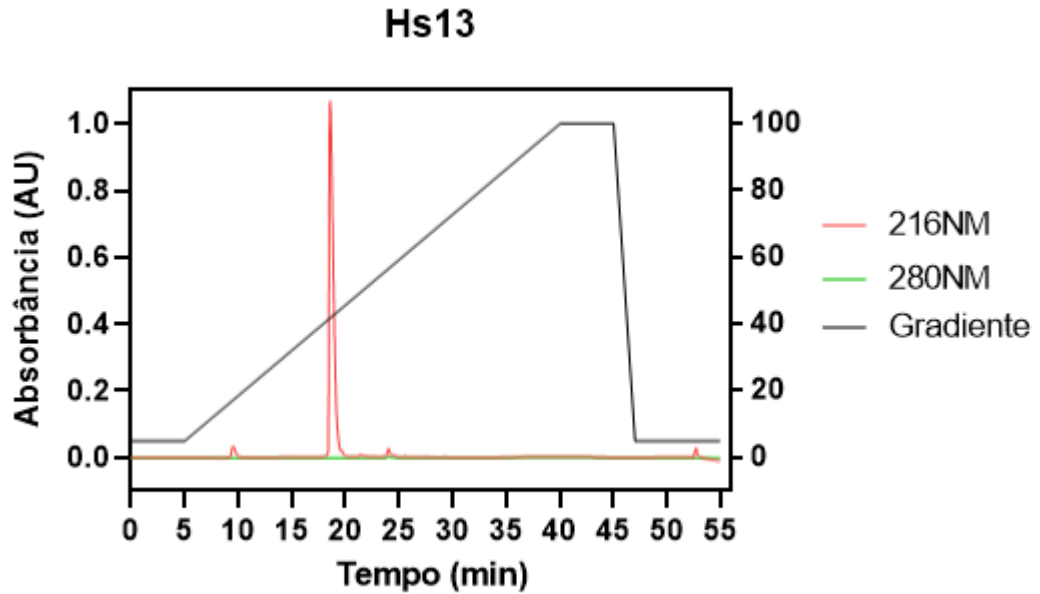


Figura 15 - Cromatograma correspondente a purificação do peptídeo Hs13 com utilização de um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA e água +0,1% TFA (representado pela linha preta) e monitoramento do comprimento de onda em 216 nm (representado pela linha vermelha) e 280nm (representado pela linha verde), onde o peptídeo eluiu em um tempo de retenção de 18,48 min.

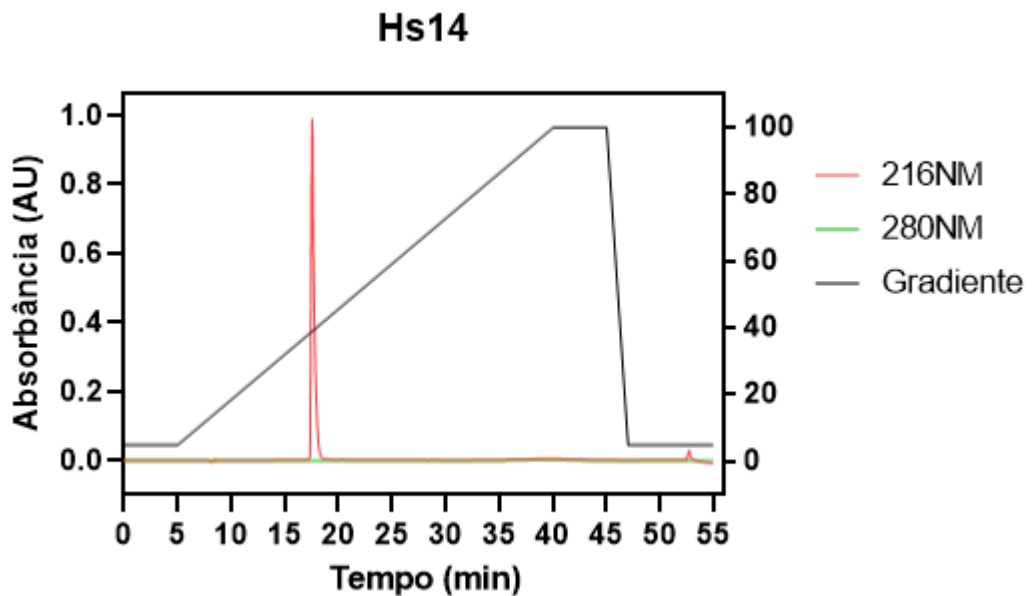


Figura 16 - Cromatograma correspondente a purificação do peptídeo Hs14 com utilização de um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA e água + 0,1% TFA (representado pela linha preta) e monitoramento do comprimento de onda em 216nm (representado pela linha vermelha) e 280nm (representado pela linha verde), onde o peptídeo eluiu em um tempo de retenção de 17,36 min.

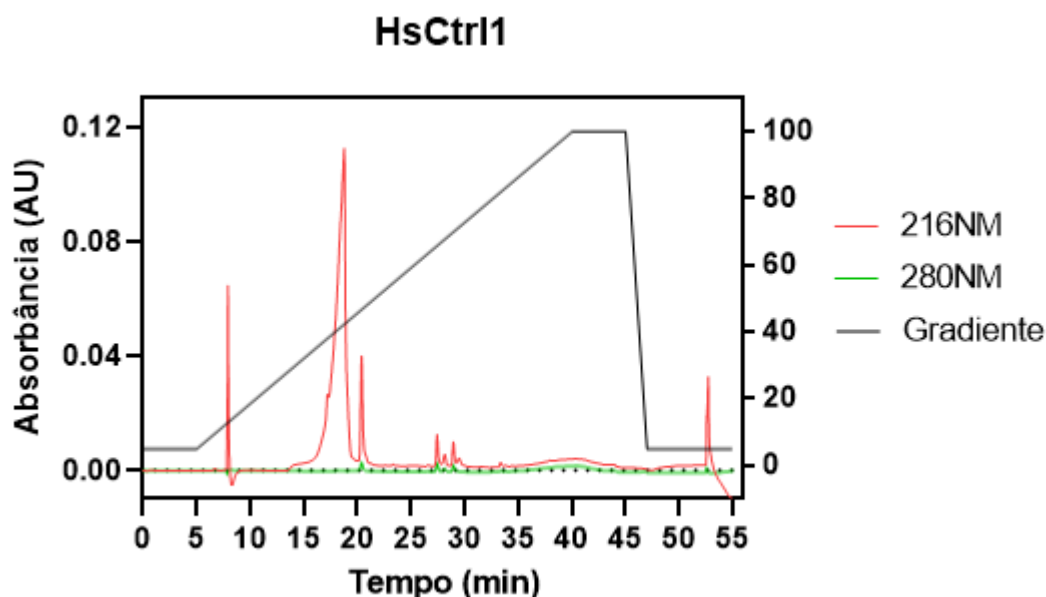


Figura 17 - Cromatograma correspondente a purificação do peptídeo HsCtrl1 com utilização de um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA e água + 0,1% TFA (representado pela linha preta) e monitoramento do comprimento de onda em 216nm (representado pela linha vermelha) e 280nm (representado pela linha verde), onde o peptídeo eluiu em um tempo de retenção de 18,66 min.

A partir dos cromatogramas das Figuras 9 a 13, é possível inferir que a síntese e purificação foi realizada de forma satisfatória para estes peptídeos, pois o pico majoritário corresponde ao peptídeo desejado, o produto principal da síntese, sendo apenas ele coletado e analisado. Além disso, é possível notar que há poucas frações secundárias, decorrentes de subprodutos. Apenas para o peptídeo HsCtrl1 é visto um alargamento do pico majoritário, podendo ser uma possível propensão a formação de agregados deste peptídeo. Os peptídeos eluem em porcentagens variadas de acetonitrila, variando de 40% até 60%, indicando uma hidrofobicidade suficiente para a adsorção na fase estacionária da coluna de fase reversa. Os cromatogramas dos peptídeos Hs15 e Hs16 não foram apresentados, pois não foi possível obter peptídeos com grau aceitável de pureza, sendo então desconsiderados para a continuidade do trabalho.

### 5.3. CONFIRMAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DOS IAPS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Após a etapa de purificação, os peptídeos foram analisados por espectrometria de massa. Destes 6 peptídeos selecionados, apenas 4 peptídeos (Hs11, Hs12, Hs13 e Hs14) foram sintetizados de maneira satisfatória, e serão eles os peptídeos que serão apresentados nas análises no decorrer de todo o trabalho a partir deste momento. Já os IAPs Hs15 e Hs16 foram descartados após a análise cromatográfica, pois apresentavam subprodutos de síntese de difícil purificação. Os valores relativos à massa/carga estão de acordo com o valor esperado (Tabela 6), confirmando a presença dos peptídeos sintetizados. Abaixo estão representados os espectros de massas e o espectros da fragmentação dos íons  $[M+H]^+$  relativos a cada peptídeo.

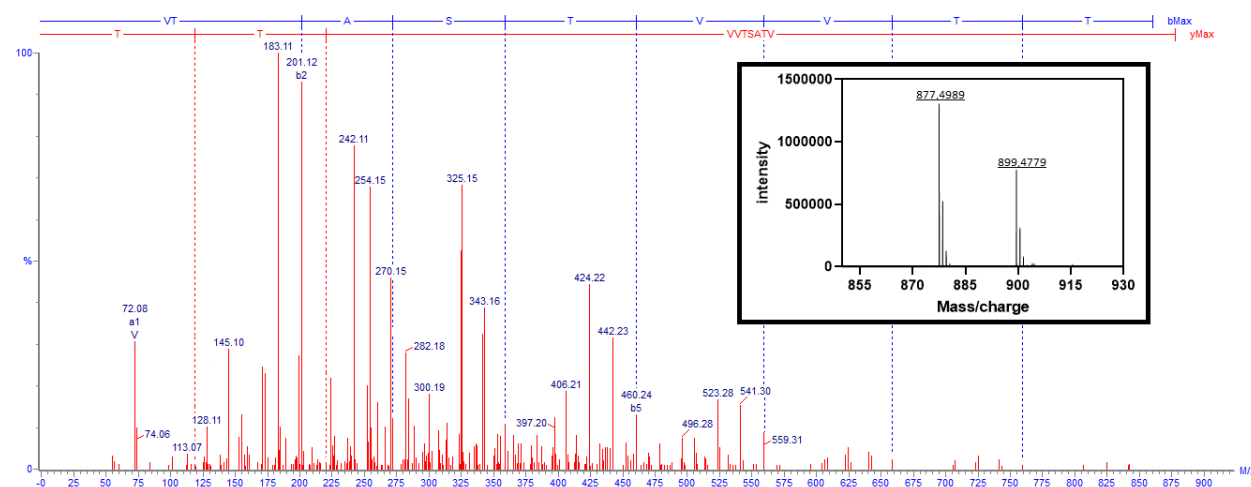


Figura 18 - Espectro de MS do peptídeo HsCtrl1, com  $[M+H]^+ = 877,498$  Da e o espectro de fragmentação do íon. Espectro obtidos a partir de um ESI-MS.

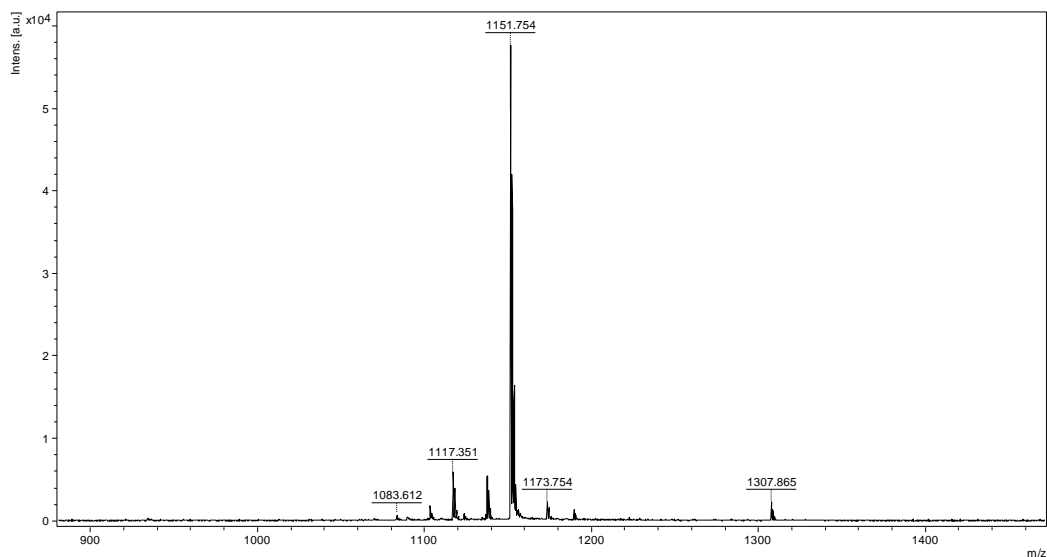


Figura 19 - Espectro de MS do produto bruto da síntese de Hs11 obtido em modo refletor positivo em um MALDI-TOF MS no range de m/z de 800 a 1600.

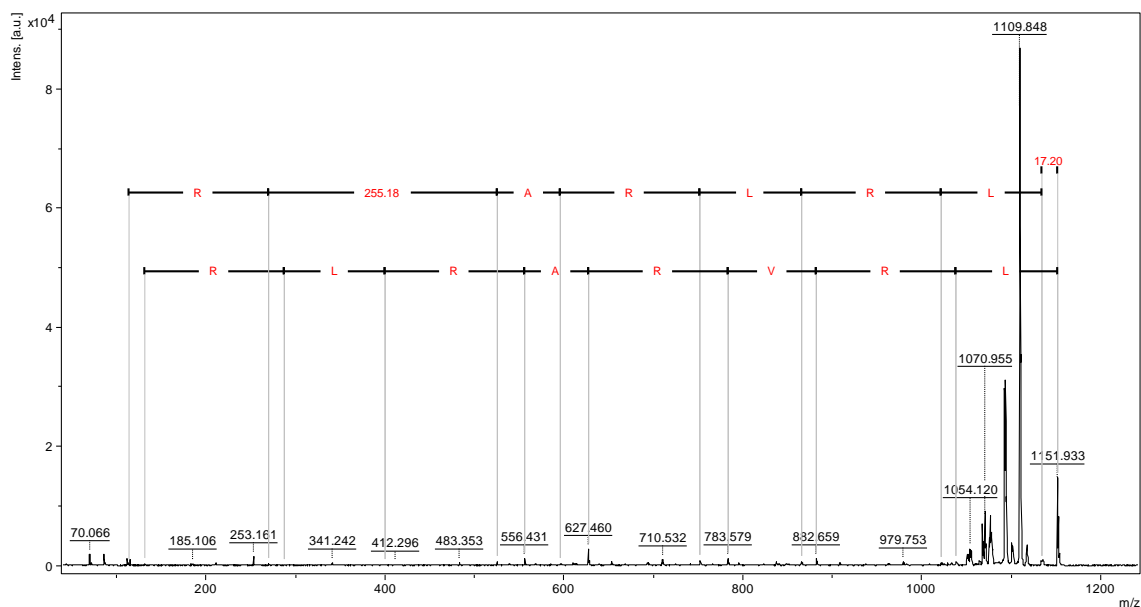


Figura 20 - Espectro de MS/MS do peptídeo Hs11 obtido em modo LIFT em um MALDI-TOF MS com o assinalamento dos íons das séries y e b (em vermelho).

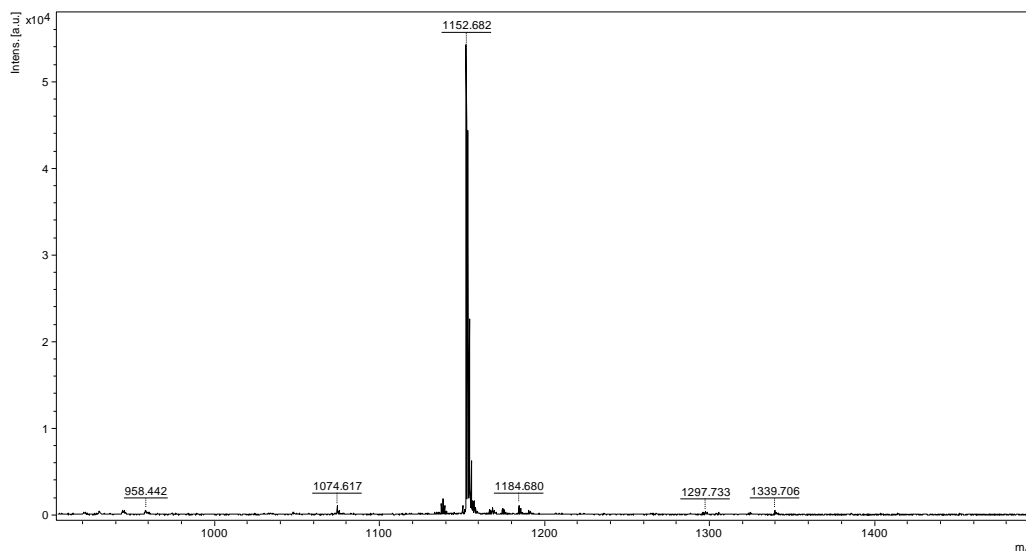


Figura 21 - Espectro de MS do produto bruto da síntese de Hs12 obtido em modo refletor positivo em um MALDI-TOF MS no range de m/z de 800 a 1600

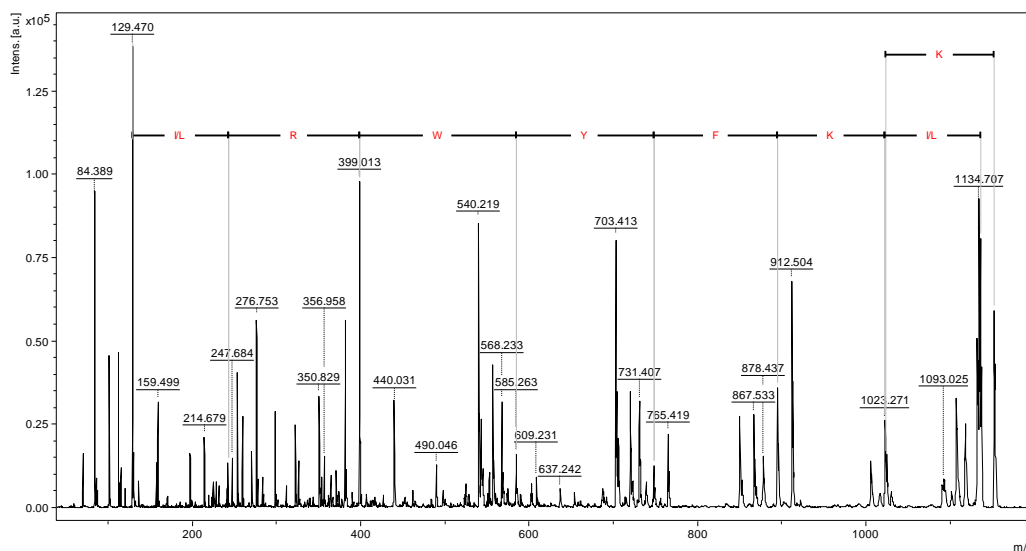


Figura 22 - Espectro de MS/MS do peptídeo Hs12 obtido em modo LIFT em um MALDI-TOF MS com o assinalamento dos íons das séries y e b (em vermelho).

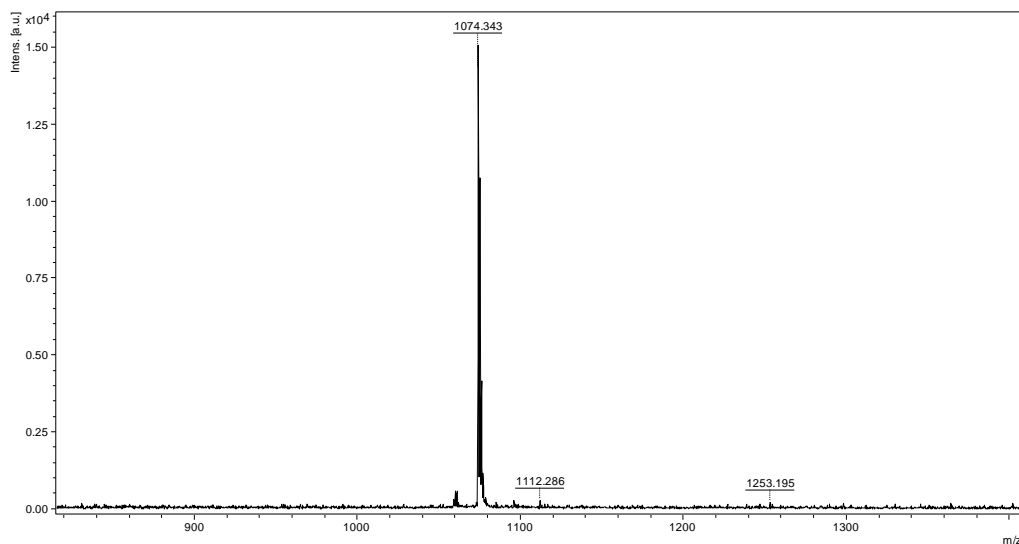


Figura 23 - Espectro de MS do produto bruto da síntese de Hs13 obtido em modo refletor positivo em um MALDI-TOF MS no range de m/z de 800 a 1600

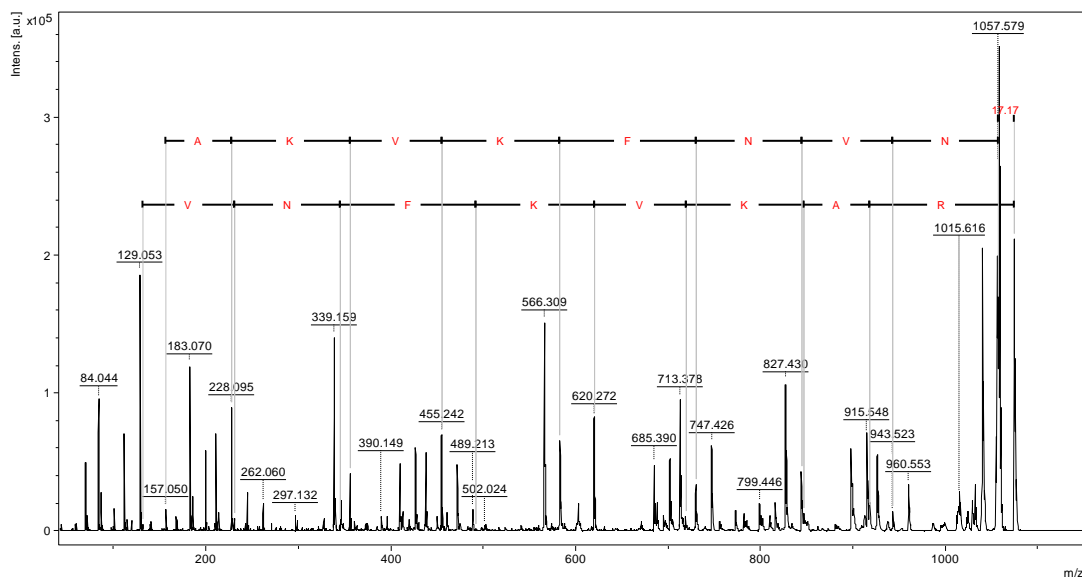


Figura 24 - Espectro de MS/MS do peptídeo Hs13 obtido em modo LIFT em um MALDI-TOF MS com o assinalamento dos íons das séries y e b (em vermelho).

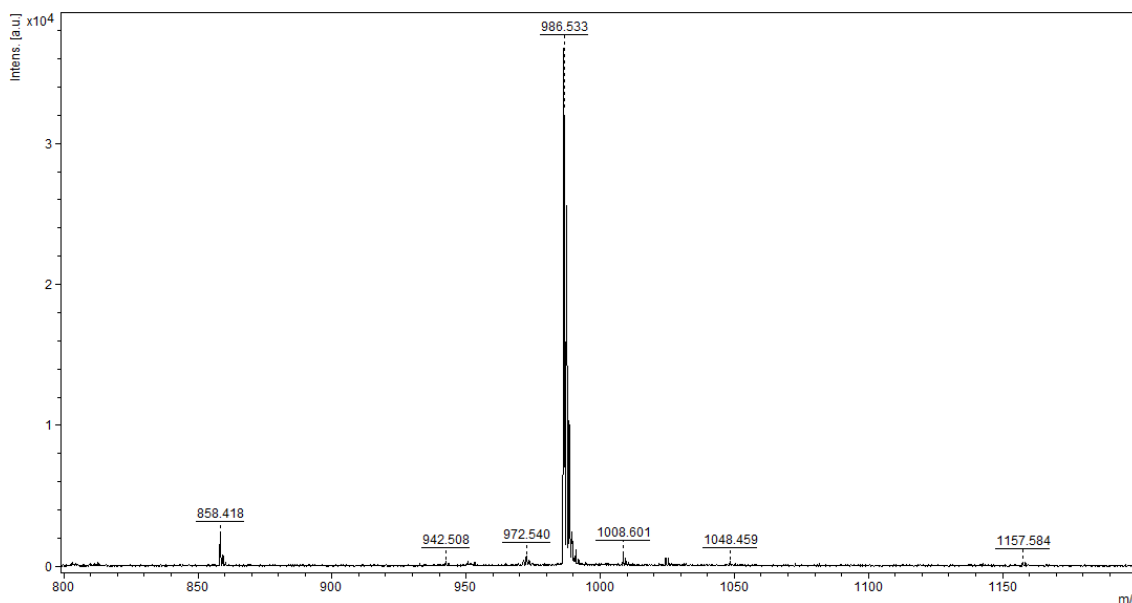


Figura 25 - Espectro de MS do produto bruto da síntese de Hs14 obtido em modo refletor positivo em um MALDI-TOF MS no range de m/z de 800 a 1600.

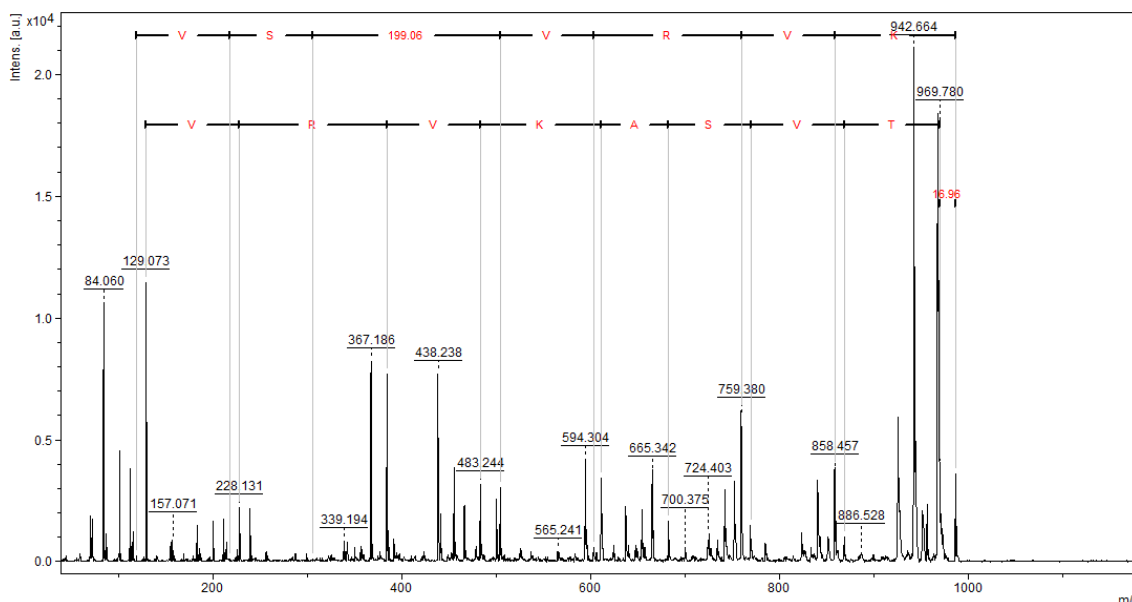


Figura 26 - Espectro de MS/MS do peptídeo Hs14 obtido em modo LIFT em um MALDI-TOF MS com o assinalamento dos íons das séries y e b (em vermelho).

A fim de comparação, a Tabela 6 lista a massa monoisotópica calculada dos peptídeos e sua massa experimental, conforme detectado. Os erros de massa estão dentro do esperado para cada técnica, sendo a técnica de elétron spray de maior acurácia, e que apresenta o menor erro envolvido entre o valor calculado para a massa e o valor experimental de massa. Os valores de erro em ppm são altos para alguns peptídeos, contudo, isto pode ser desconsiderado, pois o método foi utilizado apenas como confirmatório e com

ele foi possível verificar a estrutura primária dos peptídeos por MSMS. Por isso também, só é mostrado uma região do espectro de massas.

**Tabela 6 - Relação de comparação entre massa calculada e a massa obtida experimentalmente**

Peptídeo	Massa calculada* [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Massa experimental [M+H] <sup>+</sup> (Da)	Erro (ppm)
Hs11	1151,796	1151,754	36
Hs12	1152,704	1152,682	19
Hs13	1074,653	1074,343	288
Hs14	986,647	986,533	115
HsCtrl1	877,4990	877,4989	0,1

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

A partir do perfil de fragmentação dos íons [M+H]<sup>+</sup> foi possível confirmar a estrutura primária de cada peptídeo. Isso foi feito com base nos íons das séries complementares y e b encontrados nos espectros, que são fragmentos frequentes em MS/MS gerados a partir da quebra de ligações peptídicas. A série y é formada quando a carga residual está presente na porção C-terminal enquanto a série b é gerada por íons que retém a carga na região N-terminal (P. K. Ghosh, 2016). É comum não se observar a fragmentação de alguns íons, ou que elas não sejam tão evidentes, todavia, foi possível observar os conjuntos de íons fragmentos em pelo menos uma série.

#### 5.4. QUANTIFICAÇÃO

Após a confirmação da identidade dos peptídeos sintetizados por espectrometria de massa, para a realização dos testes biológicos, foi necessária a realização da quantificação do material purificado por UV-vis.

**Tabela 7 - Leitura dos comprimentos de onda de 205nm, 215nm, 225nm e 280nm no UV-VIS para cada peptídeo e o valor calculado para suas concentrações**

<b>Peptídeo</b>	<b>205 nm</b>	<b>215 nm</b>	<b>225 nm</b>	<b>280 nm</b>	<b>CP(ug/mL)</b>
Hs11	0,123	0,042	0,019	-	1781,25
Hs12	0,247	0,198	0,157	0,028	2460,457
Hs13	0,177	0,077	0,023	-	3315,75
Hs14	0,083	0,031	0,014	-	1255,25
HsCtrl1	0,214	0,079	0,036	-	3206,5

A partir desta concentração é possível obter o valor da concentração molar de cada peptídeo a partir de suas massas molares, e assim, dimensionar de acordo os próximos ensaios.

### **5.5. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS IAPS VERSUS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

A atividade antimicrobiana dos peptídeos Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 e HsCtrl1 foram testadas em relação a bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) e Gram-positiva (*S. aureus*) em teste de microdiluição em placa no Laboratório de Análise de Biomoléculas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da UCB.

Dentre estes peptídeos, apenas o Hs11 e Hs12 apresentaram atividade antibacteriana dentro da faixa de concentração de 128 a 0,25  $\mu$ M, inibindo todas as cepas testadas. Os outros 3 peptídeos não apresentaram atividade inibitória diante das cepas testadas. Para controle positivo foi utilizado gentamicina em uma faixa de concentração de 20  $\mu$ M a 0,039  $\mu$ M. Os valores de MIC estão representados na Tabela 8, dada abaixo:

**Tabela 8 - Concentração inibitória mínima (MIC), dado em  $\mu\text{M}$ , para em bactérias patogênicas humanas**

Peptídeos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Hs11	16 $\pm$ 0 / >32	16 $\pm$ 0 / >32	128 $\pm$ 0 / > 128	8 $\pm$ 0 / >16
Hs12	16 $\pm$ 0 / 32 $\pm$ 0	16 $\pm$ 0 / >32	64 $\pm$ 0 / > 128	8 $\pm$ 0 / >16
Hs13	N/A	N/A	N/A	N/A
Hs14	N/A	N/A	N/A	N/A
HsCtrl1	N/A	N/A	N/A	N/A
Gentamicina	0,47 $\pm$ 0,16 / 0,47 $\pm$ 0,16	0,63 $\pm$ 0 / 0,63 $\pm$ 0	0,31 $\pm$ 0 / 0,47 $\pm$ 0,16	0,31 $\pm$ 0 / 0,47 $\pm$ 0,16

N/A significa que não apresentou atividade dentro da concentração testada.

Os peptídeos Hs13, Hs14 e HsCtrl1 não apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas dentro das concentrações testadas. Já os peptídeos Hs11 e Hs12 apresentaram ação antibacteriana de perfil similar, exceto para a bactéria *K. pneumoniae*, para a qual o peptídeo Hs12 apresentou a melhor performance com uma inibição total do crescimento da bactéria em 64  $\mu\text{M}$ . Ambos os peptídeos inibiram o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Ao analisar as propriedades físico-químicas dos peptídeos testados, os que apresentaram atividade antimicrobiana foram aqueles que têm em sua composição os resíduos de aminoácidos mais hidrofóbicos, se compararmos a tabela escala de hidrofobicidade do anexo 2. Tal fato fica evidente a partir da comparação da hidrofobicidade média das sequências, sendo a do Hs11 = -0,331 e do Hs12 = -0,231, as duas maiores entre os peptídeos testados. Percebe-se que Hs13 e Hs14 apresentam um alto conteúdo de Valina em sua eventual face hidrofóbica. Na escala TM (Zhao & London, 2006), dada no Anexo 2, Valina é menos hidrofóbica que Triptofano, Leucina, Isoleucina e Fenilalanina, o que permite hipotetizar que peptídeos apresentando a periodicidade aqui investigada, mas com maior conteúdo destes últimos aminoácidos, tenderão a ser antimicrobianos. Tal hipótese deverá ser verificada no futuro. Contudo, a atividade antimicrobiana dos AMPs decorre da inserção de resíduos hidrofóbicos na bicamada lipídica que consiste em um núcleo apolar, enquanto resíduos hidrofílicos interagem com a parte externa da membrana, o que contribui para ruptura da membrana como também para

atingir alvos intracelulares. Quanto aos demais parâmetros, não foi observada uma correlação clara com os resultados obtidos.

Os valores do MIC são comparáveis a de outros AMPs e IAPs conhecidos estruturados em  $\alpha$ -hélice, os quais apresentam, porém, maior número de resíduos. Dentre os Hs IAPs helicoidais conhecidos, podemos citar o Hs02, com MICs na faixa de 1 a 2  $\mu$ M para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Contudo, Hs01 e Hs03 tiveram um desempenho mais modesto em relação a estes mesmos microrganismos, com MICs variando de 4 a 128  $\mu$ M para *S. aureus* e inatividade contra *P. aeruginosa* (Guilherme D. Brand et al., 2019). Além disso, comparando com os peptídeos testados por Ong e colaboradores (Ong et al., 2013), vemos que Hs11 e Hs12 possuem potência comparável e às vezes superior aos peptídeos mais ativos testados nesse trabalho (tabela 9), como no caso da bactéria *S. aureus* onde a menor concentração foi de 20,7  $\mu$ M para o peptídeo (IRVK)<sub>3</sub>, enquanto para o Hs11 e o Hs12 foi de 16  $\mu$ M. Isso indica que proteínas humanas possuem segmentos internos com padrão similar aos testados e com potência compatível como agentes antimicrobianos.

**Tabela 9 - Concentração inibitória mínima (MIC), dado em  $\mu$ M, para os peptídeos testados pelo trabalho de Ong et al., 2013**

Peptídeos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. epidermidis</i>
(VRVK) <sub>2</sub>	N/A	254,5	N/A	63,6
(IRIR) <sub>2</sub>	28,6	7,1	7,1	3,5
(IKIK) <sub>2</sub>	127,2	31,8	31,8	2,0
(IRIK) <sub>2</sub>	60,1	15,0	30,1	3,7
(IRVK) <sub>2</sub>	247,4	61,8	61,8	7,7
(FRFK) <sub>2</sub>	212,8	13,2	53,2	6,6
(WRWK) <sub>2</sub>	46,9	11,7	93,9	5,8
(VRVK) <sub>3</sub>	42,6	10,6	42,6	0,6
(IRIK) <sub>3</sub>	40,3	80,6	322,7	0,6
(IRVK) <sub>3</sub>	20,7	10,3	41,4	1,3
Polimixina B	103,8	1,6	1,6	12,9

\*N/A significa que não apresentou atividade na concentração testada

Ainda para fins de comparação, o IAP Hs10, um peptídeo sintetizado pelo grupo que apresenta 9 resíduos de aminoácidos e características próximas aos peptídeos deste trabalho, também foi avaliado e testado. Este peptídeo, na presença de vesículas de DMPC/DMPG (proporção 2:1), demonstrou uma estruturação secundária similar a folhas- $\beta$ , e apresentou uma

atividade antibacteriana média para *E. coli* e *P. aeruginosa* de 32  $\mu\text{M}$  e 42  $\mu\text{M}$ , respectivamente (dos Santos, 2022). Os peptídeos Hs11 e H12 apresentaram, então, maior potência como agentes antimicrobianos diretos do que o Hs10.

É importante ressaltar que os peptídeos testados têm no máximo 9 resíduos de aminoácidos, logo, são menores que um aparente limite mínimo necessário para a manutenção da atividade de peptídeos antimicrobianos helicoidais. O tamanho mínimo para peptídeos helicoidais não foi amplamente investigado na literatura. Alguns trabalhos relatam que AMPs devem apresentar no mínimo 10 resíduos de aminoácidos, porém não apresentam uma referência clara para tal (Tossi et al., 2000). Em nosso grupo, o análogo do IAP Hs02 com 10 resíduos de aminoácidos perdeu completamente a atividade antimicrobiana, sendo esta detectável somente em análogos com 13 resíduos (dos Santos, 2022). Assim, fica claro que o desenho atual, com base em fitas- $\beta$  anfífilas, é capaz de resultar em peptídeos antimicrobianos de baixa massa molecular e atividade antimicrobiana significativa, correspondendo então a um ótimo custo-benefício para este tipo de molécula.

## **5.6. EFEITO DOS IAPS CURTOS NA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS MURINOS**

Os ensaios biológicos, a seguir, foram realizados em colaboração com o Laboratório de Imunologia e Inflamação (LIMI) no Instituto de Biologia da UnB. Primeiro, foi necessário verificar se os peptídeos avaliados possuem efeito na viabilidade de células. Para tal, foi verificada a viabilidade celular de macrófagos murinos (BMDM) em relação aos peptídeos Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 e HsCtrl1 nas concentrações de 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ . O ensaio de redução de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um método quantitativo colorimétrico que tem por base a conversão deste reagente em cristais de formazan (Grela et al., 2018). Estes cristais têm a coloração azul e são solubilizados para a análise por espectrofotometria. Quanto maior a viabilidade celular, maior será a absorbância medida devido a maior formação dos cristais de MTT.

O ensaio de MTT para viabilidade de macrófagos murinos tratados com peptídeos sugere que nenhuma das moléculas testadas modula a viabilidade celular no período de 24h. O peptídeo Hs11 (figuras 27-A) não alterou a viabilidade celular nos tempos de 24h e 48h nas concentrações testadas, entretanto, ele induziu o aumento da viabilidade celular na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Esse dado, embora estatisticamente significativo, é de pouca relevância, sendo mais provavelmente devido à variância biológica inerente ao ensaio. E assim, seria necessário uma futura repetição do ensaio para verificação se este é um fato isolado ou uma tendência. Para o peptídeo Hs12 (figura 27-B), no tempo de 48h, foi observada uma redução significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 1  $\mu\text{M}$ , indo para uma viabilidade celular de 82,5%. Já nas concentrações de 100  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  há uma queda maior da viabilidade celular, apresentando uma viabilidade de aproximadamente 65% das células. Os BMDM tratados com o peptídeo Hs13 (figura 27-C), no tempo de incubação de 48h, apresentaram redução da viabilidade celular quando tratados nas concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , apresentando uma viabilidade celular em torno de 85%. O peptídeo Hs14 (figura 27-D) a partir da concentração de 0,1  $\mu\text{M}$  já reduziu a viabilidade celular, apresentando 89% da viabilidade. Na concentração de 10  $\mu\text{M}$  reduz mais significativamente, chegando a uma viabilidade celular de 74,51% de BMDM no tempo de 48h de tratamento. Entretanto, na concentração mais alta de 100  $\mu\text{M}$  deste IAP não foi observada a redução da viabilidade celular, podendo ser um erro analítico na realização do experimento. O peptídeo HsCtrl1 (figura 27-E) não modula viabilidade celular de BMDM independente da concentração e tempo.

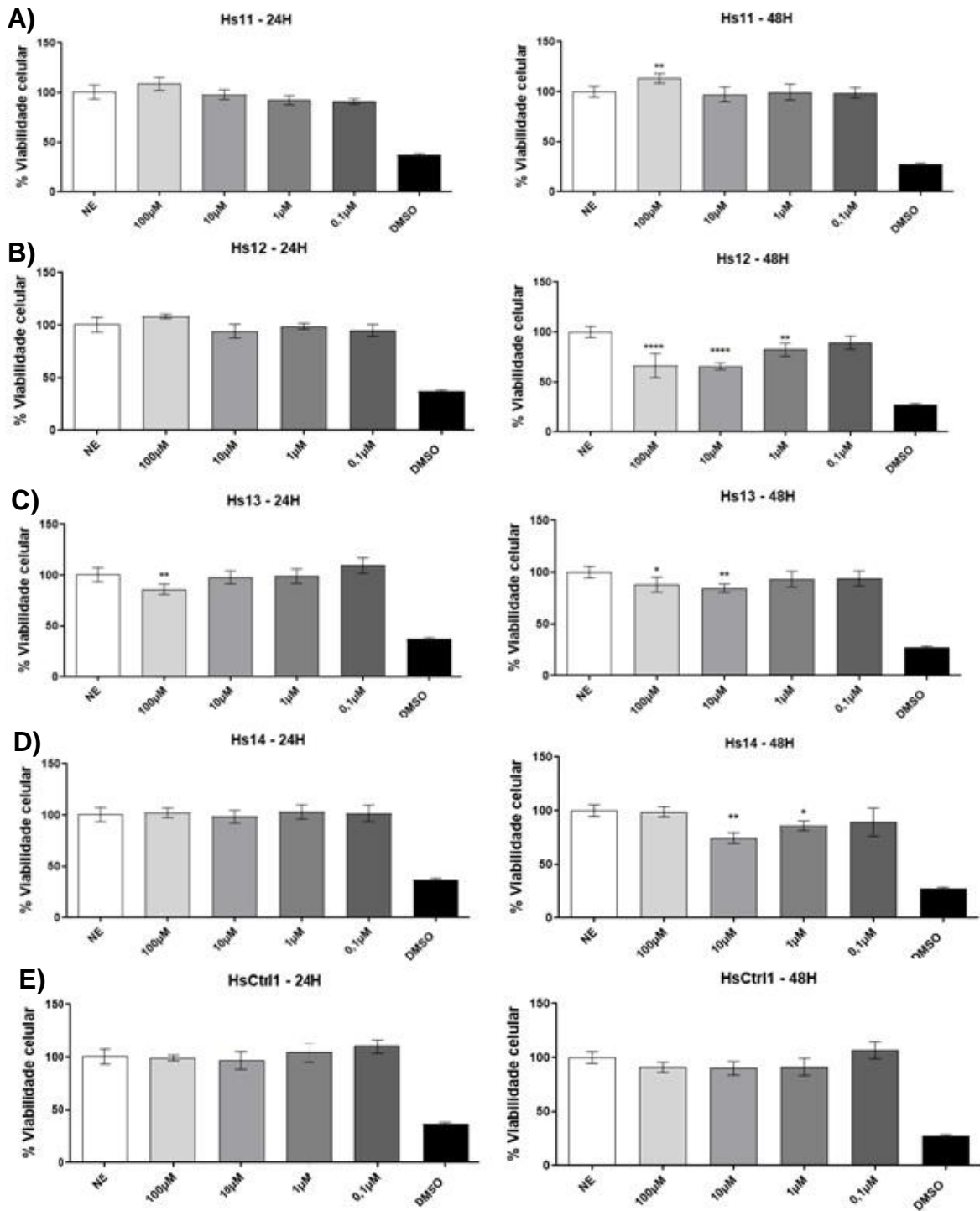


Figura 27 - Ensaio de viabilidade celular MTT para verificar o efeito dos peptídeos A)Hs11, B)Hs12, C)Hs13, D)Hs14 e E)HsCtrl1 em células de macrófagos murinos após exposição de 24H e 48H. Os asteriscos (\*), (\*\*) e (\*\*\*) representam  $p < 0,05$ ,  $P < 0,01$ , e  $P < 0,0001$ , respectivamente. NE corresponde às células não estimuladas.

O ensaio de MTT indicou que todos os peptídeos possuem baixa citotoxicidade para BMDM até 100  $\mu\text{M}$ , visto que, no tempo de 24h não houve alteração na viabilidade celular. Já no tempo de incubação de 48h, alguns peptídeos foram a causa da redução da viabilidade celular, entretanto, nenhum dos peptídeos chegou a reduzir mais de 50% da viabilidade na concentração máxima de 100  $\mu\text{M}$ . O peptídeo Hs11, o qual apresenta atividade considerável como antimicrobiano, não foi citotóxico nas concentrações testadas. Esta baixa citotoxicidade é interessante, pois o MIC do Hs11 encontra-se em valores de 8  $\mu\text{M}$  para *P. aeruginosa*, bactéria Gram-negativa, e 16  $\mu\text{M}$  para *S. aureus*, Gram-positiva. Estas concentrações são 6x menores do que a maior concentração testada aqui neste ensaio, de 100  $\mu\text{M}$ , demonstrando uma boa janela terapêutica para este peptídeo.

#### **5.7. QUANTIFICAÇÃO DE CORPUSCULOS LIPÍDICOS EM BMDM APÓS TRATAMENTO COM PEPTÍDEOS**

Os corpúsculos lipídicos (CL) são organelas celulares, usadas na literatura como marcadores de ativação celular e estão intrinsecamente ligados a resposta imunológica e inflamatória (Bozza et al., 2009). A avaliação da modulação da biogênese destas organelas serve para compreender o estabelecimento do estado inflamatório local (Bozza et al., 2009). Para isso, foi analisado por sonda fluorescente Bodipy 493/503 (Life technologies), que consegue marcar lipídios neutros presentes nos CL, o comportamento de BMDM a partir da adição dos peptídeos Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 e HsCtrl1 na concentração de 1  $\mu\text{M}$ . Também foi analisado o comportamento das células aos serem estimuladas com 500 ng/mL de LPS e posteriormente tratados com cada peptídeo a 1  $\mu\text{M}$ . E assim, realizar um simulador do comportamento das células diante uma infecção bacteriana.

Os dados apontam que o peptídeo Hs11 (Figura 28) reduziu a biogênese de corpúsculos lipídicos em células BMDM, pois a porcentagem de células apresentando o marcador Bodipy diminuiu, mesmo quando comparados às amostras não estimuladas. Ao ser adicionado após o período de incubação de BMDM por 4h com LPS, o Hs11 também provocou uma redução da biogênese de corpúsculos lipídicos, sendo de 30,4 a média de intensidade de

fluorescência para células estimuladas com LPS e indo para 19,5 após tratamento com o Hs11. Esta ação também é observada no gráfico tipo dotplot, onde se observa uma redução da porcentagem de células positivas para a fluorescência de Bodipy dentro do quadrante ao se adicionar o peptídeo nas células não estimuladas e também após o estímulo de LPS, correspondendo a 29% e 51% respectivamente. Indicando uma atividade anti-inflamatória desse peptídeo.

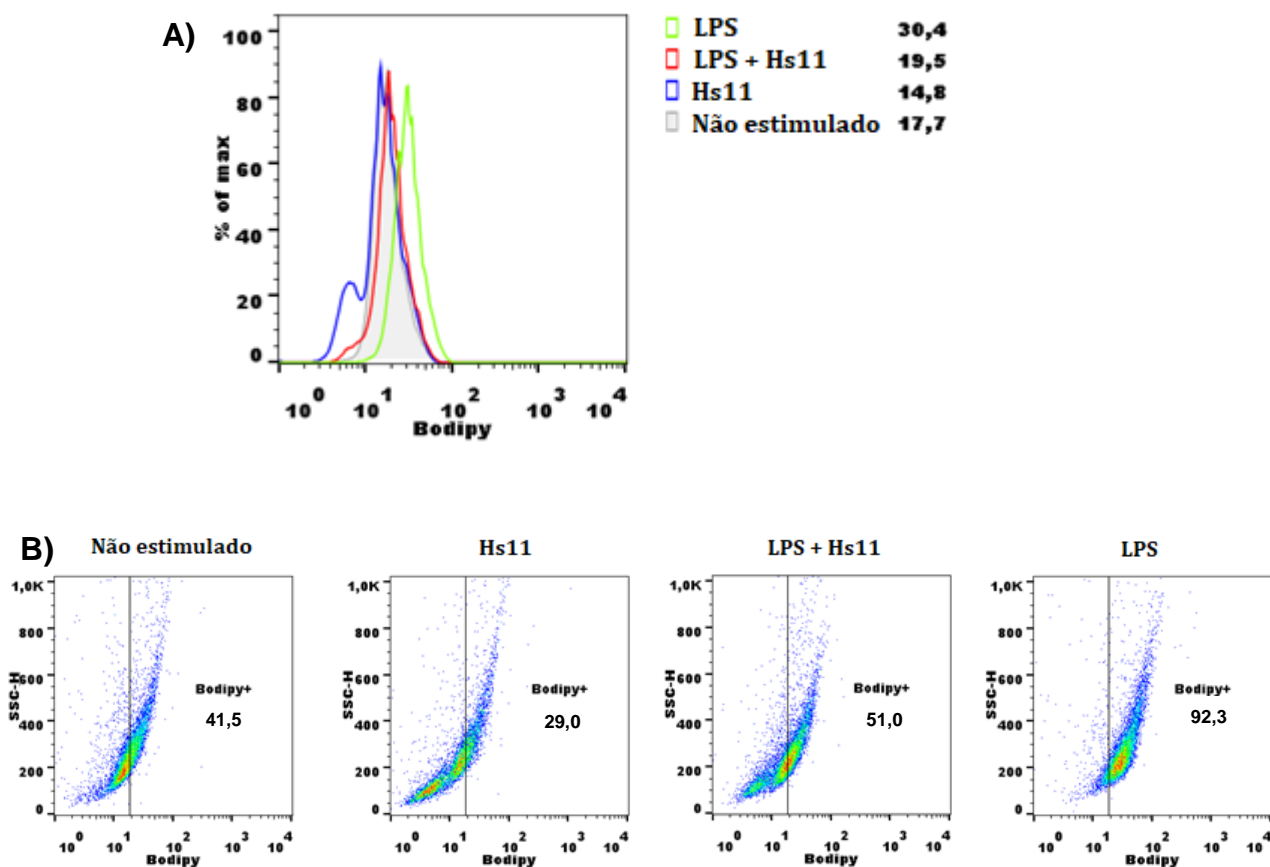


Figura 28 - Análise do efeito do peptídeo Hs11 na indução da biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos por Bodipy A) histograma em relação ao percentual da média de células B) Representação do tipo Dotplot

Já o peptídeo Hs12 (figura 29) não alterou a biogênese de corpúsculos quando adicionado aos BMDM em relação a células não estimuladas, permanecendo em 17 a média de intensidade de fluorescência. Porém, ao ser adicionado após o período de incubação de 4h de BMDM com LPS, levou a uma redução da intensidade média dos corpúsculos lipídicos de 30,4 para 21,5,

ou na representação de dotplot, diminuindo de 92,3% para 65,3%. Isso indica uma possível atividade anti-inflamatória desse peptídeo em células estimuladas por LPS.

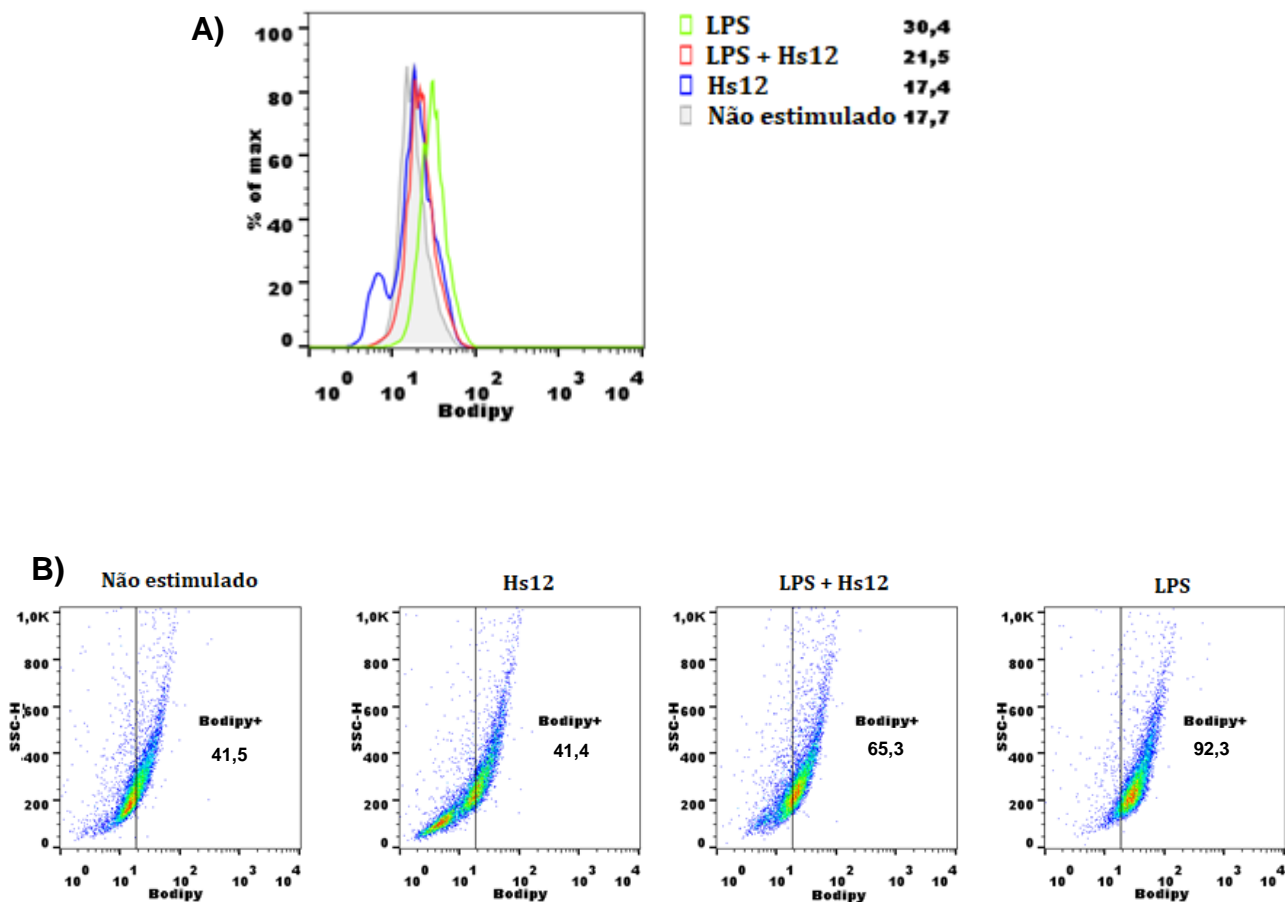


Figura 29 - Análise do efeito do peptídeo Hs12 na indução da biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos por Bodipy A) histograma em relação ao percentual da média de células B) Representação do tipo Dotplot

O peptídeo Hs13 (figura 30) induziu um leve aumento na biogênese de corpúsculos quando avaliado individualmente. A média de intensidade de fluorescência de CL que incorporaram o bodipy era de 17,7 e foi para 24,5. E destas, dentro do dotplot, observa-se um aumento de 41,5% para 73,8%. Entretanto, a adição do peptídeo após o período de incubação de 4h com LPS, causou uma redução da biogênese de corpúsculos lipídicos. Isso indica que este peptídeo também apresenta um potencial anti-inflamatório.

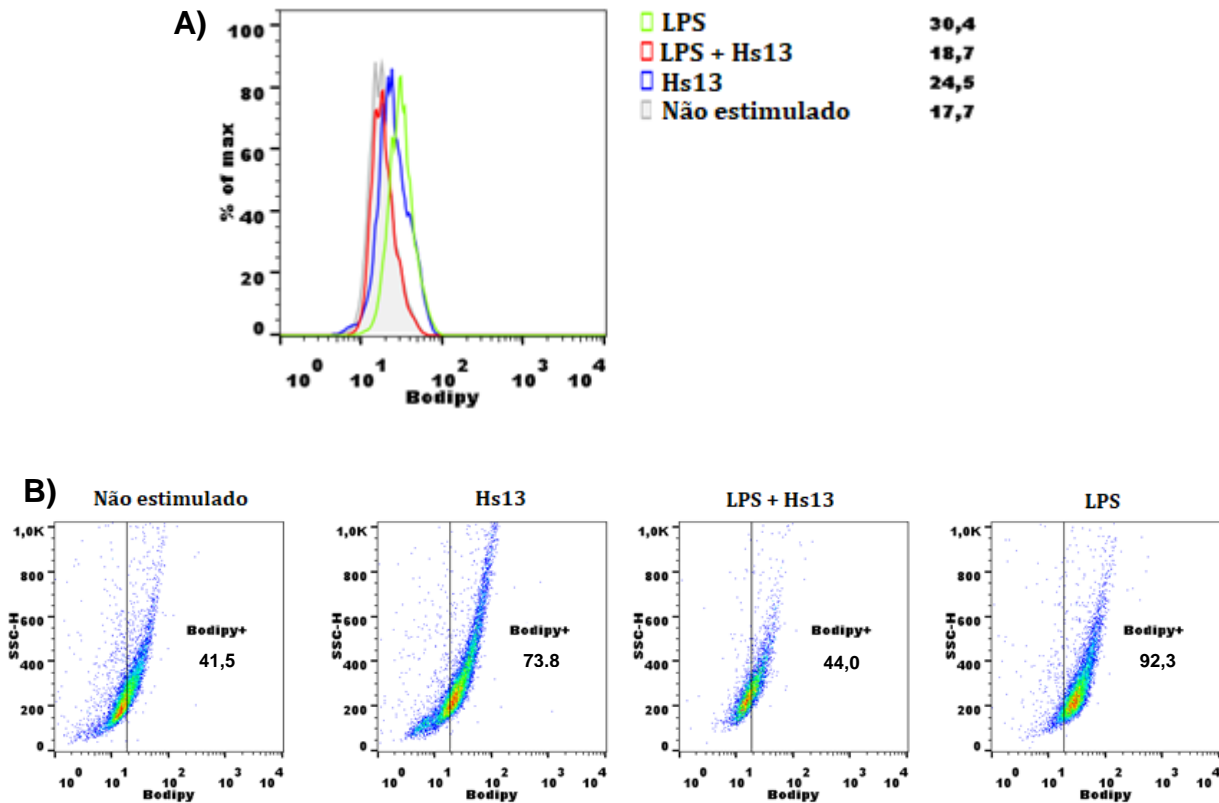


Figura 30 - Análise do efeito do peptídeo Hs13 na indução da biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos por Bodipy A) histograma em relação ao percentual da média de células B) Representação do tipo Dotplot

O peptídeo Hs14 (figura 31) não alterou a biogênese de corpúsculos lipídicos de maneira significativa quanto testado sozinho, diminuindo a média de fluorescência apenas de 17,7 para 16, ou em relação ao dotplot, de 41,5% para 34,1%. Porém, ao ser adicionado após o período de incubação de 4h com LPS, o Hs14 também levou uma redução da biogênese. Indicando uma atividade anti-inflamatória deste peptídeo.

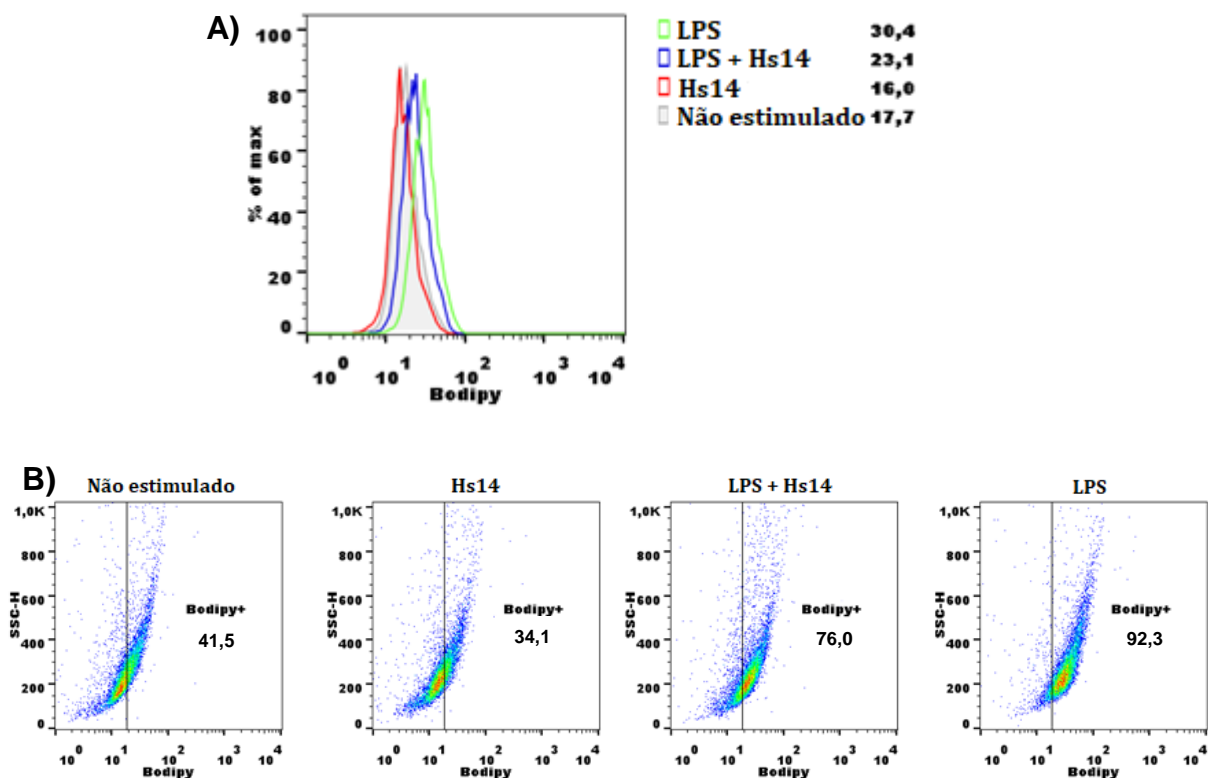


Figura 31 - Análise do efeito do peptídeo Hs14 na indução da biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos por Bodipy A) histograma em relação ao percentual da média de células B) Representação do tipo Dotplot;

O peptídeo controle (figura 32), HsCtrl1, não apresentou indução na biogênese de corpúsculos lipídicos, e reduziu levemente a biogênese em relação as células não estimuladas. Porém, ao ser adicionado após o período de incubação de 4h com LPS, ele também levou uma redução da biogênese, diminuindo a média intensidade de fluorescência de 30,4 para 23,7. Contudo, em relação ao gating, a redução foi a menor dentre as moléculas testadas, de 92,3% para 76,0%. Indicando uma possível atividade anti-inflamatória deste peptídeo também.

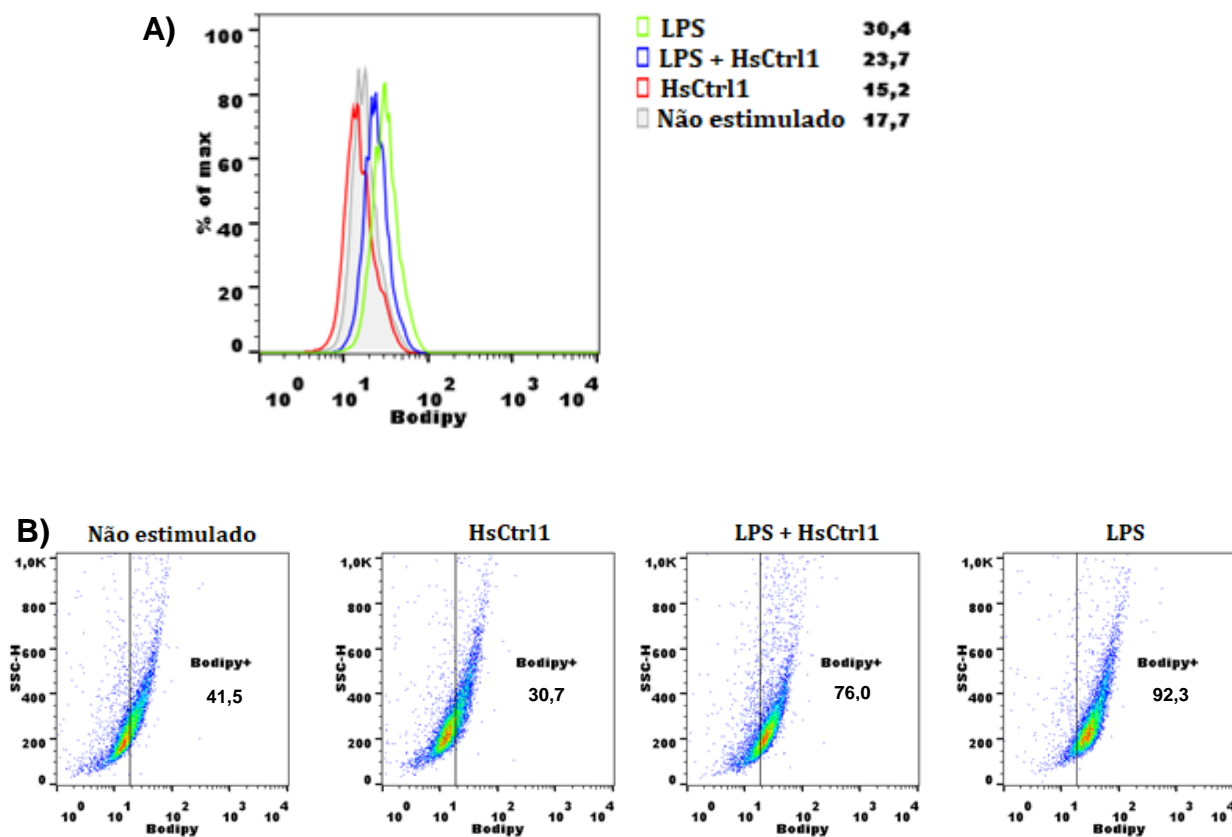


Figura 32 - Análise do efeito do peptídeo HsCtrl1 na indução da biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos por Bodipy A) histograma em relação ao percentual de média de células B) Representação do tipo Dotplot

Todos os peptídeos diminuíram a biogênese de corpúsculos lipídicos ao serem adicionados após o estímulo com LPS. Ou seja, os peptídeos conseguem reduzir os níveis inflamatórios induzidos previamente pelo LPS. As células estimuladas com LPS e tratadas com os peptídeos Hs14 e HsCtrl1 foram, contudo, aquelas que apresentaram menor redução na intensidade de fluorescência de Bodipy após tratamento. Sendo assim, essas foram as moléculas que apresentaram o menor efeito na redução da biogênese de CL em células induzidas. Tomando esses dados como referência, Hs11 e Hs13 foram os mais efetivos na redução da formação de corpúsculos lipídicos induzida por LPS. Entretanto, estes dados são indicativos e devem ser confrontados com outros, advindos de outras técnicas, como a dosagem de citocinas nesse mesmo modelo celular.

## **5.8. DOSAGEM DE CITOCINAS EM BMDM TRATADOS COM OS PEPTÍDEOS E ESTIMULADOS COM LPS**

A fim de investigar a capacidade anti-inflamatória dos peptídeos Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 e HsCtrl1, foi verificado como os BMDM se comportam ao serem tratados com estes peptídeos antes e após estímulo com LPS. Para isso, analisou-se a secreção de algumas citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- $\alpha$ . Assim, os BMDM foram plaqueados e incubados com os peptídeos a uma concentração fixa de 1  $\mu$ M e os resultados foram comparados com aqueles obtidos para células estimuladas com 500 ng/mL de LPS. Em seguida, foi coletado o sobrenadante livre de células e foi dosada a quantidade de citocinas presentes pela técnica de ELISA.

Os dados demonstraram que os peptídeos Hs11, Hs12, Hs13 e Hs14 reduziram a secreção de TNF- $\alpha$  (figura 33-A) e IL-6 (figura 33-B) em BMDM quando comparados a células não estimuladas (NE). Contudo, o peptídeo HsCtrl1, sendo o peptídeo controle, não apresentou modulação da secreção das citocinas, pois o tratamento de células com esta molécula apresentou quantidade de citocinas comparável as células não estimuladas.

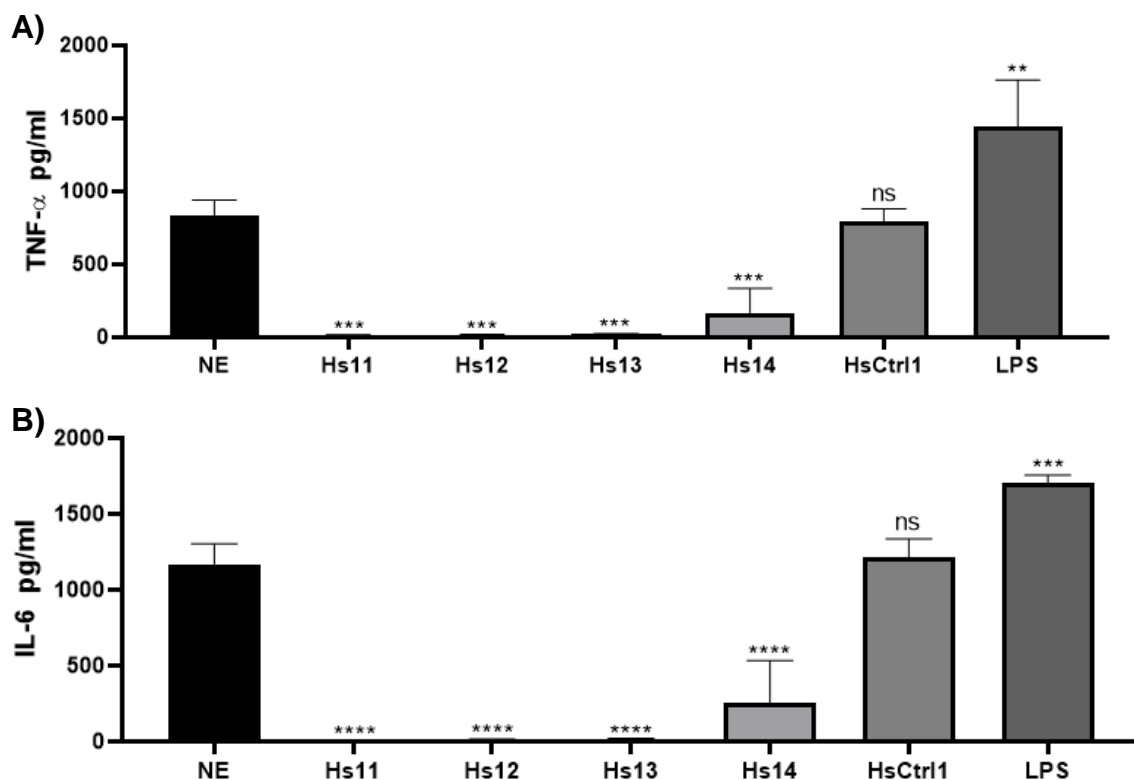


Figura 33 - A Análise da modulação da secreção de citocinas de macrófagos murinos por ELISA, após incubação com os peptídeos Hs11, Hs12, Hs13, Hs14 e HsCtrl1, e com LPS. Dosagem de A) TNF-  $\alpha$  e B) IL-6; NE corresponde a células não estimuladas, ou seja, livre de peptídeo ou LPS; Os asteriscos (\*\*), (\*\*\*) e (\*\*\*\*) correspondem a  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente; ns corresponde a não significativo; A significância disposta sobre as barras é relativa a testes versus o grupo NE.

Neste primeiro resultado é possível verificar a ação pró-inflamatória do LPS, pois este macrolipídio, ao estimular os BMDM, aumentou a secreção das citocinas analisadas. Já os peptídeos Hs11, Hs12, Hs13 e Hs14 reduziram a secreção de citocinas no meio ao entrarem em contato com as células BMDM mesmo sem estímulo com LPS, reduzindo o nível basal de liberação de citocinas. O peptídeo Hs11 demonstrou ter o melhor potencial para ação anti-inflamatória, sendo o que mais reduziu TNF- $\alpha$  e IL-6. Já o peptídeo Hs14 teve o menor efeito de redução na secreção das citocinas avaliadas, entretanto, ainda apresentando uma quantidade de citocinas significativamente menor que a observada em células não estimuladas. O peptídeo HsCtrl1 não modulou a quantidade da citocinas avaliadas, como esperado.

Em seguida, foi verificada como é a secreção de mediadores pro-inflamatórios, TNF- $\alpha$  e IL-6, quando células estimuladas com 500 ng/mL de LPS são tratadas com os IAPs curtos, a 1  $\mu$ M. Foram utilizados como comparativo células estimuladas com LPS, e posteriormente tratadas com o peptídeo e também a ordem contrária, contando primeiro com a incubação do peptídeo e posterior estímulo com LPS.

O peptídeo Hs11, em relação à secreção de TNF- $\alpha$  (figura 34-A), ao ser incubado com células pré-estimuladas com LPS, demonstrou efeito anti-inflamatório. Isso porque o peptídeo causou uma redução da secreção de TNF- $\alpha$  induzida por LPS ao mesmo nível que as células não estimuladas. Este dado corrobora com os resultados de quantificação de corpúsculos lipídicos, onde células estimuladas com LPS em seguida tratadas com Hs11 diminuíram a porcentagem média de CL (Figura 28). Já nas células pré-tratadas com o Hs11 e posteriormente estimuladas com LPS, houve uma secreção de citocinas um pouco maior que a observada em células não estimuladas, resultando em uma diferença não significativa em relação ao grupo somente estimulado com LPS. Em relação a IL-6 (figura 34-B), tanto em células estimuladas com LPS antes ou depois da adição do peptídeo apresentaram concentrações similares de IL-6 e estatisticamente não-significativas em relação ao grupo tratado com LPS sem adição de peptídeo.

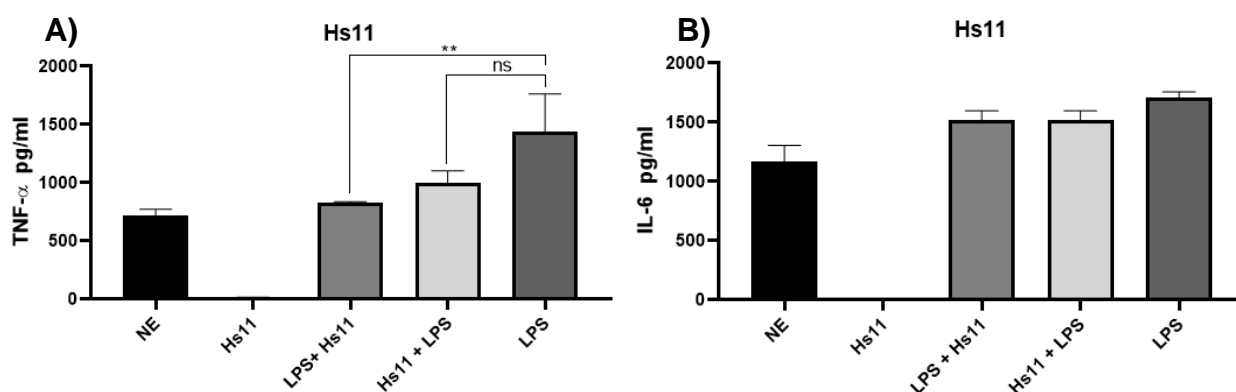


Figura 34 – Análise do efeito do peptídeo Hs11 sobre a secreção de citocinas (A) TNF- $\alpha$  e (B) IL-6 de macrófagos BMDM estimulados com LPS por ELISA. Este experimento é representativo de triplicatas. Asterisco (\*\*) representa  $P < 0,01$ ; ns corresponde a não significativo.

Os peptídeos Hs12, Hs13, Hs14 e HsCtrl1 (Figura 35) não reduziram a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-6 em BMDM estimulados com LPS, antes ou depois da

adição de peptídeo, quando comparado a células apenas estimuladas com LPS. Ou seja, nenhuma dessas moléculas apresentaram atividade anti-inflamatória significativa na concentração testada de 1  $\mu$ M.

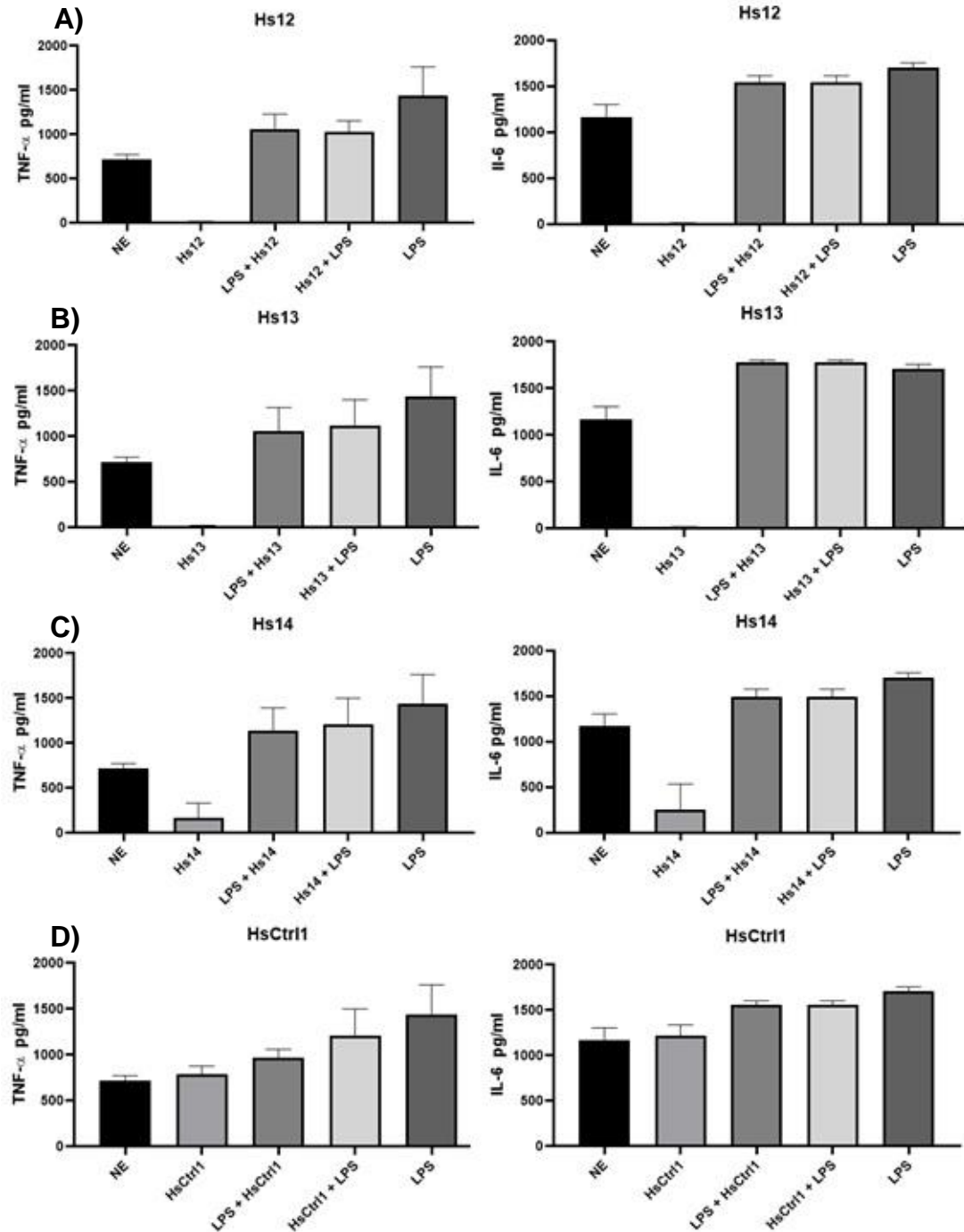


Figura 35 - Análise do efeito dos peptídeos (A)Hs12, (B)Hs13, (C)Hs14 e (D)HsCtrl1 sobre a secreção de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 de macrófagos BMDM estimulados com LPS por ELISA. Estes experimentos são representativos de triplicatas;

Em suma, somente o peptídeo Hs11 demonstrou resultados significativos na inibição de citocinas em BMDM estimulados com LPS na concentração testada. Além disso, o efeito foi observado somente para TNF- $\alpha$ , sendo que o mesmo não foi visto para IL-6. Talvez o efeito anti-inflamatório deste peptídeo esteja ligado ao mecanismo de ação do TNF- $\alpha$ , que tem como mecanismo direto a apoptose ou necrose (Horiuchi et al., 2010). Contudo, nestes ensaios de ELISA, utilizou-se uma concentração fixa de 1  $\mu$ M, uma concentração relativamente baixa, se considerar que o efeito de MIC para este peptídeo a partir de 8  $\mu$ M. Como comparativo, temos o AIP-6 (estrutura primária: RLRWR), um peptídeo pequeno que foi desenhado para suprimir inflamação a partir da inibição da sinalização de NF- $\kappa$ B (Wang et al., 2009). Esta molécula, em um ensaio utilizando macrófagos estimulados com zimosan, começou a demonstrar efeito significativo na diminuição da secreção de TNF- $\alpha$  a partir de 15  $\mu$ mol/L (Wang et al., 2009). Esta concentração é 10x maior do que a utilizada nos ensaios aqui descritos com os IAPs curtos. Logo, novos testes utilizando concentrações mais altas destes peptídeos serão capazes de confirmar o efeito de supressão de inflamação gerada por LPS observada para Hs11 e indicar o real potencial dessas moléculas como agentes anti-inflamatórios.

### **5.9. AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA INTERAÇÃO DO PEPTÍDEO HS11 COM LIPOPOLISSACARÍDEOS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

Dados anteriores do grupo indicam que um dos alvos moleculares mais prováveis dos Hs IAPs são os LPS (dados submetidos para publicação). Para analisar a interação entre o peptídeo Hs11 e micelas de LPS, foram feitos ensaios de RMN com Hs11 a 2 mM e concentrações crescentes do lipídeo. Buscou-se observar as mudanças conformacionais do peptídeo em concentrações de LPS incapazes de produzir sinal intenso, assim, facilitando a interpretação do espectro. A figura 39 apresenta as regiões que correspondem a porção amídica de Hs11 em um espectro de uma dimensão com concentrações crescentes de LPS.

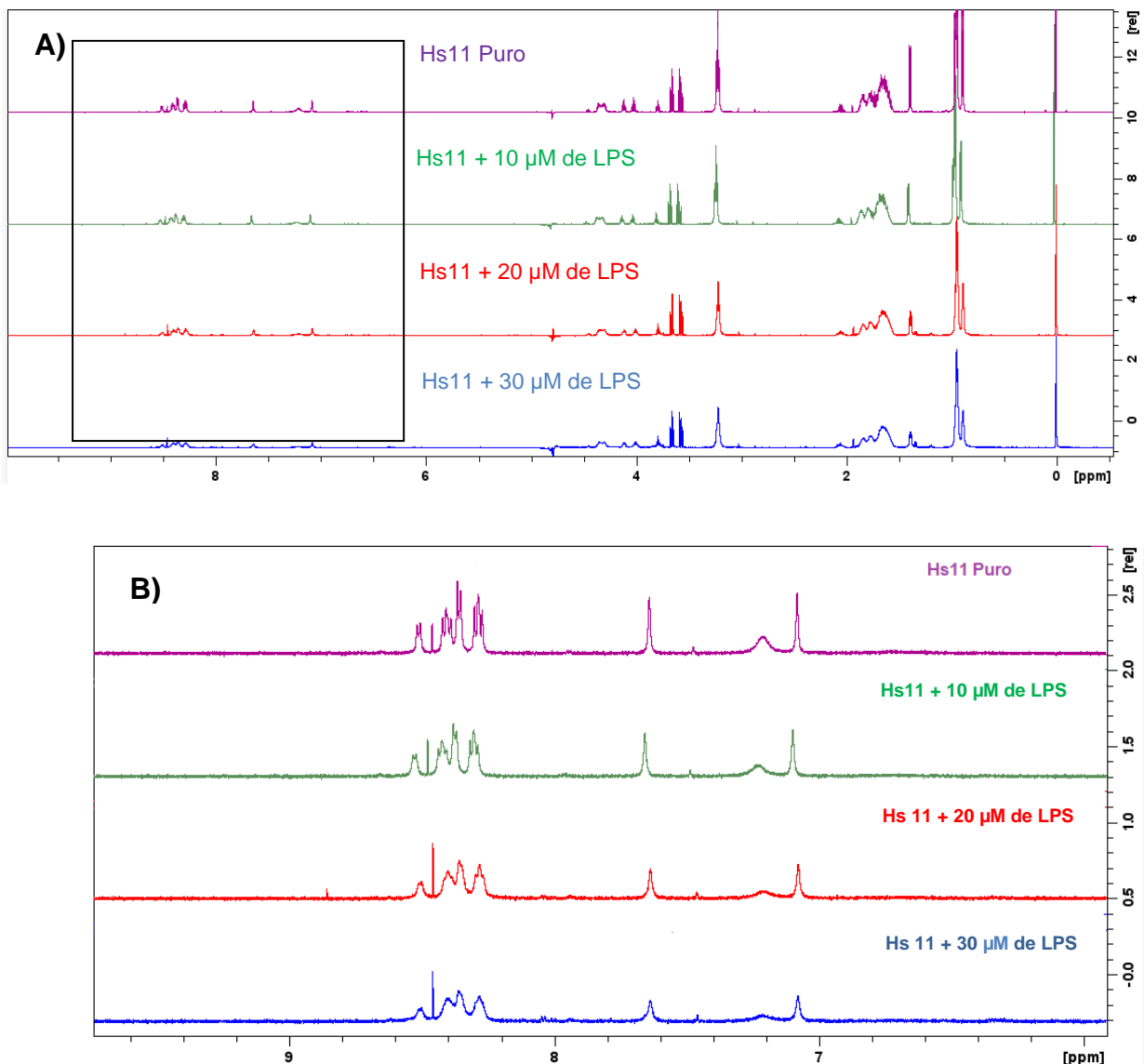


Figura 36 - Espectros de RMN de uma dimensão demonstrando a interação entre o LPS e o peptídeo Hs11 utilizando o espectrômetro Bruker Avance III HD 600 operando a 600 MHz (14 T) para  $^1\text{H}$ , a 25 °C. A) Espectros completos de uma dimensão B) Zoom nos espectros entre 10 – 6 ppm; Em roxo corresponde o espectro com o peptídeo puro a 2 mM. Em verde corresponde ao espectro de Hs11 nesta mesma concentração com 10  $\mu\text{M}$  de LPS. Em vermelho, Hs11 com 20  $\mu\text{M}$  de LPS e em azul, Hs11 com 30  $\mu\text{M}$  de LPS.

Estes dados demonstram que à medida que se aumenta a concentração de LPS, ocorre perda de resolução dos picos, o que pode ser interpretado como uma interação entre o Hs11 e os agregados de LPS. Este fenômeno, de alargamento dos picos, pode ser explicado pelas rápidas trocas conformacionais que intermediam o estado livre do peptídeo e o estado ligado

ao LPS dentro da escala de tempo de aquisição de dados de RMN (Post, 2003). Os espectros de TOCSY e NOESY, espectros bidimensionais, também foram adquiridos e estão apresentados no anexo 4. A partir deles não foi possível determinar a estruturação do peptídeo, pois poucos sinais de NOE foram observados, e apenas resíduos de aminoácidos N+1 foram observados. Assim, não foi possível verificar especificamente como é interação do Hs11 com o LPS, que se constata nos espectros de uma dimensão.

## 6. CONCLUSÃO

Seis potenciais IAPs foram selecionados dentre os peptídeos prospectados a partir do proteoma humano referência com o auxílio do software Kamal usando como molde fitas- $\beta$  catiônicas e anfifílicas. Tal padrão constitui um segundo molde para a busca de moléculas encriptadas antimicrobianas, pouco explorado na literatura. Dentre os potenciais IAPs encontrados no proteoma humano, quatro peptídeos foram sintetizados e purificados com êxito (Hs11, Hs12, Hs13 e Hs14). Também foi sintetizado um peptídeo (HsCtrl1) que foi desenhado com características físico-químicas diferentes dos demais e sintetizado para fins de comparação.

Em seguida, os peptídeos tiveram seus MICs determinados. Apenas os peptídeos Hs11 e o Hs12 apresentaram atividade antibacteriana. Estes peptídeos tiveram ação contra bactéria Gram-negativas e Gram-positivas, e seus MICs foram similares entre si e comparáveis com outras moléculas de mesmo padrão encontradas na literatura. Os demais Hs IAPs (Hs13 e Hs14) não apresentaram atividade, possivelmente pela sua menor hidrofobicidade média, o que indica que novas restrições físico-químicas podem ser impostas para aumentar o índice de acerto na predição de novas moléculas antimicrobianas de mesmo padrão em filtragens futuras. Coletivamente estes dados indicam que algumas proteínas humanas apresentam o padrão buscado em sua estrutura primária, e que uma vez sintetizados, estes apresentam potencial como agentes antimicrobianos de pequeno tamanho.

Além da atividade antimicrobiana, foi verificado que macrófagos murinos não apresentam viabilidade celular reduzida após incubação por 24h com os Hs IAPs testados. Esse dado indica uma baixa citotoxicidade para estes IAPs curtos. O peptídeo Hs11 foi o que demonstrou ter a melhor janela terapêutica, pois não foi citotóxico nas concentrações testadas independente do tempo de incubação, 24 ou 48h.

A ação anti-inflamatória dos Hs IAPs curtos aqui descritos foi também avaliada a partir da análise de mediadores pró-inflamatórios secretados por macrófagos murinos estimulados com LPS. Primeiro, com o ensaio de Bodipy, foi possível constatar uma redução da atividade pró-inflamatória do LPS nas células BMDM ao serem tratadas com os peptídeos, pois todos os IAPs

diminuíram a biogênese de corpúsculos lipídicos. O Hs11 e o Hs13 foram os mais efetivos na redução da formação de corpúsculos. Já o Hs14 e o HsCtrl1 foram os que tiveram menor redução na intensidade de fluorescência de Bodipy. Subsequentemente, foi mensurada a quantidade de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 usando o mesmo modelo experimental. Em células não estimuladas, verificou-se que os peptídeos Hs11, Hs12, Hs13 e Hs14 reduzem a liberação das citocinas já em seu nível basal, indicando ação anti-inflamatória mesmo sem indução de inflamação. Contudo, em BMDM pré-estimulados com LPS, somente o peptídeo Hs11 apresentou, na concentração de 1  $\mu$ M, atividade anti-inflamatória significativa. Novos ensaios, utilizando concentrações mais altas dos peptídeos, serão feitos para verificar o efeito do Hs11 e melhor caracterizar o potencial anti-inflamatório dessas moléculas no modelo proposto.

Por fim, foi avaliado por RMN se existem evidências da interação do peptídeo Hs11 com agregados de LPS. Os espectros mostraram o alargamento dos picos a medida que se aumenta a concentração de LPS, indicando interação direta. Entretanto, os dados de NOESY e TOCSY demonstraram poucos sinais, e assim, não foi possível verificar especificamente como é a estrutura do peptídeo Hs11 ao interagir com agregados de LPS.

Em suma, o presente trabalho demonstra um novo molde para a busca de peptídeos intragênicos em proteínas, usando como base a estrutura de fitas- $\beta$ . Estes peptídeos apresentam um custo-benefício favorável, pois apresentam até 9 resíduos de aminoácidos, sendo menores que grande parte dos peptídeos antimicrobianos  $\alpha$ -helicoidais. Além disso, os IAPs curtos aqui descritos apresentaram atividade antimicrobiana, baixa citotoxicidade e ação anti-inflamatória. Conclui-se que estas moléculas, em especial o peptídeo Hs11, são potenciais alternativas farmacológicas no combate a microrganismos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Afacan, N. J., Yeung, A. T. Y., Pena, O. M., & Hancock, R. E. W. (2012). *Therapeutic Potential of Host Defense Peptides in Antibiotic-resistant Infections*. 807–819.
- Allende, D., & McIntosh, T. J. (2003). *Lipopolysaccharides in Bacterial Membranes Act like Cholesterol in Eukaryotic Plasma Membranes in Providing Protection against Melittin-Induced Bilayer Lysis* †. 2, 1101–1108.
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2016). Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*, 26, 43–57. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.04.002>
- Bessa, L. J., Manickchand, J. R., Eaton, P., Leite, J. R. S. A., Brand, G. D., & Gameiro, P. (2019). Intragenic antimicrobial peptide Hs02 hampers the proliferation of single-and dual-species biofilms of *P. Aeruginosa* and *S. aureus*: A promising agent for mitigation of biofilm-associated infections. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 8–10. <https://doi.org/10.3390/ijms20143604>
- Blom, T. S., Koivusalo, M., Kuismanen, E., Kostianen, R., Somerharju, P., & Ikonen, E. (2001). *Mass Spectrometric Analysis Reveals an Increase in Plasma Membrane Polyunsaturated Phospholipid Species upon Cellular Cholesterol Loading* †. 14635–14644.
- Bozza, P. T., Magalhães, K. G., & Weller, P. F. (2009). Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 540–551. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2009.01.005>
- Brand, G. D., Magalhães, M. T. Q., Tinoco, M. L. P., Aragão, F. J. L., Nicoli, J., Kelly, S. M., Cooper, A., & Bloch, C. (2012). Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045848>
- Brand, G D, Ramada, M. H. S., & Jr, C. B. (2018). Towards an experimental classification system for membrane active peptides. *Scientific Reports*, January, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19566-w>
- Brand, Guilherme D., Ramada, M. H. S., Manickchand, J. R., Correa, R., Ribeiro, D. J. S., Santos, M. A., Vasconcelos, A. G., Abrão, F. Y., Prates, M. V., Murad, A. M., Cardozo, J. L., Leite, J. R. S. A., Magalhães, K. G., Oliveira, A. L., & Bloch, C. (2019). Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. *PLoS ONE*, 14(8), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220656>
- Brand, Guilherme D, Leite, J. R. S. A., Silva, L. P., Albuquerque, S., Prates, V., Azevedo, R. B., Silva, J. S., Sá, V. C. L., Brandão, R. A., Bloch, C., Brand, G. D., Leite, R. S. A., Silva, L. P., Prates, M. V, Azevedo, R. B., Carregaro, V., Silva, S., Branda, R. A., & Gene, R. (2002). *PROTEIN STRUCTURE*

*AND FOLDING : Dermaseptins from Phyllomedusa oreades and Phyllomedusa distincta : ACTIVITY WITHOUT CYTOTOXICITY Dermaseptins from Phyllomedusa oreades and Phyllomedusa distincta.*  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209289200>

- Branden, C., & Tooze, J. (1999). *Introduction to Protein Structure* (2nd ed.). Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
- Breukink, E., & Kruij, B. De. (1999). *The lantibiotic nisin , a special case or not ?* 1462, 223–234.
- Brock, T. D., Madigan, M. T., & Martinko, J. M. (2015). *Brock biology of microorganisms*.
- Brogden, K. A. (2005). *ANTIMICROBIAL PEPTIDES : PORE FORMERS OR METABOLIC INHIBITORS IN BACTERIA ?* 3(February), 238–250.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Charles, S., Medical, T., & Scotia, N. (2006). *Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer.* 933–946.
- Cheng, G., Montero, A., Gastaminza, P., Whitten-Bauer, C., Wieland, S. F., Isogawa, M., Fredericksen, B., Selvarajah, S., Gallay, P. A., Ghadiri, M. R., & Chisari, F. V. (2008). A virocidal amphipathic  $\alpha$ -helical peptide that inhibits hepatitis C virus infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 3088–3093.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0712380105>
- Claridge, T. D. W. (2016). *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry* (3rd editio).
- Conchillo-Solé, O., de Groot, N. S., Avilés, F. X., Vendrell, J., Daura, X., & Ventura, S. (2007). AGGRESKAN: A server for the prediction and evaluation of “hot spots” of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-65>
- D’Avila, H., Maya-Monteiro, C. M., & Bozza, P. T. (2008). Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *International Immunopharmacology*, 8(10), 1308–1315.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.01.035>
- Dadar, M., Shahali, Y., Chakraborty, S., Prasad, M., Tahoori, F., Tiwari, R., & Dhama, K. (2019). Antiinflammatory peptides: current knowledge and promising prospects. *Inflammation Research*, 68(2), 125–145.  
<https://doi.org/10.1007/s00011-018-1208-x>
- Dathe, Margitta, & Wieprechet, T. (1999). *Structural features of helical antimicrobial peptides : their potential to modulate activity on model membranes and biological cells.* 1462, 71–87.
- Dathe, Margitta, Wieprecht, T., Nikolenko, H., Handel, L., Maloy, W. L., Macdonald, D. L., Beyermann, M., & Bienert, M. (1997). Hydrophobicity , hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS*

- Letters*, 403(2), 208–212. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00055-0)
- de Sá, L. G. G. (2018). *PROSPECÇÃO, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE PEPTÍDEOS INTRAGÊNICOS ANTIMICROBIANOS NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS*.
- Dennison, S. R., Wallace, J., Harris, F., & Phoenix, D. A. (2005). *Amphiphilic  $\alpha$  - Helical Antimicrobial Peptides and Their Structure / Function Relationships*. 31–39.
- dos Santos, M. A. (2022). *Síntese e determinação da estrutura de peptídeos antimicrobianos intragênicos de proteínas humanas*. Universidade de Brasília.
- Drin, G., & Antony, B. (2010). Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Letters*, 584(9), 1840–1847. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.022>
- Ehrenstein, G., & Lecar, H. (1977). *Electrically gated ionic channels in lipid bilayers*.
- Eisenberg, D. (1984). *THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF MEMBRANE AND SURFACE PROTEINS David Eisenberg*. 595–623.
- Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *BBA - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.018>
- Freire, M. C. L. C., Noske, G. D., Bitencourt, N. V., Sanches, P. R. S., Santos-Filho, N. A., Gawriljuk, V. O., de Souza, E. P., Nogueira, V. H. R., de Godoy, M. O., Nakamura, A. M., Fernandes, R. S., Godoy, A. S., Juliano, M. A., Peres, B. M., Barbosa, C. G., Moraes, C. B., Freitas-Junior, L. H. G., Cilli, E. M., Guido, R. V. C., & Oliva, G. (2021). Non-toxic dimeric peptides derived from the bothropstoxin-I are potent SARS-CoV-2 and papain-like protease inhibitors. *Molecules*, 26(16), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules26164896>
- Gaidukov, L., Fish, A., & Mor, A. (2003). *Analysis of Membrane-Binding Properties of Dermaseptin Analogues : Relationships between Binding and Cytotoxicity †*. 12866–12874.
- Gallo, M. H., & Braff, R. L. (2006). *Antimicrobial Peptides : An Essential Component of the Skin Defensive Barrier*. 91–110.
- Gennis, R. B. (1989). *Biomembranes: Molecular Structure and Function* (1 ed.). Springer-Verlag New York.
- Ghosh, A., Bera, S., Shai, Y., Luisa, M., & Bhunia, A. (2016). NMR structure and binding of esculentin-1a ( 1 – 21 ) NH 2 and its diastereomer to lipopolysaccharide : Correlation with biological functions. *BBA - Biomembranes*, 1858(4), 800–812. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.027>
- Ghosh, P. K. (2016). *Introduction to Protein Mass Spectrometry*.

- Giuliani, A., Pirri, G., & Rinaldi, A. C. (2010). *Antimicrobial Peptides : The LPS Connection*. 1. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-594-1>
- Goulding, J., & London, I. C. (n.d.). *Viruses : Introduction*. 120.
- Grela, E., Koz, J., & Grabowiecka, A. (2018). Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochemica, March*. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>
- Hancock, R. E. W., Nijnik, A., & Philpott, D. J. (2012). Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nature Publishing Group, 10(4)*, 243–254. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2745>
- Haney, E. F., & Hancock, R. B. E. W. (2013). Peptide Design Applications for Antimicrobial and Immunomodulatory. *Biopolymers: Peptide Science: Peptide Science*. <https://doi.org/10.1002/bip.22250>
- Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2009). NMR of Antimicrobial Peptides. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy* (1st ed., Vol. 65, Issue 08). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(08\)00201-9](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(08)00201-9)
- Håversen, L., Ohlsson, B. G., Hahn-Zoric, M., Hanson, L. Å., & Mattsby-Baltzer, I. (2002). Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF- $\kappa$ B. *Cellular Immunology, 220(2)*, 83–95. [https://doi.org/10.1016/S0008-8749\(03\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0008-8749(03)00006-6)
- Hilchie, A. L., Wuerth, K., & Hancock, R. E. W. (2013). Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nature Publishing Group, 9(12)*, 761–768. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1393>
- Hill, J., & Chia, C. S. B. (2015). *A Head-to-Head Comparison of the Antimicrobial Activities of 30 Ultra-Short Antimicrobial Peptides Against Staphylococcus aureus , Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans*. 21–28. <https://doi.org/10.1007/s10989-014-9440-x>
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S. I., Tsukamoto, H., & Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- $\alpha$ : Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology, 49(7)*, 1215–1228. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X., Xu, W., & Liu, S. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein : potential antivirus drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica, July*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Huenges, M., Kessler, H., & Universita, T. (2017). Structural Chemistry Using NMR Spectroscopy , Peptides. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (3rd ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00295-8>
- Hyldahl, R. D., Schwartz, L. M., & Clarkson, P. M. (2013). NF-KB activity functions in primary pericytes in a cell- and non-cell-autonomous manner to affect myotube formation. *Muscle and Nerve, 47(4)*, 522–531. <https://doi.org/10.1002/mus.23640>

- Inohara, N., & Nuñez, G. (2003). NODS: Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature Reviews Immunology*, 3(5), 371–382. <https://doi.org/10.1038/nri1086>
- Ivanova, P. T., Myers, D. S., Milne, S. B., McClaren, J. L., Thomas, P. G., & Brown, H. A. (2016). Lipid Composition of the Viral Envelope of Three Strains of Influenza Virus - Not All Viruses Are Created Equal. *ACS Infectious Diseases*, 1(9), 435–442. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00040>
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R. E. W., Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). *Peptide Antimicrobial Agents*. 19(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jung, Y., Kong, B., Moon, S., Yu, S. H., Chung, J., Ban, C., Chung, W. J., Kim, S. G., & Kweon, D. H. (2019). Envelope-deforming antiviral peptide derived from influenza virus M2 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 517(3), 507–512. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.088>
- Kang, H. K., Kim, C., Seo, C. H., & Park, Y. (2017). The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *Journal of Microbiology*, 55(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6452-1>
- Kirschenbaum, D. M. (1979). *MOLAR ABSORPTIVITY AND A1% 1cm VALUES PROTEINS AT SELECTED WAVELENGTHS THE ULTRAVIOLET REGIONS*.
- Kobayashi, S., Chikushi, A., Tougu, S., Imura, Y., Nishida, M., & Yano, Y. (2004). *Membrane Translocation Mechanism of the Antimicrobial Peptide Buforin 2* †. 15610–15616.
- Koehbach, J., & Craik, D. J. (2019). The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(7), 517–528. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.04.012>
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). *AMPed up immunity : how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense*. February. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.12.003>
- Lee, T., Hall, K. N., & Aguilar, M. (2016). *Antimicrobial Peptide Structure and Mechanism of Action : A Focus on the Role of Membrane Structure*. 25–39.
- Li, Q., Zhao, Z., Zhou, D., Chen, Y., Hong, W., Cao, L., Yang, J., Zhang, Y., Shi, W., Cao, Z., Wu, Y., Yan, H., & Li, W. (2011). Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses. *Peptides*, 32(7), 1518–1525. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.05.015>

- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Peptides Overview on the recent study of antimicrobial peptides : Origins , functions , relative mechanisms and application. *Peptides*, 37(2), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>
- Lucas, L. H., & Larive, C. K. (2004). *Measuring Ligand-Protein Binding Using NMR Diffusion Experiments*. 24–41. <https://doi.org/10.1002/cmr.a.10094>
- Machado, A., Liria, C. W., Proti, P. B., Remuzgo, C., Terêsa, M., Bioquímica, D. De, Química, I. De, Paulo, U. D. S., Prof, A., & Prestes, L. (2004). *SÍNTESES QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE PEPTÍDEOS: PRINCÍPIOS BÁSICOS E APLICAÇÕES*. 27(5), 781–789.
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(DEC), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Mariano, G. H., Sá, L. G. G. De, Carmo, E. M., Santos, M. A., Fh, J. L. C., Lira, B. O. V, Barbosa, E. A., Araujo, A. R., Leite, J. R. S. A., Ramada, M. H. S., & Jr, C. B. (2021). Characterization of novel human intragenic antimicrobial peptides , incorporation and release studies from ureasil-polyether hybrid matrix. *Materials Science & Engineering C*, 119(July 2020), 111581. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111581>
- Matsuzaki, K., Sugishita, K., Ishibe, N., Ueha, M., Nakata, S., Miyajima, K., & V, M. U. (1998). *Relationship of Membrane Curvature to the Formation of Pores by Magainin 2 †*. 2960(98), 11856–11863.
- Mishra, B., Reiling, S., Zarena, D., & Wang, G. (2017). Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies. *Current Opinion in Chemical Biology*, 38, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.014>
- Nelson, David L. ; Cox, M. M. (2014). Princípios de Bioquímica de Lehninger. In *Antropología ambiental* (6<sup>a</sup> ed.). Artmed. <https://doi.org/10.2307/j.ctvk8vxxm.7>
- Nguyen, L. T., Chau, J. K., Perry, N. A., Boer, L. De, Zaat, S. A. J., & Hans, J. (2010). Serum Stabilities of Short Tryptophan- and Arginine-Rich Antimicrobial Peptide Analogs. *PLoS ONE*, 5(9), 11–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012684>
- Nijnik, A., & Hancock, R. E. W. (2009). *Host defence peptides : antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections*. 1–7. <https://doi.org/10.3134/ehtj.09.001>
- Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Tagoh, H., Monden, M., Kishimoto, S., Hirano, T., & Kishimoto, T. (1989). Elevation of serum interleukin 6 prior to acute phase proteins on the inflammation by surgical operation. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 50(3), 399–401. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(89\)90147-5](https://doi.org/10.1016/0090-1229(89)90147-5)

- Ong, Z. Y., Gao, S. J., & Yang, Y. Y. (2013). Short synthetic  $\beta$ -sheet forming peptide amphiphiles as broad spectrum antimicrobials with antibiofilm and endotoxin neutralizing capabilities. *Advanced Functional Materials*, 23(29), 3682–3692. <https://doi.org/10.1002/adfm.201202850>
- Ong, Z. Y., Wiradharma, N., & Yang, Y. Y. (2014). Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 78, 28–45. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.013>
- Oshiro, K. G. N., Porto, W. F., Ribeiro, S. M., Haney, E. F., Hancock, R. E. W., Lu, T. K., Fuente-nunez, C. De, Craik, D. J., & Mo, S. (2019). *Short Cationic Peptide Derived from Archaea with Dual Antibacterial Properties and Anti-Infective Potential* ^: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00073>
- Pane, K., Durante, L., Crescenzi, O., Cafaro, V., Pizzo, E., Varcamonti, M., Zanfardino, A., Izzo, V., Di Donato, A., & Notomista, E. (2017). Antimicrobial potency of cationic antimicrobial peptides can be predicted from their amino acid composition: Application to the detection of “cryptic” antimicrobial peptides. *Journal of Theoretical Biology*, 419, 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.012>
- Papo, N., & Shai, Y. (2004). *Articles Effect of Drastic Sequence Alteration and D -Amino Acid Incorporation on the Membrane Binding Behavior of Lytic Peptides* †. 6393–6403.
- Patrzykat, A., Friedrich, C. L., Zhang, L., Mendoza, V., & Hancock, R. E. W. (2002). *Sublethal Concentrations of Pleurocidin-Derived Antimicrobial Peptides Inhibit Macromolecular Synthesis in Escherichia coli*. 46(3), 605–614. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.605>
- Pfalzgraff, A., Brandenburg, K., & Weindl, G. (2018). *Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds*. 9(March), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00281>
- Pires, P. V. B. da C. (2018). *DELEÇÕES SELETIVAS PARA A DETERMINAÇÃO DO TAMANHO MÍNIMO DO PEPTÍDEO HS02 COM MANUTENÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA*.
- Pletzer, D., Coleman, S. R., & Hancock, R. E. W. (2016). ScienceDirect Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Current Opinion in Microbiology*, 33, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016>
- Post, C. B. (2003). *Exchange-transferred NOE spectroscopy and bound ligand structure determination*. *Figure 1*, 581–588. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.09.012>
- Ramada, M. H. S., Brand, G. D., Abrão, F. Y., Oliveira, M., Filho, J. L. C., Galbieri, R., Gramacho, K. P., Prates, M. V., & Bloch, C. (2017). Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13685-6>
- Rosenfeld, Y., & Shai, Y. (2006). Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense

- antibacterial peptides interactions: Role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758(9), 1513–1522. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.017>
- Rotem, S., Radzishovsky, I., & Mor, A. (2006). *Physicochemical Properties That Enhance Discriminative Antibacterial Activity of Short Dermaseptin Derivatives*. 50(8), 2666–2672. <https://doi.org/10.1128/AAC.00030-06>
- Samantha Ng, S. M., Yap, J. ., Lay, Q. Y., Ng, F. ., Quan Ong, E. ., Barkham, T., Pei Teo, J. W., Alfatah, M., Kong, K. W., Hoon, S., Arumagan, P., Hill, J., & Chia, C. S. B. (2018). Structure-activity relationship studies of ultra-short peptides with potent activities against fluconazole-resistant *Candida albicans*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.027>
- Santana, E., Alves, F., & Oliveira, A. L. De. (2016). *Estudo por ressonância magnética nuclear da estrutura e interação de novos protótipos de biofármacos antimicrobianos*. UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.
- Schmidt, N. W., & Wong, G. C. L. (2013). Antimicrobial peptides and induced membrane curvature : Geometry , coordination chemistry , and molecular engineering. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 17(4), 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2013.09.004>
- Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2015). (Lipo)polysaccharide interactions of antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 449, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.11.024>
- Scopes, R. K. (1974). Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Analytical Biochemistry*, 59(1), 277–282. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(74\)90034-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(74)90034-7)
- Shai, Y. (2002). *Mode of Action of Membrane Active Antimicrobial Peptides*. 236–248.
- Shankar, Pr. (2016). Book review: Tackling drug-resistant infections globally. *Archives of Pharmacy Practice*, 7(3), 110. <https://doi.org/10.4103/2045-080x.186181>
- Silva, M. E. (2019). *AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DO PEPTÍDEO Hs02 COM LIPOPOLISSACARÍDEOS DE E. COLI POR DIFRAÇÃO DE LUZ E DICROÍSMO CIRCULAR*.
- Simm, S., Einloft, J., Mirus, O., & Schleiff, E. (2016). 50 years of amino acid hydrophobicity scales: Revisiting the capacity for peptide classification. *Biological Research*, 49(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40659-016-0092-5>
- Skinner, S. P., Benjamin, T., Boucher, W., & Tim, J. (2015). *research papers Structure calculation , refinement and validation using CcpNmr Analysis research papers*. 154–161. <https://doi.org/10.1107/S1399004714026662>
- Thakur, N., Qureshi, A., & Kumar, M. (2012). AVPpred: Collection and prediction of highly effective antiviral peptides. *Nucleic Acids Research*,

- 40(W1), 199–204. <https://doi.org/10.1093/nar/gks450>
- Tombs, M. P., Souter, F., & Maclagan, N. F. (1959). *The Spectrophotometric Determination of Protein at 210 mμ*. 73(1951), 167–171.
- Torres, M. D. T., Melo, M. C. R., Crescenzi, O., Notomista, E., & de la Fuente-Nunez, C. (2022a). Mining for encrypted peptide antibiotics in the human proteome. *Nature Biomedical Engineering*, 6(1), 67–75. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00801-1>
- Torres, M. D. T., Melo, M. C. R., Crescenzi, O., Notomista, E., & de la Fuente-Nunez, C. (2022b). Mining for encrypted peptide antibiotics in the human proteome. *Nature Biomedical Engineering*, 6(1), 67–75. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00801-1>
- Torres, M. D. T., & Sothiselvam, S. (2019). Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3547–3567. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.12.015>
- Tossi, A., Sandri, L., & Giangaspero, A. (2000). Amphipathic, α-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers - Peptide Science Section*, 55(1), 4–30. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:1<4::AID-BIP30>3.0.CO;2-M)
- Vaara, M. (2009). *New approaches in peptide antibiotics*. 571–576. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.08.002>
- Veglia, G., & Ramamoorthy, A. (2010). Special issue on “ Membrane Protein Dynamics : Correlating Structure to Function .” *BBA - Biomembranes*, 1798(2), 65–67. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.026>
- Vishnepolsky, B., Gabrielian, A., Rosenthal, A., Hurt, D. E., Tartakovsky, M., Managadze, G., Grigolava, M., Makhatadze, G. I., & Pirtskhalava, M. (2018). Predictive Model of Linear Antimicrobial Peptides Active against Gram-Negative Bacteria [Research-article]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58(5), 1141–1151. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00118>
- W. C. Chan and P. D. (2000). Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach. *Oxford University Press*.
- Wang, Y. F., Xu, X., Fan, X., Zhang, C., Wei, Q., Wang, X., Guo, W., Xing, W., Yu, J., Yan, J., & Liang, H. (2009). A Cell-penetrating Peptide Suppresses Inflammation by Inhibiting NF-κB Signaling. *Molecular Therapy*, 19(10), 1849–1857. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.82>
- Wenzel, M., Chiriac, A. I., Otto, A., Zweytick, D., May, C., Schumacher, C., Gust, R., Albada, H. B., Penkova, M., Krämer, U., Erdmann, R., Metzler-Nolte, N., Straus, S. K., Bremer, E., Becher, D., Brötz-Oesterhelt, H., Sahl, H. G., & Bandow, J. E. (2014). Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 1409–1418. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319900111>
- Willis, L. M., & Whitfield, C. (2013). Capsule and lipopolysaccharide. In

*Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis: Second Edition* (Second Edi). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397048-0.00017-6>

- Wimley, W. C. (2010). Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *American Chemical Society*, 5(10), 905–917. <https://doi.org/10.1021/cb1001558>
- Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*.
- Xhindoli, D., Pacor, S., Benincasa, M., Scocchi, M., Gennaro, R., & Tossi, A. (2015). Biochimica et Biophysica Acta The human cathelicidin LL-37 — A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *BBA - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.003>
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). *Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance*. 55(1), 27–55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2.27>
- Yibin, G., Jiang, Z., Hong, Z., Gengfa, L., Liangxi, W., Guo, W., & Yongling, L. (2005). A synthesized cationic tetradecapeptide from hornet venom kills bacteria and neutralizes lipopolysaccharide in vivo and in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 70(2), 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.04.040>
- Zhang, F. X., Kirschning, C. J., Mancinelli, R., Xu, X. P., Jin, Y., Faure, E., Mantovani, A., Rothe, M., Muzio, M., & Arditi, M. (1999). Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor- $\kappa$ B through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 7611–7614. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.7611>
- Zhang, S. K., Song, J. W., Gong, F., Li, S. B., Chang, H. Y., Xie, H. M., Gao, H. W., Tan, Y. X., & Ji, S. P. (2016). Design of an  $\alpha$ -helical antimicrobial peptide with improved cell-selective and potent anti-biofilm activity. *Scientific Reports*, 6(February), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep27394>
- Zhao, G., & London, E. (2006). An amino acid “transmembrane tendency” scale that approaches the theoretical limit to accuracy for prediction of transmembrane helices: Relationship to biological hydrophobicity. *Protein Science*, 15(8), 1987–2001. <https://doi.org/10.1110/ps.062286306>
- Zhong, G., Cheng, J., Liang, Z. C., Xu, L., Lou, W., Bao, C., Ong, Z. Y., Dong, H., Yang, Y. Y., & Fan, W. (2017). Short Synthetic  $\beta$ -Sheet Antimicrobial Peptides for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Burn Wound Infections. *Advanced Healthcare Materials*, 6(7). <https://doi.org/10.1002/adhm.201601134>

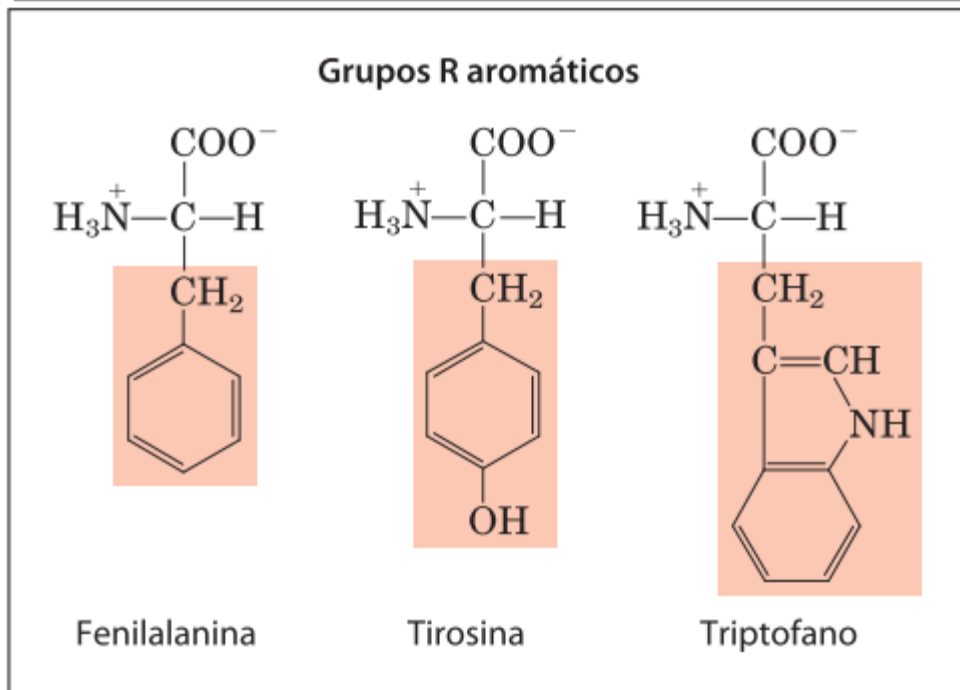
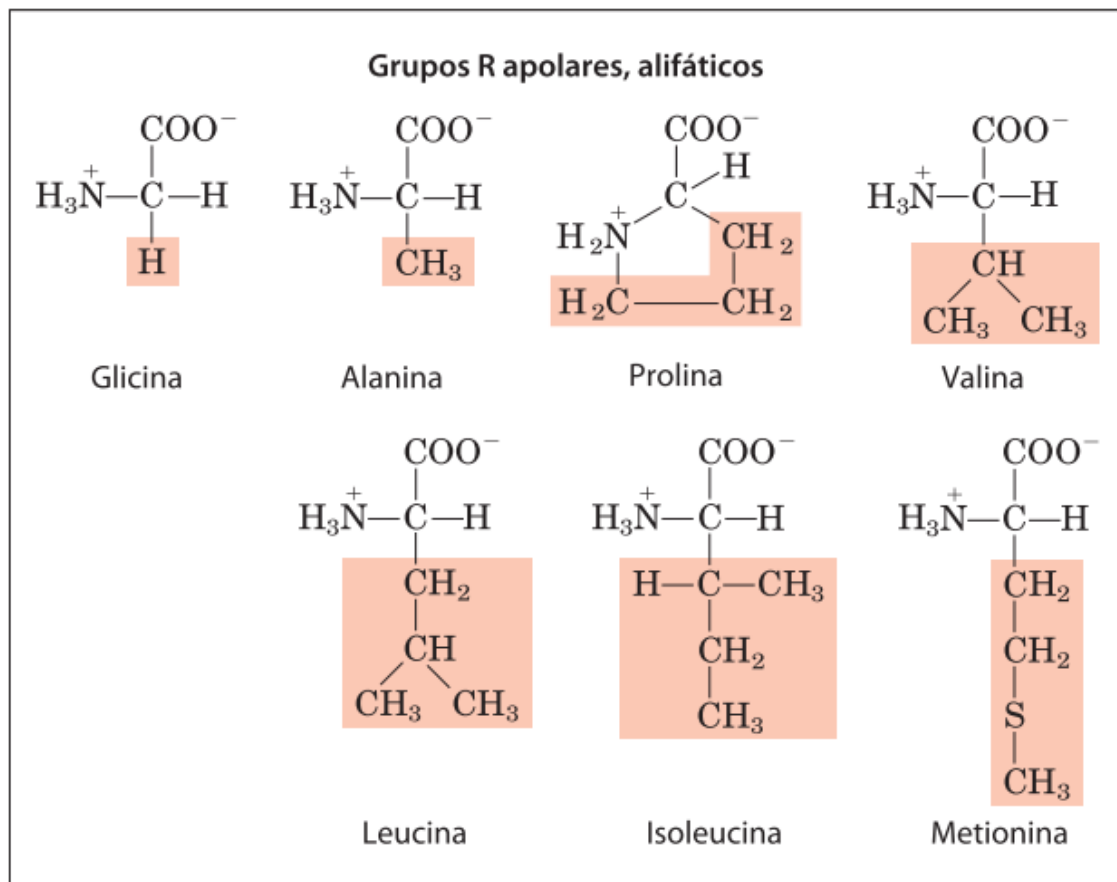
## ANEXO 1

Tabela de aminoácidos

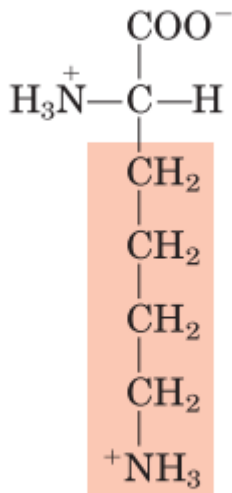
<b>Aminoácido</b>	<b>Símbolo de uma letra</b>	<b>Símbolo de três letras</b>	<b>Massa monoisotópica</b>
Ácido aspártico	D	Asp	115,026
Ácido glutâmico	E	Glu	129,042
Alanina	A	Ala	71,037
Arginina	R	Arg	156,101
Asparagina	N	Asn	114,042
Cisteína	C	Cys	103,009
Fenilalanina	F	Phe	147,068
Glicina	G	Gly	57,021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

## ANEXO 2

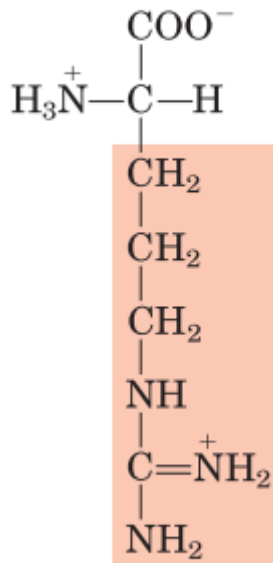
### Estruturas dos aminoácidos



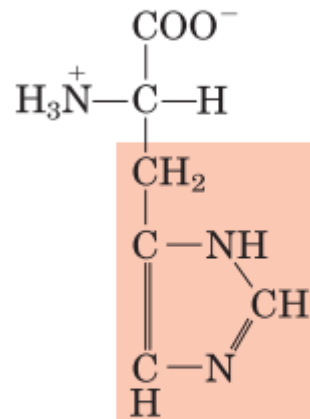
### Grupos R carregados positivamente



Lisina

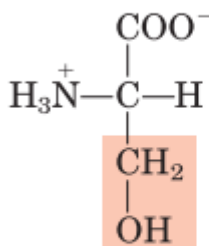


Arginina

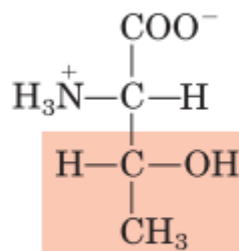


Histidina

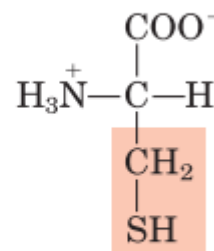
### Grupos R polares, não carregados



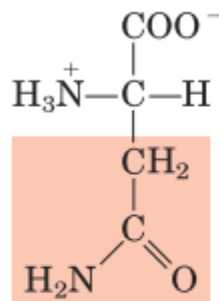
Serina



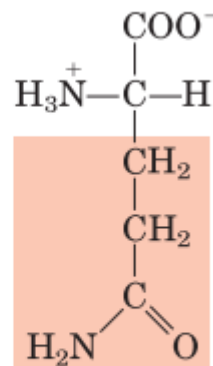
Treonina



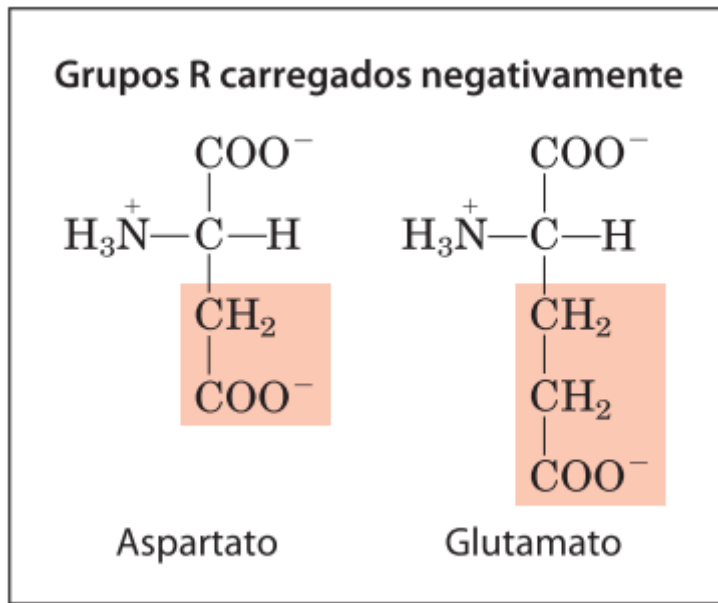
Cisteína



Asparagina



Glutamina



Retirado de 'Princípios de bioquímica de Lehninger' (Nelson, David L. ; Cox, 2014);

### ANEXO 3

Tabela de hidrofobicidade

<b>Aminoácidos</b>	<b>Escala de tendência TM</b>
Lys	-3,46
Asp	-3,27
Glu	-2,90
Arg	-2,57
Gln	-1,84
Asn	-1,62
Pro	-1,44
His	-1,44
Ser	-0,53
Thr	-0,32
Cys	-0,30
Gly	-0,19
Ala	0,38
Tyr	0,49
Met	1,40
Val	1,46
Trp	1,53
Leu	1,82
Ileu	1,97
Phe	1,98

Escala montada do mais hidrofóbico para o menos hidrofóbico de acordo com a escala de tendência transmembrana (TM) – Retirado e adaptado de (Zhao & London, 2006)

## ANEXO 4

Espectros de TOCSY e NOESY do IAP curto Hs11

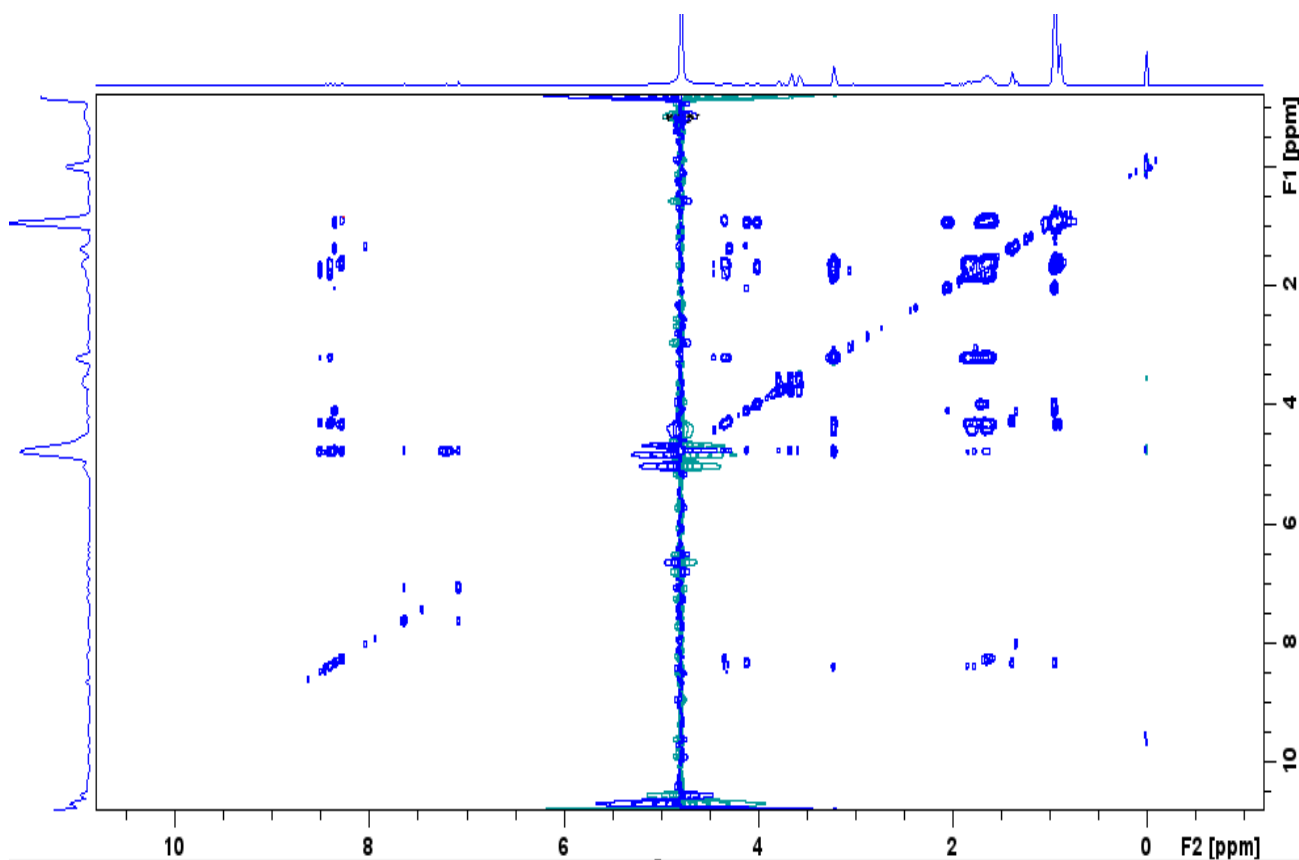


Figura A1 - Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY do Hs11 (2 mM) interagindo com 20  $\mu\text{M}$  de LPS a 25  $^\circ\text{C}$  e pH 4.

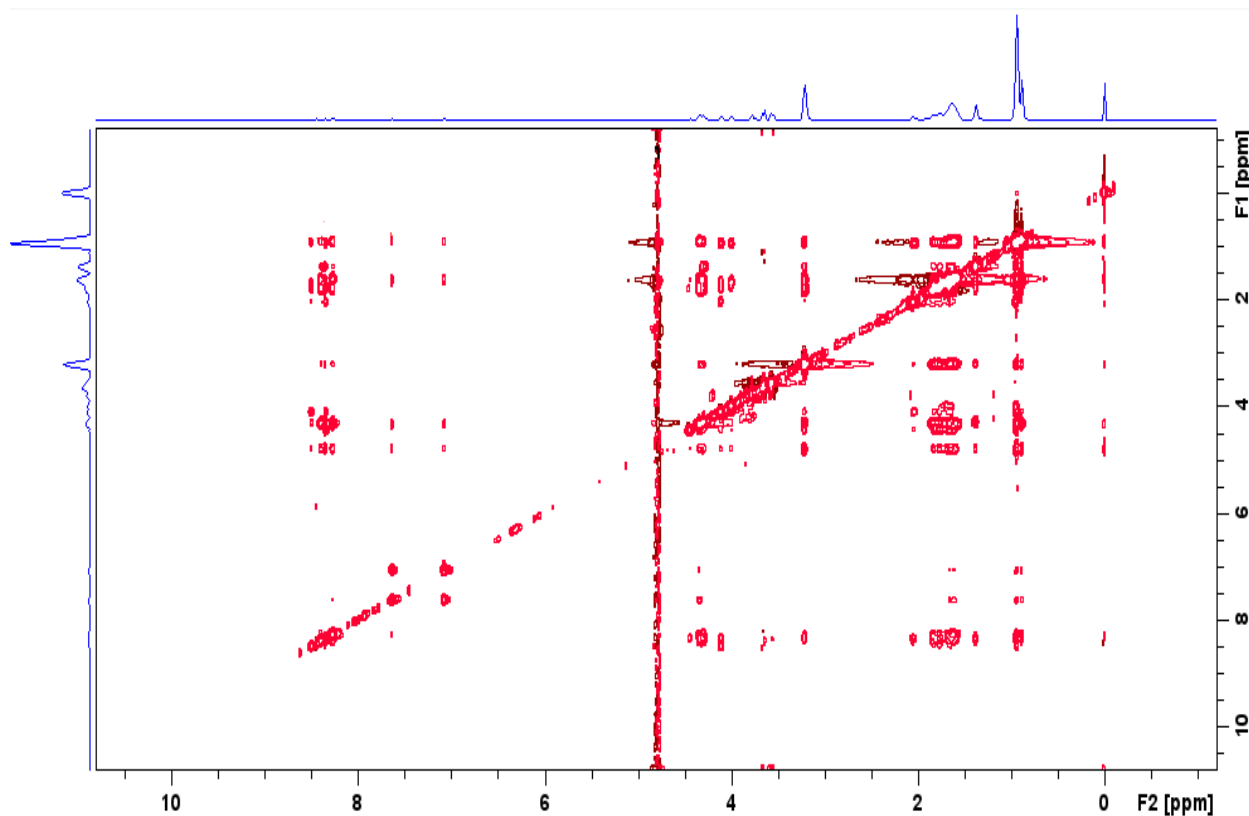


Figura A2 - Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY do Hs11 (2 mM) interagindo com 20  $\mu\text{M}$  de LPS a 25  $^\circ\text{C}$  e pH 4

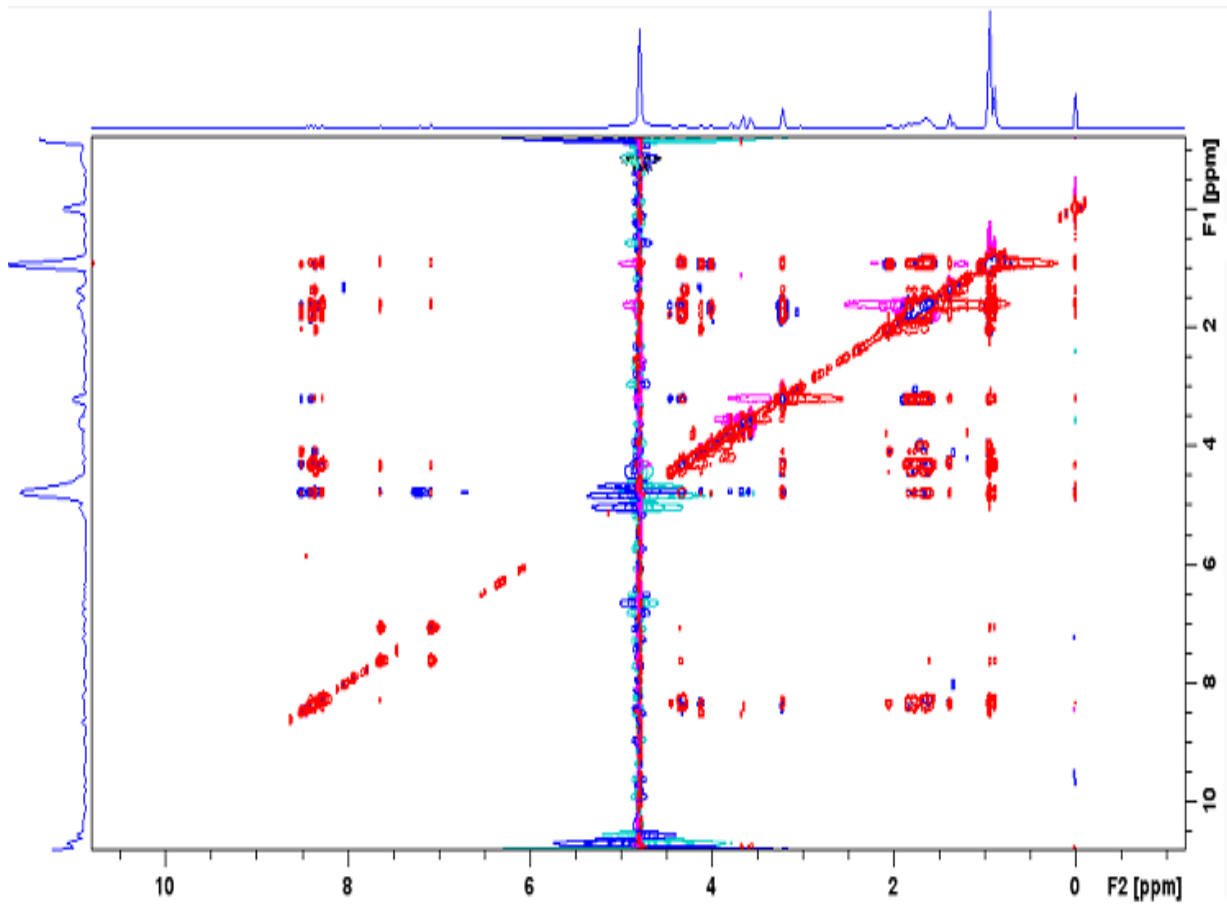


Figura A3 - Espectros de <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY e TOCSY sobrepostos do Hs11 (2 mM) interagindo com 20 uM de LPS a 25 °C e pH 4

## ANEXO 5

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) podem possuir também atividade antiviral. Esta atividade está correlacionada com o fator discriminatório de peptídeos catiônicos membrano-ativos em relação à composição das membranas fosfolipídicas normalmente carregadas negativamente (Ivanova et al., 2016). A estrutura típica de um vírus consiste em uma cobertura proteica, denominada capsídeo, que pode apresentar diversas formas dependendo de cada vírus. Este capsídeo tem como função proteger o genoma viral, que se encontra dentro dele, mas também funciona no reconhecimento de receptores, direcionando o vírus para um hospedeiro em potencial. Alguns vírus apresentam adicionalmente um envelope sobre este capsídeo, sendo essa uma estrutura composta de fosfolípidos e glicoproteínas que são codificadas por cada vírus, tendo como função o reconhecimento de receptores, facilitar a fusão com membranas e também no tropismo viral. A figura 5 há uma ilustração da composição típica dos vírus (Goulding & London, n.d.).

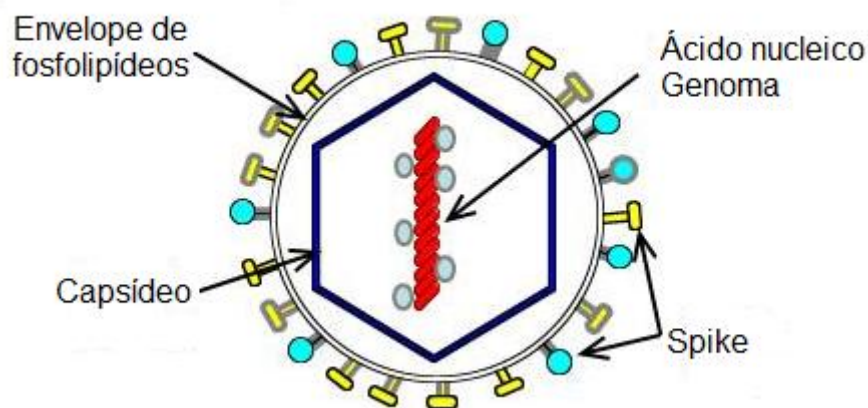


Figura B1 - Representação da estrutura típica de vírus. Extraído e adaptado de Goulding & London;

A ação dos AMPs sobre os vírus consiste em interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas com a camada fosfolipídica e/ou com a superfície polar das proteínas que são expostas durante o processo de fusão com a célula do hospedeiro (Huang et al., 2020). Muitos dos peptídeos com ação antiviral agem

com propriedades tipo detergente, e sua seletividade está ligada com as diferenças entre as composições lipídicas da membrana viral e a membrana do hospedeiro (Huang et al., 2020). O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, ou seja, apresenta fosfolipídeos estruturando sua membrana externa, com um grande número de proteínas glicosiladas do tipo S, que são responsáveis pelo reconhecimento de receptores, o ataque viral e a entrada do vírus na célula do hospedeiro (Huang et al., 2020). E devido a sua composição de superfície é possível assumir que AMPs poderão ser capazes de desestabilizar a membrana e terem ação antiviral também contra este patógeno.

## **ENSAIOS DE ATIVIDADE INIBITÓRIA CONTRA SARS-COV-2**

Para a realização desta parte do trabalho, os peptídeos Hs11, Hs12 e Hs13 foram enviados para São Paulo para que todos os procedimentos envolvendo o vírus de SARS-CoV-2 fossem realizados em um laboratório de biossegurança nível 3 do instituto de ciências biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). O SARS-CoV-2 (HIAE-02: SARS-CoV-2/SP02/human/2020/BRA, GenBank Accession No. MT126808.1) foi obtido a partir do isolamento do vírus de uma amostra nasofaríngea de um paciente diagnosticado com COVID-19. A metodologia de ensaio é similar à reportada na literatura (Freire et al., 2021).

### **- Preparo do vírus:**

O vírus, depois de isolado, foi submetido a duas passagens em uma linhagem celular Vero (Vero CCL-18, retirada do macaco verde africano adulto natural, fornecido pelo laboratório de seção de coleção de culturas do instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil) e foi mantido em DMEM (do inglês Dulbecco's Modified Eagle Medium) com alta concentração glicose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 2% de soro fetal bovino inativado por calor (FBS, do inglês Fetal Bovine Serum; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As células foram mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante coletado da cultura de células infectadas foi reservado e armazenado em alíquotas a -80°C.

Para o plaqueamento,  $1 \times 10^5$  células Vero CCL-81 foram adicionadas em cada poço contendo DMEM em alta concentração de glicose suplementada com 10% de FBS a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, o meio foi removido e substituído por 400 µL do meio sem suplementação e contendo várias diluições de SARS-CoV-2. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> para a adsorção do vírus. Então, o meio foi removido novamente e substituído por 500 µL de DMEM com alta concentração de glicose (2% FBS) contendo 2% de carboximetil celulose. Em seguida as placas foram incubadas por mais 72 horas. Passado este tempo, o meio foi removido e as placas foram fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS (m/v) com pH 7,4 por 15 minutos e colorido com violeta cristal 1% em 10% de metanol (m/v/v) por 5 minutos. O número de placas foram visualmente avaliadas e contadas, e o vírus titulado foi calculado por formação de unidades de placa (PFU)/mL.

#### - Triagem de inibição fenotípica

Em cada poço das placas de ensaio (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemanha) foram semeadas 6000 células Vero em 120 µL de DMEM com alta concentração de glicose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementada com 10% de FBS inativada por calor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Depois o meio foi removido e se adicionou 60 µL de DMEM com alta concentração de glicose DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a cada poço. Os peptídeos foram manualmente transferidos para uma placa de 96 poços de polipropileno (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) e diluídos com tampão de fosfato salino (PBS) pH 7,4 estéril, para uma diluição final de 33.33x. Então, 30 µL de cada poço foram transferidos para uma placa de ensaio contendo as células, seguido pela adição de partículas virais de SARS-CoV-2 para as multiplicidades de infecção (MOI) 0,1 em 30 µL de DMEM com alta concentração de glicose por poço.

As células infectadas e tratadas com Dimetilsulfóxido (DMSO) e as células não infectadas tratadas com DMSO foram usadas como controles. As placas de ensaio foram incubadas por 1 hora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> para a adsorção do vírus e em seguida foi adicionado 60 µL de DMEM com alta

concentração de frutose suplementada com 6% de FBS por poço. As concentrações finais das placas de ensaio foram 0,5% de DMSO e 2% de FBS(v/v). Após 33 horas de incubação, as placas foram fixadas em 4% de paraformaldeído em PBS pH 7,4 e submetido a uma determinação indireta imunofluorescente da infecção viral celular. Depois as placas foram lavadas duas vezes com PBS pH 7.4. Em seguida, as células foram bloqueadas utilizando com 5% de soro de albumina bovina (BSA, do inglês bovine serum albumine) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em PBS (BSA-PBS) por 30 minutos em temperatura ambiente e lavado duas vezes com PBS.

Soro hiperimune de um paciente brasileiro em convalescência de COVID-19 foi diluído em razão 1:1000 em 5% de BSA em PBS (v/v) e usado como anticorpo primário. Após 30 minutos de incubação, os poços foram lavados e a solução contendo anti-IgG humano conjugado (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) com 5 µg/mL de DAPI (4',6 diamidino-2-fenilidola; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em razão 1:1000 em 5% BSA (v/v) foi adicionado em cada poço. Após a última incubação de 30 minutos, as placas foram lavadas duas vezes com PBS e submetidas a imageamento no sistema de imagens de alto conteúdo Operetta (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) usando a magnitude objetiva de 20x. As imagens adquiridas foram analisadas pelo software Hasmony (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), versão 3.5.2.

#### - Análise dos dados

As análises das imagens, incluindo a identificação e contagem das células Vero, foram baseadas em segmentação nuclear, e a infecção viral foi baseada na mancha citoplasmática como as detectadas nos ensaios de imunofluorescência. Segmentação automatizada de células e identificação de células infectadas por SARS-CoV-2 foram visualmente confirmados. A razão de infecção (IR) foi calculada como a razão entre o número de células infectadas e o número total de células contadas em cada poço. A avaliação de sobrevivência celular foi calculada pelo número de células contidas em cada poço dividido pelo valor médio do número de células controle positivo (células infectadas tratadas com DMSO) multiplicado por 100. A atividade antiviral foi determinada pela normalização do IR do controle negativo (células infectadas e

não infectadas com DMSO). A curva de concentração resposta foi plotada usando a normalização da atividade e a sobrevivência celular em cada concentração com uma análise de regressão não linear em função de dose resposta sigmodal (declive variável) usando GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os valores de EC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> foram determinados como a concentração dos compostos que reduzem a taxa de infecção e a sobrevivência celular em 50%, respectivamente, comparado com os controles infectados não tratados de cada composto.

- Ensaios de concentração fixa 10 µM

Primeiramente, os compostos foram diluídos para 2 mM em DMSO. Destas soluções foram preparados os compostos em diluições 33,33x em PBS e adicionado 10 uL em cada poço das placas de ensaio, obtendo uma diluição final de 200x. As Células Vero E6 foram plaqueadas em placas de 384 poços em meio DMEM em alta concentração de glicose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após 24 horas, as células receberam os compostos, e em seguida, o vírus foi adicionado em um MOI de 0,05. Após 36 horas de infecção, as placas foram fixadas e analisadas por imunofluorescência. As imagens foram adquiridas e analisadas pelo Operetta (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Para a análise de dados, os parâmetros medidos em cada um dos poços foram: número total de células e número total de células infectadas. A partir dos controles infectado e não infectado, a atividade de cada um dos compostos e a taxa celular foram normalizadas.

- Ensaios de determinação de dose-resposta

A coleção de compostos (os peptídeos) foi reformatada para uma placa de 384 poços seguindo o mesmo procedimento anterior de preparação. Entretanto, nesta parte do experimento foi utilizado como controle a cloroquina. As Células Vero E6 foram plaqueadas em placas de 384 poços. Após 24 horas, as células receberam os peptídeos e em seguida o vírus foi adicionado em uma multiplicidade de ensaio (MOI) de 0,1 partículas virais por célula. A concentração final de DMSO nas placas de ensaio foi 0,5% (v/v). Após 33 horas de ensaio, as placas foram fixadas, a imunofluorescência foi realizada com soro de pacientes de Covid-19. As imagens foram adquiridas e analisadas

pelo equipamento de HCS Operetta (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Os parâmetros medidos em cada um dos poços foram: o número total de células e o número total de células infectadas. A redução no número de células infectadas indica a porcentagem de atividade viral das amostras. A partir dos controles infectados e não infectados, a atividade de cada composto e a taxa de sobrevivência celular foram normalizadas.

## TESTE DE ATIVIDADE ANTIVIRAL

Dado o potencial de alguns dos IAPs aqui descritos em inibir o crescimento bacteriano, provavelmente por meio da desestabilização de membranas biológicas, alguns peptídeos selecionados foram testados contra SARS-CoV-2. O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, ou seja, composto uma camada externa formada por fosfolipídeos, que irão interagir com IAPs em potencial (Huang et al., 2020). A literatura traz inúmeros AMPs com atividade antiviral direta contra vírus envelopados, capazes de desestabilização da partícula viral, e portanto, é razoável testar os Hs IAPs aqui descritos para tal atividade (Cheng et al., 2008; Jung et al., 2019; Q. Li et al., 2011). O nosso parceiro nestes ensaios foi o Instituto de Ciências Biomédicas na Universidade de São Paulo

O primeiro teste consistiu em uma varredura utilizando uma concentração fixa de peptídeos de 10  $\mu$ M em células Vero-E6 infectadas com SARS-CoV2. A tabela A.1 traz uma compilação dos resultados obtidos.

**Tabela A.1- Resultados da varredura para concentração fixa de 10  $\mu$ M dos peptídeos testados**

Nome do peptídeo	Número de células	Células infectadas	Razão de infecção	Sobrevivência celular (%)	Atividade antiviral (%)
Hs11	1998	904	0,4525	125	12
Hs12	1152	534	0,4635	72	10
Hs13	1665	816	0,4901	104	5

Esses dados demonstram que os peptídeos na concentração de 10  $\mu\text{M}$  mantiveram boa parte das células vivas, mais de 72%, o que mostra uma baixa citotoxicidade destas moléculas. Esse é um dado interessante, que deve porém ser expandido para testes de citotoxicidade utilizando concentrações mais altas dos peptídeos. O Hs12 se mostrou mais tóxico, apresentando uma sobrevivência celular de 72%, e o Hs11 o que manteve a melhor porcentagem de células vivas, com um valor de 125%. Entretanto, nesta concentração de 10  $\mu\text{M}$  a atividade antiviral foi modesta, pois o peptídeo com melhor atividade, o Hs11, inibiu somente 12% do processo infeccioso. Isso indica que, embora pouco tóxicos, os Hs IAPs aqui testados são pouco efetivos na neutralização do processo de infecção viral por SARS-CoV-2.

Após esse ensaio preliminar, foi feito um segundo ensaio com dose variável, onde foi mensurada a viabilidade celular e a atividade antiviral para o peptídeo Hs11, o peptídeo que apresentou a melhor performance no ensaio anterior. Neste ensaio foi realizado um teste variando as concentrações até a concentração de 10  $\mu\text{M}$  (Tabela A.2). A cloroquina foi utilizada como referência (Freire et al., 2021) e foram medidos dois parâmetros, o  $\text{EC}_{50}$ , sendo essa a concentração que inibe 50% da infectividade viral, e  $\text{CC}_{50}$ , a concentração que mata 50% das células.

**Tabela A.2 - Testes dose resposta para a determinação de  $\text{EC}_{50}$  e  $\text{CC}_{50}$**

Nome do composto	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	SI	Atividade máxima (%)
Cloroquina	9,22	>50,00	>5,4	99
Hs11	>10,00	>10,00	ND	4

A cloroquina foi utilizada como molécula padrão que apresenta uma boa ação antiviral *in vitro*, conforme demonstrado na literatura (Freire et al., 2021). Esta molécula, com uma concentração menor que 10  $\mu\text{M}$  conseguiu reduzir em 99% o processo infeccioso e apresentou baixa toxicidade. A inibição de 50% do processo infeccioso viral foi obtida em uma concentração de 9,22  $\mu\text{M}$  de cloroquina, enquanto a  $\text{CC}_{50}$  não foi atingida dentro da faixa de concentrações testadas. Esta análise da atividade viral e sobrevivência celular é representada na figura 23a.

O peptídeo Hs11, por sua vez, também manteve boa parte das células vivas, contudo, apenas apresentou 4% de atividade antiviral até sua concentração máxima de teste de 10  $\mu$ M. Isso indica que o Hs11 não foi antiviral na faixa testada. Porém, dado que a atividade antibacteriana destes peptídeos é manifesta entre 8 e 128  $\mu$ M, é razoável esperar que a atividade antiviral também se manifeste nesta faixa, a qual não foi avaliada por motivos técnicos. Tais dados devem ser adquiridos no futuro em uma faixa superior de concentração, para melhor compreensão da atividade antiviral desse peptídeo. Outros IAPs helicoidais testados pelo grupo demonstraram resultados promissores dentro da faixa testada (dados não mostrados). A figura 23b apresenta como foi a atividade viral e a sobrevivência celular.

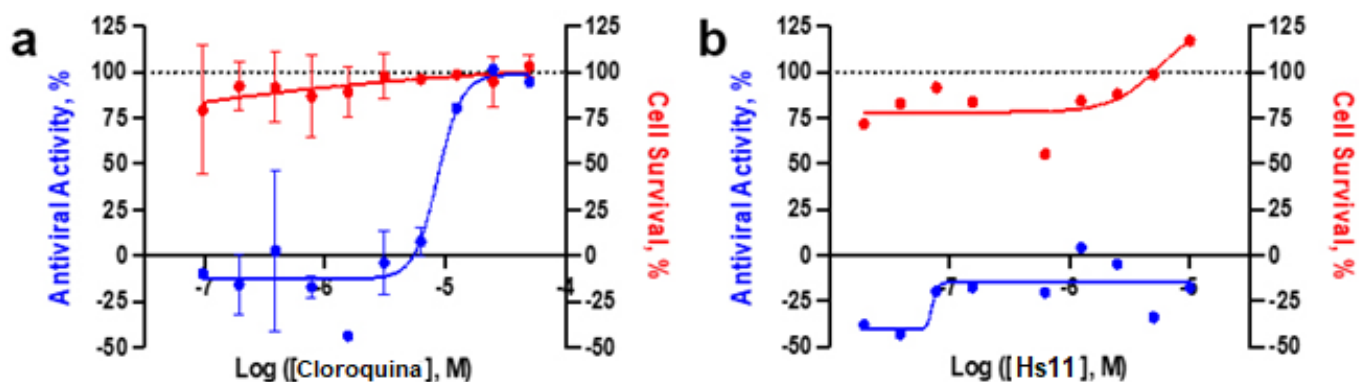


Figura B2 - Representação da atividade antiviral e a porcentagem de sobrevivência celular em uma faixa de concentração até 10  $\mu$ M. A) Atividade relativa a cloroquina; B) Atividade do peptídeo Hs11. Em vermelho, curva relativa ao % de sobrevivência celular, e em azul, para o % de atividade antiviral

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, 17 de outubro de 2022.

Assinatura do/a discente: Fernanda Leonel Silva

Programa: Programa de Pós Graduação em Química (PPGQ)

Nome completo: Fernanda Leonel Silva

Título do Trabalho: 'Prospecção, síntese e avaliação de Peptídeos Intragênicos Antimicrobianos curtos derivados de proteínas humanas como agentes antimicrobianos e anti-inflamatórios'

Nível: ( X ) Mestrado ( ) Doutorado

Orientador/a: Guilherme Dotto Brand