



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ESTUDOS VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DA ENZIMA RESPONSÁVEL PELA
HIDRÓLISE DO PEPTÍDEO CHIM3 NO SÍTIO AXA EM *ESCHERICHIA COLI* E
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

REYNER SANTOS DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. GUILHERME DOTTO BRAND

BRASÍLIA – DF, BRASIL

1º/2022



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ESTUDOS VISANDO A IDENTIFICAÇÃO DA ENZIMA RESPONSÁVEL PELA
HIDRÓLISE DO PEPTÍDEO CHIM3 NO SÍTIO AXA EM *ESCHERICHIA COLI* E
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Química da Universidade de
Brasília como requisito parcial para conclusão
do curso de Bacharelado em Química.

REYNER SANTOS DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. GUILHERME DOTTO BRAND

BRASÍLIA – DF, BRASIL

1º/2022

AGRADECIMENTOS

Sou extremamente grato a todos que, de alguma forma, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho, dentre estes, menciono:

Ao professor Guilherme Dotto, por me conferir a oportunidade de fazer parte de um projeto tão elegantemente complexo e belo. Tenho-no como exemplo e o que me foi ensinado certamente me acompanhará durante toda minha vida acadêmica.

À equipe do LSAB, em especial ao Samuel, que me acompanhou de perto e garantiu que todos os procedimentos realizados tomassem um rumo correto.

Aos profissionais do Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (NuPMIA - FS), em especial à Wanessa, por me ensinar a utilizar cromatógrafo líquido.

À equipe da central analítica do Instituto de Química, por disponibilizar o espectrômetro de massas para caracterização de CHIM3-P.

Aos meus queridíssimos amigos da UnB, Leonardo, Felipe e Lucas, que sempre se mostraram dispostos a me apoiar, tanto em termos acadêmicos quanto em termos emocionais.

Às minhas amadas amigas, Bianca e Tamara, que desde o ensino médio, sempre acreditaram e me influenciaram a seguir meus sonhos.

Aos meus familiares, em destaque à minha mãe, Rosângela e ao meu pai, Jader, pela paciência e pela confiança.

Dedico este trabalho ao Gabriel Barros e ao Lucas Vinícius que, infelizmente, partiram cedo demais desta vida.

SUMÁRIO

I. RESUMO.....	5
II. ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÃO.....	39
7. REFERÊNCIAS.....	40

RESUMO

O presente trabalho objetiva a identificação da enzima responsável pela hidrólise do polipeptídeo de CHIM3 no sítio de clivagem AXA em *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para tanto, a estrutura primária de CHIM3 foi alterada, de modo a descaracterizar o sítio de hidrólise pela enzima Spase I, dando origem ao peptídeo CHIM3-P, no qual o motivo A-X-A foi substituído por P-X-P. CHIM3-P foi sintetizado via síntese de peptídeos em fase sólida (SPPS), purificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e foi sequenciado por Espectrometria de Massas (MS e MS/MS). No entanto, devido à indisponibilidade do cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas do Instituto de Química da Universidade de Brasília, cujo sistema de resfriamento encontrava-se fora de serviço, não foi possível conduzir os ensaios de perfil de digestão de *E. coli* e *S. aureus* dos peptídeos CHIM3 e seu análogo modificado CHIM3-P em tempo hábil para entrega deste trabalho. O equipamento já encontra-se disponível e, como perspectiva, pretende-se prosseguir a incubação da molécula em culturas de *E. coli* e *S. aureus* para investigar seu perfil de digestão via cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos (AMPs), resistência múltipla a drogas (MDR), Spase I, CHIM3-P.

ABSTRACT

The present work aims to identify the enzyme responsible for the hydrolysis of CHIM3 polypeptide at the AXA cleavage site in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. To this end, the primary structure of CHIM3 was altered so as to mischaracterize the hydrolysis site by the enzyme SPase I, giving rise to the peptide CHIM3-P, in which the A-X-A motif was replaced by P-X-P. CHIM3-P was synthesized via solid phase peptide synthesis (SPPS), purified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and sequenced by Mass Spectrometry (MS). However, due to the unavailability of the liquid chromatography coupled to a mass spectrometer at the Institute of Chemistry at the University of Brasilia, whose cooling system was out of order, it was not possible to conduct the *E. coli* and *S. aureus* digestion profile assays of the peptides CHIM3 and its modified analog CHIM3-P in time to deliver this work. The equipment is now available and, as a perspective, we intend to proceed with the incubation of the molecule in *E. coli* and *S. aureus* cultures to investigate its digestion profile via liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

Keywords: Antimicrobial peptides (AMPs), multiple drug resistance (MDR), Spase I, CHIM3-P.

1. INTRODUÇÃO

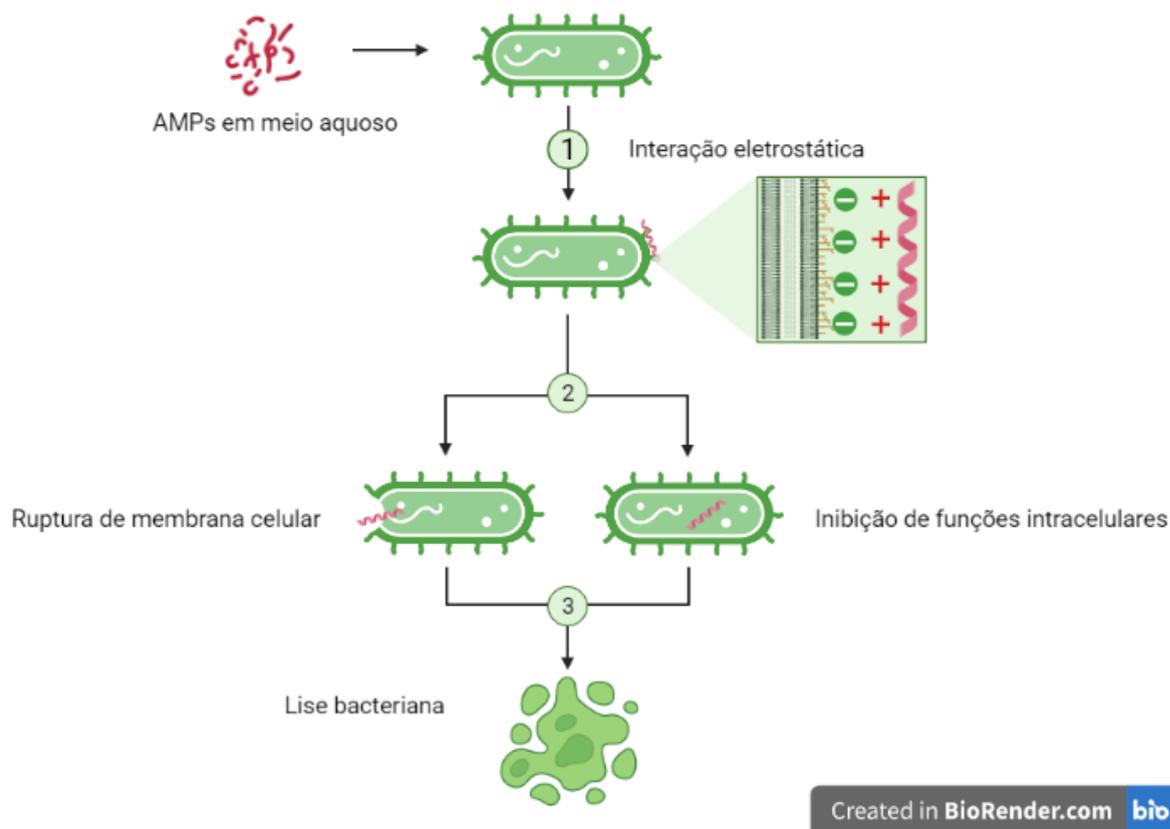
Com o uso indiscriminado de antibióticos, houve, nos últimos anos, uma rápida e crescente ascensão de microrganismos multirresistentes (MDR - do inglês, *multiple drug resistance*), sendo estes bactérias, fungos ou até mesmo outros tipos de parasitas, incluindo vírus (MULDER et al, 2013; POWERS et al, 2003). Trata-se de um grave problema de saúde pública que apresenta consequências diretas no tempo de internação e na taxa de mortalidade de pacientes (FRANCISCO et al, 2013; WHO, 2015). Em termos sociais, estima-se que, por ano, infecções por patógenos multirresistentes causem a morte de 25 mil pessoas nos Estados Unidos e na Europa. Na China, as perdas podem chegar a 100 mil (FRANCISCO et al, 2013). Ressalta-se também o impacto de custo ao sistema de saúde mundial, o qual atinge um gasto anual de até 1,5 bilhões de euros (nos valores atuais, aproximadamente 7,5 bilhões de reais) (FRANCISCO et al, 2013). Portanto, a busca de alternativas ao combate aos MDRs é vital.

À luz deste entrave, uma promissora abordagem é o ataque seletivo e direto a membrana citoplasmática destes microrganismos, de maneira a desregular sua homeostase e induzir lise celular (FJELL et al, 2012; GORDON et al, 2005). Constituintes universais do sistema imune inato de bactérias, fungos, plantas e animais, os AMPs (do inglês, *antimicrobial peptides*) têm a capacidade de exercer esta função, respondendo a agentes infecciosos com ação em amplo espectro.

Figura 1. Representação esquemática da ação direta de AMPs em membranas citoplasmáticas bacterianas. 1)

Interação eletrostática entre a porção positivamente carregada do AMP e membrana celular da bactéria. 2)

Promoção de ruptura de membrana ou inibição de funções intracelulares. 3) Lise bacteriana em consequência de desregulação da homeostase (MULDER et al, 2013; POWERS et al, 2003).



Fonte: Criado pelo autor com biorender.com

Para fins ilustrativos, a figura 1 retrata um exemplo de ação direta de AMPs em uma bactéria Gram-negativa: primeiramente, os AMPs, quando atingem uma concentração crítica, acumulam-se preferencialmente na membrana citoplasmática bacteriana por meio de interações eletrostáticas, na qual adquirem conformação α -helicoidal. Deste ponto, os peptídeos podem simplesmente promover ruptura de membrana ou podem inserir-se no interior da célula, local no qual passam a inibir o funcionamento de funções intracelulares. O resultado de ambos os casos é a morte celular (MULDER et al, 2013; POWERS et al, 2003; CASTEL et al, 2011).

Vale notar, no entanto, que o mecanismo direto não é o único reportado (FJELL et al, 2012; GORDON et al, 2005; HUAN et al, 2020; MORAVEJ, et al, 2018). O modo de ação indireto baseia-se no combate a infecções bacterianas via modulação do sistema imune do próprio hospedeiro (HUAN et al, 2020; MORAVEJ, et al, 2018). Com base nisso, o Laboratório de Síntese e Análise Biomoléculas vem trabalhando há alguns anos com o desenho racional de peptídeos da série CHIM. Esta família de moléculas apresenta três módulos: 1. um módulo membrano-ativo, de caráter catiônico anfifílico, desenhado para acumular-se preferencialmente em membranas procarióticas; 2. um módulo espaçador, o qual

permite uma maior liberdade conformacional, distanciando o sítio de clivagem da membrana bacteriana a fim de facilitar o acesso de proteases e 3. um módulo quimiotático, responsável pela atração de leucócitos com subsequente resolução da infecção via ativação de receptores de peptídeos formilados do tipo 2 (FPR2). Para fins de comparação, a estrutura primária dos peptídeos da série CHIM estão ilustrados na tabela 1.

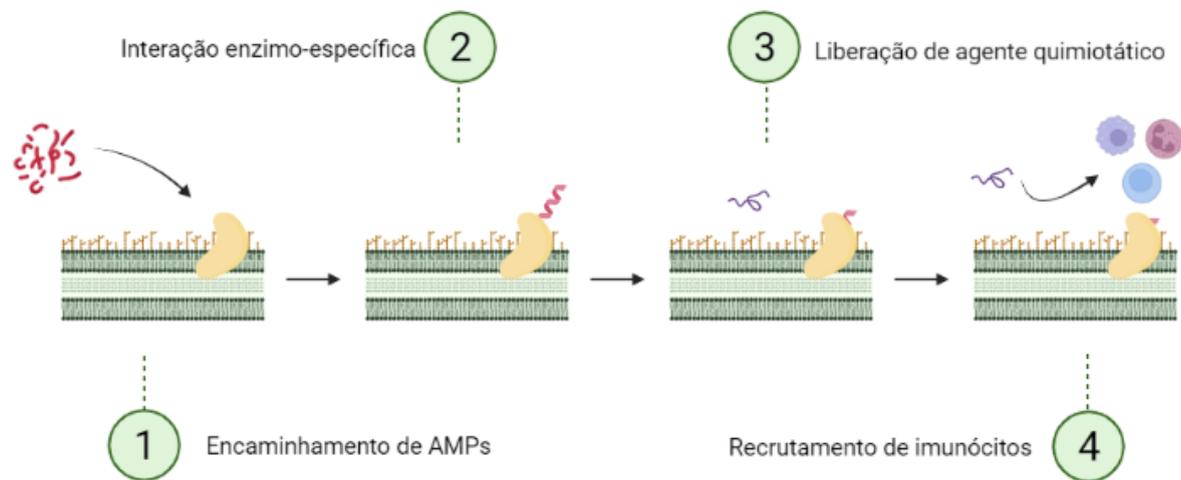
Tabela 1. Estrutura primária dos polipeptídeos da série CHIM. Na estrutura primária de CHIM3 está destacado em negrito o sítio de clivagem para Spase I. Já para o análogo modificado, CHIM3-P, o destaque encontra-se no sítio descaracterizado.

Peptídeo	Estrutura Primária
Hs02	KWAVRIIRKFIKGFIS-NH ₂
CHIM1	KWAVRIIRKFIKGFISGGKKWKYM-NH ₂
CHIM2	KWAVKIIRKFIKGFISGGKRWKYM-NH ₂
CHIM3	KWAVKIIRKFIKGFISGPG ANAAQHKRWKYM-NH₂
CHIM3-P	KWAVKIIRKFIKG PPNPP QHKRWKYM-NH ₂

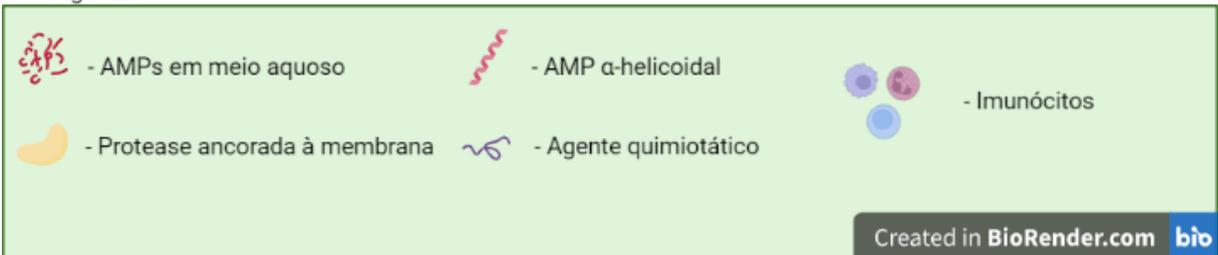
Fonte: A estrutura primária de Hs02, molécula descrita pela equipe do Laboratório de Análise e Síntese de Biomoléculas (LSAB), foi retirada de BRAND et al, 2019.

O peptídeo CHIM2, foi sintetizado e testado em sistemas modelo compostos de vesículas fosfolipídicas, permitindo atestar a seletividade de interação àquelas de carga negativa com consequente liberação do módulo agonista de FPR2 a partir de proteases adicionadas ao meio reacional (trabalho de doutorado em andamento). Já o peptídeo CHIM3, tem seu design baseado em CHIM2, mas incorporando um sítio de reconhecimento pela enzima Spase I bacteriana, objetivando a liberação do módulo quimiotático pelo próprio maquinário enzimático bacteriano. Testes de incubação de CHIM3 com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* demonstraram tanto a liberação do módulo agonista FPR2 quanto a hidrólise no sítio de Spase I pretendido (trabalho de doutorado em andamento - ilustrado na figura 2). Contudo, embora tenha havido hidrólise neste sítio, é importante se certificar de que se trata, efetivamente, da enzima Spase I e não outra com especificidade similar.

Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de ação indireto de AMPs via liberação de agente quimiotático. 1) Encaminhamento de AMPs ao sítio de reação. 2) Interação quimicamente específica entre AMP e enzima ancorada à membrana. 3) Clivagem peptídica levando a liberação de agente quimiotático. 4) Recrutamento e/ou ativação de células imunocompetentes (MATSUZAKI, 2009).



• Legenda:



Fonte: Criado pelo autor com biorender.com

Com intuito de servir como prova de conceito, a molécula CHIM3 teve o sítio de hidrólise da enzima Spase I descaracterizado, dando origem ao peptídeo CHIM3-P (de estrutura primária KWAVKIIRKFIKGPPNPPQHKRWKYM-NH₂), no qual o motivo A-X-A foi substituído por P-X-P. Desta forma, espera-se que CHIM3-P não sofra hidrólise neste sítio. Ainda, será possível verificar se a ação da enzima que causa digestão neste sítio impacta significativamente na liberação da porção de agonista de FPR2 de CHIM3, fomentando a otimização de novas moléculas.

CHIM3-P foi sintetizado utilizando a técnica síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), por estratégia Fmoc/tBu, com posterior purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (HLPC), seguido de caracterização por espectrometria de massa. Após a incubação com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, o perfil de digestão de CHIM3 e CHIM3-P foi avaliado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de hidrólise do peptídeo CHIM3-P pelas bactérias *E. coli* e *S. aureus* por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa (LC-MS), com ênfase na caracterização de potenciais diferenças na hidrólise do sítio A-X-A, reconhecido pela SPase I e presente em CHIM3, entretanto modificado em CHIM3-P.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Sintetizar CHIM3-P via síntese de peptídeos em fase sólida;
- 2) Purificar o peptídeo empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência;
- 3) Fazendo uso de espectrometria de massa, caracterizar a estrutura primária da molécula sintetizada;
- 4) Conduzir ensaios de hidrólise bacteriana por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* para ambos os peptídeos (CHIM3 e seu análogo, CHIM3-P);
- 5) Com auxílio da técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, avaliar, em termos qualitativos, o padrão de clivagem diferencial do peptídeo CHIM3-P, com foco no potencial sítio de ação da enzima SPase I.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Parâmetros gerais e mecanismos de ação direta de AMPs

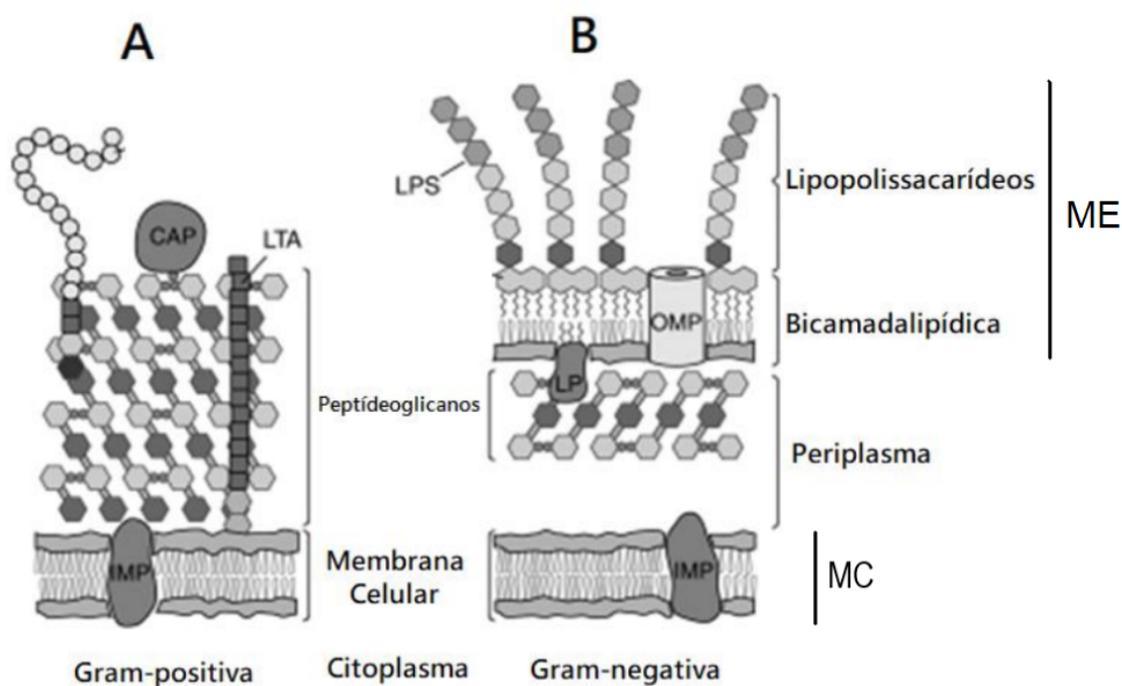
Nos últimos anos, observou-se uma rápida ascensão de microrganismos multirresistentes a antibióticos. De acordo com um recente relatório publicado pela equipe técnica das Nações Unidas, doenças causadas por estes patógenos podem levar à morte de 10 milhões de pessoas por ano em 2050, resultando em uma crise econômica similar à experimentada durante os anos 2008-2009 (WHO, 2015). Estes dados, em adjunto com diversos outros estudos publicados, reforçam a importância de se buscar alternativas no combate a estes agentes infecciosos. Uma promissora abordagem a este entrave é atacar, seletivamente, a membrana celular destes microrganismos, de modo a lhes causar rupturas, com consequente morte celular. Exercendo este papel, existem os peptídeos antimicrobianos (AMPs).

Parte dessa resistência associada às bactérias pode ser atribuída à natureza bioquímica de seus envelopes celulares. Para sobreviverem em um ambiente imprevisível e frequentemente hostil, esses microrganismos desenvolveram um envelope celular complexo que lhes confere proteção em amplo espectro (temperatura, acidez, toxinas, etc), bem como o manejo seletivo de nutrientes e dejetos metabólicos (SILHAVY et al, 2010).

Com base na composição química do envelope celular que as formam, as bactérias podem ser subdivididas como Gram-positivas ou Gram-negativas: 1. O envelope de Gram-negativas é composto de três camadas principais, a membrana externa (ME), uma delgada parede celular constituída de peptídeoglicanos e uma membrana citoplasmática (MC); no espaço entre a ME e a MC, encontra-se um compartimento celular aquoso denominado periplasma (SILHAVY et al, 2010); 2. As Gram-positivas, por sua vez, não possuem ME, mas sim uma extensa camada de peptídeoglicanos, que lhes asseguram alta rigidez e resistência às pressões exercidas na membrana plasmática (SILHAVY et al, 2010). A figura 3 ilustra as principais diferenças entre os envelopes celulares de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Figura 3. Representação comparativa do envelope celular de bactérias Gram-positivas (à esquerda) e Gram-negativas (à direita). A) Bicamada fosfolipídica jusante à uma espessa camada de peptídeoglicanos (parede celular); IMP – proteína integral de membrana; CAP – proteína ligada covalentemente; LTA – ácido lipoteicoico. B) Bicamada fosfolipídica acima (membrana externa), seguida de uma camada delgada de

peptídeoglicanos; na parte inferior, encontra-se o periplasma e outra bicamada de fosfolípidos; LP – lipoproteína; OMP – proteína de membrana externa; LPS – lipopolissacarídeos.



Fonte: Imagem adaptada e traduzida de SILHAVY *et al.*, 2010.

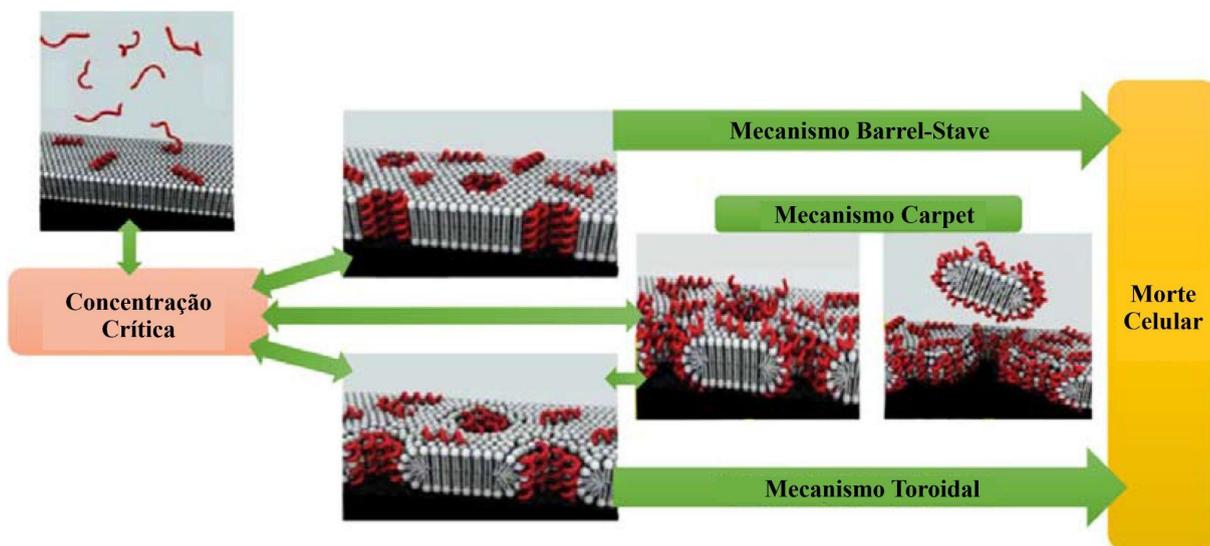
Em conformidade com a literatura vigente, Jun Lei e colaboradores revisaram as características gerais de peptídeos antimicrobianos e como tais atributos impactam seu uso e viabilidade em termos clínicos. Os AMPs são componentes indispensáveis do sistema imune de várias espécies, atuando como defesa primária contra um grande espectro de bactérias, fungos e vírus, sendo eficazes até mesmo àqueles multirresistentes, pois agem via desregulação do potencial eletroquímico de membranas celulares, induzindo a morte celular (LEI et al, 2016; LI et al, 2021).

Dentre os mais de 3000 AMPs reportados (LEI et al, 2016; LI et al, 2021) as características que lhes são comuns são: constituídos por menos de 50 resíduos de aminoácidos, ricos em resíduos catiônicos (a proporção de cargas positivas está diretamente relacionada à atividade antibacteriana), com porções tanto hidrofóbicas quanto hidrofílicas com periodicidade característica (o que lhes confere propriedades anfifílicas) (LEI et al, 2016; LI et al, 2021). A porção positivamente carregada destes peptídeos fomenta interações eletrostáticas com membranas celulares negativamente carregadas. Deste ponto, os AMPs são adsorvidos e passam por uma mudança conformacional: uma vez que ancoradas nas porções

hidrofóbicas da parede celular, estruturam-se, usualmente, em α -hélice, sendo esta conformação a mais comum, mas não a única.

Diferentemente dos antibióticos convencionais, os AMPs de ação direta interagem com relativa seletividade à membrana citoplasmática bacteriana, promovendo uma neutralização de carga que resulta em morte celular, como pode ser observado na figura 4. Este mecanismo, por atacar diretamente a porção lipídica da membrana microbiana, é de difícil resistência, pois, em contrapartida aos fármacos que atuam de modo sítio-específico, a alteração da natureza química de membrana celular é algo laborioso em termos genéticos (LEI et al, 2016; LI et al, 2021).

Figura 4. Representação esquemática de ação desreguladora de AMPs membrana ativos: três mecanismos principais - Barrel-Stave, Carpet e Toroidal.



Fonte: Imagem adaptada e traduzida de LI *et al.*, 2021.

Apesar de estar demonstrado que a maioria age por penetração de membrana, os AMPs não estão limitados a este modo de ação e diversos estudos reportaram que existem também aqueles que atuam em alvos intracelulares (LEI et al, 2016; LI et al, 2021). Os alvos no interior de uma célula são numerosos: cita-se como exemplo o DNA genômico, cuja desregulação afeta a expressão de genes, inibindo a síntese de macromoléculas ou destruindo substâncias necessárias ao metabolismo celular; mais comum aos antibióticos convencionais, os ribossomos, afetando diretamente a síntese protéica e também, de maneira generalizada, o metabolismo celular (LI et al, 2021).

Ademais, devido a sua natureza catiônica, os AMPs podem atuar como agentes antimicrobianos sem causar danos relevantes ao hospedeiro, visto que células eucarióticas são

majoritariamente compostas de fosfolipídios zwitteriônicos, colesterol e esfingomielinas, todas de caráter neutro (LEI et al, 2016; LI et al, 2021). É de se notar, portanto, que a atividade interfacial, que é amplamente dependente de suas propriedades físico-químicas, é de extrema relevância quanto às capacidades de desestabilização e permeabilidade de membranas de AMPs (LEI et al, 2016; LI et al, 2021; AGHAZADEH et al, 2019).

Não só atuantes contra bactérias, estudos demonstraram que, devido a maior presença de componentes aniônicos em suas membranas (AGHAZADEH et al, 2019), células cancerosas são mais sensíveis à ação de AMPs. Estas moléculas mostram-se significativamente inibitórias, inserindo-se nas suas paredes lipídicas, formando poros, promovendo a liberação de íons e metabólitos, desregulando processos de biossíntese e respiração celular (YANG et al, 2020). Todavia, a atividade anti-câncer de AMPs pode ocorrer também via mecanismos não-membranólíticos, com foco na perturbação da homeostase (LI et al, 2021, AGHAZADEH et al, 2019).

Observa-se uma intensificação no desenvolvimento de fármacos baseados em AMPs pois estes são, num panorama geral, menos tóxicos (LEI et al, 2016; LI et al, 2021; AGHAZADEH et al, 2019). Esta baixa toxicidade está associada a seu caminho de degradação: as ligações peptídicas são clivadas, levando à formação de peptídeos menores e aminoácidos livres, os quais são rapidamente eliminados pelo organismo (em seres humanos, os aminoácidos são metabolizados no ciclo da uréia) (LEI et al, 2016; LI et al, 2021). Ademais, a síntese de peptídeos conta com técnicas de alto rendimento, como por exemplo, a SPPS (i. é, síntese de peptídeos em fase sólida), o que facilita sua produção em larga escala (AGHAZADEH et al, 2019).

Como qualquer molécula bioativa, os AMPs possuem limitações: apresentam especificidade questionável, são relativamente instáveis, tendo um tempo de meia-vida curto, podem apresentar efeitos colaterais não negligenciáveis e, a depender de hidrofobicidade, podem possuir potente atividade hemolítica (trata-se da capacidade de destruir células vermelhas, com conseqüente liberação de hemoglobina no meio) (LI et al, 2021). Devido às dificuldades que lhes são concernentes, os AMPs carecem de um *guideline* robusto de planejamento racional e seus mecanismos de ação *in vivo* são pouco conhecidos, ou meramente empíricos (LEI et al, 2016; LI et al, 2021). Estudos vêm sendo conduzidos com finalidade de atenuar as desvantagens a acentuar a especificidade e atividade destas moléculas (LEI et al, 2016; LI et al, 2021).

É necessário, portanto, que estudos permaneçam continuamente sendo conduzidos a fim de caracterizar os parâmetros-chave para um bom funcionamento desses agentes antimicrobianos.

3.2. Relação entre estrutura e mecanismo de ação de AMPs

Em 2021, Li e colaboradores, com finalidade de prover uma referência para futuras modificações químicas e exploração de mecanismos de AMPs, puseram sob revisão a relação entre estrutura e modo de ação destas moléculas (LI et al, 2021). Ressalta-se que as propriedades físico-químicas destes peptídeos estão em concerto com atividade antimicrobiana. Tais propriedades são tão importantes às vias de ação, que até peptídeos estruturalmente semelhantes podem ser dirigidos a diferentes alvos, como é o caso da buforin II, que por penetração, inibe funções celulares e seu análogo mutado, buforin II P11A, que devido a uma mudança em um resíduo de aminoácido da sequência primária original, seu ataque passa a ser direcionado às membranas celulares (WEI et al, 2016). A estrutura primária das duas moléculas está ilustrada na tabela 2. Além disso, um mesmo peptídeo pode exibir comportamento divergente quando inserido em organismos diferentes (AGHAZADEH et al, 2019).

Tabela 2. Comparação entre os peptídeos antimicrobianos buforin II e seu análogo mutado (troca de uma prolina na posição 11 por uma alanina). O único resíduo de aminoácido que os diferenciam está destacado em negrito.

Peptídeo	Estrutura primária
Buforin II	TRSSRAGLQW P VGRVHRLLRK
Buforin II P11A	TRSSRAGLQW A VGRVHRLLRK

Fonte: Retirado e adaptado de WEI et al, 2016.

Os padrões que determinam a eficiência e viabilidade de AMPs são os que seguem:

1. o arranjo de cadeia lateral - afeta fortemente sua atividade e especificidade quanto ao micróbio alvo;
2. o peso molecular - AMPs membro-ativos mais curtos seguem a tendência de degradar membranas via formação de micelas, enquanto peptídeos mais longos tendem a se configurar de modo a estabilizar poros transmembrana;
3. a carga - para alvos cujas membranas são negativamente carregadas, é preferível que o AMP possua uma rede de cargas positivas, bem como alto caráter anfifílico;
4. a hidrofobicidade - o denominado balanço anfifílico, que é a razão entre a hidrofobicidade e o caráter catiônico, influencia tanto a atividade antibacteriana quanto a seletividade;
5. a estrutura secundária - idealmente, a

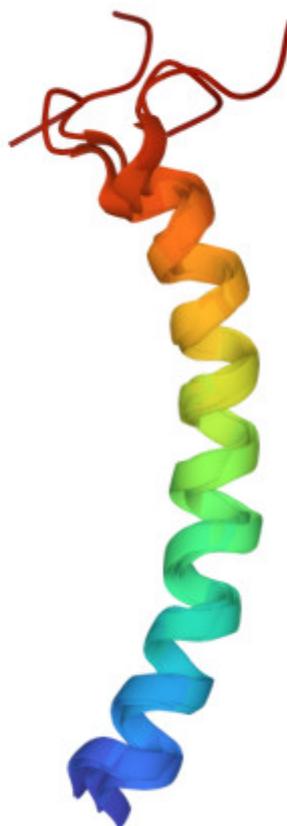
estrutura secundária adquirida deve portar porções hidrofóbicas e catiônicas discretamente organizadas, de modo a aumentar o caráter anfifílico da molécula; e 6. a curvatura de sua estrutura secundária - determina, em parte, o mecanismo de ação e é dependente do arranjo anfifílico assumido pela sequência de aminoácidos (LI et al, 2021).

A abordagem via ataque direto à membrana celular microbiana está longe de estar saturada em termos de pesquisa. Diversos estudos são publicados numa tentativa de propiciar um melhor entendimento sobre mecanismo de ação de AMPs isolados da natureza. Além disso, em termos medicinais, busca-se também determinar o conjunto de parâmetros ideais que um AMP deve possuir para a finalidade última de ação farmacológica, i. e, para o tratamento de doenças infecciosas (LEI et al, 2016; LI et al, 2021). Portanto, uma análise mais detalhada das características químicas das membranas dos microrganismos-alvos é essencial para o desenvolvimento de medicamentos cada vez mais específicos e eficientes, levando em consideração que, por se tratar de formas de vida que se adaptam rapidamente, é de extrema relevância que novas tecnologias sejam continuamente criadas.

Tratando de um método farmacologicamente e clinicamente pouco explorado, indiretamente, os AMPs podem combater infecções bacterianas pela modulação do sistema imune do hospedeiro. Isso ocorre de duas formas: recrutamento e/ou ativação de imunócitos como consequência de atividade quimiotática; e também como inibidores de agonistas dos receptores do tipo TLR (do inglês, *toll-like receptor*), promovendo supressão de inflamação (HUAN et al, 2020, VERJANS et al, 2016; YANG et al, 2020).

Existem, no entanto, AMPs que se encaixam em ambos os modos de ação descritos, como a catelicidina humana LL-37 (ilustrada na figura 5). Esta é capaz não só de atacar diretamente a membrana celular de agentes infecciosos, mas também de fomentar a modulação do sistema imune do hospedeiro. Trata-se de um componente fundamental da rápida resposta imune humana, pois é capaz de promover a ativação de numerosos receptores de superfície celular. Estas interações modificam a natureza físico-química das membranas sob ataque. Todavia, este peptídeo possui ação tanto pró- quanto anti-inflamatória e interage sem discernimento com diversas células, o que torna sua modulação pouco previsível e direcionável (HUAN et al, 2020, VERJANS et al, 2016; YANG et al, 2020). É necessário, portanto, uma molécula de especificidade maior.

Figura 5. Estrutura cristalina em três dimensões obtida via difração de raios-X da catelicidina humana, LL-37.



Fonte: Imagem retirada do banco de dados RCSB PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein DataBank) (website: <https://www.rcsb.org>).

3.3. Imunomodulação: a significância de LL-37

A única catelicidina humana, de nome LL-37, vem sendo objeto de pesquisa há anos devido suas variadas atividades biológicas (YANG et al, 2020). Numerosos estudos demonstraram que sua ação não se limita somente à atividade antimicrobiana, influenciando também na regulação do sistema imune (YANG et al, 2020; AGHAZADEH, 2019). Trata-se, no entanto, de uma via complexa de mecanismos que possuem dependência direta do microambiente que lhe é inserido: por um lado, LL-37 promove inflamação e resposta imune em adjunto a seus efeitos anti-tumorais e, em contrapartida, pode atuar como anti-inflamatório e promover carcinogênese (YANG et al, 2020).

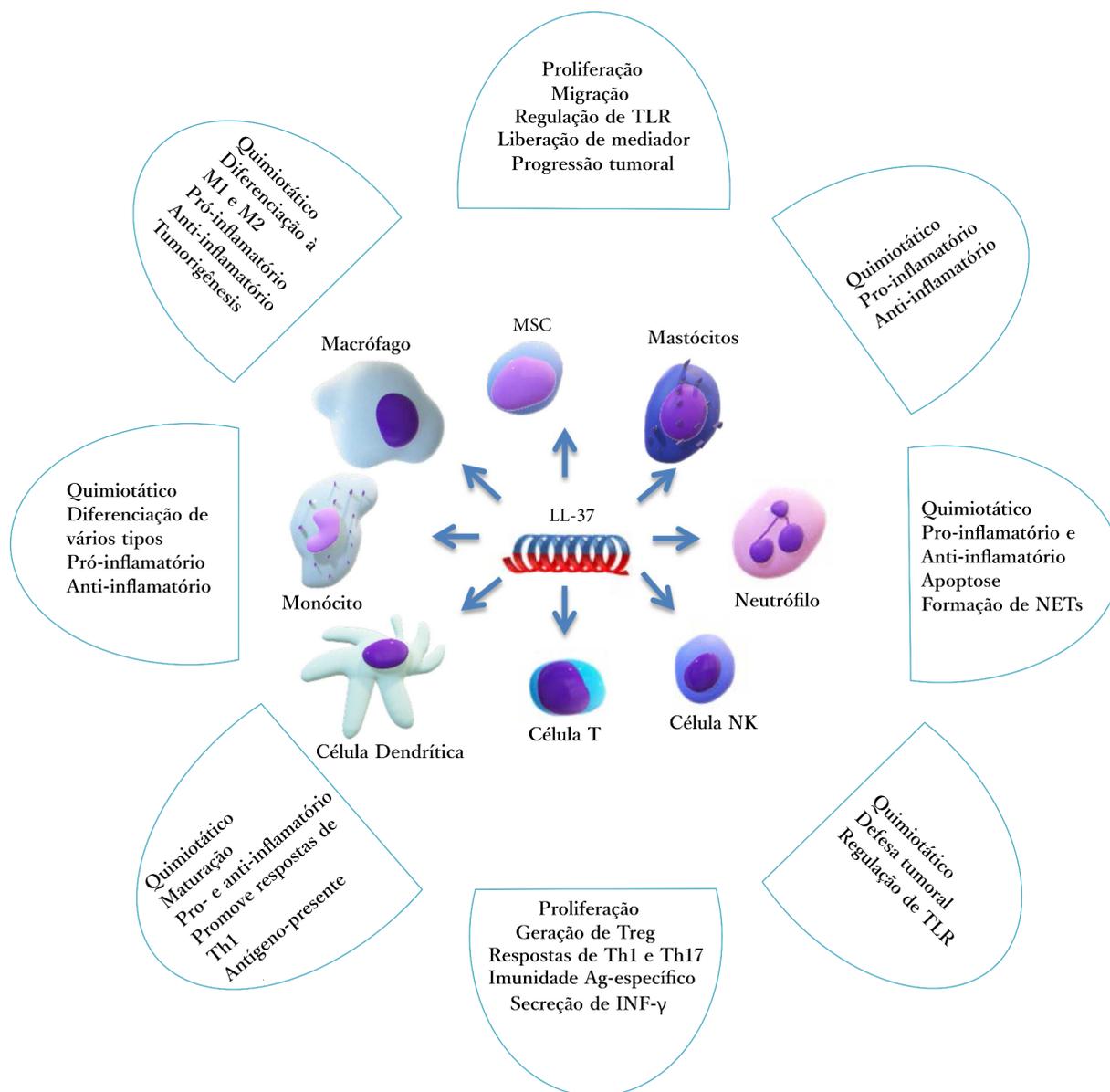
Inserido neste contexto, Yang e colaboradores desenvolveram um trabalho de revisão em 2021 que buscava sumarizar o perfil de expressão, a estrutura e os efeitos

imunomodulatórios do AMP LL-37. Em adição, no artigo se discute como este peptídeo pode ser inserido no tratamento de diversas doenças relacionadas a fenômenos inflamatórios (YANG et al, 2020).

LL-37 tem estrutura primária LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES. Em pH neutro, este peptídeo é anfipático catiônico de carga +6 e em ambientes de baixa concentração salina (mmol/L) ou membranosos, a catelicidina humana estrutura-se em α -hélice (YANG et al, 2020; AGHAZADEH, 2019). Sua superfície hidrofóbica catiônica permite interação com elementos carregados negativamente, como a parede celular de bactérias Gram-negativas, as quais apresentam em sua composição LPS (lipopolissacarídeos). Já sua porção N-terminal helicoidal é responsável pela oligomerização peptídica, resistência proteolítica, ação quimiotática e atividade hemolítica, enquanto a porção C-terminal está relacionada aos efeitos antimicrobianos da molécula (YANG et al, 2020; AGHAZADEH, 2019).

Após uma infecção bacteriana, LL-37 age como ponte entre o sistema imune inato (i. é, a primeira e imediata resposta a antígenos) e o sistema imune adaptativo (ou seja, a resposta imune adquirida após longa exposição ao patógeno) por meio de recrutamento direto de células imunocompetentes (incluindo neutrófilos, monócitos e células dendríticas) ao local da infecção bem como via modulação de imunidade adquirida através ação quimiotática, incitando a presença de macrófagos, mastócitos, células mesenquimatosas assim como células NK e linfócitos T (YANG et al, 2020; AGHAZADEH, 2019). Na figura 6 há um resumo de como a LL-37 influencia os diversos tipos de imunócitos durante uma infecção.

Figura 6. Função imunomodulatória de LL-37 nos principais agentes do sistema imune.



Fonte: Imagem adaptada e traduzida de YANG *et al.*, 2020.

Em acréscimo, com finalidade de manter o fino balanço entre respostas pró- e anti-inflamatórias, LL-37 regula a produção de quimiocinas (trata-se de um potente mediador/regulador de inflamação) e citocinas (proteínas secretadas que por meio de interações receptores-específico, afetam o comportamento de células vizinhas) (YANG et al, 2020).

Esta habilidade de preservar o balanço de ação pró- e anti-inflamatória é essencial à resistência a doenças. Portanto, qualquer modificação significativa no padrão de expressão de LL-37 promoverá um desbalanço potencialmente patológico (YANG et al, 2020). Ressalta-se o caso de algumas doenças auto-imunes, para as quais a superexpressão do gene codificante

de LL-37 resulta numa resposta imune desproporcional que tem como consequência a desregulação da homeostase (YANG et al, 2020). Estudos demonstraram que este comportamento é observado em diversos tipos de cânceres: de ovário, de pulmão, nos seios, melanoma maligno e de próstata. Conquanto, cânceres do tipo gastrointestinal e hematológicos revertem esse padrão, apresentando concentrações de LL-37 abaixo do normal. Adicionalmente, a sub-expressão de LL-37 causa um aumento na susceptibilidade a infecções e inflamações, tais como doenças do tipo periodontal (YANG et al, 2020)].

O trabalho conclui advogando a importância de LL-37 ao organismo humano, por se tratar de uma molécula essencial ao sistema imune inato que elimina invasores e restaura a homeostase. Adiciona que a atividade biológica do peptídeo deve prosseguir em incessante análise, por se tratar de um atrativo alvo para intervenção terapêutica em patologias infecciosas e inflamatórias (YANG et al, 2020; AGHAZADEH, 2019).

A relevância da atividade de LL-37 é evidente. No entanto, devido seu comportamento por vezes pouco previsível, para fins medicinais, busca-se um agente que possua capacidades imunomodulatórias similares mas, importante, controláveis. O desenho dos peptídeos da série CHIM sustenta-se neste conceito com exceção de que a ação destas moléculas está limitada somente à atividade agonista de FPR2 (receptores de peptídeos formilados do tipo 2) que LL-37 apresenta (YANG et al, 2020; AGHAZADEH, 2019), de modo que sejam mais facilmente direcionadas. Para a clivagem dos peptídeos é possível empregar enzimas de membrana especializadas no transporte de substâncias para o meio extracelular, nas quais destaca-se a SPase I. Deste modo, a liberação do agente quimiotático, com subsequente endereçamento da infecção, é mediada pelo próprio maquinário enzimático bacteriano, o que dificulta uma resposta de resistência por parte destes organismos (PAETZEL, 2013 e 2019).

A especificidade das moléculas da série CHIM foi pensada ao considerar uma importante enzima ao crescimento de bactérias: a SPase I (PAETZEL, 2013 e 2019). Esta protease ancorada à membrana bacteriana, por possuir alta fidelidade quanto ao sítio de hidrólise A-X-A de peptídeos líderes, é alvo potencial para o desenho de pró-peptídeos voltados para a liberação de agentes imunomodulatórios, tais como os peptídeos da série CHIM (PAETZEL, 2013 e 2019).

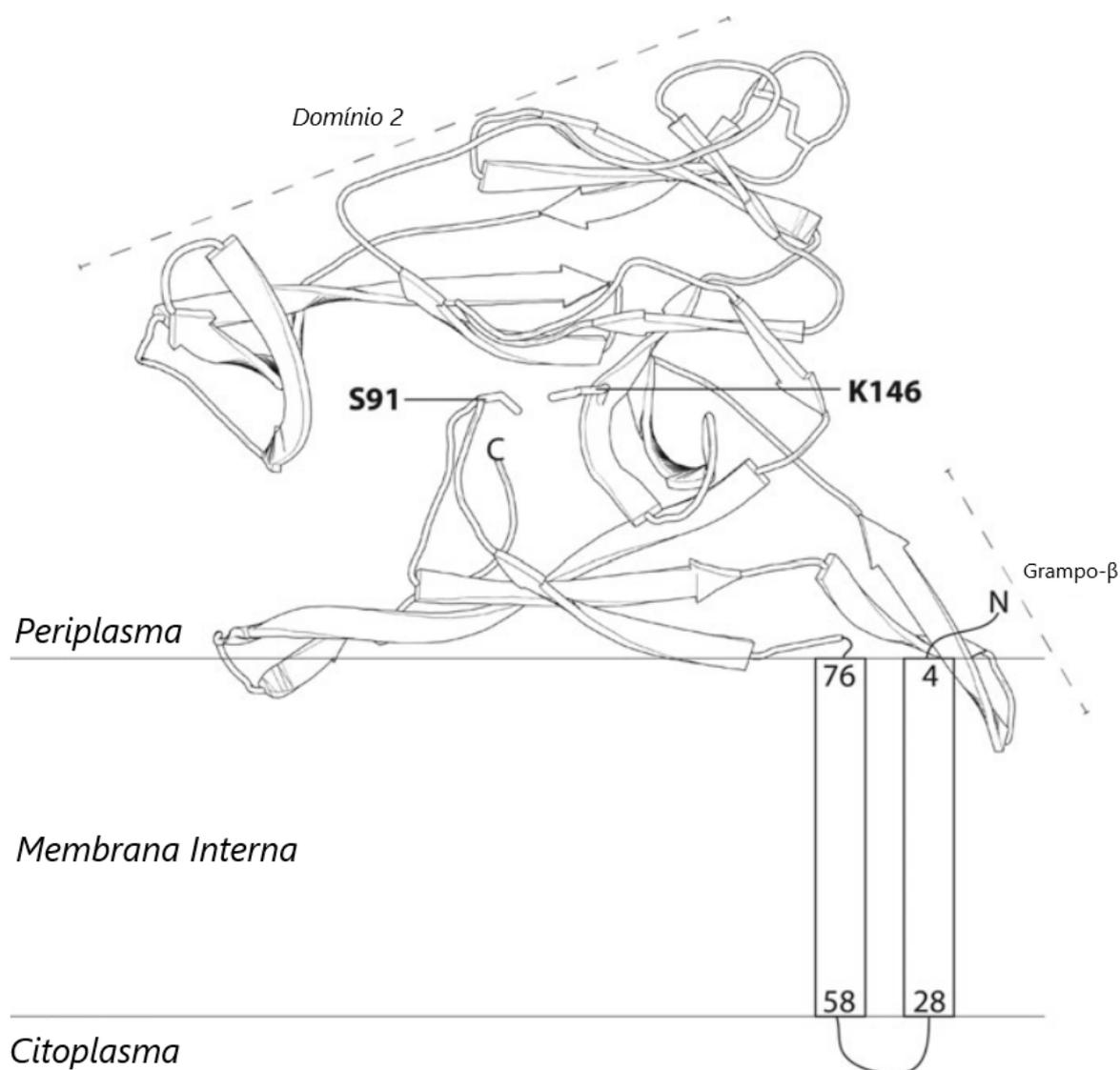
3.4. SPase I como um potencial alvo para hidrólise seletiva de peptídeos da série CHIM

Num trabalho de 2019, Paetzel discorreu sobre peptidases sinal de bactérias e como estas são potenciais alvos para o tratamento de infecções (PAETZEL, 2019). De acordo com a hipótese do sinal (tradução livre de *signal hypothesis*), as proteínas secretadas de atividade extracelular possuem, intrinsecamente, um sinal que as dirige para e através de membranas (TUTEJA, 2005; PAETZEL, 2019). Em procariotos e eucariotos, diversas proteínas exportadas do citoplasma são, inicialmente, sintetizadas com uma extensão de 15-30 aminoácidos denominada sequência líder, ou sinal. Estes peptídeos são clivados por enzimas de nome SPases (do inglês, *signal peptidases*). Trata-se de um requerimento para a liberação de proteínas maduras, as quais são destinadas ao periplasma, membrana externa ou para o ambiente extracelular. Destaca-se que os elementos básicos de secreção de proteínas conservam-se em todas as classes de células, sejam estas eucarióticas ou procarióticas (TUTEJA, 2005; PAETZEL, 2019).

A SPase do tipo 1 é responsável pela clivagem de peptídeos sinais para diversas proteínas a serem secretadas por bactérias. Esta enzima é capaz de reconhecer com alta fidelidade a sequência líder, a qual contém um padrão Ala-X-Ala antes do sítio de clivagem. Trata-se da regra (-3, -1), que advoga que os resíduos das posições -3 e -1 em relação ao sítio de hidrólise devem ser pequenos e neutros para que a clivagem ocorra (TUTEJA, 2005; PAETZEL, 2019).

A título de exemplo, a figura 7 demonstra a topologia de membrana bem como o enovelamento de proteína da SPase I de *E. coli*. Estudos demonstraram que os resíduos em destaque na imagem (Ser91 e Lys156) são essenciais para a atividade catalítica da enzima (PAETZEL, 2019; SMITH et al, 2012). Observa-se em adição que a protease é quase que completamente constituída de folhas- β e seus domínios não são diferentes: ambos se configuram em folhas- β antiparalelas, entretanto o domínio I, de superfície hidrofóbica, possui o diferencial de ser estruturado em unidade beta-beta (β -hairpin) (PAETZEL, 2019). O pH ótimo de atividade da enzima está compreendido entre 8,5 e 9 (TUTEJA, 2005; PAETZEL, 2019).

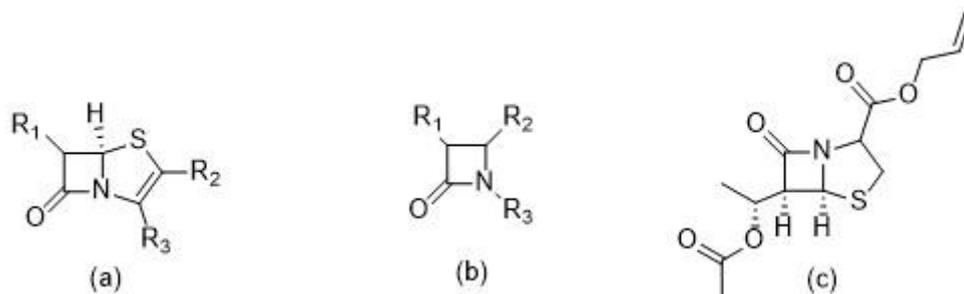
Figura 7. Representação de topologia de membrana e enovelamento de proteína da Spase I de *E. coli*. Os segmentos transmembranares, que não fazem parte da estrutura cristalina da enzima, estão retratados como retângulos.



Fonte: Adaptado e traduzido de PAETZEL, 2019.

Esforços significativos têm sido postos no desenvolvimento de inibidores de SPase I. Ilustrado na figura 9, o primeiro inibidor de Spase I reportado foi um composto do tipo β -lactam e, subsequentemente, inibidores do tipo penem foram desenvolvidos (PAETZEL, 2019). Posteriormente ao achado, um trabalho de Paetzel demonstrou, a partir da estrutura cristalina do complexo enzima-inibidor, que esta molécula, de nome alil (5S, 6S)-6-[(R)-acetoxietil]-penem-3-carboxilato, liga-se covalentemente ao O γ do resíduo Ser91, de modo a comprometer sua atividade catalítica. Em termos de concentração salina, estudos demonstram que NaCl (em concentrações acima de 160 mM) e MgCl₂ (em concentrações superiores a 1 mM) agem também como inibidores de SPases do tipo 1 (PAETZEL, 2019).

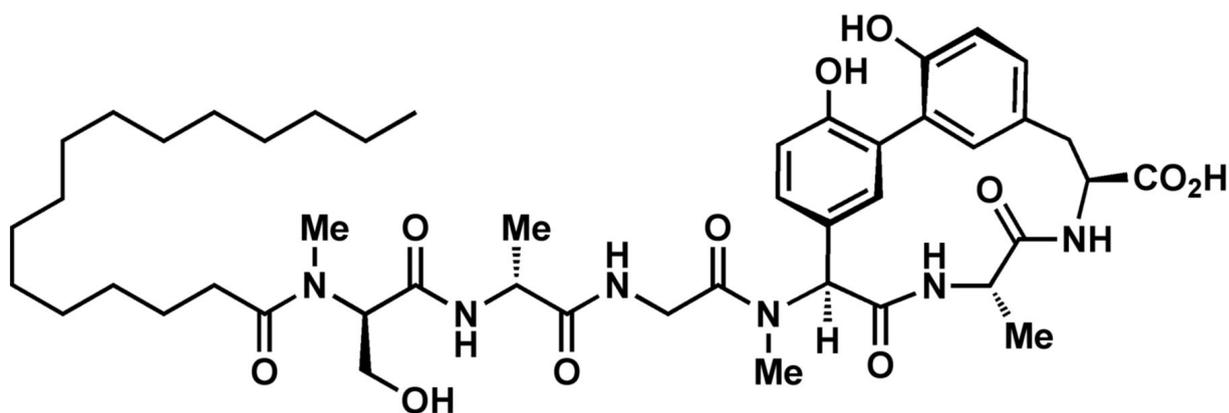
Figura 8. Estruturação geral de moléculas da família (a) penem, (b) β -lactam e (c) primeiro inibidor do tipo β -lactam de Spase I reportado, de nome alil (5*S*,6*S*)-6-[(*R*)-acetoxietil]-penem-3-carboxilato.



Fonte: PAETZEL, 2019.

Cita-se também a atividade dos antibióticos da classe arilomicinas. Tratam-se de lipopeptídeos que se subdividem em tipo A, B e C, sendo reportado que estas apresentam atividade inibitória contra SPases do tipo I *in vitro*. A priori, estudos sugeriram que o potencial antibacteriano das arilomicinas limitava-se a algumas poucas espécies, no entanto, trabalhos posteriores evidenciaram que por meio de interações não-covalentes, estas moléculas bloqueiam o acesso aos resíduos catalíticos da SPase I, impedindo o trânsito de polipeptídeos ao meio extracelular. Esse acúmulo de pré-proteínas no interior da célula causa, invariavelmente, morte celular. A figura 9 ilustra um exemplo de arilomicina do tipo A, denominada A-C₁₆ (PAETZEL, 2019; SMITH et al, 2012).

Figura 9. Estrutura de arilomicina A-C₁₆. Outros membros de família das arilomicinas são diferenciados com base no conteúdo de ácidos graxos na porção caudal ou por modificações no núcleo bifênol (SMITH et al, 2012).



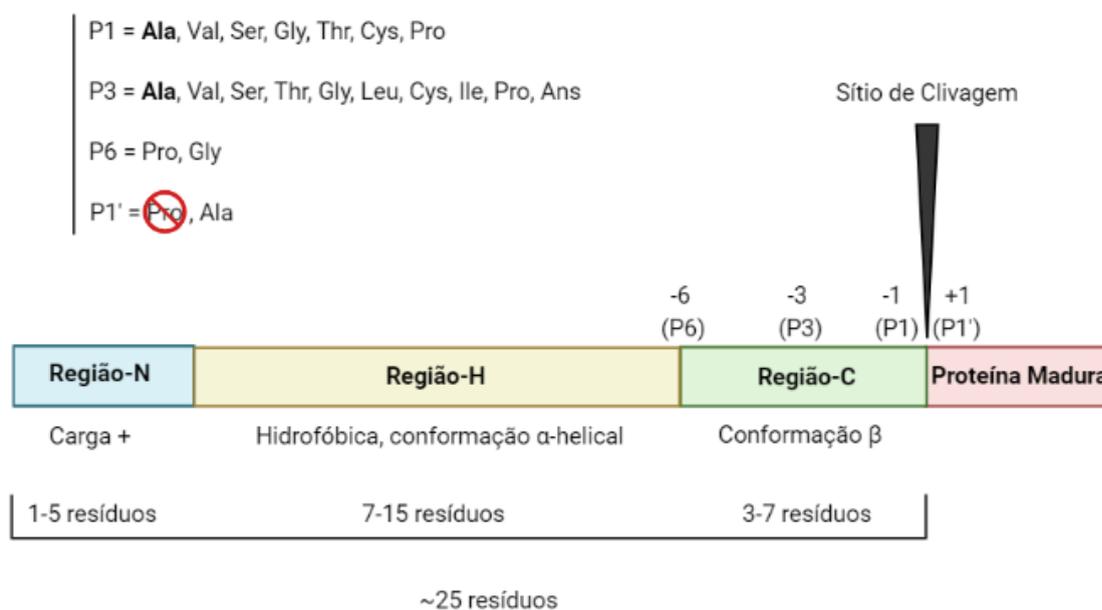
Fonte: Retirado e adaptado de SMITH e ROMESBERG, 2012.

Destaca-se, entretanto, que, concernente a SPase I, a inibição de sua atividade não é o único método viável no combate de infecções bacterianas. Devido a alta especificidade que a enzima tem para a clivagem de peptídeos sinais é possível explorar esta característica para

fins farmacológicos (TUTEJA, 2005; PAETZEL, 2019). Uma abordagem sustentada na hidrólise de moléculas de interesse por SPases do tipo I não foi, até então, investigada. Todavia, baseado no que se conhece sobre as propriedades físico-químicas de proteases sinal bacterianas, o desenvolvimento racional de moléculas que explorem a fidelidade destas enzimas quanto ao sítio de hidrólise A-X-A é, potencialmente, uma estratégia eficaz (TUTEJA, 2005; PAETZEL, 2019).

O peptídeo sinal a ser clivado pela SPase I possui regiões funcionais que são essenciais: 1. região - N, positivamente carregada composta por 1-5 resíduos; 2. região - H, de natureza hidrofóbica (sendo que a leucina é o resíduo mais comum), estrutura-se em α -hélice com uma sequência de 7-15 aminoácidos; 3. região - C, contém a sequência específica de clivagem (com 3-7 resíduos) e assume, muito provavelmente, uma conformação em folha- β e por fim, a proteína madura (TUTEJA, 2005; PAETZEL, 2019). Observa-se que estes panoramas gerais se mantiveram conservados ao longo da evolução das espécies (TUTEJA, 2005). Estas características estão destacadas na figura 10.

Figura 10. Diagrama esquemático do peptídeo sinal, representado pelas cores azul, amarelo e verde; a porção em vermelho corresponde à proteína madura que será liberada no processo de hidrólise.



Interessantemente, o tamanho da sequência do peptídeo líder varia a depender do tipo celular: para eucariotos a média é de 23 resíduos, para bactérias Gram-negativas, de aproximadamente 25 resíduos e para Gram-positivas, observa-se um comprimento médio de 32 aminoácidos. Uma hipótese defende que esta diferença ocorre em razão da espessura da bicamada lipídica de cada categoria de membrana (TUTEJA, 2005; PAETZEL, 2019).

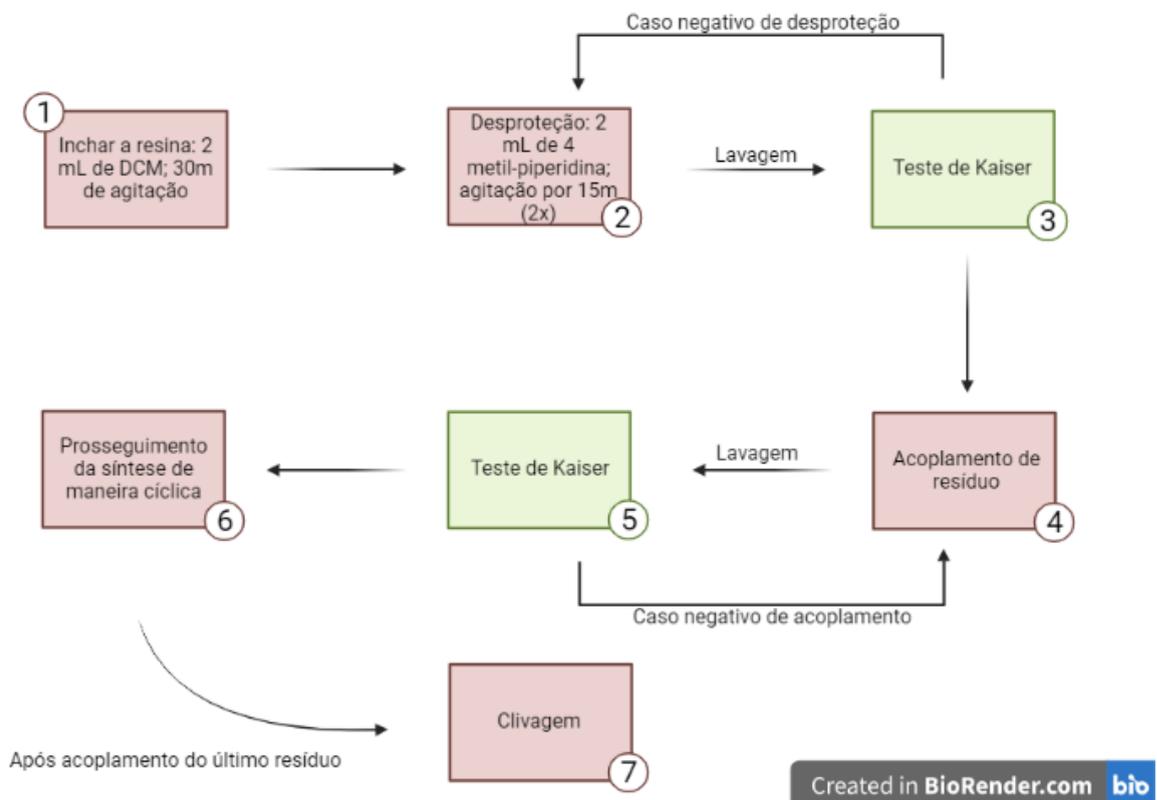
As características listadas corroboram com a ideia de que SPases do tipo I são potenciais alvos para ação farmacológica. Como fator mais chamativo, ressalva-se que a protease está exposta ao meio extracelular, característica que facilita a aproximação e favorece uma rápida cinética de agentes antibacterianos. E ainda, por estarem relacionadas a uma via metabólica essencial e complexa, as SPases procarióticas podem oferecer um modo de ataque que resulta em pouca resistência por parte das bactérias (TUTEJA, 2005; PAETZEL, 2019).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Síntese de peptídeo em fase sólida

A metodologia empregada para síntese de CHIM3-P (KWAVKIIRKFIKGGPPNPPQHKRWKYM) foi a de SPPS (síntese de peptídeos em fase sólida) via estratégia Fmoc/tBu (CHAN, WHITE, 2000). Trata-se de um processo que envolve primeiramente o preparo de resina, e segue para um ciclo de reação de desproteção, teste de Kaiser, reação de acoplamento e teste de Kaiser novamente. Esse padrão é mantido até que o último resíduo seja adicionado. Deste ponto, parte-se para a clivagem e desproteção das cadeias laterais do peptídeo. Este procedimento está descrito na figura 11.

Figura 11. Fluxograma de síntese de peptídeos em fase sólida.



Fonte: Criado pelo autor com biorender.com

4.1.1. Preparo da resina

A síntese foi realizada numa seringa de polipropileno a qual continha uma membrana porosa em seu interior a fim impedir a saída de materiais sólidos. A resina utilizada como suporte foi a Rink Amide à 0,70 mmol/g. Com finalidade de produzir 0,15 mmol de peptídeo, foram utilizados aproximadamente 250 mg de resina.

À seringa, foi adicionada a massa pesada de resina em adjunto a 2 mL de diclorometano. Em seguida, a solução foi levada para agitação por 30 minutos para “ativar” a resina.

4.1.2. Desproteção

Após a ativação, prosseguiu-se para uma seção de lavagem da resina com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM). A desproteção visa remover o grupo protetor, deixando o grupo amino livre para reagir. Este procedimento foi realizado adicionando cerca de 2 mL de 4-metilpiperidina em DMF (numa proporção 1:5, v/v) à seringa, que foi posta em agitação por 15 minutos. Para garantir a desproteção, esse processo foi feito duas vezes. Seguiu-se, por fim, para três seções de lavagens com DMF e DCM, empregando a cada ciclo aproximadamente 2 mL de cada.

4.1.3. Teste de Kaiser

A confirmação da desproteção foi feita pelo teste de Kaiser. Trata-se de um teste qualitativo que indica a presença de grupos amino livres (CHAN, WHITE, 2000). Portanto, é útil tanto para verificar a eficiência da desproteção, quanto para determinar a eficácia do acoplamento. Para tanto, alguns grãos das amostras foram transferidos a um tubo de ensaio, onde adicionou-se duas gotas de solução de ninhidrina à 5% (m/v) em etanol, duas gotas de solução de fenol à 80% (m/v) em etanol e por fim, duas gotas de solução de KCN em piridina (numa proporção 2 mL de KCN à 1 mmol/L em 98 mL de piridina) (CHAN, WHITE, 2000). A mistura foi levada para aquecimento a 120°C por cerca de 2 minutos. Se há grupos amino livres, observa-se uma nítida mudança de coloração dos grãos: estes são inicialmente translúcidos e passam a ser roxo/azulados em casos positivos. O contrário também é válido: a ausência de mudança de cor indica que não há grupos aminos livres, confirmando, por exemplo, que o acoplamento foi bem-sucedido (CHAN, WHITE, 2000).

4.1.4. Acoplamento de resíduos de aminoácidos

Uma vez confirmada a desproteção, foi possível acoplar um resíduo. O acoplamento do primeiro aminoácido ocorreu via ataque de grupo carboxila a um grupo amino que é disposto pela resina. O sentido de síntese foi, portanto, de C-terminal para N-terminal. Para que a ligação peptídica seja devidamente formada, é necessário, a priori, que o grupo carboxi seja ativado, i. é, que sua reatividade seja aumentada. Para este fim, utiliza-se Oxyma Pure: o composto, à presença de uma carbodiimida, reagiu com a porção C-terminal do resíduo, ativando-o (CHAN, WHITE, 2000). A quantidade de aminoácido protegido a ser adicionado é calculada de forma a se utilizar aproximadamente 0,15 mmol de resíduo. Logo, a massa acrescida foi variável. À seringa, verteu-se a massa de resíduo determinada, 85 mg de Oxyma Pure, 2 mL de DMF e 93 µL de diisopropilcarbodiimida (DIC). O meio foi submetido à agitação por 1h30.

Percorrido este tempo, retirou-se a porção líquida por filtração à vácuo e lavou-se o produto três vezes com DMF e DCM (aproximadamente 2 mL de cada). Parte da amostra segue para o teste de Kaiser, o qual servirá para atestar se o resíduo foi corretamente acoplado. Desta maneira, o ciclo pode ser reavido: desproteção, teste de Kaiser, acoplamento e teste de Kaiser até que o último resíduo seja aderido.

4.1.5. Clivagem

Quando finalizada a síntese, partiu-se para o procedimento padrão de clivagem da resina: preparou-se o coquetel composto de TFA/tioanisol/água/fenol/etanoditiol na proporção 82,5:5:5:2,5 (v/v) (CHAN, WHITE, 2000). O agente principal para a clivagem foi o ácido trifluoroacético, TFA, que é empregado para clivar peptídeos ancorados em resinas do tipo trialkoxibenzil-amina. Não obstante, sua ação não se limita somente à clivagem do produto, mas também promove a eliminação dos grupos protetores presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos.

Os demais reagentes visam evitar possíveis reações secundárias dos grupos de proteção retirados com os resíduos da cadeia formada, especialmente os aminoácidos ricos em densidade eletrônica, como por exemplo, o triptofano.

4.2. Purificação de peptídeo via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Para realizar a purificação do peptídeo, foi empregada a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*) em fase reversa. O monitoramento foi feito em dois comprimentos de onda: 216 nm e 280 nm (o primeiro está associado à faixa de absorção de ligações peptídicas enquanto o segundo concerne às cadeias laterais que possuem grupos aromáticos). Usou-se a coluna preparativa Júpiter 00G-4055-P0 C18 300 Å em gradiente de acetonitrila + 0,1% em TFA (v/v): de 0 a 5 minutos, a fase móvel possuía 5% de acetonitrila, em seguida, de 5 a 45 minutos, linearmente, a concentração de acetonitrila aumentou de 5 à 95%, na sequência, no intervalo de 45 e 55 minutos, manteve-se a concentração em 95% constante e finalmente, no período de 55 a 60 minutos reduziu-se de maneira linear até 5% em concentração do solvente. O procedimento foi executado no NuPMIA (Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia), na Faculdade de Medicina da UnB.

4.3. Caracterização de CHIM3-P por Espectrometria de Massa (MS)

A caracterização do peptídeo foi feita em função da razão carga/massa teórica com subsequente verificação de sequência, condizente com seu padrão de fragmentação. O espectrômetro de massa usado foi o do tipo TripleTof 5600+ (Sciex, Canadá) disponibilizado pela Central Analítica do Instituto de Química da UnB. Uma fonte de íons DuoSpray (ESI) foi usada e os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos em modo positivo. Foi utilizado o modo IDA de aquisição fragmentando íons com massa maior que 400 a 1250 Da, com intensidade superior a 1000 cps e moléculas de 1 a 4 cargas positivas, com temperatura da fonte de 500°C. Voltagem da fonte de 5200 Volts. A coluna utilizada foi da marca KINETEX® (phenomenex®) de 2,6µm, C-18 100 Å com dimensão de 50 x 2,1 mm acomodada em um forno mantido a 40°C

4.4. Cultura de *E. coli* e *S. aureus* e análise do perfil de digestão dos peptídeos CHIM3 e CHIM3-P

Os ensaios de digestão de CHIM3 e CHIM3-P foram feitos utilizando bactérias da espécie *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). Para o ensaio, as bactérias foram cultivadas em meio Mueller-Hinton ágar em uma estufa a 37°C por 18h, para a obtenção de bactérias com alta atividade metabólica. Após esse período, foi realizada uma suspensão bacteriana, medindo-se a Densidade Óptica (OD) para 600nm, para alcançar o equivalente a

1.5×10^8 células/mL, em PBS (Phosphate Buffered Saline) a 1M e o pH ajustado para 7,4. Essa suspensão foi incubada com o peptídeo CHIM3 e CHIM3-P na concentração de $5\mu\text{M}$, em triplicata, perfazendo um volume de 1 mL. A incubação teve um tempo total de 16h a 37°C sob agitação constante a 200 rpm. Transcorrido o tempo de incubação, a suspensão foi centrifugada a 4°C por 10 minutos a 5000 rpm, o sobrenadante foi separado e congelado a -20°C para análises posteriores. Ademais, o controle para este ensaio consistiu na incubação da suspensão bacteriana sem adição de peptídeo nas mesmas condições supracitadas, também em triplicata. Este procedimento foi realizado em colaboração com a Universidade Católica de Brasília, UCB.

O sobrenadante separado do ensaio de digestão do peptídeo foi submetido a uma extração em fase sólida (SPE, sigla em inglês para *solid phase extraction*). Os cartuchos da SPE, filtro cartucho SPE STRATA 100mg 3 mL com fase sólida sendo constituída por uma C-18, foram primeiramente preparados com 5 mL de acetonitrila, em seguida com 5 mL de água. Depois de preparados, os cartuchos foram carregados com a amostra do sobrenadante descrito no item anterior e lavado com 3 mL de água. Posteriormente, o retentato foi eluído com 1 mL de acetonitrila e congelado a -20°C para posteriormente ser levado para análise de LC-MS.

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

O gradiente utilizado e o método cromatográfico foram ajustados para priorizar a separação mais eficiente dos fragmentos gerados na digestão. Foi utilizado para a fase móvel Água (Fração A) e Metanol (Fração B) ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico e uma vazão de 0,4mL/min. A corrida teve um tempo total de 23 minutos com um gradiente de 0-2 minutos com 5% do solvente B, 2-12 minutos de 5 a 40% do solvente B, 12-16 minutos de 40 a 95% do solvente B, de 16-17 minutos uma diminuição do solvente B de 95% para 5% mantendo essa concentração até o final da corrida. A análise dos dados obtidos no LC-MS

para a obtenção das áreas de cada sinal das frações proteicas para uma posterior relação com a concentração de CHIM3 foi feita utilizando o Software MultiQuant (<https://sciex.com/products/software/multiquant-software>). A plotagem do gráfico e análise de dados obtidos foi feita utilizando o Software GraphPad Prism 7.04 (<https://www.graphpad.com/>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese do peptídeo CHIM3-P (KWAVKIIRKFIKGPPNPPQHKRWKYM-NH₂) foi realizada a partir da técnica de síntese de peptídeos em fase sólida empregando a estratégia Fmoc/tBu e, a fim de se obter o maior rendimento possível, um pequeno excesso de reagentes sólidos foi utilizado.

A síntese procedeu convencionalmente, com exceção das etapas de acoplamento dos quatro primeiros resíduos, os quais foram adicionados em uma escala aumentada: uma vez que o quarto resíduo fora acoplado, dividiu-se a massa da resina proporcionalmente e prosseguiu-se com a síntese. Ademais, uma dificuldade para atestar o acoplamento efetivo do resíduo de prolina da 10^a e da 12^a etapa via teste de Kaiser foi observada, onde normalmente os grânulos de resina mostrariam-se completamente transparentes, nestas ocasiões, encontravam-se levemente translúcidos. Isso ocorre pois o teste de Kaiser não é confiável para detecção de aminas secundárias, o que gera, em alguns casos, incerteza quanto ao sucesso do acoplamento (CHAN, WHITE, 2000). Outros resíduos de aminoácido também podem ser problemáticos, pois a coloração típica em azul-escuro não é sempre observada: serina, asparagina e ácido aspártico (CHAN, WHITE, 2000).

A tabela 3 dispõe os dados para cada etapa da síntese, as massas de Oxima utilizadas (m_O - para uma massa de referência igual a 0,085g), as massas de aminoácido protegido (m_{aa}) bem como as massas de referência para os resíduos protegidos, (m_{ar}), que equivale a 0,15 mmol de material.

Tabela 3. Massas, em gramas, dos reagentes sólidos empregadas para cada etapa da síntese bem como as massas de referência para os resíduos protegidos. Res. Adc. - resíduo adicionado; m_O - massa de Oxima; m_{aa} - massa de aminoácido protegido; m_{ar} - massa referência de aminoácido protegido.

Res. Adc.	m_O (g)	m_{aa} (g)	m_{ar} (g)
1° - M	0,0893	0,2538	0,2229

2° - Y	0,1117	0,3569	0,3545
3° - K	0,1116	0,3648	0,3614
4° - W	-	-	0,4063
5° - R	0,0911	0,3910	0,3893
6° - K	0,0892	0,2829	0,2811
7° - H	0,0898	0,3721	0,3718
8° - Q	0,0891	0,3692	0,3664
9° - P	0,0892	0,2070	0,2024
10° - P	0,0902	0,2071	0,2024
11° - N	0,0899	0,3588	0,3580
12° - P	0,0908	0,2060	0,2024
13° - P	0,0903	0,2054	0,2024
14° - G	0,0906	0,1820	0,1784
15° - K	0,0915	0,2830	0,2811
16° - I	0,0906	0,2143	0,2121
17° - F	0,0911	0,2384	0,2325
18° - K	0,0899	0,2858	0,2811
19° - R	0,0899	0,3913	0,3893
20° - I	0,0915	0,2165	0,2121
21° - I	0,0907	0,2148	0,2121
22° - K	0,0896	0,2866	0,2811

23° - V	0,0907	0,2070	0,2036
24° - A	0,0891	0,1900	0,1868
25° - W	0,0898	0,3184	0,3160
26° - K	0,0902	0,2838	0,2811

Finalizado o último acoplamento, partiu-se para desproteção e seguiu-se para a etapa final de clivagem. O produto bruto foi extraído e posteriormente liofilizado. Deste ponto, o sólido foi submetido à purificação via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A metodologia empregada seguiu como foi descrito no subitem 4.2. A figura 12 ilustra o cromatograma obtido para CHIM3-P, o qual apresentou um sinal intenso ($> 3,0 \times 10^6$ (a.u)) com um tempo de retenção de aproximadamente 23,8 minutos. A coleta se deu em duas partes: a priori, o primeiro pico, de menor intensidade (figura 13), foi coletado logo após a subida do sinal, em 23,25 minutos até a pouco além da região de máximo do pico, em 23,46 minutos; em seguida, partiu-se para coleta da espécie de interesse num tempo de retenção aproximado de 23,65 minutos (região correspondente à intensificação do sinal) até a região anterior a base descendente do sinal em 24,10 minutos.

Figura 12. Purificação de CHIM3-P. O pico em aproximadamente 24 minutos diz respeito ao polipeptídeo CHIM3-P, com outros picos de menor intensidade representando subprodutos de síntese.

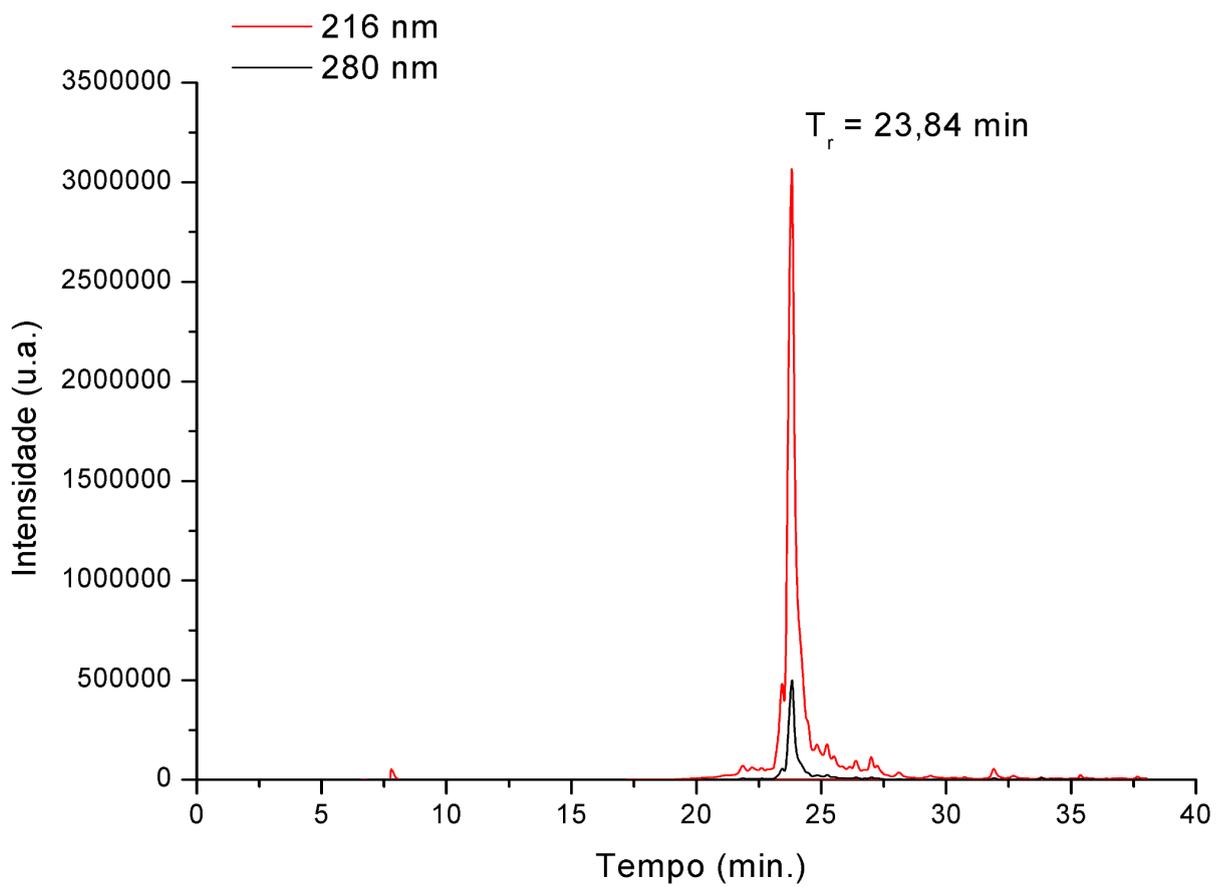
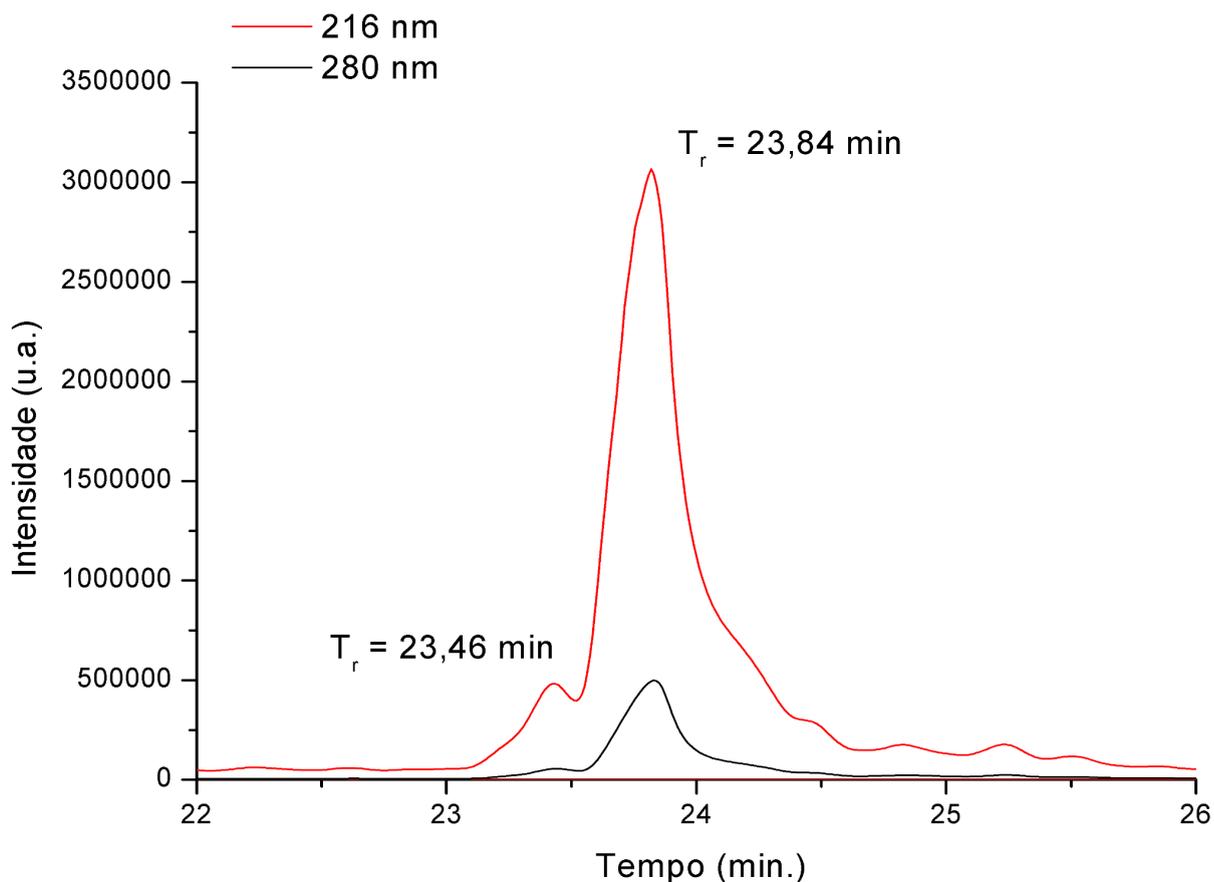


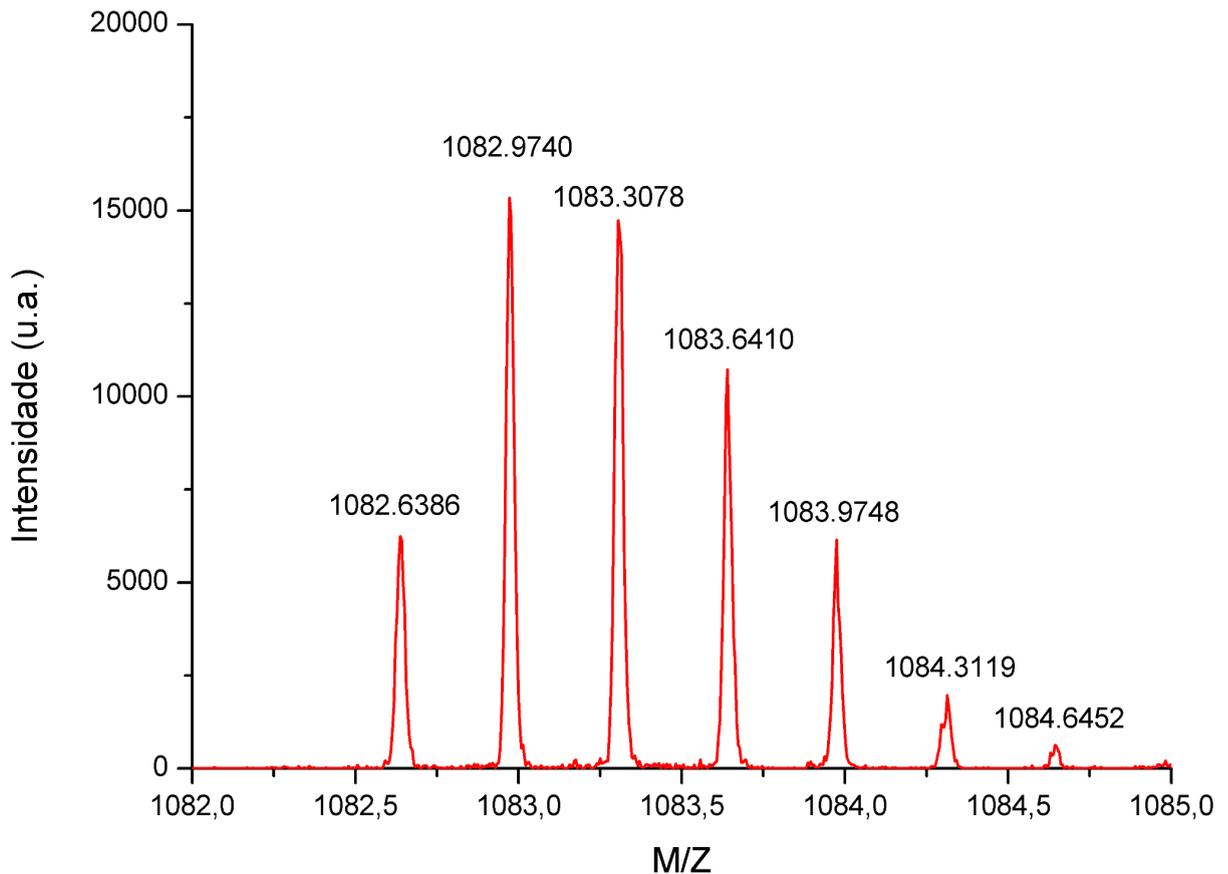
Figura 13. Ampliação da região dos picos do cromatograma no tempo onde a coleta foi realizada.



O cromatograma evidencia que o peptídeo foi sintetizado de maneira satisfatória, gerando poucos subprodutos, pois, fora o sinal relativo a CHIM3-P, os demais picos foram pouco numerosos e de baixa intensidade, demonstrando, assim, um bom grau de pureza.

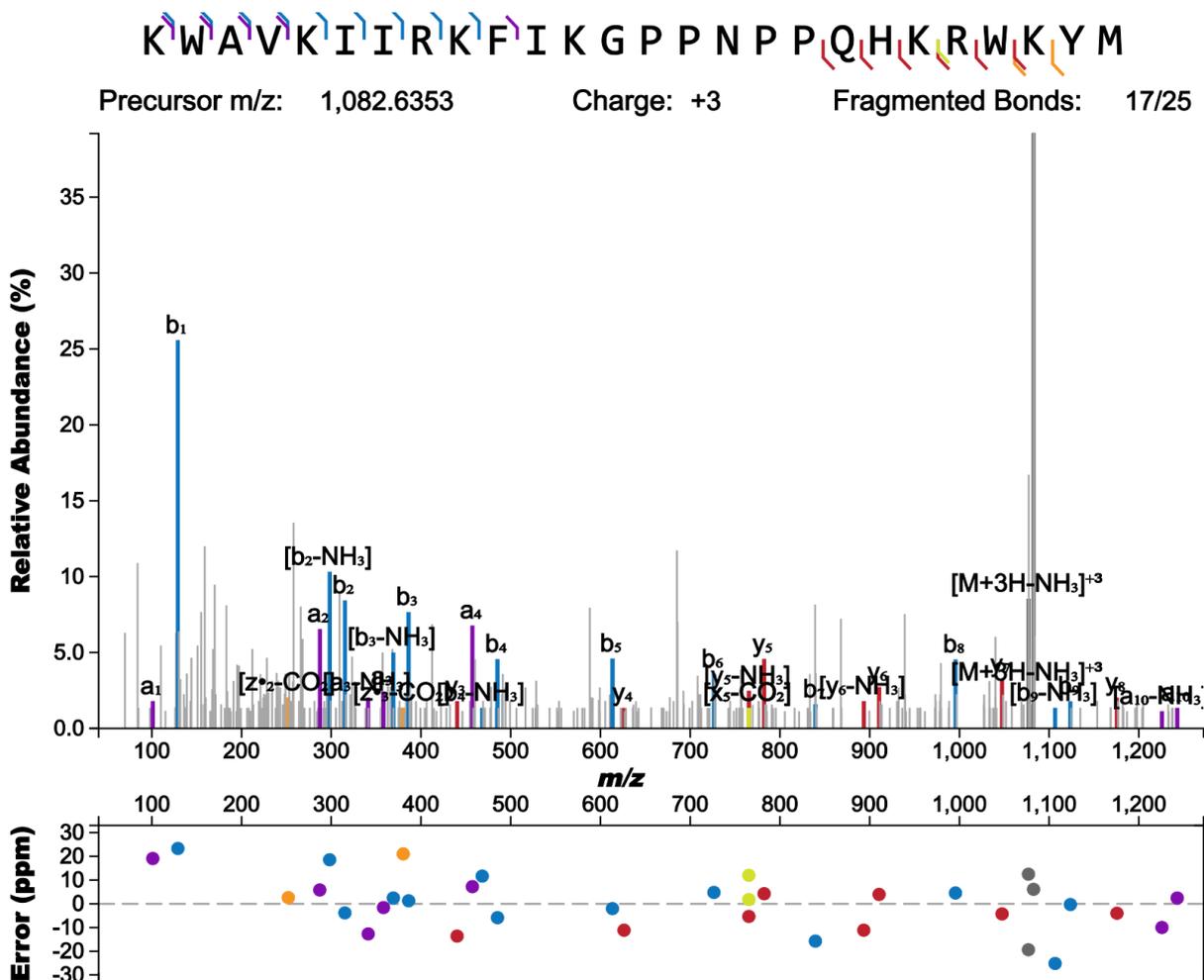
O material purificado foi, em seguida, caracterizado por espectrometria de massa (MS e MS/MS), confirmando a massa e a estrutura primária do polipeptídeo CHIM3-P. A massa obtida por MS, com predominância da espécie com tripla carga $[M+3H]^{3+} = 1082.6386$ Da, encontra-se em concordância com a massa monoisotópica teórica calculada de $[M+3H]^{3+} = 1082.6344$ Da (erro = 3,88 ppm). A figura 14 ilustra a série isotópica para CHIM3-P.

Figura 14. Espectro MS de CHIM3-P em referência ao peptídeo com tripla carga positiva ($[M+3H]^{3+}$) e sua série isotópica.



O íon precursor foi fragmentado, o que gerou um espectro de MS/MS. A partir da análise do espectro (ilustrado na figura 15) foi possível, de modo parcial, assinalar a estrutura primária do polipeptídeo. Para tanto, o sequenciamento foi feito com uso dos íons gerados nas fragmentações provenientes da quebra de ligações peptídicas, gerando as chamadas séries u- e b-. Essas ligações foram fragilizadas em razão da mobilidade dos prótons, que agiram da destabilização do esqueleto peptídico, facilitando o rompimento das ligações e a formação das espécies iônicas que retém a carga, as quais são detectadas pelo equipamento operando em modo positivo. A massa dos resíduos de aminoácidos da estrutura primária pode ser determinada pela diferença entre os íons de uma mesma série.

Figura 15. Espectro de MS/MS e sequenciamento de CHIM3-P; o padrão de fragmentação confirma, parcialmente, a série -b da estrutura primária do peptídeo.



O espectro MS/MS de CHIM3-P torna perceptível que alguns fragmentos não apresentam sinais com intensidade suficientemente forte para propiciar o sequenciamento, principalmente na região rica em prolina. Entretanto, o espectro nos permite concluir que o peptídeo foi sintetizado corretamente, i. e, a estrutura primária condiz com a sequência de aminoácidos pré-estabelecida. Para realizar o escrutínio na região não detectada, é necessário que se faça um espectro de melhor qualidade, com uma sensibilidade aumentada.

Devido à indisponibilidade do cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas do Instituto de Química da Universidade de Brasília, cujo sistema de resfriamento encontrava-se fora de serviço, não foi possível conduzir os ensaios de perfil de digestão de *E. coli* e *S. aureus* dos peptídeos CHIM3 e seu análogo modificado CHIM3-P em tempo hábil para entrega deste trabalho.

6. CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento do que foi proposto para este trabalho, foi possível concluir a síntese do polipeptídeo CHIM3-P (KWAVKIIRKFIKGPPNPPQHKRWKYM-NH₂). Em adjunto à caracterização via espectrometria de massas, o qual confirmou a massa monoisotópica de $[M+3H]^{3+}$ e a estrutura primária do peptídeo, seguida da purificação por cromatografia líquida de alta eficiência, que demonstrou que a síntese se procedeu eficientemente, gerando poucos subprodutos. Entretanto, devido a um entrave de natureza técnica, não foi possível cumprir tudo o que havia sido proposto, em especial, os ensaios de digestão de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* dos peptídeos CHIM3 e CHIM3-P.

Como perspectiva, pretende-se prosseguir a incubação da molécula em culturas de *E. coli* e *S. aureus* para investigar seu perfil de digestão via cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. O equipamento já encontra-se operacional e tais experimentos serão realizados em breve.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGHAZADEH, H. et al. The activity and action mechanism of novel short selective LL-37-derived anticancer peptides against clinical isolates of *Escherichia coli*. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 93, n. 1, p. 75–83, 1 jan. 2019.
- CASTEL, G., Chtéoui, M., Heyd, B., & Tordo, N. (2011). Phage display of combinatorial peptide libraries: Application to antiviral research. *Molecules*, 16(5), 3499–3518.
- CHAN, W. C., & White P. W. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. B. D. Hames: New York, 2000.
- FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: Form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 11, n. 1, p. 37–51, 2012
- FRANCISCO, A. et al. *Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde*. Brasília - DF: [s.n.]. Disponível em: <www.gov.br/anvisa/pt-br>.
- GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. [S. l.]: World Health Organization, 2015. 45 p. ISBN 978924150976. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>. Acesso em: 5 jul. 2022.
- GORDON, Y. et al. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Current Eye Research*, [s. l.], v. 30, ed. 7, p. 505-515, 30 jul. 2005. DOI <https://doi.org/10.1080/02713680590968637>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16020284/>. Acesso em: 5 jul. 2022.
- HUAN, Y. et al. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], v. 11, p. 1-21, 16 out. 2020. DOI <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33178164/>. Acesso em: 5 jul. 2022.
- LEI, J. et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of translational research*, [s. l.], v. 11, ed. 7, p. 3919-3931, 5 set. 2016.
- LI, S. et al. The structure-mechanism relationship and mode of actions of antimicrobial peptides: A review. *Trends in Food Science & Technology*, [s. l.], v. 109, p. 103-115, 10 mar. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092422442100008X?via%3Dihub>. Acesso em: 5 jul. 2022.
- MATSUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1788, n. 8, p. 1687–1692, 2009.

MORAVEJ, H. et al. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, [s. l.], v. 24, ed. 6, p. 747-767, 29 jun. 2018. DOI <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0392>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29957118/>. Acesso em: 5 jul. 2022.

MULDER, K. C. L., Lima, L. A., Miranda, V. J., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2013). Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Frontiers in Microbiology*, 4(October), 1–23.

PAETZEL, M. Bacterial Signal Peptidases. In: *Subcellular Biochemistry*. [s.l.] Springer New York, 2019. v. 92p. 187–219.

PAETZEL, M. Structure and mechanism of *Escherichia coli* type I signal peptidase. *Biochimica et biophysica acta*, [s. l.], v. 1843, ed. 8, p. 1497-1508, 11 dez. 2013. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.12.003>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24333859/>. Acesso em: 5 jul. 2022.

POWERS, J. P. S.; HANCOCK, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, v. 24, n. 11, p. 1681–1691, 2003.

SILHAVY, T. J. et al. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*, [s. l.], v. 2, ed. 5, p. 103-115, 14 maio 2010. DOI <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20452953/>. Acesso em: 3 set. 2022.

SMITH, P. A.; ROMESBERG, F. E. Mechanism of action of the arylomycin antibiotics and effects of signal peptidase I inhibition. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 10, p. 5054–5060, out. 2012.

SOHLENKAMP, C. et al. Bacterial membrane lipids: Diversity in Structures and Pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, [s. l.], v. 40, ed. 1, p. 133-159, 5 set. 2015. DOI <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/40/1/133/2467617>. Acesso em: 5 jul. 2022.

TUTEJA, R. Type I signal peptidase: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, [s. l.], v. 441, ed. 3, p. 107-111, 15 set. 2005.

VERJANS, A. et al. Molecular mechanisms of LL-37-induced receptor activation: An overview. *Peptides*, [s. l.], v. 85, p. 16-26, 5 set. 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.09.002>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27609777/>. Acesso em: 5 jul. 2022.

WEI, L. et al. Bacterial Spheroplasts as a Model for Visualizing Membrane Translocation of Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, [s. l.], v. 60, ed. 10, p.

6350-53, 23 set. 2016. DOI <https://doi.org/10.1128/AAC.01008-16>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01008-16>. Acesso em: 17 out. 2022.

YANG, B et al. Significance of LL-37 on Immunomodulation and Disease Outcome. *BioMed research international*, [s. l.], v. 2020, p. 1-16, 16 maio 2020. DOI <https://doi.org/10.1155/2020/8349712>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/8349712/>. Acesso em: 5 jul. 2022.