

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto De Ciências Biológicas

Pós-Graduação Em Bioquímica E Imunologia

John Alexanders Amaya Parra

**LUNATINAS: UM ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO DE
PEPTÍDEOS BIOATIVOS MULTIFUNCIONAIS**

Belo Horizonte

2023

John Alexanders Amaya Parra

**LUNATINAS: UM ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO DE
PEPTÍDEOS BIOATIVOS MULTIFUNCIONAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências: Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana T. Quezado de Magalhães

Coorientador: Prof. Dr. Adriano M. de Castro Pimenta

Belo Horizonte

2023

043

Parra, John Alexanders Amaya.

Lunatinas: um estudo da relação estrutura-função de peptídeos bioativos multifuncionais [manuscrito] / John Alexanders Amaya Parra. – 2023.

178 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana T. Quezado de Magalhães. Coorientador: Prof. Dr. Adriano M. de Castro Pimenta.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Venenos de Escorpião. 3. Peptídeos bioativos. I. Magalhães, Mariana T. Quezado de. II. Pimenta, Adriano M. de Castro. III. Universidade Federal de Minas. Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia
 ICB/UFMG Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE JOHN ALEXANDERS AMAYA

PARRA. Aos vinte e dois dias do mês de setembro de 2023 às 13:00 horas, reuniu-se de forma “on line”, utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Lunatinas: um estudo da relação estrutura-função de peptídeos bioativos multifuncionais”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof^a. Mariana Torquato Quezado de Magalhães, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Rafaela Salgado Ferreira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Adolfo Henrique Moraes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Rodrigo Moreira Verly (Universidade Federal dos V. do Jequitinhonha e Mucuri), aprovado; Dr. Marcelo Porto Bemquerer (Embrapa Gado de Leite), aprovado; Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta - Coorientador (Institute Lady Davis - Jewish General Hospital), aprovado; Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO

REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de setembro de 2023.

Dra. Rafaela Salgado Ferreira (UFMG)

Documento assinado digitalmente



ADOLFO HENRIQUE DE MORAES SILVA
 Data: 21/11/2023 16:13:21-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Adolfo Henrique Moraes (UFMG)

Documento assinado digitalmente



RODRIGO MOREIRA VERLY
 Data: 30/10/2023 13:05:31-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

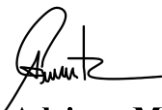
Dr. Rodrigo Moreira Verly (Universidade Federal dos V. do Jequitinhonha e Mucuri)

Documento assinado digitalmente



MARCELO PORTO BEMQUERER
 Data: 27/10/2023 15:44:13-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Marcelo Porto Bemquerer (Embrapa Gado de Leite)



Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta - Coorientador (Institute Lady Davis -Jewish General Hospital)



Documento assinado digitalmente

MARIANA TORQUATO QUEZADO DE MAGALHAE

Data: 21/11/2023 17:07:53-0300

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

Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães - Orientadora (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Enxergar problemas e falar o que poderia ter sido feito é fácil, se posicionar para resolver algum, em especial um alheio, só os corajosos fazem. Agradeço à minha orientadora Mariana Quezado, por ter me dado a oportunidade de realizar este projeto num momento em que parecia que tudo já tinha acabado, agradeço pela confiança, dedicação, compreensão, paciência e incentivo. Pelos contínuos “John vai dar certo”. Agora ela sabe que: Bogotá tiene diez millones de personas.

Ao meu coorientador Adriano Pimenta, com quem iniciei esta caminhada no mundo dos peptídeos no meu mestrado, por me deixar escolher os meus próprios peptídeos com os que tive a oportunidade de aprender demais. Pelas conversas científicas e as de rock. A gente não logrou demonstrar a existência dos criptídeos de flavivirus, mas logo logo vamos ver trabalhos disso.

Ao meu coorientador não oficial Bruno Santos, antes de colega um amigo, obrigado pela amizade, paciência, dedicação e ensinamentos, por saber quando dar uma dica para encontrar o NOE que estava gritando na minha cara, mas que minha paciência estourada ou a fadiga não me deixavam ver ele.

Agradeço a professora e antiga coordenadora Leda Quercia, sua ajuda foi fundamental para culminar esta etapa. Quem conhece a Leda, sabe a mulher brilhante, inteligente e o coração grande que tem para ajudar os outros.

Aos colegas e amigos do LBM, por estar sempre na torcida e pelos bons momentos.

Aos antigos membros do LVTA com quem dei muitas risadas e comecei a treinar meu portunhol, em especial a Edleusa.

Aos amigos Africanos, Peruanos, Colombianos, e claro os Brasileiros que o meu Brasil me permitiu conhecer e levar para o resto da vida.

Ao pessoal da UFMG que direta ou indiretamente participou para a elaboração deste trabalho.

Aos membros da banca por ter aceito o convite e por todas as sugestões feitas.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Às pessoas que sempre acreditaram em mim, que enxergavam coisas que eu mesmo nem acreditava.

Aos meus orientadores do curso de Licenciatura em Química na Colômbia, Adis Ayala e Jhon Sutachan. Parece que foi ontem (7 anos) que falei para eles sobre a chance de ir para o Brasil, e imediatamente fizeram tudo o que podiam para me ajudar.

Aos amigos do meu bairro em Bogotá e da federal Distrital Francisco José de Caldas.

A minha família, tios, primos, sobrinhos, meus avós, a eles que se juntaram e me desejaram tudo o melhor para esse desafio que foi sair de casa a enfrentar um novo mundo.

A Ferney Intencipa “Yuka”, por su tiempo y amistad estos años, gracias por escuchar, por sus consejos y por ser el psicólogo que la vida me dio cuando más lo necesitaba.

A minha namorada Isabella Lana, muito obrigado meu amorzaum por tudo o seu carinho, amizade, parceria, por estar do meu lado quando mais precisava, pela paciência e incentivo para terminar esta etapa, por todas as brincadeiras que me fizeram rir até chorar e por poder chorar para depois rir. Vamos cumbiar y comer sudado de pollito.

A mis padres y a mis hermanos, sin su ayuda nada de esto sería posible. A mi papá Ismael Amaya por ser un ejemplo de tenacidad, constancia y perseverancia para lograr los objetivos, a mi mamá Estefania Parra por todo su amor, apoyo y comprensión, por sobreponerse a la tristeza de no abrazar a un hijo después de 6 años. A mis hermanos Lady Amaya e Ismael Amaya, su empeño, dedicación y todas las muestras de amor.

A Deus e a vida por ser tão generosa e ter me dado esta oportunidade de viver e ser quem sou.

Gracias Totales.

RESUMO

As Lunatinas são uma família de peptídeos encontrados no veneno do escorpião *Hadruroides lunatus*, conhecidos por suas diversas atividades biológicas, incluindo ação antimicrobiana, antitumoral e inibição de fosfatases. Entre essas, a Lunatina-1 (L1) se destaca como um peptídeo hidrofóbico de treze resíduos, notável por suas atividades antimicrobianas, de penetração celular e antitumorais. Esta tese aprofundou a compreensão das relações entre a estrutura tridimensional adotada pelo peptídeo e suas múltiplas funções biológicas. Foi observada uma similaridade de sequência de 70-85% do peptídeo L1 com os peptídeos das famílias Temporinas, Maximinas e Caeruleina, os quais são conhecidamente antimicrobianos. Testes de viabilidade celular em linhagens NHDF e células HL-60 demonstraram que a substituição glicina-4-alanina (L1-G4A) aumentou as atividades antitumorais e citotóxicas, enquanto a substituição lisina-7-alanina (L1-K7A) resultou em perda da atividade antitumoral, sem alterar o perfil de atividade do peptídeo L1 nas células NHDF. Outros análogos mostraram redução de 25-75% na atividade antitumoral. Ademais, análogos citotóxicos foram obtidos para a NHDF, com destaque para L1-T8A. Sendo assim, escolhemos três análogos com comportamentos diversos para avaliar a relação estrutura-função por meio da ressonância magnética nuclear (RMN) em diferentes meios miméticos membranares. Enquanto a L1 apresentou uma conformação parcialmente helicoidal com extremidade N-terminal desenovelada, a L1-G4A exibiu uma estrutura α -helicoidal enovelada, em ambos os meios miméticos. O L1-T8A revelou enovelamento α -helicoidal com extremo N-terminal possivelmente menos flexível. Já o análogo L1-F12A mostrou-se com maior anfipaticidade e estabilidade estrutural, embora tenha apresentado redução na atividade antitumoral. Estes resultados destacam a importância do arranjo dos resíduos e da estrutura na atividade de peptídeos bioativos, bem como no processo de desenho racional de novos peptídeos. Essas descobertas têm implicações promissoras no desenvolvimento de peptídeos bioativos com atividades direcionadas e específicas para os alvos desejados.

Palavras-chave: Lunatinas; peptídeos bioativos; estrutura-função; desenho racional de peptídeos.

ABSTRACT

Lunatins are a family of peptides found in the venom of the scorpion *Hadruroides lunatus*, known for their various biological activities, including antimicrobial action, antitumor effects, and phosphatase inhibition. Among them, Lunatin-1 (L1) stands out as a hydrophobic peptide consisting of thirteen residues, notable for its antimicrobial, cell-penetrating, and antitumor activities. This thesis deepened the understanding of the relationships between the three-dimensional structure adopted by the peptide and its multiple biological functions. A sequence similarity of 70-85% was observed between the L1 peptide and peptides from the Temporin, Maximin, and Caerulein families, which are known to be antimicrobial. Cell viability tests on NHDF and HL-60 cell lines demonstrated that the substitution of glycine-4-alanine (L1-G4A) increased antitumor and cytotoxic activities, while the substitution of lysine-7-alanine (L1-K7A) resulted in loss of antitumor activity, without altering the activity profile of L1 peptide in NHDF cells. Other analogs showed a reduction of 25-75% in antitumor activity. Additionally, cytotoxic analogs were obtained for NHDF, with L1-T8A standing out. Therefore, we chose three analogs with diverse behaviors to evaluate the structure-function relationship through nuclear magnetic resonance (NMR) in different membrane-mimetic environments. While L1 presented a partially helical conformation with an uncoiled N-terminal end, L1-G4A exhibited a coiled α -helical structure in both mimetic environments. L1-T8A revealed α -helical coiling with a possibly less flexible N-terminal end. On the other hand, the L1-F12A analog showed greater amphipathicity and structural stability, although it exhibited a reduction in antitumor activity. These results highlight the importance of residue arrangement and structure in the activity of bioactive peptides, as well as in the rational design process of new peptides. These findings have promising implications in the development of bioactive peptides with targeted and specific activities for desired targets.

Keywords: Lunatins; bioactive peptides; structure-function; rational peptide design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas de peptídeos derivados de venenos animais.	21
Figura 2. Representações das estruturas tridimensionais principais de peptídeos AMP.....	26
Figura 3. Esquema ilustrativo dos modelos de interação de AMP com membranas celulares bacterianas.	34
Figura 4. Modelo de interação do peptídeo Lunatina-2 na região R1 da YopH.	40
Figura 5. Esquema ilustrativo do mecanismo de indução de morte da Lunatina-1 em células HL-60.....	42
Figura 6. Ensaio de citotoxicidade de análogos de Lunatina-1 substituídos por alanina.	46
Figura 7. Alinhamento de sequências de aminoácidos da Lunatina-1 com peptídeos bioativos.	56
Figura 8. Representação da Lunatina-1 e os treze análogos em rodas de hélices.	62
Figura 9. Ensaio de citotoxicidade da Lunatina-1 e análogos oriundos do alanina scanning.	65
Figura 10. Espectros unidimensionais de ¹ H dos peptídeos L1 e os análogos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A 1 mM em solução 100 mM de SDS-d25.	71
Figura 11. Ampliação do mapa de contornos TOCSY de L1 em solução 100 mM de SDS-d25.	74
Figura 12. Assinalamento sequencial na região amídica parcial de L1 em solução 100 mM de SDS-d25.....	76
Figura 13. Mapa de contornos TOCSY parcial de Lunatina-1 em solução 100 mM de SDS-d25.	77
Figura 14. Correlações inter-residuais do peptídeo Lunatina-1 em solução 100 mM de SDS-d25.	80
Figura 15. Estruturas 3D de Lunatina-1 em solução 100 mM de SDS-d25.....	84
Figura 16. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis do peptídeo Lunatina-1 em solução 100 mM de SDS-d25.	86
Figura 17. Mapa de contornos TOCSY parcial de L1-G4A em solução 100 mM de SDS-d25.	88
Figura 18. Correlações inter-residuais do peptídeo L1-G4A em solução 100 mM de SDS-d25.	91

Figura 19. Estruturas 3D de L1-G4A em solução 100 mM de SDS-d25.	94
Figura 20. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis do peptídeo L1-G4A em solução 100 mM de SDS-d25.	97
Figura 21. Mapa de contornos TOCSY parcial de L1-T8A em solução 100 mM de SDS-d25.	99
Figura 22. Correlações inter-residuais do peptídeo L1-T8A em solução 100 mM de SDS-d25.	102
Figura 23. Estruturas 3D de L1-T8A em solução 100 mM de SDS-d25.	105
Figura 24. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis do peptídeo L1-T8A em solução 100 mM de SDS-d25.	107
Figura 25. Mapa de contornos TOCSY parcial de L1-F12A em solução 100 mM de SDS-d25.	109
Figura 26. Correlações inter-residuais do peptídeo L1-F12A em solução 100 mM de SDS-d25.	112
Figura 27. Estruturas 3D de L1-F12A em solução 100 mM de SDS-d25.	115
Figura 28. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis do peptídeo L1-F12A em solução 100 mM de SDS-d25.	117
Figura 29. Mapa de contornos TOCSY parcial de L1-G4A em solução de TFE-d2:tampão (mistura 40:60).	120
Figura 30. Mapa de contornos 1H-13C HSQC de L1-G4A em solução de TFE-d2:tampão (mistura 40:60).	122
Figura 31. Mapa de contornos TOCSY e 1H-13C HSQC de L1-G4A em solução de TFE-d2:tampão (mistura 40:60).	123
Figura 32. Mapa de contornos 1H-15N HSQC de L1-G4A em solução de TFE-d2:tampão (mistura 40:60).	124
Figura 33. Correlações inter-residuais do peptídeo L1-G4A em solução de TFE-d2:tampão (mistura 40:60).	127
Figura 34. Estruturas 3D de L1-G4A em TFE:tampão (mistura 40:60).	130
Figura 35. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis de L1-G4A em TFE:tampão (mistura 40:60).	132

Figura 36. Mapa de contornos TOCSY parcial de L1-F12A em solução de TFE-d ₂ :tampão (mistura 40:60).	134
Figura 37. Mapa de contornos 1H-13C HSQC de L1-F12A em solução de TFE-d ₂ :tampão (mistura 40:60).	136
Figura 38. Mapa de contornos TOCSY e 1H-13C HSQC de L1-F12A em solução de TFE-d ₂ :tampão (mistura 40:60).....	137
Figura 39. Mapa de contornos 1H-15N HSQC de L1-F12A em solução de TFE-d ₂ :tampão (mistura 40:60).	138
Figura 40. Correlações inter-residuais do peptídeo L1-F12A em solução de TFE-d ₂ :tampão (mistura 40:60).	141
Figura 41. Estruturas 3D de L1-F12A em TFE:tampão (mistura 40:60).	144
Figura 42. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis de L1-F12A em TFE:tampão (mistura 40:60).	146
Figura 43. Estruturas 3D dos peptídeos L1 e os análogos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A, em solução 100 mM de SDS-d ₂₅	147
Figura 44. Estruturas 3D dos peptídeos L1 e os análogos sobrepostos.....	151
Figura 45. Estruturas 3D dos peptídeos L1 e os análogos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A sobrepostos.	152
Figura 46. Gráficos de DSSP das transições da estrutura secundária em Lunatina-1 em simulações de DM durante 1000 ns.....	155
Figura 47. Gráficos de DSSP das transições da estrutura secundária em L1-G4A em simulações de DM durante 1000 ns.....	156
Figura 48. Gráficos de DSSP das transições da estrutura secundária em L1-T8A em simulações de DM durante 1000 ns.....	158
Figura 49. Gráficos de DSSP das transições da estrutura secundária em L1-F12A em simulações de DM durante 1000 ns.....	159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências obtidas da análise proteômica do veneno de <i>H. lunatus</i>	38
Tabela 2. Propriedades físico-químicas da Lunatina-1 e os treze análogos	60
Tabela 3. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono obtidos dos espectros NOESY e 1H-13C HSQC do peptídeo Lunatina-1 em solução 100 mM de SDS-d25.	81
Tabela 4. Estatísticas das dez estruturas de menor energia para o peptídeo Lunatina-1 em solução 100 mM de SDS-d25.	85
Tabela 5. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono obtidos dos espectros NOESY e 1H-13C HSQC do peptídeo L1-G4A em solução 100 mM de SDS-d25.	92
Tabela 6. Estatísticas das dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-G4A em solução 100 mM de SDS-d25.	96
Tabela 7. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono obtidos dos espectros NOESY e 1H-13C HSQC do peptídeo L1-T8A em solução 100 mM de SDS-d25.	103
Tabela 8. Estatísticas das dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-T8A em solução 100 mM de SDS-d25.	106
Tabela 9. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono obtidos dos espectros NOESY e 1H-13C HSQC do peptídeo L1-F12A em solução 100 mM de SDS-d25.	113
Tabela 10. Estatísticas das dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-F12A em solução 100 mM de SDS-d25.	116
Tabela 11. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono obtidos dos espectros NOESY e 1H-13C HSQC do peptídeo L1-G4A em solução de TFE-d2:tampão (mistura 40:60).	128
Tabela 12. Estatísticas das dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-G4A em solução de TFE-d2:tampão (mistura 40:60).	131
Tabela 13. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono obtidos dos espectros NOESY e 1H-13C HSQC do peptídeo L1-F12A em solução de TFE-d2:tampão (mistura 40:60).	142
Tabela 14. Estatísticas das dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-F12A em solução de TFE-d2:tampão (mistura 40:60).	145

Tabela A-1. Sumário das estatísticas estruturais para as vinte estruturas de menor energia dos peptídeos Lunatina-1 e seus análogos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A em SDS-d25 100 μ M. 171

Tabela A-2. Sumário das estatísticas estruturais para as vinte estruturas de menor energia dos peptídeos L1-G4A e L1-F12A em TFE-d2:H2O (40:60, v/v)..... 173

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	uni-dimensional
2D	bi-dimensional
DSSP	Descrição da estrutura secundária do peptídeo (ou proteína), do inglês <i>Define Secondary Structure of Proteins</i>
EM	espectrometria de massas
FID	decaimento livre da indução, do inglês <i>free induction decay</i>
GRAVY	índice de hidropaticidade média, do inglês <i>Grand Average of Hydropathicity</i>
HSQC	espectroscopia de coerência heteronuclear de simples-quantum, do inglês <i>heteronuclear single-quantum coherence</i>
Hz	Hertz
IC ₅₀	concentração inibitória média
MALDI	ionização e dessorção a laser assistida por matriz, do inglês <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MIC	concentração inibitória mínima do inglês <i>minimal inhibitory concentration</i>
NOE	efeito nuclear Overhauser, do inglês <i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	espectroscopia de efeito nuclear Overhauser, do inglês <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
AMP	peptídeos antimicrobianos, do inglês <i>Antimicrobial peptides</i>
PDB	banco de dados de proteínas, do inglês <i>protein data bank</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSD	raiz quadrada dos desvios médios quadrados, do inglês <i>root of mean square deviation</i>
SA	arrefecimento simulado do inglês <i>simulated annealing</i>
SDS	dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulphate</i>
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TOCSY	espectroscopia de correlação total, do inglês <i>total correlation spectroscopy</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

δ deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Venenos animais	19
1.2. Biofármacos ou potenciais fármacos derivados de venenos animais	20
1.3. Os peptídeos bioativos	24
1.4. Diversidade de peptídeos bioativos	25
1.5. Os peptídeos bioativos e seu mecanismo de ação	32
1.6. O escorpião <i>Hadruido</i> lunatus e os peptídeos da família das Lunatinas	36
1.6.1. Lunatinas como inibidores proteicos	38
1.6.2. Lunatina-1 (L1) e suas diversas funções	41
1.6.3. Lunatina-1 e peptídeos derivados	43
1.6.4. A importância dos resíduos na atividade da Lunatina-1	44
2. OBJETIVOS	48
2.1. Objetivo Geral	48
2.2. Objetivos Específicos	48
3. HIPÓTESE.....	48
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1. Análise das estruturas primárias do peptídeo Lunatina-1 e análogos in silico	49
4.1.1. Alinhamento de sequências de aminoácidos de peptídeos bioativos e Lunatina-1	49
4.1.2. Determinação dos parâmetros físico-químicos de Lunatina-1 e seus análogos	49
4.2. Ensaio de viabilidade Celular	50
4.3. Determinação das estruturas tridimensionais de Lunatina-1 e seus análogos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear	51
4.3.1. Coleta das medidas de ressonância magnética nuclear	51
4.3.2. Interpretação dos dados de RMN e cálculo das estruturas tridimensionais	52
4.4. Simulações de dinâmica molecular	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1. A estrutura primária da Lunatina-1 assemelha-se à de peptídeos da família das	

Maximinas, Temporinas e Caerulina.....	55
5.2. Geração de análogos de Lunatina-1 por meio de AlaScan revelam peptídeos hidrofóbicos.....	58
5.3. Alanina scan aponta resíduos provavelmente envolvidos nas atividades antitumorais e citotóxicas da Lunatina-1.....	64
5.4. Preferências conformacionais distintas dos análogos de Luntina-1 obtidas por RMN são um fator chave para a atividade dessas moléculas	69
5.4.1. O peptídeo Lunatina-1 apresenta uma estrutura parcialmente enovelada em α -hélice e flexibilidade na região N-terminal	82
5.4.2. A Substituição de Gly por Ala na Posição 4 do Peptídeo L1 resulta em uma conformação em α -Hélice leva a um aumento da anfipaticidade quando em SDS-d25	87
5.4.3. A Substituição de Thr por Ala na Posição 8 do Peptídeo L1 resulta em uma conformação em α -Hélice com N-Terminal Menos Flexível quando em SDS-d25	98
5.4.4. A substituição de Phe por Ala levou a geração de análogo com estrutura e anfipaticidade aprimoradas quando em SDS-d25	108
5.4.5. O peptídeo L1-G4A em solução de TFE-d2:tampão (mistura 40:60) mantém a anfipaticidade e um segmento de hélice definido.....	119
5.4.6. O peptídeo L1-F12A em solução de TFE-d2:tampão (mistura 40:60) apresenta uma estrutura tridimensional em α -hélice com uma única conformação predominante	133
5.4.7. A importância dos resíduos fenilalanina na atividade e na estrutura tridimensional das Lunatins: Análise comparativa dos análogos de L1	147
5.5. Os ensaios de dinâmica molecular mostram troca de conformação estrutural dos peptídeos Lunatina-1 e análogos em soluções de TFE:H ₂ O (40:60)	153
6. CONCLUSÕES.....	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164
ANEXO A.....	174
ANEXO B.....	178

Este trabalho foi desenvolvido, em sua totalidade:

No Laboratório de Biofísica de Macromoléculas do Departamento de Bioquímica e Imunologia no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com apoio dos laboratórios: Laboratório Institucional de Pesquisa de Ressonância Magnética multiusuário LIPq/LAREMAR no Instituto de Ciências Exatas (ICEx) da UFMG e do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (CNRMN) da Universidade Federal de Rio Janeiro (RJ).

Órgãos financiadores: CAPES, CNPq, FAPEMIG.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Venenos animais

A maioria dos venenos animais são misturas complexas contendo moléculas orgânicas de baixo peso molecular, sais inorgânicos, proteínas e peptídeos, os quais estão envolvidos nos mecanismos de captura de presas e defesa de predadores. Estes venenos são sintetizados por glândulas especializadas e são injetados por meio de aparatos de envenenamento. Os aparatos são sistemas característicos como: dentes em serpentes e lagartos; ferrões em aranhas e escorpiões, os quais favorecem a inoculação do veneno nos predadores ou presas, seja por via intravenosa, subcutânea ou intramuscular (LEWIS; GARCIA, 2003; PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018). Dentre as moléculas do veneno, os peptídeos e as proteínas devem ser suficientemente estáveis para alcançar seus alvos, resistindo à ação de peptidases sejam do próprio veneno animal ou dos tecidos nas presas e predadores. A estabilidade dessas moléculas é lograda por meio de modificações pós-traducionais. As modificações mais comuns em peptídeos e proteínas são: a amidação do resíduo C-terminal (-NH₂), γ -carboxilação de resíduos de glutamato, hidroxilação de resíduos de prolina, glicosilações de resíduos de treonina e ligações dissulfeto entre resíduos de cisteínas (LEWIS; GARCIA, 2003; PIMENTA; DE LIMA, 2005).

Uma vez injetadas, estas moléculas interagem com seus alvos como canais iônicos dependentes de voltagem do sistema nervoso central, receptores de membrana, proteínas intracelulares e outros, causando os sintomas do envenenamento. Ao mesmo tempo, o sistema imune é ativado direta ou indiretamente, desencadeando respostas como inflamação, ativação do complemento, recrutamento, ativação e diferenciação de células do sistema imune, entre outros (KING, 2011; MINUTTI-ZANELLA; GIL-LEYVA; VERGARA, 2021; RYAN et al., 2021). No entanto, algumas moléculas presentes nos venenos animais podem agir como imunomoduladores do tipo imunossupressor e, também, podem ser usadas como molde no desenho de fármacos para o tratamento de várias doenças (BORDON et al., 2020; PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018).

1.2 Biofármacos ou potenciais fármacos derivados de venenos animais

A descoberta de peptídeos com efeito potenciador de bradicinina (BPP) no veneno da serpente *Bothrops jararaca* finalizou no desenvolvimento do Captopril (Capoten[®]), (Figura 1A), aprovado no ano 1981, sendo um dos medicamentos antihipertensivos mais utilizado no mundo (PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018; ROBINSON et al., 2017), abrindo as portas ao estudo dos venenos para o desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos. Na atualidade, existem onze medicamentos à base de venenos ou toxinas animais, aprovados por agências reguladoras e vários outros estão em fase clínica e pré-clínica (BORDON et al., 2020).

A Bivalirudina (Angiomax[®]) e Desirudina (Iprivask[®]) foram desenhadas a partir da proteína hirudina (Figura 1B), isolada do sanguessuga *Hirudo medicinalis*, sendo utilizadas como agentes anticoagulantes ao inibir a trombina de maneira reversível e irreversível, respectivamente, empregadas como anticoagulantes em intervenções coronárias percutâneas (PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018; ROBINSON et al., 2017).

As desintegrinas são uma família de peptídeos e proteínas presentes nos venenos de víboras, que se caracterizam por apresentar ligações dissulfeto na sua estrutura, assim como os motivos RGD (Arg-Gly-Asp) ou KGD (Lys-Gly-Asp), responsáveis pela ligação aos receptores glicoproteínas integrinas IIb/IIIa das plaquetas, exercendo uma atividade antiplaquetária ao impedir a ligação das plaquetas ativadas ao fibrinogênio. Eptifibatide (Integrilin[®]) é um heptapeptídeo cíclico (deamino-C(1)-homoR¹-GDWPC(1)-NH₂) desenhado a partir da desintegrina barbourina isolada da serpente *Sistrurus millarius barbouri*. O Tirofiban (Aggrastat[®]) é uma molécula pequena não peptídica desenhada a partir da desintegrina Echistatina isolada da serpente *Echis carinatus* (Figura 1C). Ambas moléculas são utilizadas para o tratamento de síndromes coronárias agudas, ajudando a prevenir mortes por infarto (BORDON et al., 2020; PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018; ROBINSON et al., 2017). No Brasil, o Tirofiban é vendido como cloridrato de tirofibana pela empresa [Antibióticos do Brasil Ltda.](#)², no formato de solução para diluição injetável 12,5 mg/50 mL⁻¹.

¹ Homoarginina (homoR), é um derivado guanidino da lisina e estruturalmente equivalente a um homólogo da arginina, apresentando um grupo metileno extra.

² Aprovado pela agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA), registro [155620053](#).



Figura 1. Estruturas químicas de peptídeos derivados de venenos animais.

A. Estrutura química do captopril. **B.** Proteína hirudina e a sequência da Bivalirudina. A trombina em cor cinza e a hirudina em cor roxo, estão representadas por superfície. Os resíduos de ligação do bolso hidrofóbico em verde e os resíduos de ligação da bolsa aniônica em vermelho. **C.** Estrutura química de Eptifibatide e Tirofiban. Adaptado de [\(PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018\)](#).

O uso do veneno das abelhas (*Apis mellifera*) para o tratamento de distúrbios inflamatórios como artrite reumatóide remontam à antiguidade. Na atualidade, a terapia com o veneno da abelha (Apitox®) é utilizada para o tratamento de dores como osteoartrite e esclerose múltipla em vários países do mundo, incluindo o Brasil (BORDON et al., 2020). O peptídeo Melitina, um dos principais componentes do veneno das abelhas, é um dos responsáveis pelas atividades anti-inflamatórias do veneno. Atividades antineoplásicas e antioxidantes também foram registradas para a Melitina (LIM; BAEK; JUNG, 2019).

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade de fauna no mundo, apresentando várias espécies animais venenosas de importância médica, seja pelo efeito que o envenenamento tem na saúde ou o potencial biotecnológico do veneno para o desenvolvimento de biofármacos (DE MARCO ALMEIDA et al., 2015). Algumas dessas espécies incluem o escorpião *Tityus serrulatus*, as aranhas *Phoneutria nigriventer* e *Lycosa erythrognatha*, serpentes dos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*, entre outros. Nos últimos anos, pesquisas sobre o potencial dos venenos de espécies brasileiras foram desenvolvidas no antigo Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (LVTA) da UFMG, com descobertas relevantes.

Os peptídeos BPPs de nove, dez e onze resíduos, isolados de serpente *Bothrops jararaca*; o peptídeo Bmkbpp, do escorpião *Buthus martensii*; os peptídeos BPP-S e BPP-Lt, das aranhas *Scaptocosa raptoria* e *Latrodectus tredecimguttatus*, respectivamente; e o peptídeo Phypo Xa, do anfíbio *Phyllomedusa hypochondrialis*, pertencem ao grupo de peptídeos BPPs. Esse grupo se caracteriza por apresentar um resíduo de ácido piroglutâmico na posição N-terminal e/ou a sequência IPP (Ile-Pro-Pro) na região C-terminal, necessária para a inibição da enzima conversora de angiotensina (ACE), mecanismo pelo qual potencializam os efeitos farmacológicos da bradicinina, comum na maioria dos peptídeos BPPs (PIMENTA; DE LIMA, 2005; VERANO-BRAGA et al., 2008, 2010). A partir de uma pesquisa do grupo LVTA, ao estudar a composição do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* (Ts), uma nova família de peptídeos com atividade antihipertensiva foi descoberta e denominada *Tityus serrulatus* Hipotensinas (TsHpt). Diferente dos BPPs citados previamente, o peptídeo Ts14 (AEIDFSGIPEDIKQIKETNAKPPA-NH₂) pertencente à família TsHpt, atua como agonista dos receptores de bradicinina tipo dois (BR₂), aumentando a liberação de óxido nítrico (NO), sem inibir a enzima ACE. Estudos de minimização da estrutura primária do peptídeo Ts14 deixaram em evidência a importância dos resíduos KPP (Lys-Pro-Pro) para a atividade do peptídeo. Na ausência da carga positiva do resíduo Lys, o efeito hipotensivo do peptídeo não é

observado. Por outro lado, os resíduos Pro são necessários para a atividade potenciadora de bradicinina (VERANO-BRAGA et al., 2008, 2010). O potencial terapêutico do peptídeo Ts14 vai além das suas atividades anti-hipertensivas; uma vez que atividades, anti-fibrogênicas, anti-inflamatórias e pró-angiogênicas, foram observadas em camundongos implantados com esponjas de poliéster-poliuretano e tratados com Ts14, mostrando um possível uso do Ts14 em condições de isquemia e doenças inflamatórias (CASSINI-VIEIRA et al., 2017).

O potencial biotecnológico que apresenta o veneno do escorpião Ts vai além das TsHpt. Potenciais moléculas para o tratamento da doença de Chagas e da Toxoplasmose foram encontradas no veneno do Ts. Os peptídeos acetilados na porção N-terminal Pep1 (Ac-DAYKTHLKSS-NH₂) e Pep2a (Ac-FIRPAGFKYSWP-NH₂), desenhados a partir da similaridade à toxina 2 de Ts (Ts2), presente na fração ativa do veneno, reduziram a replicação de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (Tg) em macrófagos, sem causar citotoxicidade. De forma semelhante, a replicação da parasita *Trypanosoma cruzi* (Tc) e a liberação de tripomastigotos de macrófagos foi reduzida pela ação do veneno de Ts, Ts14 e o tripeptídeo KPP. Em ambos os casos, houve um incremento na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12/TNF/IL-6) e de NO. O tratamento com KPP diminuiu a parasitemia em camundongos infectados com Tc e os peptídeos miméticos à Ts2 diminuíram o número de cistos cerebrais em camundongos infectados com Tg. A via das proteínas MAPK com a ativação de ERK1/2, JNK1/2 e p38 está envolvida nos mecanismos anti-Tc desencadeados pelos peptídeos de Ts (DE ASSIS et al., 2021; PIMENTEL et al., 2021).

O veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (PnV) apresenta toxinas que afetam os canais dependentes de voltagem de Na⁺, Ca²⁺ e K⁺, assim como os transportadores de glutamato. Entretanto, peptídeos e outras moléculas com propriedades neuroprotetoras, anti-hipertensivas, analgésicas, antimicrobianas, entre outras, têm sido encontrados no PnV (DE MARCO ALMEIDA et al., 2015). O peptídeo PnPP-19, desenhado a partir da toxina PnTx2-6 do PnV, potencia a ereção em camundongos *in vivo* e *ex vivo*. O PnPP-19 atua por meio da via óxido nítrico/guanosina monofosfato cíclico (NO/cGMP), apresentando baixa imunogenicidade e toxicidade em camundongos, sendo um candidato promissor e um fármaco alternativo para o tratamento da disfunção erétil, como mostraram os dados de pesquisas feitas no laboratório LVTA (NUNES et al., 2012; SILVA et al., 2015). Atividades antineoplásicas *in vitro* e *in vivo* em células de glioblastoma, correspondentes ao tipo de câncer cerebral mais agressivo e comum em adultos, foram registradas para o PnV. Moléculas com atividade

immunomoduladora presentes em PnV ativam macrófagos estimulando a migração e um incremento na fagocitose e na atividade citotóxica em células tumorais (BONFANTI et al., 2020; MUNHOZ et al., 2021).

Esses e muitos outros exemplos ressaltam a importância do estudo dos venenos animais para a prospecção e descoberta de moléculas bioativas com aplicações em diversas áreas como: terapias e tratamento de doenças, sondas para marcação de células ou tecidos, cosmética, testes de laboratório, entre outros (BORDON et al., 2020; DE MARCO ALMEIDA et al., 2015; PENNINGTON; CZERWINSKI; NORTON, 2018; ROBINSON et al., 2017).

1.3 Os peptídeos bioativos

Os peptídeos bioativos são uma classe ampla de biomoléculas que podem ser sintetizadas em laboratório ou podem ser obtidas de fontes naturais, uma vez que estão presentes desde procariotos até humanos. Nos eucariotos, cumprem um papel de defesa contra a invasão de patógenos sendo assim denominados peptídeos de defesa do hospedeiro (GASPAR; SALOMÉ VEIGA; CASTANHO, 2013; MULDER et al., 2013). Atividades antimicrobianas estiveram entre as primeiras a serem determinadas para essas moléculas, atribuindo-se o conceito de peptídeos antimicrobianos (AMP) (BROGDEN, 2005).

Os AMP caracterizam-se por serem, em geral, moléculas com menos de trinta resíduos e anfipáticas. Sua estrutura primária pode conter resíduos hidrofóbicos como leucinas, isoleucinas, fenilalaninas, e também resíduos que conferem carga líquida positiva como lisinas e argininas. A presença destes resíduos de aminoácidos confere a estes peptídeos a habilidade de interagir com moléculas das membranas de microrganismos principalmente com os lipídeos, por meio de interações eletrostáticas. No caso de bactérias, as membranas apresentam moléculas com carga negativa, como os ácidos lipoteicoicos e teicoicos da parede celular das bactérias Gram-positivas, e fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (LPS) das membranas de bactérias Gram-negativas que são importantes para a interação (BROGDEN, 2005; GASPAR; SALOMÉ VEIGA; CASTANHO, 2013; LI et al., 2012).

Os peptídeos bioativos podem apresentar um amplo espectro de atividade como antibacteriana, antiviral, antifúngica, inseticida, antitumoral, dentre outras, denominados peptídeos promíscuos (LI et al., 2012; MULDER et al., 2013). A procura por possíveis

biofármacos potentes e que atuem de forma seletiva nas células alvo como bactérias e células tumorais e, que também possam ser utilizados em terapia combinatória com outros agentes como quimioterápicos, potenciou o estudo dos peptídeos nas últimas décadas (FELÍCIO et al., 2017; GABERNET et al., 2016).

1.4 Diversidade de peptídeos bioativos

Os peptídeos bioativos são um grupo amplo e diverso de moléculas, que diferem em tamanho, estruturas primária e terciária, células alvo, entre outros. Assim, na literatura, é possível observar diferentes abordagens para classificar os peptídeos. Muitos trabalhos utilizam a seletividade dos alvos para classificar os peptídeos em ativo ou não. Sabe-se que, os peptídeos podem atuar em células tumorais e/ou microrganismos (bactérias, fungos, parasitos, vírus), enquanto outros podem atuar em hemácias ou células mononucleares do sangue periférico (PBMC). No entanto, existem peptídeos que dadas as suas características físico-químicas, podem agir em ambos os tipos de células (BAHAR; REN, 2013; GASPAR; SALOMÉ VEIGA; CASTANHO, 2013; HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008; MULDER et al., 2013). Exemplos destes tipos de peptídeos são o AamAP1 e o AamAP2 isolados do escorpião africano *Androctonus amoreuxi*, que possuem atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e também eritrócitos de cavalo, na mesma faixa de concentrações (20 - 100 μ M) (ALMAAYTAH et al., 2012).

Outra abordagem relevante para a classificação de peptídeos bioativos é considerar o organismo de origem do peptídeo: gerados de insetos como a Cecropina³ e a Melitina⁴; gerados de anfíbios como a Magainina-2⁵, e a Dermaseptina⁶, obtidos de humanos como o peptídeo LL-37⁷ (LI et al., 2012; MULDER et al., 2013). Ao nível de estrutura tridimensional (3D), é possível categorizar os peptídeos em estruturas com conformação em α -hélice, folha- β e desenvolvida, embora alguns peptídeos apresentam misturas dessas conformações. Exemplos

³ Sequência de Cecropina: H-GWLKIGKIKIERVGNTRDATVKGLEVAQQAANVAATVR-NH₂, depositada no UNIPROT ([P83403](#)).

⁴ Sequência de Melitina: For-GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ-NH₂, depositada no UNIPROT ([P01501](#)).

⁵ Sequência de Magainina-2: H-GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-OH, depositada no UNIPROT ([P11006](#)).

⁶ Sequência de Dermaseptina-B2: H-GLWSKIKEVGKEAAKAAKAAGKAALGAVSEAV-NH₂, depositada no UNIPROT ([P31107](#)).

⁷ Sequência de LL-37: H-LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES-OH, depositada no UNIPROT ([P49913](#)).

representativos de peptídeos que adotam algumas dessas três conformações estão destacados na Figura 2. Além da conformação, um modo de classificar os peptídeos bioativos é agrupá-los de acordo com as estruturas primárias e sua conformação 3D. De acordo com Brogden (BROGDEN, 2005) é possível agrupar os peptídeos bioativos em cinco subgrupos.

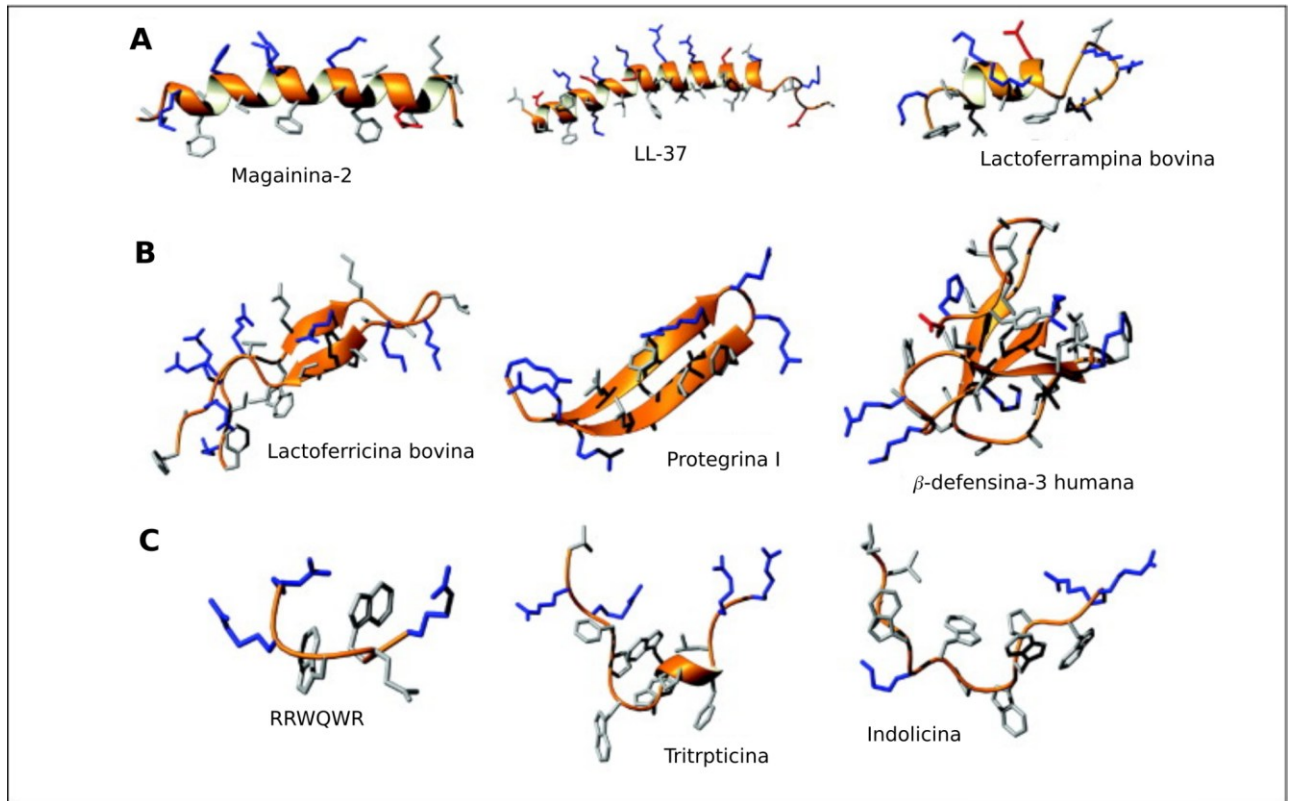


Figura 2. Representações das estruturas tridimensionais principais de peptídeos AMP.

A. Peptídeos com conformação em α -hélice. **B.** Peptídeos com conformação em folha- β . **C.** Peptídeos com conformação desenvolvida. Adaptado de (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

Subgrupo 1. Peptídeos aniônicos. Este grupo é constituído por peptídeos enriquecidos em resíduos de ácidos aspárticos e glutâmicos, os quais encontram-se ionizados em meio neutro, contribuindo com as cargas líquidas negativas do peptídeo (DAVID L. NELSON; MICHAEL M COX, 2021). Exemplos representativos desses peptídeos encontrados na natureza são a Maximina-H5⁸ de anfíbios (LAI et al., 2002b), e a Dermicidina⁹ de humanos (SCHITTEK et al., 2001). Um exemplo, de como esta informação pode ser utilizada para síntese de novos compostos é o peptídeo quimera MMIS:buforina II b:

(H-DAEAVGPEAADEEKDEEDGPLGIAGQRAGLQFPVG[RLLR]₃-OH), produto da fusão entre o peptídeo catiônico Buforina II b¹⁰ e a sequência peptídica aniônica modificada da magainina (MMIS). Esta quimera mostrou seletividade para células que produzem metalopeptidases da matriz extracelular (MPP), as quais clivam o peptídeo na posição G/I, gerando a Buforina Iib (H-RAGLQFPVG[RLLR]₃-OH) ativa. O peptídeo MMIS:Buforina II b, é um exemplo da estratégia bem sucedida no desenho de peptídeos seletivos, para células tumorais que superexpressam MMP como fibrosarcoma humano (linhagem HT1080) e glioblastoma humano (linhagem U87MG) (JANG et al., 2011).

Subgrupo 2. Peptídeos catiônicos que apresentam estrutura em α -hélice. Os peptídeos desse grupo caracterizam-se pela presença de resíduos de arginina e lisina, os quais, aportam a carga líquida positiva às moléculas em pH neutro (BROGDEN, 2005; DAVID L. NELSON; MICHAEL M COX, 2021). Embora alguns desses peptídeos apresentem resíduos de cisteína, não são observadas estruturas secundárias diferentes às α -hélices, para os peptídeos nesse grupo. A carga positiva desses peptídeos favorece as interações eletrostáticas com moléculas com carga negativa como fosfatidilserina (PS), presentes nas membranas de células tumorais e de bactérias (GASPAR; SALOMÉ VEIGA; CASTANHO, 2013; HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008). Em soluções aquosas, esses peptídeos costumam apresentar estruturas desordenadas. Entretanto, na presença de meios miméticos de membrana ou na interação com as membranas das células alvo, esses peptídeos se enovelam em estruturas helicoidais anfipáticas e alguns desses peptídeos inserem-se na membrana e causam lise celular

⁸ Sequência de Maximina-H5: H-ILGPVGLVSDTLDDVLGIL-NH₂, depositada no UNIPROT ([Q8JHE1](#)).

⁹ Sequência de Dermicidina-1: H-SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVKGKAVHDVKDVLDSV-OH, depositada no UNIPROT ([P81605](#)).

¹⁰ O peptídeo Buforina II b é um peptídeo desenhado a partir dos resíduos [5-13] da Buforina II (com sequência: H-TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK-OH) e uma extensão de 3 repetições do motivo α -helicóide RLLR da Buforina II, depositada no UNIPROT ([P55897](#)).

(MAHLAPUU et al., 2016; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012; YEAMAN; YOUNT, 2003). Um exemplo é o peptídeo α -hélice Temporina-1CEa¹¹ isolado da *Rana chensinensis* (SHANG et al., 2009), o qual induz morte celular por necrose em células de câncer de mama (linhagens Bcap-37, MDA-MB-231 e MCF-7), constatado pelas alterações na membrana plasmática e os tempos de 1 h de atividade (WANG et al., 2013a, 2013b).

Subgrupo 3. Peptídeos catiônicos que apresentam aminoácidos específicos enriquecidos. Além da presença de resíduos de Lys e Arg, os peptídeos desse grupo apresentam algum resíduo em proporções ($\geq 25\%$) maiores aos outros resíduos da estrutura primária. Um exemplo é o grupo de peptídeos enriquecidos em resíduos de prolina, como os peptídeos provenientes das abelhas, Abaecina¹² de 34 resíduos e as Apidaecinas¹³ de 18 resíduos, ambos com 29% do resíduo Pro (BROGDEN, 2005). Outro exemplo nesse grupo é a família de peptídeos AMP Catelicidinas produzidos por neutrófilos, entre eles, os peptídeos Catelicidina-3¹⁴ (também chamado de Bac7 ou PR-59) e Catelicidina-2¹⁵ (também chamado de Bac-5 ou PR-42) isolados de bovinos (*Bos taurus*), e o peptídeo PR-39¹⁶ isolado de porcos (*Sus scrofa*) (BENINCASA et al., 2004). Estudando o domínio responsável da atividade antimicrobiana do peptídeo Bac7, foi constatada a importância da porção N-terminal catiônica (primeiros 16 resíduos) e uma das três repetições hidrofóbicas em sequência, para a atividade antimicrobiana de Bac7. O peptídeo Bac7(1-35) correspondente aos primeiros 35 resíduos da Catelicidina-3 (H-RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPGPRPIRPLPFP-OH), apresentou atividades antimicrobianas comparáveis as atividade do peptídeo Bac7, contra as bactérias *E. coli*, *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) e *Enterobacter cloacae*, e de isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) resistentes a antibióticos (MIC 1-10 μ M), mostrando a importância que o peptídeo Bac7(1-35) têm como protótipo no desenho de fármacos, bem como no seu mecanismo de ação (BENINCASA et al., 2004). Por meio de um modelo de febre tifoide em

¹¹ Sequência de Temporina-1CEa: H-FVDLKKIANIINSIF-NH₂, depositada no UNIPROT ([B8QP36](#)).

¹² Sequência de Abaecina: H-YVPLPNVPQGRPFPTFPQGPFNPKIKWPQGY-OH, depositada no UNIPROT ([P15450](#)).

¹³ Sequência de Apidaecina: H-GNNRPVYISQPRPPHPRL-OH, depositada no UNIPROT ([Q06602](#)).

¹⁴ Sequência de Catelicidina-3: H-RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPGPRPIRPLPFP-OH, depositada no UNIPROT ([P19661](#)).

¹⁵ Sequência de Catelicidina-2: H-RFRPPIRPPPIRPPFYPPFRPPIRPPPIRPPFRPPLGPFP-NH₂, depositada no UNIPROT ([P19660](#)).

¹⁶ Sequência de PR-39: H-RRRPRPPYLPRRPPFFFPRLPPRIIPPGFPPRFPPRFNP-NH₂, depositada no UNIPROT([P80054](#)).

camundongos infectados com *S. typhimurium*, foi avaliado o potencial terapêutico de Bac7(1-35). Os camundongos infectados e tratados com Bac7(1-35) 30 mg·Kg⁻¹, apresentaram um aumento da taxa de sobrevivência em um 50%, reduzindo a carga bacteriana no fígado e no baço, comparando-se aos não tratados. No entanto, o peptídeo apresentou uma cinética de eliminação rápida, atingindo os rins e a bexiga em 1 e 3 h, respectivamente, sendo totalmente excretado e/ou degradado em 24 h (BENINCASA et al., 2010). Para aumentar a biodisponibilidade de Bac7(1-35) e reduzir a remoção através dos rins, versões peguiladas do peptídeo foram desenhadas. Cadeias de 20 kDa de polietilenoglicol foram adicionadas à extremidade C-terminal de Bac7(1-35)-Cys(H)-OH, por meio de uma ligação éster hidrolisável (Bac_E-PEG) e uma ligação não clivável amida (Bac_A-PEG), ambos os peptídeos mantiveram as atividades antimicrobianas contra *S. typhimurium* (MIC 4-16 µM). Entretanto, o peptídeo Bac_{CMC} produto da clivagem de Bac_E-PEG por peptidases no soro humano, é mais ativo (MIC 0,5-1 µM). O peptídeo Bac7 e suas versões peguiladas, internalizam as bactérias por meio do transportador SbmA presente na membrana bacteriana, e diferente do peptídeo não peguilado, a biodisponibilidade do peptídeo Bac_E-PEG supera as 24 h. A estratégia empregada de peguilação mostra a importância das alterações dos peptídeos bioativos, seja para alterar a farmacocinética e farmacodinâmica ou reduzir a citotoxicidade do peptídeo (BENINCASA et al., 2015).

Subgrupo 4. Peptídeos que possuem cisteína e formam ligações dissulfeto. A estrutura predominante dos peptídeos nesse grupo é a folha-β pregueada, produto das ligações dissulfeto entre os resíduos de cisteína (BROGDEN, 2005; HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008; MAHLAPUU et al., 2016). Entretanto, alguns peptídeos nesse grupo apresentam regiões com diferentes conformações como randômica (*coil*), dobra, volta ou α-hélice. As α-Defensinas como HNP-2¹⁷ e HNP-3¹⁸ e β-defensinas como BD-1¹⁹ e BD-3²⁰, produzidas por neutrófilos de vertebrados, estão entre os exemplos mais representativos desses peptídeos, as quais se diferenciam pelo padrão de enlaces estabelecido entre os seis resíduos de cisteína que formam

¹⁷ Sequência de HNP-2: H-CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC-OH, depositada no UNIPROT ([P59665](#)).

¹⁸ Sequência de HNP-3: H-DCYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC-OH, depositada no UNIPROT ([P59666](#)).

¹⁹ Sequência de BD-1: H-DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCTYRGKAKCCK-OH, depositada no UNIPROT ([P60022](#)).

²⁰ Sequência de BD-3: H-GIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK-OH, depositada no UNIPROT ([P81534](#)).

as três ligações dissulfeto. Enquanto as α -defensinas apresentam um padrão de ligação 1-6, 2-4, e 3-5, as β -defensinas apresentam ligações 1-5, 2-4, e 3-6; os números indicam a ordem em que as cisteínas são encontradas dentro da estrutura primária dos peptídeos (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008). Os peptídeos α -defensinas de neutrófilos humanos 1, 2 e 3 (HNP-1, 2 e 3) são citotóxicos para vários tipos de células tumorais. Atividades antitumorais, quimiotáticas e ativadoras de células dendríticas foram registradas para o peptídeo HNP-1 (H-ACYCRIPACIAGERRYGTTCIYQGRLWAFCC-OH), em modelos *in vitro* e *in vivo* de adenocarcinoma de pulmão humano (linhagem A549) e de carcinoma mamário de camundongo (linhagem 4T1). As células transfectadas para expressar uma versão que é secretada de HNP-1 (pSec-HNP-1), apresentaram morte celular por apoptose e uma redução no crescimento, efeitos antiangiogênicos foram observados por meio da diminuição da densidade de microvasos do tecido tumoral, e infiltrados de linfócitos e células dendríticas foram observados nos tumores. Dessa forma, as atividades antitumorais de HNP-1 envolvem a participação do sistema imune, a indução da apoptose e a inibição da angiogênese (WANG et al., 2009; XU et al., 2008). Além disso, o peptídeo HNP-1 tem o potencial de melhorar a quimiossensibilidade nessas células, por meio do incremento da permeabilidade da membrana celular e, ao mesmo tempo, diminuindo o efluxo dos fármacos, em terapias combinatórias com os quimioterápicos doxorrubicina ou cisplatina (LI et al., 2014). Esses dados apontam o peptídeo HNP-1 como uma molécula promissora na terapia gênica para o tratamento do câncer (LI et al., 2014; WANG et al., 2009).

Subgrupo 5. Peptídeos que são fragmentos de grandes proteínas. A característica desses peptídeos denominados de criptídeos, é a forma em que são gerados como produto da proteólise *in vivo* ou *in vitro* das moléculas precursoras, apresentando funções relacionadas ou diferentes, mas nunca iguais às da molécula parental (IAVARONE et al., 2018; UEKI et al., 2007). A proteína Lactoferrina humana (LF) presente em fluidos corporais e expressa por células do sistema imune, apresenta atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e outras. A Lactoferricina-H²¹ (LFcin) que corresponde aos 48 resíduos da porção N-terminal da LF, é um criptídeo gerado pela clivagem enzimática da LF pela enzima pepsina. A LFcin apresenta atividades antitumorais e as atividades antivirais estão relacionadas a sua capacidade de interagir com moléculas da matriz extracelular como sulfato de heparana, bloqueando a interação vírus-célula (LU et al., 2016; MULDER et al., 2013). O peptídeo PFR (H-

²¹Sequência de Lactoferricina-H: H-GRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCICA-NH₂, depositada no UNIPROT([P02788](#)).

PFWRIRIRR-NH₂) é uma molécula desenhada a partir de um peptídeo de onze resíduos (Lf11) encriptado na sequência da LFc_{in}. O peptídeo PFR apresentou uma melhora de 30 vezes nas atividades antibacterianas contra *E. coli* quando comparado a Lf11. Além disso, o PFR apresentou atividades antitumorais em modelos de leucemia, *in vitro* e *in vivo*. Camundongos com tumores de eritroleucemia murina (MEL) mostraram tolerabilidade ao tratamento com PFR (LU et al., 2016).

Abordagens computacionais facilitaram a identificação de peptídeos com potenciais atividades biológicas dentro de proteínas, os quais podem ser obtidos por clivagens *in silico*, peptídeos estes denominados intragênicos ou encriptados (BRAND et al., 2012; SANTOS et al., 2021). Diversos trabalhos de Brand e colaboradores, têm mostrado o potencial que os proteomas de plantas, como: a planta da soja (*Glycine max*), o cacauzeiro (*Theobroma cacao*), a erva-estrelada (*Arabidopsis thaliana*) e a laranjeira (*Citrus sinensis*), apresentam para a descoberta de novos peptídeos bioativos. Analisando e procurando *in silico* com a ferramenta KAMAL, sequências de aminoácidos com características físico-químicas como hidrofobicidade, carga líquida, tamanho, estrutura predita, entre outros, semelhantes às observadas em peptídeos antimicrobianos, é possível prospectar e, posteriormente, caracterizar e determinar as atividades de peptídeos intragênicos sintéticos, que podem apresentar ação antimicrobiana e baixa citotoxicidade (BRAND et al., 2012; RAMADA et al., 2017). Pesquisas mais recentes desse grupo apontaram a exploração de peptídeos intragênicos no proteoma humano, com a descoberta de várias novas moléculas, entre elas: o peptídeo Hs02 (H-KWAVRIIRKFIKGFIS-NH₂), derivado da proteína Miosina-1H²² não convencional, o qual inibiu o crescimento de bactérias *S. aureus*, *S. epidermis* e *P. aeruginosa* (MIC 1 ± 0.5 µM), apresentando uma baixa citotoxicidade (10%) em macrófagos, em concentrações de 10 µM, concentração na qual a atividade hemolítica pode ser considerada desprezível. Atividades anti-inflamatórias também foram observadas, ao inibir a liberação da citocina pró-inflamatória TNF-α de macrófagos pre-ativados com LPS. O peptídeo Hs02 apresenta uma estrutura em α-hélice e anfipática (BRAND et al., 2019). Um outro peptídeo denominado de Hs10 (H-KFDLKVTIK-NH₂), derivado da proteína C3 do complemento²³, foi estudado. O Hs10 apresentou seletividade contra bactérias Gram-negativas como: *E. coli*, *K pneumoniae* e *P.*

²² O peptídeo Hs02 corresponde aos resíduos 741-756 da proteína Miosina-1H, depositada no UNIPROT ([Q8N1T3](#)).

²³ O peptídeo Hs10 corresponde aos resíduos 1360-1368 da proteína C3 do complemento, depositada no UNIPROT ([P01024](#)).

aeruginosa (MIC 30 - 70 μM). Diferente de Hs02, o Hs10 não apresenta uma estrutura em α -hélice. Entretanto, uma baixa citotoxicidade (10%) também foi observada quando testado em fibroblastos humanos (128 μM) (SANTOS et al., 2023). Esses dados mostram o potencial que os proteomas apresentam para a prospecção de moléculas bioativas com aplicações que vão desde o controle e produção de alimentos, até o tratamento de doenças (BRAND et al., 2012, 2019).

Como evidenciado anteriormente, é possível agrupar ou catalogar os peptídeos de diversas formas. Um sistema de classificação comum e uniforme a todos os peptídeos poderia ser implementado, principalmente para o registro em bases de dados de peptídeos (WANG; LI; WANG, 2016).

1.5 Os peptídeos bioativos e seu mecanismo de ação

As atividades antibacterianas dos AMP dependem da interação com a membrana plasmática, bem seja para lisar a célula (membranolíticos) ou para se translocar e agir em alvos intracelulares (não-membranolíticos) (MAHLAPUU et al., 2016). Estes mecanismos não são auto excludentes, já que dependem de uma série de fatores como: a sequência de aminoácidos, a concentração do peptídeo, a composição da membrana celular e a presença do alvo dentro da célula ou exposto na membrana celular (BROGDEN, 2005; MAHLAPUU et al., 2016; YEAMAN; YOUNT, 2003). As membranas celulares têm um papel fundamental no mecanismo de ação dos peptídeos bioativos e podem influenciar o espectro de atividades deles (GABERNET et al., 2016; HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008).

As forças eletrostáticas são importantes para as interações de peptídeos, em especial de peptídeos catiônicos, com as membranas carregadas negativamente de bactérias e células tumorais (MAHLAPUU et al., 2016; YEAMAN; YOUNT, 2003). As membranas citoplasmáticas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são ricas em fosfolípidos que apresentam grupos polares carregados negativamente como a cardiolipina (CL), fosfatidilglicerol (PG) e fosfatidilserina (PS) (YEAMAN; YOUNT, 2003). A presença de moléculas de ácido teicoico na parede celular mais espessa das bactérias Gram-positivas, e de LPS na membrana externa das bactérias Gram-negativas, aportam cargas negativas adicionais. Por outro lado, as membranas citoplasmáticas de células de mamífero não tumorais, são eletricamente neutras também chamadas de zwitteriônicas, constituídas predominantemente por

fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomiéline (SM) e colesterol (CH) (YEAMAN; YOUNT, 2003). Além disso, quando apresentam fosfolípidos com carga negativa, eles estão presentes na face interna da membrana, orientados ao citosol, devido à distribuição assimétrica dos fosfolípidos neutros e carregados, nessas membranas (BROGDEN, 2005; MAHLAPUU et al., 2016; YEAMAN; YOUNT, 2003). As células neoplásicas passam por uma série de transformações que alteram a maquinaria celular e a composição da membrana celular. A diferença das células não transformadas, a carga negativa na membrana citoplasmática de células tumorais é devida principalmente ao aumento da expressão de moléculas como fosfatidilserina, sulfato de heparana, mucinas O-glicosiladas e gangliosídeos ricos em ácido siálico, presentes na membrana (GABERNET et al., 2019; HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008; SCHWEIZER, 2009). A fluidez das membranas de células tumorais também é maior, devido à redução no conteúdo de colesterol. Outra característica de algumas células tumorais, é o maior número de projeções da membrana (microvilos), aumentando a área superficial (GABERNET et al., 2019; HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008; SCHWEIZER, 2009). Assim, as interações iniciais e afinidade dos peptídeos pelas membranas celulares são diferenciadas em hidrofóbicas e mais fracas, com membranas neutras de células de mamífero não transformadas, e de forças eletrostáticas mais fortes, com as moléculas que conferem a carga negativa às membranas de bactérias e células tumorais (MAHLAPUU et al., 2016; YEAMAN; YOUNT, 2003).

Para permear a membrana externa das bactérias, os cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} ligados aos grupamentos fosfato do núcleo interno das moléculas de LPS, são deslocados pelos peptídeos, desestabilizando e promovendo a ruptura parcial da membrana, e assim, ultrapassando a parede de peptidoglicano das bactérias (MAHLAPUU et al., 2016). Em contacto com as membranas citoplasmáticas dos alvos, a transição de fase conformacional ocorre, e os peptídeos, em especial os que apresentaram estruturas em α -hélice, adquirem conformações secundárias anfipáticas (MAHLAPUU et al., 2016; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012; YEAMAN; YOUNT, 2003). Devido ao empacotamento fosfolipídico dentro da bicamada, as interações do peptídeo com as moléculas de fosfolípidos promovem o dobramento do peptídeo numa hélice, favorecendo as interações entre os grupos polares dos fosfolípidos e os domínios carregados polares dos peptídeos, enquanto os domínios hidrofóbicos de peptídeos interagem com o núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica (MAHLAPUU et al., 2016; YEAMAN; YOUNT, 2003). Posteriormente, alguns peptídeos lisam a membrana, enquanto outros serão translocados agindo intracelularmente (BROGDEN, 2005; MAHLAPUU et al., 2016; YEAMAN; YOUNT, 2003).

Após a adsorção e das mudanças conformacionais dos peptídeos na membrana, a interação peptídeo-membrana pode desencadear diferentes processos, como sugerem os modelos propostos para explicar os mecanismos de ação de peptídeos na membrana celular, esquematizados na Figura 3.

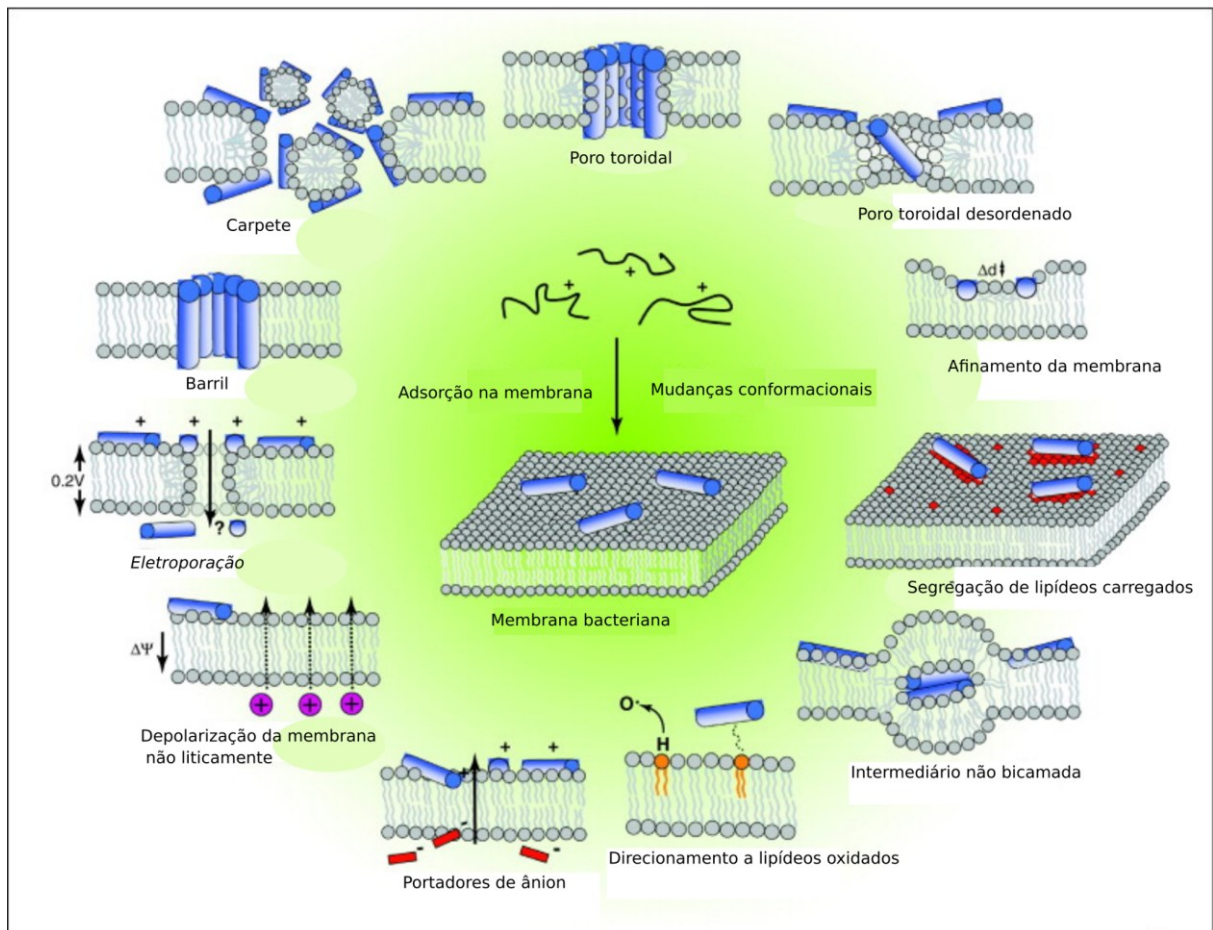


Figura 3. Esquema ilustrativo dos modelos de interação de AMP com membranas celulares bacterianas.

Os peptídeos desenovelados ao interagir com as membranas, adquirem uma conformação em α -hélice representada pelos cilindros azuis e, posteriormente, interagem e exercem alguma(s) atividade(s) como mostrado no esquema. Adaptado de (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011).

Os primeiros modelos teóricos utilizados para explicar as atividades membranolíticas de peptídeos, também chamados de modelos clássicos, estabelecem que, em baixas proporções peptídeo:lipídeos, os peptídeos adsorvidos orientam-se paralelamente sobre a superfície das membranas celulares. Posteriormente, ao atingirem uma concentração limite, as moléculas do peptídeo orientam-se perpendicularmente à membrana, formando poros que podem estar

revestidos de peptídeos e lipídeos segundo o modelo poro toroidal, ou exclusivamente de peptídeos segundo o modelo barril. No modelo de carpete, a membrana é desestabilizada e solubilizada em estruturas micelares, produto da tensão gerada pelos peptídeos na membrana (BROGDEN, 2005; GABERNET et al., 2016; MAHLAPUU et al., 2016; NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011). Após a formação de canais iônicos, poros transmembranares e a ruptura da membrana, ocorre o extravasamento de íons e outros metabólitos, a perda de componentes citoplasmáticos, e a dissipação dos potenciais eletroquímicos, que culminam com a morte da célula (BROGDEN, 2005; MAHLAPUU et al., 2016; YEAMAN; YOUNT, 2003).

Embora os peptídeos possam interagir com a membrana, eles podem apresentar um mecanismo de ação não membranolítico. Assim, novos modelos foram propostos para entender como alguns peptídeos são internalizados ou se translocam através das membranas, ou até mesmo perturbam a membrana plasmática, porém sem causar lise celular, entre eles, os modelos de eletroporação, segregação de lipídeos carregados, modelo de canais agregados, afinamento da membrana, entre outros (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012), representados na Figura 3. No modelo jangada afundando “*sinking raft*”, a interação de peptídeos com determinados domínios de lipídeos induz um desequilíbrio de massa e cria um gradiente de curvatura na membrana, os peptídeos traspassam a membrana por auto-associação, formando poros transitórios que aumentam a permeabilidade da membrana e o extravasamento do conteúdo intracelular. Posteriormente, a membrana é estabilizada e os peptídeos residirão em ambos lados da membrana (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012). No modelo de eletroporação, as interações peptídeo membrana promovem uma diferença no potencial de membrana que, quando atingem 0,2 V, pequenos poros são formados na membrana, facilitando a passagem dos peptídeos. No modelo de segregação de lipídeos, há um rearranjo de lipídeos na membrana, onde lipídeos aniônicos se agrupam em domínios peptídeo-lipídeo, separados de lipídeos zwitteriônicos (NGUYEN; HANEY; VOGEL, 2011; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012). Vários outros modelos têm sido propostos, para compreender as interações dos peptídeos com as membranas, e sua ação não-membranolítica (TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012).

Os mecanismos de ação de peptídeos bioativos vão além de perturbar ou romper a membrana celular. Alguns peptídeos apresentam alvos intracelulares, para isso os peptídeos são transportados ao interior da célula por meio de diferentes vias como endocitose, ou mediante um transportador de membrana, ou por meio de algum mecanismo como os citados

previamente. Na membrana ou intracelularmente, diversas atividades já foram determinadas para essa classe de peptídeos bioativos não líticos como ativação ou inativação de receptores hormonais estimulando cascatas de sinalização, atividades imunomoduladoras, ação antiangiogênica, indução de vias de morte celular como apoptose, necrose, necroptose, piroptose e outros mecanismos (FELÍCIO et al., 2017; GASPAR; SALOMÉ VEIGA; CASTANHO, 2013).

1.6 O escorpião *Hadruides lunatus* e os peptídeos da família das Lunatinas.

O escorpião do gênero *Hadruides* é um dos mais comuns no Peru (Pocock, 1893). Atualmente este gênero possui 16 espécies, das quais 13 habitam o Peru (OCHOA; PRENDINI, 2010). O gênero *Hadruides* (Pocock, 1893) pertence à subfamília *Caraboctoninae*, à família *Caraboctonidae*, e à superfamília *Iuroidea* de escorpiões. Entre as diversas espécies dos *Hadruides*, destaca-se a espécie *Hadruides lunatus* (L. Koch, 1867), dada a sua ampla distribuição no deserto ao longo da costa do pacífico peruano e equatoriano (OCHOA, 2005).

O primeiro estudo do veneno bruto liofilizado de *H. lunatus*, apontou uma baixa letalidade do venenos em camundongos, com DL_{50} de $68 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$. Em cães, um dos efeitos fisiológicos do veneno é a queda da pressão sanguínea (50-60 mmHg), quando injetado em concentrações de até $0,75 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$, e a morte causada por parada respiratória se dá em doses maiores ($1,2 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$), para o veneno fresco (ZAVALETA; NAVARRO; CASTRO DE LA MATA, 1981). Estudos posteriores de Escobar e colaboradores do veneno bruto do *H. lunatus* levaram à identificação de três proteínas de carácter básico, denominadas de HI1, HI2 e HI3, as quais paralisaram, respetivamente, insetos (*Grillus sp.*), crustáceos (*Porcellio laevis*) e a extremidade inoculada de ratos albinos. Notou-se que a atividade destas proteínas não correspondia à atividade proteolítica ou fosfolipásica presente no veneno bruto (ESCOBAR et al., 2002). Aprofundando os estudos da toxina HI3, os autores encontraram uma atividade miotóxica da proteína, provocando a liberação de enzimas como a creatina cinase (CK) e a lactato desidrogenase (LD), quando $26,8 \mu\text{g}$ de HI3 foram injetados no músculo estriado esquelético. Este aumento foi acompanhado de um incremento na concentração intracelular de cálcio (3 a 5 vezes), após 45 minutos de inoculação, mostrando que a toxina HI3 estaria atuando de maneira específica a nível muscular (ESCOBAR; RIVERA; TINCOPA, 2003).

Estudos mais recentes do veneno do *H. lunatus* realizados por Costal-Oliveira e colaboradores encontraram no veneno bruto atividades enzimáticas: fosfolipásicas, proteolíticas, hialuronidásicas, cardiotoxícas, etc. A toxicidade do veneno de *H. lunatus* foi avaliada de forma intracraniana e intraperitoneal em camundongos (DL_{50} 0,1 mg·Kg⁻¹ e 21,55 mg·Kg⁻¹, respectivamente). Entre as propriedades imunogênicas do veneno de *H. lunatus*, foi observada uma reatividade cruzada com venenos de escorpiões butídeos (pertencentes à família *Buthidae*) do novo mundo, entre eles *Tityus serrulatus* e *Centruroides sculpturatus*. Entretanto, os escorpiões do velho mundo como *Androctonus australis Hector* mostraram uma reatividade cruzada inferior. Alterações cardiorrespiratórias foram observadas em ratos inoculados com o veneno e, cardiocitos incubados com o veneno mostraram uma redução no transiente de cálcio, reduzindo a força de contração das células cardíacas (COSTAL-OLIVEIRA et al., 2012, 2015, 2016).

Apesar da caracterização bioquímica e farmacológica do veneno de *Hadruidoidea* em estudos anteriores, em nenhum desses trabalhos foi abordada a composição peptídica do veneno de *H. lunatus*. Como descrito anteriormente, venenos animais são uma rica fonte para a descoberta de novas moléculas bioativas, entre elas os peptídeos. Por esse motivo, nosso grupo de pesquisa realizou em 2012, o primeiro estudo do perfil proteico e peptídico da peçonha do *H. lunatus* (SANTANA, 2012). As frações cromatográficas obtidas do veneno bruto foram analisadas por espectrometria de massas (MS) do tipo MALDI (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz), e entre diversos peptídeos, foram identificados por sequenciamento de *novo* os peptídeos da família das Lunatinas (SANTANA, 2012). Estes peptídeos foram então denominados de Lunatina-1 (H-FIGGLLKTLTSFF-NH₂), Lunatina-2 (H-FLSTIANLVGGILGGGAL-NH₂), e Lunatina 3 (H-LLKLFGLLTPALSALLLT-OH) com as massas moleculares de 1442,74, 1671,98 e 1897,39 Da, respectivamente. Os peptídeos Lunatina-1 e -2 apresentaram a modificação pós-traducional amidação (-NH₂) na porção C-terminal como registrado na Tabela 1 (SANTANA, 2012).

Tabela 1. Sequências obtidas da análise proteômica do veneno de *H. lunatus*.

Nome	Sequências	[M+H] ⁺ (Da)	MM calc. (Da)	Δ (Da)	Retenção (% ACN)
Lunatina-1	FIGGLLKTLLTSFF-NH₂	1442,84	1442,88	0,04	39,40
Lunatina-2	FLSTIANIVGGILGGGAL-NH₂	1671,97	1671,57	0,4	43,30
Lunatina-3	LLKLFGLLTPALSALLLT	1897,21	1897,20	0,01	49,30

[M+H]⁺: massa molecular monoisotópica monocarregada. MM calc.: massa molecular calculada. Δ (Da): Diferença entre a massa obtida e a calculada. Adaptado de (SANTANA, 2012).

Foi realizada uma triagem da atividade antimicrobiana com os peptídeos L1 e L2, o mesmo estudo gerou um análogo do peptídeo L1 com um resíduo de Gln na posição 7 (FIGGLLQTLTSFF-NH₂), o análogo L1-K7Q. Diferentemente dos peptídeo L2 e L1-K7Q, o peptídeo L1 apresentou atividade antibacteriana contra bactérias do tipo Gram-negativas *E. coli* e *P. fluorescens*, na faixa de 23,80 e 47,60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, sendo mais ativo em bactérias Gram-positivas (*Streptococcus agalactiae*, *S. bovis*, *S. uberis*, *Staphylococcus* spp. coagulase negativo, *S. aureus*), com concentrações inibitórias mínimas (MIC) no intervalo de 1 a 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (SANTANA, 2012).

1.6.1 Lunatinas como inibidores proteicos

Como mencionado anteriormente, a ação de peptídeos bioativos contra- microrganismos vai além da interação peptídeo-membrana. Algumas dessas moléculas atuam em receptores dos patógenos, impedindo o fluxo regular de compostos, enquanto outras podem atuar em proteínas intracelulares que regulam vias de sinalização nas células do patógeno ou do hospedeiro. Este é o caso do peptídeo Lunatina-2 (L2), que apresenta similaridade de estrutura primária com proteínas metiltransferases, cinases e fosfatases de bactérias (SANTANA, 2012; SANTOS COSTA, 2016), proteínas estas que utilizem o grupo fosfato no seu mecanismo de ação, como a proteína tirosina fosfatase YopH presente nas bactérias *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. Pestis*, da ordem *Enterobacteriales*, família *Yersiniace* e do gênero *Yersinia*, espécies virulentas e patogênicas ao homem (MIKULA; KOLODZIEJCZYK; GOLDMAN, 2013).

Devido à relevância que as bactérias *Yersinia* apresentam como patógenos humanos e o fator crucial que as proteínas Yops têm para a virulência das mesmas, foram avaliadas as atividades dos peptídeos L2 e derivados na atividade da fosfatase YopH (SANTOS COSTA, 2016). Este estudo demonstrou que o peptídeo L2 e o análogo L2.1K (H-FLSTIANIVGKILGGAL-NH₂), tiveram um efeito inibitório significativo na atividade enzimática da YopH (apresentando um IC₅₀ = 1,37 e 21,64 μM, respectivamente). Ambos os peptídeos agem como inibidores reversíveis. A L2 apresentou uma inibição do tipo mista, e uma seletividade pela YopH em relação a outras fosfatases humanas como a proteína tirosina fosfatase não-receptora tipo 1 (IC₅₀ = 16,74 μM), e as proteínas linfóide específica tirosina fosfatase e PEST (IC₅₀ > 100 μM), as quais pertencem à família PEST (prolina, ácido glutâmico, serina e treonina) (JOHNSON; ERMOLIEFF; JIROUSEK, 2002; VEILLETTE et al., 2009).

Alterações conformacionais na estrutura secundária da enzima YopH, induzidas pela L2, foram observadas. Ao mesmo tempo, estas alterações na estrutura secundária levaram a uma redução na estabilidade térmica da enzima. Por meio de experimentos de ancoragem molecular e de proteólise do complexo peptídeo-enzima, foram avaliadas as regiões de maior probabilidade de interação da L2 com a YopH, identificando-se três possíveis regiões de interação. O modelo de mais baixa energia da interação entre a L2 e a região R1, próxima do sítio catalítico, em contato direto com a hélice α1, e que corroborou os dados da proteólise, está representado na Figura 4, onde pode se observar os principais resíduos envolvidos na interação do complexo peptídeo-enzima. A localização do peptídeo nesta região favorece a ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxila da Ser-3 da L2 e a cadeia lateral do Asp-356 do sítio WPD, que participa na reação enzimática (BAHTA; BURKE, 2012). Também é possível observar as interações hidrofóbicas que acontecem ao longo da porção não enovelada da região C-terminal da L2 com a hélice α1 da YopH.

O estudo da atividade inibitória bem como do mecanismo de inibição sobre a enzima YopH, deixou em evidência o potencial que os peptídeos Lunatins e derivados apresentam como pontos de partida para o desenho e desenvolvimento de um novo tipo de inibidores para esta classe de enzimas.

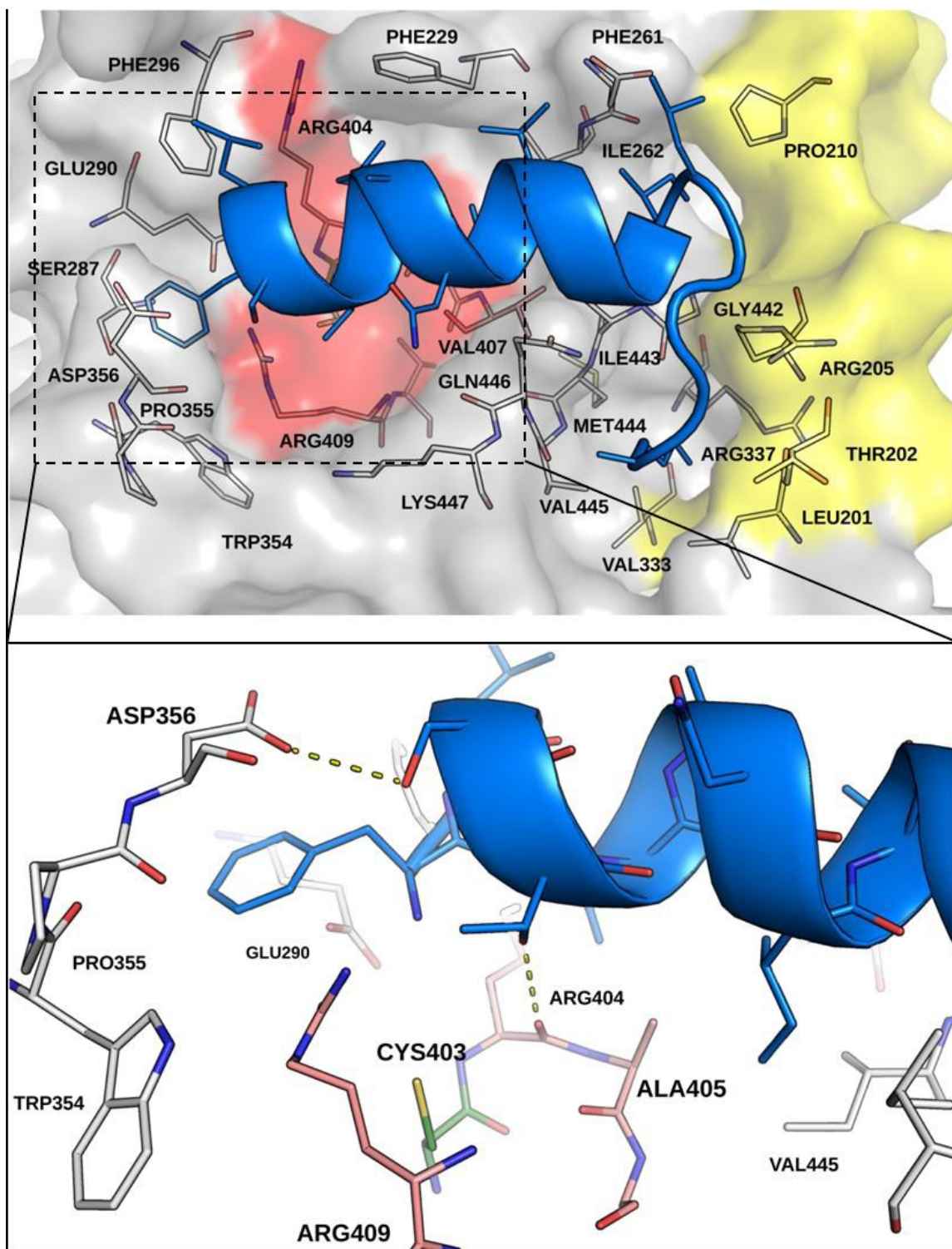


Figura 4. Modelo de interação do peptídeo Lunatina-2 na região R1 da YopH.

O peptídeo Lunatina-2 está representado em *cartoon* na cor azul e a estrutura da enzima está representada na forma de superfície. Os resíduos próximos à região de interação da enzima com o peptídeo estão destacados. A região do sítio catalítico está destacada em vermelho e a região da hélice $\alpha 1$ em amarelo. Na janela destacam-se os resíduos envolvidos na interação da enzima com o peptídeo. As ligações de hidrogênio estão indicadas com linhas tracejadas. Tomado da tese de doutorado de (SANTOS COSTA, 2016).

1.6.2 Lunatina-1 (L1) e suas diversas funções

Alguns peptídeos bioativos apresentam amplo espectro de atividade biológica, tais como antimicrobiana, antitumoral, imunomoduladora e carreadora de moléculas (GASPAR; SALOMÉ VEIGA; CASTANHO, 2013; MULDER et al., 2013). De Souza-Gomes (2018), descreveu a atividade antitumoral e citotóxicas do peptídeo L1 e outros derivados de L1, em diferentes linhagens celulares como HL-60, (leucemia promielocítica humana), células Jurkat (leucemia de células T humana), THP1 (leucemia monocítica aguda humana), MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário humano), MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano estrógeno-dependente) e HCT-116 (carcinoma colorretal humano). A L1 inibiu aproximadamente 50% da proliferação celular nas linhagens Jurkat, THP-1 e HCT-116, e mais de 50% nas linhagens HL-60, MCF7 e MDA-MB-231, na concentração de 50 μM . Na linhagem HL-60, os mecanismos de morte celular foram avaliados (IC_{50} de $45,79 \pm 4,85 \mu\text{M}$), e na Figura 5 podemos ver uma representação esquemática resumida, do mecanismo de ação proposto para o peptídeo L1 (DE SOUSA GOMES, 2018).

A L1 apresentou um efeito estimulador da morte celular por apoptose para as células HL-60, de forma semelhante ao controle positivo etoposídeo, sabidamente indutor da apoptose para a linhagem HL-60 (BARRY; REYNOLDS; EASTMAN, 1993). Os peptídeos antitumorais podem ativar a via extrínseca e/ou intrínseca da apoptose, seja pela ativação de fatores pró-apoptóticos ou inibindo fatores anti-apoptóticos (KUO et al., 2018; LABELLE et al., 2012).

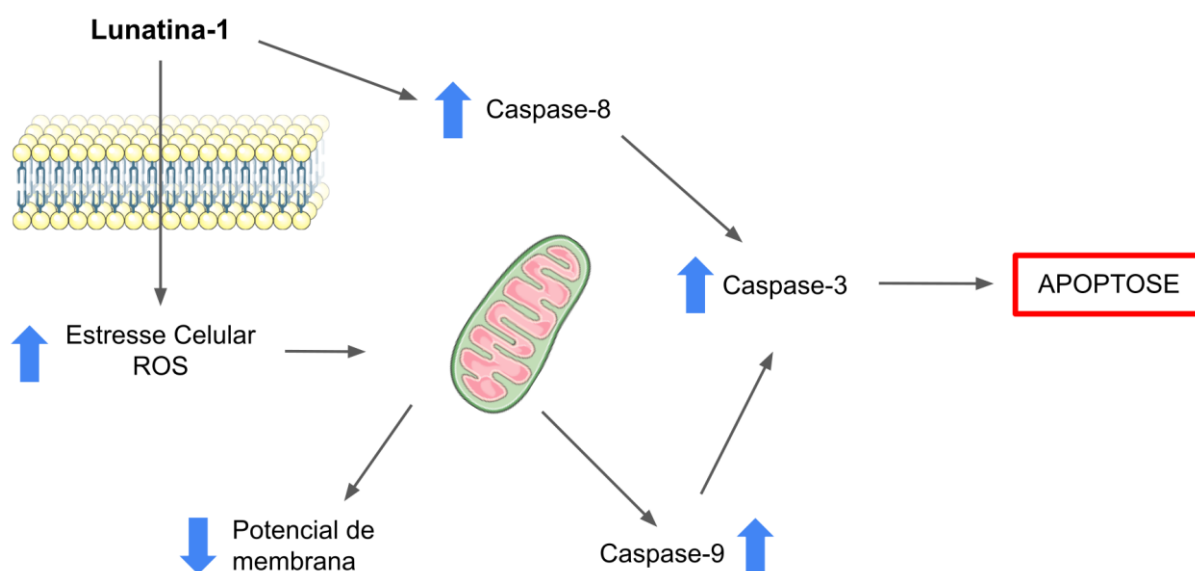


Figura 5. Esquema ilustrativo do mecanismo de indução de morte da Lunatina-1 em células HL-60.

Por meio de diversos experimentos de viabilidade celular como; fragmentação de DNA, exposição de fosfatidilserina, ativação de proteínas pró apoptóticas, entre outras, foi determinada a apoptose como mecanismo de morte celular induzido pela Lunatina-1 nas células HL-60. Adaptado da tese de doutorado de (DE SOUSA GOMES, 2018).

Células HL-60 tratadas com a L1 na presença de cálcio apresentaram ligação do peptídeo na membrana celular e um acúmulo no citoplasma, o qual não foi observado na ausência de cálcio. Os peptídeos de penetração celular (CPPs) podem ser internalizados por endocitose, translocação direta ou outros mecanismos que dependem de fatores como concentração e sequência primária do peptídeo, a composição da membrana e do meio celular, entre outros (JIAO et al., 2009; LI; TSUI; MA, 2015). Diferentes mecanismos de penetração celular podem acontecer para um mesmo CPP, porém a dependência de cálcio para a L1 indica a endocitose como o mecanismo de translocação principal, comum para a maioria de peptídeos CPPs (GRÄSLUND et al., 2011).

1.6.3 Lunatina-1 e peptídeos derivados

Uma das maneiras de avaliar a eficácia de agentes quimioterápicos é analisando o potencial que estes compostos apresentam na redução da sobrevivência de células formadoras de colônia²⁴. Dessa forma, pode-se avaliar a capacidade da droga de induzir morte das células do tumor e prevenir o seu reaparecimento. (HILCHIE et al., 2015; ZIPS; THAMES; BAUMANN, 2005).

Um novo peptídeo denominado de L1C3 (FIGGLLKKITNFF-NH₂) e sua versão minimizada L1C3M (LKKITNFF-NH₂) foram desenhados a partir da similaridade entre a L1 e a caspase-3 humana (L136)KKITNF(F143), (NP_116786.1). O peptídeo L1C3 foi testado em diversas linhagens celulares entre elas HL-60 (IC₅₀ de 45,42 ± 3,06 µM). Os estudos dos mecanismos moleculares de atividade dos peptídeos L1 e L1C3 estenderam-se às células de câncer mamário MDA-MB-231 (IC₅₀ de 21,7 ± 3,5 µM e 55,81 ± 11,79 µM, respectivamente) e MCF-7 (IC₅₀ de 31,6 ± 8,8 µM e 50,81 ± 9,41 µM, respectivamente). Atividades de proliferação celular foram avaliadas para esses peptídeos, nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. A L1 (25 µM) reduziu a formação de novas colônias em mais de um 80%, em ambas as células. Por outro lado, o L1C3 (25 µM) teve uma redução significativa na formação de novas colônias na linhagem MCF-7 (75%). Quando a concentração dos peptídeos é reduzida para 10 µM, as células mantiveram a sobrevivência em 80% (DE SOUSA GOMES, 2018).

A apoptose é um processo de morte celular que depende da sinalização celular, onde as alterações bioquímicas e morfológicas das células acontecem de forma dependente do tempo. Por outro lado, a morte celular do tipo necrose dá-se de forma mais rápida devido ao comprometimento da integridade da membrana celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático (BERTHELOOT; LATZ; FRANKLIN, 2021). Diferentemente da linhagem HL-60, as células MDA-MB-231 tratadas com L1 (25 µM) e L1C3 (50 µM) por 3, 6, e 24 h apresentaram alterações morfológicas como extravasamento do conteúdo citoplasmático, perda da integridade da membrana celular, redução no tamanho das células, junto com a presença de debris celular, que são características do processo de morte celular por necrose.

²⁴ Linhagens formadoras de colônia são aquelas que podem sobreviver ao tratamento, gerando novas colônias.

Para diferenciar se os peptídeos L1 e L1C3 induzem a morte celular das células MDA-MB-231 por meio da necrose ou necroptose, uma “necrose programada”, que requer as proteínas do receptor de proteína cinase (RIPK1 e RIPK3) e que pode funcionar como uma via alterna à apoptose, com funções pró-inflamatórias, importante para a detecção de patógenos como também no reparo de tecidos (BERTHELOOT; LATZ; FRANKLIN, 2021; PASPARAKIS; VANDENABEELE, 2015), as células MDA-MB-231 foram pré-tratadas com necrostatina-1 (Nec-1), um inibidor de RIPK1. Para ambos os peptídeos, não houve diferença na viabilidade celular, quando comparado o tratamento com Nec-1 e o grupo não tratado. Dessa forma, descarta-se a necroptose como mecanismo de morte celular induzido pela L1 e L1C3 nas células MDA-MB-231 (DE SOUSA GOMES, 2018).

O potencial citotóxico dos peptídeos L1 e L1C3 foi avaliado em eritrócitos de cordeiro e, também, em células renais (HEK-293) e hepatócitos (HepG2) de humanos. Ambos os peptídeos não apresentaram atividade hemolítica. Entretanto, o peptídeo L1C3 foi menos citotóxico para as células hepáticas e renais ($IC_{50} > 90 \mu M$), quando comparado com a L1, com concentrações de IC_{50} na mesma faixa das linhagens tumorais (20 - 60 μM). Estes resultados mostram como os peptídeos L1 e L1C3 têm potencial como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais e moléculas carreadoras de fármacos. Ao mesmo tempo, estes peptídeos podem ser estudados visando a potenciar as suas atividades aumentando a seletividade por células tumorais ou microbianas.

1.6.4 A importância dos resíduos na atividade da Lunatina-1

Com o intuito de compreender a relevância de cada resíduo de aminoácido da L1 para a atividade do peptídeo, foram feitos ensaios de citotoxicidade com análogos da L1, por meio do método denominado *Alanine Scanning*, AlaScan ou varredura de alanina (Figura 6). O princípio da técnica consiste na substituição de cada resíduo de aminoácido na sequência do peptídeo ou proteína, por um resíduo de alanina. O resíduo de alanina pode estar presente tanto em α -hélices quanto em folhas- β e apresenta um grupamento metil ($-CH_3$) como cadeia lateral. À exceção da glicina, a cadeia lateral da alanina difere das cadeias laterais dos outros 18 resíduos de alfa-aminoácidos, ao serem mais volumosas e/ou complexas (DAVID L. NELSON; MICHAEL M COX, 2021).

A perda dos resíduos de aminoácidos, Thr-8 (L1-T8A), Thr-10 (L1-T10A) e Ser-11 (L1-S11A), reduziu em 50% a atividade dos peptídeos análogos, quando comparados à atividade da L1 na linhagem HL-60 (Figura 6). Estes resíduos apresentam o grupamento hidroxila (-OH), importante na formação de pontes de hidrogênio. De forma semelhante, as alterações em resíduos com cadeias laterais mais volumosas como a Phe-1 (L1-F1A), Ile-2 (L1-I2A), Leu-5 (L1-L5A), Leu-6 (L1-L6A) e Leu-9 (L1-L9A) também culminaram em uma redução do 50 a 70% na atividade dos análogos peptídicos. Isto nos leva a acreditar que há uma relevância da hidrofobicidade para a atividade da L1, seja para favorecer a entrada do peptídeo às células ou na interação com seus alvos intracelulares (DE SOUSA GOMES, 2018).

Entre os resultados mais interessantes, destaca-se a substituição do resíduo Lys-7 pela Ala (L1-K7A). A Lys-7 é o único resíduo que confere carga líquida positiva à L1, e a perda deste resíduo levou a uma perda total da atividade antitumoral do peptídeo. Embora este resultado não seja suficiente para indicar a perda da interação da L1-K7A com as membranas das células HL-60, ou a diminuição na capacidade de penetração celular do peptídeo, é possível afirmar que a Lys-7 é importante para a atividade citotóxica da L1, nos mecanismos de ativação de vias de sinalização de forma direta ou indireta nas células HL-60.

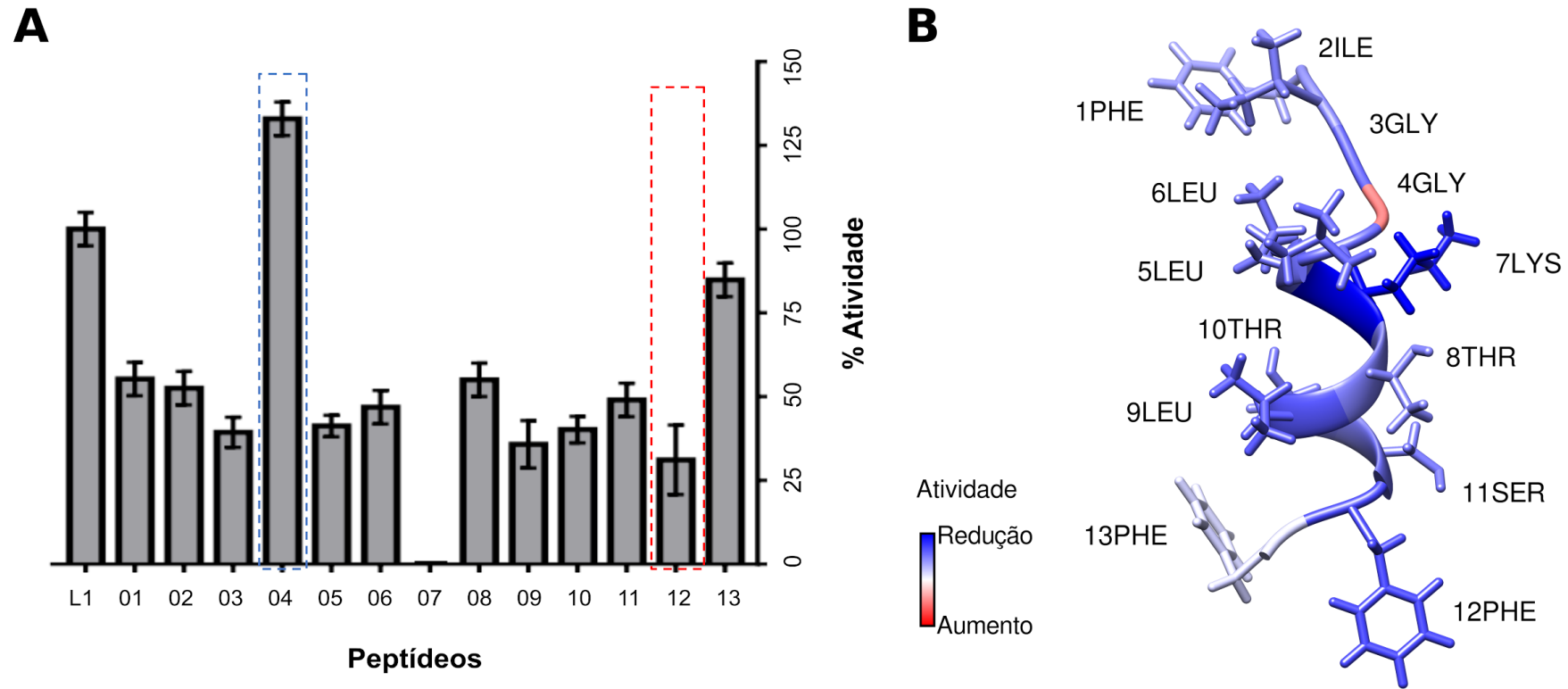


Figura 6. Ensaio de citotoxicidade de análogos de Lunatina-1 substituídos por alanina.

A. Células de leucemia promielocítica aguda (HL-60) foram tratadas com os análogos da L1, por 48 h. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de resazurina e a atividade de cada peptídeo análogo foi determinada em relação à atividade do peptídeo molde L1, sendo sua IC_{50} considerada como 100% de atividade. **B.** Estrutura 3D da L1 obtida por RMN. As cores dos resíduos estão determinadas pelo efeito que a substituição pela alanina gera, na atividade do peptídeo análogo comparado à L1, como indicado na escala de cores. Adaptado da tese de doutorado de (DE SOUSA GOMES, 2018).

Quando comparados aos outros doze resíduos, a Gly-4 (L1-G4A) foi a única alteração que levou a um ganho de atividade citotóxica para o peptídeo. A presença de um grupamento metil extra pode estar favorecendo a interação com proteínas ou outros componentes da membrana celular, como também entre moléculas do peptídeo. Além do mais, é possível indicar que esta alteração é específica da posição, uma vez que a mesma alteração com a Gly-3 (L1-G3A) teve o efeito oposto, reduzindo a atividade citotóxica do peptídeo em mais de 50%. Outro resultado que mostrou a relevância na posição da troca dos resíduos foi a Phe-12 (L1-F12A), quando comparada às Phe-1 e Phe-13 (L1-F13A), a qual teve um efeito maior na redução da atividade do peptídeo análogo.

Estes resultados mostram como as alterações na estrutura primária do peptídeo L1 tiveram um impacto na atividade da molécula e, ainda que estas alterações possam estar determinadas principalmente pelas propriedades físico-químicas dos resíduos substituídos pela Ala. É possível que mudanças nas conformações ou na orientação espacial do peptídeo com seus alvos estejam acontecendo e possam também explicar as variações nas atividades observadas para os peptídeos análogos. Este tipo de comportamento não é surpreendente e já foi observado para outros peptídeos como AmyI-1-18 derivado da α -amilase e o peptídeo desenhado BP100 (TANIGUCHI et al., 2014, 2016; ZAMORA-CARRERAS et al., 2016).

Diversos trabalhos do nosso grupo de pesquisa já mostraram o potencial que os peptídeos Lunatins têm como protótipos para o desenvolvimento de novos biofármacos com atividades antimicrobianas, antitumorais, inibidores de fosfatases, carreadores de fármacos, entre outros. Assim, com os dados expostos, é do nosso interesse fazer um estudo da relação entre as conformações de alguns dos análogos da Lunatina-1 e as suas atividades biológicas, uma vez que as informações obtidas contribuíram ao desenho de variantes mais ativas e seletivas do peptídeo Lunatina-1, ampliando o conhecimento que se têm desta família de peptídeos bioativos. Além disso, essas informações poderão ser utilizadas para estudos de predição e prospecção de peptídeos bioativos por meio de ferramentas *in silico*. Estudos desta natureza permitem encontrar quais as propriedades físico-químicas que descrevem padrões estruturais necessários para determinados peptídeos de interesse.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desta tese foi realizar uma varredura funcional do peptídeo Lunatina-1, por meio do método Ala-Scan para identificar os resíduos essenciais para a atividade biológica, permitindo assim uma visão mais abrangente da relação entre estrutura e função.

2.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos visamos responder às seguintes perguntas:

- Quais as características da estrutura primária do peptídeo Lunatina-1?
- O peptídeo Lunatina-1 e seus análogos derivados do Ala-Scan são citotóxicos em linhagem celular não tumoral?
- Os análogos do peptídeo Lunatina-1 apresentam divergências na estrutura tridimensional quando em contato com modelos miméticos de membrana?
- Estas divergências poderiam ser responsáveis pelas diferentes atividades observadas em estudos anteriores?
- Quais resíduos dos peptídeos Lunatina-1 e análogos são responsáveis pelo enovelamento e as conformações 3D dos peptídeos?

3 HIPÓTESE

A presente tese propõe que a aplicação do método Ala-Scan para identificar os resíduos críticos à atividade biológica da Lunatina-1 resultará em uma compreensão aprofundada da inter-relação entre sua estrutura e função. A análise da estrutura primária, citotoxicidade em linhagens celulares não tumorais, interações com modelos miméticos de membrana e o enovelamento dos peptídeos Lunatina-1 e seus análogos em modelos miméticos de membrana visa elucidar os mecanismos implícitos às distintas atividades observadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análise das estruturas primárias do peptídeo Lunatina-1 e análogos *in silico*

4.1.1 Alinhamento de sequências de aminoácidos de peptídeos bioativos e Lunatina-1

Para o alinhamento da sequência de aminoácidos do peptídeo Lunatina-1, sequências peptídicas do *Antimicrobial Peptide Database (APD3)* foram baixadas no formato fasta (https://aps.unmc.edu/assets/sequences/APD_sequence_release_09142020.fasta, acessado: 04/07/23). As sequências foram filtradas com o objetivo de retirar sequências que apresentassem algum resíduo diferente dos vinte α -aminoácidos ou sequências que apresentem dez ou mais resíduos; Gly, Cys, Ala ou Thr em sequência, os quais podem ser interpretados como nucleotídeos pelo algoritmo de busca. Estes dados foram então submetidos a uma análise utilizando a ferramenta *BLASTp* com o objetivo de selecionar as sequências de maior similaridade com a Lunatina-1 mantendo o critério de *E value* < 1 . Ao final, o conjunto de sequências de peptídeos foi alinhado por meio das ferramentas Clustal Omega e T-Coffee, e visualizados por meio da interface gráfica Unipro UGene.

4.1.2 Determinação dos parâmetros físico-químicos de Lunatina-1 e seus análogos

As propriedades físico-químicas de carga, hidropaticidade, composição de aminoácidos e momento hidrofóbico, foram determinadas por meio do preditor de peptídeos desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, o *enCrypted* (SANTOS et al., 2021). A hidropaticidade é determinada como o índice de hidropaticidade média (GRAVY), usando a escala de Kyte e Doolittle. O índice de hidropaticidade média (GRAVY) brinda informações sobre o caráter hidrofílico ou hidrofóbico de um peptídeo ou proteína, com base na composição de aminoácidos que apresenta. Valores positivos indicam hidrofobicidade, valores negativos indicam moléculas hidrofílicas, de acordo com a escala de Kyte e Doolittle (CHANG; YANG, 2013; KYTE; DOOLITTLE, 1982). A representação teórica das hélices por meio de rodas de hélice dos peptídeos, foram feitos com a ferramenta *Heliquest* (<https://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) (GAUTIER et al., 2008).

4.2 Ensaios de viabilidade Celular

Os ensaios de atividade citotóxica foram realizados em colaboração com o Laboratório de Quimioterapia de Protozoários Egler Chiari do Departamento de Parasitologia da UFMG, coordenado pela Profa. Dra. Érica S. Martins-Duarte.

As células NHDF (fibroblasto dermal humano normal) foram cultivadas no meio RPMI 1640 (Gibco), suplementadas com 2% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina e 1% de solução antibiótica (100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina), mantidas em garrafas de cultivo em estufa a 37°C com atmosfera úmida e CO₂ a 5% (v/v) (ARAÚJO-SILVA et al., 2021). Por meio do ensaio de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio), foi feita a avaliação da atividade citotóxica dos peptídeos L1 e análogos, nas células NHDF. As células foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas com os peptídeos nas concentrações de 20, 40, 80 e 120 µM por 96 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas com uma solução de PBS, e 100 µL de 10 mM de glicose em PBS e 20 µL do reagente MTS (Promega, Madison, WI, USA) foram acrescentados aos poços. Depois de 3 h de incubação a 37 °C, a absorbância foi lida a 490 nm e a citotoxicidade calculada como porcentagem de células viáveis versus células controle não tratadas (ARAÚJO-SILVA et al., 2021).

As análises estatísticas dos ensaios de viabilidade celular foram realizadas por meio do *software* GraphPad Prism versão 8.0. Os testes utilizados foram: cálculo de desvio padrão, teste de t Student ou análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (p<0,05).

4.3 Determinação das estruturas tridimensionais de Lunatina-1 e seus análogos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear

4.3.1 Coleta das medidas de ressonância magnética nuclear

As medidas de ressonância magnética nuclear foram obtidas a partir de amostras à 1 mM dos peptídeos L1, L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A, em 500 μ L de solução micelar de dodecilsulfato de sódio deuterado SDS- d_{25} 100 mM. Os peptídeos L1-G4A e L1-F12A, também foram analisados em 500 μ L de solução de TFE- d_2 :H₂O (40:60, v/v). Para homogeneização do campo magnético, o bloqueio ou *lock* foi feito com 10% de D₂O. Os espectros unidimensionais (1D) e bidimensionais (2D) da L1 e dos peptídeos análogos foram obtidos em dois equipamentos. As amostras em TFE- d_2 foram analisadas em um espectrômetro Bruker *AVANCE* III operado na frequência de 800 MHz, localizado no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (CNRMN) da UFRJ (RJ). As medidas de RMN de amostras em solução de SDS- d_{25} foram obtidas em um equipamento Bruker DRX 600 - série *AVANCE*, operando na frequência de 600 MHz, localizado no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LAREMAR) do Instituto de Química da UFMG (MG). Ambos operados a 300 K.

Para a supressão do sinal de água, foram usadas técnicas de pré-saturação. Para os experimentos de espectroscopia de correlação total (TOCSY), os espectros foram adquiridos usando as sequências de pulso *dipsi2esgpph* e *dipsi2gpph19* (SHAKA; LEE; PINES, 1988), usando um tempo de mistura de 80 ms, 1024 pontos na dimensão F2 e 512 na F1, 264 dummy scans e 48 scans. A largura espectral foi de 7142 Hz e o *offset* da frequência do transmissor em 4,704 ppm. Para os experimentos de espectroscopia Nuclear *Overhauser* (NOESY), os espectros foram adquiridos usando as sequências de pulso *noesyegpph* (KUMAR; ERNST; WÜTHRICH, 1980), *noesygpphw5* (com supressão de *watgate*) e com tempos de mistura de 250 e 300 ms. A largura espectral foi de 7142 Hz e 512 incrementos *t1* foram coletados, 1024 pontos na dimensão F2 e 512 na F1, 254 dummy scans e 32 scans. Para os experimentos de coerência heteronuclear de simples-quantum (HSQC), os espectros foram coletados usando a sequência de pulso de eco-antieco *hsqcedetgppsp.3* (WILLKER et al., 1993), com larguras espectrais F1 de 24902 Hz e F2 de 7143 Hz com 300 scans e 30 dummy scans, 2048 pontos na dimensão F2 e 254 pontos na dimensão F1.

4.3.2 Interpretação dos dados de RMN e cálculo das estruturas tridimensionais

O programa Topspin 4.1.4 da Bruker foi utilizado durante a aquisição dos experimentos, como também durante o processamento dos espectros, para fazer os ajustes de fase e correção de linhas de base dos espectros usando os modos *qfil* e *sfil*. Posteriormente, a interpretação dos mapas de contorno para a atribuição dos sinais de correlação foi feita por meio da plataforma CcpNMR Analysis v2.4.2 (VRANKEN et al., 2005).

Os assinalamentos sequenciais das ressonâncias de cada peptídeo foram feitos por meio do método de Wüthrich (WÜTHRICH, 1986). Para isso, foram assinalados os espectros dos experimentos TOCSY e NOESY que permitem a identificação das interações intra e inter-residuais, respectivamente, para os átomos de hidrogênio (experimentos homonucleares). Os assinalamentos dos espectros ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{15}N HSQC, permitem a identificação das interações intramoleculares, para os átomos de hidrogênio com carbono e nitrogênio, respectivamente, (experimentos heteronucleares). Os valores dos deslocamentos químicos das ressonâncias assinaladas, foram transformados em restrições de distância, usando os volumes dos sinais NOE (NILGES, 1996). Ao mesmo tempo, por meio da análise dos deslocamentos químicos de $\text{H}\alpha$, $\text{C}\alpha$, $\text{H}\beta$ e $\text{C}\beta$, foram obtidas as restrições dos ângulos diedros (φ e ψ) por meio da ferramenta DANGLE no CcpNMR (CHEUNG et al., 2010).

Os dados obtidos pelo assinalamento dos mapas de contorno foram exportados para o programa ARIA 2.3/CNS, para realização dos cálculos estruturais (RIEPING et al., 2007). Para isso, usando um protocolo de anelamento simulado e começando com uma conformação estendida, foram geradas 200 estruturas. Posteriormente foram feitas 20000 etapas de anelamento simulado a 1000 K seguida de uma diminuição na temperatura em 15000 etapas para o primeiro estágio de anelamento de resfriamento lento. Finalmente, as vinte estruturas de menor energia foram refinadas e a qualidade estereoquímica foi avaliada com os programas WhatCheck e PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993). Para a visualização final e análise das estruturas tridimensionais das dez estruturas de menor energia, foi utilizado o programa UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimerax/>).

4.4 Simulações de dinâmica molecular

As análises de dinâmica molecular (DM) foram realizadas como indicado em (ALVES et al., 2023). As simulações de DM foram feitas com o *software* de simulação molecular GROMACS versão 2019.4 (VAN DER SPOEL et al., 2005). O estudo do enovelamento dos peptídeos levou em consideração as extremidades C_T amidadas, implementando os ajustes necessários de acordo com Oostenbrik et al, usando um campo de força GROMOS 53a6, em uma caixa de água (OOSTENBRINK et al., 2005). Inicialmente, os peptídeos L1, L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A foram gerados numa conformação desenovelada e esticada, gerados pelo programa UCSF Chimera. Antes de estudar os peptídeos em ambiente hidrofóbico, eles foram simulados em uma caixa de água, para usar a estrutura predominante como confôrmero inicial no estudo em mistura de TFE:H₂O. Cada peptídeo foi simulado em ambientes separados. O comando *gmx editconf* foi utilizado para colocar o peptídeo estendido no centro de uma caixa cúbica de 125 nm³. Os sistemas foram estabilizados pela inserção de um íon de cloro usando o comando *gmx insert-molecules*. O sistema foi solvatado com moléculas de água *spc216.gro* por meio do comando *gmx solvate*. O sistema foi energeticamente minimizado usando o algoritmo *steepest descent minimization*, um *cutoff-scheme* Verlet, em um número máximo de passos de 50000. Para equilibrar a temperatura do sistema e a velocidade das partículas para 300K, uma etapa NVT foi feita antes do início da simulação, utilizando o comando *gmx grompp*, usando um termostato *Berendsen* modificado com o algoritmo V-rescale (BERENDSEN et al., 1984), que permite que a temperatura do sistema fique próxima do valor alvo (integrador *leap-frog*, 500.000 *nsteps* e o algoritmo de constrição do tipo *lincs*). Depois, a pressão do sistema foi equilibrada por meio de uma etapa NPT. O acoplamento da pressão foi feito por meio do método de Parrinello-Rahman (PARRINELLO; RAHMAN, 1981), de modo isotrópico e com pressão de referência de 1 bar (integrador *leap-frog*, 500.000 *nsteps* e o algoritmo de constrição do tipo *lincs*). As simulações de DM foram feitas em 5×10^6 *nsteps*, um total de 10 nanosegundos (ns). Para identificar o confôrmero mais predominante, foi utilizado o comando *gmx cluster* com os dados de trajetória obtidos e o método *linkage*.

Posteriormente, foi estudado o enovelamento das estruturas obtidas no passo anterior, por meio de três simulações independentes de 1000 ns, em ambientes hidrofóbicos que correspondem a caixas com soluções de TFE:H₂O (40:60). A molécula de TFE foi obtida por meio do repositório *Automated Topology Builder* (ATB) (ATB molid: 4621) (MALDE et al., 2011). Seguindo as etapas anteriormente descritas, o peptídeo foi colocado em uma caixa cúbica

de 125 nm³, e depois, usando o comando *gmx insert-molecules*, 417 moléculas de TFE foram inseridas na caixa, correspondendo, em volume, a 40%. Depois, o sistema foi neutralizado com um íon de cloro e solvatado com moléculas de água SPC216. O sistema foi minimizado, e estabilizado em condições constantes de temperatura de 300 K e 1 bar de pressão. As simulações de DM foram feitas em 5×10^8 *nsteps*, um total de 1000 nanosegundos (ns). Para as análises dos dados, foram utilizadas as ferramentas do GROMACS *gmx dssp*, para avaliar os padrões de estrutura secundária dos peptídeos (DSSP). As simulações foram feitas em máquinas virtuais disponíveis na plataforma NMRBox (MACIEJEWSKI et al., 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 A estrutura primária da Lunatina-1 assemelha-se à de peptídeos da família das Maximinas, Temporinas e Caerulina

A Lunatina-1 é um peptídeo com atividade antimicrobiana, antitumoral e penetrante de célula (CPP). Estas características permitem que o peptídeo tenha um potencial para ser utilizado como molde no desenho de peptídeos mais ativos e seletivos, como no caso do peptídeo L1C3, obtido da similaridade entre a L1 e a Caspase-3 humana, que é menos citotóxico que a L1 e ainda manteve a atividade antitumoral (DE SOUSA GOMES, 2018). Dadas essas características da L1, nos perguntamos se a L1 apresenta similaridade na estrutura primária com outros peptídeos bioativos já estudados. Para isso, procuramos na base de dados de peptídeos antimicrobianos APD3, e foi realizada uma análise de similaridade de todas as sequências peptídicas com a L1, como descrito em material e métodos 4.1. De todas as sequências presentes no APD3, foi encontrada uma similaridade com três famílias de peptídeos: os fragmentos precursores de Caeruleina (CPF) (75%), as Temporinas (75%) e as Maximinas (85%), como observado na Figura 7.

Analisando os dados, podemos notar que existe um padrão na estrutura primária desses peptídeos. Dois resíduos hidrofóbicos seguidos de duas glicinas, depois dois resíduos hidrofóbicos (leucinas, de preferência), seguidos de uma lisina, depois um resíduo qualquer e por último um resíduo de leucina: (hidrofóbico-hidrofóbico-Gly-Gly-Leu-Leu-Lys-X-Leu). As Temporinas e a Lunatina possuem como característica a presença um resíduo de lisina conservado na posição 18 (do alinhamento), o qual é sempre antecedido por dois resíduos hidrofóbicos.

Além disso, é curioso observar que o peptídeo L1, obtido da análise do peptidoma do veneno do escorpião *Hadruidoidea lunatus*, possui similaridade com três famílias de peptídeos identificadas em secreções de venenos de sapos e rãs. São eles: (a) CPF-SE3 (H-GFLGSLLKTGLKVGSNLL-NH₂), que pertence à família de fragmentos precursores de Caeruleina (CPF-SE3), isolado da secreção da pele da rã *Silurana epítropicalis*, (b) Maximinas H1, H4 e H7, uma classe homóloga à Bombinina H, de vinte resíduos de aminoácidos identificadas na secreção da pele do sapo *Bombina maxima* e (c) Temporinas CG1, MS1, SN2

e SN3, da família das Temporinas, isoladas de secreções das rãs *Amolops chunganensis* (YANG et al., 2012), *Hylarana maosuoensis* e *H. spinulosa*.

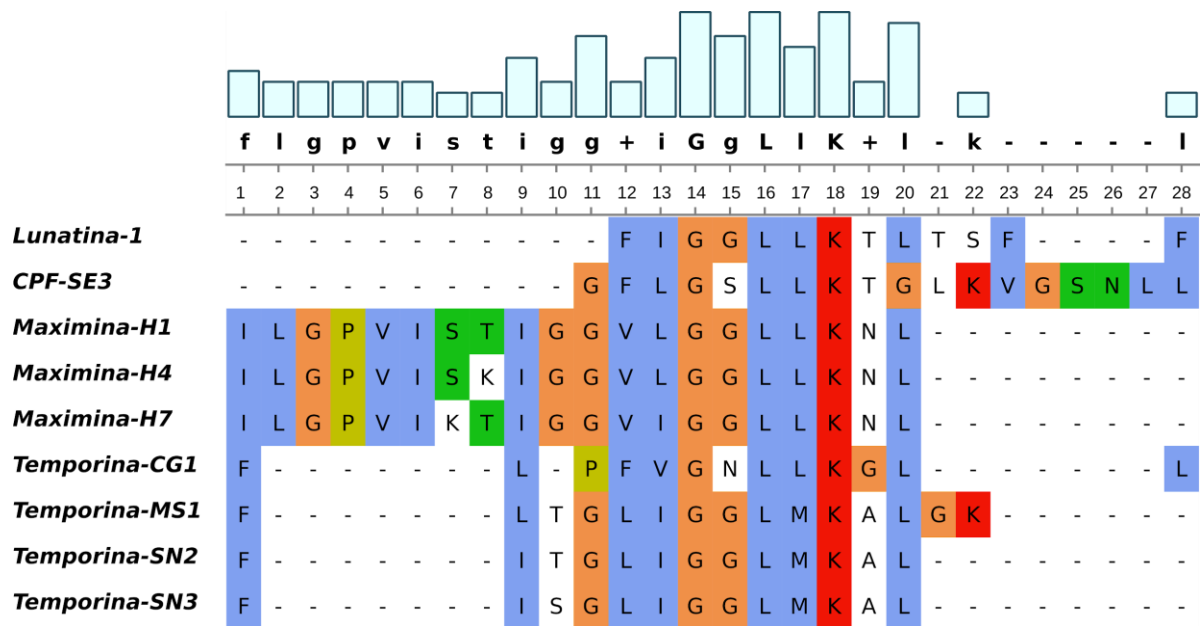


Figura 7. Alinhamento de sequências de aminoácidos da Lunatina-1 com peptídeos bioativos.

As sequências peptídicas foram obtidas da base APD3 e os alinhamentos foram feitos com as ferramentas BLAST para filtrar os alinhamentos significativos (E-value menor a 1) e posteriormente as sequências foram alinhadas com a ferramenta T-Coffee e visualizadas por meio da interface gráfica UGENE. As cores dos resíduos estão relacionadas às propriedades físico-químicas dos mesmos e ao esquema de cores de Clustal X: hidrofóbico em azul, carga positiva vermelho, carga negativa em roxo, polar em verde, glicina em laranja e prolina em amarelo.

Uma possível explicação para a presença destes peptídeos oriundos de anfíbios é o fenômeno de convergência evolutiva, que ocorre quando características semelhantes surgem de maneira independente em diferentes linhagens evolutivas. As toxinas em animais surgem repetidamente ao longo da árvore da vida, interferindo nas vias moleculares e fisiológicas das espécies-alvo, resultando na incapacitação de presas ou na dissuasão de predadores em potencial. Em resposta a esse desafio, muitas espécies expostas às toxinas desenvolvem mecanismos moleculares para contrabalançar os efeitos prejudiciais dessas substâncias (VAN THIEL et al., 2022).

Os oito peptídeos identificados nesta análise são moléculas antimicrobianas. O peptídeo CPF-SE3 apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias *S. aureus* (MIC 2.5 μM), incluindo cepas de isolados clínicos resistentes à meticilina e a antibióticos não betalactâmicos (MIC 5 μM). O CPF-SE3 tem uma baixa atividade hemolítica em eritrócitos humanos (220 μM), com o potencial para o tratamento tópico de infecções de pele causadas por bactérias *S. aureus* resistentes a antibióticos (CONLON et al., 2012).

As Maximinas H7 e H4 diferem da H1 (H-ILGPVISTIGGVLGGLLKNL-NH₂) por duas substituições dos resíduos de Ser/Lys e Thr/Lys nas posições sete e oito, respectivamente. As Maximinas H1 e H4 apresentam amplo espectro de atividades, capazes de inibir o crescimento de bactérias *E. coli*, *S. aureus* e *Bacillus pyocyaneus* e do fungo *C. albicans* (MICs 5 -15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Porém, apresentam atividade hemolítica, quando testados em eritrócitos de coelho, lisando 90-100% das células na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (LAI et al., 2002a; LIU et al., 2011). Este peptídeo está presente nos cérebros de sapos pertencentes ao gênero *Bombina*, onde podem agir como um mecanismo de defesa para microrganismos que atravessam a barreira hematoencefálica, como também, provavelmente, apresentar funções antinociceptivas (LIU et al., 2011).

As Temporinas são uma família de peptídeos presentes na pele de rãs da família *Ranidae*, as quais foram identificadas inicialmente nas espécies *Rana erythraea* e *Rana esculenta* e posteriormente na *Rana temporaria*. E, estes peptídeos são ativos principalmente em bactérias Gram-positivas e algumas como a Temporina-MS1 são hemolíticas (WANG et al., 2017; YANG et al., 2012, 2013). Embora existam exceções, as Temporinas se caracterizam por serem peptídeos de treze resíduos, com o C-terminal amidado, assim como as Lunatinas. Os resíduos que formam o N-terminal das Lunatinas e das Temporinas possuem as mesmas propriedades físico-químicas.

Estudos anteriores de minimização da estrutura primária da Lunatina-1 foram realizados para compreender o papel de cada região do peptídeo, e foi observado que o peptídeo formado pelos últimos oito resíduos após o contato com as células HL-60 foi internalizado e distribuído uniformemente pelo citoplasma e núcleo das células, enquanto que o peptídeo formado pelos seis primeiros resíduos permanecem ancorados à membrana. Este comportamento é distinto do observado para Lunatina-1 que se liga à membrana e também forma agrupamentos ao interior

das células (DE SOUSA GOMES, 2018). Apesar da similaridade que a Lunatina-1 possui com as Temporinas e com as Maximinas nos primeiros nove resíduos da L1, não é suficiente para afirmar que essas regiões dos peptídeos sejam determinantes para o processo de interação com a membrana celular ou facilitam a passagem dos peptídeos ao interior das células, não obstante, ela deve ser necessária para atividade dessas moléculas. Sintetizar e testar as possíveis atividades que teria o peptídeo com a sequência dos primeiros nove resíduos da L1 (H-FIGLLKTL-NH₂) e suas variantes ou análogos ajudaria a entender a relevância que estas sequências têm para as diversas famílias de peptídeos em que estão presentes e, ao mesmo tempo, novos peptídeos bioativos poderiam ser descobertos.

5.2 Geração de análogos de Lunatina-1 por meio de *AlaScan* revelam peptídeos hidrofóbicos

Descrever e compreender as propriedades físico-químicas dos peptídeos, permite-nos compreender os seus possíveis mecanismos de ação. Estas propriedades são determinadas pelos resíduos de aminoácidos que constituem a estrutura primária do peptídeo, e a forma em que esses resíduos estão presentes na estrutura primária é um fator substancial para favorecer ou estabilizar as conformações tridimensionais dos peptídeos, como também, refletir em propriedades como a anfipaticidade dessas moléculas, de forma que o peptídeo seja capaz de ativar ou induzir os mecanismos moleculares observados (HUANG et al., 2012; TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000; UGGERHØJ et al., 2015).

A Lunatina-1 é um peptídeo que tem distintos modos de ação, que dependem de fatores como: concentração utilizada nos ensaios biológicos e composição das membranas das células alvo. É possível que o peptídeo atue direta ou indiretamente em proteínas da membrana celular ou no interior da célula, como mostram os dados de internalização *Time-Lapse-Imaging* (DE SOUSA GOMES, 2018).

Para entender a contribuição e relevância que cada resíduo da estrutura primária do peptídeo Lunatina-1 neste espectro de atividades biológicas, um estudo anterior realizou os primeiros experimentos de *Alanine Scanning (AlaScan)*, ou varredura de alanina, e avaliou a capacidade de inibir o crescimento de células tumorais HL-60. Foi possível observar que, dependendo da posição da substituição, era alterada a atividade do peptídeo na viabilidade celular. Para facilitar as nossas análises, a Tabela 2 evidencia as sequências peptídicas, o

número e porcentagem de resíduos apolares e polares e quais resíduos polares estão presentes nos análogos da L1, assim como as propriedades físico-químicas de hidropaticidade, momento hidrofóbico e carga líquida dos peptídeos. Junto com esses dados, as representações em rodas de hélice dos peptídeos são mostrados na Figura 8.

Como observado na Tabela 2, o peptídeo L1 e seus análogos apresentam valores positivos de GRAVY, ou seja, todos são peptídeos hidrofóbicos. De um modo geral, a troca de resíduos hidrofóbicos Ile, Leu e Phe, pelo resíduo de Ala, reduziu a hidrofobicidade em valores reais na faixa de 0,1 - 0,2 para esses peptídeos análogos quando comparados à L1. Como a hidropaticidade não depende da ordem em que os resíduos estão presentes na molécula, os valores de GRAVY foram os mesmos para os análogos que apresentaram a mesma troca de resíduos; os três peptídeos L1-F1A, L1-F12A e L1-F13A com a troca Phe/Ala, apresentam uma hidropaticidade de 1,26. Os peptídeos L1-L5A, L1-L6A e L1-L9A, com as trocas Leu/Ala (GRAVY 1,18). O peptídeo menos hidrofóbico foi a L1-I2A (GRAVY 1,13), devido à substituição do resíduo Ile, o mais hidrofóbico presente na estrutura primária da L1. Como esperado, o efeito oposto foi observado ao trocar resíduos polares ou Gly pelo resíduo Ala. As trocas Gly/Ala, Thr/Ala e Ser/Ala, aumentaram a hidrofobicidade ($\pm 0,2$) para esses peptídeos análogos (GRAVY 1,5) quando comparados com a L1. O peptídeo mais hidrofóbico foi a L1-K7A (GRAVY 1,78), devido à perda do resíduo Lys, o mais hidrofílico na sequência original de Lunatina-1.

A hidrofobicidade é descrita como um parâmetro físico-químico importante para a atividade dos AMP que interagem com membranas, sendo um fator que determina a capacidade do peptídeo de se deslocar de uma fase aquosa a uma fase hidrofóbica e, no caso dos peptídeos de defesa do hospede que atuam por meio da lise celular, a hidrofobicidade do peptídeo deve garantir a solubilidade em água e ao mesmo tempo favorecer a interação com as regiões hidrofóbicas das membranas bacterianas (DATHE; WIEPRECHT, 1999; YEAMAN; YOUNT, 2003). Embora o peptídeo L1 estimule diferentes mecanismos de morte celular, a primeira interação promovida pela L1 ocorre com as membranas de células HL-60, MDA-MB-231 e MCF-7. Assim, a hidrofobicidade pode ser um dos elementos importantes para as atividades biológicas observadas para o peptídeo L1.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas da Lunatina-1 e os treze análogos

Peptídeo	Sequência	Momento Hidrofóbico	Hidropaticidade (GRAVY)	Resíduos Polares (n/%)	Resíduos Polares + Glicina		Resíduos Apolares (n/%)	Carga líquida
					Neutros	Carregados		
L1	FIGGLLKTLTSFF-NH ₂	0,7	1,34	6 / 46,15	Ser:1, Thr:2, Gly:2	Lys 1	7 / 53,85	+2
L1-F1A	A IGGLLKTLTSFF-NH ₂	0,67	1,26	6 / 46,15	Ser:1, Thr:2, Gly:2	Lys 1	7 / 53,85	+2
L1-I2A	F A GGLLKTLTSFF-NH ₂	0,6	1,13	6 / 46,15	Ser:1, Thr:2, Gly:2	Lys 1	7 / 53,85	+2
L1-G3A	FI A GGLLKTLTSFF-NH ₂	0,69	1,51	5 / 38,46	Ser:1, Thr:2, Gly:1	Lys:1	8 / 61,54	+2
L1-G4A	FIG A LLKTLTSFF-NH ₂	0,69	1,51	5 / 38,46	Ser:1, Thr:2, Gly:1	Lys:1	8 / 61,54	+2
L1-L5A	FIGG A LKTLTSFF-NH ₂	0,61	1,18	6 / 46,15	Ser:1, Thr:2, Gly:2	Lys 1	7 / 53,85	+2
L1-L6A	FIGGL A KTLTSFF-NH ₂	0,67	1,18	6 / 46,15	Ser:1, Thr:2, Gly:2	Lys 1	7 / 53,85	+2
L1-K7A	FIGGLL A TTLTSFF-NH ₂	0,6	1,78	5 / 38,46	Ser:1, Thr:2, Gly:2	-	8 / 61,54	+1
L1-T8A	FIGGLLK A LTSFF-NH ₂	0,7	1,53	5 / 38,46	Ser:1, Thr:1, Gly:2	Lys 1	8 / 61,54	+2
L1-L9A	FIGGLLK T A ^A TSFF-NH ₂	0,6	1,18	6 / 46,15	Ser:1, Thr:2, Gly:2	Lys 1	7 / 53,85	+2
L1-T10A	FIGGLLK T L A SFF-NH ₂	0,7	1,53	5 / 38,46	Ser:1, Thr:1, Gly:2	Lys 1	8 / 61,54	+2
L1-S11A	FIGGLLK T L T A ^A FF-NH ₂	0,68	1,54	5 / 38,46	Thr:2, Gly:2	Lys 1	8 / 61,54	+2
L1-F12A	FIGGLLKTLTS A F-NH ₂	0,64	1,26	6 / 46,15	Ser:1, Thr:2, Gly:2	Lys 1	7 / 53,85	+2
L1-F13A	FIGGLLKTLTS F A-NH ₂	0,63	1,26	6 / 46,15	Ser:1, Thr:2, Gly:2	Lys 1	7 / 53,85	+2

O resíduo de Ala foi destacado em cor vermelha nos peptídeos análogos

Outro valor calculado foi o momento hidrofóbico $\langle \mu H \rangle$, que, ao contrário da hidropaticidade, é uma medida que leva em consideração a localização dos resíduos na estrutura 3D da molécula. Assim, moléculas com resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos podem ou não apresentar anfipaticidade, dependendo da localização destes na estrutura 3D. Quanto maior o valor de μH maior será a anfipaticidade que a molécula apresenta, e no caso de hélices, indicam que a hélice é anfipática perpendicular ao seu eixo (EISENBERG; WEISS; TERWILLIGER, 1982).

Assumindo que a L1 adota uma conformação em α -hélice e os resíduos estão distribuídos como demonstrado na Figura 8, espera-se que a L1 seja um peptídeo anfipático com μH 0,7, e apresente uma face hidrofóbica constituída pelos resíduos Phe-1, Ile-2, Leu-5, Leu-6, Leu-9, Phe-12 e Phe-13, enquanto a face oposta está formada pelos resíduos glicinas: Gly-3 e Gly-4 e os resíduos polares: Lys-7, Thr-8, Thr-10 e Ser-11. Tomando como base esta distribuição dos resíduos, para os peptídeos análogos teríamos: alterações na face hidrofílica da L1, nos análogos L1-G3A, L1-G4A, L1-K7A, L1-T8A, L1-T10A e L1-S11A, espera-se uma redução do μH . Entretanto, à exceção da L1-K7A (μH : 0,6), esses outros análogos apresentaram uma diminuição no $\mu H \leq 0,02$ quando comparados à L1. Dessa forma, a L1-K7A é o peptídeo mais hidrofóbico (GRAVY 1,78) e junto com as Lunatinas: L1-I2A, L1-L5A e L1-L9A, os de menor momento hidrofóbico (μH 0,6). Reduções no μH foram mais evidentes quando alterados os resíduos da face hidrofóbica, principalmente a Ile-2, Leu-5 e Leu-9, resíduos estes próximos ao vetor resultante da somatória dos vetores de hidrofobicidade dos resíduos nos peptídeos, como observado nas setas das rodas de hélice (Figura 8).

A relação entre atividade, anfipaticidade e momento hidrofóbico, para alguns peptídeos que adotam uma conformação helicoidal, nem sempre é uma correlação, uma vez que os resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos podem estar distribuídos desigualmente nas duas face da hélice, gerando regiões de maior ou menor momento hidrofóbico, alterando a anfipaticidade do peptídeo (DATHE; WIEPRECHT, 1999; YEAMAN; YOUNT, 2003). Para alguns análogos à L1, é possível que se dê este efeito, uma vez que a maioria dos resíduos são hidrofóbicos.

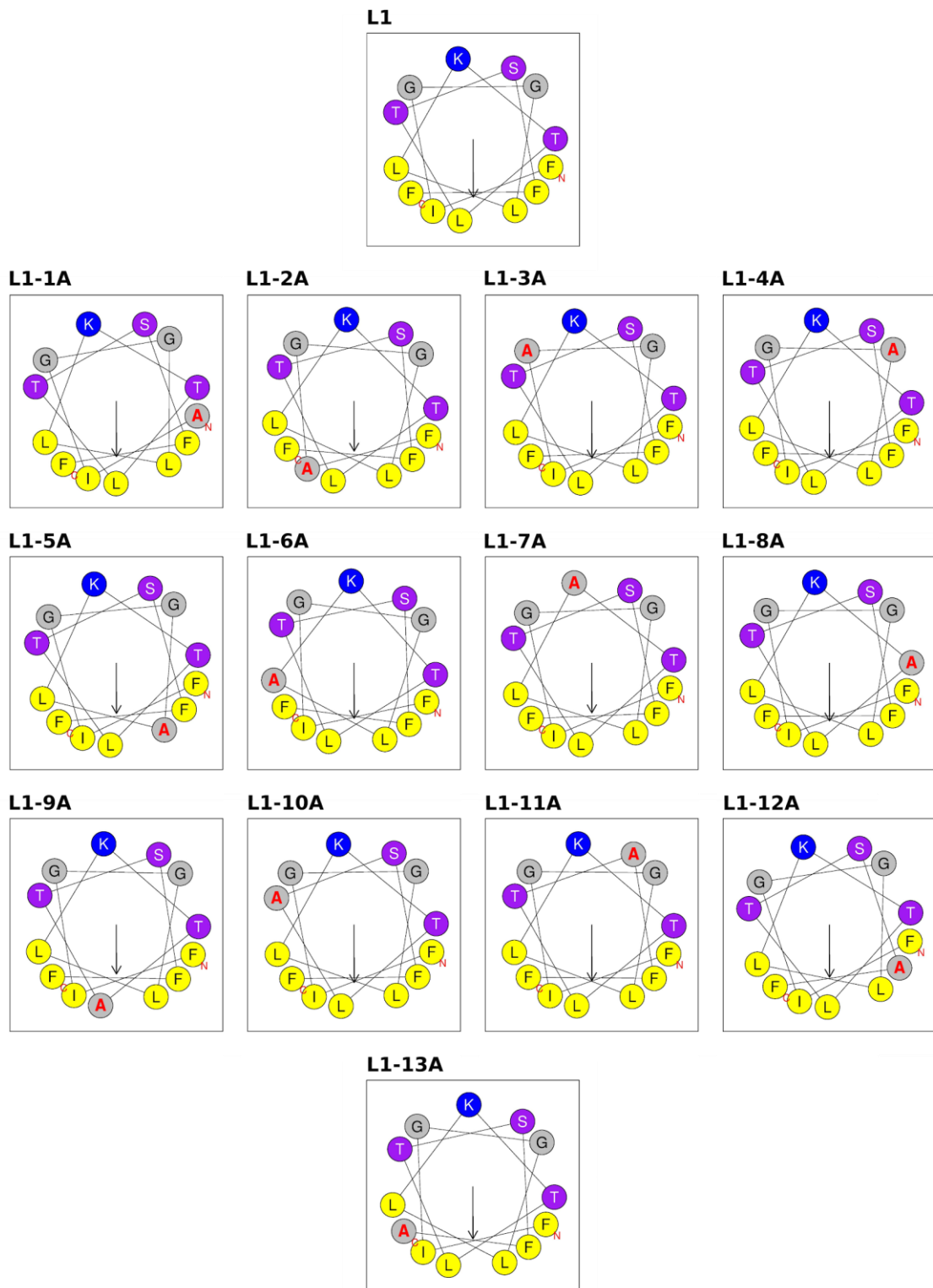


Figura 8. Representação da Luna-tina-1 e os treze análogos em rodas de hélices.

Os análogos são mostrados na ordem da substituição de Ala na sequência peptídica. As cores dos resíduos: amarelo para hidrofóbicos, roxo para polares não carregados, azul para Lys, cinza para resíduos pequenos (Ala e Gly). as extremidades N-terminal e C-terminal estão indicados com subíndices em cor vermelha. Para os peptídeos análogos, o resíduo de alanina foi destacado com a letra em cor vermelha.

A maioria de peptídeos antimicrobianos que lisam as membranas celulares (membranolíticos), forma estruturas anfipáticas ao interagir com as membranas das células alvo, e sabe-se que a anfipaticidade em estruturas helicoidais é uma das características comuns a muitos AMP. Entretanto, embora a estrutura desses peptídeos possa ser predominantemente α -hélice, ao se ligarem às membranas a estrutura helicoidal não necessariamente engloba todo o peptídeo (DATHE; WIEPRECHT, 1999; YEAMAN; YOUNT, 2003).

No desenho racional de peptídeos, manipular as propriedades físico-químicas dos peptídeos, dentre elas hidrofobicidade, anfipaticidade, cationicidade, helicidade, entre outras, podem nos auxiliar a delimitar a seletividade do peptídeo entre membranas carregadas e zwitteriônicas, evitando atividades hemolíticas ou citotóxicas para o peptídeo (GIANGASPERO; SANDRI; TOSSI, 2001; TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000). No caso da Lunatina-1 é interessante notar que em todos os análogos não houve perda da hidropaticidade, mas houve mudanças no momento hidrofóbico, permitindo-nos hipotetizar que o peptídeo provavelmente irá manter uma interação com as membranas, e que a conformação do peptídeo quando em contato com as membranas pode ser um fator determinante para guiar os distintos efeitos celulares observados.

5.3 Alanina *scan* aponta resíduos provavelmente envolvidos nas atividades antitumorais e citotóxicas da Lunatina-1

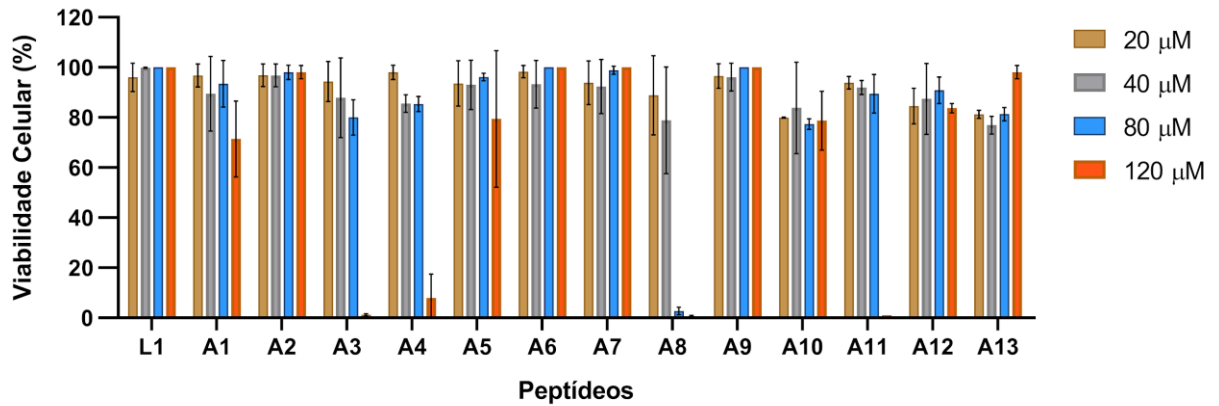
As atividades do peptídeo L1 já foram avaliadas previamente em linhagens tumorais de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7), leucemia (HL-60), como também em eritrócitos de cordeiro, células renais (HEK-293) e hepatócitos (HepG2) de humanos. Entretanto, os análogos à L1 foram apenas estudados quanto à citotoxicidade em células HL-60 (DE SOUSA GOMES, 2018).

Neste estudo, avaliamos as atividades citotóxicas dos análogos à L1, usando como modelo células de fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF). Para isso, o peptídeo L1 e os treze análogos foram testados nas concentrações de 20, 40, 80 e 120 μM por 96 horas e a viabilidade celular foi avaliada pelo método MTS, como explicado em material e métodos 4.2. O efeito citotóxicos de L1 e seus análogos é mostrado na Figura 9.

O peptídeo L1 não teve atividade citotóxica ou indutora da proliferação celular na linhagem NHDF, uma vez que as células tratadas com L1 apresentaram viabilidade celular igual ao controle positivo (Figura 9A). Em células tumorais concentrações acima de 20 μM já são suficientes para causar a morte celular, e como sabemos que este peptídeo não apresenta atividade hemolítica, confirmamos novamente que os mecanismos pelos quais L1 age são dependentes do tipo celular, seja da composição da membrana ou proteínas presentes (DE SOUSA GOMES, 2018).

Os peptídeos L1 e o análogo L1-K7A não afetaram a viabilidade celular das células NHDF. Portanto, a eliminação do único resíduo que contribui para a carga líquida positiva na L1, juntamente com o aumento da hidrofobicidade (0,44 unidades acima da L1 no índice GRAVY), não teve impacto na atividade biológica do peptídeo nessa linhagem celular. É importante notar que a L1 possui apenas um resíduo de Lys, sugerindo que as interações eletrostáticas entre a L1 e moléculas carregadas negativamente nas membranas de bactérias ou células tumorais não são fatores determinantes para a atividade deste peptídeo. Isso contrasta com os AMP catiônicos que possuem múltiplas cargas positivas, estrutura em α -hélice e atuam por meio de mecanismos líticos (GASPAR; SALOMÉ VEIGA; CASTANHO, 2013; HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008).

A.



B.

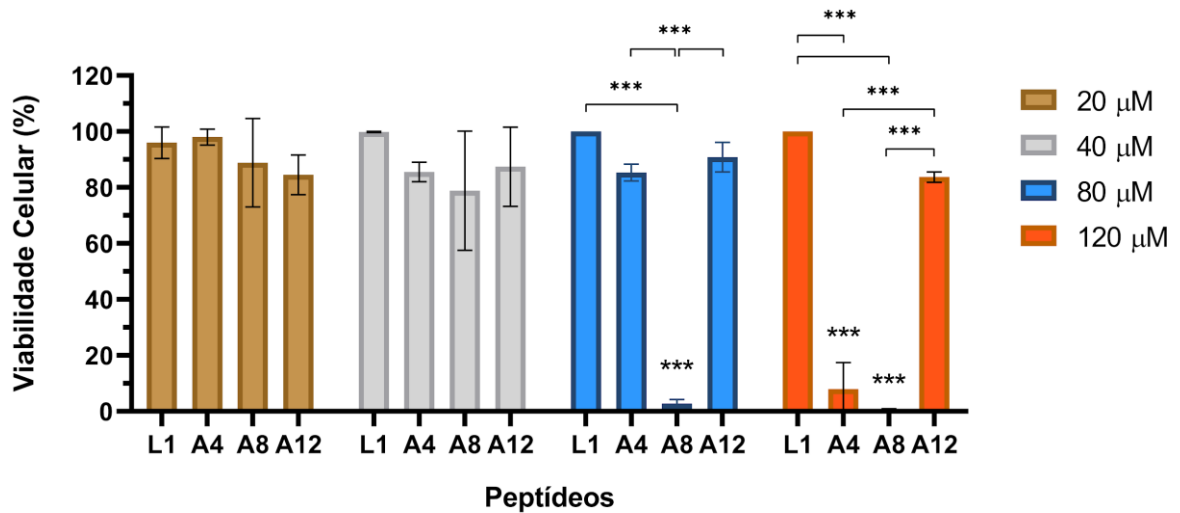


Figura 9. Ensaio de citotoxicidade da Lunatina-1 e análogos oriundos do alanina scanning.

Células de fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF) foram tratadas com os peptídeos nas concentrações de (20, 40, 80 e 120 μ M) por 96 h. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada pelo método MTS. **A)** Os resultados de viabilidade celular para a L1 e os treze análogos comparados às células controle não tratadas. **B)** Comparação das atividades citotóxicas entre os peptídeos L1, L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A. A diferença significativa comparada ao controle positivo é mostrada acima das barras. As linhas horizontais indicam diferenças significativas entre os peptídeos assinalados. (Análises ANOVA seguido do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$).

Em um estudo anterior conduzido por Santana em 2012, onde o mesmo resíduo de lisina (Lys) foi substituído por um resíduo neutro de glutamina (Gln) observou-se uma perda das atividades antimicrobianas (SANTANA, 2012). Do mesmo modo, no estudo conduzido por De Sousa-Gomes em 2018, mostrou-se a perda da atividade antitumoral na linhagem HL-60 (Figura 6) do análogo L1-K7A (DE SOUSA GOMES, 2018), expondo a importância da Lys-7 e da manutenção da carga líquida positiva para as atividades antimicrobianas e antitumorais nas células HL-60, seja pela interação com a membrana celular, internalização nas células ou interação com as moléculas alvo, enquanto que em células NHDF não houve influência ou alteração na atividade do peptídeo L1.

Uma forma de potenciar e aumentar o espectro de atividades dos AMP é aumentando a cationicidade. Os peptídeos AamAP1²⁵ e AamAP2²⁶, isolados do escorpião *Androctonus amoreuxi*, apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias *S. aureus* e *E. coli* e a levedura *C. albicans*, com concentrações de MICs entre os 20 a 150 µM. O peptídeo AamAP-S1, um análogo de Aamp1 oriundo da substituição His-8/Lys, mostrou uma redução no MIC (3-5 µM) contra os três organismos. Diferente dos peptídeos AamAP1 e AamAP2, o peptídeo AamAP-S1 apresentou atividades citotóxicas (IC₅₀ 25-40 µM) nas linhagens LNCaP e PC3 (adenocarcinoma de próstata dependente e independente de andrógeno, respectivamente) e U251 (glioblastoma). Entretanto, nessas concentrações o peptídeo foi ativo em células endoteliais microvasculares humanas (HMEC) e atividade hemolítica foi registrada (ALMAAYTAH et al., 2012). Resultados similares foram observados com os peptídeos TsAP-1²⁷ e TsAP-2²⁸, isolados do escorpião *Tityus serrulatus*, e seus análogos TsAP-S1 e TsAP-S2, desenhados para aumentar a cationicidade (carga líquida) e anfipaticidade dos peptídeos molde, substituindo quatro resíduos neutros presentes na mesma face das rodas de hélice dos peptídeos, por resíduos de lisina. O peptídeo catiônico TsAP-S1 apresentou um aumento de 30 vezes nas atividades antimicrobianas (MICs 5 µM) e um ganho de atividade antitumoral. O peptídeo TsAP-S2, diferente do TsAP-2, foi ativo em *E. coli* e teve as atividades antitumorais potenciadas (IC₅₀ 0,8 - 2,0 µM). Para ambos análogos, as atividades hemolíticas foram incrementadas significativamente a respeito dos peptídeos molde (GUO et al., 2013). Atividades antimicrobianas potenciadas, e o ganho de atividade antitumoral, também foram

²⁵ Sequência de AamAP1: H-FLFSLIPHAIGGLISAFK-NH₂, depositada no UNIPROT ([G8YYA5](#))

²⁶ Sequência de AamAP2: H-FPFSLIPHAIGGLISAIAK-NH₂, depositada no UNIPROT ([G8YYA6](#))

²⁷ Sequência de TsAP-1: H-FLSLIPSLVGGGISAFK-NH₂, depositada no UNIPROT ([S6CWV8](#))

²⁸ Sequência de TsAP-2: H-FLGMIPGLIGGLISAFK-NH₂, depositada no UNIPROT ([S6D3A7](#))

observadas para análogos (melhorados em cationicidade e anfipaticidade): dos peptídeos AcrAP1²⁹ e AcrAP2³⁰, isolados do escorpião *Androctonus crassicauda* (DU et al., 2014); e dos peptídeos AaeAP1 e AaeAP2, isolados do escorpião *Androctonus aeneas* (DU et al., 2015).

A cationicidade é uma propriedade físico-química chave para as diversas atividades de muitos AMP. Entretanto, o desenho de peptídeos, que apresentam um incremento na cationicidade e na anfipaticidade, junto com o aumento da helicidade, pode gerar moléculas hemolíticas (HUANG et al., 2014, 2012), como mostram os exemplos anteriores. Embora na nossa pesquisa não foram desenhados análogos do peptídeo L1 que apresentassem um aumento na cationicidade do peptídeo, o efeito oposto foi avaliado com o análogo L1-K7A, mostrando a importância da carga positiva para as atividades antitumorais da L1.

Os resultados de viabilidade celular mostraram que a L1 e os peptídeos análogos, nas concentrações de 20 e 40 μM , não alteraram de maneira significativa a viabilidade celular das células NHDF. O efeito citotóxico só foi observado a partir de 80 μM para alguns dos peptídeos análogos. Os análogos L1-F1A, L1-L5A e L1-T10A, na concentração de 120 μM , reduziram em um 10 a 20% a viabilidade celular das células NHDF. Esses peptídeos junto com os análogos L1-I2A, L1-L6A, L1-K7A, L1-L9A, L1-S11A, L1-F12A e L1-F13A foram os peptídeos que apresentaram uma citotoxicidade quase nula. Assim, semelhante à L1-K7A, para a maioria dos análogos testados, alterar as propriedades físico-químicas do peptídeo seja pelo incremento da hidrofobicidade (0,2 a 0,4 acima da L1 no GRAVY) ou a redução da anfipaticidade, nos análogos L1-K7A, L1-T10A e L1-S11A, ou mediante a redução da hidrofobicidade (0,2 abaixo da L1 no GRAVY) e do momento hidrofóbico, para os peptídeos que apresentaram as trocas Ile/Ala, Leu/Ala e Phe/Ala, não foi suficiente para que esses análogos apresentassem uma atividade citotóxica ou indutora da proliferação, mantendo o perfil inicial do peptídeo L1. Quando comparadas às atividades desses dez análogos nas células HL-60, em todos os casos, os peptídeos apresentaram uma redução da atividade citotóxica de 25 a 75% em comparação à L1 (Figura 6) (DE SOUSA GOMES, 2018).

O aumento da hidrofobicidade está associado a um aumento da atividade hemolítica e citotóxica. O aumento da hidrofobicidade favorece a interação entre as moléculas dos peptídeos

²⁹ AcrAP1 depositada no UNIPROT ([A0A0A116E7](#))

³⁰ AcrAP2 depositada no UNIPROT ([A0A0A116N9](#))

e as membranas zwitteriônicas que apresentam colesterol e são menos carregadas comparadas às membranas de células tumorais e de bactérias que não têm colesterol (ALMAAYTAH et al., 2012; GIANGASPERO; SANDRI; TOSSI, 2001; TEIXEIRA; FEIO; BASTOS, 2012). As alterações na hidrofobicidade da maioria dos peptídeos análogos não foram suficientes para mudar o perfil da L1, é provável que peptídeos análogos à L1 mais hidrofóbicos, produto de várias substituições, apresentem atividade citotóxica em linhagens não tumorais como as células NHDF.

Os análogos mais citotóxicos na linhagem NHDF foram L1-G3A, L1-G4A e L1-T8A. O peptídeo L1-T8A foi o único capaz de reduzir a viabilidade celular em quase 100% na concentração de 80 μ M, enquanto os análogos L1-G3A e L1-G4A, mostraram uma citotoxicidade de 20% nesta concentração (Figura 9). Entretanto, esses três análogos conseguiram reduzir a viabilidade celular em mais de um 90% na concentração de 120 μ M. O resultado do análogo L1-G4A, chamou atenção devido ao fato dele ser o único peptídeo que apresentou um ganho (20%) na atividade antitumoral nas células HL-60, enquanto os peptídeos L1-G3A e L1-T8A mostraram uma redução de 50% da atividade (Figura 6). Embora esses resultados mostram que alguns dos análogos da L1 são moléculas citotóxicas para a linhagem não tumoral NHDF, é importante considerar as concentrações em que essas moléculas apresentam atividade, visto que, de serem muito mais ativas em células tumorais, apresentariam um bom índice terapêutico.

Podemos concluir que, as atividades dos peptídeos análogos à L1 seja nas células NHDF ou HL-60 não estão determinadas só pelas propriedades físico-químicas dos resíduos que são trocados pela Ala, mas que outros fatores como as conformações 3D poderiam estar envolvidos nas atividades desses peptídeos. Assim, nossa próxima etapa foi a escolha de alguns desses peptídeos análogos à L1 para avaliar a nossa hipótese da relação estrutura (primária e terciária) atividade dos peptídeos Lunatinas. Considerando os resultados obtidos nas células NHDF e HL-60, os análogos escolhidos foram o peptídeo L1-G4A, por ser o único em apresentar uma ganho na atividade antitumoral em HL-60 e ao mesmo tempo atividade citotóxica em NHDF (Figuras 6 e Figura 9B). O peptídeo L1-T8A por ser o mais ativo na linhagem NHDF, e por último o peptídeo L1-F12A, por apresentar baixa atividade nas células NHDF e uma redução do 75% da atividade antitumoral nas células HL-60, quando comparado a L1 (Figuras 6 e Figura 9B). A comparação das atividades entre esses três peptídeos e L1, na viabilidade celular de células NHDF é mostrada na Figura 9B.

5.4 Preferências conformacionais distintas dos análogos de Luntina-1 obtidas por RMN são um fator chave para a atividade dessas moléculas

As análises das propriedades físico-químicas da Lunatina-1 e seus análogos deixaram em evidência o caráter hidrofóbico desses peptídeos. Além disso, os diagramas de roda de hélice sugerem que esses peptídeos poderiam adotar uma conformação em α -hélice anfipática (Figura 8). Com o objetivo de avaliar as estruturas tridimensionais destes peptídeos quando na presença de meios miméticos de membranas, utilizamos a técnica de RMN e os métodos de assinalamento estabelecidos por Wüthrich para obter as estruturas dos peptídeos em solução (WÜTHRICH, 1986).

Selecionamos os análogos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A, e coletamos as medidas de RMN por meio dos experimentos ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^1H NOESY e ^1H - ^{13}C HSQC em solução contendo 100 mM SDS- d_{25} (mimético de membrana). Ao mesmo tempo, os peptídeos L1-G4A e L1-F12A, foram estudados por meio dos experimentos ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^1H NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{15}N HSQC, em solução de TFE- d_2 : H_2O (40:60, v/v), de forma que pudessem ser comparadas as suas estruturas, tanto em solução micelar de SDS- d_{25} , que simula a carga negativa na membrana de células tumorais e de bactérias (HOSKIN; RAMAMOORTHY, 2008; YEAMAN; YOUNT, 2003), e em meio isotrópico constituído por trifluoroetanol em água, meio que mimetiza o ambiente hidrofóbico da membrana.

Inicialmente, os assinalamentos dos sinais no mapa de contornos do espectro TOCSY foram feitos pela determinação dos padrões de distribuição dos deslocamentos químicos (δ) dos hidrogênios de cada resíduo de aminoácido. Nesta etapa, foram utilizados como referência os valores descritos no repositório *Biological Magnetic Resonance Data Bank* (BMRDB) (ULRICH et al., 2008), começando os assinalamentos pelos resíduos únicos na sequência peptídica como a Lys-7 e Ser-11 para os quatro peptídeos, e os resíduos de alanina: Ala-4, Ala-8 e Ala-12, para os peptídeos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A, respectivamente. Para facilitar a identificação dos resíduos, o assinalamento dos espectros TOCSY foi feito de forma simultânea com os espectros NOESY e HSQC.

A seguir, serão apresentadas as análises dos espectros, bem como as estruturas tridimensionais dos peptídeos L1 e seus análogos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A. Primeiramente, serão mostrados os peptídeos analisados em meio micelar de SDS- d_{25} e posteriormente as

análises dos peptídeos em misturas de TFE- d_2 :H₂O (40:60, v/v).

Os meios micelares de SDS apresentam uma alta similaridade com os ambientes apolares de membranas e suas propriedades de interface. Ao mesmo tempo, estas micelas podem ser utilizadas para o cálculo das estruturas tridimensionais de peptídeos utilizando a RMN de alta resolução (BHATTACHARJYA; RAMAMOORTHY, 2009). Assim, experimentos unidimensionais de ¹H foram conduzidos para os peptídeos L1 e seus análogos, em meio micelar de SDS- d_{25} . A região de deslocamento químico de núcleos de ¹H amídicos e aromáticos em soluções 100 mM de SDS- d_{25} para os peptídeos é mostrada na Figura 10.

De forma geral, os sinais de ressonância dos peptídeos L1 e L1-T8A em micelas de SDS- d_{25} mostram-se mais alargados e mesmo dispersos quando comparados aos dos peptídeos L1-G4A e L1-F12A. No entanto, como observado nos espectros unidimensionais dos quatro peptídeos, os deslocamentos químicos de hidrogênios amídicos e aromáticos apresentam uma boa dispersão e larguras de linhas adequadas, o que sugere possível estrutura helicoidal. Como será mostrado posteriormente, os espectros 2D dos quatro peptídeos apresentaram resolução suficiente para os estudos estruturais do peptídeo.

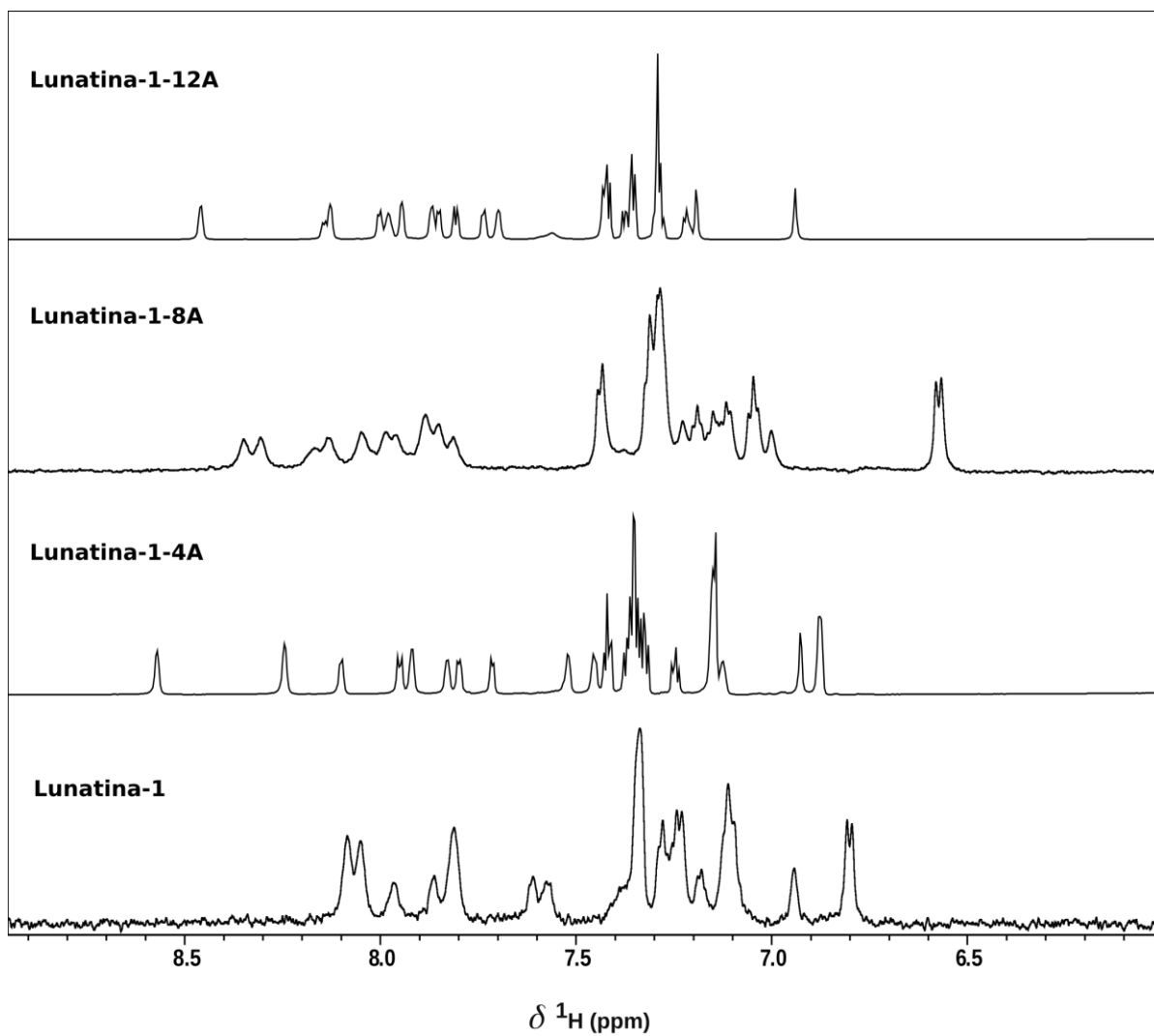


Figura 10. Espectros unidimensionais de ^1H dos peptídeos L1 e os análogos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A 1 mM em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

Região de deslocamento químico de núcleos de ^1H amídicos e aromáticos.

Por meio da análise do mapa de contornos do espectro TOCSY, foi possível identificar os resíduos de aminoácidos presentes na cadeia polipeptídica. Identificamos os hidrogênios que fazem parte do mesmo sistema de *spins*, que correspondem a um determinado resíduo de aminoácido, dado que diferentes resíduos apresentam sistemas de *spins* característicos e distintos (WÜTHRICH, 1986). Tomando como exemplo o resíduo de Thr-8 na L1, na Figura 11 são apresentadas as correlações intra-residuais do hidrogênio amídico (H_N) com os hidrogênios alfa (α), beta (β) e gama (γ), respectivamente ($H_N H_X$), para este resíduo, as conectividades produto do acoplamento escalar também são mostradas. Os resíduos com cadeias laterais mais longas como arginina e lisina são os que apresentam sistemas de *spin* maiores com um número maior de correlações. Entretanto, nem sempre são observadas todas as correlações intra-residuais para todos os resíduos de aminoácidos, dado que não acontece a transferência completa da magnetização pelo sistema de *spins* do resíduo, como observado na Figura 11. Para atribuir cada uma das ressonâncias de determinados resíduos de aminoácidos de acordo com a sua posição na sequência peptídica, foram feitos assinalamentos sequenciais. A estratégia utilizada no assinalamento sequencial é demonstrada na Figura 12.

Por meio da análise do TOCSY, foram obtidas as conectividades intra-residuais dos sistemas de *spins*. Ao mesmo tempo, foi possível estabelecer as conectividades inter-residuais que apresenta o resíduo identificado no TOCSY com os outros resíduos, utilizando o mapa de contornos NOESY. No espectro TOCSY da Figura 12A, foram observados os sistemas de *spins* com deslocamentos químicos (δ) de H_N de 7,82, 7,9 e 8,07 ppm respectivamente. Para os resíduos que apresentaram δ de H_N de 7,82 e 8,07 ppm foram observadas três correlações intra-residuais para cada um (4,27, 4,0 e 1,2) e (4,32, 4,07 e 1,3), respectivamente, correspondentes aos hidrogênios alfa, beta e gamas, de resíduos de treoninas.

Ao contrário de seus peptídeos análogos, a L1 destaca-se pela ausência de resíduos de alanina, em contrapartida, apresenta resíduos de glicina e serina. Uma característica importante reside na presença dos hidrogênios gama nas treoninas, com um deslocamento químico médio de 1,15 ppm, o que permite discriminá-los dos sistemas de *spins* de glicina e serina, cujos hidrogênios alfa e beta compartilham uma faixa de deslocamento químico médio de 3,9 ppm.

Além disso, a L1 se diferencia dos peptídeos análogos que contêm alanina devido à presença de três correlações intra-residuais específicas para os resíduos de treonina. Isso contrasta com os sistemas de *spins* da alanina, que apresentam apenas duas correlações intra-

residuais. Essa diferença é crucial ao avaliar os peptídeos análogos à L1, pois fornece informações valiosas sobre sua composição e estrutura. Identificou-se também um terceiro sistema de *spins* com um deslocamento químico de δ HN de 7,9 ppm (Figura 12A), que exibiu três correlações intra-residuais distintas no espectro TOCSY, correspondendo aos hidrogênios alfa e beta de uma leucina.

Todas estas correlações intra-residuais para os três resíduos foram observadas no espectro NOESY. Entretanto, no mapa de contornos NOESY, podemos observar correlações adicionais, as quais podem ser do tipo sequencial. No NOESY da Figura 12A, o resíduo de leucina apresentou três correlações sequenciais, produto da correlação do H_N da leucina e os três hidrogênios da treonina com δ de H_N de 7,82, caracterizando-se correlações sequenciais do tipo $d_{\alpha N}$, $d_{\beta N}$ e $d_{\gamma N}$, o que indica que essa treonina é o resíduo anterior à leucina, ou seja o oitavo resíduo e a leucina identificada é o resíduo número nove. Como a L1 só têm duas treoninas, espera-se que a treonina com δ de H_N de 8,07 seja o décimo resíduo. Isto pode ser confirmado no espectro NOESY. Além das três correlações intra-residuais da treonina, foram observadas as correlações do H_N com os hidrogênios alfa e beta do resíduo anterior Leu-9, caracterizando-se correlações sequências do tipo $d_{\alpha N}$ e $d_{\beta N}$, no espectro NOESY. A sobreposição dos espectros TOCSY e NOESY deixa em evidência as correlações intra e inter-residuais anteriormente citadas (Figura 12A).

Além das correlações inter-residuais do tipo $d_{\alpha N}(i,i+1)$, outro tipo de correlações de média distância podem ser observadas no espectro NOESY, como $d_{\alpha N}(i,i+2)$ e $d_{NM}(i,i+2)$, $d_{\alpha N}(i,i+3)$ e $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$, entre outras. As correlações do tipo $d_{\alpha N}(i,i+n)$ $n=3$ e 4 e $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ são correlações características de estruturas em α -hélice (WÜTHRICH, 1986).

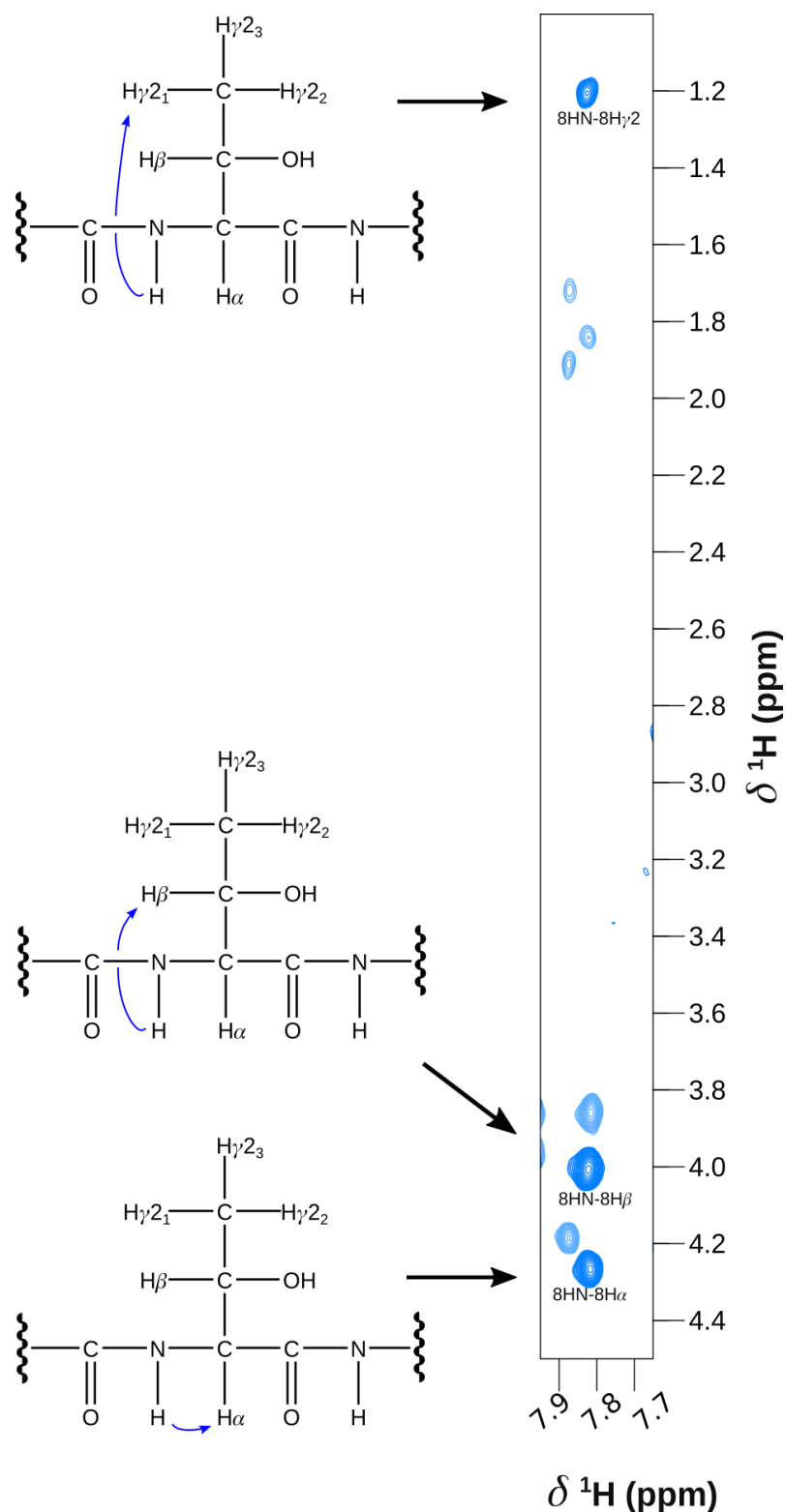


Figura 11. Ampliação do mapa de contornos TOCSY de L1 em solução 100 mM de SDS-*d*₂₅.

A direita uma ampliação do mapa de contornos do espectro TOCSY na região de deslocamento químico do H amídico com os resíduos do sistema de *spins* da treonina-8. A esquerda, as representações das conectividades das correlações mostradas no espectro para o resíduo de Thr-8, por meio das setas azuis.

Figura 12. Assinalamento sequencial na região amídica parcial de L1 em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

A. Os mapas de contorno dos espectros TOCSY, NOESY e a sobreposição dos mesmos, para a mesma faixa de deslocamento químico do tipo H_NH_α e H_NH_x , sendo x igual a β , γ , δ , ϵ , ζ ou η , é mostrada. No espectro TOCSY e NOESY, foram indicadas as correlações intra-residuais e inter-residuais, respectivamente, para e/ou entre os resíduos de Thr-8, Leu-9 e Thr-10 da L1. As linhas vermelhas indicam a posição no espectro NOESY das correlações observadas no TOCSY. Nos espectros sobrepostos, foram indicadas os dois tipos de correlações: intra-residuais e inter-residuais. **B.** Os resíduos Thr-8, Leu-9 e Thr-10 são representados através de projeções de Fischer. As correlações intra-residuais só foram mostradas para o resíduo Thr-8 (setas em cor azul), enquanto as correlações inter-residuais e sequenciais foram mostradas para os resíduos Thr-8, Leu-9 e Thr-10 (setas cor laranja).

Por meio da análise simultânea dos espectros TOCSY e NOESY, foram realizados os assinalamentos sequenciais para os outros resíduos da L1, de maneira análoga ao exemplo da Figura 11. Além disso, outras regiões dos espectros são utilizadas para complementar e confirmar as informações das correlações inter-residuais $d_{\alpha N}(i,i+1)$ e $d_{\beta N}(i,i+1)$ observadas na Figura 12, entre elas as correlações do tipo $d_{NN}(i,i+1)$, como será mostrado posteriormente.

A identificação dos sinais de correlação intra-residuais atribuídos à sequência do peptídeo L1, produto do assinalamento sequencial dos espectros TOCSY e NOESY, é apresentada na Figura 13, no mapa de contornos TOCSY parcial da L1. À exceção do resíduo Phe-1, foram identificadas as correlações intra-residuais de hidrogênios amídicos e hidrogênios alfa (H_NH_α), para os outros doze resíduos. Os resíduos que apresentaram sobreposição das correlações H_NH_α foram a Leu-5/Lys-7, e Leu-6 junto com Thr-8 e Ser-11. Para o resíduo de Lys-7, foi identificada a correlação do H_ζ da amina primária da cadeia lateral com o H_α . Além disso, também foram observadas as correlações do H_ζ com os outros hidrogênios da Lys (H_ϵ , H_δ , H_γ e H_β), como observado na Figura 13A. Para os dois resíduos de treonina; Thr-8 e Thr-10, foram identificadas as correlações intra-residuais do H_N , com os outros hidrogênios presentes no resíduo (H_α , H_β e H_γ), como mostrado anteriormente na Figura 11. Diferente da Phe-1, para os resíduos Phe-12 e Phe-13, foram observadas as correlações H_NH_β . Entre os resíduos de leucinas: Leu-5, Leu-6 e Leu-9, junto com o resíduo de isoleucina (Ile-2), só a Ile-2 apresentou uma correlação H_NH_δ no seu sistema de *spins* identificado no espectro TOCSY.

FIGLLKTLTSFF-NH₂

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

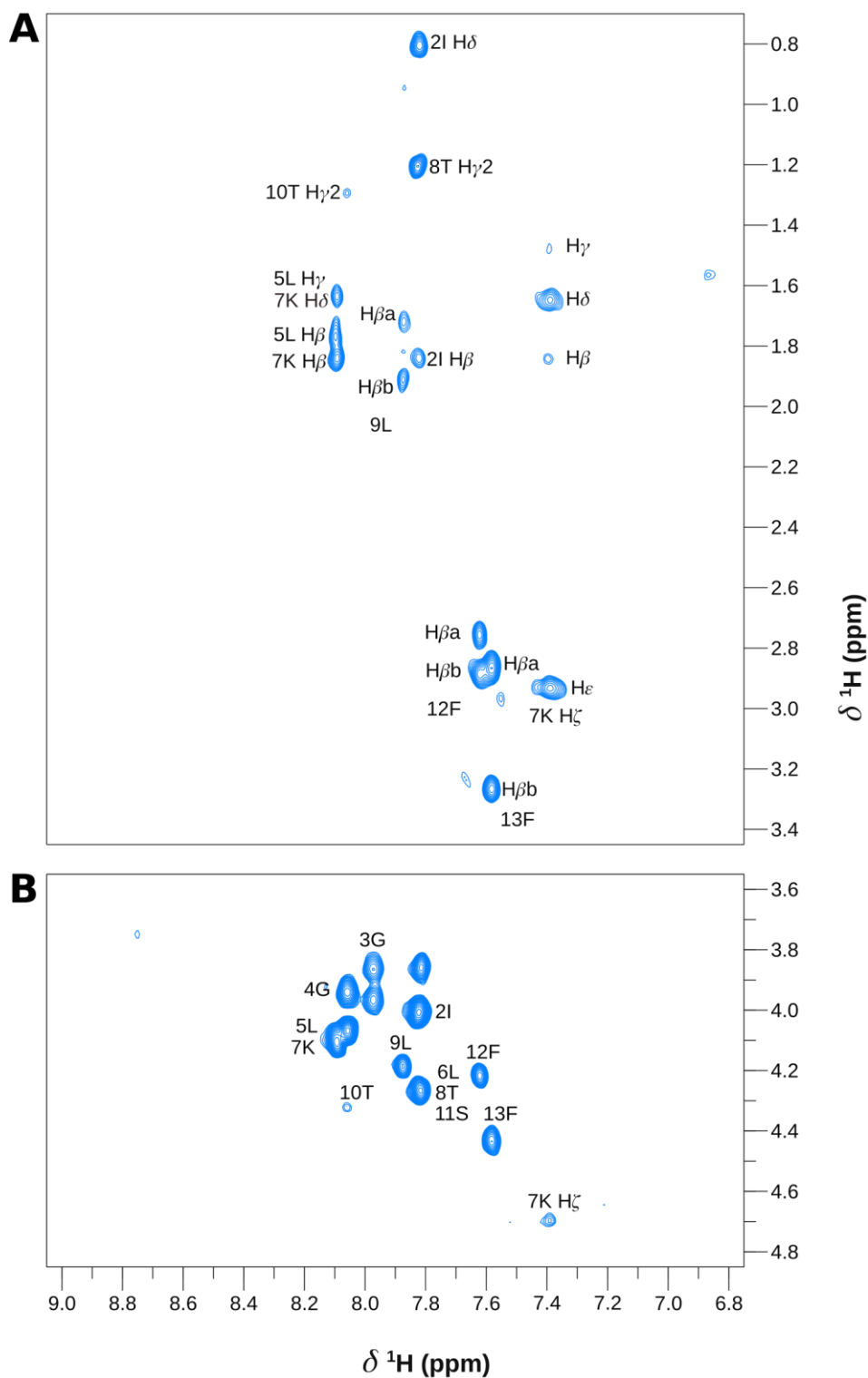


Figura 13. Mapa de contornos TOCSY parcial de Lunatina-1 em solução 100 mM de SDS-*d*₂₅.

A. Região do TOCSY com os sinais de correlação intra-residuais do tipo H_NH_X, sendo x igual a β , γ , δ , ϵ , ζ ou η . **B.** Região do TOCSY com os sinais de correlação intra-residuais do tipo H_NH _{α} *d* _{α N}(*i*,*i*+*n*).

Como mencionado anteriormente, para atribuir as ressonâncias a cada resíduo de acordo com sua posição na sequência peptídica, devem ser feitos assinalamentos sequenciais dos resíduos, por meio dos espectros TOCSY e NOESY sobrepostos, como mostrado na Figura 12. Além da região dos hidrogênios amídicos com os outros hidrogênios que fazem parte dos sistemas de *spins* de cada resíduo, as atribuições sequenciais também podem ser complementadas analisando a região dos hidrogênios amídicos (Figura 14B), determinando quais são os resíduos vizinhos àquele que é analisado, dadas as interações d_{NN} e $d_{NN}(i,i-1)$ no espectro NOESY e que caracterizam estruturas com conformação α -hélice (WÜTHRICH, 1986).

Um resumo das correlações inter-residuais sequenciais e de média distância determinadas para o peptídeo L1 é mostrado na Figura 14C. As conexões sequenciais do tipo $d_{\alpha N}(i,i+1)$ foram observadas para duas regiões do peptídeo: Gly-3 a Leu-6 e Lys-7 a Phe-12. Da mesma forma, conexões do tipo d_{NN} foram observadas para duas regiões peptídicas entre os resíduos Ile-2 a Leu-6 e Thr-8 a Phe-12. Como pode ser observado na Figura 14, os deslocamentos químicos de H_N de alguns resíduos de aminoácidos sequenciais estão muito próximos (δ menor a 0.05 ppm), o que pode dificultar a identificação das correlações $H_N H_N$ para estes resíduos, como ocorrido com a Phe-12/Phe-13. Entretanto, foi possível observar as correlações $H_N H_N$ para os resíduos Gly-4/Leu-5 e Thr8/Leu-9. Além disso, para alguns resíduos, ainda quando não apresentaram deslocamentos químicos próximos para os H_N como Leu-6/Lys-7 e Lys-7/Thr-8, não foram observadas as correlações $H_N H_N$ provavelmente pela falta de estruturação do peptídeo nesta região.

A sobreposição das correlações $H_N H_\alpha$ dos resíduos Leu-5/Lys-7 e Leu-6/Thr-8, impossibilita a atribuição das correlações do tipo $d_{\alpha N}(i,i+2)$ e $d_{NN}(i,i+2)$, para esses resíduos. Uma terceira sobreposição $H_N H_\alpha$ entre os resíduos Thr-8/Ser-11 impede a correlação do tipo $d_{\alpha N}(i,i+3)$, para o resíduo de Thr-8. A equivalência no deslocamento químico do H_N para os resíduos Ile-2 e Leu-6 impede a correlação do tipo $d_{\alpha N}(i,i+4)$, para a Ile. Diferente das correlações sequenciais encontradas ao longo da cadeia polipeptídica, correlações inter-residuais de média distância de NOEs foram observadas principalmente na porção C-terminal. A única correlação do tipo $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ foi observada para o resíduo Leu-9.

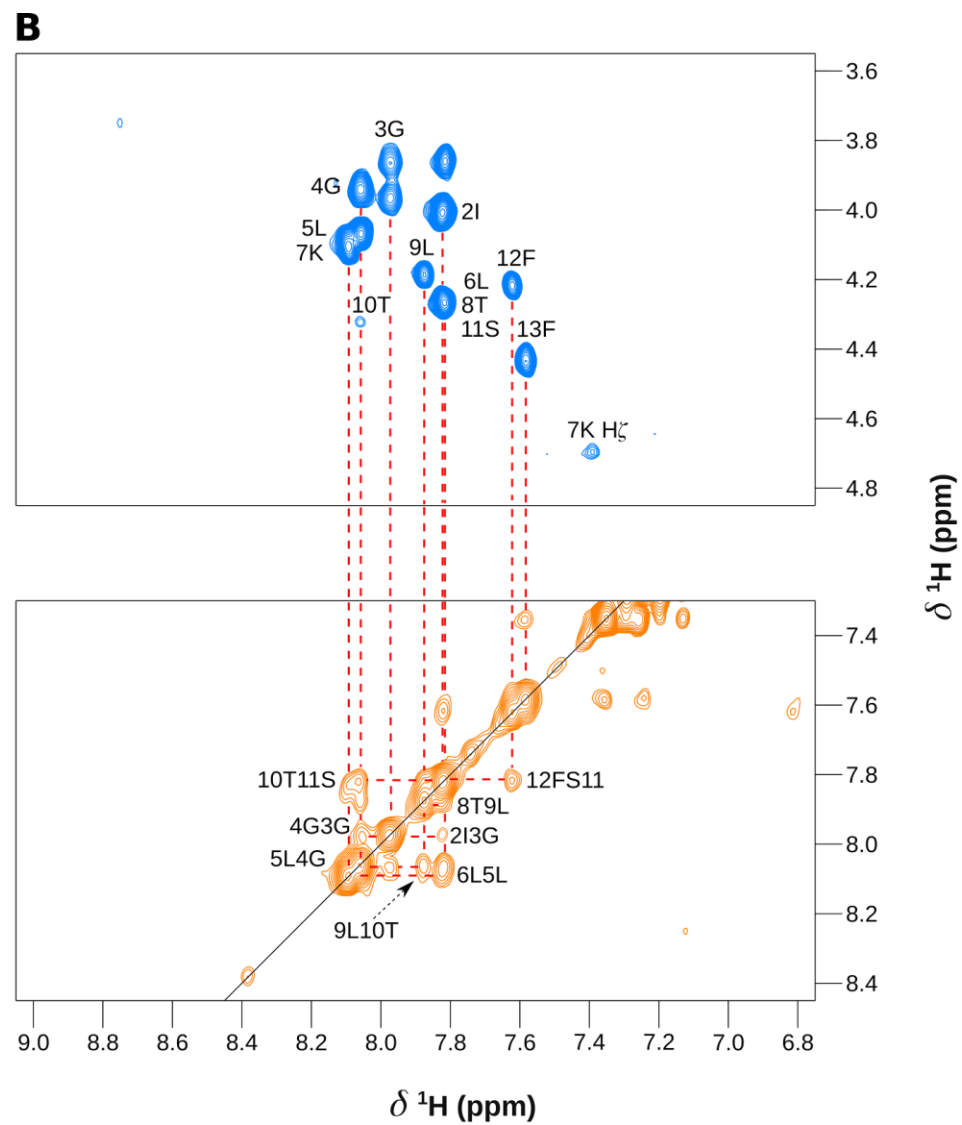
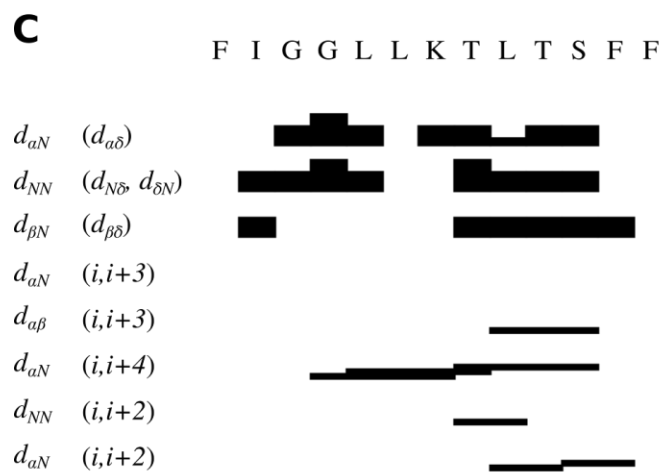
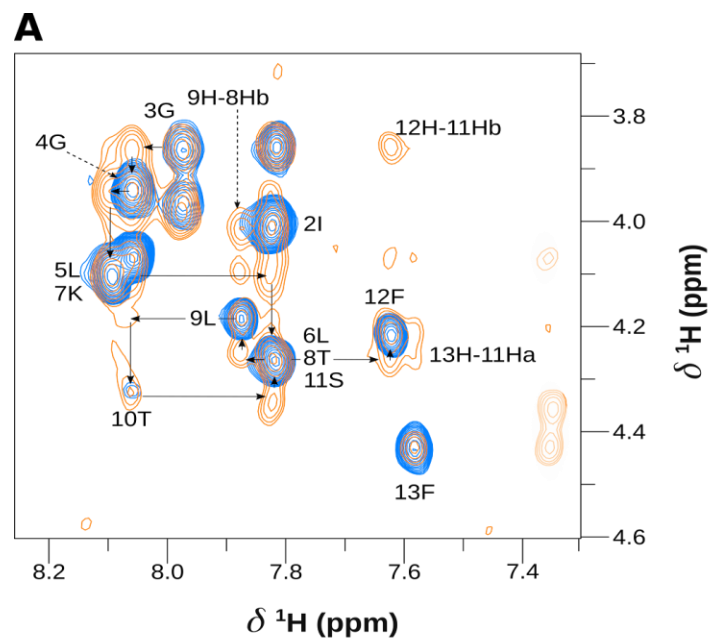


Figura 14. Correlações inter-residuais do peptídeo Lunatina-1 em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

A. Expansão dos mapas de contornos TOCSY e NOESY sobrepostos, na região de interação H_N e H_α , mostrando as conexões $d_{\alpha N}(i,i+1)$. **B.** Expansão dos mapas de contornos TOCSY na região de interação H_N e H_α e NOESY na região de interação H_N mostrando as conectividades entre H_N $d_{NN}(i,i+1)$. A conexão das informações obtidas nos dois experimentos, é mostrada pelas linhas pontuadas que conectam os respectivos sinais de ressonância nos dois espectros. **C.** Diagrama de conectividade de NOEs para o peptídeo L1. O diagrama mostra as interações sequências $d_{\alpha N}$, $d_{\beta N}$ e d_{NN} ($i,i+1$), como também as interações de maior distância ($i,i+2$), ($i,i+3$) e ($i,i+4$), observados no experimento NOESY. A intensidade das interações está indicada pela espessura das linhas.

Mesmo que o peptídeo L1 não tenha apresentado correlações do tipo $d_{\alpha N}(i,i+3)$ e apenas uma interação do tipo $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$, a presença de três interações do tipo $d_{\alpha N}(i,i+4)$ entre os resíduos Gly-4/Thr-8, Leu-5/Leu-9 e Thr-8/Phe-12, sugerem que, embora o peptídeo L1 não tenha adotado uma conformação completamente estruturada, pode haver um arranjo estrutural na região C-terminal.

Os deslocamentos químicos dos núcleos de 1H e ^{13}C obtidos para o peptídeo L1 estão listados na Tabela 3. Como citado anteriormente, a correlação do $H_N H_\alpha$ para o resíduo de aminoácido Phe-1 não foi identificada nos espectros de TOCSY e NOESY. Os valores obtidos e registrados na Tabela 3 são compatíveis com aqueles registrados para os núcleos de átomos de resíduos em estruturas com conformação α -hélice.

Tabela 3. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono obtidos dos espectros NOESY e ^1H - ^{13}C HSQC do peptídeo Lunatina-1 em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

Resíduo	H _N	H _α	C _α	H _β	C _β	H (γδεζ)	C (γδεζ)
1 Phe	-	-	-	-	-	-	-
2 Ile	7,82	4,0	61,72	1,84	41,97	γ ₁ =1,37 δ=0,80	-
3 Gly	7,98	3,87;3,97	40,96	-	-	-	-
4 Gly	8,06	3,94	-	-	-	-	-
5 Leu	8,09	4,10	57,45	1,76	42,15	γ=1,63 δ=0,86;0,93	-
6 Leu	7,83	4,29	-	-	-	-	-
7 Lys	8,09	4,12	57,95	1,84	31,19	γ=1,40;1,48 δ=1,64 ε=2,94	ε=41,94
8 Thr	7,82	4,25	60,69	4,02	64,96	γ=1,21	-
9 Leu	7,88	4,19	56,72	1,73;1,91	42,64	γ=1,81 δ=0,88;0,94	-
10 Thr	8,06	4,32	-	4,07	65,19	γ=1,29	-
11 Ser	7,82	4,26	-	3,86	62,80	-	-
12 Phe	7,62	4,21	57,45	2,76;2,89	40,55	δ=6,81 ε=7,15	-
13 Phe	7,58	4,43	-	2,87;3,26	39,92	δ=7,35 ε=7,25 ζ=7,13	-
14 NH ₂	6,82;7,11	-	-	-	-	-	-

5.4.1 O peptídeo Lunatina-1 apresenta uma estrutura parcialmente enovelada em α -hélice e flexibilidade na região N-terminal

Após ter feito os assinalamentos das ressonâncias nos espectros TOCSY, NOESY e HSQC, as correlações de NOEs obtidas foram convertidas em restrições de distâncias, e os valores de deslocamentos químicos dos átomos de H_α , C_α , H_β e C_β foram utilizados para determinar os ângulos diedros da cadeia principal do peptídeo. Dessa forma, foram obtidos os dados de restrições estruturais utilizados para o cálculo das estruturas tridimensionais do peptídeo.

As estruturas tridimensionais de menor energia obtidas para o peptídeo L1 em solução SDS- d_{25} são mostradas na Figura 15. As dez estruturas de menor energia foram sobrepostas (Figura 15A). Nas estruturas, é possível observar que os resíduos do peptídeo adotam um arranjo estrutural na conformação α -hélice desde o resíduo Leu-5 até a extremidade C-terminal, o que pode estar explicado pelas correlações de média distância $d_{\alpha N}(i, i+4)$ entre os resíduos Gly-4/Thr-8, Leu-5/Leu-9 e Thr-8/Phe-12, junto com a correlação $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ para os resíduos Leu-9/Phe-12, como observado no diagrama de conectividades NOEs na Figura 14C. Ainda quando não foram observados NOEs entre resíduos e a extremidade C-terminal amidada (Figura 14C), espera-se que a estruturação na região C-terminal também esteja mediada pelo grupamento amida, devido à ausência da carga negativa do carboxilato produto da amidação, que ajuda na estabilização do dipolo da hélice nessa porção da cadeia peptídica. Por outro lado, a porção N-terminal apresenta uma estrutura não enovelada.

A L1 é um peptídeo que apresenta três resíduos de fenilalanina (Phe-1, Phe-12 e Phe-13), um resíduo de isoleucina (Ile-2) e três resíduos de leucina (Leu-5, Leu-6 e Leu-9), todos estes hidrofóbicos. A região N-terminal não apresenta uma estrutura em α -hélice e as cadeias laterais da Phe-1 e Ile-2 não estão orientadas para uma única face do peptídeo, quando examinadas as dez estruturas de menor energia (Figura 15A). Ao examinar a disposição dos resíduos na estrutura de menor energia da L1, e seu mapa de contorno de superfície (Figura 15B e C), é possível observar que, em uma das faces do peptídeo predominam os resíduos hidrofóbicos; fenilalaninas (Phe-1 e Phe-13) e leucinas (Leu-5, Leu-6 e Leu-9), sendo assim, uma face hidrofóbica, onde a quebra da hidrofobicidade é dada por um resíduo de treonina (Thr-10). Por outro lado, a face oposta está enriquecida em aminoácidos hidrofílicos Lys-7, Thr-8 e

Ser-11, porém, os resíduos Ile-2 e Phe-12 também estão orientados nessa face. Assim, a L1 não apresenta uma estrutura completamente anfipática, no seu lugar, uma das faces é hidrofóbica e a outra face com as extremidades hidrofóbicas e a parte interna hidrofílica. A L1 é uma molécula com as cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos presentes ao redor de toda a molécula, sendo um peptídeo bastante hidrofóbico. A estrutura 3D de menor energia da L1 mostra que a anfipaticidade do peptídeo é menor do que sugerem os dados teóricos de roda de hélice (Figura 8).

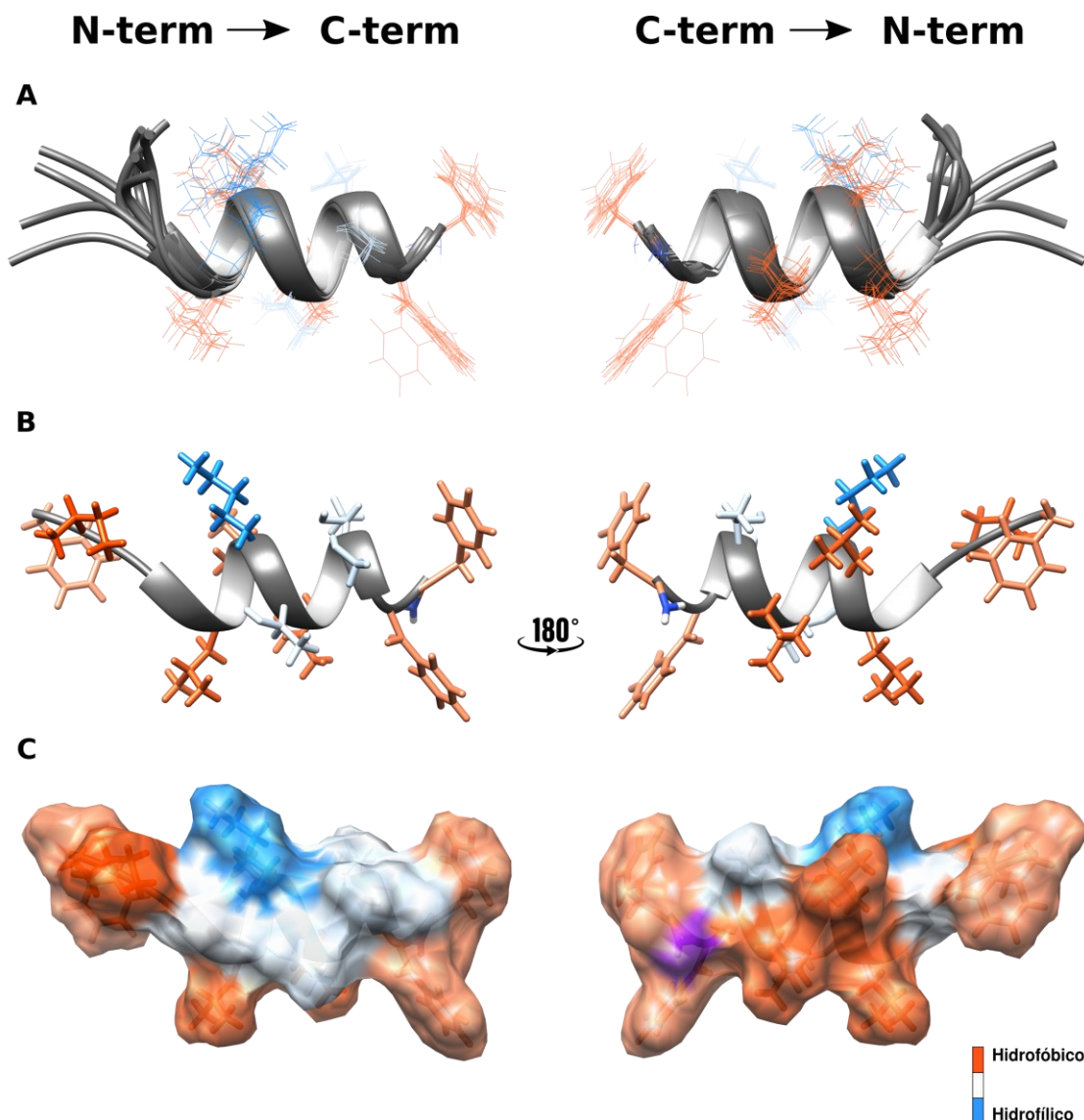


Figura 15. Estruturas 3D de Lunatina-1 em solução 100 mM de SDS-d₂₅.

A. As dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1. **B.** Apenas a estrutura de menor energia é mostrada. **C.** Mapa de contorno de superfície da mesma cadeia peptídica em B. a extremidade C-terminal amidado (-CONH₂) apresenta cor roxa no mapa de contornos da superfície. Em A, B e C, os resíduos estão corados segundo a escala de cores de hidrofobicidade.

Uma vez obtidas as estruturas da L1, elas foram submetidas a análises estatísticas. Os resultados das análises estão resumidos na Tabela 4 e uma análise mais detalhada é mostrada na Tabela A-1 no Anexo A. Os dados da análise gráfica por Ramachandran (Tabela 4 e Figura 16) mostram que todos os resíduos encontram-se em regiões favorecidas ou permitidas, o que indica que a qualidade das estruturas calculadas por RMN em solução é adequada.

Tabela 4. Estatísticas das dez estruturas de menor energia para o peptídeo Lunatina-1 em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

RMSD (Å) - Todos os resíduos	
Cadeia principal	1,32 (\pm 0,44)
Cadeia principal e átomos pesados	2,13 (\pm 0,59)
RMSD (Å) - Segmento helicoidal	
Cadeia principal	0,14 (\pm 0,05)
Cadeia principal e átomos pesados	0,72 (\pm 0,23)
Análise gráfica por Ramachandran %	
Resíduos em região favorecidas	100
Resíduos em regiões permitidas	0
Resíduos em regiões menos permitidas	0
Resíduos em regiões não permitidas	0

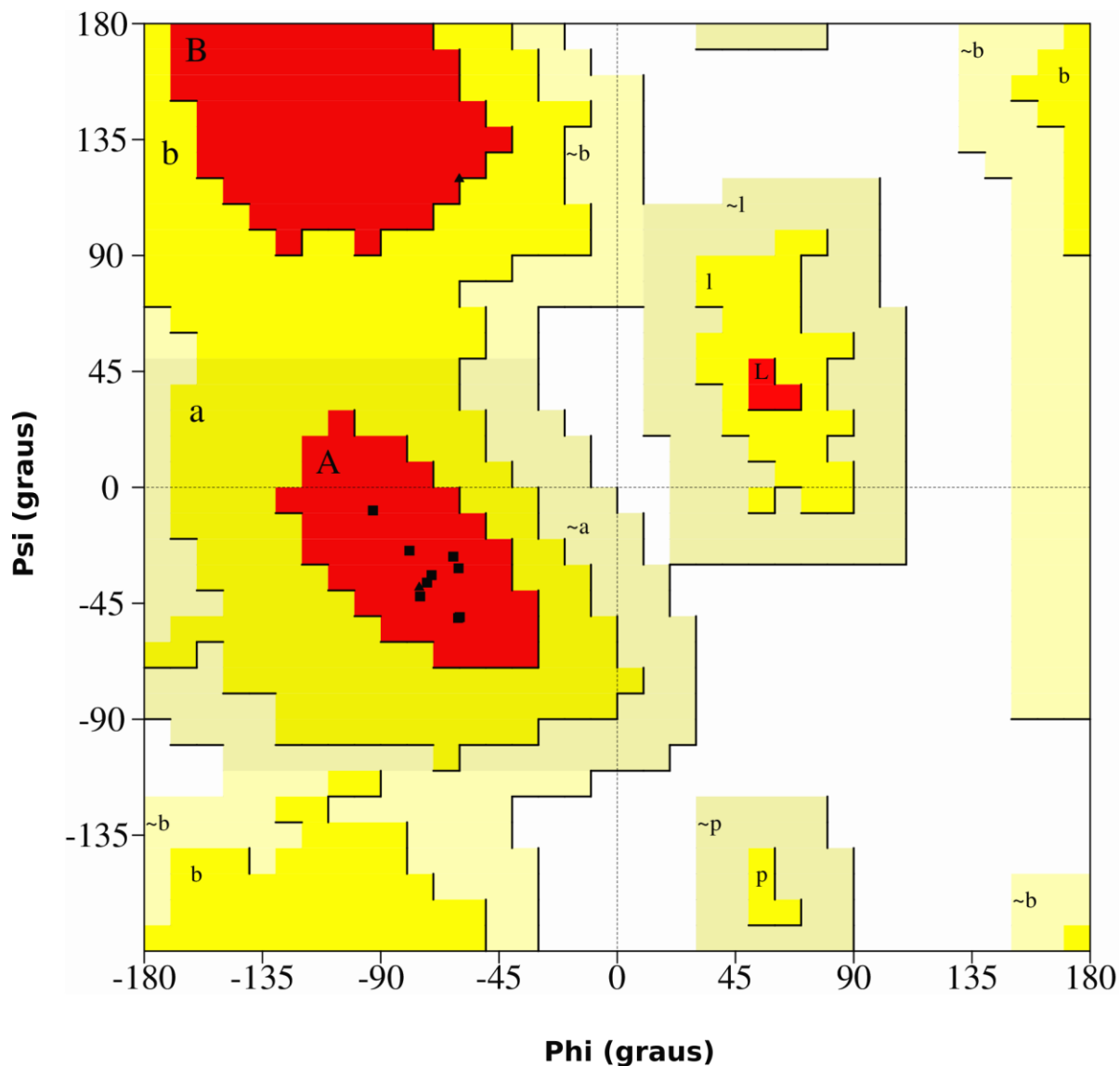


Figura 16. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis do peptídeo Lunatina-1 em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

As áreas em vermelho indicam conformações sem impedimento estérico, também chamadas de regiões favorecidas. As regiões mais favorecidas para as conformações em α -hélice e folha- β estão indicadas com as letras A e B, respectivamente. As regiões em amarelo escuro correspondem a conformações menos estáveis, com aproximação de átomos, as regiões em amarelo claro indicam estruturas pouco flexíveis e as áreas em branco indicam regiões proibidas com ocorrência de impedimentos estereoquímicos. Os resíduos de glicina estão representados como triângulos.

5.4.2 A Substituição de Gly por Ala na Posição 4 do Peptídeo L1 resulta em uma conformação em α -Hélice leva a um aumento da anfipaticidade quando em SDS- d_{25}

O peptídeo análogo à L1, L1-G4A, apresenta a troca da Gly-4 pelo resíduo Ala. Por meio do assinalamento sequencial, foi possível estabelecer as correlações intra-residuais e atribuídas à sequência para o peptídeo L1-G4A, como mostrado na Figura 17.

À exceção dos resíduos Phe-1 e Ile-2, foram determinadas as correlações intra-residuais H_NH_α para os outros onze resíduos. As duas fenilalaninas Phe-12 e Phe-13 tiveram suas correlações H_NH_β identificadas. As duas treoninas Thr-8 e Thr-10, tiveram as três correlações intra-residuais H_NH_α , H_NH_β e H_NH_γ determinadas. Os peptídeos estudados análogos à L1 apresentam um resíduo de Ala que se caracteriza por ter um sistema de *spins* com H_β ($\delta_{\text{médio}}$ 1.35 ppm), que auxilia na identificação do resíduo e na diferenciação com outros resíduos como Ser e Gly. Ao mesmo tempo, o H_β da Ala e os H_γ da Thr, apresentam δ semelhantes, porém às três correlações intra-residuais das Thr ajudam a diferenciar os sistemas de *spins* desses dois resíduos. Os resíduos de Gly e Ser se caracterizam por apresentar $\delta_{\text{médio}}$ semelhantes do seus hidrogênios α e β , respectivamente, apesar disso, as correlações intra-residuais H_NH_α e H_NH_β da Ser se encontram mais distantes entre elas (δ maior a 2 ppm), em comparação às dos hidrogênios α da Gly, quando identificados separadamente no espectro (δ menor a 2 ppm).

A Lys-7 apresentou as correlações do H_N com os hidrogênios β , γ e δ . A presença dos hidrogênios epsilon (H_ϵ) e hidrogênios zeta (H_ζ) da amina primária da cadeia lateral da Lys ajuda na identificação e diferenciação do sistema de *spins* da Lys dos outros resíduos (Figura 17). Porém, na ausência destes hidrogênios, os δ dos H_β , H_γ e H_δ da Lys podem não ser suficientes para identificar o resíduo e diferenciá-lo de outros resíduos como Leu que apresentam δ dos H_β e H_γ semelhantes aos H_β e H_δ da Lys, dependendo da identificação de outras correlações intra-residuais desses resíduos para sua diferenciação. As correlações intra-residuais H_NH_β foram identificadas para os três resíduos de leucinas: Leu-5, Leu-6 e Leu-9.

FIGALLKTLTSFF-NH₂

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

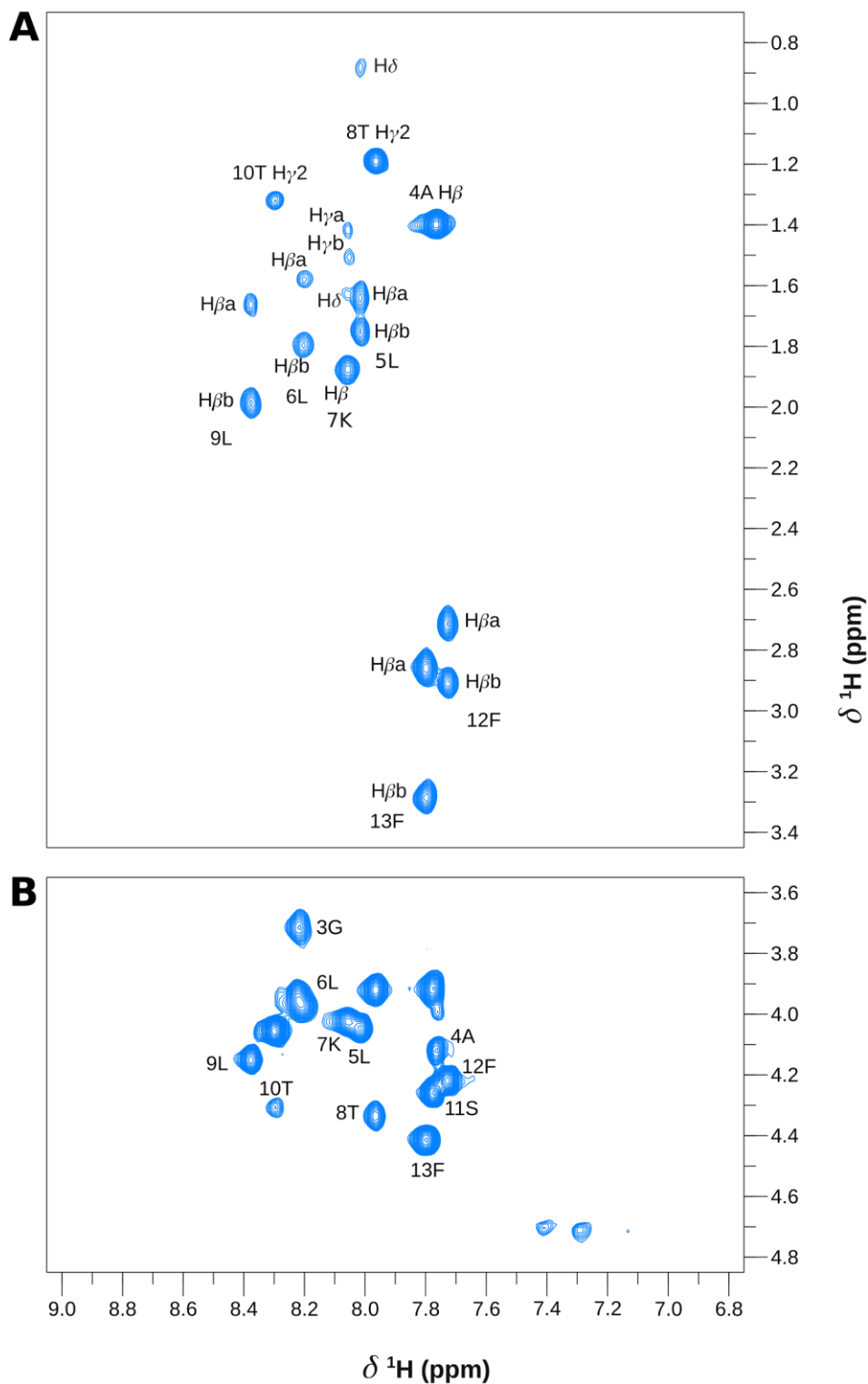


Figura 17. Mapa de contornos TOCSY parcial de L1-G4A em solução 100 mM de SDS-*d*₂₅.

A. Região do TOCSY com os sinais de correlação intra-residuais do tipo H_NH_X, sendo x igual a β , γ , δ , ϵ , ζ ou η . **B.** Região do TOCSY com os sinais de correlação intra-residuais do tipo H_NH _{α} *d* _{α N(i,i+n)}.

As correlações inter-residuais sequenciais e não sequenciais para o peptídeo L1-G4A são mostradas na Figura 18. Diferente do espectro TOCSY onde não foram observadas as correlações intra-residuais para o resíduo Ile-2, no espectro NOESY foi identificado o resíduo de Ile.

As conexões sequenciais do tipo $d_{\alpha N}(i,i+1)$ e $d_{NN}(i,i+1)$ para o peptídeo L1-G4A, foram identificadas para os resíduos Ile-2 a Phe-13 (Figura 18A, B e C). Com exceção do resíduo de Phe-1 que não foi identificado no espectro TOCSY e NOESY e da Gly-3 que não apresenta hidrogênios beta, as correlações sequenciais do tipo $d_{\beta N}(i,i+1)$ foram determinadas para os outros onze resíduos. Diferente do peptídeo L1, para o peptídeo L1-G4A não se apresentaram sobreposições das correlações $H_N H_\alpha$, o que também ajudou na identificação dos resíduos durante a análise dos espectros TOCSY e NOESY. Os únicos resíduos que apresentaram uma correspondência no δ dos H_N foram os resíduos Gly-3 e Leu-6. Mesmo que os δ dos H_N de alguns resíduos se encontravam muito próximos (δ menor a 0,03 ppm), o fato de não serem sequenciais como Ala-4/Phe-12 e Ala-4/Ser-11, não tiveram um efeito na determinação das correlações de média distância para estes resíduos.

Correlações de média distância do tipo $d_{\alpha N}(i,i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ e $d_{\alpha N}(i,i+4)$ características de estruturas que adotam conformação em α -hélice (WÜTHRICH, 1986), foram observadas a partir do segundo resíduo (Ile-2) até a porção C-terminal, o que sugere que o peptídeo apresenta um arranjo helicoidal bem definido para a maioria do peptídeo. A presença de interações do tipo $d_{NN}(i,i+2)$ entre os resíduos Thr-8/Thr-10, Leu-9/Ser-11 e Phe-12 com o H_N do C_T , podem sugerir torções nessa região da cadeia peptídica.

Os deslocamentos químicos dos núcleos de 1H e ^{13}C obtidos para o peptídeo L1-G4A, estão listados na Tabela 5.

Figura 18. Correlações inter-residuais do peptídeo L1-G4A em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

A. Expansão dos mapas de contornos TOCSY e NOESY sobrepostos, na região de interação H_N e H_α , mostrando as conexões $d_{\alpha N}(i,i+1)$. **B.** Expansão dos mapas de contornos TOCSY na região de interação H_N e H_α e NOESY na região de interação H_N mostrando as conectividades entre H_N $d_{NN}(i,i+1)$. A conexão das informações obtidas nos dois experimentos, é mostrada pelas linhas pontuadas que conectam os respectivos sinais de ressonância nos dois espectros. **C.** Diagrama de conectividade de NOEs para o peptídeo L1-G4A. O diagrama mostra as interações sequências $d_{\alpha N}$, $d_{\beta N}$ e $d_{NN}(i,i+1)$, como também as interações de maior distância $(i,i+2)$, $(i,i+3)$ e $(i,i+4)$, observados no experimento NOESY. A intensidade das interações está indicada pela espessura das linhas.

Tabela 5. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono obtidos dos espectros NOESY e ^1H - ^{13}C HSQC do peptídeo L1-G4A em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

Resíduo	H _N	H _α	C _α	H _β	C _β	H (γδεζ)			C (γδεζ)		
1 Phe	-	-	-	-	-	-			-		
2 Ile	8,01	3,89	-	1,86	38,09	γ ₁ =1,36	γ ₂ =1,09	δ=0,83	γ ₁ =28,14	γ ₂ =17,90	δ=13,43
3 Gly	8,22	3,71;3,95	47,11	-	-	-			-		
4 Ala	7,76	4,12	54,71	1,40	18,51	-			-		
5 Leu	8,01	4,04	58,12	1,64;175	41,71	δ=0,86;0,89			δ=25,09;24,84		
6 Leu	8,20	3,97	58,38	1,58;1,79	41,36	δ=0,83;0,89			δ=23,60;23,77		
7 Lys	8,05	4,03	59,34	1,88	32,02	γ=1,41;1,51	δ=1,62	ε=2,91	γ=25,13	δ=29,05	ε=41,18
8 Thr	7,96	4,33	-	3,92	66,62	γ=1,19			γ=21,74		
9 Leu	8,37	4,15	58,34	1,66;1,99	42,10	δ=0,9			δ=23,52		
10 Thr	8,30	4,30	-	4,05	65,72	γ=1,32			γ=21,98		
11 Ser	7,77	4,25	60,98	3,91	63,16	-			-		
12 Phe	7,73	4,21	60,41	2,71;2,90	39,76	δ=6,70	ε=7,07	ζ=7,12	δ=131,72	ε=131,14	ζ=129,81
13 Phe	7,80	4,41	58,44	2,86;3,28	40,18	δ=7,40	ε=7,27	ζ=7,14	δ=132,30	ε=131,25	ζ=129,44
14 NH₂	6,99;7,25	-	-	-	-	-			-		

A troca do resíduo Gly por uma Ala na posição quatro do peptídeo L1, foi suficiente para que o peptídeo análogo L1-G4A adotasse uma conformação aparentemente mais estruturada, apresentando flexibilidade conformacional nas extremidades N- e C- terminais.

As dez estruturas de menor energia do peptídeo L1-G4A foram sobrepostas e são mostradas na Figura 19A. Pode-se observar que, a L1-G4A adota um arranjo estrutural na conformação α -hélice desde o primeiro até o último resíduo. Como falado anteriormente, a L1-G4A apresenta correlações de NOE de média distância do tipo $d_{\alpha N}(i,i+3)$, $d_{\alpha N}(i,i+4)$ e $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$, entre os resíduos Ile-2 a Phe-12, enquanto os resíduos das extremidades fenilalaninas, Phe-1 e Phe-13, não apresentaram este tipo de correlações de média distância (Figura 18C). Da mesma forma, também não se observaram correlações NOE com a extremidade C_T amidada, o que pode explicar a maior flexibilidade conformacional para as extremidades do peptídeo. Todavia, espera-se que a amidação ajude na estabilização do dipolo da hélice na porção C_T da cadeia peptídica.

Ao examinar a disposição dos resíduos nas dez estruturas peptídicas de menor energia e de forma mais clara na estrutura de menor energia da L1-G4A (Figura 19 B e C), é possível observar que os resíduos de fenilalanina Phe-1 e Phe-13 estão orientados de forma oposta. Além disso, a distribuição dos resíduos nas duas faces do peptídeo geram uma molécula anfipática; a face hidrofóbica está formada pelos resíduos Ile-2, as três leucinas (Leu-5, Leu-6 e Leu-9) e as fenilalaninas Phe-12 e Phe-13. A quebra da hidrofobicidade na outra face do peptídeo é devida ao resíduo Phe-1. Dessa forma, o análogo L1-G4A é um peptídeo com uma conformação mais estruturada, menos flexível e ao mesmo tempo com maior anfipaticidade que o peptídeo L1, como observado no mapa de contorno de superfície. A distribuição das cadeias laterais dos resíduos na estrutura 3D desse peptídeo, é semelhante à observada nos dados teóricos da roda de hélice do peptídeo (Figura 8).

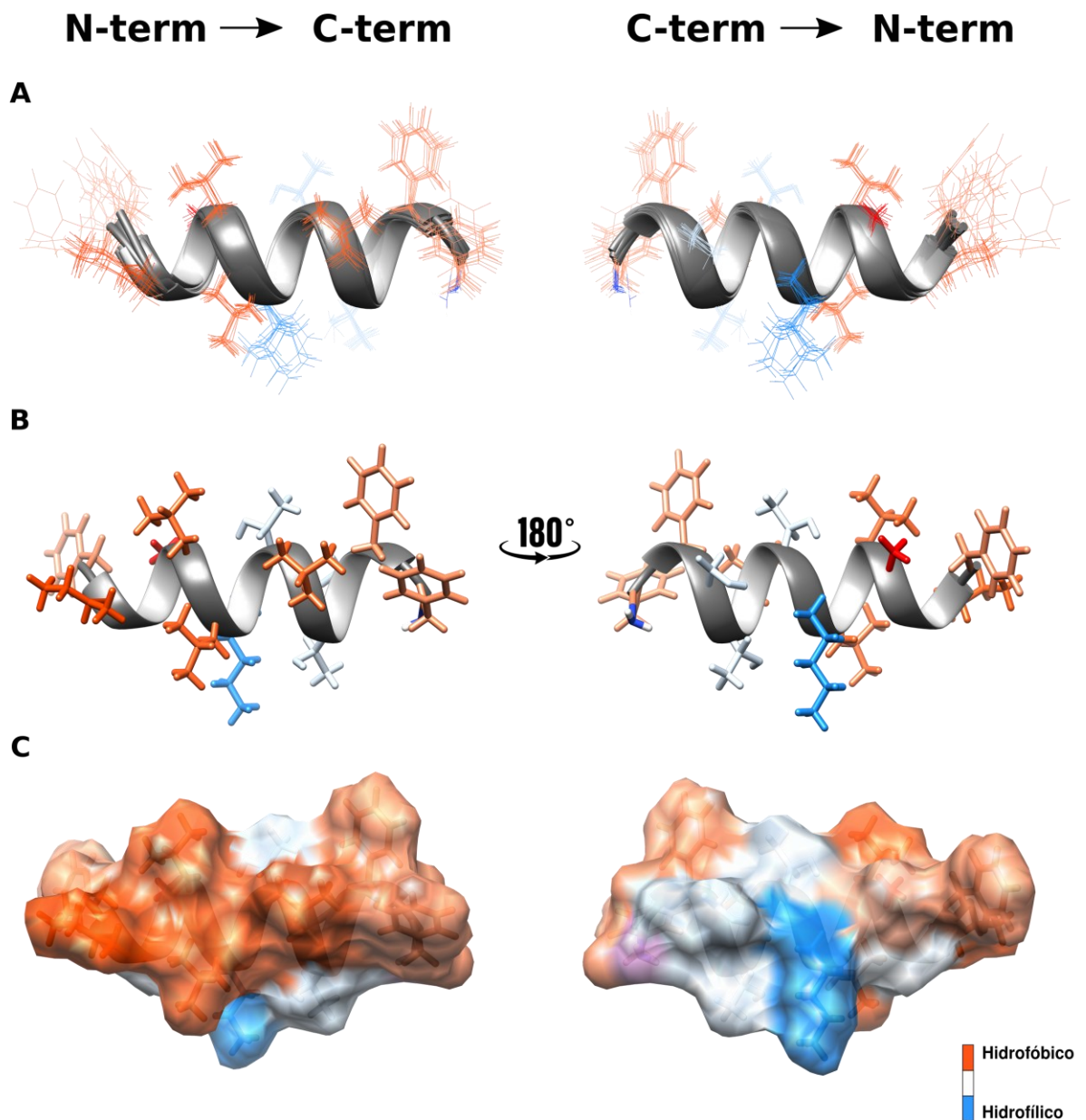


Figura 19. Estruturas 3D de L1-G4A em solução 100 mM de SDS-d₂₅.

A. As dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-G4A. **B.** Apenas a estrutura de menor energia é mostrada. **C.** Mapa de contorno de superfície da mesma cadeia peptídica em B. a extremidade C-terminal amidado (-CONH₂) apresenta cor roxa no mapa de contornos da superfície. Em A, B e C, os resíduos estão corados segundo a escala de cores de hidrofobicidade. A cadeia lateral do resíduo de aminoácido Ala-4 foi destacada em cor vermelha.

Após a obtenção das estruturas da L1-G4A, estas foram submetidas a análises estatísticas para avaliar a qualidade. Os resultados das análises estão resumidos na Tabela 6 e uma análise mais detalhada é mostrada na Tabela A-1 no Anexo A. Os dados da análise gráfica por Ramachandran (Tabela 6 e Figura 20) mostram que todos os resíduos encontram-se em regiões favorecidas ou permitidas, o que indica que a qualidade das estruturas calculadas por RMN em solução é ótima, como também, que todos os resíduos apresentam valores de Phi e Psi característicos de estruturas com conformação em α -hélice.

O aumento da anfipaticidade de um peptídeo pode ter uma série de implicações em sua função, variando conforme o contexto e o ambiente em que atua. Especificamente em relação à interação com membranas, um aumento na anfipaticidade pode ampliar a afinidade do peptídeo pela bicamada lipídica, facilitando sua inserção. Isso, por sua vez, pode influenciar a permeabilidade da membrana, a formação de poros e a regulação de funções celulares. Em relação a microrganismos, essa alteração pode levar à perturbação da integridade de suas membranas, resultando na morte celular.

Além disso, é sabido que peptídeos anfipáticos desempenham o papel de transportadores de moléculas hidrofóbicas em sistemas biológicos. Eles têm a capacidade de encapsular e solubilizar substâncias lipofílicas, facilitando seu transporte em meios aquosos. Portanto, o aumento da anfipaticidade pode expandir as capacidades de interação do peptídeo com membranas, moléculas hidrofóbicas e outros componentes celulares, tendo implicações significativas em sua função.

Tabela 6. Estatísticas das dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-G4A em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

RMSD (Å) - Todos os resíduos	
Cadeia principal	0,34 (\pm 0,08)
Cadeia principal e átomos pesados	0,80 (\pm 0,22)
RMSD (Å) - Segmento helicoidal	
Cadeia principal	0,10 (\pm 0,04)
Cadeia principal e átomos pesados	0,36 (\pm 0,08)
Análise gráfica por Ramachandran %	
Resíduos em região favorecidas	100
Resíduos em regiões permitidas	0
Resíduos em regiões menos permitidas	0
Resíduos em regiões não permitidas	0

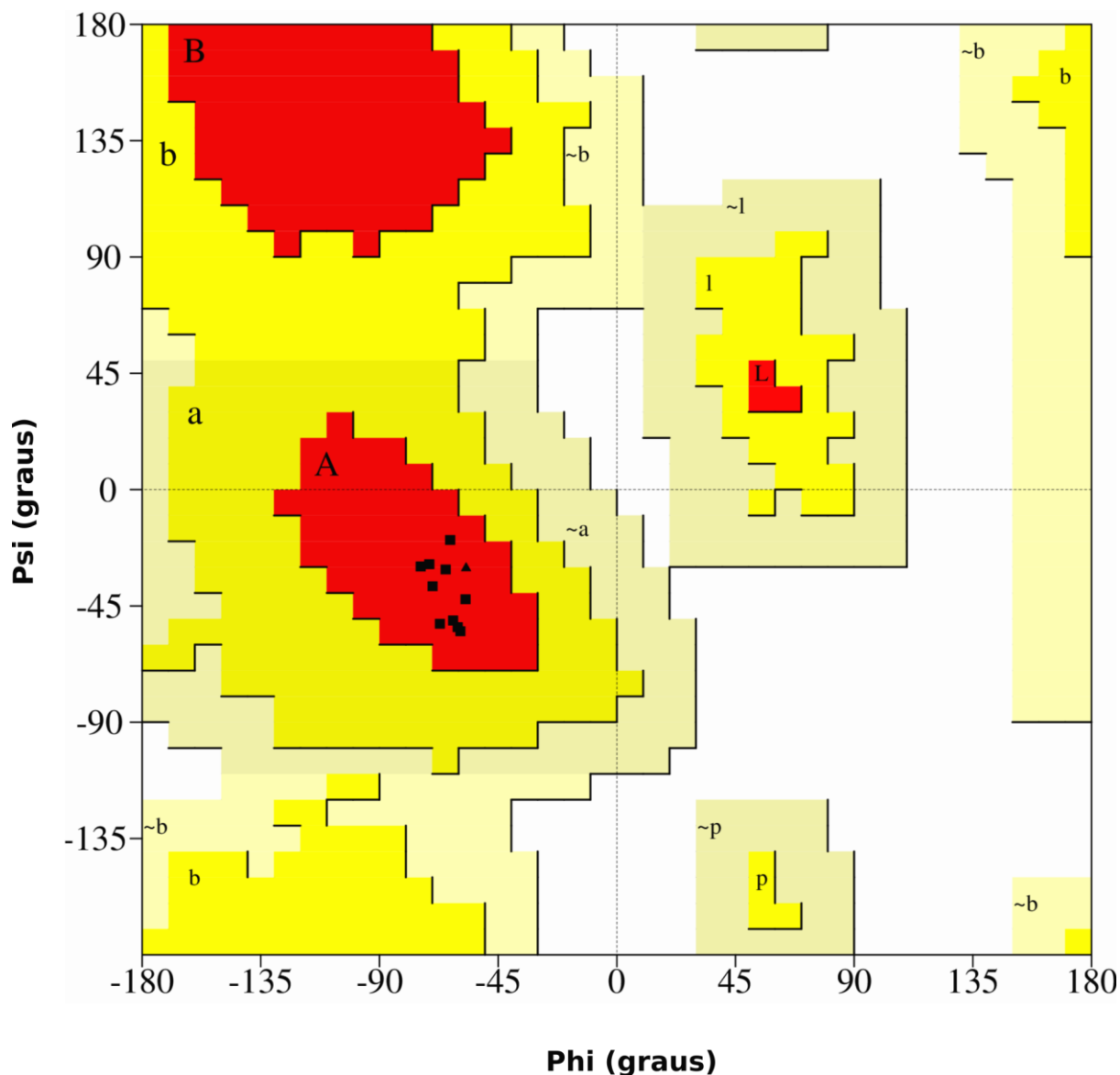


Figura 20. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis do peptídeo L1-G4A em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

As áreas em vermelho indicam conformações sem impedimento estérico, também chamadas de regiões favorecidas. As regiões mais favorecidas para as conformações em α -hélice e folha- β estão indicadas com as letras A e B, respectivamente. As regiões em amarelo escuro correspondem a conformações menos estáveis, com aproximação de átomos, as regiões em amarelo claro indicam estruturas pouco flexíveis e as áreas em branco indicam regiões proibidas com ocorrência de impedimentos estereoquímicos. Os resíduos de glicina estão representados como triângulos.

5.4.3 A Substituição de Thr por Ala na Posição 8 do Peptídeo L1 resulta em uma conformação em α -Hélice com N-Terminal Menos Flexível quando em SDS- d_{25}

O peptídeo análogo à L1, L1-T8A, apresenta a troca da Thr-8 pelo resíduo Ala. Por meio do assinalamento sequencial foi possível estabelecer as correlações intra-residuais e atribuídas à sequência para o peptídeo L1-T8A, como mostrado na Figura 21.

As correlações intra-residuais $H_N H_\alpha$ foram determinadas para os resíduos Gly-3 a Phe-13. Os resíduos de fenilalaninas Phe-12 e Phe-13 tiveram suas correlações $H_N H_\beta$ identificadas. À diferença do peptídeo L1 e os análogos L1-G4A e L1-F12A, a L1-T8A apresenta um único resíduo de Thr (Thr-10) e de Ala (Ala-8). Assim, estes resíduos podem ser utilizados como o ponto de partida para as atribuições e assinalamento sequencial para esse peptídeo, lembrando que a correlação intra-residual $H_N H_\beta$ da Thr ajuda a diferenciá-lo da Ala, visto que assim como seus H_α , o H_β da Ala e o H_γ da Thr apresentam δ semelhantes. Diferentemente das leucinas Leu-5 e Leu-6, para o resíduo Leu-9 foi determinada a correlação $H_N H_\gamma$, enquanto o resíduo Leu-5 foi o único em apresentar correlações do tipo $H_N H_\delta$. Entretanto, as correlações intra-residuais $H_N H_\beta$ foram identificadas para os três resíduos de Leu. A Lys-7 apresentou as correlações intra-residuais do H_N com seus H_β , H_γ e H_δ além da correção $H_N H_\alpha$. A Ser-11 apresentou duas correlações $H_N H_\beta$, ajudando a diferenciá-lo dos resíduos de glicina Gly-3 e Gly-4.

FIGLLKALTSFF-NH₂

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

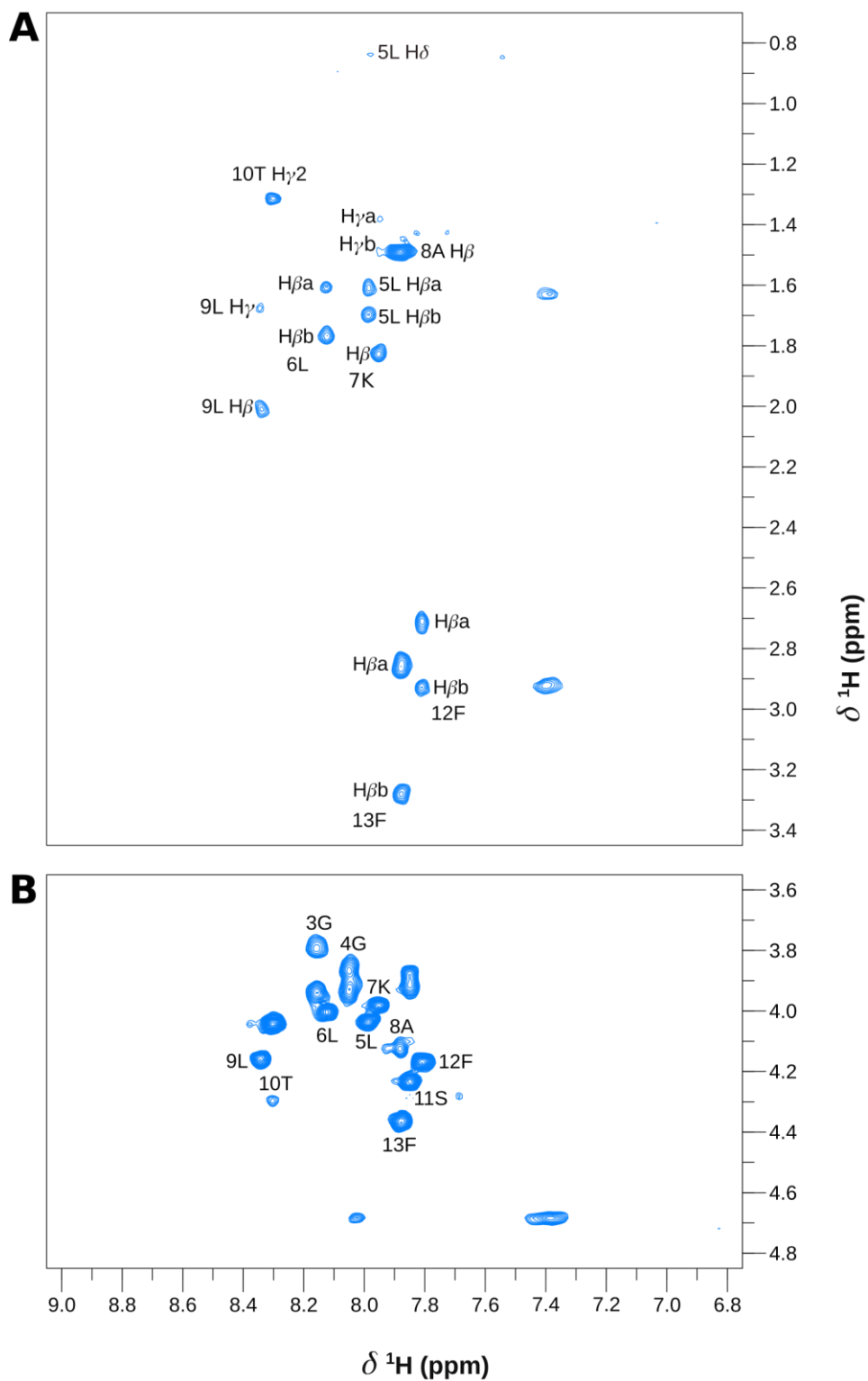


Figura 21. Mapa de contornos TOCSY parcial de L1-T8A em solução 100 mM de SDS-*d*₂₅.

A. Região do TOCSY com os sinais de correlação intra-residuais do tipo H_NH_x, sendo x igual a β, γ, δ, ε, ζ ou η. **B.** Região do TOCSY com os sinais de correlação intra-residuais do tipo H_NH_α d_{αN}(i,i+n).

As correlações inter-residuais sequenciais e não sequenciais para o peptídeo L1-T8A são mostradas na Figura 22. À diferença do espectro TOCSY, no espectro NOESY foi observada a correlação $H_N H_\alpha$ para o resíduo Ile-2.

As conexões sequenciais do tipo $d_{\alpha N}(i, i+1)$ e $d_{NN}(i, i+1)$ do peptídeo L1-T8A foram identificadas para os resíduos Gly-3 a Phe-13 (Figura 22A B e C). As correlações sequenciais do tipo $d_{\beta N}(i, i+1)$ foram determinadas para os resíduos Ala-8 a Phe-13, junto com a leucina: Leu-5. Para o peptídeo L1-T8A não se apresentaram sobreposições das correlações $H_N H_\alpha$. Entretanto, os resíduos que apresentaram uma correspondência no δ dos H_N foram Ile-2/Gly-3 e Ala-8/Phe-13. O δ do H_N para o resíduo Ser-11 é muito próximo ao resíduo vizinho Phe-12 (diferença de δ menor a 0,05 ppm), contudo, não teve algum efeito para a determinação das correlações sequenciais como falado anteriormente. De forma semelhante, para o resíduo Leu-6 o δ do H_α é muito próximo (diferença de δ menor a 0.03 ppm) dos resíduos vizinhos Leu-5 e Lys-7, no entanto as correlações $d_{\alpha N}$ sequenciais foram determinadas para estes resíduos. O fato dos resíduos de glicina apresentarem duas correlações intra-residuais $H_N H_\alpha$, permitiu encontrar a conexão sequencial $d_{\alpha N}$ entre eles, dado que um dos H_α de cada Gly apresentou δ semelhante (Gly-3: 3,95, Gly-4: 3,94).

Correlações de média distância $d_{\alpha N}(i, i+3)$ e $d_{\alpha N}(i, i+4)$, foram observadas a partir do resíduo Gly-3 até a Phe-12, já a correlação $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ foi a única correlação de média distância observada para o resíduo Ile-2. Assim, espera-se que o peptídeo apresente um arranjo helicoidal bem definido, provavelmente com as duas fenilalaninas das extremidades mais livres como sugere a falta de NOE para estes resíduos com o resto da cadeia peptídica. A L1-T8A não apresentou conexões do tipo $d_{NN}(i, i+2)$, que junto com a única interação do tipo $d_{\alpha N}(i, i+2)$ entre os resíduos Lys-7/Leu-9, sugerem uma alfa-hélice sem torções. A abundância de conectividades do tipo $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$ e $d_{\alpha N}(i, i+4)$ é uma característica de estruturas que adotam conformação em α -hélice (WÜTHRICH, 1986).

Os deslocamentos químicos dos núcleos de 1H e ^{13}C obtidos para o peptídeo L1-T8A, estão listados na Tabela 7.

Figura 22. Correlações inter-residuais do peptídeo L1-T8A em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

A. Expansão dos mapas de contornos TOCSY e NOESY sobrepostos, na região de interação H_N e H_α , mostrando as conexões $d_{\alpha N}(i,i+1)$. **B.** Expansão dos mapas de contornos TOCSY na região de interação H_N e H_α e NOESY na região de interação H_N mostrando as conectividades entre H_N $d_{NN}(i,i+1)$. A conexão das informações obtidas nos dois experimentos, é mostrada pelas linhas pontuadas que conectam os respectivos sinais de ressonância nos dois espectros. **C.** Diagrama de conectividade de NOEs para o peptídeo L1-T8A. O diagrama mostra as interações sequenciais $d_{\alpha N}$, $d_{\beta N}$ e $d_{NN}(i,i+1)$, como também as interações de maior distância $(i,i+2)$, $(i,i+3)$ e $(i,i+4)$, observados no experimento NOESY. A intensidade das interações está indicada pela espessura das linhas.

Tabela 7. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono obtidos dos espectros NOESY e ^1H - ^{13}C HSQC do peptídeo L1-T8A em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

Resíduo	H_N	H_α	C_α	H_β	C_β	H ($\gamma\delta\varepsilon\zeta$)	C ($\gamma\delta\varepsilon\zeta$)
1 Phe	-	-	-	-	-	-	-
2 Ile	8,16	3,91	-	1,88	-	$\gamma_1=1,08;1,40$ $\gamma_2=0,84$	-
3 Gly	8,16	3,80;3,95	-	-	-	-	-
4 Gly	8,05	3,88;3,94	-	-	-	-	-
5 Leu	7,99	4,04	-	1,62;1,70	-	$\delta=0,85;0,90$	$\delta=24,62;24,74$
6 Leu	8,13	4,01	-	1,62;1,78	-	$\delta=0,85;0,91$	$\delta=23,83;24,83$
7 Lys	7,95	3,99	59,15	1,84	31,90	$\gamma=1,40;1,50$ $\delta=1,64$ $\varepsilon=2,93$	$\gamma=24,99$ $\delta=29,01$ $\varepsilon=42,15$
8 Ala	7,88	4,13	55,13	1,50	18,09	-	-
9 Leu	8,35	4,17	58,34	2,02	-	$\gamma=1,69$ $\delta=0,92$	-
10 Thr	8,31	4,31	-	4,05	65,89	$\gamma=1,32$	$\gamma=21,94$
11 Ser	7,85	4,24	61,02	3,89;3,92	63,21	-	-
12 Phe	7,81	4,18	58,32	2,72;2,94	-	$\delta=6,58$ $\varepsilon=7,05$ $\zeta=7,11$	$\delta=131,60$ $\varepsilon=131,17$ $\zeta=129,81$
13 Phe	7,88	4,38	58,83	2,86;3,29	-	$\delta=7,43$ $\varepsilon=7,29$ $\zeta=7,15$	$\delta=132,25$ $\varepsilon=131,48$ $\zeta=129,47$
14 NH₂	7,00;7,23	-	-	-	-	-	-

A troca do resíduo Thr por uma Ala na posição oito do peptídeo L1, levou a geração de um peptídeo com uma conformação enovelada em α -hélice, porém com a extremidade N-terminal possivelmente menos flexível que a L1.

As dez estruturas de menor energia do peptídeo L1-T8A foram sobrepostas e são mostradas na Figura 23A. Pode-se observar que, a L1-T8A adota um arranjo estrutural na conformação α -hélice desde a Leu-5 até o último resíduo Phe-13. Como falado anteriormente, a L1-T8A apresenta correlações de NOEs de média distância do tipo $d_{\alpha N}(i, i+3)$ e $d_{\alpha N}(i, i+4)$ entre os resíduos Gly-3-a Phe-12 (Figura 22C). Porém o resíduo Ile-2 só apresentou a correlação $d_{\alpha\beta}(i, i+3)$, já estes três tipos de correlações se fazem mais abundantes e aparecem para o mesmo resíduo Leu-5 em diante. As poucas correlações de NOE entre os dois primeiros resíduos podem explicar a maior flexibilidade conformacional para a extremidades N_T do peptídeo. O resíduo Phe-13 C_T não apresentou correlações de média distância, entretanto, espera-se que a amidação contribua para a estabilização do dipolo da hélice na porção C_T da cadeia peptídica, que junto com as correlações até o resíduo Phe-12, façam com que a extremidade C_T seja mais estruturada que a extremidade oposta.

Ao examinar a disposição dos resíduos na estrutura de menor energia da L1-T8A, junto com o mapa de contorno de superfície (Figura 23B e C), é possível observar que a face mais hidrofóbica do peptídeo está constituída pelos resíduos Phe-1, Ile-2, as três leucinas: Leu-5, Leu-6 e Leu-9 e a Phe-13, o único resíduo polar que quebra a hidrofobicidade nesta face é a Thr-10. Na face oposta estão presentes os resíduos hidrofílicos, porém, o resíduo Ala-8 presente no médio da hélice e o resíduo Phe-12 na extremidade C_T, quebram a hidrofobicidade desta face e reduzem a anfipaticidade do peptídeo. O análogo L1-T8A é um peptídeo com uma conformação menos estruturada e menos anfipático que o peptídeo L1-G4A, no entanto possivelmente menos flexível que o peptídeo parental L1. Quando comparada essa estrutura com a disposição dos resíduos na roda de hélice, é possível dizer que o peptídeo L1-T8A é menos anfipático do que o diagrama de roda de hélice sugere (Figura 8).

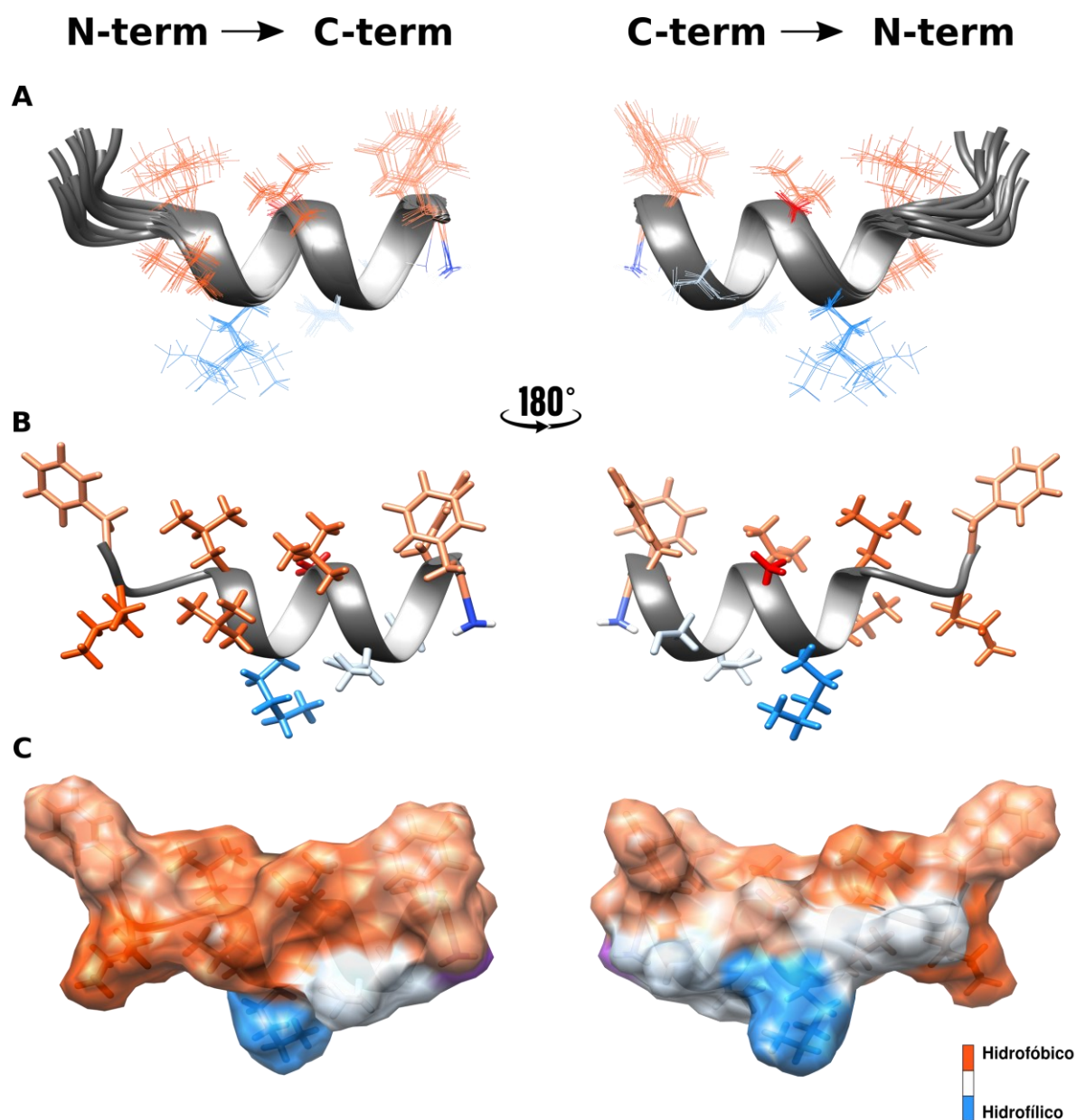


Figura 23. Estruturas 3D de L1-T8A em solução 100 mM de SDS-d₂₅.

A. As dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-T8A. **B.** Apenas a estrutura de menor energia é mostrada. **C.** Mapa de contorno de superfície da mesma cadeia peptídica em B. a extremidade C-terminal amidado (-CONH₂) apresenta cor roxa no mapa de contornos da superfície. Em A, B e C, os resíduos estão corados segundo a escala de cores de hidrofobicidade. A cadeia lateral do resíduo de aminoácido Ala-8 foi destacada em cor vermelha.

Após a obtenção das estruturas da L1-T8A, a qualidade foi avaliada. Os resultados das análises estão resumidos na Tabela 8 e uma análise mais detalhada é mostrada na Tabela A-1 no Anexo A. Os dados da análise gráfica por Ramachandran (Tabela 8 e Figura 24) mostram que à exceção dos resíduos Ile-2 e glicinas Gly-3 e Gly-4, os resíduos apresentam valores de Phi e Psi característicos de estruturas com conformação em α -hélice. Entretanto, 100% dos resíduos estão presentes em regiões permitidas.

Tabela 8. Estatísticas das dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-T8A em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

RMSD (Å) - Todos os resíduos	
Cadeia principal	0,69 (\pm 0,19)
Cadeia principal e átomos pesados	1,24 (\pm 0,26)
RMSD (Å) - Segmento helicoidal	
Cadeia principal	0,43 (\pm 0,13)
Cadeia principal e átomos pesados	0,66 (\pm 0,13)
Análise gráfica por Ramachandran %	
Resíduos em região favorecidas	88,9
Resíduos em regiões permitidas	11,1
Resíduos em regiões menos permitidas	0
Resíduos em regiões não permitidas	0

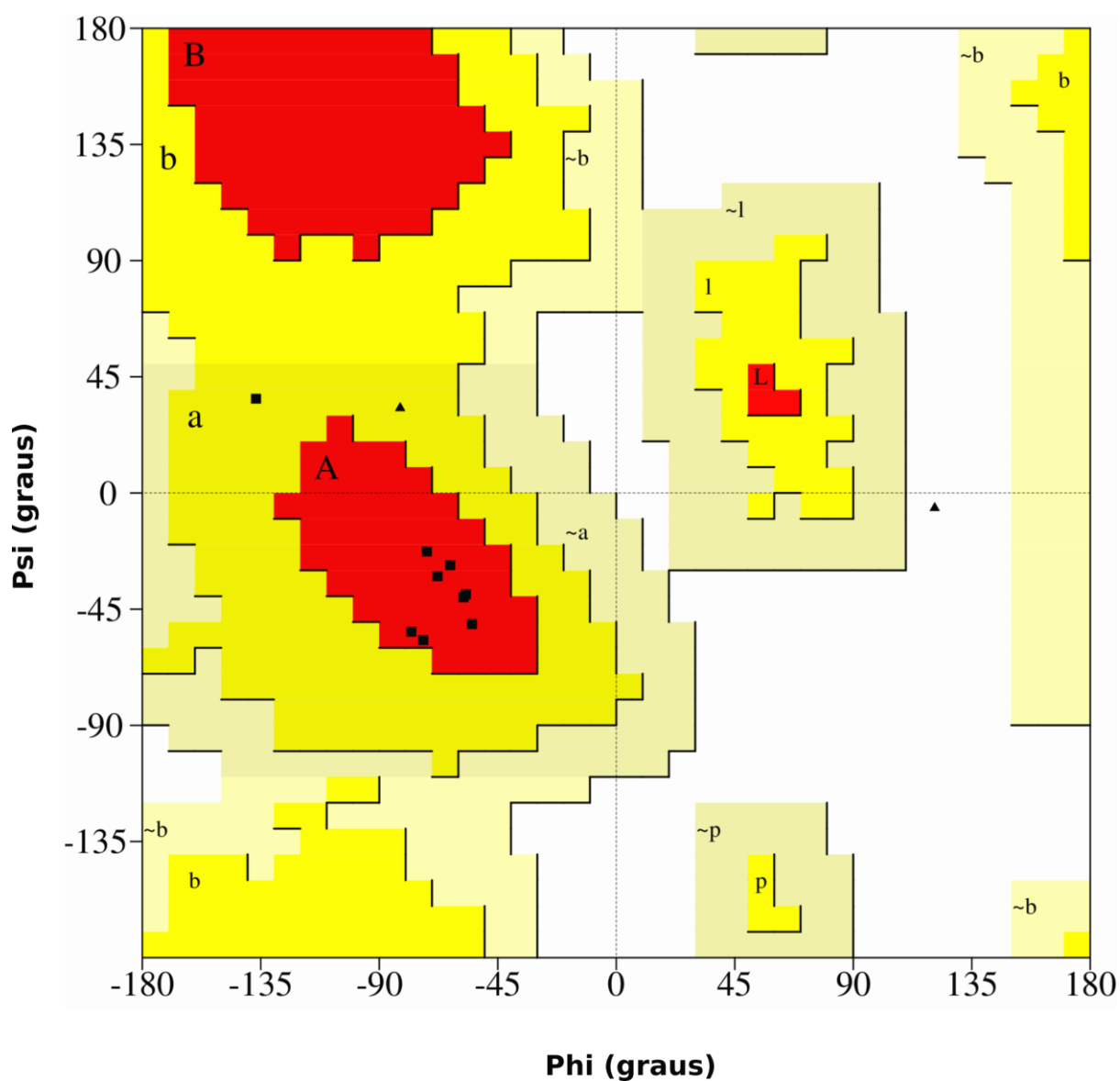


Figura 24. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis do peptídeo L1-T8A em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

As áreas em vermelho indicam conformações sem impedimento estérico, também chamadas de regiões favorecidas. As regiões mais favorecidas para as conformações em α -hélice e folha- β estão indicadas com as letras A e B, respectivamente. As regiões em amarelo escuro correspondem a conformações menos estáveis, com aproximação de átomos, as regiões em amarelo claro indicam estruturas pouco flexíveis e as áreas em branco indicam regiões proibidas com ocorrência de impedimentos estereoquímicos. Os resíduos de glicina estão representados como triângulos.

5.4.4 A substituição de Phe por Ala levou a geração de análogo com estrutura e anfipaticidade aprimoradas quando em SDS-*d*₂₅

O peptídeo análogo à L1, L1-F12A, apresenta a troca da Phe-12 pelo resíduo Ala. Por meio do assinalamento sequencial foi possível estabelecer as correlações intra-residuais e atribuídas à sequência para o peptídeo L1-F12A como mostrado na Figura 25.

De forma semelhante aos análogos L1-G4A e L1-T8A, à exceção dos resíduos Phe-1 e Ile-2, foram encontradas as correlações intra-residuais H_NH_α para o peptídeo L1-F12A. Diferente do peptídeo L1 e os análogos L1-G4A e L1-T8A, a L1-F12A apresenta só duas fenilalaninas: Phe-1 e Phe-13. Além disso, dado que o resíduo de Phe-1 não foi observado nos espectros TOCSY dos peptídeos analisados em meio micelar de SDS, as correlações H_NH_β da Phe-13 facilitaram a identificação do resíduo por serem as únicas com δ de 2,9 e 3,2, característico de H_β de Phe ($\delta_{\text{médio}}$ 2,9 ppm). As treoninas Thr-8 e Thr-10 tiveram as três correlações intra-residuais H_NH_α , H_NH_β e H_NH_γ identificadas. O H_β da Ala-12 e o H_γ da Thr-8 tiveram um δ semelhante (diferença de δ menor a 0,04 ppm), porém o sistema de *spins* maior para os resíduos de Thr, ajudou a diferenciar os dois resíduos.

O peptídeo L1-F12A foi o único em apresentar correlações intra-residuais H_NH_δ para dois resíduos de leucina, sendo eles Leu-5 e Leu-9. Entretanto, as correlações intra-residuais H_NH_β foram identificadas para os três resíduos de leucina: Leu-5, Leu-6 e Leu-9. As correlações H_NH_β , H_NH_δ e H_NH_γ do resíduo de lisina facilitaram a identificação do resíduo e ao mesmo tempo ajudaram a diferenciá-lo do resíduo de Leu-6 que apresentou δ dos H_β semelhante aos dos H_β e H_δ da lisina (δ entre 1,6 e 1,8 ppm). O sistema de *spins* da Ser-11 apresentou três correlações intra-residuais, correspondentes a H_NH_α e duas H_NH_β que auxiliam na diferenciação do resíduo dos dois resíduos de glicina: Gly-3 e Gly-4.

FIGLLKTLTSAF-NH₂

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

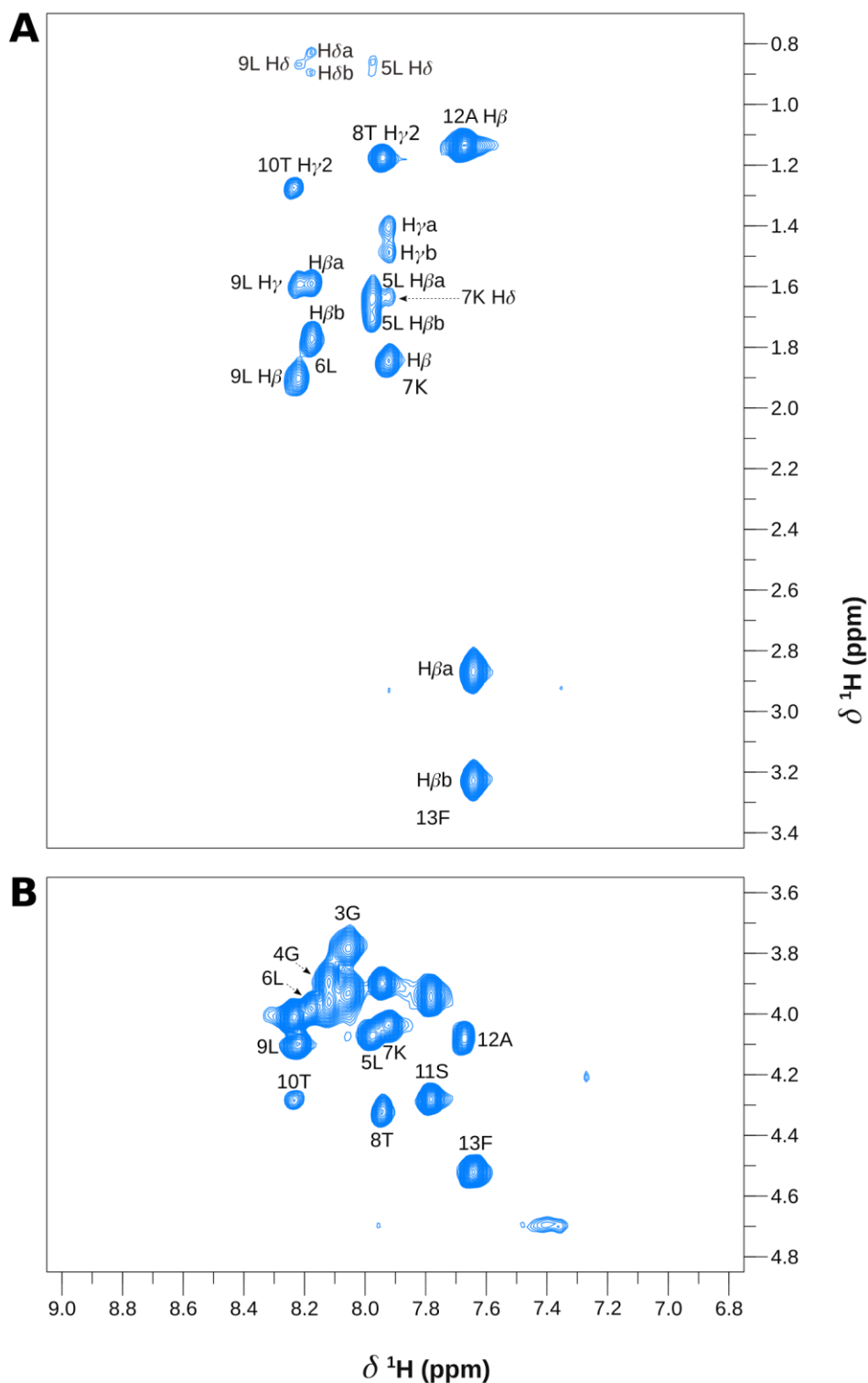


Figura 25. Mapa de contornos TOCSY parcial de L1-F12A em solução 100 mM de SDS-*d*₂₅.

A. Região do TOCSY com os sinais de correlação intra-residuais do tipo $H_N H_X$, sendo x igual a β , γ , δ , ϵ , ζ ou η . **B.** Região do TOCSY com os sinais de correlação intra-residuais do tipo $H_N H_\alpha d_{\alpha N}(i, i+n)$.

As correlações inter-residuais sequenciais e não sequenciais para o peptídeo L1-F12A são mostradas na Figura 26. De forma semelhante ao TOCSY, no NOESY não foi identificada a correlação intra-residual $H_N H_\alpha$ para o resíduo Ile-2.

Os resíduos Lys-7/Thr-8, assim como Leu-9/Thr-10 tiveram o δ dos seus H_N muito próximos (diferença de δ menor a 0,02 ppm), o que explica a ausência das conexões sequenciais $d_{NN}(i,i+1)$ para esses pares de resíduos (Figura 26B e C). Esta correlação sequencial também não foi observada para os resíduos Ala-12/Phe-13. À exceção desses resíduos, as conexões $d_{NN}(i,i+1)$ para o peptídeo L1-F12A, foram identificadas para os resíduos Gly-3 até H_N da extremidade C_T amidado. Os resíduos de Thr-10 e Ser-11 apresentaram δ dos H_N diferente, não obstante, o mesmo δ para o H_α , impedindo a conexão sequencial do tipo $d_{\alpha N}(i,i+1)$ entre eles, e que foi observada para os resíduos Gly-3 a Phe-13 (Figura 26A e C). Com exceção do resíduo Phe-1 que não foi identificado no espectro TOCSY e NOESY e das glicinas Gly-3 e Gly-4, que não apresentam H_β , as correlações sequenciais do tipo $d_{\beta N}(i,i+1)$ foram determinadas para os resíduos Ile-2 a Phe-13.

Correlações de média distância do tipo $d_{\alpha N}(i,i+3)$, $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ e $d_{\alpha N}(i,i+4)$ características de estruturas que apresentam conformações em α -hélice (WÜTHRICH, 1986) foram observadas a partir do resíduo Gly-3 até a porção C-terminal (Figura 26C), o que sugere que o peptídeo L1-F12A apresenta um arranjo helicoidal bem marcado para a maioria do peptídeo. A presença de interações do tipo $d_{NN}(i,i+2)$ entre os resíduos Thr-10/Ala-12, e de interações $d_{\alpha N}(i,i+2)$ entre os resíduos Gly-3/Leu-5 e Leu-9/Ser-11, podem sugerir torções nessa região da cadeia peptídica.

Os deslocamentos químicos dos núcleos de 1H e ^{13}C obtidos para o peptídeo L1-F12A, estão listados na Tabela 9.

Figura 26. Correlações inter-residuais do peptídeo L1-F12A em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

A. Expansão dos mapas de contornos TOCSY e NOESY sobrepostos, na região de interação H_N e H_α , mostrando as conexões $d_{\alpha N}(i,i+1)$. **B.** Expansão dos mapas de contornos TOCSY na região de interação H_N e H_α e NOESY na região de interação H_N mostrando as conectividades entre H_N $d_{NN}(i,i+1)$. A conexão das informações obtidas nos dois experimentos, é mostrada pelas linhas pontuadas que conectam os respectivos sinais de ressonância nos dois espectros. **C.** Diagrama de conectividade de NOEs para o peptídeo L1-F12A. O diagrama mostra as interações sequenciais $d_{\alpha N}$, $d_{\beta N}$ e $d_{NN}(i,i+1)$, como também as interações de maior distância $(i,i+2)$, $(i,i+3)$ e $(i,i+4)$, observados no experimento NOESY. A intensidade das interações está indicada pela espessura das linhas.

Tabela 9. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono obtidos dos espectros NOESY e ^1H - ^{13}C HSQC do peptídeo L1-F12A em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

Resíduo	H _N	H _α	C _α	H _β	C _β	H (γδεζ)	C (γδεζ)
1 Phe	-	4,34	-	3,25	40,56	δ=7,34 ε=7,29 ζ=7,21	δ=132,32 ε=131,35 ζ=130,18
2 Ile	-	3,95	-	1,86	38,22	γ ₁ =1,34 γ ₂ =0,0;0,99	γ ₁ =27,68 γ ₂ =17,80
3 Gly	8,06	3,78;3,94	46,51	-	-	-	-
4 Gly	8,12	3,89;3,96	46,49	-	-	-	-
5 Leu	7,98	4,07	58,15	1,64;170	41,93	δ=0,85;0,90	δ=25,01;24,99
6 Leu	8,18	3,98	58,22	1,59;1,77	41,01	δ=0,84;0,90	δ=23,79
7 Lys	7,93	4,04	58,99	1,85	31,97	γ=1,41;1,49 δ=1,63 ε=2,93	γ=25,06 δ=28,96 ε=42,08
8 Thr	7,94	4,32	-	3,90	66,33	γ=1,18	-
9 Leu	8,22	4,10	58,13	1,89;1,92	42,04	γ=1,60 δ=0,87	γ=27,19 δ=23,57
10 Thr	8,24	4,28	60,84	4,01	65,26	γ=1,27	-
11 Ser	7,78	4,28	60,54	3,93;3,96	63,36	-	-
12 Ala	7,67	4,08	53,96	1,14	18,75	-	-
13 Phe	7,64	4,52	-	2,87;3,23	40,25	δ=7,28 ε=7,20 ζ=7,11	δ=131,79 ε=130,85 ζ=129,24
14 NH ₂	6,97;7,24	-	-	-	-	-	-

A troca do resíduo Phe por uma Ala na posição doze do peptídeo L1, fez com que o peptídeo análogo L1-F12A adotasse uma conformação estruturada e enovelada em α -hélice.

As dez estruturas de menor energia do peptídeo L1-F12A foram sobrepostas e são mostradas na Figura 27A. É possível observar que a L1-F12A adota um arranjo estrutural na conformação α -hélice desde o primeiro até o último resíduo. Ainda quando a Ile-2 só apresentou a correlação de média distância $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$, o resíduo Gly-3 apresentou 4 correlações de NOE; $d_{\alpha N}(i,i+n)$ $n= 2, 3$ e 4 e $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$, que junto com as correlações $d_{\alpha N}(i,i+3)$ e $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$ dos resíduos seguintes: Gly-4, Leu-5 e Leu-6, explicam a estabilização da α -hélice desde a extremidade N_T. O peptídeo L1-F12A apresentou uma correlação $d_{\alpha N}(i,i+4)$ da Thr-10 e o H_T, e conexões $d_{\alpha N}(i,i+3)$ entre os resíduos Leu-9/Phe-12 e Thr-10/Phe-13, que junto com a amidação ajudam na estabilização da região C_T do peptídeo.

Ao avaliar a disposição dos resíduos na estrutura de menor energia (Figuras 27B e C), é possível observar que os resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos estão orientados de forma oposta. Assim, a distribuição dos resíduos nas duas faces do peptídeo L1-F12A gera uma molécula anfipática; a face hidrofóbica está formada pelos resíduos Ile-2, as três leucinas (Leu-5, Leu-6 e Leu-9) e o resíduo Phe-13. Na face oposta encontram-se os resíduos polares, onde a quebra da hidrofobicidade é devido ao resíduo Phe-1. Dessa forma, o análogo L1-F12A de forma semelhante à L1-G4A, é um peptídeo com um arranjo tridimensional mais estruturado, menos flexível e ao mesmo tempo mais anfipático que o peptídeo molde L1, como pode ser observado nas estruturas de menor energia e nos mapas de contorno de superfície. O arranjo estrutural é parecido ao observado na predição sugerida pela roda de hélice deste peptídeo (Figura 8).

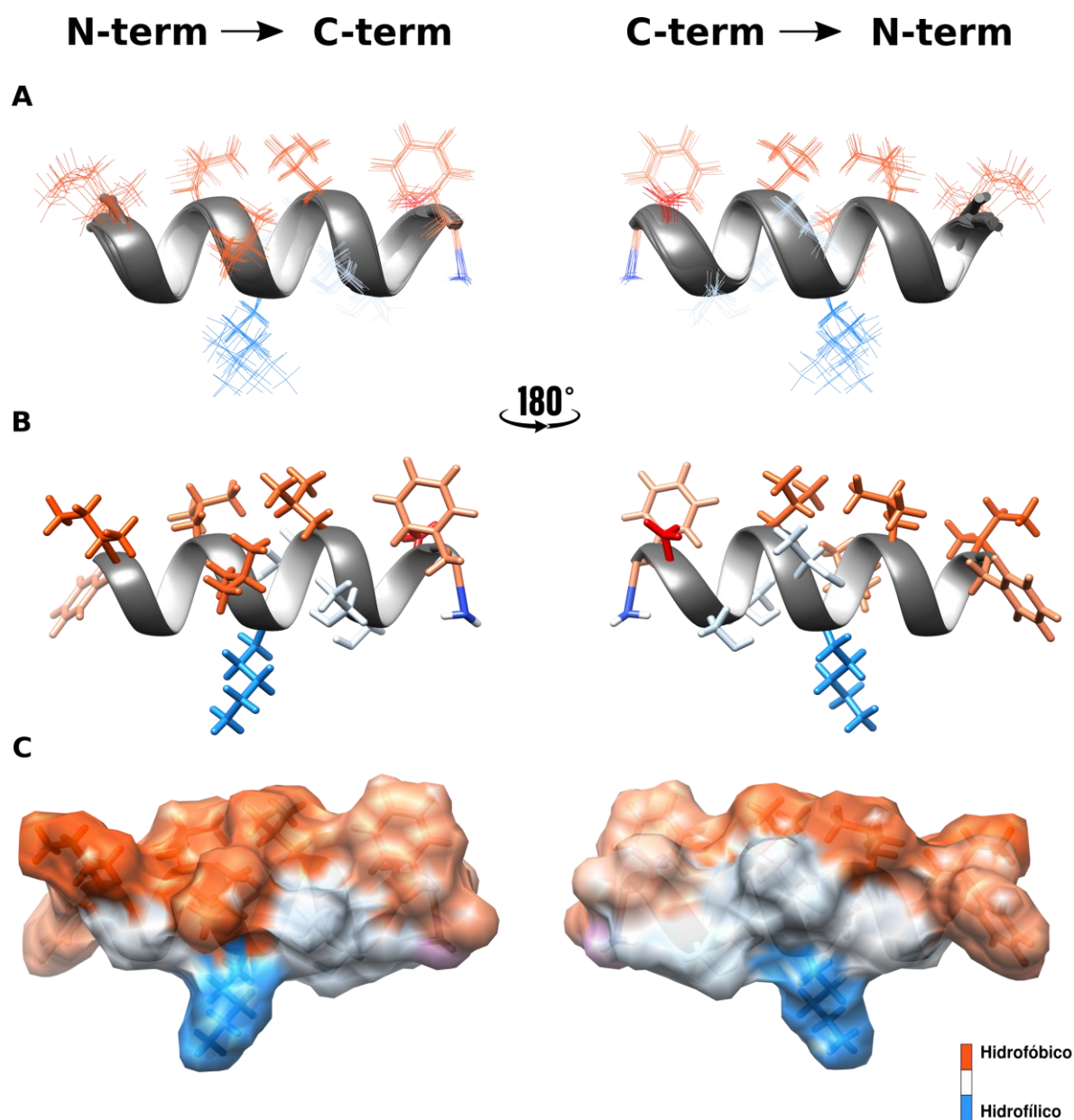


Figura 27. Estruturas 3D de L1-F12A em solução 100 mM de SDS-d₂₅.

A. As dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-F12A. **B.** Apenas a estrutura de menor energia é mostrada. **C.** Mapa de contorno de superfície da mesma cadeia peptídica em B. a extremidade C-terminal amidado (-CONH₂) apresenta cor roxa no mapa de contornos da superfície. Em A, B e C, os resíduos estão corados segundo a escala de cores de hidrofobicidade. A cadeia lateral do resíduo de aminoácido Ala-12 foi destacada em cor vermelha.

Uma vez obtidas as estruturas da L1-F12A, estas foram submetidas a análises estatísticas para avaliar a qualidade. Os resultados das análises estão resumidos na Tabela 10 e uma análise mais detalhada é mostrada na Tabela A-1 no Anexo A. Os dados da análise gráfica por Ramachandran (Tabela 10 e Figura 28), mostram que, à exceção do resíduo Ile-2, os resíduos apresentam valores de Phi e Psi característicos de estruturas com conformação em α -hélice. Ainda assim, 100% dos resíduos estão presentes em regiões permitidas, o que indica que a qualidade das estruturas calculadas por RMN em solução é ótima.

Tabela 10. Estatísticas das dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-F12A em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

RMSD (Å) - Todos os resíduos	
Cadeia principal	0,38 (\pm 0,12)
Cadeia principal e átomos pesados	0,81 (\pm 0,25)
RMSD (Å) - Segmento helicoidal	
Cadeia principal	0,17 (\pm 0,05)
Cadeia principal e átomos pesados	0,36 (\pm 0,09)
Análise gráfica por Ramachandran %	
Resíduos em região favorecidas	88,9
Resíduos em regiões permitidas	11,1
Resíduos em regiões menos permitidas	0
Resíduos em regiões não permitidas	0

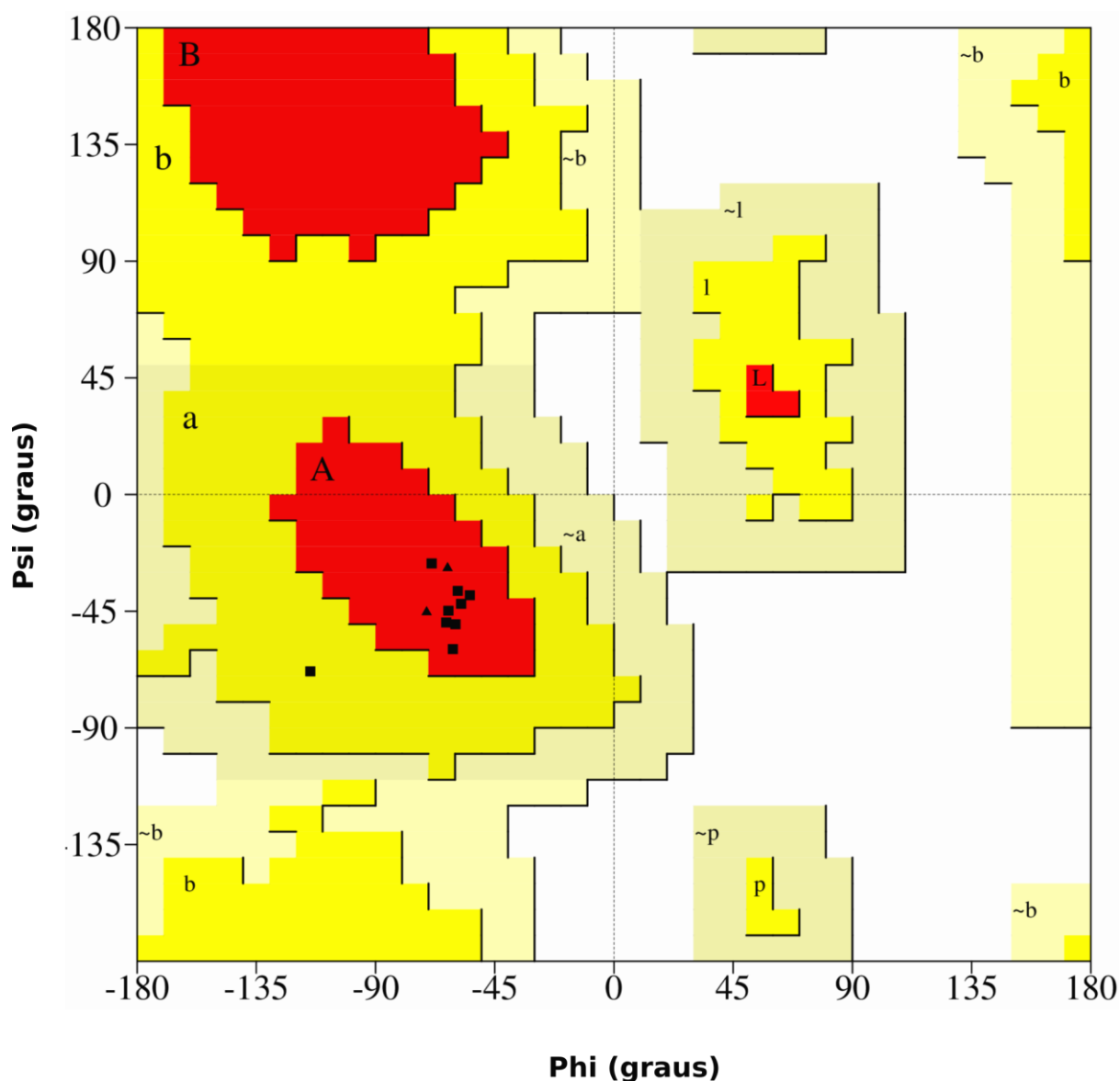


Figura 28. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis do peptídeo L1-F12A em solução 100 mM de SDS- d_{25} .

As áreas em vermelho indicam conformações sem impedimento estérico, também chamadas de regiões favorecidas. As regiões mais favorecidas para as conformações em α -hélice e folha- β estão indicadas com as letras A e B, respectivamente. As regiões em amarelo escuro correspondem a conformações menos estáveis, com aproximação de átomos, as regiões em amarelo claro indicam estruturas pouco flexíveis e as áreas em branco indicam regiões proibidas com ocorrência de impedimentos estereoquímicos. Os resíduos de glicina estão representados como triângulos.

Do ponto de vista do desenho racional de novos peptídeos antimicrobianos, o análogo L1-F12A se destaca por apresentar uma conformação em α -hélice altamente estruturada e anfipática, características cruciais para potencializar a atividade biológica, como a indução de formação de poros. Esses atributos têm uma relevância significativa na busca por agentes antimicrobianos mais eficazes e menos suscetíveis à resistência. Estes tipos de peptídeos tendem a ter uma maior eficácia na perturbação da integridade da membrana dos alvos, o que pode resultar em uma atividade aprimorada.

A possível estabilidade do peptídeo pode também permitir que este seja menos suscetível ao desenvolvimento de resistência quando no contexto de ação em microrganismos, uma vez que a perturbação da membrana é uma estratégia de ação menos suscetível à evolução de resistência. Isto pode abrir portas para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos com potencial para aplicações médicas e terapêuticas

O análogo L1-F12A é relevante no desenho racional de novos peptídeos antimicrobianos, pois fornece informações valiosas sobre as características estruturais e funcionais muitas vezes desejáveis para a atividade antimicrobiana. Além disso, quando falamos de especificidade aprimorada, podemos hipotetizar que haja um encaixe de forma mais precisa em alvos específicos na membrana dos alvos.

5.4.5 O peptídeo L1-G4A em solução de TFE- d_2 :tampão (mistura 40:60) mantém a anfipaticidade e um segmento de hélice definido.

O peptídeo análogo à L1, L1-G4A, apresenta a troca do resíduo Gly-4 por Ala. Por meio do assinalamento sequencial foram estabelecidas as correlações intra-residuais e atribuídas à sequência para o peptídeo L1-G4A como mostrado na Figura 29.

Com exceção do primeiro resíduo Phe, as correlações intra-residuais $H_N H_\alpha$ foram encontradas para todos os outros doze resíduos. Os sinais de ressonância não sobrepostos e a presença da maioria dos sinais de correlação intra-residuais para cada resíduo do peptídeo facilitou a atribuição das correlações. À diferença dos espectros TOCSY dos peptídeos analisados em meio micelar de SDS, para o peptídeo L1-G4A em TFE, foram obtidas todas as correlações intra-residuais dos sistemas de *spins* dos resíduos leucinas; Leu-5, Leu-6 e Leu-9, como também da isoleucina Ile-2.

A presença dos H_ϵ e H_ζ da amina primária da cadeia lateral da Lys ajudou na identificação e diferenciação do sistema de *spins* da Lys dos outros resíduos, principalmente da Ile-2, dado que os dois resíduos apresentaram sobreposição no δ do H_N (8,24). Entretanto, ainda quando os hidrogênios das cadeias laterais H_β e H_γ apresentam valores de δ muito próximos para esses dois resíduos, os sinais de correlação $H_N H_\beta$ e $H_N H_\gamma$ não se encontram sobrepostos. Os resíduos Phe, Phe-12 e Phe-13, tiveram suas correlações $H_N H_\beta$ identificadas, caracterizadas pelos δ do H_β que com exceção do H_ϵ da lisina, são os únicos que apresentam um δ na faixa do 2,8-3,4. As treoninas Thr-8 e Thr-10, tiveram as três correlações intra-residuais $H_N H_\alpha$, $H_N H_\beta$ e $H_N H_\gamma$ identificadas. Todavia, as correlações $H_N H_\gamma$ para os resíduos de Thr apresentam δ próximos às correlações $H_N H_\gamma$ da Ile-2 (δ 1,2 - 1,4), porém, o fato dos sinais se encontrarem dispersos e a ausência de sobreposição, facilitou a identificação do sistema de *spins* das Thr, como também sua distinção com os resíduos Ala-4 e Gly-3, ao serem sistemas de *spins* com um menor número de correlações intra-residuais.

De um modo geral, à exceção da Phe-1, foram observadas as correlações intra-residuais dos hidrogênios das cadeias laterais: H_β , H_γ , H_δ , H_ϵ , H_ζ e H_η com seus respectivos hidrogênios amídicos ($H_N H_X$) para todos os resíduos no espectro TOCSY, para o peptídeo L1-G4A analisado em meio hidrofóbico de TFE.

Junto com os experimentos TOCSY e NOESY, foram feitos experimentos de ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{15}N HSQC. Na Figura 30 e 31 são mostrados os assinalamentos das correlações intra-residuais entre o H_α e o carbono α (C_α), ($\text{H}_\alpha\text{C}_\alpha$), para os treze resíduos do peptídeo L1-G4A. Nos espectros, é observado que o C_α da Gly-3, é o C_α com o menor δ (45 ± 3 ppm). Por outro lado, a maioria dos resíduos apresentara valores de δ de C_α na faixa dos 50 - 62 ppm. No espectro HSQC de carbono, houve uma sobreposição das correlações $\text{H}_\alpha\text{C}_\alpha$, para os resíduos Leu-5 e Leu-9. Por meio dos assinalamentos das correlações intra-residuais dos outros carbonos ligados a seus respectivos hidrogênios (H_xC_x), foi possível assinalar e diferenciar os H_β dos H_γ , para os três resíduos de leucina; Leu-5, Leu-6 e Leu-9, para o peptídeo L1-G4A.

Por meio do experimento ^1H - ^{15}N HSQC, foram identificadas as correlações entre os nitrogênios (N) e os respectivos H_N dos resíduos Ile-2 até Phe-13, para o peptídeo L1-G4A, como observado na Figura 32. No espectro, também são mostrados os assinalamentos para o nitrogênio e os hidrogênios da extremidade C_T amidado do peptídeo, correspondentes às correlações NH_T com os valores de δ menores (105 ppm). Esses assinalamentos são importantes para diferenciar os H_δ , H_ϵ e H_ζ da cadeia lateral dos anéis aromáticos das fenilalaninas: Phe-1, Phe-12 e Phe-13, dos hidrogênios terminais (H_T) da extremidade C_T amidado.

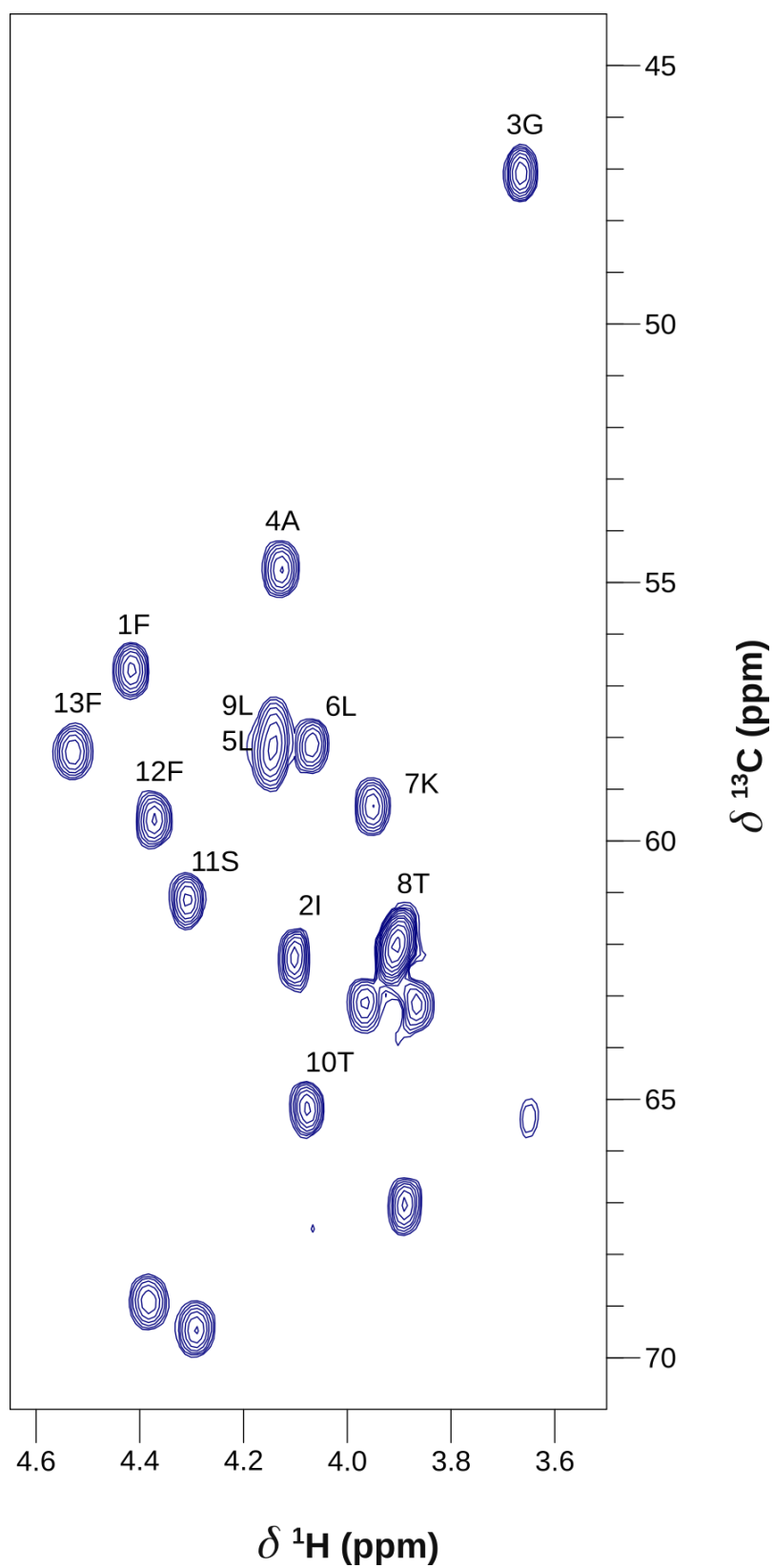


Figura 30. Mapa de contornos ^1H - ^{13}C HSQC de L1-G4A em solução de TFE- d_2 :tampão (mistura 40:60).

Mapa de contornos ^1H - ^{13}C HSQC mostrando a região de interação entre os H_α e os C_α .

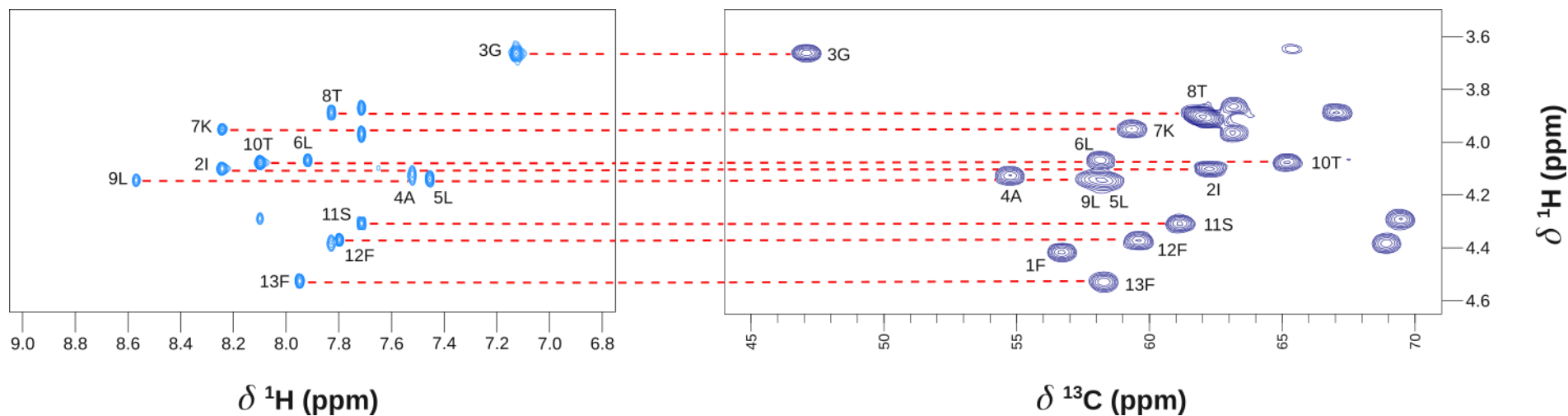


Figura 31. Mapa de contornos TOCSY e ¹H-¹³C HSQC de L1-G4A em solução de TFE-*d*₂:tampão (mistura 40:60).

A esquerda, o espectro TOCSY mostrando a região de interação H_NH_α, a direita o espectro ¹H-¹³C HSQC mostrando a região de interação entre os H_αC_α. A conexão das informações obtidas nos dois experimentos é mostrada pelas linhas pontuadas que conectam os respectivos sinais de ressonância nos dois espectros.

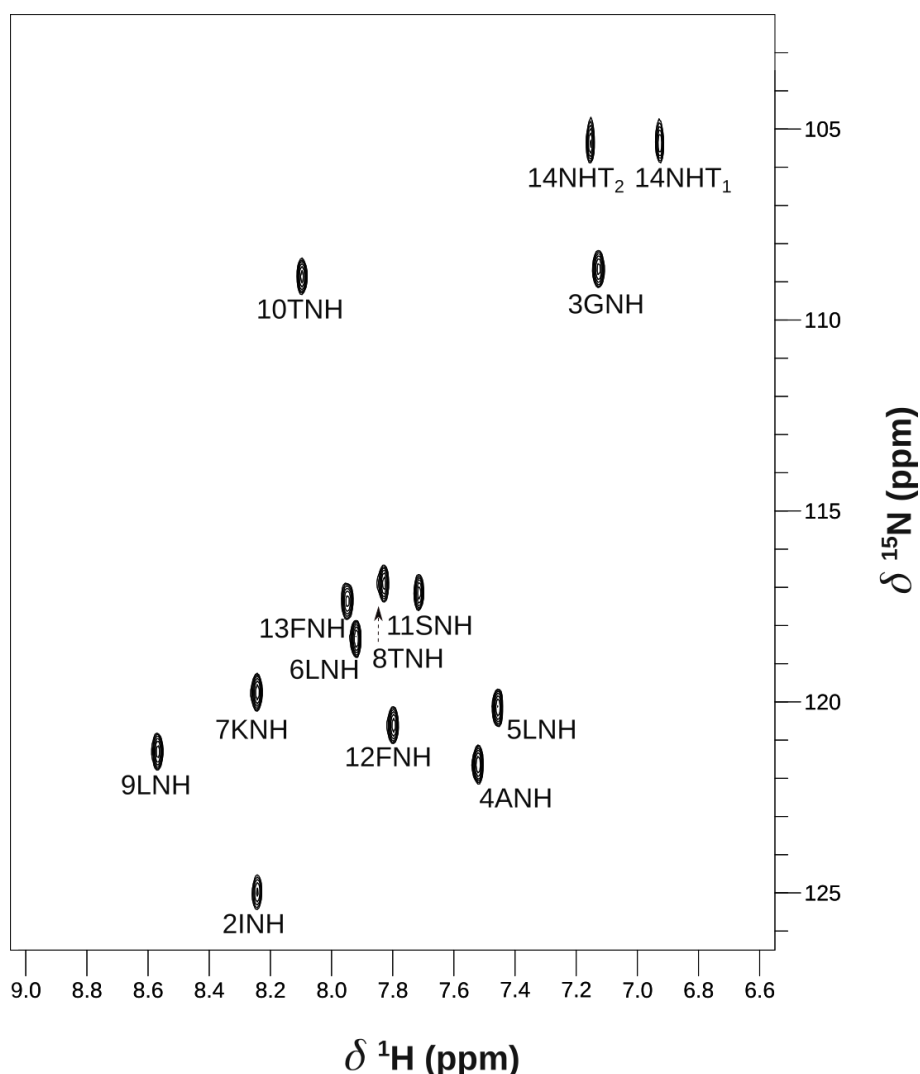


Figura 32. Mapa de contornos ^1H - ^{15}N HSQC de L1-G4A em solução de TFE- d_2 :tampão (mistura 40:60).

O espectro ^1H - ^{15}N HSQC mostrando a região de interação N-H amídicos.

As correlações inter-residuais sequenciais e não sequenciais para o peptídeo L1-G4A em TFE, são mostradas na Figura 33. Como falado anteriormente, os únicos resíduos que apresentaram uma sobreposição no δ do H_N foram a Ile-2/Lys-7, com tudo, a ausência de NOE entre estes resíduos, afastados por outros cinco resíduos, não refletiu nas conexões sequenciais e de média distância para estes resíduos. Os únicos resíduos sequenciais que apresentaram um δ do H_α muito próximo, foram a Ala-4 e Leu-5 (diferença de δ : 0,01). Entretanto, conexões sequenciais $d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$ foram determinadas para todo o peptídeo, todavia sem identificar a correlação intra-residual $\text{H}_\text{N}\text{H}_\alpha$ para o resíduo Phe-1. As conexões sequenciais $d_{\text{NN}}(i,i+1)$ para o peptídeo L1-G4A foram identificadas para os resíduos Ile-2 até a Phe-13. Semelhante às

conexões $d_{\alpha N}(i,i+1)$, conexões sequenciais $d_{\beta N}(i,i+1)$ foram determinadas para todo o peptídeo à exceção da Gly-3, resíduo que não apresenta H_{β} .

Embora os resíduos de Leu-6 e Thr-10 tenham diferentes δ para seus H_N , apresentaram o mesmo δ para o H_{α} , dessa forma impedindo a conexão do tipo $d_{\alpha N}(i,i+4)$ entre eles. Correlações de média distância do tipo $d_{\alpha N}(i,i+3)$ e $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$, foram observadas para a maioria dos resíduos do peptídeo, desde o resíduo Ile-2 até a extremidade C_T . A ausência da correlação $d_{\alpha N}(i,i+3)$ para o resíduo Thr-8 deve-se a sobreposição do δ do H_{α} da Thr-8 e os H_{β} da Ser-11. Interações de maior distância $d_{\alpha N}(i,i+4)$ foram observadas para duas regiões do peptídeo; com os resíduos Gly-3/Lys-7 e Leu-9/Phe-13.

As conexões não sequenciais presentes ao longo de toda a cadeia peptídica sugerem que o peptídeo L1-G4A apresenta um arranjo helicoidal bem definido para a maioria do peptídeo. As interações de média distância $d_{\alpha N}(i,i+2)$ foram observadas para alguns resíduos, a partir do resíduo Gly-3 até a extremidade C_T , sugerindo possíveis torções nessas regiões da cadeia peptídica.

Os deslocamentos químicos dos núcleos de 1H e ^{13}C obtidos para o peptídeo L1-G4A, estão listados na Tabela 11. Como citado anteriormente, a Phe-1 foi o único resíduo de aminoácido cuja correlação do $H_N H_{\alpha}$ no espectro TOCSY e NOESY não foi identificada. Os valores obtidos e registrados na Tabela 11 são compatíveis com valores de deslocamento químico para núcleos atômicos de resíduos de aminoácidos em estruturas com conformação α -hélice.

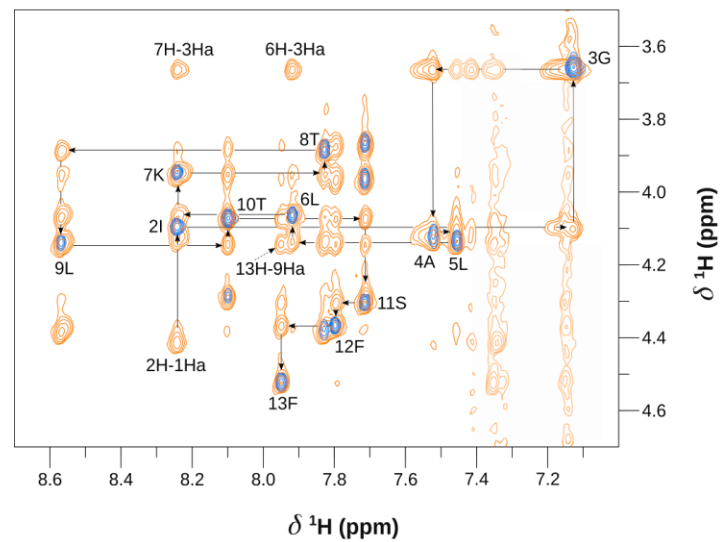
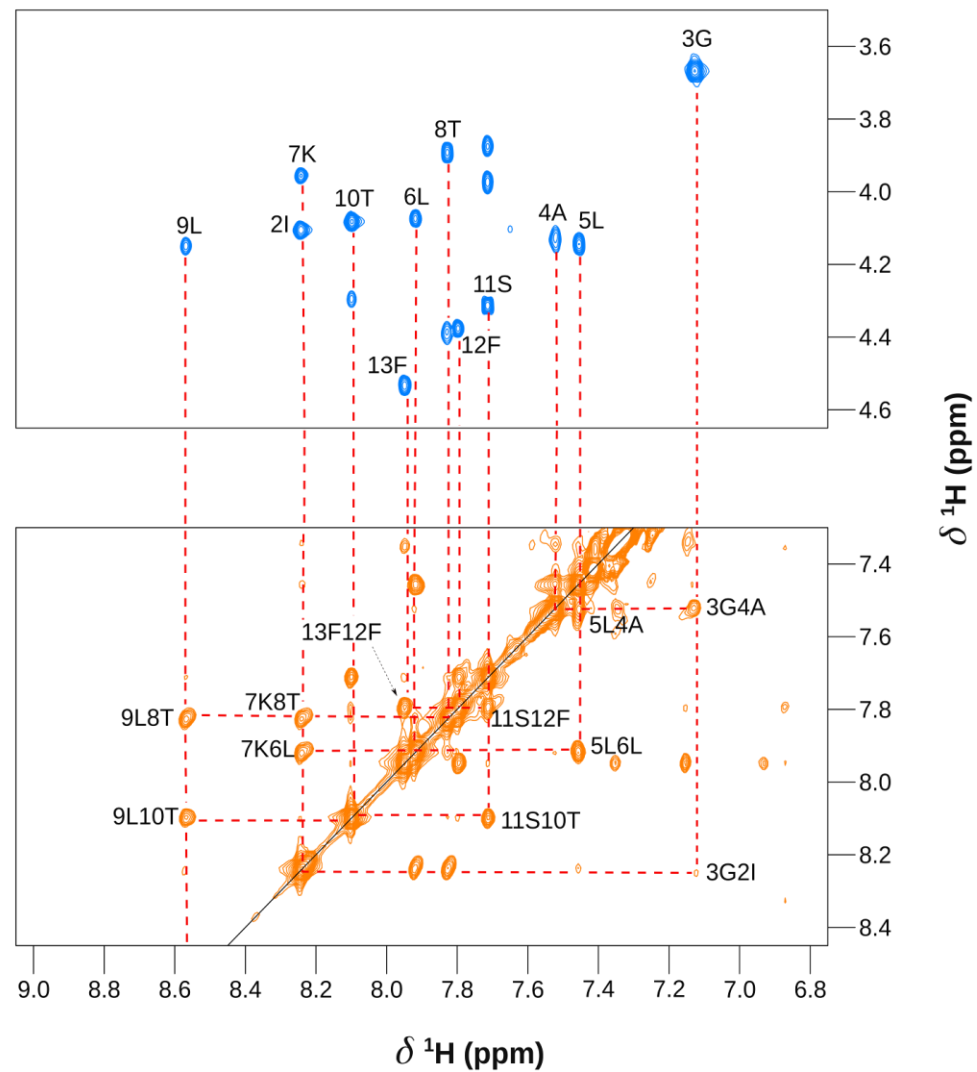
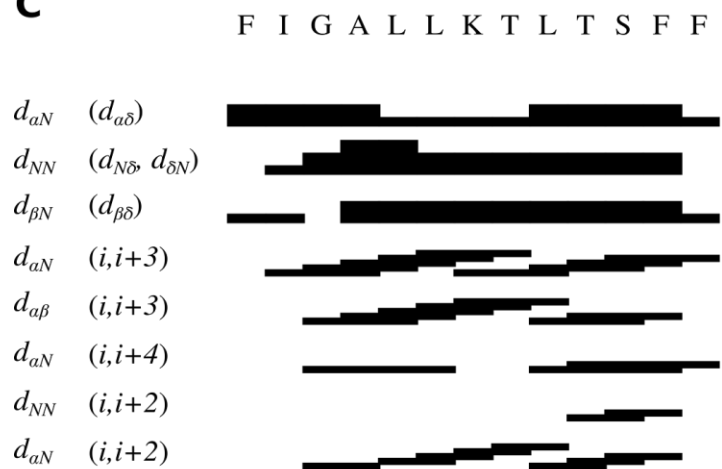
A**B****C**

Figura 33. Correlações inter-residuais do peptídeo L1-G4A em solução de TFE- d_2 :tampão (mistura 40:60).

A. Expansão dos mapas de contornos TOCSY e NOESY sobrepostos, na região de interação H_N e H_α , mostrando as conexões $d_{\alpha N}(i,i+1)$. **B.** Expansão dos mapas de contornos TOCSY na região de interação H_N e H_α e NOESY na região de interação H_N mostrando as conectividades entre H_N $d_{NN}(i,i+1)$. A conexão das informações obtidas nos dois experimentos, é mostrada pelas linhas pontuadas que conectam os respectivos sinais de ressonância nos dois espectros. **C.** Diagrama de conectividade de NOEs para o peptídeo L1-G4A. O diagrama mostra as interações sequenciais $d_{\alpha N}$, $d_{\beta N}$ e $d_{NN}(i,i+1)$, como também as interações de maior distância $(i,i+2)$, $(i,i+3)$ e $(i,i+4)$, observados no experimento NOESY. A intensidade das interações está indicada pela espessura das linhas.

Tabela 11. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono obtidos dos espectros NOESY e ^1H - ^{13}C HSQC do peptídeo L1-G4A em solução de TFE- d_2 :tampão (mistura 40:60).

Resíduo	H _N	H _α	C _α	H _β	C _β	H (γδεζ)	C (γδεζ)
1 Phe	-	4,42	56,72	3,18;3,37	39,50	δ=7,42 ε=7,35	δ=131,86 ε=130,82
2 Ile	8,24	4,11	62,26	1,85	38,53	γ ₁ =1,17;1,38 γ ₂ =0,88 δ=0,85	γ ₁ =27,68 γ ₂ =16,99 δ=12,62
3 Gly	7,13	3,67	47,08	-	-	-	-
4 Ala	7,52	4,13	54,79	1,46	18,02	-	-
5 Leu	7,46	4,14	58,20	1,85	41,75	γ=1,59 δ=0,88;0,92	γ=27,07 δ=22,02;22,92
6 Leu	7,92	4,07	58,15	1,58;1,75	41,29	γ=1,71 δ=0,83;0,86	γ=26,84 δ=22,21;22,32
7 Lys	8,24	3,96	59,37	1,92	32,06	γ=1,44;1,48 δ=1,64;1,68 ε=2,93 ζ=7,54	γ=24,83 δ=28,90 ε=42,10
8 Thr	7,83	3,89		4,39	68,90	γ=1,19	-
9 Leu	8,57	4,15	57,83	1,61;1,92	42,04	γ=1,86 δ=0,87	γ=26,71 δ=24,28
10 Thr	8,10	4,08	65,18	4,30	69,49	γ=1,33	γ=21,12
11 Ser	7,71	4,31	61,15	3,88;3,97	63,13	-	-
12 Phe	7,80	4,38	59,62	2,80;2,91	39,37	δ=6,88 ε=7,15 ζ=7,36	δ=131,33 ε=130,84 ζ=130,68
13 Phe	7,95	4,53	58,29	2,97;3,30	39,40	δ=7,35 ε=7,33 ζ=7,25	δ=131,77 ε=131,10 ζ=129,53
14 NH₂	6,93;7,15	-	-	-	-	-	-

Após ter feito os assinalamentos das ressonâncias nos espectros de TOCSY, NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{15}N HSQC, as correlações de NOEs obtidas foram convertidas em listas de restrições de distâncias, e os valores de deslocamentos químicos dos átomos de H_α , H_β , C_α e C_β utilizados para determinar os ângulos diedros da cadeia principal do peptídeo. Desta forma, foram obtidos os dados de restrições estruturais utilizados para o cálculo das estruturas tridimensionais do peptídeo analisado em meio TFE.

As estruturas tridimensionais da L1-G4A são mostradas na Figura 34. As dez estruturas de menor energia foram sobrepostas. Como pode ser observado, as moléculas de L1-G4A apresentam um segmento de hélice bem definido desde o resíduo Ala-4 até a região C_T . À exceção dos anéis aromáticos dos resíduos Phe-1 e Phe-13, as cadeias laterais dos outros doze resíduos se encontram bem sobrepostas. Deve-se destacar que o peptídeo apresenta um grau elevado de anfipaticidade, com os resíduos das cadeias laterais hidrofóbicos orientados em uma face e na face oposta os resíduos das cadeias laterais hidrofílicas, à exceção da Phe-1.

A confirmação de que o análogo L1-G4A adota uma estrutura tridimensional com um segmento de hélice bem definido desde o resíduo Ala-4 até a região C-terminal é muito importante quando tratamos do desenho racional de novos peptídeos. Além disso, destaca-se o alto grau de anfipaticidade, onde os resíduos com cadeias laterais hidrofóbicas estão orientados em uma face, enquanto os resíduos com cadeias laterais hidrofílicas estão na face oposta, com exceção da Phe-1. Esses resultados fornecem informações valiosas sobre as propriedades estruturais deste análogo L1-G4A em meio TFE.

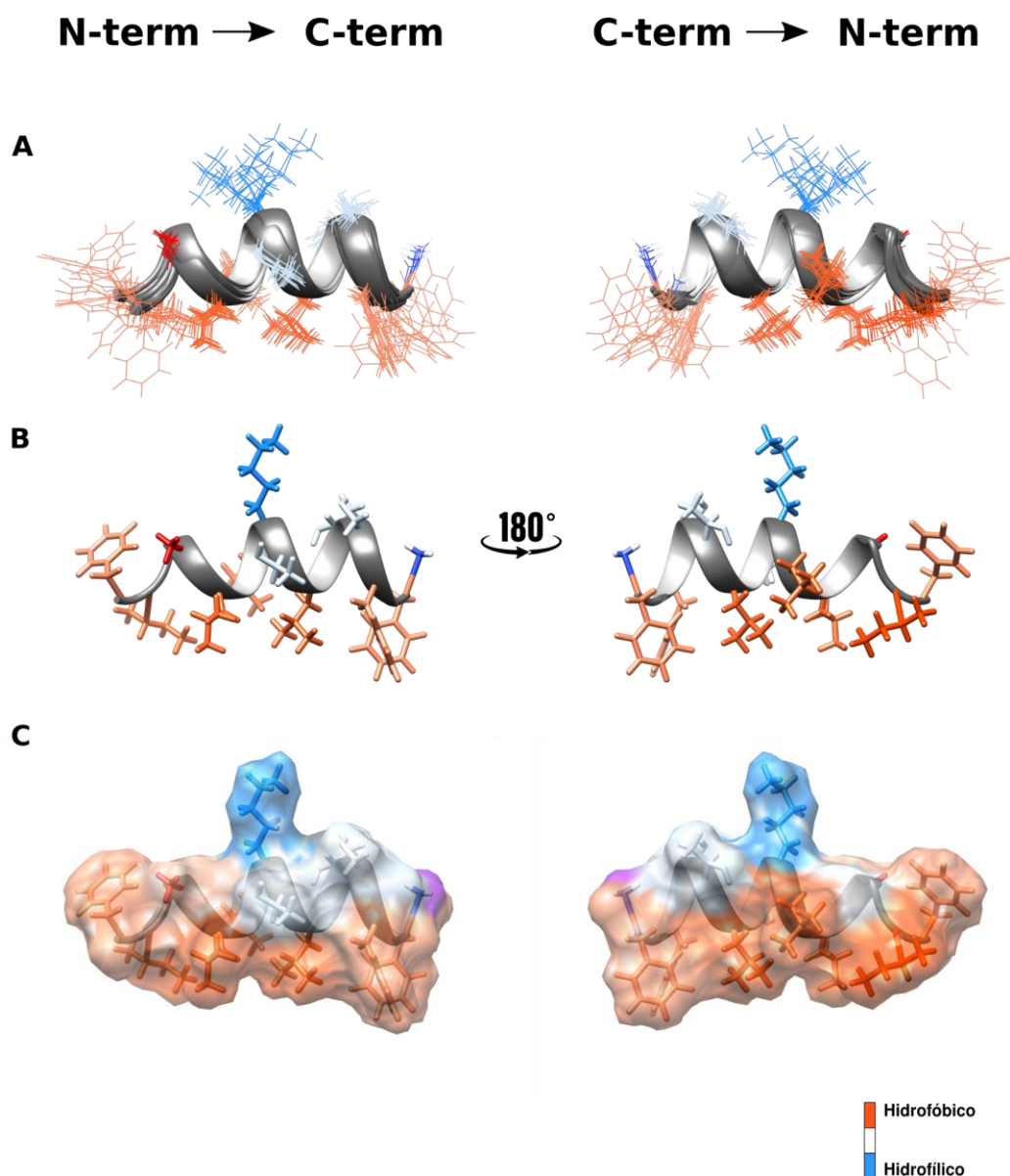


Figura 34. Estruturas 3D de L1-G4A em TFE:tampão (mistura 40:60).

A. As dez estruturas de menores energias para o peptídeo. **B.** Apenas uma das dez estruturas é mostrada. **C.** Mapa de contorno de superfície da mesma cadeia peptídica em B, mostrando a presença de uma molécula anfifílica com um lado formado por aminoácidos hidrofóbicos e o outro lado por aminoácidos polares. A cadeia lateral do resíduo de aminoácido Ala-4 foi destacada em cor vermelha.

Estas estruturas de L1-G4A foram submetidas à análise estatística. Os resultados da análise estão resumidos na Tabela 12 e uma análise mais detalhada é mostrada na Tabela A-2 no Anexo A. Os valores de RMSD obtidos para o conjunto de todos os resíduos (0,64 Å), assim como para o segmento helicoidal (0,12 Å), indicam que para as dez estruturas de menor energia a conformação predominante em α -hélice e a disposição no espaço para as cadeias laterais dos resíduos é quase a mesma. Junto com esses dados, é possível acompanhar a qualidade das estruturas obtidas por meio do gráfico de Ramachandran apresentado na Figura 35. Os dados da análise gráfica por Ramachandran (Tabela 12 e Figura 35) mostram que todos os resíduos encontram-se em regiões favorecidas ou permitidas, indicando uma excelente qualidade das estruturas calculadas por RMN em solução.

Tabela 12. Estatísticas das dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-G4A em solução de TFE- d_2 :tampão (mistura 40:60).

RMSD (Å) - Todos os resíduos	
Cadeia principal	0,64 (\pm 0,22)
Cadeia principal e átomos pesados	1,30 (\pm 0,28)
RMSD (Å) - Segmento helicoidal	
Cadeia principal	0,12 (\pm 0,05)
Cadeia principal e átomos pesados	0,71 (\pm 0,11)
Análise gráfica por Ramachandran %	
Resíduos em região favorecidas	100
Resíduos em regiões permitidas	0
Resíduos em regiões menos permitidas	0
Resíduos em regiões não permitidas	0

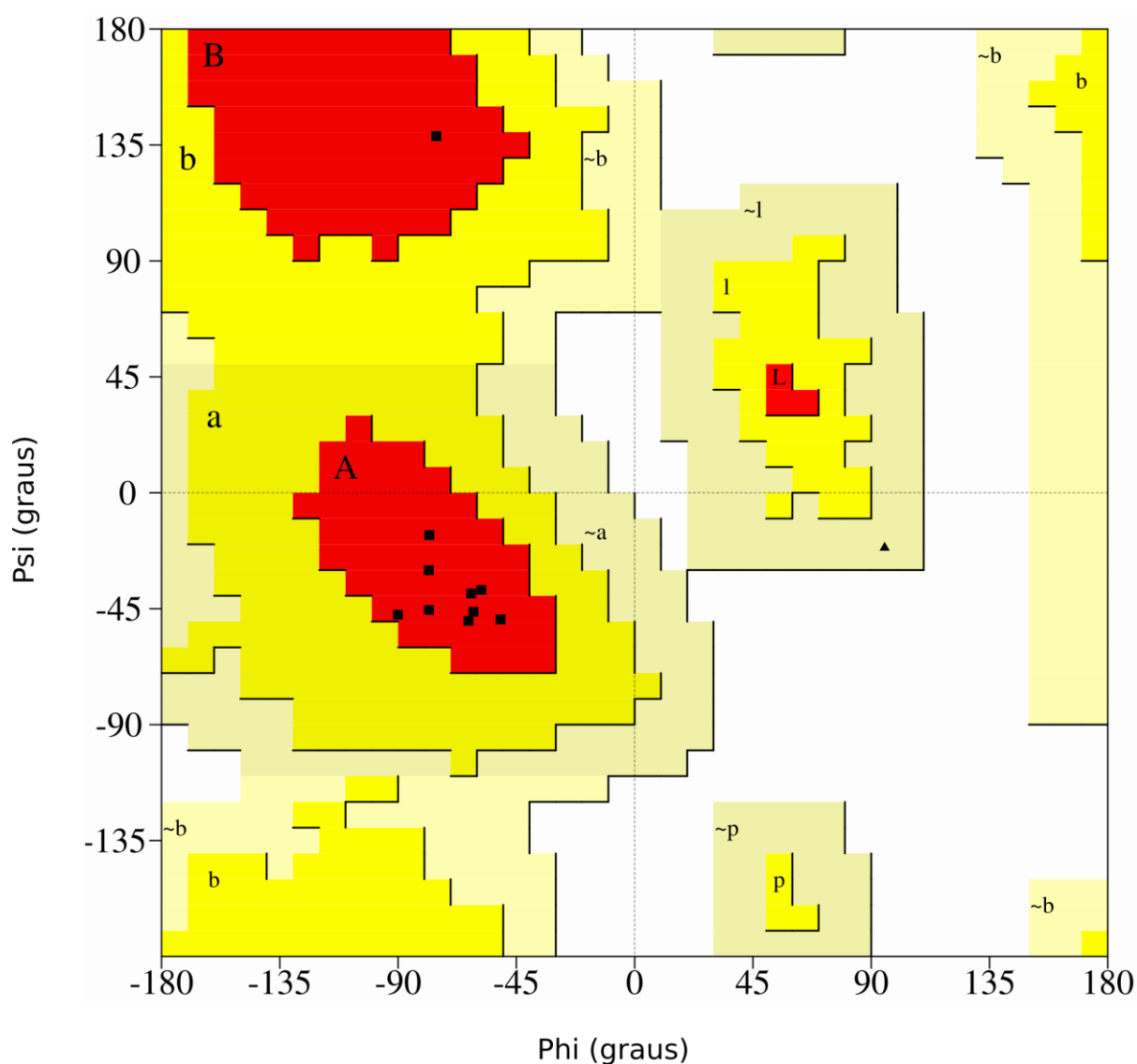


Figura 35. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis de L1-G4A em TFE:tampão (mistura 40:60).

As áreas em vermelho indicam conformações sem impedimento estérico, também chamadas de regiões favorecidas. As regiões mais favorecidas para as conformações em α -hélice e folha- β estão indicadas com as letras A e B, respectivamente. As regiões em amarelo escuro correspondem a conformações menos estáveis, com aproximação de átomos, as regiões em amarelo claro indicam estruturas pouco flexíveis e as áreas em branco indicam regiões proibidas com ocorrência de impedimentos estereoquímicos. Os resíduos de glicina estão representados como triângulos.

5.4.6 O peptídeo L1-F12A em solução de TFE- d_2 :tampão (mistura 40:60) apresenta uma estrutura tridimensional em α -hélice com uma única conformação predominante

O peptídeo análogo à L1, L1-F12A, apresenta a troca do resíduo Phe-12 por Ala. Por meio do assinalamento sequencial foram estabelecidas as correlações intra-residuais e atribuídas à sequência para o peptídeo L1-F12A como mostrado na Figura 36.

Semelhante ao peptídeo L1-G4A, analisado em TFE- d_2 , com exceção do resíduo Phe-1 foram encontradas as correlações intra-residuais $H_N H_\alpha$ para todos os outros doze resíduos para o peptídeo L1-F12A. À diferença dos espectros TOCSY dos peptídeos analisados em meio micelar de SDS, para os peptídeos L1-G4A e L1-F12A analisados em TFE, foram obtidas todas as correlações intra-residuais dos sistemas de *spins* dos resíduos leucinas Leu-5, Leu-6 e Leu-9, Ile (Ile-2), como também do resíduo Lys (Lys-7), correspondentes aos resíduos com os sistemas de *spins* que apresentam o maior número de correlações intra-residuais, dentre os resíduos que constituem a L1 e seus análogos. À exceção da Phe-1, foi possível observar as correlações intra-residuais dos hidrogênios das cadeias laterais H_β , H_γ , H_δ , H_ϵ , H_ζ e H_η , com seus respectivos H_N ($H_N H_X$), para os outros doze resíduos do peptídeo L1-F12A. No espectro TOCSY é possível observar também que, de modo diferente à L1-G4A em TFE- d_2 , os resíduos do peptídeo L1-F12A não apresentaram sobreposição no δ dos H_N , facilitando as atribuições das correlações tanto para os H_α como para o resto dos hidrogênios de cada resíduo, ainda quando alguns resíduos como Ile-2/Lys-7 (diferença de δ 0,01), Gly-4/Thr-10 e Thr-8/Ala-12 (diferenças de δ 0,02 para ambos pares), apresentaram δ de H_N muito próximos.

FIGLLKTLTSAF-NH₂

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

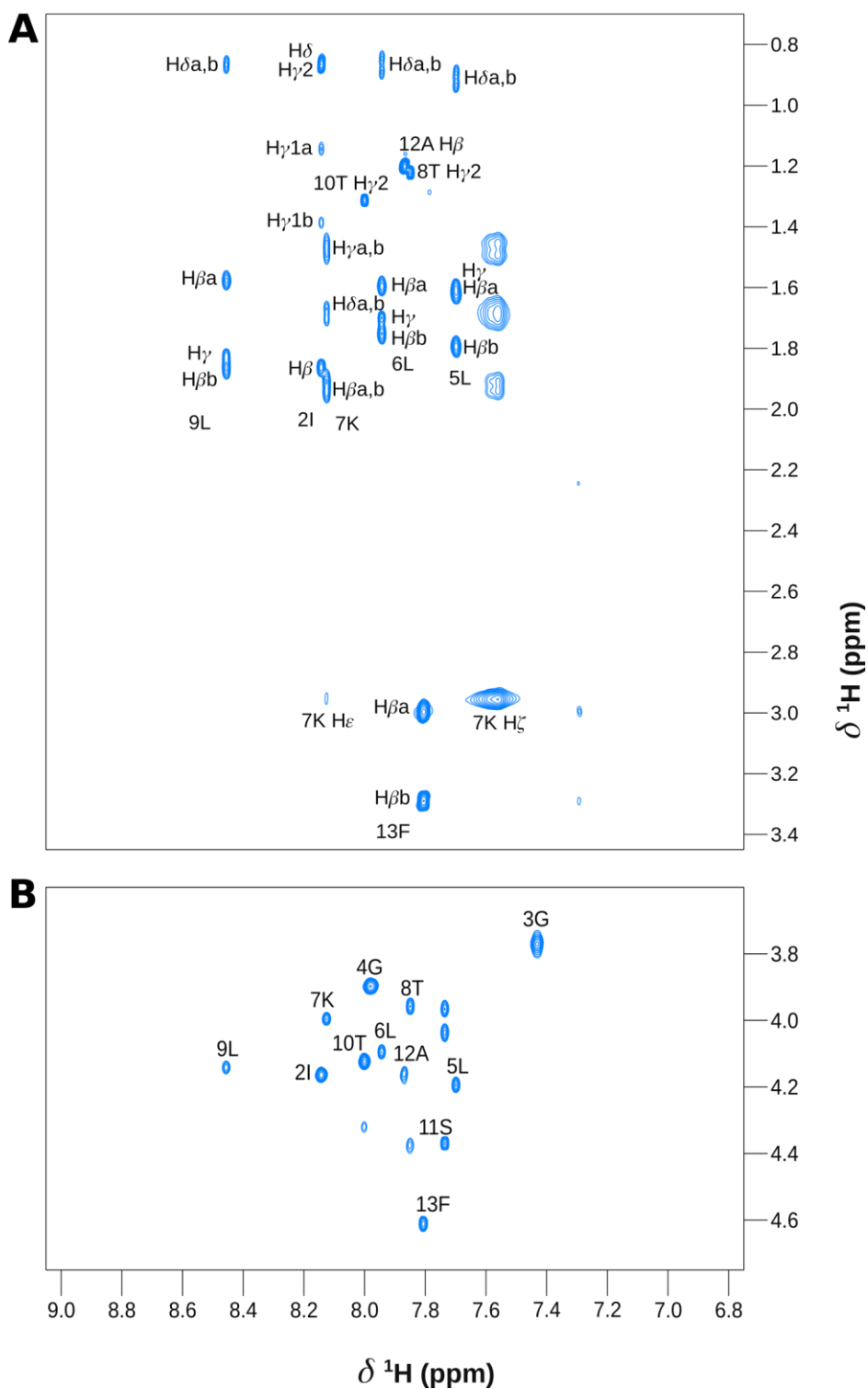


Figura 36. Mapa de contornos TOCSY parcial de L1-F12A em solução de TFE-*d*₂:tampão (mistura 40:60).

A. Região do TOCSY com os sinais de correlação intra-residuais do tipo $H_N H_X$, sendo x igual a β , γ , δ , ϵ , ζ ou η . **B.** Região do TOCSY com os sinais de correlação intra-residuais do tipo $H_N H_\alpha d_{\alpha N}(i, i+n)$.

Complementando os experimentos de TOCSY e NOESY, foram feitos os experimentos de ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{15}N HSQC para o peptídeo L1-F12A. Os assinalamentos das correlações intra-residuais $\text{H}_\alpha\text{C}_\alpha$ para os treze resíduos do peptídeo L1-F12A são mostrados nas Figuras 37 e 38. Nos espectros, é observado que os C_α dos resíduos Gly-3 e Gly-4 apresentaram os menores δ (± 47 ppm). Por outro lado, a maioria dos resíduos apresentou valores de δ de C_α na faixa dos 52 - 65 ppm. Diferente da L1-G4A, não foram observadas sobreposições das correlações $\text{H}_\alpha\text{C}_\alpha$ para nenhum dos resíduos do peptídeo L1-F12A. Apesar de os átomos de C_α das Leu-5, Leu-6 e Leu-9 apresentarem o mesmo valor de δ (± 58 ppm), as diferenças nos δ dos H_α permitiram distinguir as correlações $\text{H}_\alpha\text{C}_\alpha$ desses resíduos. Semelhante ao peptídeo L1-G4A, por meio dos assinalamentos das correlações intra-residuais dos outros carbonos ligados a seus respectivos hidrogênios ($\text{H}_\alpha\text{C}_\alpha$), foi possível assinalar e diferenciar os H_β dos H_γ para os 3 resíduos de leucina Leu-5, Leu-6 e Leu-9, para o peptídeo L1-F12A.

Por meio do experimento ^1H - ^{15}N HSQC, foram identificadas as correlações entre os N_H e os respectivos H_N dos resíduos Ile-2 à Phe-13 para o peptídeo L1-F12A, como observado na Figura 39. De forma semelhante à L1-G4A, para a L1-F12A também foram determinadas as correlações dos NH_T da extremidade C_T amidado do peptídeo, com os valores de δ menores (± 105 ppm). Como citado anteriormente, esses assinalamentos são importantes para diferenciar os H_δ , H_ϵ e H_ζ das cadeias laterais do anel aromático das fenilalaninas dos H_T da extremidade C_T amidada.

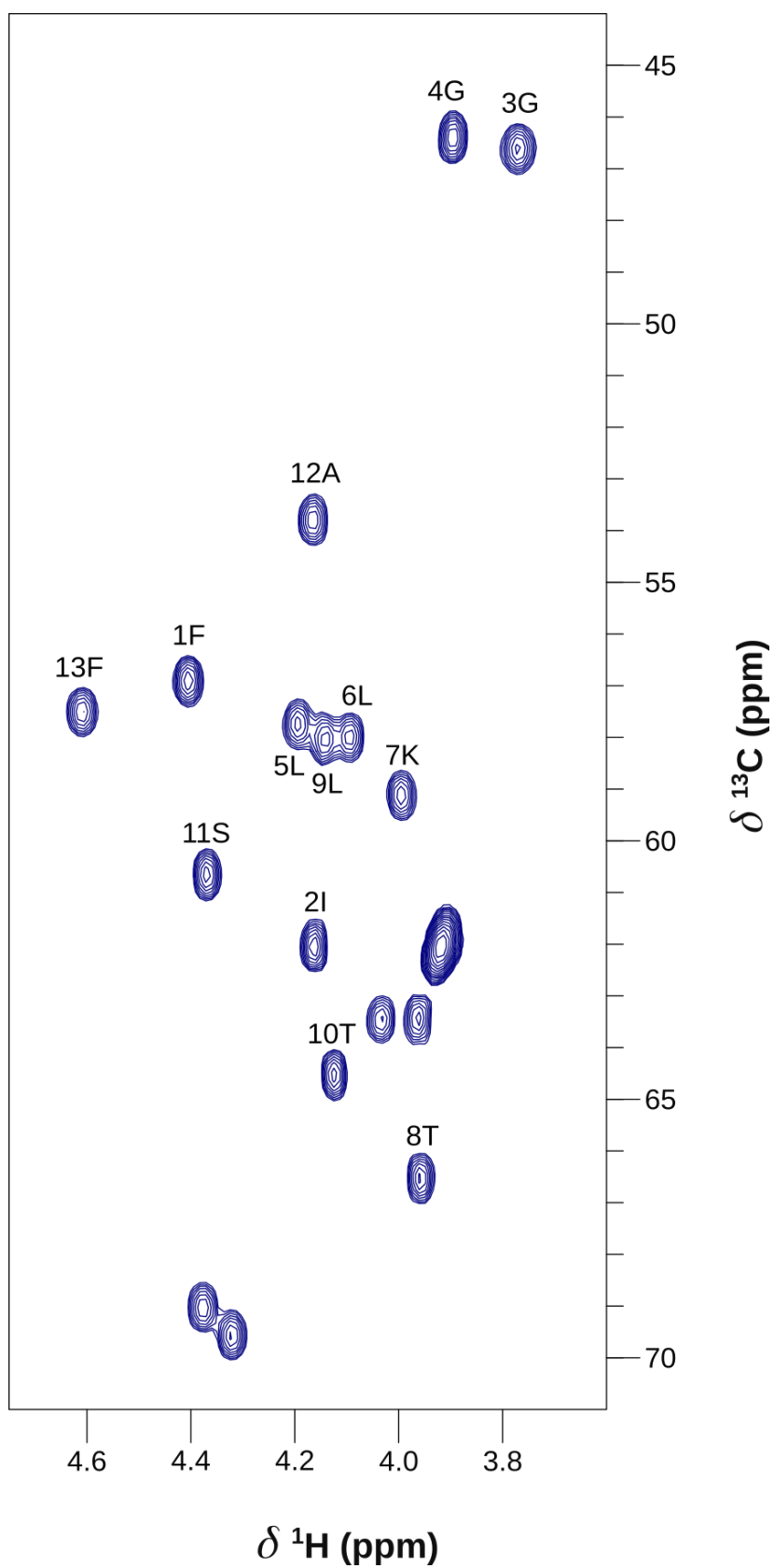


Figura 37. Mapa de contornos ^1H - ^{13}C HSQC de L1-F12A em solução de TFE- d_2 :tampão (mistura 40:60).

Mapa de contornos ^1H - ^{13}C HSQC mostrando a região de interação entre os $\text{H}_\alpha\text{C}_\alpha$.

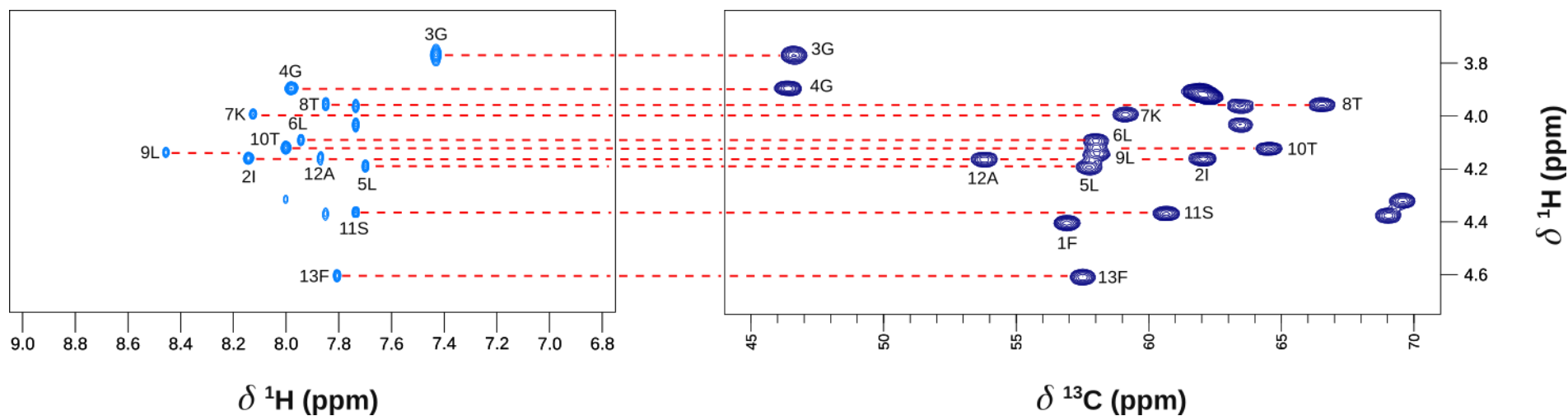


Figura 38. Mapa de contornos TOCSY e ^1H - ^{13}C HSQC de L1-F12A em solução de TFE- d_2 :tampão (mistura 40:60).

A esquerda, o espectro TOCSY mostrando a região de interação $\text{H}_\text{N}\text{H}_\alpha$, a direita o espectro ^1H - ^{13}C HSQC mostrando a região de interação entre os $\text{H}_\alpha\text{C}_\alpha$. A conexão das informações obtidas nos dois experimentos é mostrada pelas linhas pontuadas que conectam os respectivos sinais de ressonância nos dois espectros.

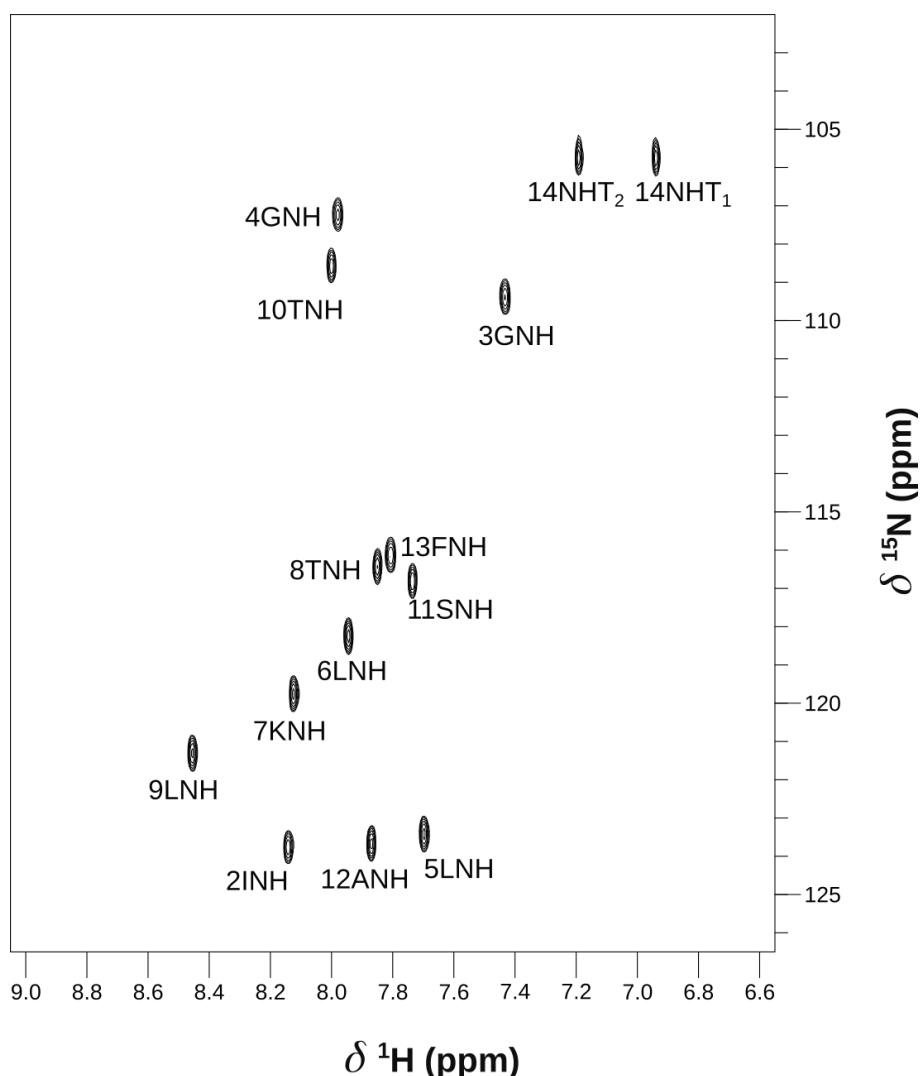


Figura 39. Mapa de contornos ^1H - ^{15}N HSQC de L1-F12A em solução de TFE- d_2 :tampão (mistura 40:60).

O espectro ^1H - ^{15}N HSQC mostrando a região de interação N-H amídicos.

As correlações inter-residuais sequenciais e não sequenciais para o peptídeo L1-F12A são mostradas na Figura 40. Como falado anteriormente, embora alguns resíduos como Ile-2/Lys-7, Gly-4/Thr-10 e Thr-8/Ala-12 apresentaram δ de H_N muito próximos (diferença de δ 0,01 - 0,02), não se apresentaram sobreposições para os H_N . Além disso, esses resíduos não são consecutivos. Assim, as conexões sequenciais $d_{\text{NN}}(i,i+1)$ para o peptídeo L1-F12A, foram identificadas entre os resíduos Ile-2 a Phe-13. Os únicos resíduos sequenciais que apresentaram um δ do H_α muito próximo foram a Leu-9 e Thr-10 (diferença de $\delta = 0,02$), por este motivo, conexões sequenciais $d_{\alpha\text{N}}(i,i+1)$ foram determinadas entre os resíduos Phe-1 a Leu-9 e Thr-10 a Phe-13. À exceção das glicinas Gly-3 e Gly-4, resíduos que não apresentam H_β , conexões

sequenciais $d_{\beta N}(i,i+1)$ foram determinadas para todo o peptídeo L1-F12A.

A sobreposição do δ do H_α da Thr-8 e os H_β da Ser-11 impediu a correlação $d_{\alpha N}(i,i+3)$ para a Thr-8, enquanto os resíduos Thr-8/Ala-12 não apresentaram a correlação $d_{\alpha N}(i,i+4)$ pelo δ dos H_N muito próximos. Como observado na Figura 40C, foram identificadas interações de média distância do tipo $d_{\alpha N}(i,i+2)$, $d_{\alpha N}(i,i+3)$, $d_{\alpha N}(i,i+4)$ e $d_{\alpha\beta}(i,i+3)$, englobando os resíduos Ile-2 até a Phe-13, o que sugere que a L1-F12A adota um arranjo estrutural helicoidal bem definido.

Os deslocamentos químicos dos núcleos de ^1H e ^{13}C obtidos para o peptídeo L1-F12A, estão listados na Tabela 13. Como citado anteriormente, a Phe-1 foi o único resíduo de aminoácido cuja correlação do $H_N H_\alpha$ no espectro TOCSY e NOESY não foi identificada. Os valores obtidos e registrados na Tabela 13, são compatíveis com valores de deslocamento químico para núcleos atômicos de resíduos de aminoácidos em estruturas com conformação α -hélice.

Figura 40. Correlações inter-residuais do peptídeo L1-F12A em solução de TFE- d_2 :tampão (mistura 40:60).

A. Expansão dos mapas de contornos TOCSY e NOESY sobrepostos, na região de interação H_N e H_α , mostrando as conexões $d_{\alpha N}(i,i+1)$. **B.** Expansão dos mapas de contornos TOCSY na região de interação H_N e H_α e NOESY na região de interação H_N mostrando as conectividades entre H_N $d_{NN}(i,i+1)$. A conexão das informações obtidas nos dois experimentos, é mostrada pelas linhas pontuadas que conectam os respectivos sinais de ressonância nos dois espectros. **C.** Diagrama de conectividade de NOEs para o peptídeo L1-F12A. O diagrama mostra as interações sequências $d_{\alpha N}$, $d_{\beta N}$ e $d_{NN}(i,i+1)$, como também as interações de maior distância $(i,i+2)$, $(i,i+3)$ e $(i,i+4)$, observados no experimento NOESY. A intensidade das interações está indicada pela espessura das linhas.

Tabela 13. Deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono obtidos dos espectros NOESY e ^1H - ^{13}C HSQC do peptídeo L1-F12A em solução de TFE- d_2 :tampão (mistura 40:60).

Resíduo	H_N	H_α	C_α	H_β	C_β	H ($\gamma\delta\varepsilon\zeta$)	C ($\gamma\delta\varepsilon\zeta$)
1 Phe	-	4,41	56,93	3,24;3,31	39,42	$\delta=7,35$ $\varepsilon=7,42$	$\delta=131,92$ $\varepsilon=131,89$
2 Ile	8,14	4,16	62,09	1,86	38,78	$\gamma_1=1,14;1,39$ $\gamma_2=0,87$ $\delta=0,86$	$\gamma_1=27,52$ $\gamma_2=16,89$ $\delta=12,58$
3 Gly	7,43	3,77	46,62	-	-	-	-
4 Gly	7,98	3,90	46,39	-	-	-	-
5 Leu	7,70	4,19	57,77	1,62;1,79	41,98	$\gamma=1,60$ $\delta=0,89;0,93$	$\gamma=27,02$ $\delta=23,13;24,13$
6 Leu	7,94	4,09	58,02	1,60;1,75	41,40	$\gamma=1,70$ $\delta=0,85;0,89$	$\gamma=26,94$ $\delta=22,46;23,76$
7 Lys	8,13	3,99	59,13	1,91;1,94	32,10	$\gamma=1,45;1,49$ $\delta=1,67;1,70$ $\varepsilon=2,95$ $\zeta=7,56$	$\gamma=24,84$ $\delta=29,05$ $\varepsilon=42,10$
8 Thr	7,85	3,96	66,56	4,38	69,10	$\gamma=1,22$	$\gamma=20,65$
9 Leu	8,46	4,14	58,04	1,58;1,86	42,17	$\gamma=1,83$ $\delta=0,87$	$\gamma=26,73$ $\delta=22,13$
10 Thr	8,0	4,12	64,64	4,32	69,58	$\gamma=1,31$	$\gamma=21,12$
11 Ser	7,74	4,37	60,67	3,96;4,04	63,45	-	-
12 Ala	7,87	4,16	53,87	1,20	18,40	-	-
13 Phe	7,81	4,61	57,49	3,0;3,29	39,38	$\varepsilon=7,29$	$\varepsilon=131,43$
14 NH₂	6,94;7,19	-	-	-	-	-	-

As dez estruturas de menor energia da L1-F12A foram sobrepostas e são mostradas na Figura 41. Como se pode observar, as moléculas de L1-F12A apresentam uma estrutura completamente organizada em α -hélice desde a extremidade N-terminal até a extremidade C-terminal. Diferentemente do peptídeo L1-G4A, que apresentou as cadeias laterais do resíduo Phe-1 mais livres, o peptídeo L1-F12A apresenta as cadeias laterais da Phe-1 mais sobrepostas. À exceção da Phe-1, todos os outros resíduos de aminoácidos hidrofóbicos apresentam as cadeias laterais orientadas em uma mesma fase e na face oposta estão as cadeias laterais dos resíduos hidrofílicos. Dessa forma, a anfipaticidade da L1-F12A pode ser reduzida quando comparada à L1-G4A, o que pode ser um fator importante que diferencia a interação com membranas desses peptídeos ou até mesmo a organização estrutural em complexos.

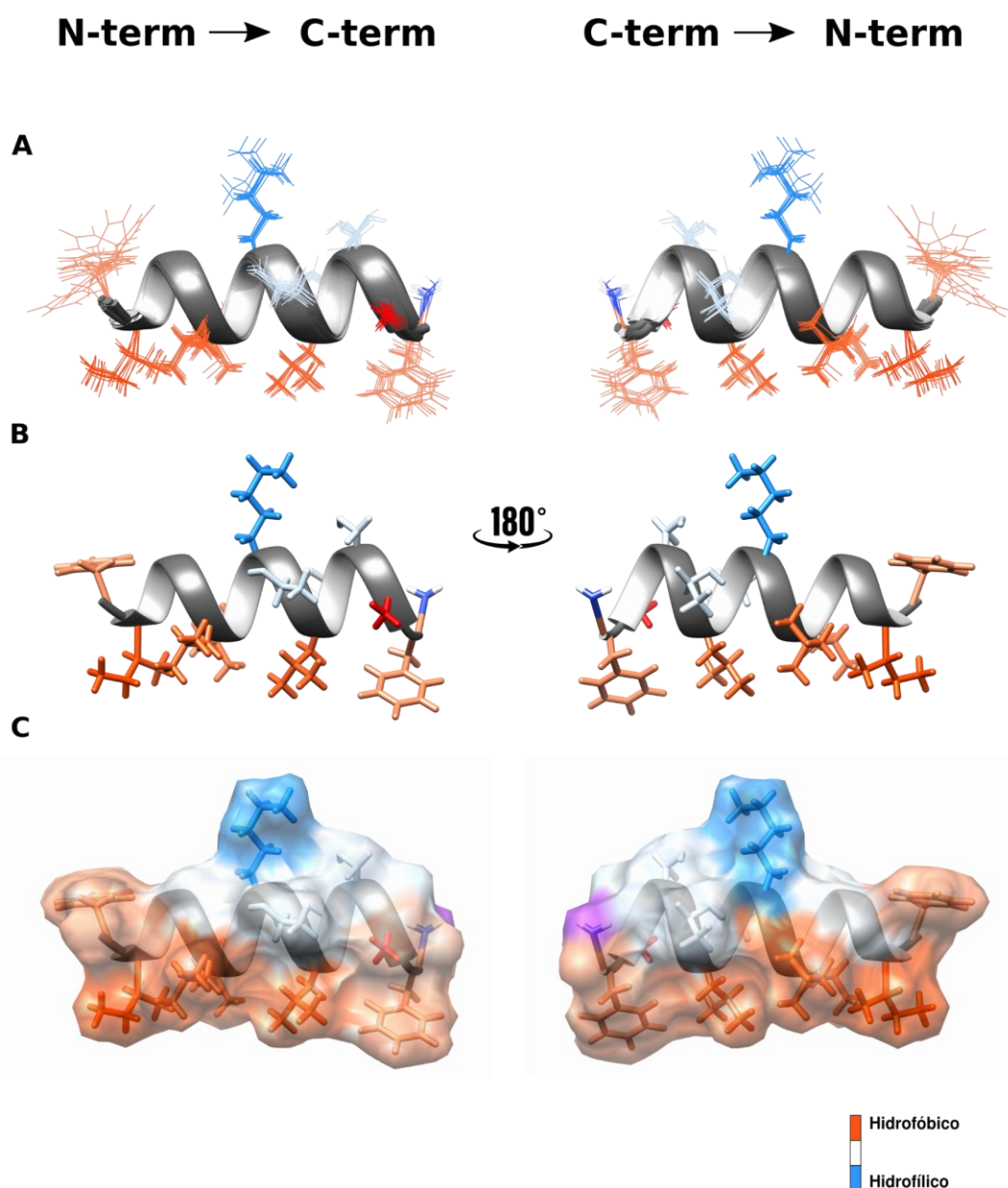


Figura 41. Estruturas 3D de L1-F12A em TFE:tampão (mistura 40:60).

A. As dez estruturas de menores energias para o peptídeo. **B.** Apenas uma das dez estruturas é mostrada. **C.** Mapa de contorno de superfície da mesma cadeia peptídica em B, mostrando a presença de uma molécula anfifílica com um lado formado por aminoácidos hidrofóbicos e o outro lado por aminoácidos polares. A cadeia lateral do resíduo de aminoácido Ala-12 foi destacada em cor vermelha.

Estas estruturas de L1-F12A foram submetidas à análise estatística. Os resultados da análise estão resumidos na Tabela 14 e uma análise mais detalhada é mostrada na Tabela A-2 no Anexo A. Os valores de RMSD obtidos para o conjunto de todos os resíduos (0,29 Å), assim como para o segmento helicoidal (0,06 Å), indicam que o peptídeo não apresenta flexibilidade conformacional. Junto com esses dados, é possível acompanhar a qualidade das estruturas obtidas por meio do gráfico de Ramachandran apresentado na Figura 36. Os dados da análise gráfica por Ramachandran (Tabela 14 e Figura 42) mostram que todos os resíduos encontram-se em regiões favorecidas indicando uma excelente qualidade das estruturas calculadas por RMN em solução.

Tabela 14. Estatísticas das dez estruturas de menor energia para o peptídeo L1-F12A em solução de TFE-*d*₂:tampão (mistura 40:60).

RMSD (Å) - Todos os resíduos	
Cadeia principal	0,29 (± 0,06)
Cadeia principal e átomos pesados	0,70 (± 0,31)
RMSD (Å) - Segmento helicoidal	
Cadeia principal	0,06 (± 0,01)
Cadeia principal e átomos pesados	0,44 (± 0,21)
Análise gráfica por Ramachandran %	
Resíduos em região favorecidas	100
Resíduos em regiões permitidas	0
Resíduos em regiões menos permitidas	0
Resíduos em regiões não permitidas	0

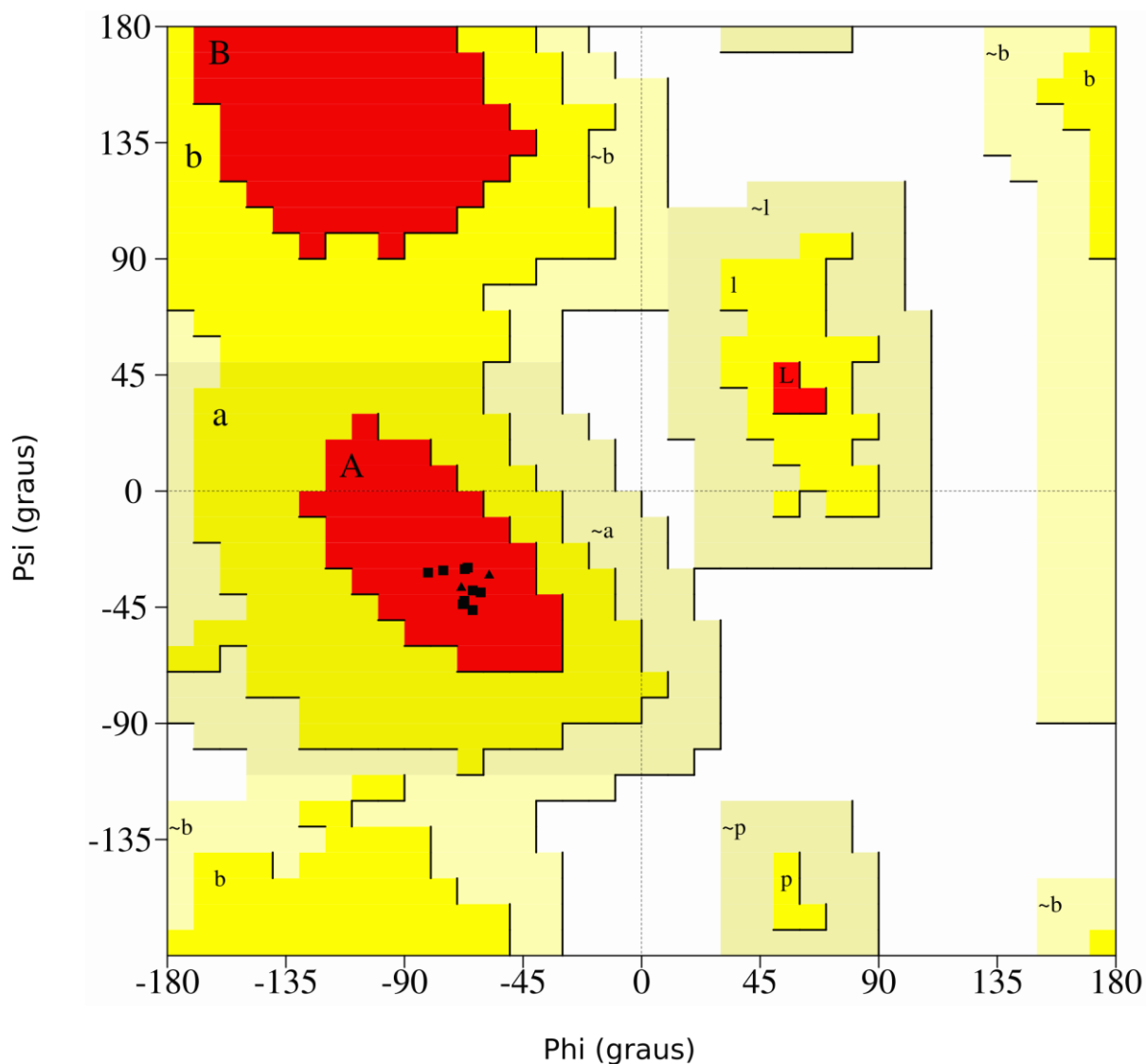


Figura 42. Diagrama de Ramachandran para as dez estruturas mais estáveis de L1-F12A em TFE:tampão (mistura 40:60).

As áreas em vermelho indicam conformações sem impedimento estérico, também chamadas de regiões favorecidas. As regiões mais favorecidas para as conformações em α -hélice e folha- β estão indicadas com as letras A e B, respectivamente. As regiões em amarelo escuro correspondem a conformações menos estáveis, com aproximação de átomos, as regiões em amarelo claro indicam estruturas pouco flexíveis e as áreas em branco indicam regiões proibidas com ocorrência de impedimentos estereoquímicos. Os resíduos de glicina estão representados como triângulos.

5.4.7 A importância dos resíduos fenilalanina na atividade e na estrutura tridimensional das Lunatinas: Análise comparativa dos análogos de L1

Uma vez obtidas as estruturas 3D dos peptídeos L1 e os análogos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A, foram comparadas as estruturas desses peptídeos como observado na Figura 43.

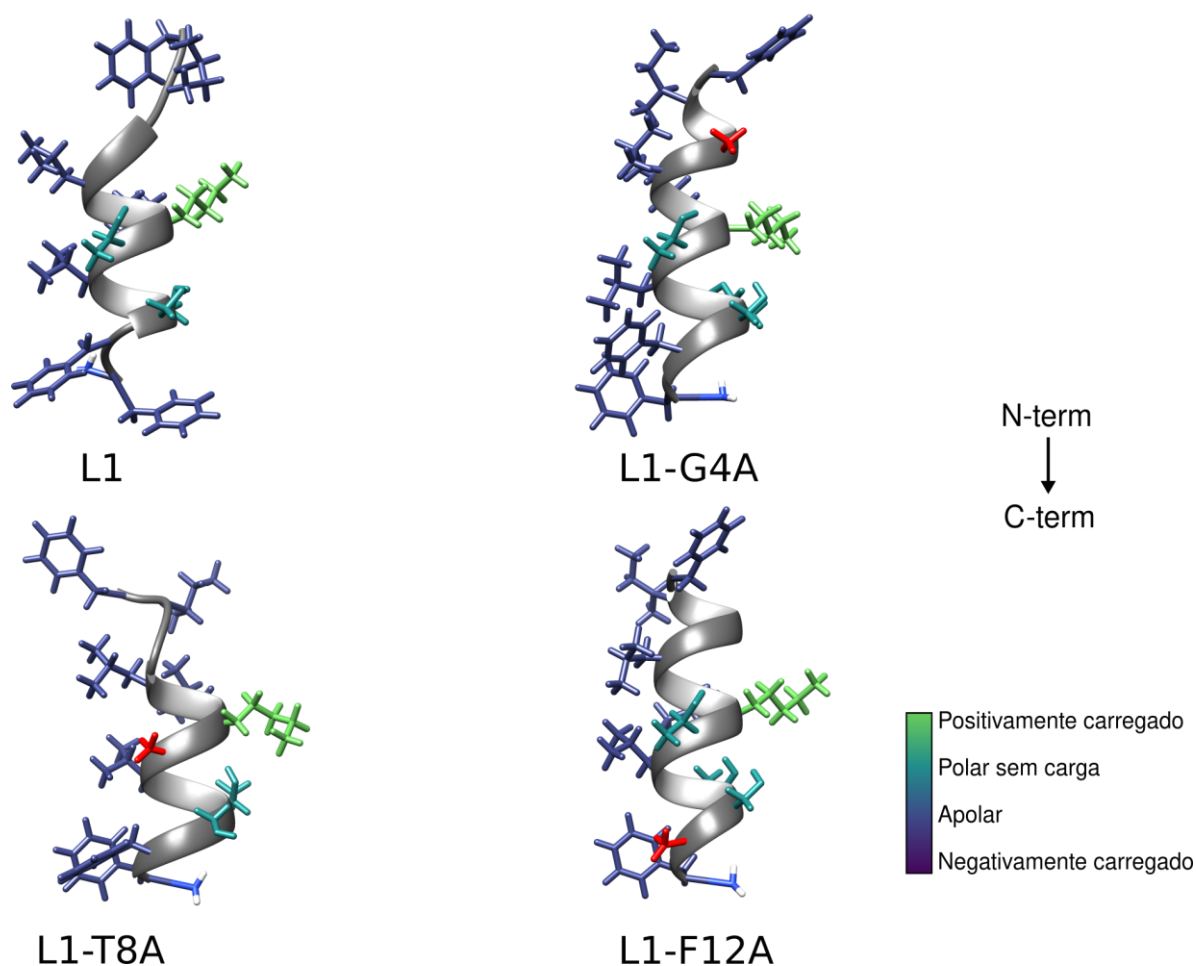


Figura 43. Estruturas 3D dos peptídeos L1 e os análogos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A, em solução 100 mM de SDS-d₂₅.

A estrutura de menor energia de cada peptídeo é mostrada. A cadeia lateral do resíduo de aminoácido Ala presente nos análogos foi destacada em cor vermelha.

Quando avaliamos a disposição das cadeias laterais em cada uma das estruturas 3D de menor energia dos peptídeos L1 e os análogos, podemos observar que, para os peptídeos L1, L1-G4A e L1-T8A, que apresentam os resíduos Phe-12 e Phe-13 na região C-terminal, a relação espacial entre esses resíduos para cada um desses peptídeos é diferente. Enquanto o peptídeo

L1 tem esses resíduos separados, orientados em diferente face da molécula, para os peptídeos L1-G4A e L1-T8A, esses resíduos Phe estão orientados na mesma face e, para o peptídeo L1-G4A, o *stacking* de elétrons π entre as duas Phe é maior, comparado aos outros peptídeos. O peptídeo L1-F12A, diferente dos 3 peptídeos anteriores, só apresenta um resíduo Phe na região C-terminal, o qual está orientado na mesma face dos outros resíduos hidrofóbicos. Em termos da atividade citotóxica que os análogos da L1 apresentaram na linhagem NHDF (Figura 9), as substituições dos resíduos fenilalanina Phe-1, Phe-12 e Phe-13, pelo resíduo Ala, não modificaram o perfil do peptídeo L1. Por outro lado, essas mesmas alterações tiveram um impacto maior na atividade antitumoral na linhagem HL-60 (Figura 6), visto que em todos os casos os análogos apresentaram uma redução na atividade (20% à 70%). Além disso, o peptídeo L1-F12A junto com o peptídeo L1-K7A, que apresentou a perda da cationicidade, foram os menos ativos.

A importância dos resíduos Phe para as interações dos peptídeos com membranas de bactérias e células tumorais, como também para as atividades biológicas dos peptídeos, têm sido objeto de extensa pesquisa. O peptídeo Piscidina-1 (Pis-1) (H-FFHHIFRGIVHVGKTIHRLVTG-OH) derivado de mastócitos do peixe robalo, apresenta atividade antibacteriana e hemolítica. Estudos com análogos do peptídeo, nos quais os resíduos Phe-1, Phe-2, Phe-6 e Val-10 foram substituídos por alanina (Ala), lisina (Lys) ou triptofano (Trp), revelaram que o resíduo Phe-2 penetra mais profundamente nas membranas de vesículas unilamelares pequenas (SUVs) de PC/PG e PC/CH. Essas SUVs mimetizam as membranas de bactérias e mamíferos, respectivamente.

Os peptídeos bioativos com domínios heptal (a-g); repetições de sete resíduos (a-g), onde os resíduos a e d são aminoácidos hidrofóbicos, principalmente Leu, Ile ou Phe, têm sido identificados em AMP de fontes naturais. Os zíper de Phe ou Leu, são um tipo específico de heptal, onde o sétimo resíduo (a) é Phe ou Leu. O peptídeo Melitina apresenta um zíper de Leu, essencial para as atividades citotóxicas do peptídeo e para sua interação com LPS (TRIPATHI et al., 2017). O peptídeo FR-15 (H-FRRFFKWFRFFKFF-NH₂) é um heptal desenhado para ter Phe nas posições (a) e (d). Análogos de FR-15, com substituição dos resíduos Phe-4, Phe-8 e Phe-11 por Pro, foram desenhados para potencializar as atividades ou aumentar a seletividade de FR-15. Os análogos FR8P e FR11P mostraram uma atividade anticancerígena potente contra a linhagem celular de câncer de mama humano MDA-MB-231, altamente metastático (IC₅₀ < 10 μ M), como também atividades anti-migratórias e anti-invasivas para essas células.

Diferentemente dos peptídeos FR-15 e FR4P, hemolíticos e citotóxicos em células 3T3 murinas, os análogos FR8P e FR11 foram seletivos (TRIPATHI et al., 2017).

Ao contrário dos peptídeos L1-T8A e L1-F12A, o peptídeo análogo L1-G4A demonstrou um aumento na atividade antitumoral nas células HL-60 (Figura 6). Como explicado anteriormente, a substituição Gly-4/Ala favoreceu uma conformação mais enovelada em α -hélice. Os resíduos de Gly e Pro são conhecidos por desestabilizar estruturas em α -hélice (TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000; TRIPATHI et al., 2017). Assim, as conformações com um N-terminal não enovelado e flexível para os peptídeos L1 e L1-T8A, podem ser explicadas pela presença dos resíduos Gly-3 e Gly-4. Entretanto, o peptídeo L1-F12A apresenta esses dois resíduos de Gly, porém, uma conformação mais estruturada e enovelada na região N-terminal.

O peptídeo Palustrina-Ca ($\text{H-GFLDIKDTGKEFAVKILNNLKCKLAGGCPP-OH}$), isolado do sapo *Lithobates catesbeianus*, o qual apresenta atividade antitumoral contra células de câncer gástrico (SGC-790) IC_{50} $0.951 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, teve sua estrutura 3D determinada por RMN em soluções de TFE- d_3 : H_2O (50:50) e, de modo similar aos peptídeos L1 e L1-T8A, a conformação em α -hélice foi observada até o resíduo Ala-26, resíduo anterior às duas glicinas; Gly-27 e Gly-28 (TIMMONS; HEWAGE, 2021). O peptídeo Maximina-3 isolado de secreções da pele e do cérebro do sapo *Bombina Maxima* ($\text{H-GIGGKILSGLKTALKGAAKELASTYLH-NH}_2$), semelhante à L1, apresenta os resíduos IGG na região N-terminal. A determinação da estrutura 3D por RMN em soluções de TFE- d_3 : H_2O (50:50), mostrou uma conformação em α -hélice para os resíduos Gly-1 até Ala-22, enquanto a extremidade C-terminal se encontra desenovelada (BENETTI; TIMMONS; HEWAGE, 2019, p. 3).

A diferença na sequência de resíduos de aminoácidos e o número de resíduos desses peptídeos contrastados à L-1 e seus análogos, como também as condições dos ensaios, dificulta a comparação do enovelamento para esses peptídeos. Entretanto, é possível observar que nem sempre a presença de resíduos de Gly na sequência impede o enovelamento do peptídeo, como ocorre com os peptídeos análogos à L1, L1-G4A e L1-F12A.

As estruturas de menor energia de cada análogo foram sobrepostas com a L1, como observado na Figura 44. Os valores de RMSD obtidos para os peptídeos L1 e L1-G4A mostram

que para o segmento helicoidal (0,40 Å) a disposição no espaço para as cadeias laterais dos resíduos Leu-6 até Phe-12 é similar. Por outro lado, o conjunto de todos os resíduos (2,52 Å) apresenta uma sobreposição menor, devido à flexibilidade conformacional da extremidade N-terminal da L1 (Figura 43 e Figura 44A). Os peptídeos L1 e L1-T8A, apresentam uma sobreposição no segmento helicoidal (0,35 Å) com os resíduos Gly-4 até Phe-12, superior à de L1/L1-G4A. Porém, a sobreposição é menor quando considerado todo o conjunto de resíduos (3,41 Å). Esses dois peptídeos apresentaram a extremidade N-terminal mais flexível e para as estruturas de menor energia, os resíduos Phe-1 e Ile-2 estão orientados de forma oposta entre elas (Figura 43 e Figura 44B). Finalmente, para os peptídeos L1 e L1-F12A, o segmento helicoidal entre os resíduos Leu-5 até Ser-11 apresentou a maior sobreposição (0,31 Å). Os resíduos Leu-6, Leu-9 e Thr-10 apresentaram a maior sobreposição dentre os resíduos, para esses peptídeos (Figura 44C). Quando avaliado o conjunto de todos os resíduos, a sobreposição foi menor (2,95 Å), devido à conformação mais helicoidal que apresenta o L1-F12A.

As sobreposições entre os quatro peptídeos também foram feitas (Figura 45). Os resíduos Gly-4 até Phe/Ser-12 do segmento helicoidal apresentaram uma sobreposição (0,48 Å) similar à de cada peptídeo com L1, como mostrado anteriormente. O conjunto de todos os resíduos apresentou uma sobreposição (2,52 Å) similar à de L1/L1-G4A. A flexibilidade conformacional dos peptídeos L1 e análogos está determinada principalmente pelos resíduos da região N-terminal.

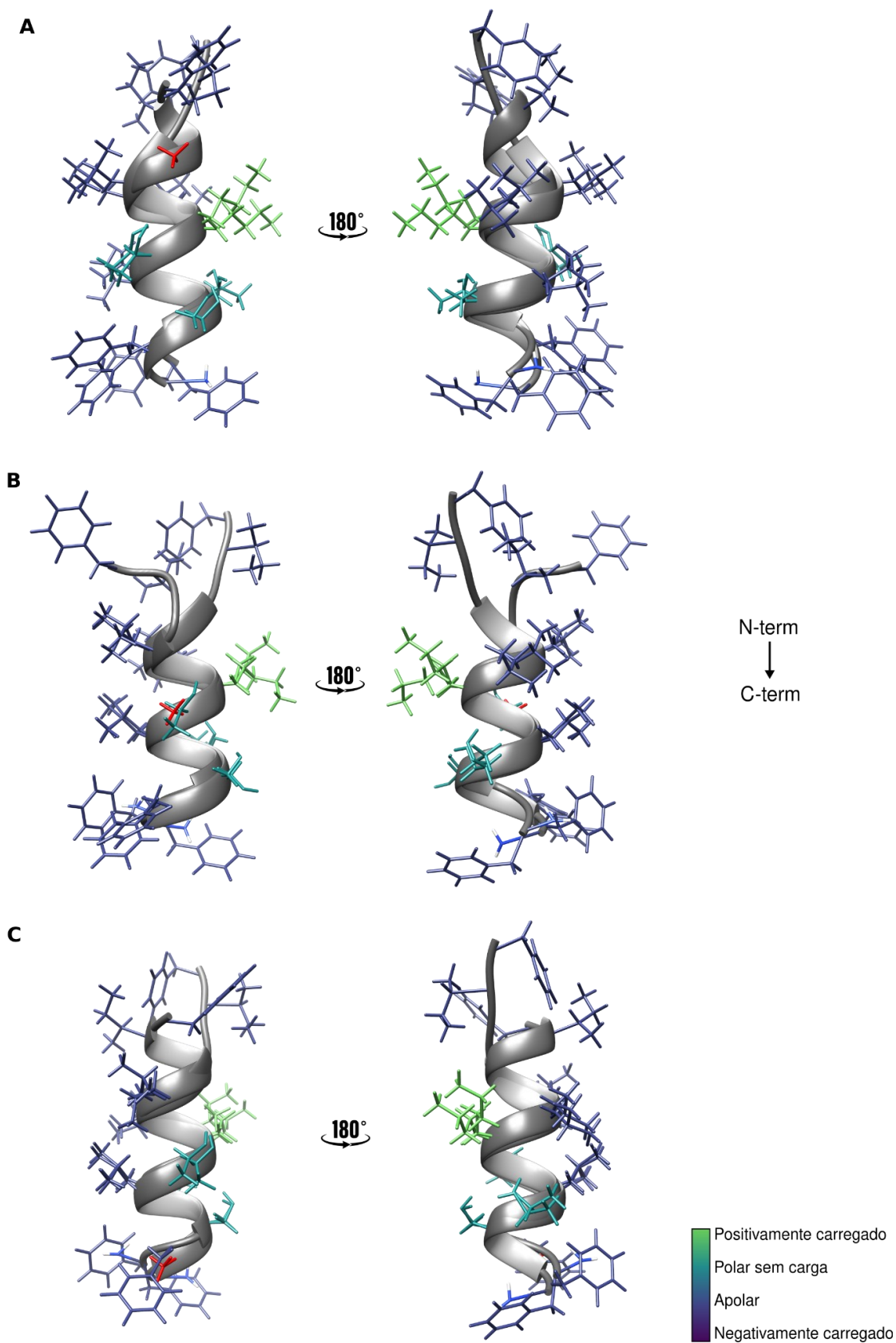


Figura 44. Estruturas 3D dos peptídeos L1 e os análogos sobrepostos.

As estruturas de menor energia de cada peptídeo foram sobrepostas. **A.** Os peptídeos L1 e L1-G4A. **B.** Os peptídeos L1 e L1-T8A. **C.** Os peptídeos L1 e L1-F12A.

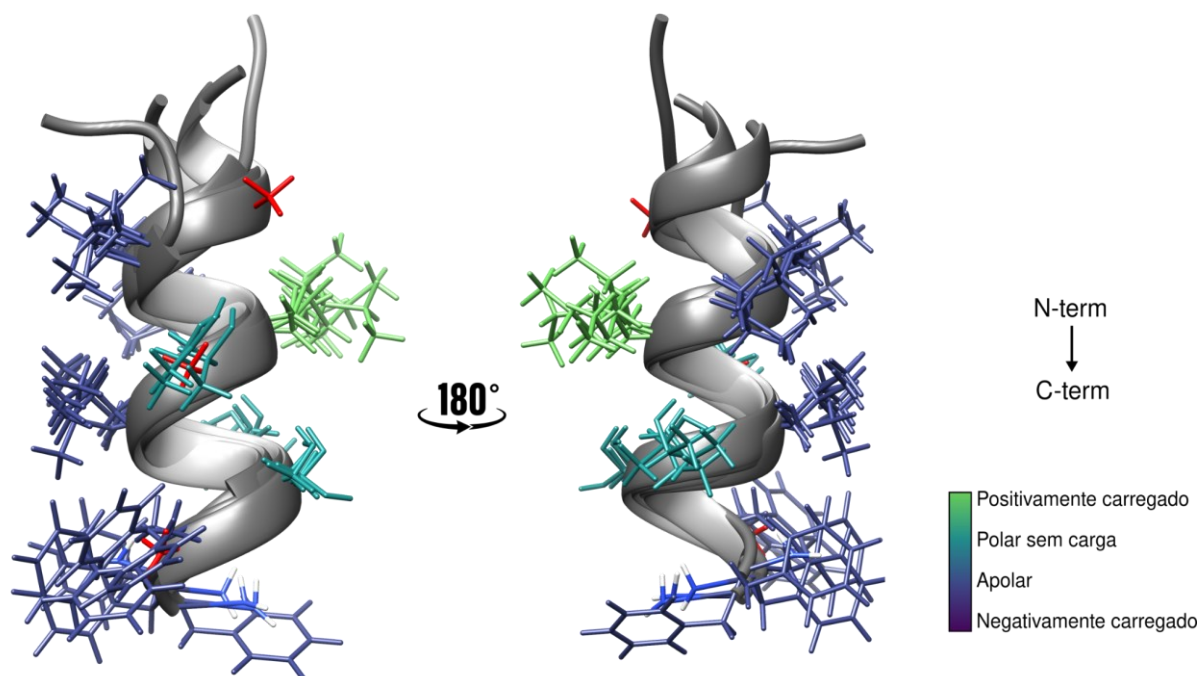


Figura 45. Estruturas 3D dos peptídeos L1 e os análogos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A sobrepostos.

As estruturas de menor energia de cada peptídeo foram sobrepostas. A cadeia lateral do resíduo de aminoácido Ala presente nos análogos, foi destacada em cor vermelha.

5.5 Os ensaios de dinâmica molecular mostram troca de conformação estrutural dos peptídeos Lunatina-1 e análogos em soluções de TFE:H₂O (40:60)

Os estudos de dinâmica molecular (MD) de peptídeos bioativos frequentemente apresentam maior complexidade em comparação aos estudos de proteínas globulares. Isso se deve às interações não específicas que ocorrem quando esses agentes entram em contato com a membrana, bem como às diversas propriedades das membranas com as quais interagem, como sua fluidez e composição lipídica. Essas pesquisas são de suma importância, uma vez que existe uma íntima relação entre a estrutura físico-química e a dinâmica desses peptídeos e suas atividades bioativas. A forma precisa de como os peptídeos interagem com os lipídios pode causar modificações significativas em seu mecanismo de ação e eficácia. Ao investigar essas interações por meio da MD, é possível identificar padrões específicos que conferem seletividade em relação a membranas alvo particulares. Essas informações podem ser utilizadas para orientar o desenho racional de novos peptídeos bioativos, levando em consideração tanto a atividade antimicrobiana quanto a toxicidade para células humanas (SILVA et al., 2020; TORRES; DE LA FUENTE-NUNEZ, 2019; ULMSCHNEIDER; ULMSCHNEIDER, 2018).

Existem diversas famílias de peptídeos bioativos, categorizadas principalmente por sua estrutura secundária e sequência, incluindo estruturas α -helicoidais, hélices aleatórias, voltas β e peptídeos com uma combinação de estruturas α e β . No entanto, essas estruturas podem variar dependendo do ambiente em que o peptídeo se encontra. Peptídeos, como as Lunatinas, frequentemente atuam na membrana, e essa interação pode ser investigada por meio de diversos experimentos biofísicos, como dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear (RMN), para determinar sua estrutura secundária em diferentes contextos. Em muitos casos, os resultados de simulações de dinâmica molecular podem fornecer informações valiosas sobre os possíveis mecanismos de ação dos peptídeos e ajudar a determinar medidas termodinâmicas importantes.

Nosso grupo de pesquisa tem-se dedicado à análise de motivos estruturais que podem ser empregados no desenho racional de peptídeos com propriedades terapêuticas desejáveis. Para avaliar o comportamento dos peptídeos em conjunto com os resíduos que os compõem, realizamos simulações de dinâmica molecular (DM) em misturas de TFE:água (40:60), ao longo de uma simulação de 1000 nanossegundos. A análise dos padrões de estrutura secundária dos peptídeos (realizada por meio do programa DSSP) foi conduzida com as ferramentas

disponíveis no GROMACS. Os resultados estão apresentados nas Figuras 46, 47, 48 e 49, referentes aos peptídeos Lunatina-1, L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A, respectivamente.

O cossolvente trifluoroetanol (TFE) é amplamente utilizado em estudos de dinâmica molecular e na determinação de estruturas por RMN e dicroísmo circular. Ele induz a formação de estruturas secundárias em proteínas ou peptídeos, especialmente a conformação de α -hélice, devido à sua natureza anfifílica. No entanto, acredita-se que o TFE também pode se auto-associar, formando aglomerados semelhantes a micelas em escala nanométrica. Esses aglomerados podem atuar como microdomínios "*nanocrowders*", aumentando as taxas de dobramento de proteínas por meio do efeito de volume excluído (CULIK et al., 2014). Em soluções aquosas, o TFE proporciona um ambiente com regiões tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas para os peptídeos. Os três átomos de flúor ligados ao carbono podem solvatar as regiões hidrofóbicas do peptídeo, enquanto a hidroxila pode formar pontes de hidrogênio com moléculas de água, grupos polares do peptídeo ou outras moléculas de TFE.

As análises para o peptídeo L1 nos mostram uma mistura de estruturas randômica (*coil*), dobra, volta e α -hélice (Figura 46). Das três replicatas das simulações de DM do peptídeo L1, podemos observar que, o peptídeo L1 adota uma conformação em α -hélice em uma delas (Figura 46A), a qual se inicia a partir da metade do peptídeo com o resíduo Lys-7 a Thr-10 e posteriormente engloba os resíduos Leu-6 a Phe-12, por quase 200 ns, no período de 330 ns a 530 ns da simulação. Essa conformação favorece o enovelamento da extremidade N_T desde o resíduo Ile-2, e o peptídeo adota uma estrutura em α -hélice durante quase 300 ns, no período de 550 ns - 830 ns, apresentando dobras para a extremidade C_T desde o resíduo Thr-10, em alguns momentos. Finalmente, o peptídeo é desenovelado, voltando a apresentar as estruturas iniciais randômicas. Diferente dessa simulação, nas outras duas simulações a conformação principal do peptídeo L1 é randômica, e a estrutura em α -hélice só foi observada em um período reduzido de 30 ns para a metade N_T ou C_T do peptídeo, o que indica que o processo de enovelamento pode ocorrer preferencialmente em tempos maiores ao avaliado nessas simulações (Figura 46B e C).

Lunatina-1 em TFE:H₂O (40:60)

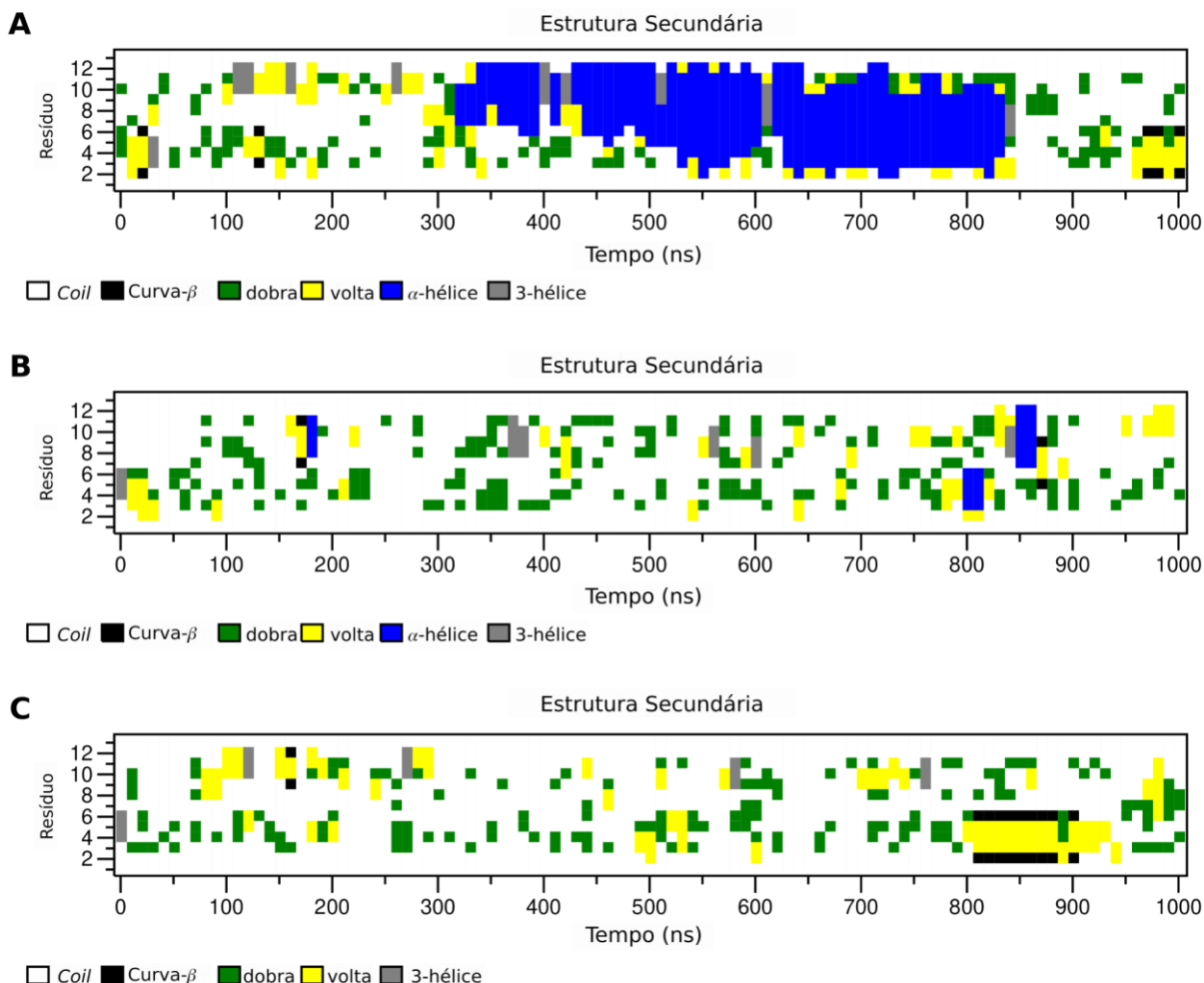


Figura 46. Gráficos de DSSP das transições da estrutura secundária em Lunatina-1 em simulações de DM durante 1000 ns.

Em **A**, **B** e **C**, as triplicatas das simulações de DM em solução TFE:H₂O (40:60).

Os resultados da análise do peptídeo L1-G4A em uma mistura de TFE:H₂O demonstram uma variedade de estruturas, incluindo configurações randômicas, dobradas, em α -hélice e em volta (Figura 47). Ao contrário do peptídeo L1, em que uma das replicatas adota uma conformação em α -hélice para a maioria da cadeia peptídica durante um período superior a 300 ns, o peptídeo L1-G4A não demonstrou uma conformação em α -hélice por períodos superiores a 50 ns. As três replicatas indicam que o enovelamento do peptídeo pode ocorrer em diferentes regiões: na região central à C-terminal, abrangendo os resíduos 7-13, entre 950 ns e 1000 ns (Figura 47A), entre 630 ns e 700 ns (Figura 47B) e entre 920 ns e 970 ns (Figura 47C). Além disso, o enovelamento do peptídeo pode ocorrer na região N-terminal, envolvendo os resíduos

2-6, entre 200 ns e 260 ns (Figura 47C). No entanto, independentemente da região envolvida, as tentativas de enovelamento parecem não ser bem-sucedidas, e o peptídeo retorna ao estado desenovelado.

Observamos também que a conformação em volta na região N-terminal foi a mais estável para esse peptídeo, abrangendo os resíduos 2-6, entre 450 ns e 630 ns (Figura 47B). Esta conformação permaneceu estável nos últimos 150 ns da simulação, mas eventualmente se desestabilizou para dar lugar à conformação em α -hélice, como explicado anteriormente.

L1-G4A em TFE:H₂O (40:60)

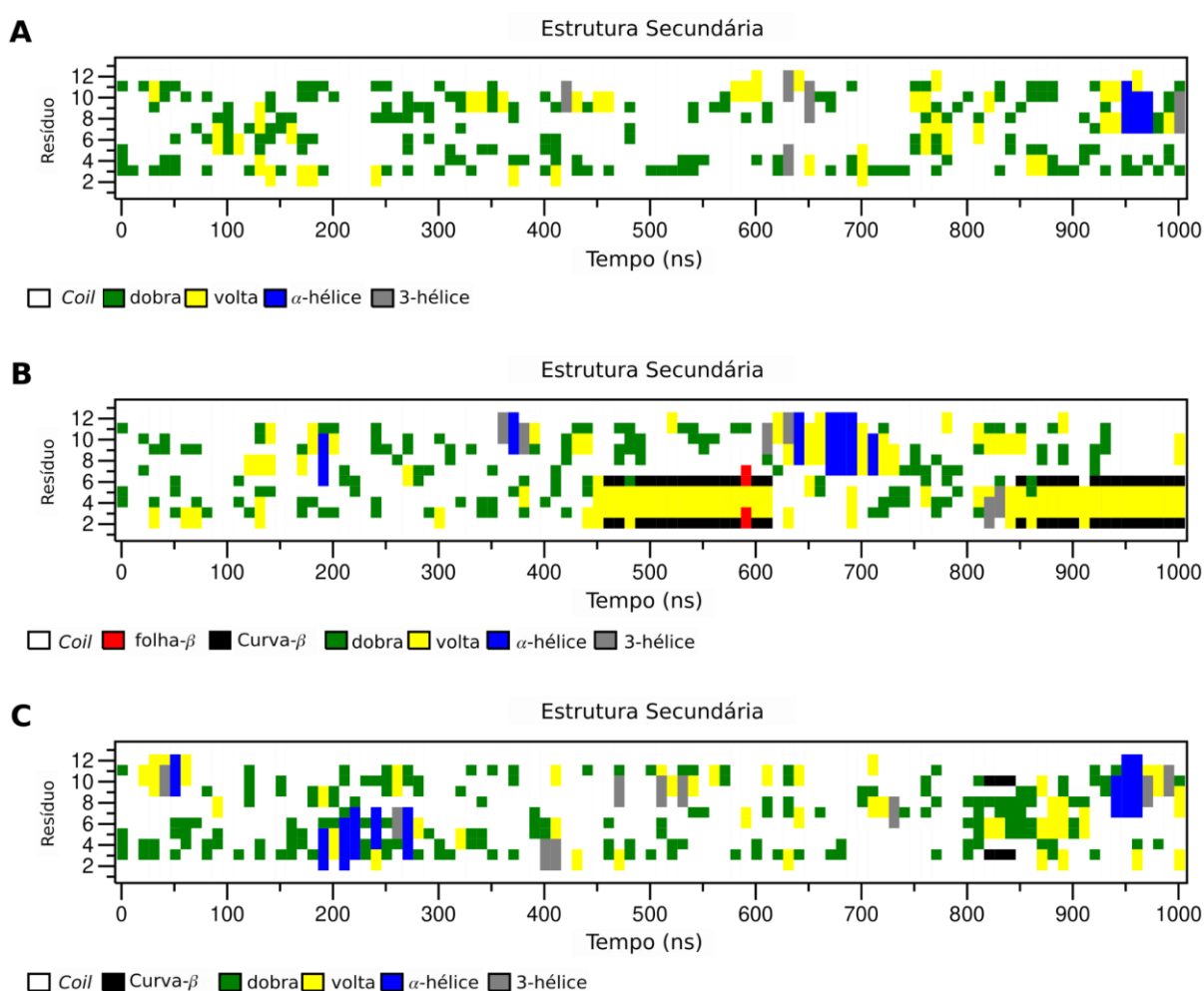


Figura 47. Gráficos de DSSP das transições da estrutura secundária em L1-G4A em simulações de DM durante 1000 ns.

Em A, B e C, as triplicatas das simulações de DM em solução TFE:H₂O (40:60).

Os resultados das análises com o peptídeo LI-T8A em mistura TFE:H₂O demonstram que o enovelamento do peptídeo pode ocorrer a partir da região C-terminal: resíduo 9-13, entre 200 ns e 250 ns (Figura 48A), entre 400 ns e 450 ns, entre 825 ns e 875 ns (Figura 48B), entre 100 ns e 150 ns e entre 450 e 500 ns (Figura 48C), demonstrando que existem várias tentativas de enovelamento do peptídeo que ocorrem começando pelo C-terminal. Entretanto, essas tentativas parecem falhar na primeira replicata e na terceira replicata. Na segunda replicata (Figura 48B), todavia, parece haver uma tentativa em 825 ns, que logo se desfaz, mas retorna em 925 ns, estendendo-se no sentido N-terminal (resíduos 13 ao 6 e depois do resíduo 13 ao 3). As regiões enoveladas vão variando, perdendo parte do enovelamento da região C-terminal, mas parece ocorrer uma estabilização do peptídeo em alfa-hélice. Ao contrário do enovelamento partindo da região C-terminal, o enovelamento do LI-T8A ocorre também a partir da região central do peptídeo: resíduos 4 ao 9, entre 100 e 150 ns, resíduo 5 ao 11, a partir de 775 ns (Figura 48A). Esta segunda tentativa obteve sucesso, e a conformação em hélice permanece no restante da primeira replicata, excluindo os três primeiros resíduos (FIG), e os últimos resíduos (SFF). É interessante observar também que antes do enovelamento o peptídeo adota estruturas em volta, tanto na porção N-terminal, dos resíduos 2-6, entre 100 e 150 ns, entre 500 e 575 ns e entre 825 e 925 ns (Figura 48C) ou em porções C-terminal, entre 400 a 600 ns (Figura 48A) e entre 150 a 200 ns e 350 a 400 ns (Figura 48B). Entretanto, essa conformação parcial em volta não parece ser estável e logo é desfeita para uma conformação randômica, diferentemente das conformações em alfa-hélice, que parecem estabilizar.

L1-T8A em TFE:H₂O (40:60)

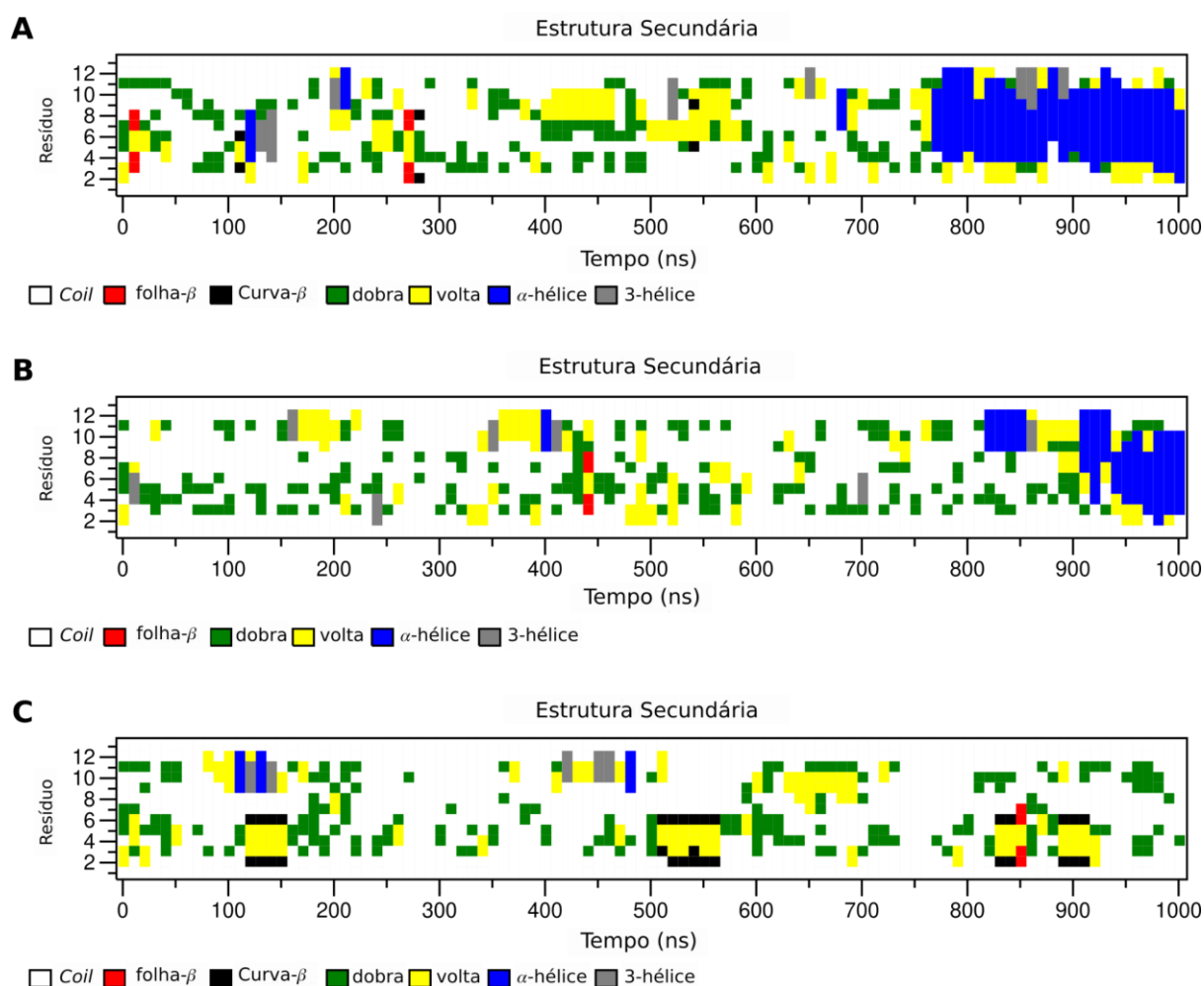


Figura 48. Gráficos de DSSP das transições da estrutura secundária em L1-T8A em simulações de DM durante 1000 ns.

Em A, B e C, as triplicatas das simulações de DM em solução TFE:H₂O (40:60).

Por último, as análises com o peptídeo L1-F12A em mistura TFE:H₂O demonstram que o peptídeo L1-F12A apresenta uma mistura de estruturas randômicas. Entretanto, a conformação em α -hélice foi notória (Figura 49). O processo de enovelamento pode se iniciar na região C-terminal: resíduos 9 ao 13, entre 100 e 150 ns e entre 450 e 500 ns (Figura 49B), entre 200 e 250 ns e 330 e 350 ns (Figura 49C). O enovelamento pode começar com os resíduos centrais (LKTL) e se estender à região C-terminal até o resíduo 13 entre 500 e 550 ns (Figura 49B). Uma das replicatas mostrou uma conformação mais enovelada que se inicia no meio do peptídeo e estende-se nos dois sentidos englobando toda a cadeia peptídica, entre 300 e 400 ns,

posteriormente as extremidades do peptídeo se tornam desenoveladas, da mesma forma a região central entre 400 e 430 ns (Figura 49A). No entanto, para esta mesma replicata o processo de enovelamento se inicia de novo a partir da mesma região central e mais uma vez se estende para os dois extremos do peptídeo, onde os primeiros três resíduos FIG e os últimos três resíduos SFF em momentos específicos fazem parte da estrutura helicoidal, entre 650 e 1000 ns (Figura 49A), ocorrendo uma estabilização do peptídeo em alfa-hélice até o final da simulação. Diferente dos outros peptídeos, a conformação em volta só foi observada por períodos reduzidos de tempo de 50 ns ou menos, entre 300 e 350 ns, entre 970 a 100 ns (Figura 49B) e aos 700 ns e 1000 ns da última replicata (Figura 49 C).

L1-F12A em TFE:H₂O (40:60)

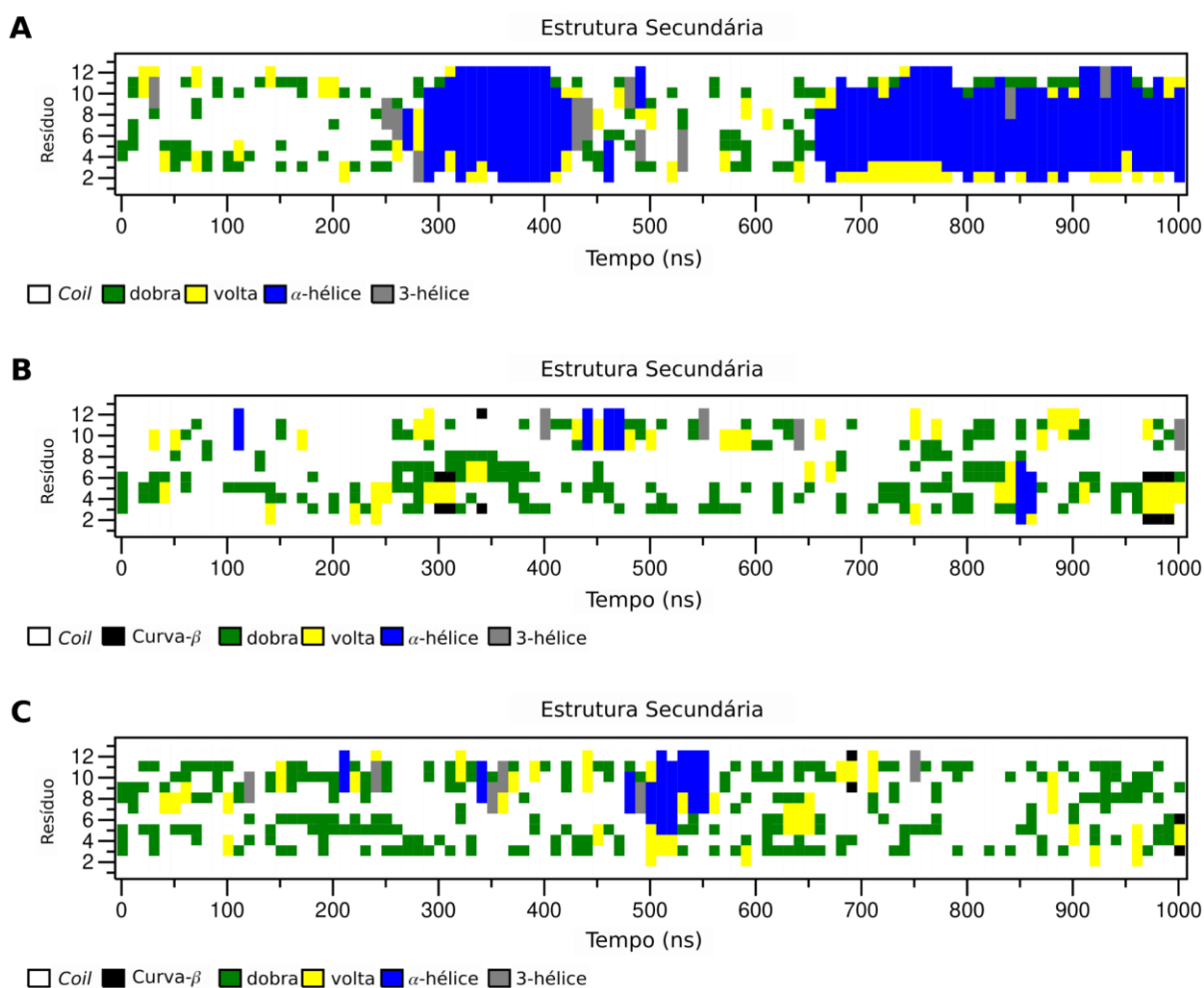


Figura 49. Gráficos de DSSP das transições da estrutura secundária em L1-F12A em simulações de DM durante 1000 ns.

Em A, B e C, as triplicatas das simulações de DM em solução TFE:H₂O (40:60).

As análises de dinâmica molecular nos mostram que a região central dos peptídeos Lunatina-1 e os análogos favorece o enovelamento dos peptídeos e, uma vez essa região adquire essa conformação enovelada, induz o enovelamento do resto do peptídeo, principalmente da região C-terminal, como observado para os peptídeos L1 e L1-F12A. Porém, a estabilidade e conformação helicoidal é maior entre os resíduos Gly-4 a Thr-10, para a maioria dos peptídeos. A maioria dos peptídeos apresentou um enovelamento em conformação helicoidal, sendo esta estável para algumas das replicatas das simulações (Figura 48A e 49A). Diferentemente ao observado nas estruturas 3D obtidas por RMN para o peptídeo L1-G4A, que apresentou uma conformação em α -hélice, nas simulações de DM essa não foi a conformação principal para essa molécula. Assim, nos tempos de simulação de 1000 ns, a troca Gly-Ala não mostra um favorecimento ao enovelamento, que se dá nas condições avaliadas de RMN. É provável que em experimentos de simulações de DM de tempos maiores se observe uma transição completa das conformações randômicas a enoveladas em α -hélice para alguma região ou para todo do peptídeo, para esses peptídeos.

O peptídeo *Synoeca*-MP de 14 resíduos pertencente à família dos mastoparanos isolado da vespa *Synoeca surinama* apresenta atividades antibacterianas e antifúngicas, com potencial para o desenho de biofármacos pela baixa citotoxicidade. Estudos estruturais do peptídeo em micelas de SDS mostraram o enovelamento em uma α -hélice anfipática, com as extremidades desenoveladas N-terminal (1-4) e C-terminal (14-15) desenoveladas. Análises de DM em caixas de água mostraram uma conformação randômica do peptídeo. Entretanto, em micelas de SDS a porção C-terminal (resíduos 8 a 14) do peptídeo adquire a conformação enovelada (ALVES et al., 2023). Análises de DM do peptídeo *Palustrina*-Ca, em micelas de SDS para modelar a interação do peptídeo com a membrana, mostraram que o peptídeo mantém sua conformação α -helicoidal entre os resíduos Ile6-Ala26, enquanto adota uma posição paralela à superfície da micela, o que é energeticamente favorável devido a muitos contatos hidrofóbicos e eletrostáticos com a micela (TIMMONS; HEWAGE, 2021). Podemos observar como as extremidades desses peptídeos, de modo semelhante aos peptídeos Lunatina-1 e análogos apresentam conformações desenoveladas obtidas por RMN e DM.

6 CONCLUSÕES

Com base nos objetivos específicos apresentados e nas perguntas formuladas, este trabalho proporcionou uma análise abrangente da Lunatina-1 e seus análogos. Inicialmente, foram identificadas e analisadas as características da estrutura primária do peptídeo Lunatina-1, fornecendo informações detalhadas sobre a sequência de aminoácidos e suas possíveis modificações. A análise de similaridade com peptídeos bioativos da base de dados APD3 revelou uma semelhança notável (70-85%) com peptídeos das famílias Temporinas, Maximinas e Caeruleina, culminando na obtenção de uma sequência consenso de resíduos de aminoácidos: (hidrofóbico-hidrofóbico-Gly-Gly-Leu-Leu-Kys-X-Leu), que se assemelha aos primeiros nove resíduos da Lunatina-1 (FIGLLKTL).

Além disso, confirmou-se que tanto a Lunatina-1 quanto seus análogos derivados do Ala-Scan demonstraram atividade citotóxica em linhagens celulares não tumorais, indicando um potencial efeito antiproliferativo. Os ensaios de Alanine scan foram realizados para compreender a relevância de cada resíduo para as atividades do peptídeo bioativo Lunatina-1. As análises das propriedades físico-químicas desses peptídeos mostraram um caráter hidrofóbico e uma preferência por adotarem estruturas antipáticas. As atividades citotóxicas do peptídeo Lunatina-1 e dos treze análogos foram avaliadas em relação à linhagem não tumoral de fibroblasto dermal humano normal (NHDF) e comparadas com as atividades desses peptídeos na linhagem tumoral HL-60, estudada em uma pesquisa prévia.

O peptídeo Lunatina-1, ativo em linhagens tumorais, não apresentou atividade citotóxica para a linhagem NHDF, nas concentrações testadas (20-120 μ M). A perda da carga líquida do peptídeo, com o análogo L1-K7A, não modificou a atividade da L1. No entanto, esta carga positiva é relevante para as atividades antitumorais e antibacterianas, como demonstrado em pesquisas anteriores. As alterações de hidrofobicidade e do momento hidrofóbico que a maioria dos análogos apresentou não foram suficientes para modificar o perfil de atividade do peptídeo L1 na linhagem NHDF, ao contrário da linhagem HL-60, onde doze dos análogos experimentaram uma redução de 20-80% da atividade. Entre os resultados mais interessantes ao estudar essas duas linhagens, ressalta-se o análogo L1-G4A, o único que apresentou uma melhora de atividade na linhagem HL-60 e atividade citotóxica na linhagem NHDF. Além desse

peptídeo, os análogos L1-G3A e L1-T8A demonstraram atividade citotóxica em células NHDF, nas concentrações de 80 e 120 μM .

Ao analisar a interação dos análogos do peptídeo Lunatina-1 com modelos miméticos de membrana, observaram-se divergências em sua estrutura tridimensional. Esta constatação sugere que o ambiente lipídico exerce uma influência significativa na conformação do peptídeo. Essas divergências na estrutura tridimensional dos peptídeos podem ser responsáveis pelas diferentes atividades observadas em estudos anteriores. Portanto, fica evidente que as interações com membranas celulares desempenham um papel crucial na atividade biológica desses peptídeos.

A substituição do resíduo de fenilalanina por alanina em peptídeos antimicrobianos, como demonstrado no análogo L1-F12A, influencia significativamente a estrutura e atividade biológica desses peptídeos. Os resíduos de fenilalanina, especialmente os localizados na região C-terminal, desempenham um papel crucial nas interações com membranas de bactérias e células tumorais, bem como nas atividades biológicas dos peptídeos. Esses achados estão alinhados com estudos anteriores que destacam a importância dos resíduos fenilalanina em peptídeos bioativos.

A análise estrutural revelou que a conformação em α -hélice é uma característica marcante nos peptídeos L1, L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A, com variações na orientação espacial dos resíduos fenilalanina na região C-terminal. A conformação helicoidal desses peptídeos pode estar relacionada à sua atividade antimicrobiana, indicando a relevância de estruturas bem definidas na eficácia desses compostos.

Os estudos estruturais dos peptídeos L1 e os análogos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A, foram realizados por meio da técnica de RMN em soluções micelares de SDS- d_{25} e, os peptídeos L1-G4A e L1-F12A, também foram analisados em soluções de TFE- d_2 :H₂O (50:50). O cálculo das estruturas 3D realizado a partir das restrições de distância fornecidas pelos experimentos NOESY e HSQC, mostraram diferenças nas conformações 3D desses quatro peptídeos no meio micelar. O peptídeo Lunatina-1 não apresenta uma estrutura completamente anfipática e enovelada em α -hélice, no seu lugar, uma das faces é hidrofóbica e a outra face com as extremidades hidrofóbicas e a parte interna hidrofílica. O enovelamento em α -hélice ocorre para os resíduos Leu-5 até a extremidade C-terminal, com a extremidade N-terminal flexível.

O análogo L1-T8A também apresentou uma conformação enovelada desde o resíduo Leu-5 até a extremidade N-terminal. Porém, a anfipaticidade desse peptídeo é maior à da L1, no entanto, a flexibilidade conformacional da extremidade N-terminal é menor. Os peptídeos mais estruturados na conformação α -hélice foram os análogos L1-G4A e L1-F12A, ambos os peptídeos são mais anfipáticos e a disposição dos resíduos é mais parecida ao observado em rodas de hélice. As análises desses dois peptídeos no meio hidrofóbico TFE-d2 também mostraram estruturas anfipáticas helicoidais.

A combinação das propriedades físico-químicas da estrutura primária e secundária determina as atividades dos peptídeos bioativos Lunatina-1. Um maior número de substituições é necessário para entender melhor como as alterações na hidrofobicidade e anfipaticidade do peptídeo Lunatina-1 melhoram ou alteram o espectro de atividades do peptídeo.

Adicionalmente, foram identificados os resíduos específicos nos peptídeos Lunatina-1 e seus análogos que são essenciais para o enovelamento e as conformações tridimensionais dos peptídeos. Esta descoberta contribui significativamente para a compreensão mais detalhada da relação entre estrutura e função desses compostos.

Estas conclusões fornecem um alicerce sólido para futuras pesquisas na área e abrem portas para o potencial desenvolvimento de novos biofármacos baseados na Lunatina-1 e seus análogos, oferecendo conhecimento promissor para o desenho racional de novos peptídeos bioativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMAAYTAH, A. et al. Antimicrobial/cytolytic peptides from the venom of the North African scorpion, *Androctonus amoreuxi*: Biochemical and functional characterization of natural peptides and a single site-substituted analog. **Peptides**, v. 35, n. 2, p. 291–299, jun. 2012.
- ALVES, E. S. F. et al. Synoeca-MP: New insights into its mechanism of action by using NMR and molecular dynamics simulations approach. **Peptide Science**, v. 115, n. 1, 1 jan. 2023.
- ARAÚJO-SILVA, C. A. et al. HDAC inhibitors Tubastatin A and SAHA affect parasite cell division and are potential anti-Toxoplasma gondii chemotherapeutics. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 15, p. 25–35, 1 abr. 2021.
- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1543–1575, 28 nov. 2013.
- BAHTA, M.; BURKE, T. R. Yersinia pestis and Approaches to Targeting its Outer Protein H Protein-Tyrosine Phosphatase (YopH). **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 33, p. 5726–5734, 2012.
- BARRY, M. A.; REYNOLDS, J. E.; EASTMAN, A. Etoposide-induced Apoptosis in Human HL-60 Cells Is Associated with Intracellular Acidification. 3 nov. 1993.
- BENETTI, S.; TIMMONS, P. B.; HEWAGE, C. M. NMR model structure of the antimicrobial peptide maximin 3. **European Biophysics Journal**, v. 48, n. 2, p. 203–212, 1 mar. 2019.
- BENINCASA, M. et al. Antimicrobial activity of Bac7 fragments against drug-resistant clinical isolates. **Peptides**, v. 25, n. 12, p. 2055–2061, 1 dez. 2004.
- BENINCASA, M. et al. The proline-rich peptide Bac7(1-35) reduces mortality from Salmonella typhimurium in a mouse model of infection. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 178, 23 jun. 2010.
- BENINCASA, M. et al. PEGylation of the peptide Bac7(1-35) reduces renal clearance while retaining antibacterial activity and bacterial cell penetration capacity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 210–219, 5 maio 2015.
- BERENDSEN, H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 15 out. 1984.
- BERTHELOOT, D.; LATZ, E.; FRANKLIN, B. S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 18, n. 5, p. 1106–1121, maio 2021.
- BHATTACHARJYA, S.; RAMAMOORTHY, A. Multifunctional host defense peptides:

functional and mechanistic insights from NMR structures of potent antimicrobial peptides. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 22, p. 6465–6473, 2009.

BONFANTI, A. P. et al. Spider venom administration impairs glioblastoma growth and modulates immune response in a non-clinical model. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5876, 3 abr. 2020.

BORDON, K. DE C. F. et al. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 24 jul. 2020.

BRAND, G. D. et al. Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 28 set. 2012.

BRAND, G. D. et al. Intragenic antimicrobial peptides (IAPs) from human proteins with potent antimicrobial and anti-inflammatory activity. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0220656, de ago. de 2019.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, mar. 2005.

CASSINI-VIEIRA, P. et al. Ts14 from *Tityus serrulatus* boosts angiogenesis and attenuates inflammation and collagen deposition in sponge-induced granulation tissue in mice. **Peptides**, v. 98, p. 63–69, 1 dez. 2017.

CHANG, K. Y.; YANG, J. R. Analysis and Prediction of Highly Effective Antiviral Peptides Based on Random Forests. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 5 ago. 2013.

CHEUNG, M. S. et al. DANGLE: A Bayesian inferential method for predicting protein backbone dihedral angles and secondary structure. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 202, n. 2, p. 223–233, fev. 2010.

CONLON, J. M. et al. Host-defense peptides in skin secretions of the tetraploid frog *Silurana epittropicalis* with potent activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Peptides**, v. 37, n. 1, p. 113–119, 1 set. 2012.

COSTAL-OLIVEIRA, F. et al. General biochemical and immunological characteristics of the venom from Peruvian scorpion *Hadruroides lunatus*. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 934–942, out. 2012.

COSTAL-OLIVEIRA, F. et al. Serological, biochemical and enzymatic alterations in rodents after experimental envenomation with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. **Toxicon**, v. 103, p. 129–134, 1 set. 2015.

COSTAL-OLIVEIRA, F. et al. Cardiorespiratory alterations in rodents experimentally envenomed with *Hadruroides lunatus* scorpion venom. **Journal of Venomous Animals and**

Toxins Including Tropical Diseases, v. 23, n. 1, 15 jul. 2016.

CULIK, R. M. et al. Experimental Validation of the Role of Trifluoroethanol as a Nanocrowder.

The Journal of Physical Chemistry B, v. 118, n. 39, p. 11455–11461, 2 out. 2014.

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1462, n. 1, p. 71–87, 15 dez. 1999.

DAVID L. NELSON; MICHAEL M COX. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 8 th ed. [s.l.] W. H. Freeman, 2021.

DE ASSIS, D. R. R. et al. Tityus serrulatus (Scorpion): From the Crude Venom to the Construction of Synthetic Peptides and Their Possible Therapeutic Application Against Toxoplasma gondii Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 20 jul. 2021.

DE MARCO ALMEIDA, F. et al. Venoms, toxins and derivatives from the Brazilian fauna: valuable sources for drug discovery. **Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]**, v. 67, n. 3, p. 261–270, 25 jun. 2015.

DE SOUSA GOMES, K. **Relação estrutura-atividade do peptídeo sintético Lunatina-1 e seus derivados na citotoxicidade de diferentes linhagens celulares**. [s.l.] UFMG, 2018.

DU, Q. et al. Cationicity-enhanced analogues of the antimicrobial peptides, AcrAP1 and AcrAP2, from the venom of the scorpion, Androctonus crassicauda, display potent growth modulation effects on human cancer cell lines. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1097–1107, 21 set. 2014.

DU, Q. et al. AaeAP1 and AaeAP2: Novel antimicrobial peptides from the venom of the scorpion, Androctonus aeneas: Structural characterisation, molecular cloning of biosynthetic precursor-encoding cDNAs and engineering of analogues with enhanced antimicrobial and anticancer activities. **Toxins**, v. 7, n. 2, p. 219–237, 23 jan. 2015.

EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. **Nature**, v. 299, n. 5881, p. 371–374, set. 1982.

ESCOBAR, E. et al. Purificación parcial de las toxinas HI1, HI2 y HI3 del veneno del escorpión Hadrurides lunatus Koch, 1867 (Scorpionida: Vejovidae)RPIONIDA: VEJOVIDAE). **Revista Peruana de Biología**, v. 9, n. 1, p. 3–10, 15 jul. 2002.

ESCOBAR, E.; RIVERA, C.; TINCOPA, L. Acción de la toxina HI3 sobre músculo esquelético. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n. 1, p. 88–92, dez. 2003.

FELÍCIO, M. R. et al. Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. Feb, 2017.

- GABERNET, G. et al. Membranolytic anticancer peptides. **MedChemComm**, v. 7, n. 12, p. 2232–2245, 2016.
- GABERNET, G. et al. In silico design and optimization of selective membranolytic anticancer peptides. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 11282, 2 ago. 2019.
- GASPAR, D.; SALOMÉ VEIGA, A.; CASTANHO, M. A. R. B. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. OCT, 2013.
- GAUTIER, R. et al. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific α -helical properties. **Bioinformatics**, v. 24, n. 18, p. 2101–2102, 15 set. 2008.
- GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic α helical antimicrobial peptides. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 21, p. 5589–5600, 2001.
- GRÄSLUND, A. et al. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. **Journal of Biophysics**, 2011.
- GUO, X. et al. Two peptides, TsAP-1 and TsAP-2, from the venom of the Brazilian yellow scorpion, *Tityus serrulatus*: Evaluation of their antimicrobial and anticancer activities. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1784–1794, set. 2013.
- HILCHIE, A. L. et al. Enhanced killing of breast cancer cells by a d-amino acid analog of the winter flounder-derived pleurocidin NRC-03. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 99, n. 3, p. 426–434, 1 dez. 2015.
- HOSKIN, D. W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 2, p. 357–375, fev. 2008.
- HUANG, Y. et al. Role of helicity of α -helical antimicrobial peptides to improve specificity. **Protein and Cell**, v. 5, n. 8, p. 631–642, 1 ago. 2014.
- HUANG, Y. B. et al. Role of helicity on the anticancer mechanism of action of cationic-helical peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 6849–6862, jun. 2012.
- IAVARONE, F. et al. Cryptides: latent peptides everywhere. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, n. 3, p. 246–263, jun. 2018.
- JANG, J. H. et al. Enhancement of the cancer targeting specificity of buforin IIb by fusion with an anionic peptide via a matrix metalloproteinases-cleavable linker. **Peptides**, v. 32, n. 5, p. 895–899, maio 2011.
- JIAO, C. Y. et al. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 49, p. 33957–33965, 4 dez. 2009.
- JOHNSON, T. O.; ERMOLIEFF, J.; JIROUSEK, M. R. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 9, p. 696–709, set. 2002.

- KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: Translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, n. 11, p. 1469–1484, nov. 2011.
- KUMAR, A.; ERNST, R. R.; WÜTHRICH, K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 95, n. 1, p. 1–6, 16 jul. 1980.
- KUO, H. M. et al. MSP-4, an Antimicrobial Peptide, Induces Apoptosis via Activation of Extrinsic Fas/FasL- and Intrinsic Mitochondria-Mediated Pathways in One Osteosarcoma Cell Line. **Marine Drugs**, v. 16, n. 1, 1 jan. 2018.
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, n. 1, p. 105–132, 5 maio 1982.
- LABELLE, J. L. et al. A stapled BIM peptide overcomes apoptotic resistance in hematologic cancers. 1 jun. 2012.
- LAI, R. et al. **Antimicrobial peptides from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima***. [s.l: s.n.].
- LAI, R. et al. An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 295, n. 4, p. 796–799, 26 jul. 2002b.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.
- LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 10, p. 790–802, 2003.
- LI, D. et al. Intratumoral expression of mature human neutrophil peptide-1 potentiates the therapeutic effect of doxorubicin in a mouse 4T1 breast cancer model. **Oncology Reports**, v. 31, n. 3, p. 1287–1295, mar. 2014.
- LI, H.; TSUI, T. Y.; MA, W. Intracellular delivery of molecular cargo using cell-penetrating peptides and the combination strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 19518–19536, 18 ago. 2015.
- LI, Y. et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207–215, out. 2012.
- LIM, H. N.; BAEK, S. B.; JUNG, H. J. Bee Venom and Its Peptide Component Melittin Suppress Growth and Migration of Melanoma Cells via Inhibition of PI3K/AKT/mTOR and MAPK Pathways. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 929, jan. 2019.
- LIU, R. et al. There are abundant antimicrobial peptides in brains of two kinds of *Bombina* toads. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 4, p. 1806–1815, 1 abr. 2011.

- LU, Y. et al. PFR peptide, one of the antimicrobial peptides identified from the derivatives of lactoferrin, induces necrosis in leukemia cells. **Scientific Reports**, v. 6, 10 fev. 2016.
- MACIEJEWSKI, M. W. et al. NMRbox: A Resource for Biomolecular NMR Computation. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 8, p. 1529–1534, 25 abr. 2017.
- MAHLAPUU, M. et al. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. DEC, 2016.
- MALDE, A. K. et al. An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 12, p. 4026–4037, 13 dez. 2011.
- MIKULA, K.; KOLODZIEJCZYK, R.; GOLDMAN, A. Yersinia infection tools—characterization of structure and function of adhesins. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, 2013.
- MINUTTI-ZANELLA, C.; GIL-LEYVA, E. J.; VERGARA, I. Immunomodulatory properties of molecules from animal venoms. **Toxicon**, v. 191, p. 54–68, 1 fev. 2021.
- MULDER, K. C. L. et al. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.
- MUNHOZ, J. et al. Components from spider venom activate macrophages against glioblastoma cells: new potential adjuvants for anticancer immunotherapy. **The Journal of Biochemistry**, v. 170, n. 1, p. 51–68, 1 jul. 2021.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 464–472, 1 set. 2011.
- NILGES, M. Structure calculation from NMR data. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 5, p. 617–623, out. 1996.
- NUNES, K. P. et al. Erectile Function Is Improved in Aged Rats by PnTx2-6, a Toxin from Phoneutria nigriventer Spider Venom. **Journal of Sexual Medicine**, v. 9, n. 10, p. 2574–2581, 2012.
- OCHOA, J. A. Patrones de distribución de escorpiones de la región andina en el sur peruano. **Revista Peruana de Biología**, v. 12, n. 1, p. 49–68, jan. 2005.
- OCHOA, J. A. (JOSÉ A.); PRENDINI, L. The genus Hadruroides Pocock, 1893 (Scorpiones, Iuridae), in Peru: new records and descriptions of six new species. (American Museum novitates, no. 3687). 2010.
- OOSTENBRINK, C. et al. Validation of the 53A6 GROMOS force field. **European Biophysics Journal**, v. 34, n. 4, p. 273–284, 1 jun. 2005.

- PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, 1 dez. 1981.
- PASPARAKIS, M.; VANDENABEELE, P. Necroptosis and its role in inflammation. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 311–320, 15 jan. 2015.
- PENNINGTON, M. W.; CZERWINSKI, A.; NORTON, R. S. Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2738–2758, 1 jun. 2018.
- PIMENTA, A. M. C.; DE LIMA, M. E. Small peptides, big world: Biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. **Journal of Peptide Science**, v. 11, n. 11, p. 670–676, nov. 2005.
- PIMENTEL, P. M. DE O. et al. Tityus serrulatus scorpion venom as a potential drug source for Chagas' disease: Trypanocidal and immunomodulatory activity. **Clinical Immunology**, v. 226, 1 maio 2021.
- RAMADA, M. H. S. et al. Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.
- RIEPING, W. et al. ARIA2: Automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. **Bioinformatics**, v. 23, n. 3, p. 381–382, 1 fev. 2007.
- ROBINSON, S. D. et al. Venom peptides as therapeutics: advances, challenges and the future of venom-peptide discovery. **Expert Review of Proteomics**, v. 14, n. 10, p. 931–939, 3 out. 2017.
- RYAN, R. Y. M. et al. Immunological Responses to Envenomation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 10 maio 2021.
- SANTANA, H. F. **Determinação da diversidade peptídica do veneno do escorpião peruano Hadruidoies lunatus**. Dissertação—[s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.
- SANTOS, B. P. O. et al. Schistocins: Novel antimicrobial peptides encrypted in the Schistosoma mansoni Kunitz Inhibitor SmKI-1. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1865, n. 11, 1 nov. 2021.
- SANTOS COSTA, N. C. **Estudo da atividade inibitória e da interação molecular das Lunatinas e análogos sobre a proteína tirosina fosfatase de Yersinia sp (YopH)**. [s.l.] UFMG, 2016.
- SANTOS, M. A. et al. Probing human proteins for short encrypted antimicrobial peptides reveals Hs10, a peptide with selective activity for gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1867, n. 1, p. 130265, 1 jan. 2023.

- SCHITTEK, B. et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. **Nature Immunology**, v. 2, n. 12, p. 1133–1137, dez. 2001.
- SCHWEIZER, F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, n. 1–3, p. 190–194, 25 dez. 2009.
- SHAKA, A. J.; LEE, C. J.; PINES, A. Iterative schemes for bilinear operators; application to spin decoupling. **Journal of Magnetic Resonance (1969)**, v. 77, n. 2, p. 274–293, 1 abr. 1988.
- SHANG, D. et al. Molecular Cloning of cDNAs Encoding Antimicrobial Peptide Precursors from the Skin of the Chinese Brown Frog, *Rana chensinensis*. **Zoological Science**, v. 26, n. 3, p. 220–226, mar. 2009.
- SILVA, C. N. et al. PnPP-19, a Synthetic and Nontoxic Peptide Designed from a *Phonotria nigriventer* Toxin, Potentiates Erectile Function via NO/cGMP. **Journal of Urology**, v. 194, n. 5, p. 1481–1490, 1 nov. 2015.
- SILVA, O. N. et al. Repurposing a peptide toxin from wasp venom into antiinfectives with dual antimicrobial and immunomodulatory properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 43, p. 26936–26945, 27 out. 2020.
- TANIGUCHI, M. et al. Effect of substituting arginine and lysine with alanine on antimicrobial activity and the mechanism of action of a cationic dodecapeptide (CL(14-25)), a partial sequence of cyanate lyase from rice. **Biopolymers - Peptide Science Section**, v. 102, n. 1, p. 58–68, 1 jan. 2014.
- TANIGUCHI, M. et al. Antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis* and mechanism of action of the cationic octadecapeptide AmyI-1-18 and its amino acid-substituted analogs. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 122, n. 6, p. 652–659, 1 dez. 2016.
- TEIXEIRA, V.; FEIO, M. J.; BASTOS, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 2, p. 149–177, 1 abr. 2012.
- TIMMONS, P. B.; HEWAGE, C. M. Conformation and membrane interaction studies of the potent antimicrobial and anticancer peptide palustrin-Ca. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 22468, 17 nov. 2021.
- TORRES, M. D. T.; DE LA FUENTE-NUNEZ, C. Toward computer-made artificial antibiotics. **Current Opinion in Microbiology**, Antimicrobials. v. 51, p. 30–38, 1 out. 2019.
- TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. **Peptide Science**, v. 55, n. 1, p. 4–30, 2000.
- TRIPATHI, A. K. et al. Selective phenylalanine to proline substitution for improved antimicrobial and anticancer activities of peptides designed on phenylalanine heptad repeat. **Acta Biomaterialia**, v. 57, p. 170–186, 15 jul. 2017.

- UEKI, N. et al. **Cryptides: Functional cryptic peptides hidden in protein structures.** Biopolymers - Peptide Science Section. **Anais...**2007.
- UGGERHØJ, L. E. et al. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides: Do's and don'ts. **ChemBioChem**, v. 16, n. 2, p. 242–253, 21 dez. 2015.
- ULMSCHNEIDER, J. P.; ULMSCHNEIDER, M. B. Molecular Dynamics Simulations Are Redefining Our View of Peptides Interacting with Biological Membranes. **Accounts of Chemical Research**, v. 51, n. 5, p. 1106–1116, 15 maio 2018.
- ULRICH, E. L. et al. BioMagResBank. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. SUPPL. 1, jan. 2008.
- VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.
- VAN THIEL, J. et al. Convergent evolution of toxin resistance in animals. **Biological Reviews**, v. 97, n. 5, p. 1823–1843, 2022.
- VEILLETTE, A. et al. PEST family phosphatases in immunity, autoimmunity, and autoinflammatory disorders. **Immunological Reviews**, v. 228, n. 1, p. 312–324, mar. 2009.
- VERANO-BRAGA, T. et al. Tityus serrulatus Hypotensins: A new family of peptides from scorpion venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 371, n. 3, p. 515–520, 4 jul. 2008.
- VERANO-BRAGA, T. et al. Structure–function studies of Tityus serrulatus Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B2 kinin receptor. **Toxicon**, Highlights in Toxinology: Biodiversity in Toxins - Tools for Biological Research and Drug Development. v. 56, n. 7, p. 1162–1171, 15 dez. 2010.
- VRANKEN, W. F. et al. The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 59, n. 4, p. 687–696, 1 jun. 2005.
- WANG, C. et al. Rapid Cytotoxicity of Antimicrobial Peptide Tempoprin-1CEa in Breast Cancer Cells through Membrane Destruction and Intracellular Calcium Mechanism. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 5 abr. 2013a.
- WANG, C. et al. Anticancer mechanisms of temporin-1CEa, an amphipathic α -helical antimicrobial peptide, in Bcap-37 human breast cancer cells. **Life Sciences**, v. 92, n. 20–21, p. 1004–1014, 30 maio 2013b.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1087–D1093, 2016.
- WANG, X. et al. Identification and functional analyses of novel antioxidant peptides and antimicrobial peptides from skin secretions of four East Asian frog species. **Acta Biochimica**

- et **Biophysica Sinica**, v. 49, n. 6, p. 550–559, 1 jun. 2017.
- WANG, Y. S. et al. Intratumoral expression of mature human neutrophil peptide-1 mediates antitumor immunity in mice. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 22, p. 6901–6911, 15 nov. 2009.
- WILLKER, W. et al. Gradient selection in inverse heteronuclear correlation spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 287–292, mar. 1993.
- WÜTHRICH, K. **NMR of Proteins and Nucleic Acids**. [s.l.] John Wiley, 1986.
- XU, N. et al. Human α -defensin-1 inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenograft in nude mice. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 6, p. 1588–1597, 2008.
- YANG, X. et al. Characterization of diverse antimicrobial peptides in skin secretions of Chungang torrent frog *Amolops chunganensis*. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 41–53, nov. 2012.
- YANG, X. et al. Identification of multiple antimicrobial peptides from the skin of fine-spined frog, *Hylarana spinulosa* (Ranidae). **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2429–2436, dez. 2013.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27–55, 1 mar. 2003.
- ZAMORA-CARRERAS, H. et al. Alanine scan and (2)H NMR analysis of the membrane-active peptide BP100 point to a distinct carpet mechanism of action. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1858, n. 6, p. 1328–1338, jun. 2016.
- ZAVALETA, A.; NAVARRO, J.; CASTRO DE LA MATA, R. Pharmacological effects of a Peruvian scorpion (*Hadruroides lunatus*) venom. **Toxicon**, v. 19, n. 6, p. 906–909, jan. 1981.
- ZIPS, D.; THAMES, H. D.; BAUMANN, M. New Anticancer Agents: In Vitro and In Vivo Evaluation. **in vivo**, 2005.

ANEXO A

Tabela A-1. Sumário das estatísticas estruturais para as vinte estruturas de menor energia dos peptídeos Lunatina-1 e seus análogos L1-G4A, L1-T8A e L1-F12A em SDS- d_{25} 100 μ M.

	Lunatina-1				L1-G4A				L1-T8A				L1-F12A			
Restrições Geométricas																
NOEs																
Intra-residuais	69				112				98				102			
Inter-residuais	34				96				56				78			
Sequenciais	23				58				37				48			
Curta distância	9				27				13				22			
Meia distância	2				11				6				8			
Longa distância	0				0				0				0			
Não ambíguos	103				208				154				180			
Ambíguos	18				33				20				23			
Ângulos diedro ($\psi + \phi$)	12				20				20				20			
Estatísticas estruturais																
Precisão estrutural																
RMSD (Å) cadeia principal (todos / estrutura 2ª)	1,32 (\pm 0,44) / 0,14 (\pm 0,05)				0,34 (\pm 0,08) / 0,10 (\pm 0,04)				0,69 (\pm 0,19) / 0,43 (\pm 0,13)				0,38 (\pm 0,12) / 0,17 (\pm 0,05)			
RMSD (Å) átomos pesados (todos / estrutura 2ª)	2,13 (\pm 0,59) / 0,72 (\pm 0,23)				0,80 (\pm 0,22) / 0,36 (\pm 0,08)				1,24 (\pm 0,26) / 0,66 (\pm 0,13)				0,81 (\pm 0,25) / 0,36 (\pm 0,09)			
PROCHECK	Valor	error	min	max	Valor	error	min	max	Valor	error	min	max	Valor	error	min	max
Regiões mais favorecidas	96,7	5,22	88,9	100	98,5	3,66	90	100	88,9	3,6	77,8	100	95,2	5,93	88,9	100
Regiões permitidas	2,22	4,56	0	11,1	1,5	3,66	0	10	10,5	4,37	0	22,2	4,76	5,93	0	11,1
Regiões menos permitidas	0,555	2,48	0	11,1	0	0	0	0	0,55	2,48	0	11,1	0	0	0	0
Regiões não permitidas	0,555	2,48	0	11,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resíduos rotulados (todos os Ramachandra)	0,45	0,686	0	2	0	0	0	0	0,9	0,308	0	1	0	0	0	0

Resíduos rotulados (gráficos chi1-chi2)	0,35	0,489	0	1	1,7	0,47	1	2	0,05	0,224	0	1	1,57	0,535	1	2
Erro de contactos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fator-G diedro	0,006	0,13	-0,32	0,2	-0,006	0,09	-0,16	0,18	-0,125	0,111	-0,39	0,02	0,171	0,079	0,1	0,34
Fator-G covalente	0,619	0,0107	0,59	0,63	0,648	0,004	0,64	0,66	0,639	0,009	0,62	0,65	0,67	0	0,67	0,67
Fator-G total	0,266	0,0766	0,07	0,37	0,268	0,0534	0,18	0,38	0,201	0,063	0,05	0,29	0,386	0,045	0,34	0,48

WHATCHECK

Escore Z do gráfico de Ramachandran (RAMCHK)	-3,3	1,94	-7,33	0,036	-2,62	1,43	-5,58	0,278	-5,95	1,3	-8,55	-3,14	-5,26	0,688	-5,92	-4,38
Escore Z de normalidade do rotâmero Chi-1 chi-2 (C12CHK)	-2,41	2,18	-6,24	1,1	-7,95	1,1	-9,66	-6,03	-7,2	1,59	-10,2	-4,93	-3,88	1,13	-6,11	-3,08
Escore Z de conformação da cadeia principal (BBCCHK)	-1,81	0,962	-3,59	-0,511	0,258	0	0,258	0,258	-1,62	0,808	-3,73	-0,86	0,255	0	0,255	0,255
Escore Z do comprimento das ligações RMS (BNDCHK)	0,266	0,017	0,239	0,301	0,255	0,01	0,243	0,279	0,261	0,0142	0,23	0,284	0,196	0,002	0,193	0,198
Escore Z dos ângulos das ligações RMS (ANGCHK)	0,335	0,031	0,284	0,391	0,284	0,013	0,257	0,316	0,301	0,029	0,26	0,367	0,218	0,024	0,215	0,222
Escore Z das restrições angulares Omega RMS (OMECHK)	0,578	0,077	0,447	0,764	0,560	0,094	0,387	0,752	0,56	0,1	0,414	0,772	0,052	0,003	0,048	0,059
Escore Z da planaridade da cadeia lateral RMS (PLNCHK)	0,0628	0,017	0,039	0,106	0,055	0,012	0,031	0,076	0,039	0,013	0,017	0,071	0,027	0,008	0,017	0,041
Escore Z da distribuição diedral inadequada RMS (HNDCHK)	0,348	0,056	0,221	0,44	0,382	0,020	0,35	0,424	0,384	0,029	0,331	0,425	0,309	0,005	0,301	0,316

MOLPROBITY

<i>Clashscore</i> = Escore de número de choques por 1000 átomos	8,33	4,89	0	18,5	12,1	6,16	0	22,8	7,78	4,4	0	18,9	4,85	0	4,85	4,85
Percentil do <i>Clashscore</i>	78,2	19,9	36	100	62,8	23,6	25	100	80,3	17,5	36	100	94	0	94	94
Escore Z do <i>Clashscore</i>	inf	nan	-0,306	inf	nan	nan	-0,605	inf	nan	nan	-0,333	inf	1,61	0	1,61	1,61

Tabela A-2. Sumário das estatísticas estruturais para as vinte estruturas de menor energia dos peptídeos L1-G4A e L1-F12A em TFE-*d*₂:H₂O (40:60, v/v).

	L1-G4A				L1-F12A			
Restrições Geométricas								
NOEs								
Intra-residuais	123				127			
Inter-residuais	84				95			
Sequenciais	48				53			
Curta distância	29				33			
Meia distância	7				9			
Longa distância	0				0			
Não ambíguos	207				222			
Ambíguos	32				35			
Ângulos diedro (psi + phi)	20				20			
Estatísticas estruturais								
Precisão estrutural								
RMSD (Å) cadeia principal (todos / estructura 2 ^a)	0,64 (± 0,22) / 0,12 (±0,05)				0,29 (± 0,06) / 0,06 (± 0,01)			
RMSD (Å) átomos pesados (todos / estructura 2 ^a)	1,30 (± 0,28) / 0,71 (± 0,11)				0,70 (± 0,31) / 0,44 (± 0,21)			
PROCHECK	Valor	error	min	max	Valor	error	min	max
Regiões mais favorecidas	98	4.1	90	100	100	0	100	100
Regiões permitidas	2	4.1	0	10	0	0	0	0
Regiões menos permitidas	0	0	0	0	0	0	0	0
Regiões não permitidas	0	0	0	0	0	0	0	0
Resíduos rotulados (todos os Ramachandra)	0,3	0,657	0	2	0	0	0	0
Resíduos rotulados (gráficos chi1-chi2)	0,1	0,308	0	1	0,05	0,224	0	1
Erro de contactos	0	0	0	0	0	0	0	0
Fator-G diedro	0,217	0,0854	0,05	0,4	0,357	0,0652	0,24	0,47
Fator-G covalente	0,643	0,00967	0,62	0,66	0,653	0,00786	0,64	0,66
Fator-G total	0,397	0,052	0,3	0,51	0,483	0,0381	0,42	0,55

WHATCHECK								
Escore Z do gráfico de Ramachandran (RAMCHK)	-1,57	2,36	-7,2	3,68	0,235	0,949	-2,57	1,7
Escore Z de normalidade do rotâmetro Chi-1 chi-2 (C12CHK)	-0,891	2,73	-6	4,17	-0,322	1,51	-2,84	2,41
Escore Z de conformação da cadeia principal (BBCCHK)	0,347	0,348	-0,522	0,501	0,255	0	0,255	0,255
Escore Z do comprimento das ligações RMS (BNDCHK)	0,228	0,0149	0,209	0,273	0,244	0,0125	0,225	0,263
Escore Z dos ângulos das ligações RMS (ANGCHK)	0,272	0,0218	0,232	0,332	0,25	0,0166	0,219	0,28
Escore Z das restrições angulares Omega RMS (OMECHK)	0,484	0,0812	0,316	0,622	0,471	0,0701	0,297	0,551
Escore Z da planaridade da cadeia lateral RMS (PLNCHK)	0,0417	0,0119	0,025	0,068	0,0487	0,0194	0,024	0,097
Escore Z da distribuição diedral inadequada RMS (HNDCHK)	0,316	0,0249	0,263	0,36	0,312	0,0248	0,276	0,368
MOLPROBITY								
<i>Clashscore</i> = Escore de número de choques por 1000 átomos	1,6	2,24	0	4,57	7,28	4,31	0	14,6
Percentil do <i>Clashscore</i>	98,2	2,45	95	100	81,2	15,3	51	100
Escore Z do <i>Clashscore</i>	nan	nan	1,7	inf	nan	nan	0,0384	inf

ANEXO B

Artigo publicado

Cherry L Wainwright 1, Mauro M Teixeira 2, David L Adelson 3, Eric J Buenz 4, Bruno David 5, Keith B Glaser 6, Yuka Harata-Lee 3, Melanie-Jayne R Howes 7, Angelo A Izzo 8, Pasquale Maffia 9, Alejandro M S Mayer 10, Claire Mazars 5, David J Newman 11, Eimear Nic Lughadha 12, Adriano M C Pimenta 13, John A A Parra 13, Zhipeng Qu 3, Hanyuan Shen 3, Michael Spedding 14, Jean-Luc Wolfender 15. **Future directions for the discovery of natural product-derived immunomodulating drugs: an IUPHAR positional review.** *Pharmacological Research*, Volume 177, March 2022, 106076. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106076>.