



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Campus Araraquara

Lorrane Davi Brito

Planejamento *in silico* e síntese de peptídeos derivados  
da proteína YjhX: Estudos de inibição da atividade de  
DNA topoisomerasas

Araraquara  
2020

LORRANE DAVI BRITO

**Planejamento *in silico* e síntese de peptídeos derivados  
da proteína YjhX: Estudos de inibição da atividade de  
DNA topoisomerasas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Camila Aguiar Rocha

Araraquara  
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

B862p Brito, Lorrane Davi  
Planejamento *in silico* e síntese de peptídeos derivados da  
proteína YjhX: estudos de inibição da atividade de DNA  
topoisomerasas / Lorrane Davi Brito. –  
Araraquara/SP : [s.n.], 2020  
88 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química

Orientador: Reinaldo Marchetto

Coorientador: Camila Aguiar Rocha

1. Dinâmica molecular. 2. Inibidores enzimáticos.  
3. Antibacterianos. 4. Peptídeos. 5. Toxinas bacterianas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Planejamento *in silico* e síntese de peptídeos derivados da proteína YjhX: Estudos de inibição da atividade de DNA topoisomerases"

AUTORA: LORRANE DAVI BRITO

ORIENTADOR: REINALDO MARCHETTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. EDUARDO FESTOZO VICENTE  
Departamento de Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia - UNESP - Tupã

  
Prof. Dr. FILLIPE VIEIRA ROCHA  
Departamento de Química / Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - UFSCar - São Carlos

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020

## DADOS CURRICULARES

**Nome:** Lorrane Davi Brito

**Nome em citações bibliográficas:** BRITO, L. D.

**Filiação:** Jair José de Brito

Rosemeira Davi

**Data de nascimento e local:** 06/05/1992, Campinas - SP

**Estado civil:** solteira

**Endereço:** Avenida Alberto Toloi, 185 – Araraquara - SP

**CEP:** 14800105

**Telefone:** (16) 997748009

**E\_mail:** lorranedbrito@gmail.com

**Resumo das qualificações:** Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, na área de síntese de peptídeos com ênfase em peptídeos antimicrobianos. Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste Paulista- UNOESTE, (2017).

## FORMAÇÃO ACADÊMICA

### 2017-2019

Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Instituto de Química de Araraquara.

Título: PLANEJAMENTO *IN SILICO* E SÍNTESE DE PEPTÍDEOS DERIVADOS DA PROTEÍNA YJHX: ESTUDOS DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DE DNA TOPOISOMERASES.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto.

Bolsista Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

### 2014-2017

Graduação em Ciências Biológicas Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Câmpus de Presidente Prudente, SP.

## ATUAÇÃO PROFISSIONAL

### 2017

Estágio supervisionado em laboratório de análises clínicas (EXAME) – Presidente Prudente, SP.

### 2015-2016

Iniciação Científica no Laboratório de Imunologia Clínica, Bioquímica e Histologia da UNOESTE, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leandra Ernst Kecher.

### 2016-2017

Iniciação Científica no Laboratório de Imunologia Clínica, Bioquímica e Histologia da UNOESTE, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leandra Ernst Kecher.

## **2016-2018**

Auxiliar de laboratório no Hospital Estadual Dr. Odilo Antunes de Siqueira de Presidente Prudente, SP

## **PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

### **ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS**

ARAUJO, C. S. ; BRITO, L. D. ; TARIFA, M. O. ; FARAH-DA-SILVA, N. J. ; RODRIGUES, K. S. ; CAVALCANTE, D. G. S. M. ; GOMES, A. S. ; ZOCOLER, M. A. YOSHIHARA, E. ; CAMPAROTO, M. L. ; JOB, A. E. ; KERCHE, L. E. . Protective effects of bark ethanolic extract from *Spondias dulcis* Forst F. against DNA damage induced by Benzo[a]pyrene and Cyclophosphamide. **GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**, 2019.

### **TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS**

BENITES, T. A.; MARCHETTO, R.; BRITO, L. D. A 2.0-kDa Peptide from ParD Protein as a Potential Antidote of Bacterial ParE Toxin. Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq). 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

BRITO, L. D.; LEITE, C. E. M.; ZOCOLER, MARCOS A.; KERCHE, L. E. Avaliação in vitro de efeitos genotóxicos e protetores do extrato etanólico da casca de *Spondias purpurea* L. Encontro Nacional de Ensino, Pesquisa e Extensão (ENEPE). 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

CAMARA, J. A. R.; ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; ZOCOLER, MARCOS A.; KERCHE, L. E. Avaliação in vitro do potencial antioxidante dos extratos etanólicos das cascas de *Spondias dulcis* forst F. e *Spondias purpurea* L. (ANACARDIACEAE). Encontro Nacional de Ensino, Pesquisa e Extensão (ENEPE). 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

TARIFA, M. O.; FARAH-DA-SILVA, N. J.; ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; CAVALCANTE, D. G. S. M; GOMES, A. S.; YOSHIHARA, E.; KERCHE-SILVA, L. E. In vivo assessment of mutagenic and protective effects of the bark ethanolic extract of *Spondias dulcis*. In: 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP). Ribeirão Preto. Abstracts of CIFARP, 2017. v. 11. p. 1101-1101. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

BRITO, L. D.; ARAUJO, C. S.; ZOCOLER, M. A.; KERCHE-SILVA, L. E. An evaluation, using the comet assay and the micronucleus test, of the antimutagenic effects of bark ethanolic extract of *Spondias purpurea* in mice. In: 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP). Ribeirão Preto. Abstracts of CIFARP, 2017. v. 11. p. 1000-1000. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; KERCHÉ-SILVA, L. E. Bark ethanolic extracts of *Spondias dulcis* and *Spondias purpurea* protects against oxidative stress induced by cyclophosphamide and benzo[a]pyrene in mice. In: 11th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP). Ribeirão Preto. Abstracts of CIFARP, 2017. v. 11. p. 1191-1191. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

BRITO, L. D.; ARAUJO, C. S.; ZOCOLER, M. A.; KERCHÉ-SILVA, L. E. Cytotoxic and Mutagenic Evaluation of Bark Ethanolic Extract from *Spondias Purpurea* L. and its Influence on Benzo[A]Pyrene-and Cyclophosphamide-Induced Mutagenicity: An in Vivo Analysis. I International Symposium of Experimental Pathology e VI Simpósio de Patologia Experimental da UEL. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; ZOCOLER, M. A.; KERCHÉ-SILVA, L. E. Bark Ethanolic Extract from *Spondias Dulcis* Forst F. Protects Against Alterations of the Redox Status Induced by Cyclophosphamide and Benzo[A]Pyrene in Mice. I International Symposium of Experimental Pathology e VI Simpósio de Patologia Experimental da UEL. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

TARIFA, M. O.; FARAH-DA-SILVA, N. J.; ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; KERCHÉ-SILVA, L. E. Avaliação in vivo da citotoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato etanólico da casca de *Spondias dulcis* Forst F. XVII Simpósio de Iniciação Científica. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

BRITO, L. D.; ARAUJO, C. S.; KERCHÉ-SILVA, L. E. Avaliação in vivo de efeitos citotóxicos e protetores do extrato etanólico da casca de *Spondias purpurea* L. XVII Simpósio de Iniciação Científica. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

ARAUJO, C. S.; BRITO, L. D.; KERCHÉ-SILVA, L. E. Avaliação do estresse oxidativo em animais tratados com extrato etanólico da casca de *Spondias dulcis* Forst F. (Anacardiaceae). XVII Simpósio de Iniciação Científica. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

**Com grande carinho,**

**A Deus.**

**Aos meus pais Jair e Rosemeire.**

**Aos meus irmãos Gustavo e Jonas.**

**A minha segunda mãe Célia.**

**E a todos os meus amigos tão queridos.**



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por sua presença em minha vida, por me direcionar e sustentar. Pela sua fidelidade, misericórdia e amor que tenho experimentado todos os dias.

Aos meus pais, Jair e Meire , e aos meus irmãos Gustavo e Jonas. Serei eternamente grata por todo zelo, apoio e amor que sempre me deram.

À minha segunda mãe, Celinha, por ser um exemplo de fé para mim. Serei sempre grata por todas as orações e por ser um canal de bençãos em minha vida.

Ao meu querido orientador Reinaldo Marchetto, pela oportunidade concedida. Não tenho como agradecer pela paciência, dedicação e por tudo que me ensinou.

À minha co-orientadora Camila, por quem tenho muito carinho. Sou muito grata por toda a sua disposição em me ajudar, sempre me atendendo prontamente, inclusive nos finais de semana.

Aos meus queridos companheiros de laboratório, Fauller, Carol, Jonatas, Bia, Greg, Gabi, Nat, Nayara, Leo, Bianca e Zaida pela convivência, risadas e pelas dificuldades compartilhadas e por toda a ajuda, em especial ao Aderson, Crusca e Daniela, pela contribuição para este trabalho.

Ao Aderson pelas análises de bioinformática, sem a qual esse trabalho não existiria.

Ao professor Saulo, por todo carinho e sugestões que contribuíram para este trabalho.

Ao professor Adelino, por tão gentilmente ter cedido as linhagens celulares.

Ao professor Paulo Inácio, por sua disposição em me ensinar e contribuir com o trabalho.

Às minhas queridas amigas, Marília, Maísa e Camila pelo ombro amigo, e por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos.

À seção de pós-graduação, em especial à Wennia, Célia, Cíntia, Ana Paula e Robson.

À Capes pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho, cujos nomes não foram citados, mas que sabem da sua importância.

Muito obrigada a todos!

*Por isso mesmo, vós, reunindo toda a vossa diligência, associai com a vossa fé a virtude; com a virtude, o conhecimento; com o conhecimento, o domínio próprio; com o domínio próprio, a perseverança; com a perseverança, a piedade; com a piedade, a fraternidade; com a fraternidade, o amor. (2 Pedro 1. 5 – 7)*

## RESUMO

O recém-descoberto sistema YjhX-YjhQ bacteriano é um sistema toxina-antitoxina (TA) do tipo II (formado por duas proteínas) que apresenta um grande potencial a ser estudado com o intuito de desenvolver potenciais fármacos, tanto com ação antimicrobiana como antitumoral. A toxina YjhX é uma pequena proteína de 85 resíduos de aminoácidos, sem homologia com outras toxinas e descrita como a primeira proteína endógena, de efeito neutralizante, específica para topoisomerase IA. A antitoxina YjhQ (181 resíduos de aminoácidos) é capaz de neutralizar a citotoxicidade de YjhX, pela formação de um complexo estável com a toxina. YjhX possui atividade citotóxica na replicação do DNA e na síntese do RNA, promovendo assim a interrupção do crescimento e consequente morte celular de *E. coli*. Algumas evidências tem sugerido que a interação toxina-enzima ocorre na extremidade N-terminal da toxina. Embora esta toxina possa ser encontrada em um grande número de microrganismos, ainda apresenta mecanismos de citotoxicidade e funções celulares a serem elucidadas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo planejamento *in silico* e a síntese de peptídeos derivados de YjhX e avaliar a capacidade inibitória de diferentes topoisomerases. Com base nas informações estruturais, obtidas por modelagem e dinâmica molecular, quatro sequências peptídicas derivadas de YjhX foram projetadas e sintetizadas pela metodologia da fase sólida. As sequências foram analisadas e purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência e caracterizadas por espectrometria de massas. A capacidade de inibição destes peptídeos sobre a atividade de diferentes topoisomerases foi avaliada por ensaios de eletroforese em gel. Ensaio de inibição do crescimento bacteriano, hemólise e viabilidade celular também foram realizados. Os peptídeos testados, não apresentaram atividade inibitória frente a DNA topoisomerases tipo II, mas inibiram a atividade da topoisomerases tipo I bacteriana. YjhXw-14I foi o único capaz de inibir 100% a atividade topo IA de *M. tuberculosis* na concentração de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Os ensaios microbiológicos envolvendo *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus agalactiae* mostraram baixa atividade antimicrobiana. Embora determinadas sequências tenham apresentado um índice de inibição superior a 50%, os resultados não são satisfatórios por estarem abaixo dos 90% de inibição. Os peptídeos estudados não são tóxicos para células humanas, tendo em vista os resultados nos ensaios de hemólise e viabilidade celular. A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, conclui-se que a  $\alpha$ -hélice N-terminal de YjhX não deve participar do processo de interação com a enzima e consequentemente do processo inibitório, ou que o domínio 1 da topo IA não é aquele mais provável para a interação com a toxina.

**Palavra-chave:** antitoxina YjhQ, peptídeos, topoisomerase, toxina YjhX.

## ABSTRACT

The newly discovered bacterial YjhX-YjhQ system is a type II toxin-antitoxin (TA) system (formed by two proteins) that has great potential to be studied in order to develop drug products, both with antimicrobial and anti-tumor action. The YjhX toxin is a small protein of 85 amino acid residues, without homology with other toxins and used as the first endogenous protein, with a neutralizing effect, specific for topoisomerase IA. The YjhQ antitoxin (181 amino acid residues) is able to neutralize the cytotoxicity of YjhX, by forming a stable complex with the toxin. YjhX has cytotoxic activity on DNA replication and RNA synthesis, thus promoting an interruption of growth and consequent cell death of *E. coli*. Some evidences suggested that the enzyme-toxin interaction occur at the N-terminal end of the toxin. Although this toxin can be found in a large number of microorganisms, there are still mechanisms of cytotoxicity and cellular functions to be elucidated. In this context, this work aimed at *in silico* planning and the detection of peptides derived from YjhX and evaluation of the inhibitory capacity of different topoisomerases. Based on the structural information, obtained by molecular modeling and molecular dynamics, four peptides sequences, derived from YjhX, were proposed and synthesized by solid phase peptide synthesis. The sequences were analyzed and purified by high performance liquid chromatography and characterized by mass spectrometry. The ability of these peptides to inhibit the activity of different topoisomerases was evaluated by gel electrophoresis assays. Evaluation of bacterial development inhibition, hemolysis, viability was also performed. The proposed peptides did not show inhibitory activity against DNA topoisomerases type II, but they inhibited the activity of bacterial type I topoisomerases. YjhXw-14I was the only one capable of inhibiting 100% of the top IA activity of *M. tuberculosis* at a concentration of  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Microbiological tests involving *Klebsiella pneumoniae* and *Streptococcus agalactiae* showed low antimicrobial activity. Although the sequences showed an inhibition index greater than 50%, the results are not satisfactory because they are below 90% inhibition. The studied peptides are not toxic to human cells, considering the results caused by hemolysis and cell viability tests. From the results obtained in this work, it is concluded that the N-helical terminal of YjhX should not participate in the interaction process with enzymes and, consequently, in the inhibitory process, or that domain 1 of the top of the IA is not the most likely to interact with toxin.

**Keyword:** YjhQ antitoxin, peptides, topoisomerase, YjhX toxin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mudanças topológicas no DNA catalisadas pelas DNA topoisomerases.....	21
<b>Figura 2.</b> Esquema dos domínios estruturais da DNA topoisomerase IA de <i>E. coli</i> (aminoácidos 32-509; pdb: 1ECL). Os domínios I, II, III e IV são mostrados em vermelho, azul, verde e laranja, respectivamente .....	24
<b>Figura 3.</b> Similaridade estrutural entre as enzimas DNA girase e topo IV. Subunidades da DNA girase, GyrA e GyrB; Subunidades da topo IV, ParC e ParE.....	26
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de manutenção de plasmídeos por morte pós-segregacional. . Durante o processo de divisão de uma célula bacteriana, por exemplo, uma das células-filhas recebe o plasmídeo e a outra não. Devido as células-filhas herdarem parte das moléculas de toxina e antitoxina presentes no citoplasma da célula-mãe, e a antitoxina ser rapidamente degradada, a célula desprovida do plasmídeo acaba sendo eliminada por não possuir o gene que expressa a antitoxina. ....	28
<b>Figura 5.</b> Estrutura primária da YjhX de <i>E. coli</i> alinhada à sequência de outros homólogos de <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Caulobacter crescentus</i> e <i>Myxococcus xanthus</i> . Resíduos de aminoácidos conservados e semi-conservados estão representados em vermelho e verde, respectivamente. ....	30
<b>Figura 6.</b> Estruturas da proteína YjhX de <i>E. coli</i> obtida por modelagem molecular. (A) diagrama de fitas; (B) distribuição de cargas na superfície; (C) sequência primária da proteína. As cores representadas em (C) correspondem àquelas apresentadas em (A). As cores na superfície em B representam regiões de maior densidade de carga negativa (vermelho), de carga positiva (azul) ou neutra (branca).....	31
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática de um processo típico de modelagem comparativa por homologia.....	34
<b>Figura 8.</b> Protetores usuais para o grupo $\alpha$ -amina na metodologia da fase sólida .....	37
<b>Figura 9.</b> . Esquema ilustrativo da SPFS. Os círculos coloridos formando a palavra PEPTÍDEO e as estrelas azuis representam, respectivamente, os resíduos de aminoácidos utilizados na síntese e os protetores permanentes das cadeias laterais reativas dos mesmos. ....	39
<b>Figura 10.</b> Estrutura primária das sequências peptídicas selecionadas por estudos computacionais.....	43
<b>Figura 11.</b> Representação da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda, (A) incidente e (B) transmitida, após interagir com a molécula dicrótica.....	46
<b>Figura 12.</b> Espectros típicos de DC mostrando o perfil característico de $\alpha$ - hélice, folha- $\beta$ e estrutura desordenada .....	46
<b>Figura 13.</b> . Estrutura 3D representativa do cluster mais prevalente da trajetória da simulação de DM obtida para o peptídeo YjhX1-24A em meio aquoso. Abaixo sua estrutura primária correspondente .....	54
<b>Figura 14.</b> . Estrutura 3D representativa do cluster mais prevalente da trajetória da simulação de DM obtida para o peptídeo YjhX1-15A em meio aquoso. Abaixo sua estrutura primária correspondente .....	54
<b>Figura 15.</b> . Estrutura 3D representativa do cluster mais prevalente da trajetória da simulação de DM obtida para o peptídeo YjhXw-14I em meio aquoso. Abaixo sua estrutura primária correspondente. ....	55
<b>Figura 16.</b> . Estrutura 3D representativa do cluster mais prevalente da trajetória da simulação de DM obtida para o peptídeo YjhXw-14L em meio aquoso. Abaixo sua estrutura primária correspondente. ....	55
<b>Figura 17.</b> Estrutura molecular parcial de uma Rink Amida MBHA Resina .....	56
<b>Figura 18.</b> Perfil cromatográfico obtido em escala analítica do peptídeo <b>YjhX1-24A</b> antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 $\mu$ m; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm .....	57

<b>Figura 19.</b> Perfil cromatográfico obtido em escala analítica do peptídeo <b>YjhX1-15A</b> antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm .....	58
<b>Figura 20.</b> Perfil cromatográfico obtido em escala analítica do peptídeo <b>YjhXw-14I</b> antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm .....	58
<b>Figura 21.</b> Perfil cromatográfico obtido em escala analítica do peptídeo <b>YjhXw-14L</b> antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm .....	59
<b>Figura 22.</b> Espectro de massas do peptídeo <b>YjhX1-24A</b> . Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES+ .....	60
<b>Figura 23.</b> Espectro de massas do peptídeo <b>YjhX1-15A</b> . Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES+ .....	60
<b>Figura 24.</b> Espectro de massas do peptídeo <b>YjhXw-14I</b> . Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES+ .....	60
<b>Figura 25.</b> Espectro de massas do peptídeo <b>YjhXw-14L</b> . Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES+ .....	61
<b>Figura 26.</b> Espectros de DC obtidos para os peptídeos (A) <b>YjhX1-24A</b> , (B) <b>YjhX1-15A</b> , (C) <b>YjhXw-14I</b> e (D) <b>YjhXw-14L</b> , em solução aquosa e solução TFE 60% em água. ....	62
<b>Figura 27.</b> Triagem inicial dos peptídeos sobre a inibição da atividade da <b>topo IA de M. tuberculosis</b> . C-: controle negativo (plasmídeo relaxado); C+: controle positivo (plasmídeo relaxado + 1U de topo IA). Linhas 1 a 4 representam respectivamente os peptídeos: <b>YjhXw-14I</b> , <b>YjhXw-14L</b> , <b>YjhX1-24A</b> e <b>YjhX1-15A</b> na concentração de 100 µmol.L <sup>-1</sup> .....	64
<b>Figura 28.</b> Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de triagem inicial dos peptídeos sobre a atividade de inibição da <b>topo IA de M. tuberculosis</b> . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Linhas 1 a 4: representam respectivamente os peptídeos: <b>YjhXw-14I</b> , <b>YjhXw-14L</b> , <b>YjhX1-24A</b> e <b>YjhX1-15A</b> na concentração de 100 µmol.L <sup>-1</sup> .....	64
<b>Figura 29.</b> Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo <b>YjhXw-14I</b> sobre a atividade da <b>topo IA de M. tuberculosis</b> . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração dos peptídeos em µmol.L <sup>-1</sup> .....	65
<b>Figura 30.</b> Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da atividade da <b>topo IA de M. tuberculosis</b> do peptídeo <b>YjhXw-14I</b> . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração dos peptídeos em µmol.L <sup>-1</sup> .....	65
<b>Figura 31.</b> Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo <b>YjhXw-14L</b> sobre a atividade da <b>topo IA de M. tuberculosis</b> . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração dos peptídeos em µmol.L <sup>-1</sup> .....	66
<b>Figura 32.</b> Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da atividade da <b>topo IA de M. tuberculosis</b> do peptídeo <b>YjhXw-14L</b> . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Números em cada aplicação no gel representam a concentração dos peptídeos em µmol.L <sup>-1</sup> .....	66
<b>Figura 33.</b> Triagem inicial dos peptídeos sobre a inibição da atividade da <b>DNA girase de E. coli</b> . C-: controle negativo (plasmídeo relaxado); C+: controle positivo (plasmídeo relaxado + 1U de girase). Linhas 1 a 4 representam respectivamente os peptídeos: <b>YjhXw-14I</b> , <b>YjhXw-14L</b> , <b>YjhX1-24A</b> e <b>YjhX1-15A</b> na concentração de 100 µmol.L <sup>-1</sup> .....	68

<b>Figura 34.</b> Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de triagem inicial dos peptídeos sobre a atividade de inibição da <b>DNA girase de E. coli</b> . C-: controle negativo (plasmídeo relaxado); C+: controle positivo (plasmídeo relaxado + 1U de DNA girase). Linhas 1 a 4: representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	69
<b>Figura 35.</b> Triagem inicial dos peptídeos sobre a inibição da atividade da <b>topo IV de E. coli</b> . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IV). Linhas 1 a 4 representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	70
<b>Figura 36.</b> Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de triagem inicial dos peptídeos sobre a atividade de inibição da topo IV de E. coli. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IV). Linhas 1 a 4: representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	70
<b>Figura 37.</b> Triagem inicial dos peptídeos sobre a inibição da atividade da <b>topo II<math>\alpha</math></b> . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de girase). Linhas 1 a 4 representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	71
<b>Figura 38.</b> Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de triagem inicial dos peptídeos sobre a atividade de inibição da <b>topo II<math>\alpha</math></b> . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Linhas 1 a 4: representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	72
<b>Figura 39.</b> Triagem inicial dos peptídeos sobre a inibição da atividade da <b>topo II<math>\beta</math></b> . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de girase). Linhas 1 a 4 representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	72
<b>Figura 40.</b> Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de triagem inicial dos peptídeos sobre a atividade de inibição da <b>topo II<math>\beta</math></b> . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Linhas 1 a 4: representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	73
<b>Figura 41.</b> Triagem inicial dos peptídeos sobre a inibição da atividade da <b>htopo IB</b> . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de girase). Linhas 1 a 4 representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	74
<b>Figura 42.</b> Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de triagem inicial dos peptídeos sobre a atividade de inibição da topo IB. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Linhas 1 a 4: representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	74
<b>Figura 43.</b> Viabilidade celular de células humanas MCF-7 de adenocarcinoma de mama tratadas por 24h com os peptídeos YjhX-24A, YjhX-15A, YjhXw-14I e Yjhw-14L conforme determinado pelo teste MTT. ....	78



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das Topoisomerases.....	22
<b>Tabela 2.</b> Protocolo sintético padrão utilizando DIC/HOBt (estratégia Fmoc-tBu).....	43
<b>Tabela 3.</b> Composição dos kits de ensaio utilizados no teste de inibição enzimática: topoisomerase IA de <i>M. Tuberculosis</i> (Mtb) .....	47
<b>Tabela 4.</b> Composição dos kits de ensaio utilizados no teste de inibição enzimática: DNA girase ( <i>E. coli</i> ).....	48
<b>Tabela 5.</b> Composição dos kits de ensaio utilizados no teste de inibição enzimática: topoisomerase IV ( <i>E. coli</i> ) .....	48
<b>Tabela 6.</b> Composição dos kits de ensaio utilizados no teste de inibição enzimática: topoisomerase II humana $\alpha$ e $\beta$ .....	48
<b>Tabela 7.</b> Resultado das análises de espectrometria de massas .....	61
<b>Tabela 8.</b> Comparação da atividade inibitória dos peptídeos sintéticos derivados de YjhX sobre a topoisomerase IA de <i>M. tuberculosis</i> .....	67
<b>Tabela 9.</b> Percentual da atividade hemolítica dos peptídeos YjhX1-24A, Yjhx1-15A, YjhXw14I e YjhXw-14L, em diferentes concentrações ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) .....	75
<b>Tabela 10.</b> Resultados das absorvâncias (625nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento de crescimento bacteriano para <b>K. pneumoniae</b> utilizando os análogos peptídicos YjhX1-24A, Yjhx1-15A, YjhXw14I e YjhXw-14L, a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	76
<b>Tabela 11.</b> Resultados das absorvâncias (625nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento de crescimento bacteriano para <b>S. agalactiae</b> utilizando os análogos peptídicos YjhX1-24A, Yjhx1-15A, YjhXw14I e YjhXw-14L a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### 1. Aminoácidos

Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Ácido aspártico
Cys (C)	Cisteína
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido glutâmico
Gly (G)	Glicina
His (H)	Histidina
Ile (I)	Isoleucina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Met (M)	Metionina
Phe (F)	Fenilalanina
Pro (P)	Prolina
Ser (S)	Serina
Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptofano
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina

## 2. Outras terminologias:

ACN	Acetonitrila
DCM	Diclorometano
Boc	t-Butiloxicarbonila
DIC	Diisopropilcarbodiimida
CD	Dicroísmo circular
DM	Dinâmica molecular
DMF	N,N-Dimetilformamida
EDT	1,2-etanoditiol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonila
HOBt	N-Hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio
PDB	Protein data bank
RMSD	Root mean square deviation (Desvio da raiz quadrada média)
STEB	Carregador de DNA sacarose, tris, EDTA e azul de bromofenol
TA	Sistema toxina-antitoxina
TBE	Tampão para eletroforese tris/borato/EDTA
tBu	terc-butila
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	Trifluoroetanol
TIS	Triisopropilsilano
Topo I Mtb	Topoisomerase de <i>M. tuberculosis</i>
hTopoIB	Topoisomerase IB humana
Topo II $\alpha$	Topoisomerase II $\alpha$
Topo II $\beta$	Topoisomerase II $\beta$
Topo IV	Topoisomerase IV

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	<b>19</b>
<b>1.1 DNA Topoisomerases</b>	<b>20</b>
1.1.1 DNA Topoisomerases tipo IA	23
1.1.2 DNA Topoisomerases tipo IIA	24
<b>1.2 Sistemas Toxina-Antitoxina (TA)</b>	<b>27</b>
<b>1.3 Estudos <i>in silico</i></b>	<b>31</b>
1.3.1 Modelagem Molecular	31
1.3.2 Modelagem comparativa ou por homologia	32
1.3.3 Simulação de dinâmica molecular associada a docking	35
<b>1.4 Química de peptídeos</b>	<b>35</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>40</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Estudos de Bioinformática</b>	<b>41</b>
<b>3.2 Síntese de peptídeos</b>	<b>43</b>
<b>3.3 Análise, purificação e caracterização</b>	<b>44</b>
<b>3.4 Dicroísmo Circular</b>	<b>45</b>
<b>3.5 Ensaio de inibição enzimática</b>	<b>47</b>
<b>3.6 Atividade hemolítica</b>	<b>49</b>
<b>3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana</b>	<b>50</b>
<b>3.8 Viabilidade celular</b>	<b>52</b>
<b>4. Resultados e Discussões</b>	<b>53</b>
<b>4.1 Estudos de Bioinformática</b>	<b>53</b>
<b>4.2 Síntese e purificação dos peptídeos</b>	<b>56</b>
<b>4.3 Espectrometria de massas</b>	<b>59</b>
<b>4.4 Dicroísmo Circular</b>	<b>62</b>
<b>4.5 Ensaio de inibição da atividade de DNA Topoisomerases</b>	<b>63</b>
4.5.1 DNA topoisomerases bacterianas	63
4.5.2 DNA topoisomerases humanas	71
<b>4.6 Avaliação da atividade hemolítica</b>	<b>75</b>
<b>4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana</b>	<b>75</b>
<b>4.8 Viabilidade celular</b>	<b>78</b>
<b>5. Conclusões</b>	<b>79</b>
<b>6. Referências</b>	<b>81</b>

## 1. Introdução

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana, o que pode ser explicado, em grande parte, pelo surgimento de microrganismos multirresistentes ou tolerantes aos medicamentos existentes no mercado. A resistência e a tolerância aos antimicrobianos, um fenômeno natural, está relacionada à existência de diferentes mecanismos bioquímicos que inibem a ação dos antimicrobianos (LOHNER; STAUDEGGER, 2001; WANG; WOOD, 2011). Os mecanismos descritos na literatura para o surgimento de resistência seriam as mutações, que resultam em modificações no material genético dos microrganismos e a transferência de genes, causada por mecanismos de transdução, transformação e conjugação de elementos genéticos como plasmídeos e transposons (MARTÍNEZ, 2012). Por outro lado, a tolerância está relacionada com um mecanismo que vem sendo estudado de forma crescente, que é a persistência bacteriana, um fenômeno no qual subpopulações de células não mutantes sobrevivem ao tratamento de antibióticos. Em razão de se tratar de um fenótipo temporário, é importante enfatizar que as células persistentes não são resistentes a esses compostos, mas apenas tolerantes. Isso significa que elas não crescem na presença deles, mas também não morrem, sendo essa particularidade o elemento-chave desse grupo celular (HELAINÉ; KUGELBERG, 2014; KEREN et al., 2004).

Atualmente, as empresas farmacêuticas têm dedicado grandes esforços para obter novas versões de velhas classes de antibióticos, abandonando pesquisas que têm como foco moléculas inexploradas. Como resultado, há uma diminuição da capacidade total de geração de novos bactericidas (FERNANDES; MARTENS, 2017; PAYNE, 2008). O cenário atual demonstra a inserção em uma era pós-antibióticos, já que o número de novos antibióticos no mercado diminuiu significativamente nos últimos anos (LUEPKE et al., 2017). Na década de 2000, somente dez novas entidades de fármacos foram aprovadas, o que fez com que a Organização Mundial de Saúde (OMS) incluísse os agentes antimicrobianos na lista de medicamentos prioritários para o mundo (KAPLAN et al., 2013).

Portanto, o desenvolvimento de medicamentos a partir de moléculas que apresentem ação contra diferentes organismos e que possam atuar em conjunto com drogas já existentes, criando um efeito aditivo ou sinérgico, é um campo biotecnológico bastante atrativo e promissor, onde compreender as suas estruturas e

os seus mecanismos de ação é certamente a “chave” para a síntese de fármacos mais eficientes (MAISONNEUVE; CAMARGO; GERDES, 2013; NAGHMOUCHI et al., 2012).

Neste contexto, proteínas que constituem os denominados sistemas toxina-antitoxina (TA), amplamente difundidos em organismos procarióticos, apresentam - se como modelos interessantes para alcançar estes objetivos, em decorrência da sua extensa distribuição nos genomas procarióticos e funções exercidas, as quais estão diretamente relacionadas à sobrevivência e patogenicidade bacteriana (BANIN; HUGHES; KUIPERS, 2017; WANG; WOOD, 2011).

Dentre os diversos sistemas TA, destaca-se o YjhX-YjhQ, um dos sistemas mais recentes descritos na literatura (YAMAGUCHI; INOUE, 2015), sendo a proteína YjhX uma toxina que atua inibindo a atividade das DNA topoisomerasas.

### **1.1 DNA Topoisomerasas**

As DNA topoisomerasas constituem um grupo de enzimas que se tornou alvo efetivo para vários agentes terapêuticos. Tais enzimas estão presentes em todas as células (procarióticas e eucarióticas) e catalisam mudanças topológicas no DNA, essenciais ao metabolismo e, portanto, para a viabilidade celular (WANG, 1985; REECE; MAXWELL, 1991).

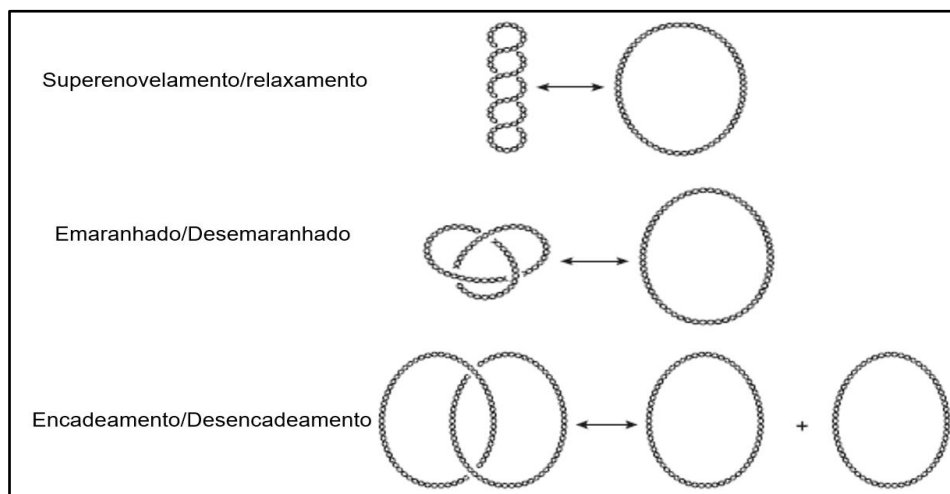
O grande interesse nas DNA topoisomerasas nos últimos anos decorre não somente do reconhecimento de seu papel crucial na gestão da topologia do DNA, mas também da variedade de fármacos identificados, que atuam na atividade destas enzimas, que incluem tanto agentes antimicrobianos quanto antineoplásicos (POMMIER et al., 2010; TOMAŠIĆ; MAŠIĆ, 2014; TSE-DINH, 2016).

A necessidade fundamental das topoisomerasas deriva da estrutura de dupla-hélice do DNA, do seu superenovelamento (torção da dupla hélice sobre seu próprio eixo) e da necessidade de separação das duas fitas da hélice durante a realização de suas funções metabólicas.

Estas enzimas introduzem uma quebra transitória em um segmento do DNA, seguida da passagem de outro segmento por essa abertura, de modo a reduzir as tensões presentes na molécula devido ao seu alto estado de compactação (CHAMPOUX, 2001). O relaxamento do DNA é uma reação comum a todas as topoisomerasas; entretanto, outras reações também são catalisadas por diversas

enzimas deste grupo, tais como a introdução de superhélices negativas ou positivas, o encadeamento ou desencadeamento de dois DNAs duplex cíclicos e a introdução e remoção de emaranhados de uma única molécula de DNA duplex circular (KREUZER; COZZARELLI, 1980; HOLDEN, 2001) (Figura 1).

**Figura 1.** Mudanças topológicas no DNA catalisadas pelas DNA topoisomerases



**Fonte:** Adaptado de Holden (2001).

Com base em seus mecanismos de ação e semelhanças sequenciais, as DNA-topoisomerases são divididas em duas principais classes: tipo I e tipo II. Ambas eliminam o superenrolamento do DNA que ocorre normalmente nas células durante a replicação, reparo e recombinação do DNA, bem como na segregação dos cromossomos-filhos nas células em divisão (VOET; VOET, 2013), porém se diferenciam no mecanismo de ação. As topoisomerases do tipo I agem pela quebra transitória de uma das duas fitas do DNA, rodando uma das extremidades sobre a fita não quebrada e reunindo as extremidades quebradas, não sendo necessário nenhum cofator de energia para realizar esta reação. Esta movimentação proporciona uma alteração no número de ligações das fitas, em aumentos de uma unidade. As topoisomerases do tipo II quebram as duas fitas do DNA simultaneamente, reunindo-as, posteriormente, resultando num aumento do número de ligações em duas unidades, sendo necessário ATP para a realização deste evento (CORBETT; BERGER, 2004). Estas duas classes podem ainda conter subgrupos específicos, sendo que a nomenclatura dessas enzimas foi designada de acordo com a descoberta de cada uma delas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Classificação das Topoisomerases

Topoisomerases <sup>a</sup>	Tipo da subfamília	Estrutura da subunidade	Tamanho (aa) <sup>b</sup>
DNA topoisomerase I de Eubactéria ( <i>E. coli</i> )	IA	Monômero	865
DNA topoisomerase III de Eubactéria ( <i>E. coli</i> )	IA	Monômero	653
DNA topoisomerase III $\alpha$ de Mamífero (humana)	IA	Monômero	1001
DNA topoisomerase III $\beta$ de Mamífero (humana)	IA	Monômero	862
Girase reversa de Arqueobactéria ( <i>M. kandleri</i> ) <sup>c</sup>	IA	Heterodímero	A, 358; B, 1221
DNA topoisomerase I Eucariótica (humana)	IB	Monômero	765
DNA topoisomerase de Poxvírus (vaccinia)	IB	Monômero	314
DNA topoisomerase V de Eubactéria ( <i>M. kandleri</i> )	IC	Monômero	984
DNA girase de Eubactéria ( <i>E. coli</i> )	IIA	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> heterotetâmero	GyrA, 875; GyrB, 804
DNA topoisomerase IV de Eubactéria ( <i>E. coli</i> )	IIA	C <sub>2</sub> C <sub>4</sub> heterotetramero	ParC, 752; ParE, 630
DNA topoisomerase II de Levedura ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	IIA	Homodímero	1428
DNA topoisomerase II de Mamífero (humana)	IIA	Homodímero	1531
DNA topoisomerase VI de Arqueobactéria ( <i>Sulfolobus shibatae</i> )	IIB	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> heterotetâmero	A, 389; B, 530

<sup>a</sup> Em parênteses os membros das famílias mais estudados

<sup>b</sup> Tamanhos das subunidades, em número de aminoácidos, correspondentes ao membro da família mais estudado.

<sup>c</sup> Única girase reversa conhecida com uma estrutura heterodimérica.

**Fonte:** Adaptado de CHAMPOUX (2001).



Em *Escherichia coli* foram descritas as topo I, III e IV, em eucariotos, as topo I, II e III e em Archaea, topo V e VI. Ainda por essa nomenclatura, as topoisomerases do tipo I, com exceção da girase reversa, usam números ímpares em sua nomenclatura. Já as topoisomerases tipo II usam números pares em sua nomenclatura, com exceção da DNA girase (subfamílias topo II, IV e VI) (WANG, 2005; FORTERRE et al., 2007).

Ambas, DNA topoisomerase do tipo I e do tipo II, foram utilizadas neste trabalho, mais especificamente aquelas pertencentes às subfamílias IA e IIA.

### 1.1.1 DNA Topoisomerases tipo IA

A subfamília IA é constituída pelas topoisomerases I e III bacterianas, topoisomerases III de eucariotos e girase reversa de arqueobactérias (SRIVENUGOPAL; LOCKSHON; MORRIS, 1984; SLESAREV et al., 1993, CHAMPOUX, 2001). Estas enzimas são todas monoméricas, com exceção da girase reversa da bactéria *Methanopyrus kandleri*, a qual consiste em um heterodímero (KRAH et al., 1996). A topoisomerase IA de *E. coli* foi o primeiro membro a ser descoberto, tendo sido inicialmente denominada de “proteína  $\omega$ ”, devido a sua purificação por ultracentrifugação que utiliza  $\omega$  como parâmetro de velocidade (WANG, 1971; POMMIER, 2010).

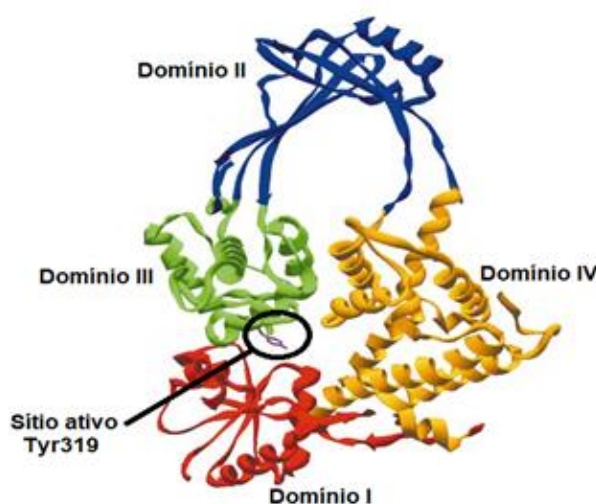
As enzimas da subfamília IA possuem uma massa molecular de aproximadamente 67 kDa, forma toroidal, sendo seu núcleo constituído de quatro domínios que formam uma cavidade com carga positiva, onde o sítio ativo se encontra na interseção de dois domínios que podem se separar para formar uma abertura que permite que o DNA possa entrar e sair do orifício central (CHAMPOUX, 2001; TEREKHOVA et al., 2012) (Figura 2). Para realização da atividade catalítica, tais enzimas requerem íons de metal divalentes ( $Mg^{+2}$  e  $Zn^{+2}$ ) e a exposição de uma região de fita simples do DNA.

A clivagem de uma cadeia de DNA é acompanhada pela ligação covalente 5'-fosfotirosil, formando uma ponte enzima/fita única com o DNA, permitindo assim a passagem de uma única ou dupla fita através da abertura gerada. Este mecanismo de passagem das fitas possibilita o relaxamento de superenrolamentos negativos do DNA, bem como emaranhar/desemaranhar e entrelaçar/desentrelaçar moléculas de

DNA (TSE-DINH; WANG, 1980, TSE-DINH et al., 1980; BROWN; COZZARELLI, 1981, CHAMPOUX, 2002; TEREKHOVA et al., 2012).

Constituintes de todos os patógenos bacterianos, as topoisomerasas tipo IA têm sido consideradas alvos potenciais para a descoberta de novos agentes antimicrobianos (TSE-DINH, 2015). Entretanto, as topoisomerasas desta subfamília ainda não constituem alvos terapêuticos clínicos e poucos relatos têm sido encontrados na literatura explorando estas enzimas para o desenvolvimento de novos antibióticos (CHENG; LIU; TSE-DINH, 2007; BANSAL et al., 2012; YAMAGUCHI; INOUE, 2015).

**Figura 2.** Esquema dos domínios estruturais da DNA topoisomerase IA de *E. coli* (aminoácidos 32-509; pdb: 1ECL). Os domínios I, II, III e IV são mostrados em vermelho, azul, verde e laranja, respectivamente



**Fonte:** Adaptado de CHAMPOUX (2001).

## 1.1.2 DNA Topoisomerasas tipo IIA

### 1.1.2.1 DNA girase e Topoisomerase IV

DNA girase e topoisomerase IV (topo IV) são enzimas tipo IIA que representam alvos validados de terapia antibacteriana. Estas enzimas compartilham considerável similaridade na sequência de aminoácidos e atuam essencialmente do mesmo modo, ou seja, pela formação de uma quebra simultânea em ambas as fitas do DNA e pela catálise da passagem do DNA dúplice, reunindo as extremidades quebradas

posteriormente (TSE-DINH, 2009).

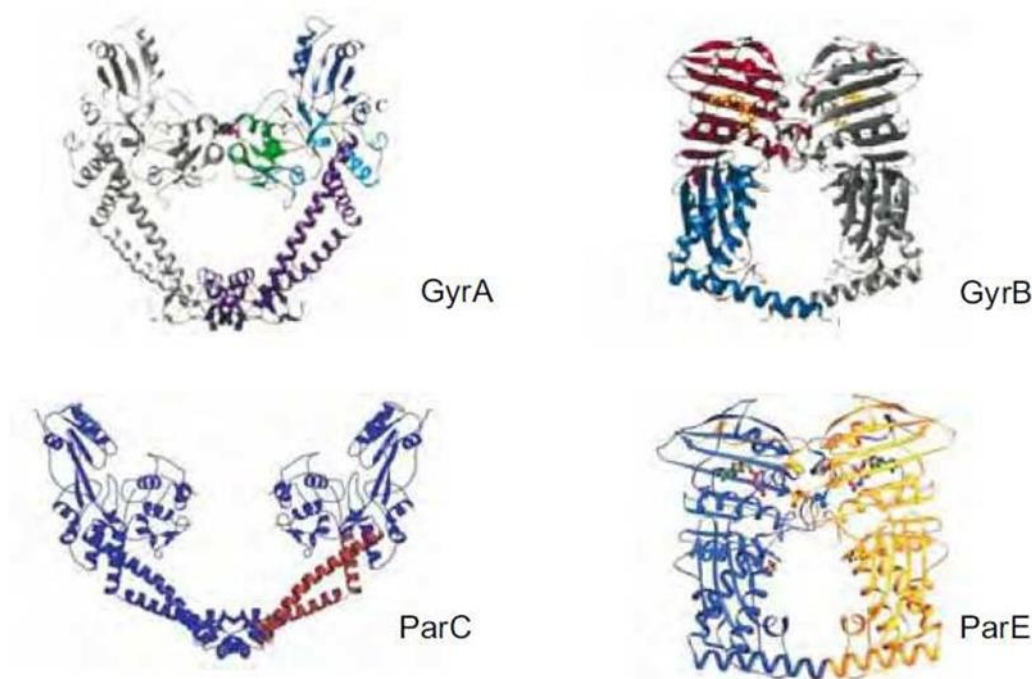
A DNA girase tem sido isolada de diferentes espécies bacterianas, sendo que a girase de *Escherichia coli* representa a enzima mais bem estudada em termos de estrutura e funções bioquímicas. Esta enzima é constituída de duas subunidades A (GyrA) e duas B (GyrB), as quais estão unidas formando um heterotetrâmero  $A_2B_2$ , que corresponde à sua forma ativa (REECE; MAXWELL, 1991; WIGLEY et al., 1995). A subunidade A tem um peso molecular de 97 kDa e é constituída de um domínio amino-terminal (64 kDa), que é essencial para o mecanismo de quebra-união do DNA, além de um domínio carboxi-terminal (33 kDa), responsável por interações DNA-proteína (REECE; MAXWELL, 1991; MAXWELL, 1993). A subunidade B (90-kDa) contém um domínio amino-terminal (43-kDa), o qual inclui o sítio de ligação do ATP, bem como um domínio carboxi-terminal (47-kDa) envolvido na interação com a subunidade GyrA e com o DNA (NOLLMANN et al., 2007).

A topo IV compartilha considerável similaridade estrutural e catalítica com a DNA girase, sendo também constituída por quatro subunidades, duas ParC (84 kDa) e duas ParE (70 kDa), tendo como forma ativa o heterotetrâmero  $ParC_2ParE_2$  (PENG; MARIANS, 1993; POMMIER, 2010). Semelhantemente à GyrA, a subunidade ParC possui na região C-terminal o sítio de ligação com o DNA, enquanto a região N-terminal contém o domínio que envolve a clivagem e religação do DNA. A subunidade ParE, possui na região C-terminal o domínio que envolve a interação com ParC e na região N-terminal o sítio de hidrólise de ATP (PENG; MARIANS, 1995) (Figura 3).

Apesar da similaridade entre as enzimas, elas diferem entre si em um aspecto fundamental: a DNA girase envolve o DNA ao redor de si mesma, enquanto a topo IV não. Essa sutil diferença favorece a atividade da topo IV no desencadeamento do DNA, além de dotá-la de certa especificidade em termos de relaxamento, enquanto que a girase adiciona superenrolamento negativo ao DNA (NEUMAN, 2010).

A DNA girase e topo IV são bons alvos para quimioterapia antibacteriana, pois são essenciais em todas as bactérias para replicação e divisão celular; o acúmulo de complexos de clivagem formados durante a ação de ambas tem efeito bactericida (não apenas bacteriostático); os agentes antibacterianos mostram um nível de especificidade/seletividade para enzimas procarióticas pelo menos três ordens de magnitude mais alta do que para enzimas eucarióticas; e por possuírem alto grau de homologia, agentes inibidores tendem a alvejar ambas as enzimas (POMMIER, 2010).

**Figura 3.** Similaridade estrutural entre as enzimas DNA girase e topo IV. Subunidades da DNA girase, GyrA e GyrB; Subunidades da topo IV, ParC e ParE.



**Fonte:** PENG; MARIANS (1995).

### 1.1.2.2 DNA Topoisomerase tipo IIA humana

A DNA topoisomerase tipo II humana inclui duas isoformas, II $\alpha$  e II $\beta$ . Estas são codificadas por genes separados e apresentam diferenças em estrutura, função e padrão de expressão, embora compartilhem cerca de 68% e 78% de identidade entre si e entre suas porções catalíticas, respectivamente (WENDORFF et al., 2012; HIGGINS, 2012).

Estas enzimas apresentam estrutura dimérica, sendo cada subunidade constituída de três domínios, sendo um domínio N-terminal ATPase; um domínio central, o qual possui o sítio ativo (Tyr-805 e Tyr-821 das topoisomerases II $\alpha$  e II $\beta$ , respectivamente) responsável pela quebra/união do DNA; e um domínio C-terminal, muito variável, estando envolvido no reconhecimento da geometria de moléculas de DNA (MCCLENDON; OSHEROFF, 2007).

As isoformas II $\alpha$  e II $\beta$  possuem diferentes padrões de expressão. Topoisomerases II $\alpha$  (170kDa) são indispensáveis para a sobrevivência das células em proliferação, sendo que seus níveis aumentam significativamente durante o período

de crescimento celular, e são requeridas para os eventos relacionados à mitose, replicação do DNA e segregação dos cromossomos. Já as enzimas II $\beta$  (180 kDa) são expressas em todas as células e, diferentemente das topoisomerases II $\alpha$ , não são essenciais para as células de proliferação rápida, sendo sua concentração independente dos ciclos de crescimento celular. Outra diferença é que as enzimas II $\beta$  não apresentam a capacidade de distinguir a geometria dos superenrolamentos do DNA durante o relaxamento *in vitro*, enquanto que as topoisomerases II $\alpha$  são capazes de relaxar o DNA superenrolado positivamente cerca de 10 vezes mais rápido do que o DNA superenrolado negativo (DEWEESE; OSHEROFF, 2009; WENDORFF et al., 2012; HIGGINS, 2012). Devido à sua importância na proliferação celular, a expressão das topoisomerases II $\alpha$  tem sido usada como marcador de células cancerígenas. Ambas as topoisomerases II humanas têm se tornado alvos altamente efetivos de diversos fármacos antitumorais de origem sintética ou natural. Agentes como o etoposídeo e a doxorubicina estão na linha de frente do tratamento de uma variedade de cânceres sistêmicos e tumores sólidos (MCCLENDON; OSHEROFF, 2007; WENDORFF et al., 2012).

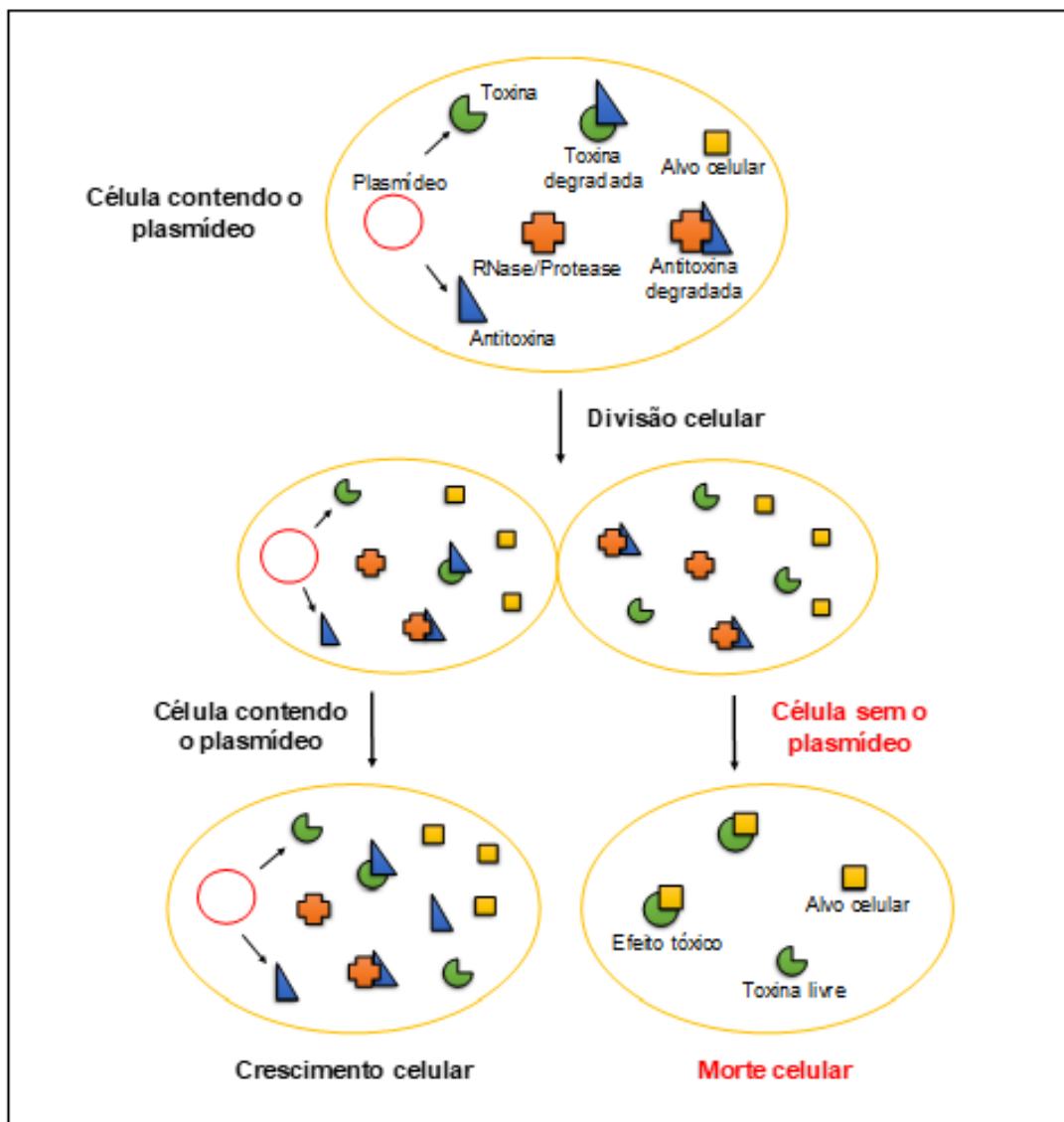
## 1.2 Sistemas Toxina-Antitoxina (TA)

Amplamente difundidos em organismos procarióticos, os sistemas toxina-antitoxina (TA) são importantes módulos genéticos formados, geralmente, por dois elementos, sendo eles uma toxina e uma antitoxina cognata. Em condições favoráveis ao crescimento celular, a toxina é normalmente neutralizada pela antitoxina. Contudo, sob condições de estresse (tal como na escassez de nutrientes e presença de substâncias nocivas) as antitoxinas são rapidamente degradadas por proteases e RNases, tornando as toxinas livres para agir sobre os seus alvos com consequente interferência em processos celulares fundamentais, como a replicação do DNA, tradução de proteínas e produção de ATP (BARBOSA et al., 2014; MASUDA; INOUE, 2017).

Os sistemas TA foram descobertos inicialmente em plasmídeos como um mecanismo de manutenção desses fragmentos de DNA extracromossomais, processo denominado de morte pós-segregacional (Figura 4). Posteriormente, também foram encontrados nos cromossomos de bactérias e arqueobactérias participando de outros eventos celulares importantes, tais como a formação de biofilmes, proteção contra

bacteriófagos, reparação do DNA cromossomal e resposta a condições adversas (BUSTAMANTE; IREDELL, 2017; PAGE; PETI, 2016), além de estarem diretamente associados à persistência bacteriana (fenômeno em que bactérias exibem tolerância temporária a antibióticos) (HALL; GOLLAN; HELAINE, 2017). Desta forma, os módulos TA podem ser compreendidos basicamente como entidades genéticas que regulam o crescimento celular em procariontos.

**Figura 4.** Mecanismo de manutenção de plasmídeos por morte pós-segregacional. . Durante o processo de divisão de uma célula bacteriana, por exemplo, uma das células-filhas recebe o plasmídeo e a outra não. Devido as células-filhas herdarem parte das moléculas de toxina e antitoxina presentes no citoplasma da célula-mãe, e a antitoxina ser rapidamente degradada, a célula desprovida do plasmídeo acaba sendo eliminada por não possuir o gene que expressa a antitoxina.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

De acordo com a natureza da antitoxina (RNA ou polipeptídeo) e o seu modo de interação com a toxina (sempre um polipeptídeo), os sistemas TA são atualmente agrupados em seis tipos: I à VI (PAGE; PETI, 2016).

No sistema tipo I, a antitoxina é um RNA *antisense* que suprime o efeito da toxina através da ligação ao seu mRNA, em que a formação do duplex inibe o seu processo de tradução. Já no sistema tipo III, a antitoxina também é um RNA, mas não um RNA *antisense*. A toxina é neutralizada por meio da formação do complexo TA, ou seja, por meio da interação direta entre as moléculas (BLOWER et al., 2012; FOZO et al., 2010).

Nos sistemas tipo II, IV, V e VI as antitoxinas são polipeptídeos, porém, diferem nos seus mecanismos de ação. Assim, enquanto que no tipo II a antitoxina se liga diretamente à toxina para neutralizar a sua toxicidade, no sistema tipo IV ela atua como antagonista, anulando a toxina ao interagir com o seu alvo celular e no tipo V funciona como RNase, clivando o mRNA que codifica a toxina, impossibilitando a sua expressão. Por último, no tipo VI, a antitoxina se liga à toxina induzindo a degradação do complexo pela protease ClpXP (AAKRE et al., 2013; GERDES; CHRISTENSEN; LØBNER-OLESEN, 2005; LEPLAE et al., 2011; MASUDA et al., 2012; WANG et al., 2012).

Um interessante sistema TA do tipo II foi descrito recentemente na literatura, sendo denominado YjhX-YjhQ (YAMAGUCHI; INOUE, 2015). A toxina YjhX não possui homologia com quaisquer outras toxinas. A Figura 5 mostra o alinhamento da estrutura primária da proteína YjhX de diferentes microrganismos, mostrando uma maior conservação de aminoácidos na extremidade N-terminal da toxina, evidenciando que sua interação com a enzima deva ocorrer nesta região. A antitoxina YjhQ é capaz de neutralizar a ação da toxina YjhX, a qual possui atividade citotóxica na replicação do DNA e na síntese de RNA por interferir na atividade da DNA topoisomerase IA. De acordo com estudos realizados por Yamaguchi e Inoue (2015), a YjhX representa a primeira proteína endógena inibidora específica da topoisomerase IA de *E. coli*.



**Figura 5.** Estrutura primária da YjhX de *E. coli* alinhada à sequência de outros homólogos de *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Caulobacter crescentus* e *Myxococcus xanthus*. Resíduos de aminoácidos conservados e semi-conservados estão representados em vermelho e verde, respectivamente.

<i>E. coli</i>	MNL SRQEQHTLHVLAKGRI AHVRDSSGRVTSVECY SREGLLLTDCTLAV	50
<i>S. typhimurium</i>	MNL SRQEQRTLHVLAKGRI THIRDASGRVTAVECY SREGLLLADCTLAV	50
<i>P. aeruginosa</i>	MNV SKPEQRTLHALLAQGGHIAFLRDASGKI TRVECYNRDGHLLLDCTLAV	50
<i>C. crescentus</i>	MNI SKPQQRTHALLAQGGRI ELERDDNGRI ISADCLTRDGWALTDCTVAV	50
<i>M. xanthus</i>	MNV SRKELRVLNVLAQGGRI LKHKDENGRLTHVACV TPEGWQLSLCTLEV	50
<i>E. coli</i>	FKKLKTKKL I KSVNGQPYRI NTTELNKVRAQLDNR - - - - -	85
<i>S. typhimurium</i>	FKKLKTKKL I KSVNGQPYRI NTTGLNNVRAQPDN - - - - -	84
<i>P. aeruginosa</i>	FSRLKNKGLVHSRQGRPYRI SMAGLKAVRPQADNR - - - - -	85
<i>C. crescentus</i>	FQSLKRKRL I ASQDGGPYRI TRLGLANLRAQLDNRVGA KAW	91
<i>M. xanthus</i>	FQQLKRKRL I SSVKGGPYLI - - - - -	70

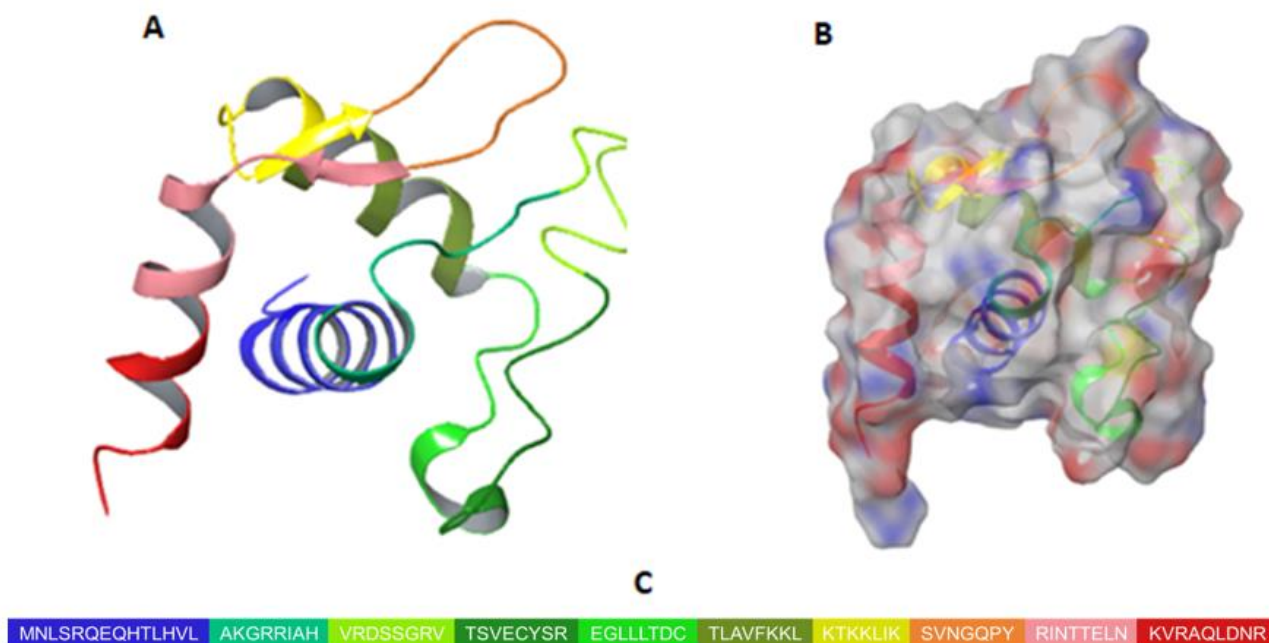
**Fonte:** Adaptado de Yamaguchi; Inouye (2015).

Evidências indicam que interação da toxina ocorre na região N-terminal da enzima; porém, essa interação só ocorre na presença de DNA (YAMAGUCHI; INOUE, 2015). Esses autores sugerem que a região de ligação da toxina ao domínio N-terminal de enzima não está acessível na ausência de DNA. No entanto, quando a enzima se liga ao DNA, sua estrutura é alterada, expondo o local de ligação, tornando-o acessível à YjhX. Supõe-se que a toxina se ligue a um estado intermediário da enzima, formado durante o processo de relaxamento do DNA, uma vez que se sabe que o domínio N-terminal da enzima é capaz de alterar-se conformacionalmente (FEINBERG; LIMA; MONDRAGON, 1999). A estrutura secundária da toxina YjhX, obtida por estudos de modelagem molecular, assim como sua sequência correspondente, estão representadas na Figura 6.

As proteínas membros de sistemas TA, tal como a YjhX, que exerce sua função citotóxica sobre as topoisomerasas bem como seus derivados peptídicos, podem apresentar um grande potencial para o desenvolvimento de novas classes de antibacterianos. Com base neste fato e nas escassas informações a respeito da região de interação toxina-topoisomerase, a expectativa é que nossos resultados possam trazer não somente a elucidação do modo de ação da toxina em questão, como também contribuir para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos mais potentes, menos susceptíveis à resistência bacteriana e que possam vir a complementar a ação dos antibióticos já existentes.



**Figura 6.** Estruturas da proteína YjhX de *E. coli* obtida por modelagem molecular. (A) diagrama de fitas; (B) distribuição de cargas na superfície; (C) sequência primária da proteína. As cores representadas em (C) correspondem àquelas apresentadas em (A). As cores na superfície em B representam regiões de maior densidade de carga negativa (vermelho), de carga positiva (azul) ou neutra (branca)



**Fonte:** Elaborado pela autora.

### 1.3 Estudos *in silico*

#### 1.3.1 Modelagem Molecular

A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de fármacos. Com esse objetivo, uma das técnicas que mais se destacam é a modelagem molecular, o qual consiste em um conjunto de ferramentas que podem ser aplicadas em estratégias de desenvolvimento de novas drogas (COHEN et al., 1990). Tais ferramentas são comumente utilizadas para a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos. Em outras palavras, essas técnicas de modelagem molecular são estratégias que possibilitam que novos agentes terapêuticos possam ser desenvolvidos pela análise de dados teóricos de estrutura-atividade de forma tridimensional (WERMUTH et al., 1998).

Desde 1994, os métodos de predição de estruturas de proteínas são avaliados bianualmente pela CASP (*Comparative Assessment of Methods for Protein Structure Prediction*) (MOULT et al., 2014). O intuito dessa avaliação é verificar a qualidade e eficiência dos métodos de predição de estruturas existentes. São avaliados os métodos de predição estrutural de diversas sequências proteicas disponibilizadas e, ao final da competição, é divulgada a classificação com o desempenho dos grupos participantes. As sequências alvo são divididas em duas categorias: *template - based modelling* e *template free modelling*. A primeira categoria corresponde àquelas sequências que já possuem estruturas tridimensionais determinadas experimentalmente, enquanto que, para a segunda categoria, não há um template definido para servir como modelo (MOULT et al., 2014).

Na tentativa de solucionar o problema de predição do enovelamento de proteínas, muitas metodologias foram sugeridas ao longo dos anos (MOULT, 2005; OSGUTHORPE, 2000; TRAMONTANO; LESK, 2006). Essas metodologias são classificadas em dois grupos de acordo com a sua metodologia. O primeiro grupo corresponde aos métodos de modelagem comparativa por homologia e métodos baseados em conhecimento (MARTIM-REMON et al., 2000). Em contrapartida, no segundo grupo encontram-se as metodologias *ab initio* e os métodos *de novo* (ROHL et al., 2004; SRINIVASAN; ROSE; LINUS, 1995), utilizados para predizer novas formas de enovelamento de proteínas e peptídeos quando não existe uma estrutura contendo uma sequência de resíduos que possa ser utilizada como um template adequado para construção do modelo. Neste caso, dependendo do método, será necessário a execução de cálculos mais robustos do ponto de vista computacional e, para isto, geralmente utilizam-se servidores para realizar esta tarefa.

### 1.3.2 Modelagem comparativa ou por homologia

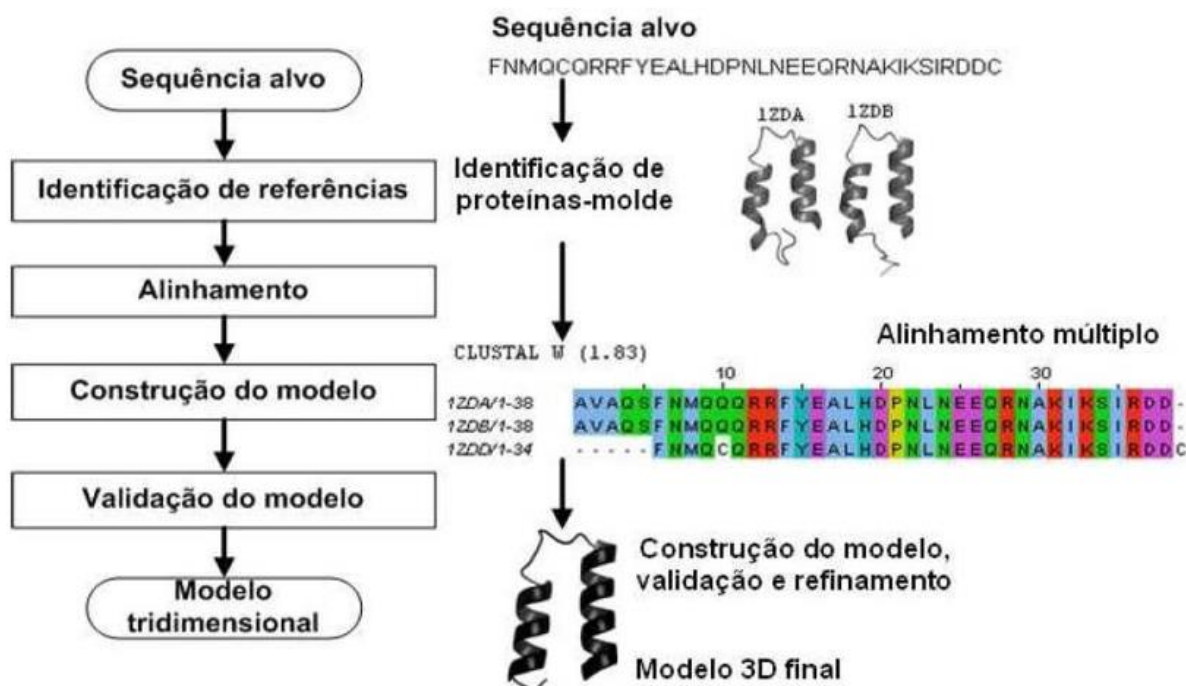
Durante todo o processo de evolução, proteínas que desempenharam funções essenciais para à sobrevivência de organismos permaneceram conservadas, sofrendo poucas mutações em suas sequências. Dessa forma, proteínas evolutivamente relacionadas possuem alta similaridade em suas estruturas primárias, e essa semelhança é conhecida como homologia. De acordo com KACZANOWSKI e ZIELENKIEWICZ (2010), a homologia não se restringe necessariamente a estruturas

primárias; proteínas homólogas quase sempre possuem estruturas tridimensionais semelhantes. As homologias geralmente são detectadas ao possuírem mais de 30% de similaridade, e o procedimento de modelagem consiste basicamente em realizar cópia das coordenadas 3D de uma estrutura molde ou obter a média entre múltiplos moldes, possibilitando substituí-las na proteína alvo (KOLINSKI, 2004; BUJNICKI, 2006). Para a modelagem comparativa por homologia é necessário alinhar a sequência de resíduos de aminoácidos da proteína de interesse com a sequência de aminoácidos de outra proteína com estrutura conhecida e armazenada no PDB (sequência e estrutura-molde) (BERMAN et al., 2000). De acordo com STERNBERG (1997), o método de predição baseado em homologia possui seis passos básicos:

1. Encontrar um conjunto de proteínas, determinadas experimentalmente, que são homólogas à sequência da proteína-alvo;
2. Estabelecer um alinhamento de sequência entre a sequência-alvo e as proteínas com estruturas determinadas experimentalmente;
3. Identificar segmentos da cadeia principal da estrutura desconhecida que são conservados em relação a estruturas conhecidas;
4. Modelar as regiões variáveis;
5. Modelar as cadeias laterais da proteína-alvo;
6. Refinar a estrutura predita através de métodos de refinamento, tendo como base a energia potencial.

O processo de modelagem molecular é baseado entre a sequência da proteína-alvo e as sequências de proteínas com estruturas conhecidas, o qual irão formar a base do modelo. Em seguida, as regiões homólogas são usadas como base para a construção da cadeia principal, seguido da construção da cadeia principal das regiões divergentes e por fim, das cadeias laterais. O critério de avaliação final do modelo leva em consideração toda a informação disponível da proteína de interesse (TRAMONTANO; LESK, 2006). A Figura 7 esquematiza um processo típico de modelagem comparativa por homologia.

**Figura 7.** Representação esquemática de um processo típico de modelagem comparativa por homologia.



**Fonte:** Adaptado de MARTIM-REMON et al., (2000).

A modelagem comparativa por homologia de sequência é o método mais utilizado para a predição de estruturas de proteínas, apresentando-se como o método de maior rigor nos resultados finais (MARTIM-REMON et al., 2000). O fato do método se basear na relação evolucionária permite gerar modelos preditos com uma acurácia maior do que aquelas produzidas com técnicas diferentes. Outra vantagem é que a confiabilidade do modelo pode ser avaliada a priori, permitindo estimar a qualidade do mesmo (TRAMONTANO; LESK, 2006).

Contudo, apesar das vantagens, a técnica também apresenta limitações. A primeira é o alinhamento, que é o passo mais crítico na modelagem por homologia, pois um alinhamento incorreto pode alterar os demais passos, gerando um modelo de estrutura final distorcido e falho (BAXEVANIS; OUELLETTE, 2005). Ademais, é um método que se baseia em estruturas já conhecidas, armazenadas no banco de dados de estrutura (PDB), o que impossibilita a realização de predição de novas formas de enovelamento.

### 1.3.3 Simulação de dinâmica molecular associada a docking

A associação de dinâmica molecular (DM) com docagem molecular (*docking*) tem se mostrado uma excelente alternativa para a compreensão das interações ligante-receptor e para o planejamento racional de novos inibidores (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). A DM é um método computacional utilizado para estudos de macromoléculas e para práticas de simulações de processos de interação intermolecular (HANSSON; OOSTENBRINK; VAN GUNSTEREN, 2002). Esta técnica também tem contribuído com elucidações de mecanismos associados à cinética de interação (ALONSO, BLIZNYUK; GREASY, 2006).

Os métodos da dinâmica molecular como arrefecimento simulado (SA, do inglês *simulated annealing*) são fundamentados na termodinâmica e baseiam-se no fato de que a estrutura nativa de uma proteína corresponde ao mínimo global de sua energia livre (TRAMONTANO; LESK, 2006). Esta metodologia simula o espaço conformacional da proteína utilizando uma função de energia potencial, a qual descreve a energia interna da proteína e suas interações com o meio em que está inserida. O objetivo é encontrar um mínimo global de energia livre que corresponda ao estado nativo ou funcional da proteína por meio de variações de temperatura (OSGUTHORPE, 2000; TRAMONTANO; LESK, 2006).

A DM/SA costuma ser uma abordagem amplamente utilizada, pois permite, através da aplicação de diferenciais de temperatura, inferir na estabilidade estrutural do peptídeo em solução. Com isto, procura-se obter uma estrutura tridimensional que apresente uma conformação mais próxima da estrutura real em solução, tornando os resultados mais confiáveis para a utilização destes modelos em estudos de interação entre peptídeo e proteína, através de *docking*. Este tipo de procedimento permite maior confiabilidade dos complexos obtidos através de *docking* para comparação com os dados obtidos através de experimentos *in vitro*.

## 1.4 Química de peptídeos

Peptídeos são compostos formados pela união entre dois ou mais resíduos de aminoácidos (NELSON; COX, 2011). Esta união ocorre por uma reação de condensação envolvendo um grupo  $\alpha$ -carboxílico e um grupo  $\alpha$ -amínico de duas moléculas de aminoácidos, formando a denominada “ligação peptídica”.

Os peptídeos são moléculas produzidas naturalmente por organismos vivos.

Contudo, várias metodologias surgiram ao longo do século XX que possibilitaram a síntese de peptídeos sintéticos, tais como clonagem gênica, síntese enzimática e síntese química, que pode ser feita em solução ou em fase sólida.

No início do século XX, os trabalhos de Fischer e Curtius possibilitaram a síntese química de peptídeos em solução. Décadas mais tarde, Bruce Merrifield desenvolveu uma metodologia inovadora para a síntese de peptídeos, uma vez que tornou obsoleta a tradicional rotina, própria da síntese em solução, introduzindo o uso de polímeros insolúveis como suporte (MERRIFIELD, 1963; PINILLA. et al., 1995). Este método ficou conhecido como síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), que consiste no fato do grupo carboxílico do aminoácido C-terminal de uma cadeia peptídica se encontrar unido covalentemente a um polímero e, portanto, o componente que contém esta extremidade permanece insolúvel nos solventes utilizados no processo de síntese. Dessa forma, o excesso de reagentes e uma grande maioria dos produtos secundários podem ser eliminados por filtração e lavagens do polímero, que contém o peptídeo em crescimento. Este fato determina a grande vantagem desta técnica, pois permite que se usem grandes excessos de reagentes, conseguindo, ao longo de muitas etapas, rendimentos satisfatórios, além de minimizar as perdas por manipulação. Este método conduziu Merrifield ao Prêmio Nobel de química em 1984, com a síntese da bradiginina (CAREY, 1996).

Os polímeros utilizados na SPFS, muitas vezes chamados de resinas, são partículas de tamanho e forma adequados à manipulação e filtração. Apresentam como característica um alto grau de solvatação em solvente apolar, permitindo a entrada de reagentes através das partículas e certificando a acessibilidade dos reagentes aos sítios reativos. Possuem grupos funcionais passíveis de sofrer modificações químicas para permitir que o primeiro aminoácido possa ser prontamente inserido, ocorrendo a formação de uma ligação covalente entre ambos (MARQUARDT; LIMA, 2001).

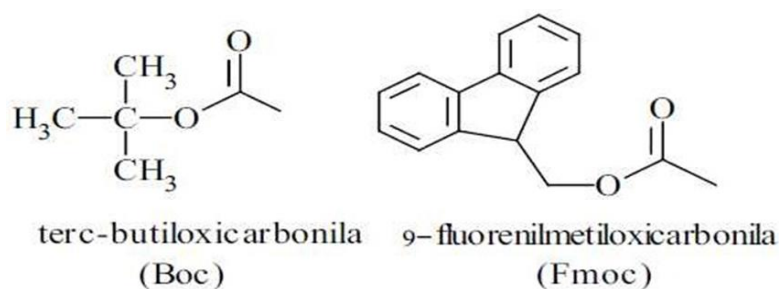
A partir dos trabalhos de Merrifield, o polímero microporoso de estireno (PS) tem sido o mais utilizado, contendo 1% de divinilbenzeno (DVB) como crosslinker. Enquanto os grãos de poliestireno secos apresentam um diâmetro de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , na presença dos solventes ou sistemas de solventes mais comuns utilizados na síntese de peptídeos, costumam aumentar de 2 a 6 vezes o seu volume inicial (MARCHETTO et al., 1992). Esta característica possibilita que todos os

ligantes, presentes no interior da rede polimérica fiquem expostos e, conseqüentemente, acessíveis aos solventes e reagentes utilizados na síntese.

Durante a síntese, é necessário que todos os grupos funcionais presentes nas moléculas, exceto os dois que vão participar da formação da ligação peptídica, estejam protegidos. Após formada a ligação peptídica, o protetor do grupo funcional deve ser retirado, possibilitando a incorporação do aminoácido seguinte, e assim sucessivamente, até o término da sequência. Por último e ao final do processo sintético, os protetores de todos os grupos funcionais devem ser eliminados. De acordo com o exposto, pode-se concluir que o esquema de proteção é crucial para desempenhar com êxito a síntese de um peptídeo.

Há duas estratégias principais no que se refere à síntese de peptídeos em fase sólida, são a química t-butiloxicarbonila (Boc) e 9-fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc). (Figura 8). Ambas se baseiam na proteção temporária do grupo  $\alpha$ -amínico dos aminoácidos com um dos dois protetores Boc (ANDERSON; MCGREGOR, 1957) ou Fmoc (CARPINO; HAN, 1972), que se diferenciam, principalmente, quanto à labilidade ácido-base.

**Figura 8.** Protetores usuais para o grupo  $\alpha$ -amina na metodologia da fase sólida



**Fonte:** MARCHETTO (2006).

A estratégia Boc requer o uso de ácido trifluoroacético (TFA) para as desproteções do grupo Boc e de fluoreto de hidrogênio para a clivagem final. Essas condições ácidas em alguns casos podem provocar a degradação de alguns aminoácidos, além da necessidade de instrumentais mais complexos. Essas dificuldades orientaram as pesquisas para o desenvolvimento da química Fmoc, que utiliza uma solução de uma base de força moderada (geralmente piperidina 20% em DMF) para remoção do grupo protetor do  $\alpha$ -amino (Fmoc), e ácido trifluoroacético

(TFA) na etapa final de clivagem do peptídeo da resina e desproteção das cadeias laterais (ANDERSON; MCGREGOR, 1957; CARPINO; HAN, 1972; JUBILUT et al., 2001).

Em ambas as estratégias de síntese, para que ocorra a formação da ligação peptídica, é necessário que o componente eletrofílico (C carbonílico) seja ativado com agentes acilantes. Desta forma, ele pode sofrer ataque nucleofílico do grupo amina do aminoácido que permanece ligado à resina e, assim, formar a ligação amida. Este processo tem sido uma das etapas da síntese de peptídeos que tem sido profundamente aprimorada, justamente pelo interesse em se obter bons rendimentos, mantendo-se a integridade da cadeia em crescimento, sobretudo do centro estereogênico em  $\alpha$  do grupo carboxílico ativado.

Os reagentes de acoplamento mais utilizados são as carbodiimidas [diisopropilcarbodiimida (DIC)], as hidroxilaminas [1-hidroxibenzotriazol (HOBt) ou 7-aza-1-hidroxibenzotriazol (HOAt) e sais de urônio, tais como [hexafluorofosfato de 2-(1-H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônico (HBTU) e O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HATU)].

Durante todo o processo de síntese de peptídeos, as reações de acoplamento e desproteção são monitoradas através de um simples teste colorimétrico utilizando-se ninidrina (KAISER et al., 1970). Este composto reage com aminas primárias, levando à formação de um produto de coloração violeta (púrpura de Ruhemann). Dessa forma, a desproteção do grupamento amina apresenta uma coloração violeta, sinalizando que o grupo protetor foi retirado e que o próximo aminoácido pode ser acoplado. Já para a confirmação do acoplamento, o teste deve apresentar coloração amarela, indicando a ausência de aminas livres, pois apresentam-se protegidas.

Após conclusão da síntese da cadeia peptídica, o material é separado da resina por técnicas de clivagem, utilizando HF na estratégia Boc ou TFA na estratégia Fmoc. Em seguida, o peptídeo é purificado através de técnicas de cromatografia líquida de fase reversa e a identidade química do peptídeo é determinada por espectrometria de massas (MACHADO et al., 2004).

Um esquema geral da SPFS utilizando a estratégia Fmoc, a qual foi utilizada na obtenção dos peptídeos estudados neste trabalho, está representado na Figura 9.

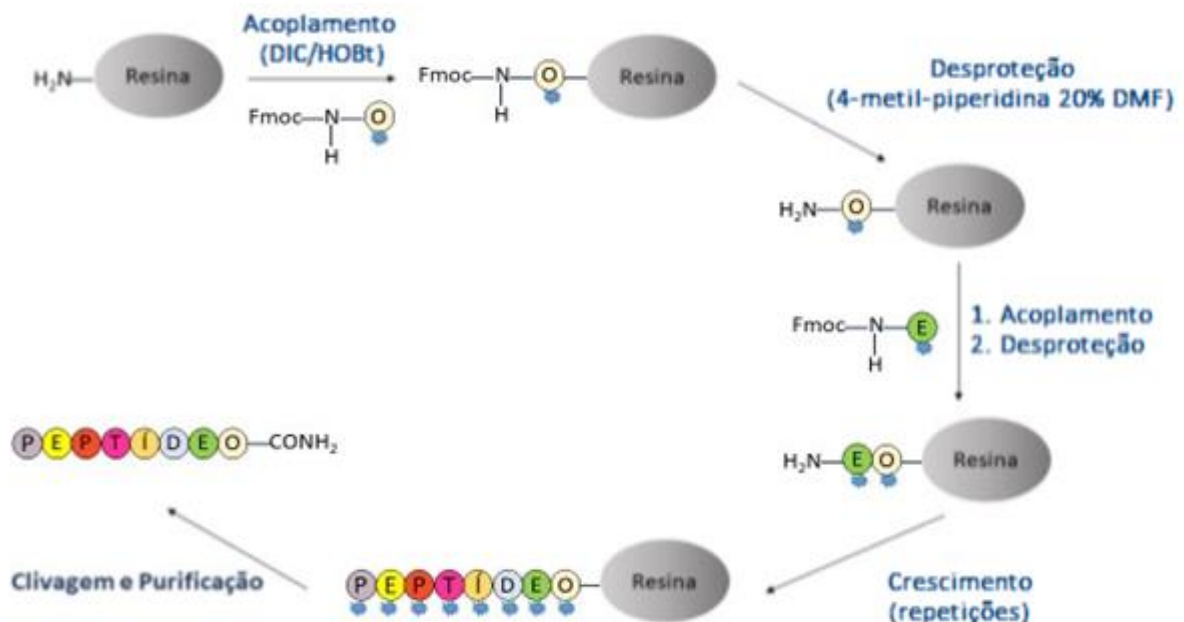
Atualmente, pesquisas com peptídeos bioativos têm estado em voga como alternativa para exploração de novas moléculas, sobretudo no mercado farmacêutico.



A razão é que a terapia baseada em peptídeos apresenta várias vantagens, pois são moléculas com maior especificidade, menor acúmulo nos tecidos, menor toxicidade e ampla diversidade biológica (LIEN; LOWMAN, 2003; LAU; DUNN, 2018).

Segundo estimativas, apenas no ano de 2018 o mercado mundial de peptídeos movimentou aproximadamente 25 bilhões de dólares. Atualmente, mais de 60 peptídeos já estão no mercado, 150 estão sendo aplicados em testes clínicos e mais de 500 estão na fase de testes pré-clínicos (FOSGERAU; HOFFMANN, 2015; LAU; DUNN, 2018). Os dados revelam que o uso de peptídeos como alternativa terapêutica tem conquistado espaço tanto na área da saúde como na área econômica.

**Figura 9.** Esquema ilustrativo da SPFS. Os círculos coloridos formando a palavra PEPTÍDEO e as estrelas azuis representam, respectivamente, os resíduos de aminoácidos utilizados na síntese e os protetores permanentes das cadeias laterais reativas dos mesmos.



**Fonte:** Elaborada pela autora.

## 2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de peptídeos derivados da proteína YjhX por síntese química e avaliar a capacidade inibitória sobre a atividade de DNA topoisomerasas.

De maneira específica objetivou-se:

1. Projetar *in silico* e sintetizar derivados peptídicos de YjhX;
2. Estudar a estrutura das moléculas sintéticas pela técnica de dicroísmo circular;
3. Verificar a capacidade inibitória dos peptídeos sobre a atividade de topoisomerasas bacterianas e humanas;
4. Identificar a região de maior probabilidade de interação com a enzima-alvo;
5. Avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos derivados;
6. Investigar a atividade hemolítica dos peptídeos sintéticos;
7. Analisar o efeito citotóxico dos peptídeos análogos da YjhX sobre a viabilidade de células humanas tumorais;

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Estudos de Bioinformática

O ensaio virtual, o qual inclui o procedimento de *docking* das moléculas na base de dados frente ao alvo molecular, é largamente utilizado no processo de planejamento e desenvolvimento de novos fármacos, tanto na identificação de novos ligantes quanto na otimização estrutural destes (WASZKOWYCZ et al., 2011). Desta forma, foi conduzida uma abordagem de simulação de dinâmica molecular aliada ao *docking*, visando descrever possíveis interações entre a toxina YjhX e a topoisomerase IA de *E. coli* de forma dinâmica, e assim planejar racionalmente sequências peptídicas derivadas desta toxina.

Inicialmente, para a obtenção da estrutura dos peptídeos foi conduzido um estudo de modelagem por homologia, utilizando o servidor I-TASSER (ROY; ZHANG, 2010), avaliado como o melhor servidor para predição de estruturas proteicas, de acordo com a CASP (MOULT, et al., 2014). A partir da sequência YjhX de *E. coli* (UniProtKB - Q2EEU2) foram gerados dez modelos e, destes, foram selecionados aqueles que apresentaram a melhor pontuação (Figura 10), de acordo com os parâmetros de avaliação de modelos estruturais do próprio servidor. Em seguida, foi obtida a estrutura da topo IA de *E. coli* (PDB ID 1ECL e UNIPROTKB P06612), utilizando também a mesma sistemática com o servidor I-TASSER. Após o estudo de modelagem, as estruturas selecionadas foram submetidas ao procedimento de *docking*.

O *docking* é uma técnica computacional que permite analisar as estruturas químicas, bem como as possíveis orientações que determinada molécula pode assumir no interior do sítio ligante de um biorreceptor ou entre duas macromoléculas, proteína-proteína ou proteína-DNA, (PRIETO-MARTÍNEZ; ARCINIEGA; MEDINA-FRANCO, 2018). A técnica consiste em associar dois componentes principais: algoritmo de busca e função de escore. O algoritmo analisa a possibilidade de interação entre moléculas, considerando os graus de liberdade rotacional, translacional e conformacional do ligante. Em seguida, o escore elege os melhores modelos, sendo os mais próximos de serem obtidos experimentalmente. O escore é obtido de acordo com os campos de força de mecânica molecular e parâmetros

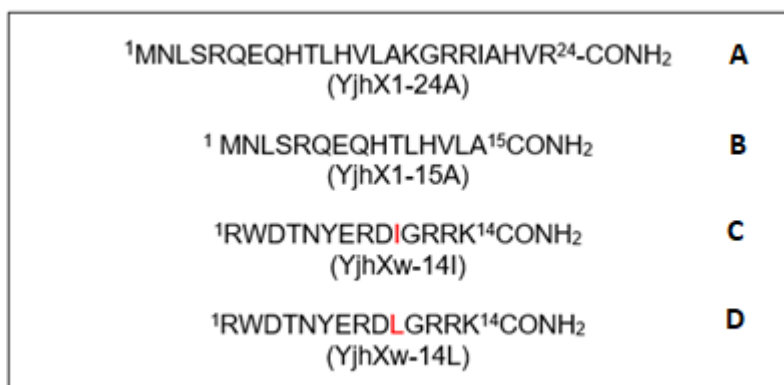
empíricos de cálculos de energia livre (VERDONK et al., 2003).

Nesse trabalho foi utilizado *docking* visando analisar as interações da molécula com a proteína alvo, nesse caso, a topo IA. Para a topo IA foi escolhido o domínio 1, uma vez que, segundo Yamaguchi e Inouye (2015), os domínios 1 e 3 são os mais prováveis de apresentarem interação com a YjhX. Além disso, através de uma análise preliminar, utilizando os domínios 1 e 3 em separado e realizando análise através do servidor DogSiteScorer (BIETZ; RAREY, 2015) o domínio 1 apresenta uma probabilidade maior de expor sítios para uma interação com outra proteína em relação ao domínio 3. Após o procedimento de *docking*, foram avaliados os dez melhores complexos obtidos, utilizando o servidor GetArea (FRACZKIEWICZ; BRAUN, 1998). O objetivo consiste em selecionar o complexo que apresenta a menor área de superfície hidrofóbica acessível ao solvente.

A partir da seleção do complexo na etapa anterior, foi iniciado um estudo sistemático de simulação de dinâmica molecular (DM). Inicialmente, o complexo foi submetido ao arrefecimento simulado (SA, do inglês *simulated annealing*), o qual permite, através da variação de temperatura, inferir na estabilidade estrutural do peptídeo em solução. O melhor modelo previsto de cada sequência peptídica foi utilizado para a simulação de dinâmica molecular usando o pacote GROMACS versão 5.1 (PRONK et al., 2013). Para este experimento, as variações foram de 27 a 82°C em 30 ns. O intuito foi alcançar uma estrutura tridimensional, que apresentasse uma conformação crível, fornecendo confiabilidade para a utilização dessa estrutura para estudos de interação entre peptídeos e a topo IA através de *docking*.

Após esta etapa, foi selecionado o cluster da trajetória com maior número de conformações, baseando-se em um RMSD comparativo de 0.4 Angstroms para as sequências de 14 resíduos. A partir de uma estrutura representativa deste cluster, foram conduzidos os estudos de escaneamento por alanina, visando identificar possíveis mutações *in silico* que pudessem favorecer a interação entre esta sequência estruturada da YjhX e o domínio 1 da topo IA. Isto resultou na seleção de duas novas sequências para a síntese e avaliação no ensaio em gel de eletroforese com a topo IA e, portanto, com menor número de resíduos em relação à sequência inicial, com 24 resíduos (Figura 10, C e D).

**Figura 10.** Estrutura primária das sequências peptídicas selecionadas por estudos computacionais.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

### 3.2 Síntese de peptídeos

Os peptídeos projetados a partir dos ensaios de *docking* e dinâmica molecular (Figura 10), foram sintetizados quimicamente pelo método da fase sólida (STEWART; YOUNG, 1984; AMBLARD et al., 2005), de acordo com o protocolo padrão (Tabela 2) que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos  $\alpha$ -amino grupos, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (CHAN; WHITE, 2000).

**Tabela 2.** Protocolo sintético padrão utilizando DIC/HOBt (estratégia Fmoc-tBu)

Reagente/Solventes	Operação	Tempo (min)	Ciclos
DCM/DMF	Lavagem	1	3
4-metil-Piperidina 20% em DMF	Lavagem	1	1
4-metil-Piperidina 20% em DMF	Desproteção	20	1
DCM/DMF	Lavagem	1	6
Fmoc-AA-OH (3eq) +DIC/HOBt (3eq) em DCM/DMF (1:1)	Acoplamento	120	1
DCM/DMF	Lavagem	1	6

**Fonte:** Elaborado pela autora.

Foi utilizada uma resina Rink Amida MBHA com grau de funcionalização de 0,55 mmol/g, como polímero de partida (220 mg para YjhX1-24A, 310 mg para YjhX1-15A e 500 mg para YjhXw-14I e YjhXw-14L).

Para o acoplamento de cada aminoácido, empregou-se o excesso molar de 3 equivalentes para o Fmoc-aminoácido e 3 equivalentes para os agentes de condensação DIC/HOBt, em relação à escala de síntese, em DCM:DMF (1:1), por aproximadamente 2 horas. A desproteção dos grupos  $\alpha$ -amínicos (remoção do grupo Fmoc), após a entrada de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução de 4-metil-piperidina 20% (v/v) em DMF (Tabela 2). O monitoramento das etapas de acoplamento foi realizado pelo teste de ninidrina (KAISER et al., 1970) e quando positivo (acoplamentos incompletos), o processo era repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes. Acetilação, quando necessária, foi feita com anidrido acético e diisopropiletilamina (10 equivalentes cada) em DMF, por 30 minutos ao final do acoplamento ou ao final da síntese.

A clivagem final dos peptídeos da resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi efetuada pelo tratamento das respectivas peptidil-resinas com uma solução de clivagem contendo TFA (94,5%), água deionizada (2,5%), EDT (2,5%) e TIS (0,5%), em temperatura ambiente não controlada, por 3 horas. Os peptídeos, agora denominados brutos, foram precipitados e lavados com éter dietílico gelado e centrifugados (seis vezes), dissolvidos em solução aquosa de ácido acético 10%, liofilizados e submetidos a análise de CLAE analítico.

### **3.3 Análise, purificação e caracterização**

A análise e purificação dos peptídeos foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de acordo com as seguintes condições:

- Analítica: UPLC Shimadzu Prominense, coluna de fase reversa Kromasil C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm), diâmetro da partícula de 5  $\mu$ m e porosidade de 300 Å. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e a água empregada foi do tipo ultrapura. As condições cromatográficas gerais incluíram os solventes A (água contendo 0,045% de TFA) e B (acetonitrila - ACN, contendo 0,036% de TFA), em gradiente de 5 a 95% de B em 30 min, com fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda do detector de 220 nm.

- Semi-preparativa: HPLC Shimadzu LC-20AT/DGU-2A/SPD-20A, coluna de fase reversa Júpiter Phenomenex C<sub>18</sub> (250 x 10 mm), diâmetro da partícula de 10 µm e porosidade de 300 Å. Os solventes utilizados foram todos de grau cromatográfico e água ultrapura. As condições cromatográficas gerais incluíram um gradiente linear de 10 a 40% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA), em 90 min, com fluxo de 2,5 mL/min e detecção a 220 nm, para todos peptídeos.

A caracterização dos produtos foi realizada a partir do material bruto, por determinação da massa molecular, utilizando um espectrômetro de massas Bruker Amazon SL acoplado a um cromatógrafo líquido Shimadzu (LC-MS) no modo de ionização Electrospray positivo (ES-MS+), tendo como resultado final a razão massa molar/carga (MM/z).

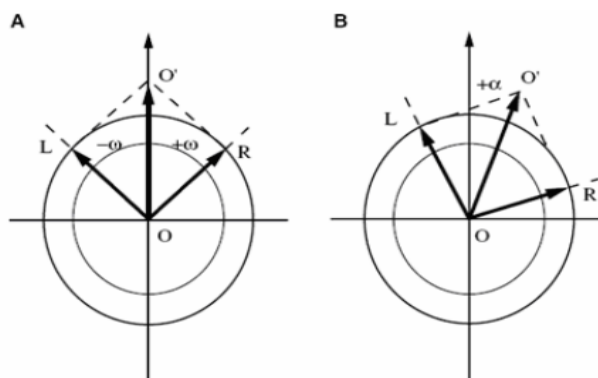
### 3.4 Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular (DC) se baseia na absorção diferenciada da luz circularmente polarizada incidente em compostos quirais (CAMPANA et al., 2001). A luz circularmente polarizada é gerada quando a fonte de luz oscila em duas direções perpendiculares entre si, com amplitudes iguais, mas com uma diferença de fase ( $\pi/2$ ). Com isso, a trajetória do vetor resultante de propagação de luz é helicoidal. Devido a isso, a onda resultante será circularmente polarizada à direita ou à esquerda, conforme for a diferença de fase,  $+\pi/2$  ou  $-\pi/2$ .

Para uma molécula quiral apresentando o fenômeno de dicroísmo circular, o componente circularmente polarizado à direita é absorvido em diferente intensidade em relação ao polarizado à esquerda. Assim, a combinação das duas ondas transmitidas resulta em uma luz elipticamente polarizada, como exemplificado na Figura 11 (PURDIE, 2007).

Em peptídeos e proteínas, existem duas ligações cuja rotação é permitida: C<sub>α</sub>-NH, cujo ângulo de rotação é  $\Phi$  (phi) e C<sub>α</sub>-CO, cujo ângulo de rotação é  $\Psi$  (psi). Os ângulos específicos  $\Phi$  e  $\Psi$  são os responsáveis pelo espectro de CD característico das estruturas secundárias,  $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$  e estrutura randômica (MICSONAI et al., 2015).

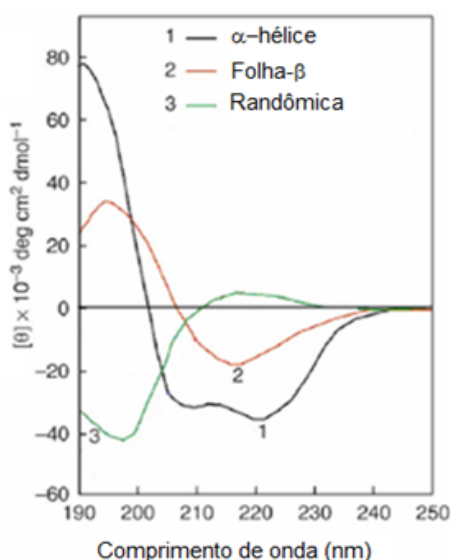
**Figura 11.** Representação da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda, (A) incidente e (B) transmitida, após interagir com a molécula dicróica.



**Fonte:** Purdie (2007).

Estruturas secundárias do tipo  $\alpha$ -hélice apresentam três bandas características: com transição  $n-\pi^*$  que resulta em uma banda negativa com absorção em 222 nm, transição  $\pi-\pi^*$  paralela, resultando em outra banda negativa com absorção em 209 nm e  $\pi-\pi^*$  perpendicular que forma uma banda positiva com absorção entre 192 nm. Estruturas secundárias do tipo folha- $\beta$  apresentam duas bandas espectrais, uma positiva com transição  $\pi-\pi^*$  e absorção em 196 nm e uma banda negativa com transição  $n-\pi^*$  absorção em 218 nm. Espectros de estruturas desordenadas apresentam a formação de uma banda negativa, com transição  $\pi-\pi^*$ , absorvendo em 198 nm (Figura 12).

**Figura 12.** Espectros típicos de DC mostrando o perfil característico de  $\alpha$ -hélice, folha- $\beta$  e estrutura desordenada



Estrutura	Banda espectral/ Comprimento de onda (nm)
$\alpha$ -hélice	Positiva em 192
	Negativa em 209
	Negativa em 222
Folha- $\beta$	Positiva em 196
	Negativa em 218
Randômica	Positiva em 212
	Negativa em 198

**Fonte:** WHITMORE; WALLACE (2007).



Assim, de acordo com a conformação estrutural adquirida pelas proteínas, é possível caracterizar a estrutura secundária destas macromoléculas devido ao perfil espectral de CD particular destes arranjos (WHITMORE; WALLACE, 2007).

A análise da estrutura secundária de cada peptídeo foi feita por dicroísmo circular utilizando um espectropolarímetro JASCO J-815. Utilizou-se uma concentração de  $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de cada peptídeo em um volume final de  $400 \mu\text{L}$  de água ultrapura ou TFE 60% em água.

Os espectros de CD foram traçados com acúmulo de 6 varreduras de 190 a 280 nm, à temperatura ambiente, numa cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm.

Foi realizado um branco, contendo apenas os solventes, para cada medida, o qual apresentou sinal desprezível, sendo subtraído mesmo assim de todas as curvas obtidas para cada peptídeo.

### 3.5 Ensaios de inibição enzimática

As enzimas DNA girase, topoisomerase IV, topoisomerase I e topoisomerases II humana ( $\alpha$  e  $\beta$ ), produzidas heterologamente (bactéria, baculovírus/células de insetos), foram adquiridas comercialmente da *Inspirallis Ltda* (<http://www.inspirallis.com>) e fornecidas com os respectivos tampões e substratos, como descritos nas Tabelas 3 a 6.

**Tabela 3.** Composição dos kits de ensaio utilizados no teste de inibição enzimática: topoisomerase IA de *M. Tuberculosis* (Mtb)

Composição	
<b>Substrato</b>	Plasmídeo pBR322 superenrolado ( $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
<b>Tampão de diluição (1x)</b>	Tris.HCl $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; Ditioneitol (DTT) $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; EDTA $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; NaCl $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ glicerol 50% (v/v); pH 7,6
<b>Tampão de ensaio (5x)</b>	Tris.HCl $40 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; NaCl $20 \text{ mmol.L}^{-1}$ EDTA $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; $\text{MgCl}_2$ $5 \text{ mmol.L}^{-1}$ BSA $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; pH 7,6

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Tabela 4.** Composição dos kits de ensaio utilizados no teste de inibição enzimática: DNA girase (*E. coli*)

Composição	
<b>Substrato</b>	Plasmídeo pBR322 relaxado (1 µg/µL)
<b>Tampão de diluição (1x)</b>	Tris.HCl 50 mmol. L <sup>-1</sup> ; KCl 100 mmol. L <sup>-1</sup> ; EDTA 1 mmol. L <sup>-1</sup> ; DTT 2 mmol. L <sup>-1</sup> ; glicerol 50% (w/v); pH 7,5
<b>Tampão de ensaio (5x)</b>	Tris.HCl 35 mmol.L <sup>-1</sup> ; KCl 24 mmol.L <sup>-1</sup> ; MgCl <sub>2</sub> , 4 mmol.L <sup>-1</sup> ; DTT 2 mmol.L <sup>-1</sup> ; ATP 1mmol.L <sup>-1</sup> ; Espermidina 1,8 mmol.L <sup>-1</sup> ; glicerol 6,5% (v/v); BSA 0,1 µg.mL <sup>-1</sup> ; pH 7,5

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Tabela 5.** Composição dos kits de ensaio utilizados no teste de inibição enzimática: topoisomerase IV (*E. coli*)

Composição	
<b>Substrato</b>	Plasmídeo pBR322 superenrolado (1 µg/µL)
<b>Tampão de diluição (1x)</b>	HEPES.KOH 40 mmol.L <sup>-1</sup> ; glutamato de potássio 100 mmol.L <sup>-1</sup> ; DTT 1 mmol.L <sup>-1</sup> ; EDTA 1 mmol.L <sup>-1</sup> ; glicerol 40% (v/v); pH 7,6
<b>Tampão de ensaio (5x)</b>	HEPES.KOH 40 mmol.L <sup>-1</sup> ; glutamato de potássio 100 mmol.L <sup>-1</sup> ; acetato de magnésio 10 mmol.L <sup>-1</sup> ; DTT 10 mmol.L <sup>-1</sup> ; ATP 1 mmol.L <sup>-1</sup> ; BSA 50 µg.mL <sup>-1</sup> ; pH 7,6

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Tabela 6.** Composição dos kits de ensaio utilizados no teste de inibição enzimática: topoisomerase II humana α e β

Composição	
<b>Substrato</b>	Plasmídeo pBR322 superenrolado (1 µg/µL)
<b>Tampão de diluição (1x)</b>	Tris.HCl 50 mmol.L <sup>-1</sup> ; DTT 1 mmol.L <sup>-1</sup> ; NaCl 100 mmol.L <sup>-1</sup> ; glicerol 50% (v/v); EDTA 1 mmol.L <sup>-1</sup> ; BSA 50 µg.mL <sup>-1</sup> ; pH 7,5
<b>Tampão de ensaio (10x)</b>	Tris.HCl 50 mmol. L <sup>-1</sup> ; DTT 5 mmol. L <sup>-1</sup> ; MgCl <sub>2</sub> 10 mmol. L <sup>-1</sup> ; NaCl 125 mmol. L <sup>-1</sup> ; Albumina 100 µg.mL <sup>-1</sup> ; pH 7,5
<b>Aditivo (30x)</b>	ATP 30 mmol.L <sup>-1</sup>

**Fonte:** Elaborado pela autora

Para os ensaios de inibição enzimática, inicialmente foram feitas triagens, utilizando os peptídeos sintetizados em uma concentração a  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , a fim de avaliar o potencial de inibição frente a cada uma das enzimas. Posteriormente, os peptídeos selecionados, foram testados em concentrações decrescentes, a fim de se determinar a mínima concentração de peptídeo capaz de inibir 100% da atividade da topoisomerase ( $\text{IC}_{100}$ ).

Os ensaios de inibição da atividade das topoisomerases foram realizados utilizando 1 unidade (U) da enzima, com  $0,5 \mu\text{g}$  de plasmídeo pBR322 relaxado (DNA girase) ou superenrolado (demais topoisomerases) e os peptídeos sintetizados, na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , em um volume de reação de  $30 \mu\text{L}$ , conforme protocolo da *Inspiralis Ltda*. A reação foi incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos em tampão de ensaio. Ao término desse período a reação foi interrompida pela adição de  $2,5 \mu\text{L}$  de SDS 2% e incubação por 5 min a  $65^\circ\text{C}$ . Em seguida, foram adicionados  $12,5 \mu\text{L}$  de STEB (sacarose 20% em Tris.HCl  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,5; EDTA  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ ; azul de bromofenol  $0,5 \text{ mg/mL}$ ) e  $50 \mu\text{L}$  da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Por fim, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a  $12.000 \text{ rpm}$ , e os sobrenadantes recolhidos e analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE ( $89 \text{ mmol.L}^{-1}$  de ácido bórico;  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  EDTA, pH 8,2), submetidas à tensão constante de  $60\text{V}$  ou  $4\text{V/cm}$ , à temperatura ambiente por 2 horas. Após a corrida, o gel foi corado durante 20 minutos com uma solução de brometo de etídio ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em tampão de corrida (TBE) e analisado em um fotodocumentador Alpha Imager EP System da Alpha Innotech. As porcentagens de inibição foram estimadas pelo software AlphaView (AlphaImager®EP).

### **3.6 Atividade hemolítica**

A atividade hemolítica dos peptídeos foi determinada a partir da análise da liberação da hemoglobina dos eritrócitos. Para a realização deste ensaio, realizado em duplicata, foi utilizado eritrócitos humanos obtidos a partir do sangue fresco de doador voluntário (CAAE: 61293316.4.0000.5426), separados do plasma por centrifugação a  $3.000 \text{ rpm}$  (5 min) e lavadas 3-5 vezes em tampão PBS ( $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ , contendo  $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$  NaCl), pH 7,4. Da solução inicial de cada peptídeo a  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , em tampão PBS, foram realizadas diluições seriadas em tubos tipo

ependorf e adicionado a cada um solução 1% de eritrócitos, obtendo um volume final de 200 µL em cada tubo.

O controle negativo (0% de hemólise) foi preparado apenas com PBS (198 µL) e 2 µL de eritrócitos 1%. A referência de 100% de lise foi 2 µL de eritrócitos (1%) misturados com 198 µL de uma solução 1% (v/v) Triton X-100 (controle positivo). As amostras foram incubadas por 1 hora a 37 °C, e centrifugadas a 3.000 rpm por 3 minutos, e alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram coletadas em placas de 96 poços.

A atividade hemolítica foi analisada a partir dos valores de absorvância do sobrenadante a 570 nm, utilizando um leitor de microplacas EPOCH (BioTek, Instruments). Os resultados da atividade hemolítica foram calculados e expressos em porcentagem de hemólise de acordo com a equação 1:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{(A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Tampão}})}{(A_{\text{Triton}} - A_{\text{Tampão}})} \times 100$$

**Equação 1**

Onde, “ $A_{\text{Amostra}}$ ” representa a absorvância auferida na leitura das amostras e “ $A_{\text{Triton}}$ ” e “ $A_{\text{Tampão}}$ ” referem-se as leituras obtidas para os controles positivos e negativos, respectivamente.

### 3.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeos sintetizados, foi realizada contra dois microrganismos: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) e *Streptococcus agalactiae* (ATCC 14458), representantes das bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente, ambas adquiridas do Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Uma alíquota de cada microrganismo foi coletada com a ajuda de uma alça de platina e semeada em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio Mueller Hinton (MH) e então incubadas a 37°C sob agitação a 140 rpm “overnight”. Após esse o período de crescimento, o inóculo foi semeado em placas de petri contendo meio ágar Mueller

Hinton e então incubadas a 37°C “overnight”, para crescimento. Passado esse período, transferiu-se 5 colônias isoladas de cada cepa bacteriana crescida na placa, para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio.

Em seguida, foi retirado 3 mL desse inóculo e aferida sua absorvância em 625 nm, acertadas de acordo com o padrão de turbidez McFarland 0,5 que obtém uma absorvância entre 0,08 e 0,10 neste comprimento de onda, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Após ajustar a suspensão bacteriana, esta foi diluída 1:10 com meio MH, resultando em uma diluição de  $10^7$  células.mL<sup>-1</sup>, a qual foi utilizada nos ensaios.

A atividade de inibição foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 poços) de acordo com as normas descritas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI – documentos M7-A10, 2015 e M27-A3, 2017), com modificações. Os poços tiveram um volume final de 100 µL (40 µL de meio de cultivo MH; 10 µL da cultura bacteriana; e 50 µL de peptídeo, nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 e 100,0 µmol.L<sup>-1</sup>, dissolvidos em tampão PBS).

As microplacas foram incubadas em uma estufa a 37°C por 24 horas e os testes foram realizados em duplicata. Como controles positivo e negativo do crescimento microbiano foram empregados, respectivamente, meio de cultura com os microrganismos e meio de cultivo MH com os microrganismos e ciprofloxacina (Sigma N1628) nas mesmas concentrações dos peptídeos, em um volume final de 100 µL.

Após o período de incubação, as placas foram submetidas à análise espectrofotométrica, empregando um leitor de microplacas EPOCH da Biotek Instruments, em comprimento de onda de 625 nm. A porcentagem de inibição do crescimento bacteriano por cada uma das amostras peptídicas foi determinada através da análise comparativa destas com os controles utilizados. Os resultados da atividade antimicrobiana foram calculados e expressos em porcentagem de inibição de acordo com a equação 2:

$$\% \text{ inibição} = 100\% \times \left( 1 - \frac{DO_{\text{amostra}} - DO_{\text{meio de cultura}}}{DO_{\text{controle}} - DO_{\text{meio de cultura}}} \right) \quad \text{Equação 2}$$

Onde,  $DO_{\text{amostra}}$  representa a absorvância auferidas na leitura das amostras, a  $DO_{\text{controle}}$ , refere-se ao controle negativo e a  $DO_{\text{meio de cultura}}$  corresponde às leituras obtidas provenientes do meio de cultura.

### 3.8 Viabilidade celular

A análise de viabilidade celular e citotoxicidade foi realizada através do método colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio, Sigma), baseado na medida quantitativa da formação de cristais de formazan (cor púrpura) a partir da reação de redução do sal de brometo por proteinases mitocondriais ativas apenas em células viáveis (MOSMANN,1983; LOBNER,2000).

O ensaio foi feito em duplicata, o qual a atividade de inibição foi determinada pela técnica de diluição em microplacas de 96 poços (Corning, Inc.). Foi utilizado a linhagem celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama, sendo semeadas em densidade celular de  $5 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup> sobre as amostras de peptídeos nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 e 0,19  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , dissolvidos em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo L-Glutamine, mas sem piruvato. O controle positivo, que corresponde a 0% de viabilidade celular, foi realizado com amostras de peptídeos em meio de cultura DMEM e o controle negativo, representando 100% de viabilidade celular, foi preparado com apenas as células em meio de cultura DMEM. As placas de cultura foram incubadas por 24h em estufa Galaxy 48S, a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (New Brunswick). Após o período de incubação, os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução salina tamponada de fosfatos (PBS) estéril para lavagem e remoção de células mortas suspensas. Esta solução foi descartada e foram então adicionados 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de MTT a 10,0 mg.mL<sup>-1</sup> diluída em PBS e meio DMEM na proporção 1:4. Cada placa foi incubada por mais 4 h nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação, os sobrenadantes foram descartados e foram então adicionados 100  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico para dissolução dos cristais de formazan formados. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplaca EPOCH da Biotek Instruments em com filtro de 540 nm e filtro de referência de 620 nm.

## 4. Resultados e Discussões

### 4.1 Estudos de Bioinformática

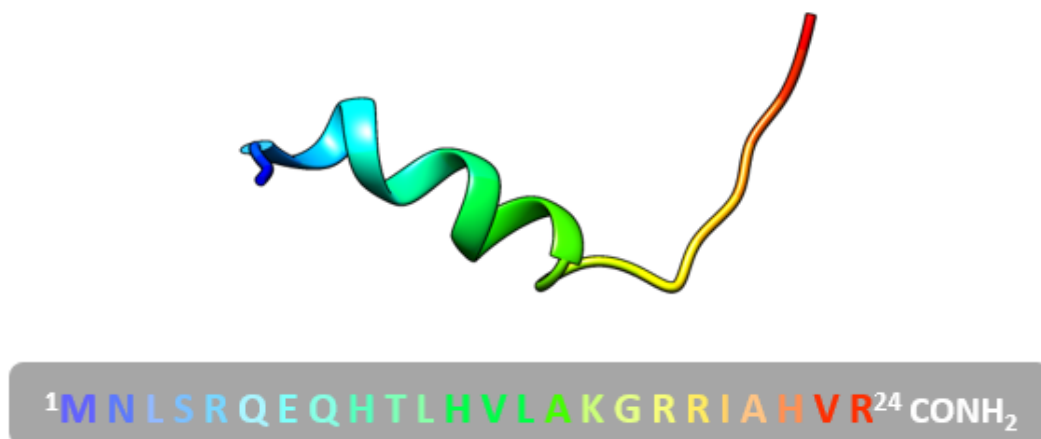
As sequências peptídicas obtidas neste trabalho foram planejadas tendo como base a estrutura secundária da toxina YjhX, cujo alvo intracelular é a enzima DNA topoisomerase IA. Uma maior conservação dos resíduos de aminoácidos (Figura 5), na extremidade N-terminal de YjhX, de diferentes espécies de bactérias, já evidenciavam que a interação toxina-enzima poderia ocorrer nesta região da toxina. A análise por simulação de DM/SA aliada ao *docking* permitiu confirmar esta evidência, uma vez que uma parte estruturada ( $\alpha$ -hélice) da região N-terminal do modelo de YjhX mostrou ser a principal região de interação com o domínio 1 da topoisomerase IA. Neste caso, esta região estruturada poderia ser utilizada como uma sequência capaz de interagir favoravelmente com a enzima.

Diante desta evidência, os estudos de simulação foram centrados em provável interação entre a região correspondente à  $\alpha$ -hélice N-terminal da toxina, e o domínio 1 da topoisomerase IA. Neste contexto, foi proposta inicialmente a sequência YjhX-24A (Figura 13), constituída dos aminoácidos 1-24 da sequência nativa de YjhX de *E.coli*, por conter a estrutura em  $\alpha$ -hélice inserida entre duas estruturas randomizadas, na extremidade N-terminal da toxina. O uso desta sequência permitirá avaliar a real importância desta região da toxina, na interação com a enzima.

Posteriormente, um segundo estudo sistemático de simulação, seguindo os mesmos procedimentos de simulação de DM/SA, revelou que esta sequência de 24 resíduos poderia ser reduzida ainda mais, resultando em uma estrutura de 15 resíduos de aminoácidos (YjhX-15A – Figura 14), que apresenta grande estabilidade em solução e confiabilidade para estudos interacionais.

Este peptídeo é resultado da eliminação da estrutura randômica correspondente aos resíduos de aminoácidos 16-24 de YjhX-24A e foi sintetizado para comparar a atividade de ambas as sequências no processo de interação e inibição da topo IA, bem como avaliar o papel da região randômica, na interação peptídeo-enzima, especificamente o seu papel na toxicidade da molécula frente às DNA-topoisomerasas.

**Figura 13.** . Estrutura 3D representativa do cluster mais prevalente da trajetória da simulação de DM obtida para o peptídeo YjhX1-24A em meio aquoso. Abaixo sua estrutura primária correspondente



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 14.** . Estrutura 3D representativa do cluster mais prevalente da trajetória da simulação de DM obtida para o peptídeo YjhX1-15A em meio aquoso. Abaixo sua estrutura primária correspondente



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Sucessivos estudos de simulação por DM/SA aliada ao *docking* sugeriram diferentes padrões de interação entre YjhX e a topo IA. Desta forma, foram identificadas sequências de novos análogos da toxina capazes de apresentar interações mais favoráveis com a enzima do que a proteína nativa. Neste etapa, foi selecionado o cluster da trajetória com maior número de conformações, baseando-se em um RMSD comparativo de 0.4 Å para sequências de 14 resíduos de aminoácidos.



A partir de uma estrutura representativa deste cluster, foram conduzidos os estudos de escaneamento por alanina, utilizando o programa Maestro® (Schrödinger, LLC), que analisa substituições pontuais de aminoácidos por outros resíduos mais eficazes do ponto de vista de interação peptídeo-enzima e conseqüentemente potencialização da toxicidade. Isto resultou na seleção de duas novas sequências, YjhXw-14I e YjhXw-14L, que foram sintetizadas e avaliadas quanto a interação com DNA topoisomerases (Figuras 15 e 16).

**Figura 15.** . Estrutura 3D representativa do cluster mais prevalente da trajetória da simulação de DM obtida para o peptídeo YjhXw-14I em meio aquoso. Abaixo sua estrutura primária correspondente.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 16.** . Estrutura 3D representativa do cluster mais prevalente da trajetória da simulação de DM obtida para o peptídeo YjhXw-14L em meio aquoso. Abaixo sua estrutura primária correspondente.



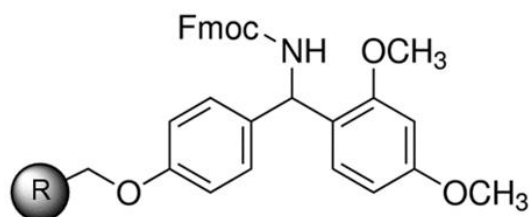
**Fonte:** Elaborado pela autora.

## 4.2 Síntese e purificação dos peptídeos

Na busca constante de novos inibidores peptídicos de DNA topoisomerasas, decidiu-se por desenhar e sintetizar quimicamente peptídeos análogos da toxina YjhX, proteína endógena inibidora específica da topoisomerase IA de *E. coli* (YAMAGUCHI; INOUE, 2015).

Desta forma, quatro sequências peptídicas, obtidas por estudos de bioinformática, YjhX1-24A, YjhX1-15A, YjhXw-14I e YjhXw-14L (Figura 10), foram sintetizadas pela metodologia da fase sólida de acordo com o protocolo padrão da estratégia Fmoc/tBu, seguindo as etapas descritas em Materiais e Métodos. Foi utilizada como suporte uma resina Rink amida MBHAR (Figura 17), com grau de funcionalização de 0,55 mmol/g, cujo uso justifica-se pelo fato de que, ao final da síntese, os peptídeos produzidos apresentam um grupamento amida na extremidade C-terminal, simulando uma ligação peptídica nesta região, uma vez que o resíduo da extremidade C-terminal deste peptídeo corresponde a um resíduo interno da sequência da YjhX nativa.

**Figura 17.** Estrutura molecular parcial de uma Rink Amida MBHA Resina



**Fonte:** MARCHETTO (2006)

As sínteses ocorreram sem maiores problemas, sendo necessários poucas repetições (reacoplamentos), sendo que, ao final, foram obtidas 604, 715, 1180 e 1250 mg de peptidil-resinas relativas às sequências YjhX1-24A, YjhX1-15A, YjhXw-14L e YjhXw-14I, respectivamente.

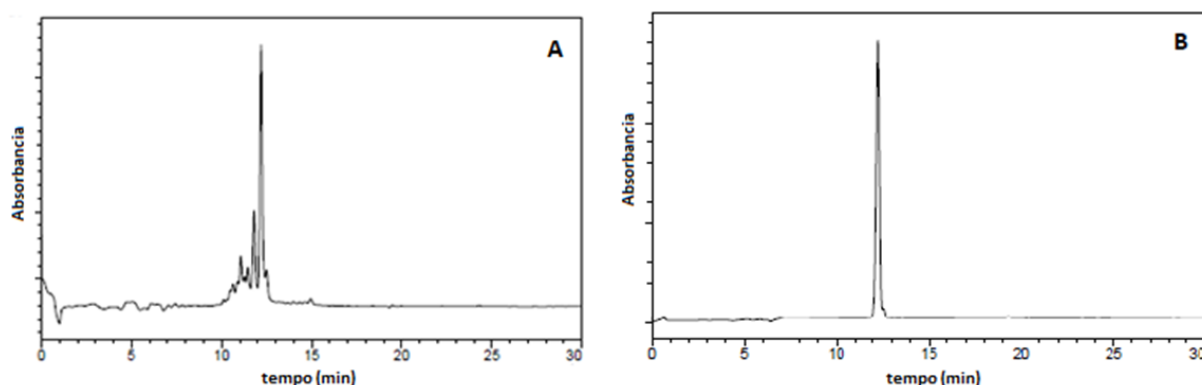
Cada uma das peptidil-resinas obtida (400 mg cada), foi submetida ao processo de clivagem utilizando 1 mL de solução de clivagem (Materiais e Métodos) para cada 100 mg de peptidil-resina, à temperatura ambiente por 2 h sob agitação. Após o procedimento de clivagem, foi realizada a extração dos respectivos peptídeos com

ácido acético 10% em sistemas de seringas de polipropileno de 5 mL, equipadas com um filtro de polietileno poroso acopladas a um sistema de vácuo com frasco coletor para cada um dos peptídeos extraídos. O extrato bruto de cada peptídeo foi liofilizado e o valor da massa bruta obtida para YjhX1-24A, YjhX1-15A, YjhXw-14I e YjhXw-14L foram 230,0, 200,0, 117,2 e 140,0 mg, respectivamente.

Uma pequena quantidade de cada peptídeo bruto (aproximadamente 1 mg) foi dissolvida em 1 ml de água ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa em CLAE, sob condições analíticas, conforme descrito em Materiais e Métodos. A partir dos resultados de tempo de retenção e porcentagem de solvente obtidos nestas análises, foram definidas as condições relativas à concentração de solvente para purificação dos peptídeos em escala semi-preparativa, que foram idênticas para cada um deles (item 3.3). As frações provenientes do processo de purificação foram submetidas novamente a análises por CLAE em modo analítico. O conteúdo dos tubos denominados puros foi reunido e liofilizado, resultando em 6,5, 15, 13 e 20 mg para YjhX1-24A, YjhX1-15A, YjhXw-14I e YjhXw-14L, respectivamente. Posteriormente, os peptídeos foram analisados por CLAE em modo analítico para confirmação da pureza.

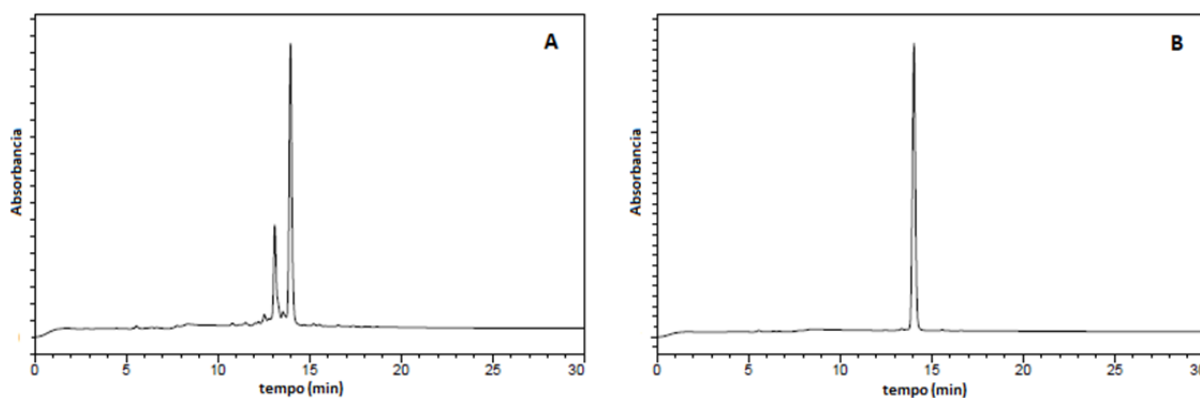
Os perfis cromatográficos dos peptídeos obtidos antes da purificação, bem como os respectivos cromatogramas obtidos após purificação estão representados nas Figuras 18 a 21.

**Figura 18.** Perfil cromatográfico obtido em escala analítica do peptídeo **YjhX1-24A** antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm



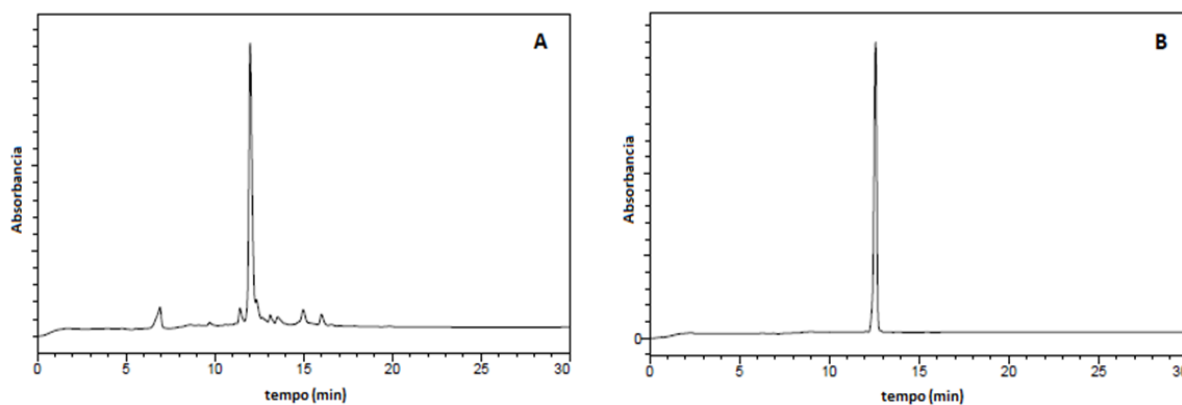
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 19.** Perfil cromatográfico obtido em escala analítica do peptídeo **YjhX1-15A** antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm



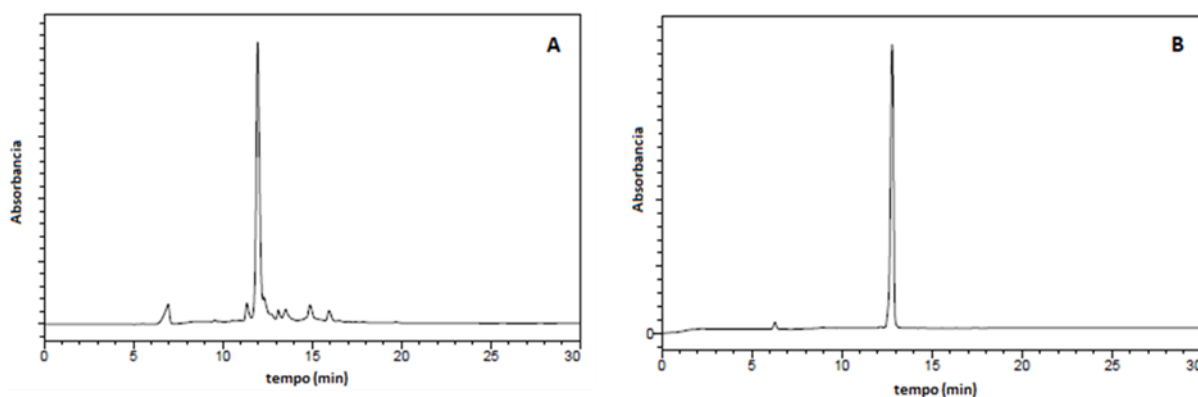
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 20.** Perfil cromatográfico obtido em escala analítica do peptídeo **YjhXw-14I** antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 21.** Perfil cromatográfico obtido em escala analítica do peptídeo **YjhXw-14L** antes (A) e após (B) a purificação. Coluna de fase reversa C18 Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm; 300 Å). Gradiente linear de 5 a 95% de solvente B (A: água, 0,045% TFA; B: ACN, 0,036% TFA) em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detecção a 220 nm



**Fonte:** Elaborado pela autora.

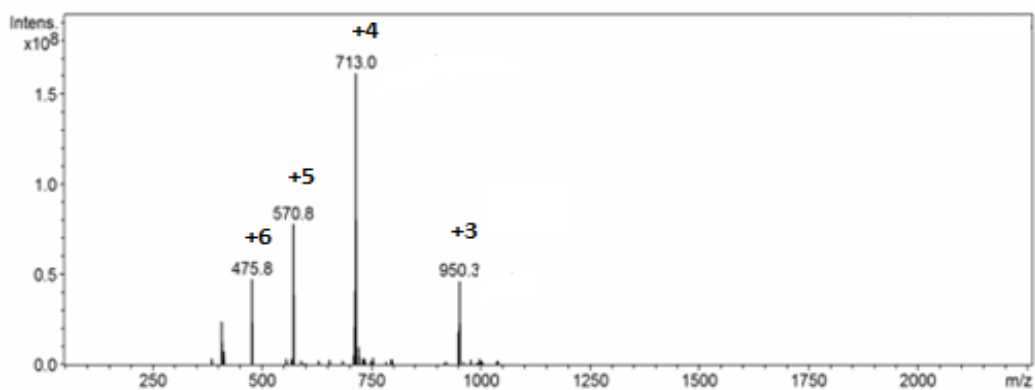
Os peptídeos purificados mostraram um único pico em relação aos cromatogramas obtidos a partir das análises do extrato bruto e o parâmetro tempo de retenção dos peptídeos puros foi praticamente mantido em relação ao pico correspondente no extrato bruto, e a pureza relativa, em média 97%, demonstra que os métodos utilizados foram adequados para obtenção dos peptídeos.

### 4.3 Espectrometria de massas

A caracterização dos peptídeos sintetizados foi realizada por meio de ensaios de espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro de massas Bruker Amazon SL acoplado a um cromatógrafo líquido Shimadzu (LC-MS) no modo de ionização por electrospray positivo (ES-MS+) e os espectros obtidos estão representados nas Figuras 22 a 25.

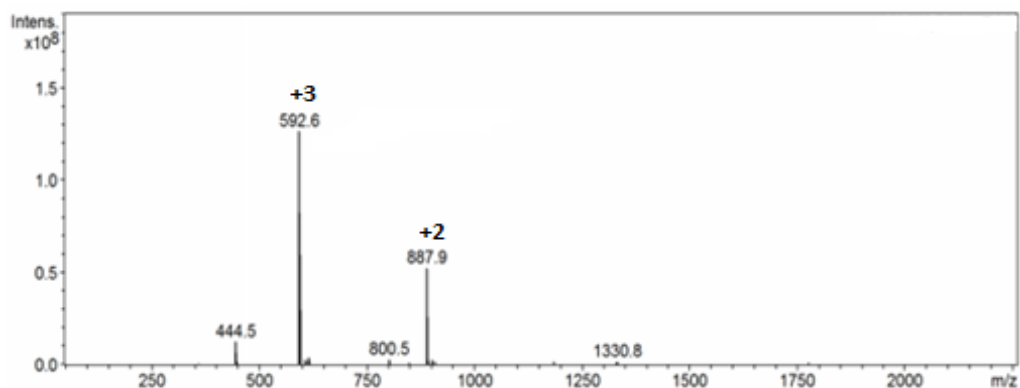
Os valores de massa molecular obtidos [ES  $m/z$ :  $(M + H)^+$ ], estão apresentados na Tabela 7, e foram coincidentes com o teórico esperado, considerando que todos foram analisados antes do processo de purificação, confirmando a identidade das estruturas peptídicas sintetizadas. O conjunto de resultados, permite concluir que os procedimentos utilizados para síntese, clivagem de peptidil-resina e metodologias de purificação desenvolvidas foram adequados, levando à obtenção das sequencias desejadas.

**Figura 22.** Espectro de massas do peptídeo **YjhX1-24A**. Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES+



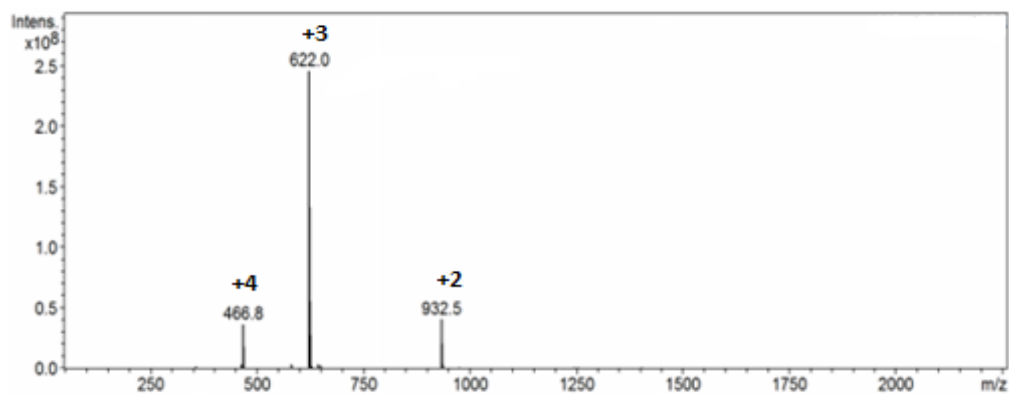
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 23.** Espectro de massas do peptídeo **YjhX1-15A**. Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES+



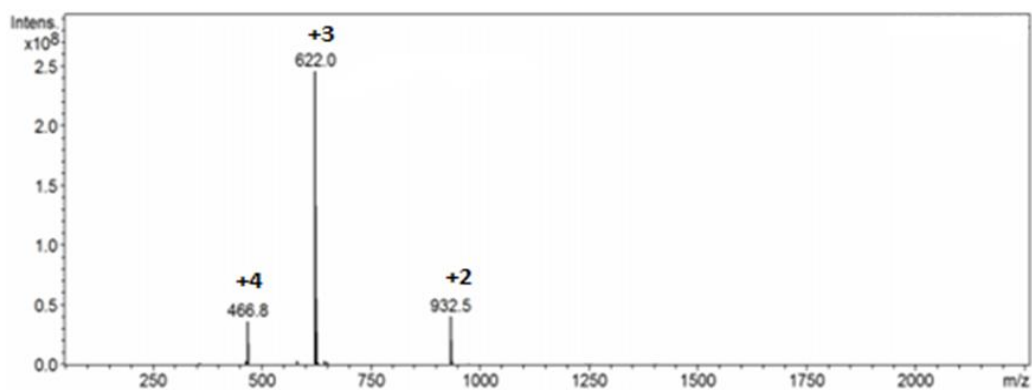
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 24.** Espectro de massas do peptídeo **YjhXw-14I**. Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES+



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 25.** Espectro de massas do peptídeo YjhXw-14L. Condições de ESI-MS: capilar: 3KV, cone:37 kV, modo de ionização ES+



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Tabela 7.** Resultado das análises de espectrometria de massas

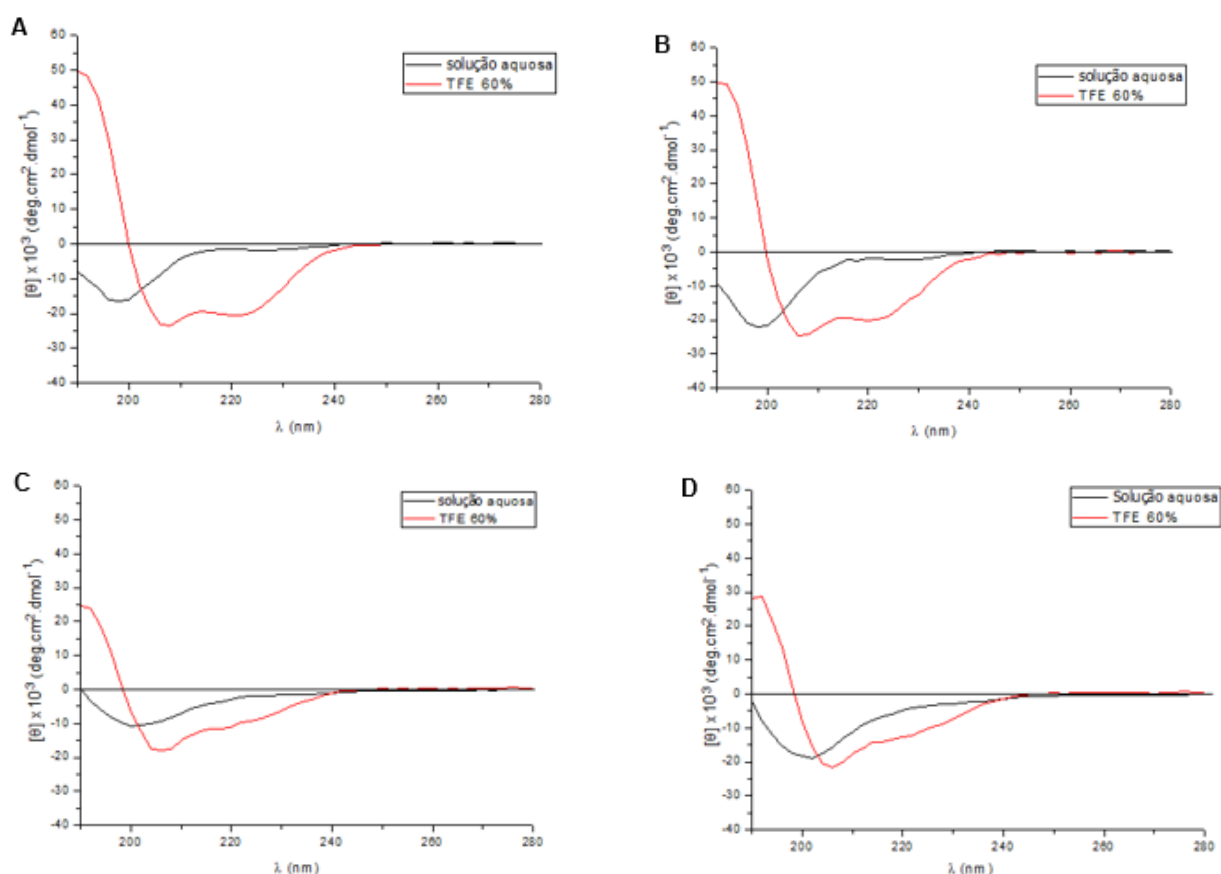
Peptídeo	Massa Molecular (g/mol)	ES+	ES m/z (MM)	Massa Molecular Obtida (g/mol)
YjhX1-24A	2.850,32	+3 +4 +5 +6	950,3 713,0 570,8 475,8	2.848,45
YjhX1-15A	1.776,03	+2 +3	887,9 592,6	1.774,30
YjhXw-14I	1.864,03	+2 +3 +4	932,5 622,0 466,8	1863,07
YjhXw-14L	1.864,03	+2 +3 +4	932,5 622,0 466,8	1863,07

**Fonte:** Elaborado pela autora.

#### 4.4 Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular (DC) fornece condições de avaliar a estrutura secundária de proteínas e peptídeos de interesse biológico, o que é importante para ajudar no entendimento do modo de ação destas moléculas. Os ensaios de DC para os peptídeos sintetizados foram realizados em solução aquosa e em TFE 60% em água (Figura 26), como descrito em Materiais e Métodos. Como referência, para análise dos espectros, foi utilizada os espectros padrões contidos na Figura 12.

**Figura 26.** Espectros de DC obtidos para os peptídeos (A) YjhX1-24A, (B) YjhX1-15A, (C) YjhXw-14I e (D) YjhXw-14L, em solução aquosa e solução TFE 60% em água.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Em solução aquosa, os peptídeos, independentemente da sequência, não apresentaram estrutura secundária definida, sendo observado em todos os espectros uma banda negativa com um máximo em torno de 198-200 nm, característica de randomização (WOODY, 1992). Em solução aquosa contendo TFE 60%, os peptídeos parecem exibir uma tendência de estruturação característica de  $\alpha$ -hélices.



Os estudos de modelagem molecular já direcionavam para a predominância de  $\alpha$ -hélice, como estrutura secundária dos peptídeos análogos de YjhX, especialmente YjhX1-24A e YjhX1-15A (Figuras 13 e 14). A técnica de dicroísmo circular confirmou estes resultados, ao menos quando na presença de um indutor de estrutura secundária como o TFE. A presença de uma banda positiva a 192-195 nm e as bandas negativas a 208 e 222 nm, evidenciam muito bem a estruturação em  $\alpha$ -hélice (Figuras 26A e 26B), o que não se pode afirmar em relação aos peptídeos YjhXw-14I e YjhXw-14L, cujos espectros mostram uma redução na banda negativa a 222 nm, caracterizando ainda uma sensível contribuição de uma randomização estrutural (Figuras 26C e 26D), a exemplo dos resultados prévios de modelagem molecular (Figuras 15 e 16).

## 4.5 Ensaios de inibição da atividade de DNA Topoisomerases

### 4.5.1 DNA topoisomerases bacterianas

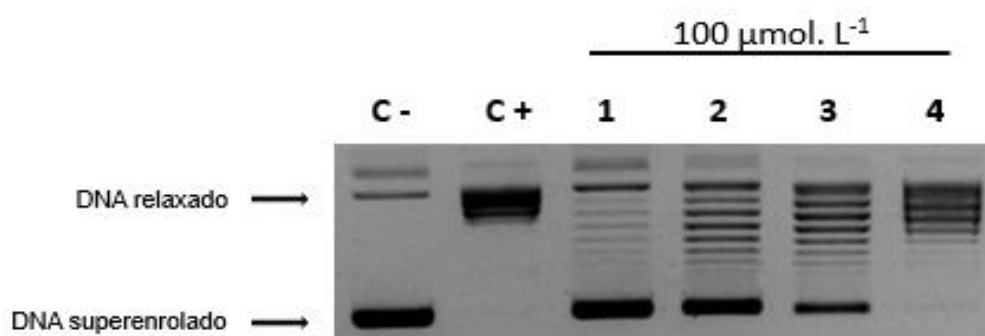
Os peptídeos sintetizados e purificados foram testados quanto a capacidade inibitória sobre a atividade de diferentes topoisomerases bacterianas, tais como a topoisomerase IA de *M. tuberculosis*, como representante das topoisomerases do tipo I e DNA girase e topoisomerase IV de *E. Coli*, como representantes das enzimas do tipo II.

#### *Topoisomerase IA (topoIA Mtb)*

As topoisomerases IA, presentes em todos os patógenos bacterianos, têm sido consideradas alvos potenciais para novos antibacterianos (TSE-DINH, 2015). Estas enzimas participam de vários processos essenciais ao metabolismo celular, promovendo o relaxamento de DNA superenrolado (VOS et al., 2011), gerando uma molécula que migra mais lentamente em relação à molécula de DNA superenrolado fechado, durante a eletroforese em gel.

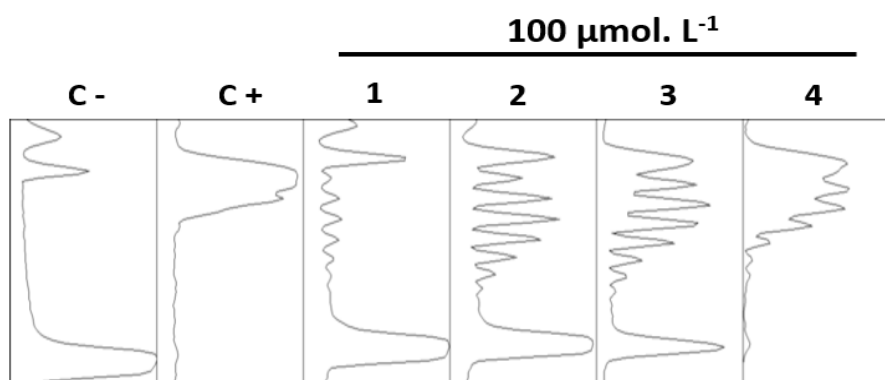
Assim, a reação de relaxamento do DNA superenrolado catalisada pela topoisomerase IA foi realizada na presença dos peptídeos sintetizados, e submetidos à eletroforese em gel. Inicialmente foi proposta uma triagem utilizando concentrações de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  para cada um dos peptídeos (Figuras 27 e 28).

**Figura 27.** Triagem inicial dos peptídeos sobre a inibição da atividade da **topo IA de *M. tuberculosis***. C-: controle negativo (plasmídeo relaxado); C+: controle positivo (plasmídeo relaxado + 1U de topo IA). Linhas 1 a 4 representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 28.** Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de triagem inicial dos peptídeos sobre a atividade de inibição da **topo IA de *M. tuberculosis***. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Linhas 1 a 4: representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$



**Fonte:** Elaborado pela autora.

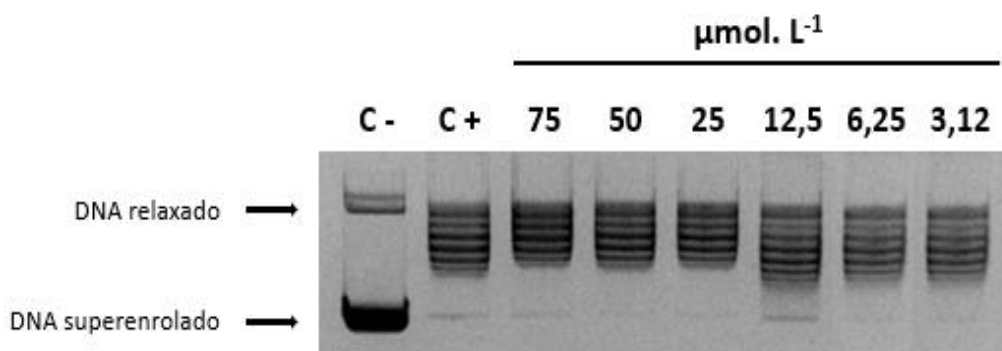
Com exceção do YjhX1-15A, que não inibiu, os demais peptídeos apresentaram um padrão de inibição da atividade da enzima, na concentração inicial de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Os resultados podem ser observados pelas bandas atribuídas aos respectivos topoisômeros e pelos picos de densitometria óptica das respectivas bandas referentes ao DNA relaxado e superenrolado do gel (Figuras 27 e 28).

Considerando-se o fato de que a proteína YjhX foi descrita como a primeira proteína endógena inibidora específica de topoisomerases do tipo IA (YAMAGUCHI;

INOUE, 2015), os resultados obtidos para a ação dos análogos peptídicos sobre a topo IA de *M. tuberculosis* corroboram o descrito por estes autores, pelo menos em concentrações até  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

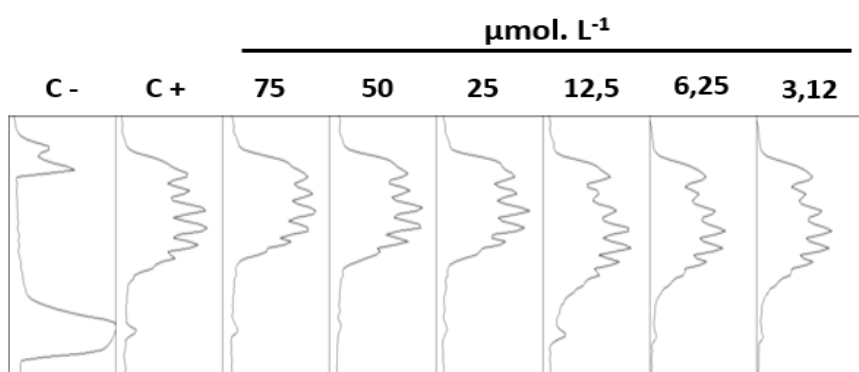
Contudo, é importante a determinação da concentração mínima inibitória (CIM) dos peptídeos que apresentaram atividade inibitória observada na triagem inicial, para realmente determinar o potencial de inibição de cada um deles. Deste modo, YjhXw-14I e YjhXw-14L foram testados em concentrações desde 75 a  $3,12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , (Figuras 29 a 34).

**Figura 29.** Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo **YjhXw-14I** sobre a atividade da **topo IA de *M. tuberculosis***. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração dos peptídeos em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$



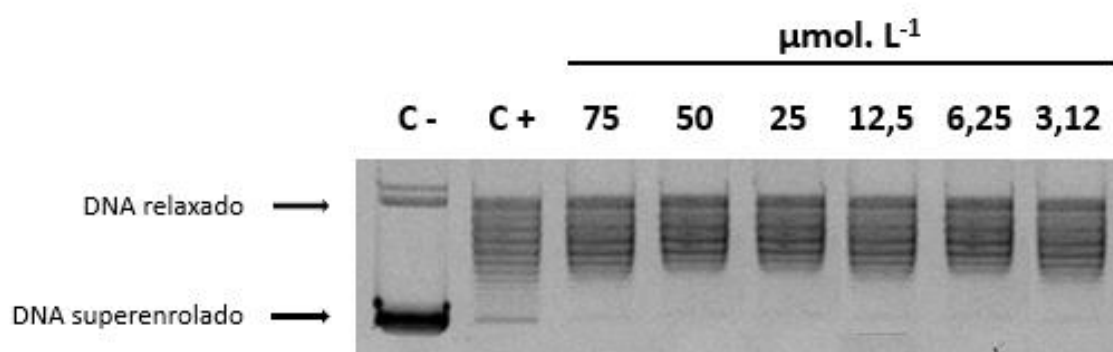
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 30.** Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da atividade da **topo IA de *M. tuberculosis*** do peptídeo **YjhXw-14I**. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração dos peptídeos em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$



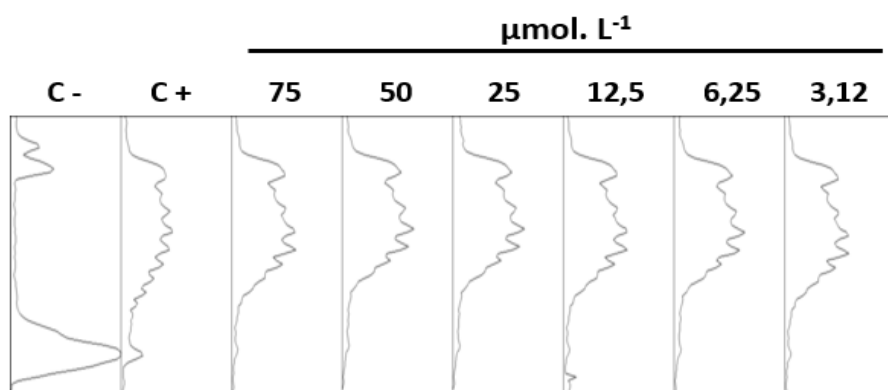
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 31.** Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo **YjhXw-14L** sobre a atividade da **topo IA de *M. tuberculosis***. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração dos peptídeos em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 32.** Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de inibição da atividade da **topo IA de *M. tuberculosis*** do peptídeo **YjhXw-14L**. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Números em cada aplicação no gel representam a concentração dos peptídeos em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Como pode ser avaliado, diferentemente dos resultados obtidos na triagem, os peptídeos YjhXw-14I e YjhX-14L não foram capazes de inibir a atividade da enzima topo IA de *M. tuberculosis*, em concentrações inferiores a  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . De fato, os valores de  $\text{IC}_{100}$ , obtidos por análise dos picos de Densitometria óptica dos respectivos gels de agarose apresentados nas Figuras 28, 30 e 32 e detalhados na Tabela 8, mostram que, nas concentrações ensaiadas (75 a  $3,12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), não há inibição enzimática.

No caso do peptídeo YjhX1-24A, devido sua baixa atividade inibitória, abaixo de 30% a 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , os ensaios empregando concentrações inferiores, não foram realizados.

**Tabela 8.** Comparação da atividade inibitória dos peptídeos sintéticos derivados de YjhX sobre a topoisomerase IA de *M. tuberculosis*.

Peptídeos	IC <sub>100</sub> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>
YjhXw-14I	100*
YjhXw-14L	>100 <sup>b*</sup>
YjhX1-24A	>100 <sup>c*</sup>
YjhX1-15A	Não Inibe

\* inibição estimada pelo software AlphaView (Alphamager®EP).

<sup>a</sup> Concentração do inibidor requerida para a completa inibição da atividade da topoisomerase.

<sup>b</sup> 70% de inibição da Topo IA de *M. tuberculosis* na concentração de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

<sup>c</sup> 30% de inibição da Topo IA de *M. tuberculosis* na concentração de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

**Fonte:** Elaborado pela autora.

Uma avaliação estrutural dos peptídeos propostos por modelagem molecular e sintetizados neste trabalho, sinalizava, a princípio, para a importância da estrutura em  $\alpha$ -hélice da extremidade N-terminal de YjhX, na interação com a topoisomerase IA, o que não foi confirmado pelos estudos de inibição da atividade desta enzima. De fato, os derivados YjhX1-24A e YjhX1-15A, caracterizados pela presença da referida  $\alpha$ -hélice, apresentaram as menores taxas de inibição, 30 e 0% a 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente. Por outro lado, os peptídeos sem estrutura definida em solução e contendo sequências de aminoácidos sem homologia com a toxina nativa, YjhXw-14I e YjhXw-14L, foram os que melhor inibiram a topo IA.

Estes resultados podem ser indicativos de que a  $\alpha$ -hélice N-terminal não deve participar do processo de interação com a enzima e conseqüentemente do processo inibitório, ou o domínio 1 da topo IA não é aquele mais provável para a interação com a toxina. A maior probabilidade de exposição de sítios para interação, determinada pelos estudos de bioinformática, não significa que estes deverão interagir,

necessariamente, com a toxina.

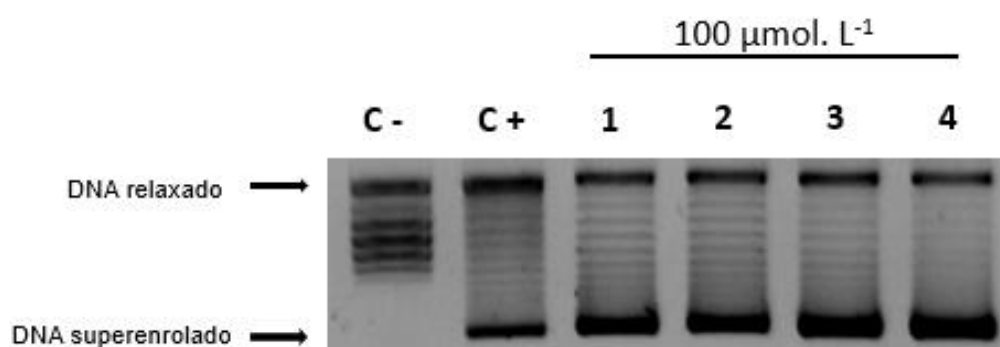
Diante destes resultados de baixa atividade inibitória sobre a topo IA, decidiu-se por avaliar a ação dos quatro peptídeos na inibição da atividade das topoisomerases do tipo II, DNA girase e topoisomerase IV.

#### *DNA girase e topoisomerase IV*

A DNA girase é uma topoisomerase do tipo II que introduz superenrolamento negativo em um DNA circular fechado, gerando uma molécula mais compacta, que migra mais rapidamente em relação ao DNA relaxado durante a corrida em gel de agarose, permitindo deste modo concluir acerca da atividade da enzima na presença de inibidores. Assim, foram realizadas reações de superenrolamento do DNA catalisado pela DNA girase de *Escherichia coli* na presença dos peptídeos sintetizados.

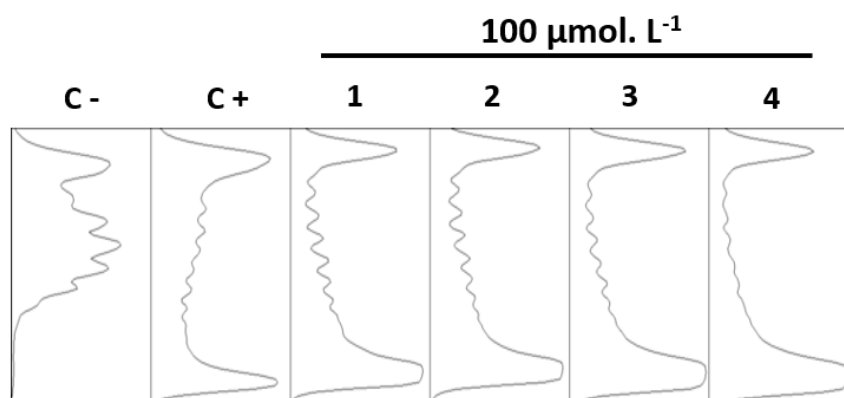
As Figuras 33 e 34 mostram, respectivamente, a eletroforese realizada para uma triagem inicial para estes peptídeos e a densitometria do gel obtida pelo software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). Observa-se que, independentemente da sequência peptídica utilizada, não foi identificada qualquer inibição da atividade da DNA girase, na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

**Figura 33.** Triagem inicial dos peptídeos sobre a inibição da atividade da **DNA girase de *E. coli***. C-: controle negativo (plasmídeo relaxado); C+: controle positivo (plasmídeo relaxado + 1U de girase). Linhas 1 a 4 representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 34.** Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de triagem inicial dos peptídeos sobre a atividade de inibição da **DNA girase de *E. coli***. C-: controle negativo (plasmídeo relaxado); C+: controle positivo (plasmídeo relaxado + 1U de DNA girase). Linhas 1 a 4: representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$



**Fonte:** Elaborado pela autora.

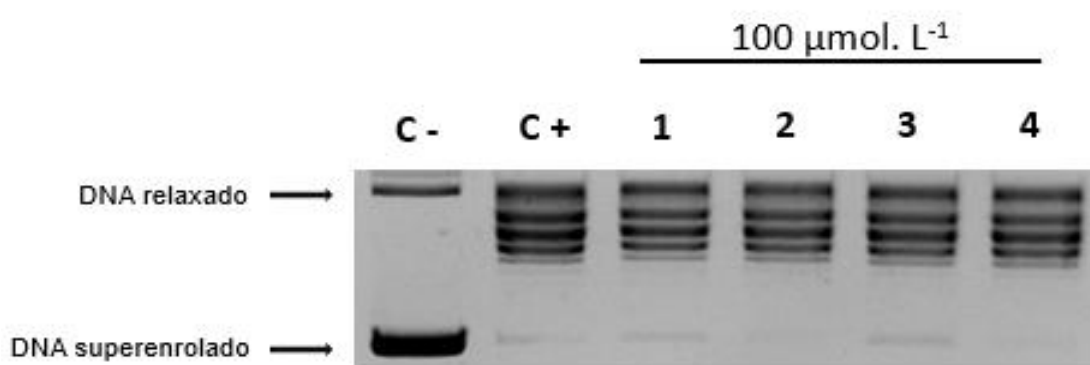
Ensaio de inibição da atividade da topoisomerase IV (topo IV) de *Escherichia coli* também foram realizados com os quatro peptídeos. Esta enzima possui a capacidade de relaxar moléculas de DNA superenovelado, gerando uma molécula mais volumosa que migra mais lentamente em relação à molécula de DNA superenovelado fechado, durante a eletroforese em gel. Assim, a reação de relaxamento do DNA superenovelado catalisada pela topo IV foi realizada na presença dos peptídeos e submetidos à eletroforese em gel.

Semelhantemente aos resultados obtidos com a DNA girase, todos os peptídeos testados não inibiram a atividade da topo IV na reação de triagem inicial, a  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figuras 35 e 36).

As topoisomerases IA bacterianas são todas monoméricas, possuem forma toroidal, sendo seu núcleo constituído de quatro domínios que formam uma cavidade com carga efetiva positiva, onde o sítio ativo se encontra. Já as topoisomerases IIA, assumem a forma de um heterotetrâmero  $A_2B_2$  (girase e de arqueas e topo IV), porém apresentando sempre dupla simetria. Esta diferença estrutural, resulta em mecanismos de ação distintos, de modo que as topoisomerases IA, atuam clivando apenas uma das fitas do DNA, independentemente da presença de ATP, e as topoisomerases IIA, catalisam a quebra e religação de ambas as fitas do DNA, uma reação dependente da hidrólise de ATP.

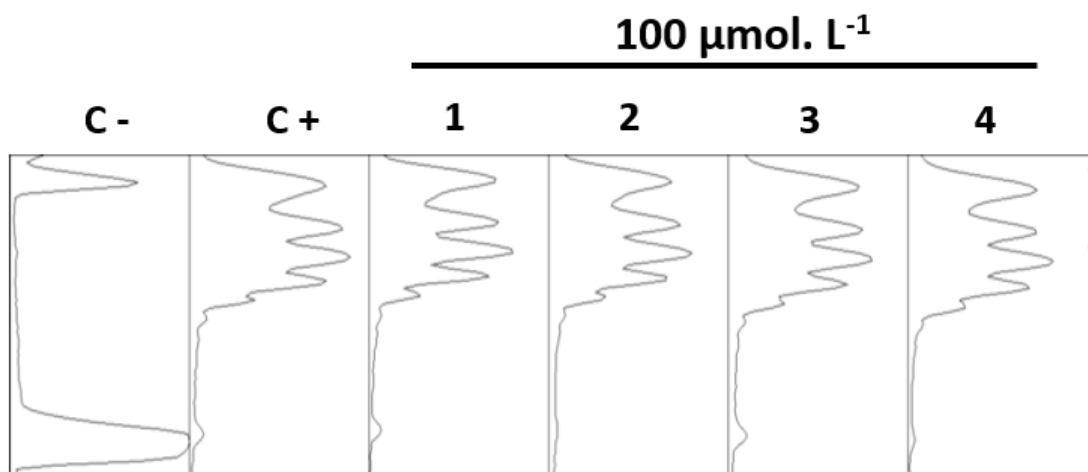
Essas diferenças estruturais e mecânicas, certamente, é o que faz da proteína YjhX, um inibidor específico de topoisomerase IA (YAMAGUCHI; INOUE, 2015), assim como alguns dos seus peptídeos derivados, aqui testados, mesmo que em concentrações elevadas.

**Figura 35.** Triagem inicial dos peptídeos sobre a inibição da atividade da **topo IV de *E. coli***. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IV). Linhas 1 a 4 representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 36.** Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de triagem inicial dos peptídeos sobre a atividade de inibição da topo IV de *E. coli*. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IV). Linhas 1 a 4: representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$



**Fonte:** Elaborado pela autora



#### 4.5.2 DNA topoisomerasas humanas

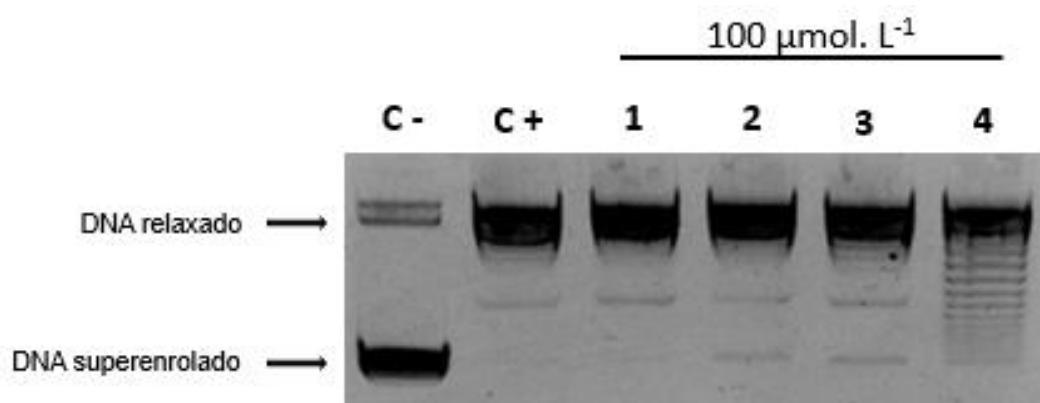
Os peptídeos obtidos neste trabalho também foram testados quanto a capacidade inibitória sobre a atividade de diferentes topoisomerasas humanas, tais como IB como representante das topoisomerasas do tipo I e II $\alpha$  e II $\beta$ , como representantes das enzimas do tipo II.

##### *Topoisomerasas II $\alpha$ e II $\beta$*

Embora relativamente diversas, a nível molecular, as topoisomerasas tipo II bacterianas (DNA girase e topo IV) e a topoisomerase II humana (Topo II) demonstram homologia estrutural e funcional suficiente, que é a base molecular para o modo conservado de interação entre a enzima e o DNA.

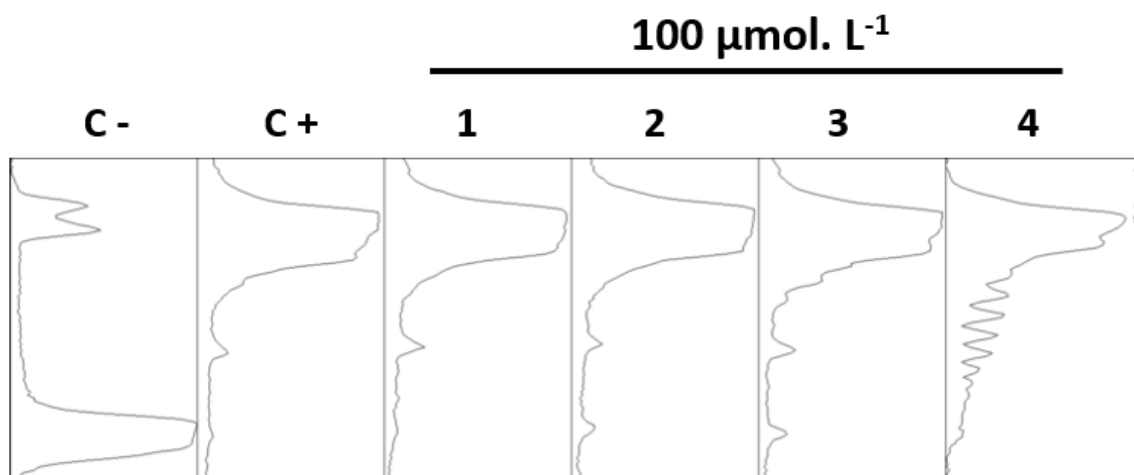
A exemplo das topoisomerasas tipo II bacterianas, importantes alvos terapêuticos para antibióticos naturais e sintéticos, a topo II humana também é alvo de diferentes fármacos, utilizados na terapia antitumoral (TOPCU, 2001). Duas isoformas de topoisomerase II ( $\alpha$  e  $\beta$ ) foram descritas em células humanas, e ambas foram testadas quando a capacidade de inibição dos peptídeos sintéticos YjhXw-14L, YjhXw-14I, YjhX1-24A e YjhX1-15A, inicialmente na concentração de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figuras 37 a 40).

**Figura 37.** Triagem inicial dos peptídeos sobre a inibição da atividade da **topo II $\alpha$** . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de girase). Linhas 1 a 4 representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$



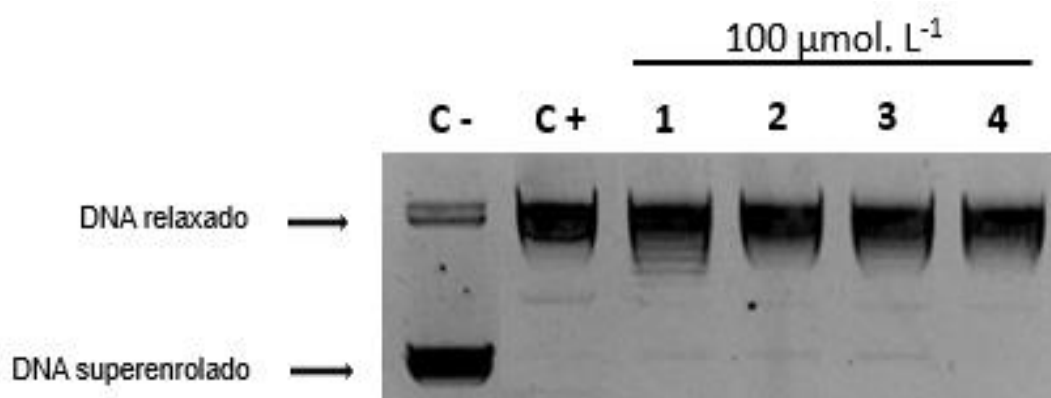
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 38.** Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de triagem inicial dos peptídeos sobre a atividade de inibição da **topo II $\alpha$** . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Linhas 1 a 4: representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$



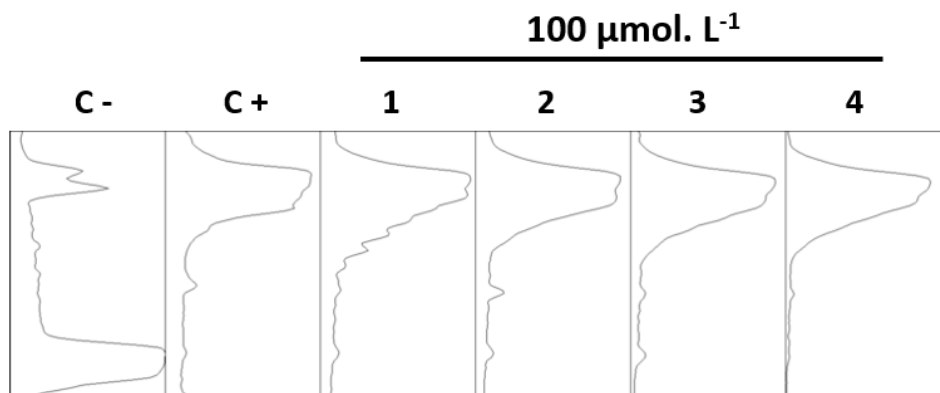
**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 39.** Triagem inicial dos peptídeos sobre a inibição da atividade da **topo II $\beta$** . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de girase). Linhas 1 a 4 representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 40.** Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de triagem inicial dos peptídeos sobre a atividade de inibição da **topo II $\beta$** . C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Linhas 1 a 4: representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Assim como foi observado para as topoisomerasas tipo II bacterianas, as de origem humana, também não foram inibidas por qualquer um dos peptídeos testados, na concentração de análise (100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Estas enzimas, de origens diferentes, não demonstram homologia estrutural e funcional com a topo IA bacteriana, reforçando a ideia de que a atividade inibitória da toxina YjhX e de seus análogos peptídicos, realmente é específica para topoisomerasas do tipo IA, assim como descrito por Yamaguchi e Inouye (2015). Em adição, os resultados semelhantes para as duas isoformas da enzima pode estar relacionados ao fato de as topoisomerasas humanas II $\alpha$  e II $\beta$  serem 68% idênticas entre si e compartilharem cerca de 78% de identidade entre suas porções catalíticas (WENDORFF et al., 2012).

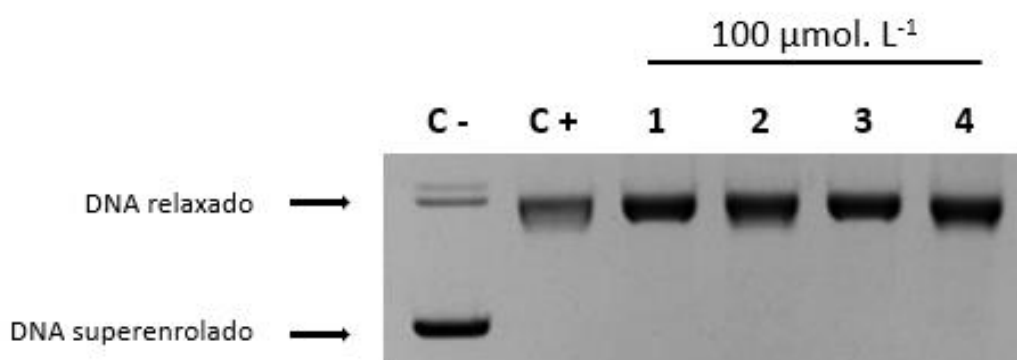
### *Topoisomerase IB*

A enzima topoisomerase IB humana (hTopoIB) assim como as topoisomerasas II  $\alpha$  e II $\beta$  é alvo de várias drogas utilizadas na quimioterapia do câncer, tais como a camptotecina e seus derivados. A busca por novos agentes antitumorais tais como inibidores de topoisomerasas humanas, representa um campo bastante interessante a ser explorado (POMMIER, 2010). Nesse contexto, sendo YjhX uma molécula

descrita como inibidora de topoisomerase tipo I bacteriana (YAMAGUCHI; INOUE, 2015), decidiu-se por realizar ensaios de avaliação do potencial inibitório da hTopoIB, também uma topoisomerase do tipo I, pelos peptídeos sintéticos derivados de YjhX.

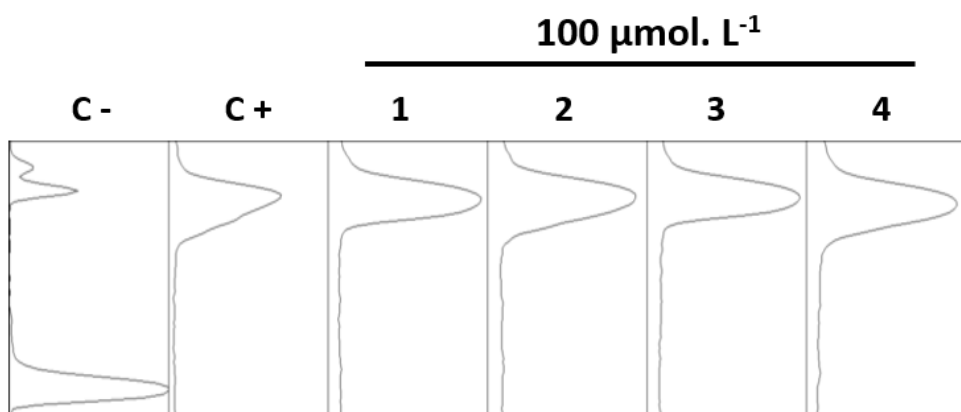
A exemplo dos demais experimentos, a concentração inicial de ensaio foi de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$  (Figuras 41 e 42).

**Figura 41.** Triagem inicial dos peptídeos sobre a inibição da atividade da **hTopo IB**. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de girase). Linhas 1 a 4 representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$



**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Figura 42.** Densitometria óptica do gel de agarose empregado no ensaio de triagem inicial dos peptídeos sobre a atividade de inibição da topo IB. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo IA). Linhas 1 a 4: representam respectivamente os peptídeos: YjhXw-14I, YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A na concentração de  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Os resultados obtidos com a topoisomerase IB de origem humana, a exemplo daquelas do tipo II, não teve sua atividade inibida por nenhum dos peptídeos testados.

Apesar de ambas, topo IA bacteriana e IB humana, serem classificadas como sendo do mesmo tipo, pertencem a famílias diferentes, IA e IB, não compartilhando assim, semelhanças em sequência, estrutura e mecanismo, características típicas de membros de uma mesma família (BAKER; RAJAN; MONDRAGON, 2009), o que justifica a ausência da atividade observada.

#### 4.6 Avaliação da atividade hemolítica

Os resultados apresentados na Tabela 9 evidenciam a baixa capacidade hemolítica de todos os peptídeos ensaiados. Na maior concentração testada, 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , YjhXw-14L, YjhX1-24A e YjhX1-15A apresentaram algum percentual de lise eritrocitária, com valores de 1%. A característica não citotóxica desses peptídeos representaria uma grande vantagem quanto da sua aplicação, especialmente se os peptídeos testados tivessem tido algum tipo de atividade inibitória em baixas concentrações. De qualquer forma, YjhXw-14I que inibiu a atividade da topoisomerase IA a 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , não apresentou atividade hemolítica nesta concentração.

**Tabela 9.** Percentual da atividade hemolítica dos peptídeos YjhX1-24A, Yjhx1-15A, YjhXw14I e YjhXw-14L, em diferentes concentrações ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )

Amostras	100	50	25	12,5	6,25	3,125
YjhX1-24A	1%	0%	0%	0%	0%	0%
YjhX1-15A	1%	1%	1%	0%	0%	0%
YjhXw-14I	0%	0%	0%	0%	0%	0%
YjhXw-14L	1%	0%	0%	0%	0%	0%

**Fonte:** Elaborado pela autora.

#### 4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana

O ensaio de inibição da atividade antimicrobiana em meio líquido foi realizado como descrito no item 3.7, com o intuito de analisar uma provável atividade bactericida

dos peptídeos sintetizados. Para isso foram selecionadas duas cepas bacterianas, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) e *Streptococcus agalactiae* (ATCC 14458), uma representante das Gram negativas e a outra das Gram positivas, respectivamente. Os ensaios foram efetuados em duplicata e a média das absorvâncias medidas, estão representadas nas Tabelas 10 e 11.

Para cada ensaio foram consideradas as medidas das absorvâncias do controle positivo e negativo. Os ensaios referentes à *K. pneumoniae* e à *S. agalactiae* apresentaram uma absorvância média para o controle positivo de  $0 \pm 0$ , enquanto o controle negativo obteve uma absorvância de  $0,348 \pm 0,04$  e  $0,406 \pm 0,09$ , respectivamente.

**Tabela 10.** Resultados das absorvâncias (625nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento de crescimento bacteriano para *K. pneumoniae* utilizando os análogos peptídicos YjhX1-24A, Yjhx1-15A, YjhXw14I e YjhXw-14L, a  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$

Peptídeo	Absorvância	% Inibição
YjhX1-24A	0,112	64,05%
YjhX1-15A	0,201	35,61%
YjhXw-14I	0,248	12,90%
YjhXw-14L	0,132	53,38%

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Tabela 11.** Resultados das absorvâncias (625nm) obtidas nos ensaios de inibição de crescimento de crescimento bacteriano para *S. agalactiae* utilizando os análogos peptídicos YjhX1-24A, Yjhx1-15A, YjhXw14I e YjhXw-14L a  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$

Peptídeo	Absorvância	% Inibição
YjhX1-24A	0,242	32,31%
YjhX1-15A	0,300	24,30%
YjhXw-14I	0,203	48,97%
YjhXw-14L	0,303	27,90%

**Fonte:** Elaborado pela autora.

Nenhum dos peptídeos ensaiados demonstrou atividade inibitória elevada, inclusive na concentração mais alta, a  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Contudo, é possível concluir acerca do efeito inibitório preferencial para a cepa Gram negativa. Para *K. pneumoniae*, os peptídeos YjhX1-24A e YjhXw-14L, obtiveram uma taxa de inibição de 64,05% e 53,38 % respectivamente, e uma sensível redução nestes valores para *S.agalactiae*.

Bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa composta fundamentalmente por lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídeos, a qual exibe forte carga negativa. Estudos como o de Hancock e Scott (2000) sugerem que a adição de peptídeos catiônicos, como YjhX1-24A (+5) e YjhXw-14L (+3) no meio extracelular, causa o deslocamento dos íons magnésio e cálcio que estabilizam a membrana externa, desse modo, facilitando a interação dos polipeptídeos com a membrana plasmática (MADIGAN, et al., 2010). Porém, o fato de se ter obtido uma taxa de inibição abaixo de 90%, bem como os valores obtidos para YjhXw-14L, que também possui uma carga líquida +3, no meio, fica evidente que este não é o único fator que rege a interação e o transporte do peptídeo para o meio intracelular.

Com relação a bactéria gram-positiva *S. agalactiae* (Tabela 11), constatou-se que as três moléculas também interferiram na multiplicação do microrganismo, com destaque para YjhXw-14L, que reduziu em cerca de 50% o crescimento bacteriano, enquanto que os demais tiveram queda no percentual na atividade, quando comparada à Gram negativa.

Nos ensaios com DNA topoisomerases, o peptídeo YjhX-15A, foi o único que não apresentou qualquer atividade inibitória, mesmo a  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , o que pode estar relacionado com a composição do meio intracelular. Diferentemente do meio utilizado para os ensaios de inibição de topoisomerases, o meio intracelular pode fornecer condições específicas que podem viabilizar a inibição das topoisomerases e consequentemente na atividade antimicrobiana observada. Por outro lado, a atividade antimicrobiana atribuída ao peptídeo YjhX-15A, pode estar relacionada com um mecanismo de ação distinto, ainda a ser identificado que, provavelmente não está envolvida a inibição da atividade de uma das topoisomerases dos microrganismos.

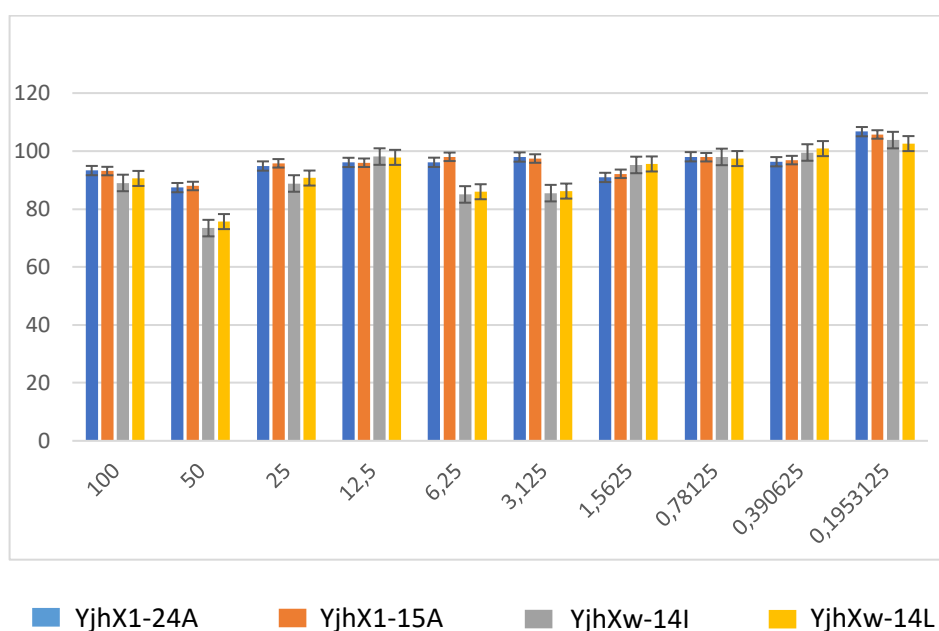
#### 4.8 Viabilidade celular

Um dos maiores desafios para o desenvolvimento de novos fármacos, tais como agentes antimicrobianos, consiste na obtenção de compostos ativos que não sejam tóxicos. Neste contexto, ensaios de viabilidade celular em células MCF-7 de adenocarcinoma de mama foram realizados, buscando-se avaliar a toxicidade dos peptídeos sintetizados.

Para isso, empregou-se o ensaio de MTT que fundamenta-se na atividade de desidrogenases mitocondriais de células viáveis que reduzem metabolicamente o sal de MTT (coloração amarela e solúvel em água), em cristais de formazan (cor azul-púrpura e insolúvel em água), que se acumulam no citoplasma celular (LI; SONG, 2007). Portanto, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular.

De acordo com a Figura 43 a viabilidade das células MCF-7, exposta à diferentes concentrações dos peptídeos YjhX-24A, YjhX-15A, YjhXw-14I e Yjhw-14L, não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle negativo, expressando, em geral, valores acima de 80% de viabilidade celular. Dessa forma, conclui-se que os peptídeos não apresentam ação tóxica frente a esta linha celular.

**Figura 43.** Viabilidade celular de células humanas MCF-7 de adenocarcinoma de mama tratadas por 24h com os peptídeos YjhX-24A, YjhX-15A, YjhXw-14I e Yjhw-14L conforme determinado pelo teste MTT.



**Fonte:** Elaborado pela autora.



## 5. Conclusões

- Os peptídeos YjhX1-24A e YjhX1-15A apresentam estruturação em  $\alpha$ -hélice, enquanto os peptídeos YjhXw-14I e YjhXw-14L possuem estrutura desordenada, segundo os estudos de dinâmica molecular.
- O método de síntese de peptídeo em fase sólida demonstrou ser eficiente para a produção das sequências peptídicas estudadas. Os processos de purificação e caracterização também foram eficientes, resultando em moléculas com elevado grau de pureza relativa acima dos 95% com identidade confirmada por espectrometria de massas.
- Os resultados adquiridos por meio da técnica de dicroísmo circular demonstraram que os peptídeos possuem estrutura randômicas em meio aquoso e que há uma tendência de se estruturarem em  $\alpha$ -hélice na presença de TFE, corroborando os dados obtidos na dinâmica molecular.
- Os peptídeos ensaiados, não apresentaram atividade inibitória frente a DNA topoisomerasas tipo II, mas inibem a atividade da topoisomerasas tipo I bacteriana, corroborando com conclusões prévias de que a proteína YjhX é um inibidor específico de DNA topoisomerasas do tipo IA.
- Os testes microbiológicos demonstraram haver baixa capacidade inibitória por parte dos peptídeos. Embora determinadas sequências tenham apresentado um índice de inibição superior a 50%, os resultados não são satisfatórios por estarem abaixo dos 90% de inibição.
- O peptídeo YjhXw-14I foi o único capaz de inibir 100% a atividade topo IA de *M. tuberculosis* na concentração de 100  $\mu\text{mol. L}^{-1}$ .
- Os peptídeos estudados não são tóxicos para células humanas, tendo em vista os resultados apresentados nos ensaios de hemólise e viabilidade celular.

- Com base nos resultados deste trabalho, a hipótese de que a interação da toxina YjhX ocorreria no domínio 1 da topoisomerase IA apresentou-se inválida. Sendo assim, novos estudos serão necessários para reavaliar a importância da região N-terminal na ação tóxica da YjhX, bem como identificar a região da topoisomerase IA que, de fato, interage com a toxina.

## 6. Referências

AAKRE, C. D. et al. A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the  $\beta$  sliding clamp. **Mol. Cell.**, v. 52, n. 5, p. 617-628, 2013.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREARY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Med. Res. Rev.**, v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.

AL-WARHI, T. I.; AL-HAZIMI, H. M. A.; EL-FAHAM, A. Recent development in peptide coupling reagents. **J. Saudi Chem. Soc.**, v. 16, p. 97-116, 2012.

AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. **Fundamentals of Modern peptide Synthesis**, in *Methods Mol. Biol.*, v. 298: *Peptide Synthesis and Applications*, edited by: J. Howl © Human Press Inc., Totowa, 2005.

ANDERSON, G. W.; MCGREGOR, A. C. t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, p. 6180-6183, 1957.

BAKER, N. M.; RAJAN, R.; MONDRAGON, A. Structural studies of type I topoisomerases. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 693-701, 2009.

BANIN, E.; HUGHES, D.; KUIPERS, O. P. Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 41, n. 3, p. 450-452, 2017.

BANSAL, S. et al. 3,4-Dimethoxyphenyl bis-benzimidazole, a novel DNA topoisomerase Inhibitor that preferentially targets *Escherichia coli* topoisomerase I. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 2882-2891, 2012.

BARBOSA, L. C. B. et al. Toxin-antitoxin systems and its biotechnological applications. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 13, n. 1, p. 11-17, 2014.

BAXEVANIS, A. D.; OUELLETTE, B. F. F. (Ed.). **Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins**. 3rd ed. Hoboken: John Wiley and Sons, 2005.

BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BIETZ, S.; RAREY, M. ASCONA: Rapid Detection and Alignment of Protein Binding Site Conformations. **Journal of Chemical Information and Modeling.**, v.8, p.1747-1756, 2015.

BLOWER, T. R. et al. Identification and classification of bacterial Type III toxin antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, n. 13, p. 6158-6173, 2012.

BROWN, P. O.; COZZARELLI, N. R. Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 78, n. 2, p. 843-847, 1981.

BUJNICKI, J. M. Protein structure prediction by recombination of fragments. **ChemBiochem**, v. 7, n. 1, p. 19-27, 2006.

BUSTAMANTE, P.; IREDELL, J. R. Carriage of type II toxin-antitoxin systems by the growing group of IncX plasmids. **Plasmid**, v. 91, p. 19-27, 2017.

CAMPANA, P. T. et al. Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 5647-5652, 2001.

CAREY, F. A. **Organic chemistry**. 3rd ed. New York: MacGraw-Hill, 1996.

CARPINO, L. A.; HAN, G. A. The 9-fluorenylmethyloxycarbonyl amino protecting group. **Journal of the American Chemical Society**, v. 37, p. 3404-3409, 1972.

CHAN, W. C.; WHITE, P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach**, New York, Oxford University Press, 2000.

CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 369-413, 2001.

CHENG, B.; LIU, I.; TSE-DINH, Y. C. Compounds with antibacterial activity that enhance DNA cleavage by bacterial DNA topoisomerase I. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 640-645, 2007.

COHEN, N. C. et al. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. **J. Med. Chem.**, v. 33, p. 883-894, 1990.

CORBETT, K. D.; BERGER, J. M. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 33, p. 95-118, 2004.

DEWEESE, J. E.; OSHEROFF, N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: Wolf in sheep's clothing. **Nucleic Acids Research**, **Nashville**, v.37, p. 738-748, 2009.

FEINBERG, H., LIMA, C.D., MONDRAGON, A. Conformational changes in E. coli DNA topoisomerase I. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v.6, p. 918-922, 1999.

FERNANDES, P.; MARTENS, E. Antibiotics in late clinical development. **Biochem. Pharmacol.**, v. 133, p. 152-163, 2017.

FORTERRE, P. et al. Origin and Evolution of DNA topoisomerases. **Biochimie**, v. 89, p. 427-446, 2007.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 1, p. 122-128, 2015.

FOZO, E. M. et al. Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: searches for new candidates and discovery of novel families. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, n. 11, p. 3743-3759, 2010.

FRACZKIEWICZ, R., BRAUN, W. "A New Efficient Algorithm for Calculating Solvent Accessible Surface Areas of Macromolecules" presented at the Third Electronic Computational Chemistry Conference; Northern Illinois University; November, **World Wide Web**, 1996.

- FRACZKIEWICZ, R., BRAUN, W. "Exact and Efficient Analytical Calculation of the Accessible Surface Areas and Their Gradients for Macromolecules" **J. Comp. Chem.**, v.19, p. 319-333, 1998.
- GERDES, K.; CHRISTENSEN, S. K.; LØBNER-OLESEN, A. Prokaryotic toxin antitoxin stress response loci. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 5, p. 371-382, 2005.
- HALL, A. M.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Toxin–antitoxin systems: reversible toxicity. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 36, p. 102-110, 2017.
- HANCOCK, R. E. W.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, n. 16, p. 8856-8861, 2000.
- HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C.; VAN GUNSTEREN, W. Molecular dynamics simulation. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 12, p. 190-196, 2002.
- HELAINE, S.; KUGELBERG, E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. **Trends Microbiol.**, v. 22, n. 7, p. 417-424, 2014.
- HIGGINS, N. P. A human TOP2A core DNA binding X-ray structure reveals topoisomerase subunit dynamics and a potential mechanism for SUMO modulation of decatenation. **Journal of Molecular Biology**, v. 424, p. 105-108, 2012.
- HOLDEN, J. A. DNA topoisomerases as anticancer drug targets: from the laboratory to the clinic. **Current Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-25, 2001.
- JUBILUT, G. N. et al. Evaluation of the trifluoromethanesulfonic acid/trifluoroacetic acid/thioanisole cleavage procedure for application in solid-phase peptide synthesis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 9, p. 1089-1092, 2001.
- KACZANOWSKI, S.; ZIELENKIEWICZ, P. Why similar protein sequences encode similar three-dimensional structures? **Theor. Chem. Acc.**, v. 125, p. 643-650, 2010.
- KAISER, E.; COLESCOT, R. L.; BOSSINGE, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Anal. Bioch.**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970.
- KAPLAN, W. et al. Priority Medicines for Europe and the World 2013 Update. **World Health Organization**, v. 9, 2013.
- KRAH, R. et al. A Two-Subunit Type I DNA Topoisomerase (reverse Gyrase) from an Extreme Hyperthermophile. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 106-110, 1996.
- KEREN, I. et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 230, n. 1, p. 13-18, 2004.
- KREUZER, K. N.; COZZARELLI, N. R. Formation and resolution of DNA catenates by DNA gyrase. **Cell**, v. 20, p. 245-254, 1980.
- KOLINSKI, A. Protein modelling and structure prediction with a reduced representation. **Acta Biochim. Pol.**, v. 51, p. 349-371, 2004.

LAU, J. L.; DUNN, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.26, p. 2700-2707, 2018.

LEPLAE, R. et al. Diversity of bacterial type II toxin–antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 3, n. 5, p. 371-384, 2011.

LIEN, S.; BLOWMAN, H. Therapeutic peptides. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n.12, p. 556-562, 2003.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?. **Journal of Neuroscience Methods**., v. 96, p.147-152, 2000.

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E. Development of novel antimicrobial agents: emerging strategies. Wymondham: Horizon Scientific Press, p. 1-15, 2001.

LUEPKE, K.H., SUDA, K.J., BOUCHER, H., RUSSO, R.L., BONNEY, M.W., HUNT, T.D., MOHR, J. F. Past, present and future of antibacterial economics: increasing bacterial resistance, limited antibiotic pipeline, and societal implications. **Pharmacotherapy**, v. 37, n.1, 2017.

MACHADO, A.; LIRIA, C. W.; PROTI, P. B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T. M. Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, p.1160, 2010.

MAISONNEUVE, E.; CAMARGO, M. C.; GERDES, K. (p) ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. **Cell**., v. 154, n. 5, p. 1140-1150, 2013.

MARCHETTO, R.; ETCHEGARAY, A.; NAKAIE, C. R. Kinetics of synthesis and swelling studies of highly substituted benzhydrylamine-resins: implications for peptide synthesis and perspectives for use as anion exchanger resin. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 3, p. 30-37, 1992.

MARCHETTO, R. A química de peptídeos e o mecanismo de ação da DNA girase. 2006. 94 f. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2006.

MARQUARDT, M.; EIFLER-LIMA, V. L. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. **Quim. Nova**, v. 24, n. 6, p. 846-855, 2001.

MARTIM-REMON, M. A.; STUART, A.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELLO, F.; SALI, A. Comparative protein structure modelling of genes and genomes. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 29, n. 16, p. 291-235, 2000.

MARTÍNEZ, J. L. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. **Front. Microbiol.**, v. 3, 2012.

MASUDA, H. et al. YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 84, n. 5, p. 979-989, 2012.

MASUDA, H.; INOUE, M. Toxins of Prokaryotic Toxin-Antitoxin Systems with Sequence-Specific Endoribonuclease Activity. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 140, 2017.

MAXWELL, A. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 681-686, 1993.

MCCLENDON, A. K.; OSHEROFF, N. DNA Topoisomerase II, **Genotoxicity, and Cancer. Mutation Research**, v. 623, p. 83-97, 2007.

MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. I: the synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, p. 2149-2154, 1963.

MICSONAI, A.; WIEN, F.; KERNYA, L.; LEE, Y.; GOTO, Y.; RÉFRÉGIERS, M.; KARDOS, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proc. Natl. Acad. Sc. USA**, v. 112, p. 3095-3103, 2015.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immun. Meth.**, v.55, p. 55-63, 1983.

MOULT, J.; FIDELIS, K.; KRYSHTAFOVYCH, A.; SCHWEDE, T.; TRAMONTANO, A. Critical assessment of methods of protein structure prediction (CASP) -roundx. **Proteins**, v. 82, p.1-6, 2014.

NAGHMOUCHI, K. et al. Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. **Res. Microbiol.**, v. 163, n. 2, p. 101-108, 2012.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecl. Quím.**, v. 33, n. 4, p.13-24, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NEUMAN, K. C. Evolutionary twist on topoisomerases: Conversion of gyrase to topoisomerase IV. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 52, p. 22363-22364, 2010.

NOLLMANN et al. Multiple modes of *Escherichia coli* DNA gyrase activity revealed by force and torque. **Nat. Struct. Mol. Biol.** v. 14, p. 264-271, 2007.

OSGUTHORPE, D. J. Ab initio protein folding. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 10, n. 2, p. 146-152, 2000.

PAGE, R.; PETI, W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. **Nat. Chem. Biol.**, v. 12, n. 4, p. 208-214, 2016.

PAYNE, D. J. Desperately seeking new antibiotics. **Science.**, v. 321, n. 5896, p. 1644-1645, 2008.

PENG, H.; MARIANS, K. J. Escherichia coli Topoisomerase IV. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 32, p. 24481-24490, 1993.

PENG, H.; MARIANS, K. J. The interaction of Escherichia coli Topoisomerase IV with DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 25286-25290, 1995.

PINILLA, C. et al. A review of the utility of soluble peptide combinatorial libraries. **Biopolymers**, v. 37, p. 221-240, 1995.

PRIETO-MARTÍNEZ, F. D.; ARCINIEGA, M.; MEDINA-FRANCO, J. L. Molecular docking: current advances and challenges. **Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol.**, v.21, p.1-23, 2018.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. **Chemistry & Biology**, v. 17, p. 421-433, 2010.

PRONK, S. et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, p. 845-854, 2013.

PURDIE, N. Chiroptical analytical methods. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. (Ed.). **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. 3rd ed. Pinehurst: PharmaceuTech, v. 1, p. 445-462., 2007.

REECE, R.; MAXWELL, A. DNA gyrase: structure and function. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 26, p. 335-375, 1991.

ROHL, C. A.; STRAUSS, C. E.; MISURA, K. M.; BAKER, D. Protein structure prediction using rosetta. **Methods in Enzymology**, v. 383, p. 66-93, 2004.

ROY, A. K.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nat. Prot.**, v. 5, p. 725-738, 2010.

SLESAREV, A. I. et al. DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic Topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. **Nature**, v. 364, n. 6439, p.735-737, 1993.

SRINIVASAN, R.; ROSE, G. D. LINUS - a hierarchic procedure to predict the fold of a protein. **Proteins**, v. 22, p. 81-99, 1995

SRIVENUGOPAL, K. S.; LOCKSHON, D.; MORRIS, D. R. Escherichia coli DNA topoisomerase III: purification and characterization of a new type I enzyme. **Biochemistry**., v. 23, n. 9, p. 1899-1906, 1984.

STERNBERG, M. **Protein structure prediction: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1997.

STEWART, J. M.; YOUNG, J. D. In: MERRIFIELD, R. B. (Ed.) **Solid Phase Peptide Synthesis**, New York: Pierce Chemical Company, 2<sup>a</sup> Ed., 1984.

TEREKHOVA, K.; GUNN, K. H.; MARKO, J. F.; MONDRAGÓN, A. Bacterial topoisomerase I and topoisomerase III relax supercoiled DNA via distinct pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 10432-10440, 2012.



TOMAŠIĆ, T.; MAŠIČ, L. P. Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 1, p.130-151, 2014.

TOPCU, Z. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. **Journal of Clinical Pharmacy Therapeutics**, v. 26, p. 405-416, 2001.

TRAMONTANO, A.; LESK, A. M. **Protein structure prediction**. Weinheim: Wiley- VCH, 2006.

TSE-DINH, Y. C.; KIRKEGAARD, K.; WANG, J. Covalent bonds between protein and DNA. Formation of phosphotyrosine linkage between certain DNA topoisomerases and DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 255, p. 5560-5565, 1980.

TSE-DINH, Y. C.; WANG, J. C. E. coli and M. luteus DNA topoisomerase I can catalyze catenation of decatenation of double-stranded DNA rings. **Cell Press**. v. 22, p.269-276, 1980.

TSE-DINH, Y. C. Bacterial topoisomerase I as a target for discovery of antibacterial compounds. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 3, p. 731-737, 2009.

TSE-DINH, Y. C. Targeting bacterial topoisomerase I to meet the challenge of finding new antibiotics. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 459-471, 2015.

TSE-DINH, Y. C. Targeting bacterial topoisomerases: how to counter mechanisms of resistance. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n.10, p. 1085-1100, 2016.

VERDONK, L. V. et al. Improved protein–ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, p.609-623, 2003.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4<sup>a</sup> ed, Artmed, Porto Alegre, 2013.

VOS, S. M. et al. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.12, n.12, p. 827-841, 2011.

WANG, J.C. Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein  $\omega$ . **Journal of Molecular Biology**, v. 55, p. 523-533, 1971.

WANG, J. C. DNA topoisomerases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 665-697, 1985.

WANG, J. Chap 5. In: BATES, A.D.; MAXWELL, A. **DNA Topology**. Oxford University Press, 2005.

WANG, X.; WOOD, T. K. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5577-5583, 2011.

WANG, X. et al. A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. **Nat. Chem. Biol.**, v. 8, n. 10, p. 855-861, 2012.

WASZKOWYCZ, B.; CLARK, D.E.; GANCIA, E.; Outstanding challenges in protein–ligand docking and structure-based virtual screening. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 1, p. 229 -259, 2011.

WENDORFF, T. J. et al. The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. **Journal of Molecular Biology**, v. 424, p. 109-124, 2012.

WERMUTH, G. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC recommendations 1997). **Annu. Rep. Med. Chem**, v.33, p.385-395, 1998.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89, n. 5, p. 392-400, 2007.

WIGLEY, D. B. Structure and mechanism of DNA topoisomerases. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 24, p. 185-208, 1995.

YAMAGUCHI, Y., INOUE, M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. **Nat. Rev. Microbiol.** , v.9, n.11,p.779-790, 2011.

YAMAGUCHI, Y.; INOUE, M. An endogenous protein inhibitor, YjhX (TopAI), for topoisomerase I from *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, v. 43, p. 10387-10396, 2015.