

UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Estudos de dimerização de peptídeos e os efeitos na
inibição da atividade de DNA topoisomerasas

Jonatas Medeiros de Almeida Angelo

Araraquara
2021

JONATAS MEDEIROS DE ALMEIDA ANGELO

Estudos de dimerização de peptídeos e os efeitos na inibição
da atividade de DNA topoisomerasas

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Araraquara
2021

FICHA CATALOGRÁFICA

A584e Angelo, Jonatas Medeiros de Almeida
Estudos de dimerização de peptídeos e os efeitos na
inibição da atividade de DNA topoisomerasas / Jonatas
Medeiros de Almeida Angelo. – Araraquara : [s.n.], 2021
104 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Reinaldo Marchetto

1. Inibidores enzimáticos. 2. Antibióticos peptídicos.
3. Antibacterianos. 4. Anti-infecciosos. 5. Dímeros. I. Título.

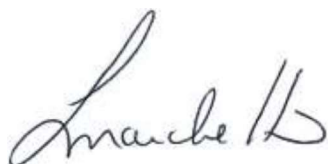
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudos de dimerização de peptídeos e os efeitos na inibição da atividade de DNA topoisomerasas

AUTOR: JONATAS MEDEIROS DE ALMEIDA ANGELO

ORIENTADOR: REINALDO MARCHETTO

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



Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. FERNANDO ROGERIO PAVAN (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 16 de junho de 2021

DADOS CURRICULARES

Nome: Jonatas Medeiros de Almeida Angelo

Nome em citações bibliográficas: ANGELO J. M. A.; DE ALMEIDA ANGELO, JONATAS MEDEIROS; ANGELO J. M DE A.

Endereço profissional: Instituto de Química – UNESP- Araraquara. Rua Francisco Degni, 55, Quitandinha, Araraquara 14800-900, SP – Brasil.

Telefone: (16) 997741260

Endereço eletrônico: jonatas.angelo@unesp.br

Formação Acadêmica

2014 - 2017 Graduação em Biomedicina.
Universidade do Sagrado Coração, USC, Brasil.

Cursos de curta duração

2021

Ancoragem Molecular: (Carga horária: 9h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2020

Introduction to Molecular Modeling in Drug Discovery (Carga horária: 20h).
Schrödinger curso online código 0000590

2019

Esquistossomose: manejo clínico e epidemiológico na Atenção Básica. (Carga horária: 45h).
Universidade Aberta do SUS, UNA-SUS, Brasil.

2018

Microbiologia: Por Dentro do Corpo Humano. (Carga horária: 5h).
Instituto Biomédico de Aprimoramento Profissional, IBAP, Brasil.

2018

Deteção de Drogas em Matrizes Biológicas. (Carga horária: 1h).
Instituto Biomédico de Aprimoramento Profissional, IBAP, Brasil.

2018

Controle de Qualidade Microbiológico. (Carga horária: 60h).
Instituto Biomédico de Aprimoramento Profissional, IBAP, Brasil.

2018

Biotecnologia. (Carga horária: 60h).
Instituto Biomédico de Aprimoramento Profissional, IBAP, Brasil.

2018

Hanseníase na Atenção Básica. (Carga horária: 45h).
Universidade Aberta do SUS, UNA-SUS, Brasil.

2017

Produção de Etanol a partir do melaço de cana. (Carga horária: 18h).
Universidade do Sagrado Coração, USC, Brasil.

2017

Micologia Médica: do clássico ao molecular. (Carga horária: 7h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2016

Desafiando o Cérebro para obter Neuroproteção contra Neuroinflamação e doenças
Neurodegenerativas (Carga horária: 4h).
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2016

Manejo da Coinfecção TB-HIV. (Carga horária: 45h).

Universidade Aberta do SUS, UNA-SUS, Brasil.

2016

Curso de Férias em Farmacologia 2016. (Carga horária: 80h).

Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Brasil.

2015

Neuroplasticidade. (Carga horária: 4h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2015

Introdução à Bioinformática. (Carga horária: 7h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2014

Mini-curso Biotecnologia de células-tronco. (Carga horária: 4h).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Participação em eventos científicos

- 3ª Escola de “Modelagem Molecular”. Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. 2021.
- Workshop “Redação de Patentes, Além do Guias”. Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. 2019.
- Workshop “Introdução à Simulação da Dinâmica de Proteínas”. Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. 2019.
- 20º Encontro Nacional de Biomedicina. ”. Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil 2017.
- 19º Encontro Nacional de Biomedicina. ”. Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil 2016.
- VIII SIMPÓSIO FORENSE. 2016.

- 18º Encontro Nacional de Biomedicina. ". Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil 2015.
- 17º Encontro Nacional de Biomedicina. ". Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil 2014
- II Jornada de Biomedicina. 2014.

Apresentação de Trabalhos

- ANGELO, J. M. A.; BERTOZZO, T. V.; MOREIRA, L. R. Investigação sobre o Efeito do exercício físico aeróbico e da suplementação *Tribulus Terrestris* no desempenho mnemônico de camundongos suíços. 2017.
- BERTOZZO, T. V.; MARCELLINO, M.C.L.; ANGELO, J. M. A.; MOREIRA, L. R. Avaliação do Efeito do extrato de *Tribulus terrestris* na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizados e não ovariectomizados. 2017.

Trabalhos publicados:

- BERTOZZO, T. V.; MOREIRA, L R.; ANGELO J. M. A.; MARCELLINO, M. C. L. Análise histológica do fêmur de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas suplementadas com extrato de *Tribulus terrestris* L. SALUSVITA: REVISTA DA AREA DE CIENCIAS BIOLOGICAS E DA SAUDE, v. 38, p. 369-379, 2019.
- BERTOZZO, T. V.; MOREIRA, L R; ANGELO J. M. A.; MARCELLINO, M. C. L. Avaliação do efeito do extrato de *Tribulus terrestris* L. na ocorrência do ciclo estral de camundongos suíços fêmeas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.. SALUSVITA: REVISTA DA AREA DE CIENCIAS BIOLOGICAS E DA SAUDE, v. 38, p. 381-399, 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Claudenir e Maria, pelo apoio incondicional

Às minhas irmãs

Aos queridos amigos Sebastião e Diego Wilxenski (*in memoriam*)

A todos que contribuíram, de alguma forma, para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todos os sacrifícios e abdições que fizeram para me proporcionar as oportunidades que eles não tiveram.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Reinaldo Marchetto, por me aceitar como orientado, pela dedicação ao trabalho, ensinamentos, discussões, conselhos e todo o crescimento que ocasionaram.

Ao Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido, pelas contribuições que fez durante a qualificação, e pelas conversas na “salinha”.

Aos amigos que este projeto me concedeu: Fauller, David, Carol, Jéssica, Nayara, Nat, Zaida, Leonardo, Greg, Gabi, Dani, Aderson, Lorrane que me ensinaram tanto e ainda tornaram toda a trajetória mais prazerosa.

Aos amigos “Brendon” e Carol, que me acompanham desde a graduação.

Ao Crusca, pelo auxílio nos experimentos e por sempre estar disponível para ajudar em todas as etapas desse projeto.

Às minhas sobrinhas, Sophia e Luíza pela alegria que transforma todos ao seu redor.

À Ana, minha querida namorada, pelo incentivo, por estar ao meu lado em todos os momentos e por me fazer desejar ser melhor.

A todos os profissionais da Seção Técnica de pós-graduação do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, sem os quais nada poderia ser feito.

Aos cientistas e profissionais da saúde que estão na linha de frente contra Covid-19, mesmo sem descanso e reconhecimento.

À CAPES pela bolsa concedida, por financiar este projeto.

“E se o mundo não corresponde em todos os aspectos a nossos desejos, é culpa da ciência ou dos que querem impor seus desejos ao mundo?”
Carl Sagan

RESUMO

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de mortalidade em todo o mundo, especialmente devido à crescente disseminação de bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos atualmente disponíveis. Diante deste cenário, a pesquisa e o desenvolvimento de novos antimicrobianos, que possam atuar em diferentes alvos intracelulares, torna-se de grande urgência e importância. DNA topoisomerasas são enzimas essenciais para a regulação dos processos fisiológicos e viabilidade celular e têm se mostrado um alvo bem atrativo para a ação de vários fármacos. Neste sentido, a pesquisa de novos inibidores de topoisomerasas, incluindo os peptídeos sintéticos, representa uma estratégia promissora no desenvolvimento de uma nova classe de agentes terapêuticos. O uso de peptídeos como antimicrobianos apresenta importantes vantagens, como alta especificidade, diversidade nos mecanismos de ação, relativa facilidade no processo de síntese, capacidade de impedir a formação de biofilme e raras ocorrências de resistência bacteriana. Assim sendo, a síntese de análogos dimerizados do peptídeo WRWYCRCK se mostra uma importante e eficiente abordagem, que pode vir a contribuir com o desenvolvimento de novos e mais potentes inibidores de topoisomerasas, candidatos a agentes antimicrobianos. Neste trabalho, peptídeos lineares, análogos ao octapeptídeo WRWYCRCK, foram obtidos pela metodologia da fase sólida e submetidos a processos oxidativos para a formação de ligações dissulfeto direcionadas, com o objetivo de avaliar o efeito do número e posição destas ligações, na inibição da atividade de diferentes topoisomerasas. A dimerização favoreceu a atividade inibitória do octapeptídeo WRWYCRCK sobre as DNA topoisomerasas, independentemente da classe e da origem das mesmas. A maior susceptibilidade das topoisomerasas aos dímeros DimLin2 e DimAPLin2 sugere que ambos os resíduos de cisteína e as respectivas ligações dissulfeto são fundamentais para a inibição enzimática, o que corrobora o efeito bactericida e fungicida obtidos a baixas concentrações para estes peptídeos. Os peptídeos sintetizados não apresentaram atividade hemolítica e a inibição do crescimento de células de fibroblastos da linhagem NIH/3T3 foi detectada apenas em concentrações superiores às necessárias para a inibição enzimática. De uma maneira geral, os resultados obtidos se mostraram bastante promissores, uma vez que a dimerização direcionada da sequência peptídica WRWYCRCK resultou na obtenção de novos inibidores de DNA topoisomerasas, com grande potencial para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Palavras chave: peptídeos, dimerização, topoisomerasas, antimicrobianos

ABSTRACT

Infectious diseases are among the leading causes of mortality worldwide, especially due to the increasing spread of antimicrobial-resistant pathogenic bacteria currently available. Given of this scenario, the research and development of new antimicrobial drugs, which can act on different intracellular targets, become urgent and of utmost importance. DNA topoisomerases are enzymes essential for the physiological processes regulation and cell viability and have been shown a very attractive target for various drugs. In this context, the search for novel topoisomerase inhibitors, including synthetic peptides, represents a promising strategy in the development of a new class of therapeutic agents. The use of synthetic peptides as antimicrobial drugs has important advantages, such as high specificity, diversity in the mechanisms of action, relative ease in the synthesis process, ability to prevent the formation of biofilms and rare bacterial resistance occurrences. Therefore, the synthesis of dimerized analogues of the WRWYCRCK peptide proves to be an important and efficient approach, which may contribute to the development of new and more potent topoisomerase inhibitors, candidates for antimicrobial agents. In this work, linear peptides, analogous to the WRWYCRCK octapeptide, were obtained by the solid phase methodology and subjected to oxidative processes for the targeted disulfide bonds formation, in order to evaluate the effect of the number and position of these bonds, in the inhibition of the activity of different topoisomerases. Dimerization favored the inhibitory activity of the octapeptide WRWYCRCK on DNA topoisomerases, regardless of their class and origin. The greater susceptibility of topoisomerases to DimLin2 and DimAPLin2 dimers suggests that both cysteine residues and the respective disulfide bonds are fundamental for enzymatic inhibition, which corroborates the bactericidal and fungicidal effects obtained at low concentrations for these peptides. The synthesized peptides did not show hemolytic activity and the inhibition of the growth of fibroblast cells of the NIH/3T3 strain was detected only in concentrations higher than those required for enzymatic inhibition did. In general, the results obtained showed to be quite promising, since the targeted dimerization of the WRWYCRCK peptide sequence resulted in the obtaining of new DNA topoisomerase inhibitors, with great potential for the development of new antimicrobial agents.

Key words: peptides, dimerization, topoisomerases, antimicrobial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modo de ligação das DNA topoisomerases tipo I e II.....	27
Figura 2. Estrutura comparativa das topoisomerases II α e II β	28
Figura 3. Reação de desencadeamento do material genético.....	29
Figura 4. Protetores usuais para o grupo α -amina na metodologia de SPFS.....	32
Figura 5. Esquema comparativo das estratégias Fmoc e Boc.....	34
Figura 6. Esquema ilustrativo da síntese do peptídeo Lin2 pela metodologia da fase sólida e estratégia Fmoc.	37
Figura 7. Reação de substituição do grupo protetor do grupo sulfidrila da cisteína (trítala) pelo grupo NPys (5-nitro-2-piridinosulfenila), durante a etapa de desproteção.	38
Figura 8. Esquema do ensaio de cinética de morte celular (Time-kill) para <i>C.albicans</i>	50
Figura 9. Redução do MTT para cristais de Formazan, pelas células viáveis.	51
Figura 10. Esquema da etapa de clivagem de Lin2 e Lin3	52
Figura 11. Reação de formação de uma ligação dissulfeto intermolecular entre os resíduos de cisteínas da posição 5 de Lin2.	54
Figura 12. Monitoramento da reação de oxidação de A ⁷ Lin2 (formação da ligação dissulfeto C ⁵ -C ⁵), por CLAE analítica.....	55
Figura 13. Monitoramento da reação de oxidação de Lin2 (formação da ligação dissulfeto C ⁵ -C ⁵), por CLAE analítica.....	55
Figura 14. Monitoramento da reação de oxidação de Lin3 (formação da ligação dissulfeto C ⁵ -C ⁵), por CLAE analítica.....	56
Figura 15. Reação de oxidação para formação da segunda ligação dissulfeto intermolecular para obtenção de DimLin2.	57
Figura 16. LC-MS de monitoramento da reação de oxidação com iodo, para obtenção do peptídeo DimLin2 (formação da ligação dissulfeto C ⁷ -C ⁷).	58
Figura 17. LC-MS de monitoramento da reação de oxidação com iodo, para obtenção do peptídeo DimLin3 (formação da ligação dissulfeto C ⁷ -C ⁷)	59
Figura 18. Esquema da reação para obtenção do dímero antiparalelo DimAP1.	59
Figura 19. Monitoramento por CLAE, da reação de oxidação, para preparação do peptídeo DimAP1 (formação da ligação dissulfeto C ⁵ -C ⁷).	60

Figura 20. Monitoramento por CLAE, da reação de oxidação, para formação da primeira ligação dissulfeto (C ⁵ -C ⁷) do dímero DimAPLin2.	61
Figura 21. Monitoramento por LC-MS, da reação de oxidação com iodo, para obtenção do peptídeo DimAPLin2 (formação da ligação dissulfeto C ⁷ -C ⁵).	62
Figura 22. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o dímero DimA ⁷ Lin2.	63
Figura 23. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo DimLin2.	63
Figura 24. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo DimAP1.	64
Figura 25. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo DimAPLin2.	64
Figura 26. Porcentagem de identidade e homologia entre as topoisomerases.	66
Figura 27. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de 100 μmol.L ⁻¹ , sobre a inibição da atividade da DNA girase de <i>E. coli</i>	68
Figura 28. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2 na concentração de 100 μmol.L ⁻¹ sobre a inibição da atividade da DNA girase de <i>S. aureus</i>	68
Figura 29. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos dímeros DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da DNA girase de <i>E. coli</i>	69
Figura 30. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos dímeros DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da DNA girase de <i>S. aureus</i>	70
Figura 31. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de 100 μmol.L ⁻¹ , sobre a inibição da atividade da Topo IV de <i>E. coli</i>	71
Figura 32. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de 100 μmol.L ⁻¹ , sobre a inibição da atividade da Topo IV de <i>S. aureus</i>	72

Figura 33. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos dímeros DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da Topo IV de <i>E. coli</i>	73
Figura 34. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos dímeros DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da Topo IV de <i>S. aureus</i>	74
Figura 35. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de 100 µmol.L ⁻¹ , sobre a inibição da atividade da topoisomerase IIα humana.....	76
Figura 36. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de 100 µmol.L ⁻¹ , sobre a inibição da atividade da topoisomerase IIβ humana.....	77
Figura 37. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo DimLin2 sobre a atividade da Topoisomerase IIα humana.	78
Figura 38. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da Topoisomerase IIβ humana.....	78
Figura 39. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de 100 µmol.L ⁻¹ , sobre a inibição da atividade da Topoisomerase IB humana..	80
Figura 40. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da Topoisomerase IB humana..	81
Figura 41. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de 100 µmol.L ⁻¹ , sobre a inibição da atividade da topoisomerase IA de <i>E. coli</i>	83
Figura 42. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da Topoisomerase IA de <i>E. coli</i>	84
Figura 43. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de 100 µmol.L ⁻¹ , sobre a inibição da atividade da topoisomerase IA de <i>M. tuberculosis</i>	85

Figura 44. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos DimA ⁷ Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da topoisomerase IA de <i>M. tuberculosis</i>	86
Figura 45. Cinética de morte celular bacteriana.	90
Figura 46. Cinética de morte celular para <i>C. albicans</i>	91
Figura 47. Determinação da atividade hemolítica.....	92
Figura 48. Estudo de viabilidade de células MCF-7 de adenocarcinoma de mama após tratamento com diferentes concentrações dos peptídeos diméricos.	94
Figura 49. Expressão das topoisomerasas humanas dos tipos I (A) e II (B) em diferentes linhagens celulares.....	94
Figura 50. Estudo de viabilidade de células de fibroblastos NIH/3T3 após tratamento com diferentes concentrações dos peptídeos diméricos.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura primária dos peptídeos sintetizados.	36
Tabela 2. Composição das soluções de clivagem.	38
Tabela 3. Massa molecular obtidas para os peptídeos lineares	53
Tabela 4. Estrutura primária dos peptídeos obtidos após processos de oxidação. ..	56
Tabela 5. Massa molecular obtidas para os peptídeos diméricos.....	65
Tabela 6. Comparação da atividade inibitória de derivados dos peptídeos em topoisomerases bacterianas.....	75
Tabela 7. Comparação da atividade inibitória dos peptídeos diméricos em topoisomerases II humanas.	79
Tabela 8. Comparação da atividade inibitória dos peptídeos diméricos sobre a topoisomerase IB humana (hTopoIB).....	82
Tabela 9. Comparação da atividade inibitória dos peptídeos diméricos sobre a topoisomerase IA bacteriana.....	87
Tabela 10. Atividade antimicrobiana dos peptídeos dimerizados.	89
Tabela 11. Índice de seletividade da ação antimicrobiana.....	96

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Prospecção de novos agentes antimicrobianos	21
1.2	Antimicrobianos no contexto da pandemia de Covid-19	24
1.3	DNA topoisomerases: alvos estratégicos para novos fármacos	26
1.4	Inibidores peptídicos de topoisomerases	30
1.5	Síntese de peptídeos em fase sólida	31
1.6	Justificativa e Hipótese	33
2	OBJETIVOS	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Desenho e síntese de peptídeos	36
3.2	Reações de oxidação e formação de ligações dissulfeto	39
3.3	Purificação e caracterização	40
3.4	Determinação da concentração dos compostos peptídicos	41
3.5	Determinação da homologia entre as topoisomerases	41
3.6	Ensaio de inibição da atividade enzimática	42
3.6.1	Inibição da atividade da DNA girase	42
3.6.2	Inibição da atividade da topoisomerase IV	43
3.6.3	Inibição da atividade das topoisomerases tipo II humana	43
3.6.4	Inibição da atividade das Topoisomerases tipo I	44
3.7	Avaliação da atividade hemolítica	44
3.8	Avaliação da atividade antimicrobiana	45
3.8.1	Preparação do inoculo	46
3.8.2	Determinação da concentração inibitória mínima para bactérias	46
3.8.3	Determinação da concentração inibitória mínima para fungos	47
3.8.4	Indicação de viabilidade celular	48
3.8.5	Cinética de morte de microrganismos (Time-kill)	48
3.8.6	Cinética de morte celular para C. albicans em macrodiluição	49
3.9	Viabilidade celular	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Desenho e síntese de peptídeos	52
4.2	Reações de oxidação e formação de ligações dissulfeto	54
4.3	Purificação e caracterização	62
4.4	Determinação da homologia entre as topoisomerases	65

4.5	Ensaio de inibição enzimática	67
4.5.1	Inibição da atividade das topoisomerasas tipo II bacterianas	67
4.5.2	Topoisomerasas II α e β humanas	75
4.5.3	Inibição da atividade das topoisomerasas tipo I	79
4.6	Avaliação antimicrobiana.....	88
4.7	Avaliação da atividade hemolítica	92
4.8	Viabilidade Celular.....	93
4.8.1	Células tumorais	93
4.8.2	Células não tumorais	95
5	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

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

Acm – Acetoamidometila

ACN – Acetonitrila

ATCC – American Type Culture Collection

Boc – t-butiloxicarbonila

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DCM – Diclorometano

DIC – N,N'-diisopropilcarbodiimida
DMF – Dimetilformamida
DMSO – Dimetilsulfóxido
DO – Densidade Ótica
DTT – 1,4-Dithiothreitol
EDT – Etanoditiol
EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético
Fmoc – 9-fluorenilmetiloxycarbonila
GyrA – Subunidade A da DNA girase
GyrB – Subunidade B da DNA girase
HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etano-sulfônico
HOBt – N-hidroxibenzotriazol
hTopoIB – Topoisomerase IB humana
MBHAR – Metil-benzidrilamino-resina
MH – Mueller Hilton
MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio
Npys – 5-nitro-2-piridilsulfenila
OMS – Organização Mundial da Saúde
Pbf – 2,2,4,6,7-pentametildi-hidrofurano-5-sulfonila
PBS – Tampão fosfato-salino
SDB – Caldo Sabouraud Dextrose (Sabouraud Dextrose Broth)
SPFS – Síntese de peptídeos em fase sólida
SDS – Dodecil sulfato de sódio
STEB – Carregador de DNA: Sacarose, Tris, EDTA e Azul de Bromofenol
tBu – terc-butila
TBE – Tampão tris-borato-EDTA
TIS – Triisopropilsilano
Topo I – topoisomerase tipo I
Topo II – topoisomerase tipo II
Topo IV – topoisomerase tipo IV
Trt – Tritila
TRIS – tris(hidroximetil)metilamina
UFC – Unidade Formadora de Colônias

1 INTRODUÇÃO

1.1 Prospecção de novos agentes antimicrobianos

Segundo dados do relatório global de resistência a antimicrobianos, apresentados pela Organização Mundial de saúde (2014), este tipo de resistência promove um grande impacto econômico e clínico, tanto para os pacientes quanto para o sistema de saúde. Em geral, os custos relacionados às infecções causadas por microrganismos resistentes são, em até 5 vezes maiores, quando comparados àquelas causadas por microrganismos suscetíveis. Entretanto suas influências clínicas podem variar de acordo com o tipo de microrganismo ou o tipo de resistência apresentada, e alguns gêneros de bactérias de grande preocupação mundial devido a sua incidência e crescente taxa de resistência são: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* não tifóide, *Shigella sp* e *Neisseria gonorrhoeae* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

O *Staphylococcus aureus*, um microrganismo comumente encontrado colonizando a pele do ser humano, é o agente patogênico responsável por uma ampla variedade de infecções. A primeira e mais comum forma de resistência descrita para este microrganismo ocorre por meio da produção de enzimas β -lactamases, que agem hidrolisando a ligação amida do anel β -lactâmico de antimicrobianos dessa classe, impedindo assim seu mecanismo de ação. Em 1981 já eram encontradas cepas de microrganismos resistentes a metilicina, fármaco desenvolvido no ano anterior, capaz de promover a inibição do crescimento microbiano, inerte a ação das enzimas β -lactamases. Porém, a inserção de um gene plasmidial, levou o microrganismo a expressar um novo tipo de proteína de ligação de penicilina (PBP_{2a}), com menor afinidade ao fármaco, e em decorrência disso a uma nova forma de resistência. As infecções causadas por cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) são extremamente difíceis de serem tratadas, restando como opção apenas a vancomicina e a teicoplanina, que necessitam de maior monitoramento devido aos possíveis efeitos colaterais (PANTOSTI; SANCHINI; MONACO, 2007).

Já a *Escherichia coli* é encontrada na microbiota intestinal humana e animal, é a promotora mais frequente de infecções do trato urinário incluindo infecções renais. Mesmo que a ocorrência de resistência deste microrganismo esteja associado

principalmente às fluoroquinolonas, não é incomum encontrar cepas resistentes às cefalosporinas de terceira geração, resistência conferida principalmente por enzimas conhecidas como β -lactamases de espectro estendidas (ESBLs), que de maneira geral promovem resistência a uma ampla variedade de antibacterianos, fazendo com que em alguns casos os carbapenêmicos sejam a única opção disponível para tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Escherichia coli resistentes, principalmente às fluoroquinolonas, tendem a levar um maior número de infectados para Unidade de Terapia Intensiva (UTI), enquanto *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina resultam em um significativo aumento da mortalidade, assim como maior número de ocorrência de choque séptico e um maior tempo de hospitalização. Esses dois microrganismos são responsáveis por 21% dos casos de infecção hospitalares e aproximadamente 2 milhões de casos de infecções por bactérias resistentes anualmente (THABIT; CRANDON; NICOLAU, 2015).

Streptococcus pneumoniae, promovem vários tipos de infecções comuns, tal como otites, no entanto tem a capacidade de promover infecções de maior gravidade como por exemplo bacteremias e meningites, sendo ainda a principal causa de pneumonia bacteriana no mundo, sua resistência aos fármacos β -lactâmicos, assim como ocorre com o *S. aureus*, está relacionada a mutações nos genes que codificam as proteínas de ligação da penicilina (PBPs), embora também sejam detectadas outros mecanismos de resistência não-PBPs. (HAKENBECK; BRÜCKNER; DENAPAITE; MAURER, 2012; MITCHELL; MITCHELL, 2010).

Assim como a *E. coli*, as bactérias do gênero *Klebsiella* são frequentemente encontradas na microbiota e promovem infecções em hospedeiros com o sistema imune debilitado, atualmente é a principal causa mundial de infecções causada por bactérias resistentes aos carbapenêmicos em todo o mundo. Esta resistência, em especial se faz ainda mais preocupante, uma vez que as demais opções de tratamento disponíveis são ineficazes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

A *Neisseria gonorrhoeae* é o agente etiológico da gonorreia, a segunda infecção sexualmente transmissível (IST) com maior número de casos no mundo e se não houver tratamento adequado pode levar a uma série de complicações. Pode-se afirmar que há microrganismos resistentes para todos os agentes terapêuticos usados ao longo de décadas no combate a gonorreia, inclusive para os medicamentos utilizados atualmente, como às ciprofloxacina, ceftriaxona, cefixima e azitromicina. A

resistência desses microrganismos aos antimicrobianos, ocorre devido a uma grande variedade de mecanismos moleculares distintos, desde mutações nas regiões de ligação das topoisomerase do tipo II com o DNA, diminuindo assim sua capacidade de interação com as quinolonas, até mutações das PBP2 ocasionando uma menor suscetibilidade para penicilinas (COSTA-LOURENÇO; BARROS DOS SANTOS; MOREIRA; FRACALANZZA *et al.*, 2017).

A *Shigella* spp é um importante agente causador de doenças diarreicas, ocorrendo uma maior taxa de transmissão, principalmente em países com condições sanitárias deterioradas. Estimativas atribuem a *Shigella* a causa de ao menos 160.000 mortes por ano (um terço delas associadas a crianças). Embora seja uma doença autolimitada, opta-se pela utilização de antimicrobianos, visando impedir o seu agravamento durante o curso da doença, assim como prevenir a sua transmissão. Sendo ainda, bem documentada a ocorrência de resistência para todos os principais antibióticos utilizados em seu tratamento como ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima e ácido nalidíxico (BAKER; THE, 2018; SETHUVEL; PERUMALLA; ANANDAN; MICHAEL *et al.*, 2019).

A *Salmonella* não tifóide é um gênero de bacilos do tipo Gram-negativo, colonizador do trato intestinal de uma ampla gama de animais. É uma das principais causas de doenças infecciosas gastrointestinais em todo mundo e a infecção humana ocorre principalmente por meio da contaminação dos alimentos. A resistência apresentada por esses microrganismos é influenciada pela utilização de antimicrobianos tanto em humanos quanto em animais. Destaca-se a importância clínica da resistência às fluoroquinolonas e às cefalosporinas de terceira geração, uma vez que estes são os principais fármacos utilizados no tratamento das infecções provocadas por esses microrganismos em pessoas com sistema imune debilitado ou que apresentem outras comorbidades (MCDERMOTT PATRICK; ZHAO; TATE; AARESTRUP FRANK *et al.*, 2018).

É importante ressaltar ainda, a relevância de outros agentes infecciosos, tal como o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose, doença infecciosa bacteriana que mais mata no mundo. Em 2019, infectou mais de 10 milhões de pessoas (com 1,5 milhões de óbitos), sendo 3,3% atribuídos à *M. tuberculosis* resistente, um acréscimo considerável, comparado aos 2,3% registrados em 2016. Estima-se que deste total, 78% foram infectados por bactérias resistentes para ambos os medicamentos: rifampicina e isoniazida. Neste caso, as opções de tratamento se

tornam ainda mais complicadas e ineficientes, sendo necessário estender o tempo de tratamento, bem como o uso de outros medicamentos altamente tóxicos e de baixa eficácia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Adicionalmente, há de se considerar o agravamento dos casos de tuberculose devido a coinfeção pelo SARS-CoV-2. Devido à influência deste vírus e de possíveis imunossupressores, a função imunológica pode ser temporariamente inibida, resultando em exacerbação da tuberculose causada pela reativação ou infecção do *M. tuberculosis*, o que agrava o problema de resistência aos antimicrobianos (YANG; LU, 2020).

Por sua vez, a *Candida spp* é uma levedura comensal presente na microbiota da maioria dos seres humanos, muito comumente encontrada na pele, trato gastrointestinal e geniturinário (ENOCH; LUDLAM; BROWN, 2006). Entretanto, uma vez que o sistema imune se encontre comprometido, a mesma pode causar a candidíase, infecção causada por fungo oportunista com maior incidência no mundo, destacando-se ainda a espécie *Candida albicans* como a principal causadora dessa doença, entre 50-90% dos casos (MARTINS; FERREIRA; BARROS; SILVA *et al.*, 2014).

Dentre as várias estratégias da *Candida spp* visando a sobrevivência frente ao sistema imune do hospedeiro, destacam-se a alteração dos componentes da parede celular, mudanças morfológicas, inativação do Sistema Complemento do hospedeiro, expressão de fatores de virulência, capacidade de produção de proteínas que promovem sua adesão e invasão celular, além de apresentar mecanismos que conferem resistência a antifúngicos amplamente utilizados como o fluconazol, sendo assim também essencial a busca por novas estratégias biotecnológicas no desenvolvimento de novos antifúngicos mais eficientes contra esses agentes infecciosos (GOW; YADAV, 2017; REIS ZAMBOM; HENRIQUE DA FONSECA; SANTESSO GARRIDO, 2020; THABIT; CRANDON; NICOLAU, 2015).

1.2 Antimicrobianos no contexto da pandemia de Covid-19

A pandemia de COVID-19 foi ocasionada pelo agente etiológico SARS-COV-2 (Síndrome respiratória aguda grave-coronavírus 2), um vírus de RNA de fita simples de sentido positivo, com a capacidade de infectar células epiteliais do sistema respiratório, por meio de gotículas de saliva, tosse e espirro, no ar, contato mão-boca-

olho e através de superfícies contaminadas (MACHHI *et al.*, 2020). O SARS-COV-2 já infectou ao menos 137 milhões de pessoas (10% só no Brasil), levando a um número de óbitos próximo a 3 milhões a nível global (12% no Brasil), segundo dados levantados pela Organização Mundial da Saúde, em abril de 2021 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

É extensivamente descrito na literatura que durante períodos de surtos virais, infecções secundárias ou coinfeções bacterianas podem induzir a um aumento nas taxas de morbidade, com agravamento prolongado dos sintomas e mortalidade em pacientes com infecções virais (BEADLING; SLIFKA, 2004). KNIGHT e colaboradores (2021) relataram que coinfeções bacterianas ocorrem em 3,5% dos pacientes hospitalizados com COVID-19, chegando a 8,1% em pacientes gravemente enfermos, enquanto que as infecções secundárias ocorrem em ao menos 14,3% dos pacientes com COVID-19 (KNIGHT *et al.*, 2021). Em um estudo retrospectivo realizado nos Estados Unidos, durante os meses de março e abril de 2020, foi observado que os pacientes que apresentaram um quadro de coinfeção respiratória com SARS-CoV-2 tinham uma alta taxa de internação e agravamento do estado de saúde, sendo que de um total de 91 pacientes, 93% necessitaram de UTIs e 95% precisaram ser intubados (NORI *et al.*, 2021). Estudos realizados em modelos animais demonstraram que coinfeções bacterianas tem uma maior capacidade de invasão tecidual, frequentemente evoluindo em posterior bacteremia (ALONSO *et al.*, 2003).

As infecções virais respiratórias têm a capacidade de alterar negativamente a capacidade de resposta do sistema imune inato no tecido pulmonar, uma vez que a alta carga de células apoptóticas, em decorrência da infecção viral, limitam a capacidade dos macrófagos fagocitarem as células bacterianas (MORGAN *et al.*, 2018).

Destacam-se *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* como as bactérias mais comumente encontradas em coinfeções com influenza B, representando 80% dos achados clínicos, enquanto que as bactérias mais encontradas em coinfeções em pacientes hospitalizados com COVID-19 são *Escherichia coli* e *S. pneumoniae*, cada um representando 28,6% dos achados (THELEN *et al.*, 2021). O que torna esse quadro mais grave é que no caso da *E. coli*, as contaminações por bactérias gram-negativas apresentaram uma taxa superior de resistência aos medicamentos utilizados (15%) (NORI *et al.*, 2021).

1.3 DNA topoisomerases: alvos estratégicos para novos fármacos

Uma nova e importante abordagem visando o desenvolvimento de novos antimicrobianos, se faz por intermédio da síntese de inibidores das enzimas DNA topoisomerases, cujas funções relacionam-se à regulação dos processos fisiológicos e na viabilidade celular dos microrganismos (KATHIRAVAN *et al.*, 2013).

A necessidade fundamental das topoisomerases deriva da estrutura de dupla-hélice do DNA. A maioria dos processos metabólicos que necessitam de acesso às informações armazenadas no DNA, como replicação, transcrição, recombinação e reparo, requer a separação temporária ou permanente das fitas complementares da dupla hélice o que, inevitavelmente, levam a mudanças na topologia do DNA, como o aumento excessivo da tensão, que pode levar à sua fragmentação (BUSH; EVANS-ROBERTS; MAXWELL, 2015). Essas mudanças na topologia são resolvidas pelas DNA topoisomerases, uma família de enzimas onipresente, que atuam ligando-se ao DNA, clivando uma ou ambas as fitas da dupla hélice, passando a outra fita da mesma hélice ou outra fita dupla através da quebra e, finalmente religando-as, diminuindo assim, a tensão da dupla fita e, como consequência, evitando que ocorra enovelamento e instabilidade do genoma durante estes e outros processos metabólicos (POMMIER *et al.*, 2016).

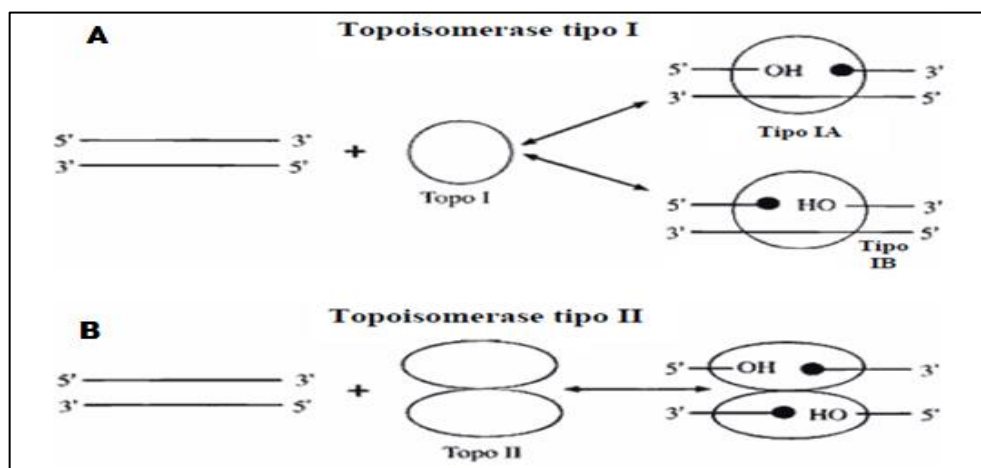
Tomando como base seus mecanismos de ação e semelhanças sequenciais, as DNA topoisomerases são divididas em duas principais classes: topoisomerases tipo I e topoisomerases tipo II (CHAMPOUX, 2001; VOS *et al.*, 2011). Ambas conseguem reagir reversivelmente com o DNA por meio da reação denominada topoisomerização, a qual mantém as sequências do DNA inalteradas. De uma maneira geral, estas enzimas clivam o esqueleto das ligações fosfodiéster do DNA por meio do ataque nucleofílico do resíduo de tirosina localizado no seu sítio ativo, resultando na formação de uma ligação com o fosfato terminal da quebra do DNA enquanto libera a região hidroxilada. Em seguida, há a restauração da ligação fosfodiéster por meio da reação entre a fosfotirosina formada durante a quebra e a extremidade que contém a hidroxila, na fita livre do DNA (FORTERRE *et al.*, 2007; POMMIER *et al.*, 2010).

Como principal divergência, as topoisomerases tipo I clivam apenas uma das fitas do DNA, não sendo necessário nenhum cofator de energia para realizar esta reação, usando apenas a energia obtida da rotação da própria fita de DNA, enquanto que as topoisomerases tipo II executam a quebra e religação de ambas as fitas do

DNA simultaneamente, sendo necessário ATP (adenosina trifosfato) para a realização deste evento (CORBETT; BERGER, 2004).

As topoisomerases tipo I podem ainda ser subdivididas em duas famílias denominadas tipo IA e tipo IB. As topoisomerases tipo IA são predominantes em espécies de procariotos e se ligam covalentemente ao grupo fosfato 5' da fita do DNA durante a clivagem, enquanto as topoisomerases tipo IB são encontradas predominantemente em espécies de eucariotos e se ligam covalentemente à extremidade 3' do local de clivagem, ambas pelo resíduo de tirosina presente no sítio ativo da enzima (CHAMPOUX, 2001; CORBETT; BERGER, 2004). Embora ambas, IA e IB, compartilhem função e tenham semelhança em seus mecanismos de ação (Figura 1A), não há homologia entre suas sequências de aminoácidos e são estruturalmente distintas (FORTERRE, *et al.*, 2007).

Figura 1. Modo de ligação das DNA topoisomerases tipo I e II



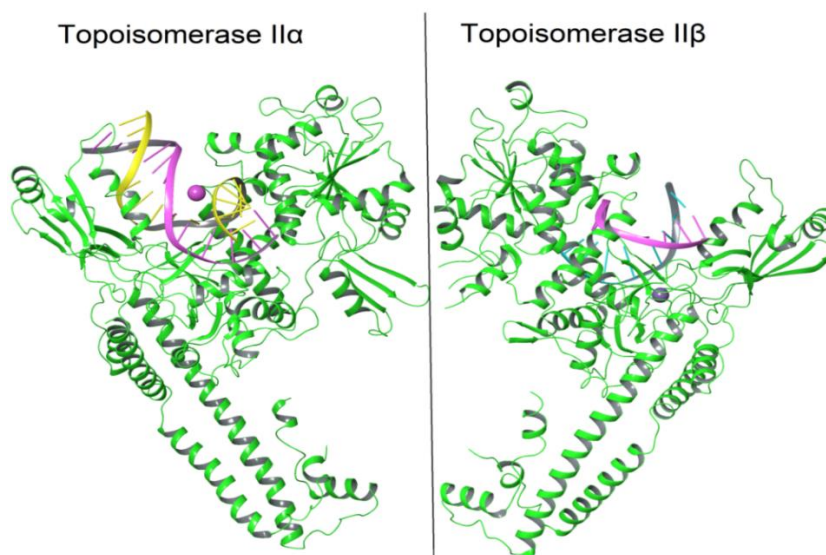
Fonte: Adaptado de HOLDEN, 2001.

Já a classe das topoisomerases tipo II é subdividida nas famílias tipo IIA e tipo IIB, das quais todos os membros são estruturalmente relacionados e caracterizados pela formação de uma ligação 5'-fosfotirosina durante a clivagem (Figura 1B). As topoisomerases tipo IIA são encontrados tanto em espécies de eucariotos como de procariotos, enquanto que as topoisomerases do tipo IIB, são encontradas apenas em em archeas e algumas espécies de vírus. Normalmente, estas enzimas apresentam-se como homodímeros em eucariotos, enquanto em organismos procariotos apresentam-se como heterotetrâmeros (CORBETT; BERGER, 2004; TAKAHASHI *et al.*, 2020).

Embora os eucariotos inferiores sejam capazes de expressar apenas um tipo da topoisomerase do tipo IIA, duas isoformas dessas enzimas são expressas nos vertebrados, a topoisomerase II α (170 kDa) e a II β (180 kDa) (Figura 2), as quais compartilham uma identidade de até 70% na sequência de aminoácidos, mas são expressas por diferentes genes e possuem funções distintas, sendo a atividade de ambas, essenciais para os mamíferos (FORTUNE; OSHEROFF, 2000; MCCLENDON; OSHEROFF, 2007).

Outra diferença importante entre estas duas isoformas é que enquanto as topoisomerases II β são constitutivamente ativadas, as topoisomerases II α passam a ser reprimidas após o processo de proliferação celular. Estruturalmente ambas podem ser divididas em 3 regiões: a região N-terminal, responsável pela ocorrência da ligação com o ATP e indução de mudanças conformacionais na proteína; a região central onde se localiza o sítio ativo (resíduo de tirosina), responsável por promover a ligação, quebra e posterior religação da dupla fita de DNA; e a região C-terminal, responsável pelas diferenças funcionais entre as topoisomerases II α e II β , sendo as duas primeiras altamente conservadas (LINKA *et al.*, 2007; NITISS, 2009).

Figura 2. Estrutura comparativa das topoisomerases II α e II β



Fonte: Elaborada pelo autor (PDB: 4FM9, 5zen) (modificada com Maestro)

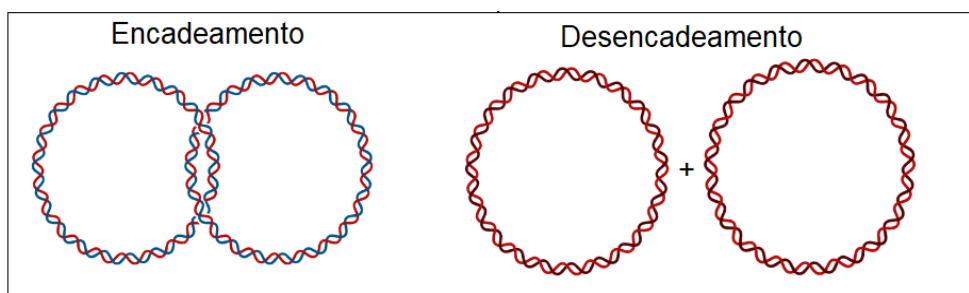
A DNA girase, uma topoisomerase do tipo II bacteriana, é essencial para viabilidade do microrganismo, destacando-se como a única enzima capaz de

promover o superenrolamento negativo do DNA. Por ser uma enzima essencial para a bactéria e estar ausente no ser humano, sua utilização como alvo de possíveis agentes antimicrobianos é amplamente descrita na literatura. 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. A subunidade A é constituída de um domínio amino-terminal, que é essencial para o mecanismo de quebra-união do DNA e para a interação com quinolonas, além de um domínio carboxi-terminal, responsável por interações com o DNA. A subunidade B contém um domínio N-terminal, o qual inclui o sítio de ligação do ATP, bem como um domínio carboxi-terminal envolvido na interação com o DNA (KHAN *et al.*, 2018).

A topoisomerase IV (Topo IV), também é uma topoisomerase do tipo IIA e compartilha com a DNA girase considerável similaridade estrutural e catalítica, sendo também constituída por quatro subunidades, duas ParC e duas ParE, tendo como forma ativa o heterotetrâmero $ParC_2ParE_2$ (POMMIER *et al.*, 2010). Semelhantemente à GyrA, a subunidade ParC possui na região C-terminal o sítio de ligação enzima-DNA, enquanto a região N-terminal contém o domínio que envolve a clivagem e religação do DNA. A subunidade ParE, que corresponde à GyrB, possui na região C-terminal o domínio que envolve a interação com ParC e na região N-terminal o sítio de hidrólise de ATP (EL SAYYED; ESPÉLI, 2018).

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 (Figura 3), além de dotá-la de certa especificidade em termos de relaxamento (NEUMAN, 2010; EL SAYYED; ESPÉLI, 2018).

Figura 3. Reação de desencadeamento do material genético



Fonte: Elaborada pelo autor via plataforma BioRender

1.4 Inibidores peptídicos de topoisomerases

Inibidores de topoisomerases conhecidos são classificados em inibidores de topoisomerases do tipo I (classe I) e inibidores de topoisomerases do tipo II (classe II), de acordo com a classificação da enzima alvo. Embora ambas as classes promovam a inibição das topoisomerases, apenas os inibidores da classe I acarretam o acúmulo do DNA danificado no citoplasma, devido à diferença em seu mecanismo de ação, agindo após a abertura da dupla fita de DNA e impedindo que a enzima possa promover sua posterior religação (JENEN; SEHESTED, 1997). Neste caso, há uma estabilização do complexo enzima-DNA formado durante a quebra da fita do DNA (WANG, 1994). Nesta categoria incluem-se, por exemplo, alguns compostos químicos naturais e sintéticos utilizados para o tratamento do câncer, tais como a camptotecina e seus derivados topotecan e irinotecan (GRANADA *et al.*, 2007).

Inibidores da classe II são chamados de inibidores catalíticos e impedem a ligação enzima-DNA por interação com a topoisomerase ou com o DNA (BRIDEWELL; FINLAY; BAGULEY, 1997; FORTUNE; OSHEROFF, 1998). Exemplos desta classe são as quinolonas, as quais atuam sobre as enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV e os inibidores das topoisomerases II de eucariotos, que incluem a doxorubicina, o etoposido e o teniposide (DAS; GANGULY; MAJUMDER, 2008; FORTUNE; OSHEROFF, 2000).

Peptídeos sintéticos têm sido descritos como os inibidores ideais da atividade de topoisomerases, isoladamente ou em combinação com pequenas moléculas de fármacos (POND; MARSHALL; BARROWS, 2006; SINGH *et al.*, 2001). Diversos estudos mostram uma série de peptídeos com potencial atividade inibitória sobre topoisomerases de bactérias (BARBOSA *et al.*, 2012), de vírus (KLEMM *et al.*, 2000) e de protozoários (ROY *et al.*, 2011).

As perspectivas para o desenvolvimento de novas espécies com ação antibacteriana e antitumoral incluem o estudo de moléculas peptídicas obtidas por química combinatória, ou seja, técnica que usa a combinação química de todos os aminoácidos, potencialmente em todas as combinações e permutações, possibilitando que milhares de moléculas sejam geradas rapidamente e ensaiadas de uma só vez (SHAIKH; NAKAWADE; DOIJAD, 2017).

Nos últimos anos, diversos estudos foram realizados utilizando bibliotecas combinatórias de peptídeos como ferramentas para a descoberta de novos inibidores

de enzimas importantes para o metabolismo do DNA, tais como as tirosina-recombinases e topoisomerases (BOLDT; PINILLA; SEGALL, 2004; CASSELL *et al.*, 2000; FUJIMOTO; PINILLA; SEGALL, 2006; KLEMM *et al.*, 2000). Estas enzimas compartilham características estruturais e de mecanismos, sendo as tirosina-recombinases consideradas um sub-ramo da família das topoisomerases do tipo IB (HANSEN, FRØHLICH; KNUDSEN, 2003).

Uma série de hexapeptídeos inibidores de várias reações catalíticas de tirosina-recombinases foram identificados a partir de triagens de bibliotecas combinatórias (BOLDT; PINILLA; SEGALL, 2004; CASSELL *et al.*, 2000). Não surpreendentemente, estes peptídeos também apresentaram inibição da topoisomerase IB do vírus vaccinia (vvTopol) (KLEMM *et al.*, 2000).

O peptídeo WRWYCR foi relatado como o melhor inibidor das enzimas testadas, tendo demonstrado, em estudos subsequentes, um largo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Dentre os múltiplos possíveis mecanismos até então descritos para este peptídeo, estão inclusos o de recombinação e reparo do DNA e a disrupção não lítica da membrana celular bacteriana (GUNDERSON *et al.*, 2009; GUNDERSON; SEGALL, 2006; RIDEOUT *et al.*, 2013) A retriagem dessas bibliotecas combinatórias resultou na identificação de três novos peptídeos, WYCRCK, KCCRCK e WRWYCRCK, com elevada atividade inibitória da vvTopol. Dos três peptídeos citados, o octapeptídeo WRWYCRCK, foi o mais potente inibidor das topoisomerases IB testadas. Este peptídeo inibiu vvTopol com valores de IC₅₀ entre 0,1 e 0,25 µmol.L⁻¹. Embora estruturalmente não relacionada à topoisomerases IB, a Topo IA de *Escherichia coli* também foi inibida, porém em menor extensão, com valor de IC₅₀ igual a 5,5 µmol.L⁻¹ (FUJIMOTO; PINILLA; SEGALL, 2006) Estudos realizados por Roy e colaboradores (2011), envolvendo peptídeos derivados da sequência WRWYCR e a topoisomerase I de *Plasmodium falciparum* (pfTopol), mostraram efeito inibitório sobre a atividade de relaxamento do DNA pela pfTopol, com valor de IC₅₀ entre 2,5 a 5 µmol.L⁻¹, tendo sido descrito a potencialização da inibição quando o peptídeo se encontra dimerizado.

1.5 Síntese de peptídeos em fase sólida

Peptídeos são biomoléculas formadas pela união entre dois ou mais resíduos de aminoácidos através de ligações peptídicas. Estes compostos podem ser produzidos

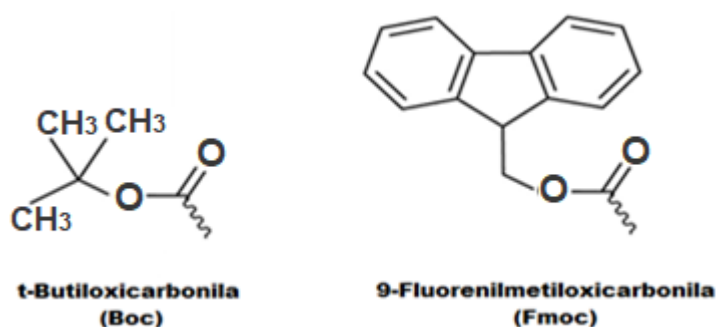
de forma natural ou por diferentes metodologias sintéticas, tais como clonagem gênica, síntese enzimática e síntese química (MACHADO *et al.*, 2004).

Classicamente, desde o início do século XX, todo processo relacionado à síntese de um peptídeo ocorria quimicamente e em solução. Há mais de seis décadas, uma inovadora metodologia para a síntese de peptídeos veio revolucionar a síntese orgânica por suas características peculiares, uma vez que abandonou a tradicional rotina de síntese em solução e introduziu o uso de polímeros insolúveis como suporte (MERRIFIELD, 1963). Este método foi denominado então de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).

A SPFS baseia-se no crescimento de uma cadeia peptídica a partir de seu grupo carboxílico C-terminal, que se encontra unido covalentemente ao suporte polimérico. Assim, o crescimento da cadeia peptídica ocorre no sentido do aminoácido C-terminal para o N-terminal. A remoção de subprodutos de reação e reagentes em excesso em cada etapa é realizada por simples filtração e lavagem. Este fato influencia favoravelmente para que se possam utilizar grandes excessos de reagentes, conseguindo em muitas etapas, rendimentos bem satisfatórios (MERRIFIELD, 2002). Essas características, juntamente com a capacidade de automatizar o processo são algumas das vantagens que fizeram da SPFS o método de escolha mais utilizado atualmente para a síntese de peptídeos.

As duas principais estratégias para a SPFS são: a química *tert*-butiloxicarbonila (Boc) e a 9-fluorenilmetiloxicarboxila (Fmoc). Ambas se baseiam na proteção temporária do grupamento α -amínico dos aminoácidos com um dos dois protetores, Boc (ANDERSON; MCGREGOR, 1957) ou Fmoc (CARPINO, 1970), que se diferenciam, principalmente, quanto à labilidade ácido-base (Figura 4).

Figura 4. Protetores usuais para o grupo α -amina na metodologia de SPFS.



Fonte: Elaborada pelo autor

Em ambas as estratégias de síntese, para que ocorra a formação da ligação peptídica, é necessário que o grupo carboxila livre do aminoácido que será acoplado, seja ativado com agentes acilantes, gerando uma espécie mais suscetível ao ataque nucleofílico pelo grupo α -amino do aminoácido que permanece ligado à resina e, assim, formar a ligação peptídica (JARADAT, 2018). Este processo tem sido uma das etapas da síntese de peptídeos que mais evoluiu nos últimos anos, justamente pelo interesse em se obter bons rendimentos, mantendo-se a integridade da cadeia em crescimento.

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

Após a conclusão da síntese da cadeia peptídica desejada, a próxima etapa consiste na clivagem do peptídeo da resina, utilizando HF na estratégia Boc ou ácido trifluoracético (TFA) na estratégia Fmoc (Figura 5).

Finalmente, a cromatografia líquida de fase reversa é empregada como técnica de escolha para a purificação e a espectrometria de massas para a determinação da identidade química de peptídeos sintéticos (MACHADO *et al.*, 2004).

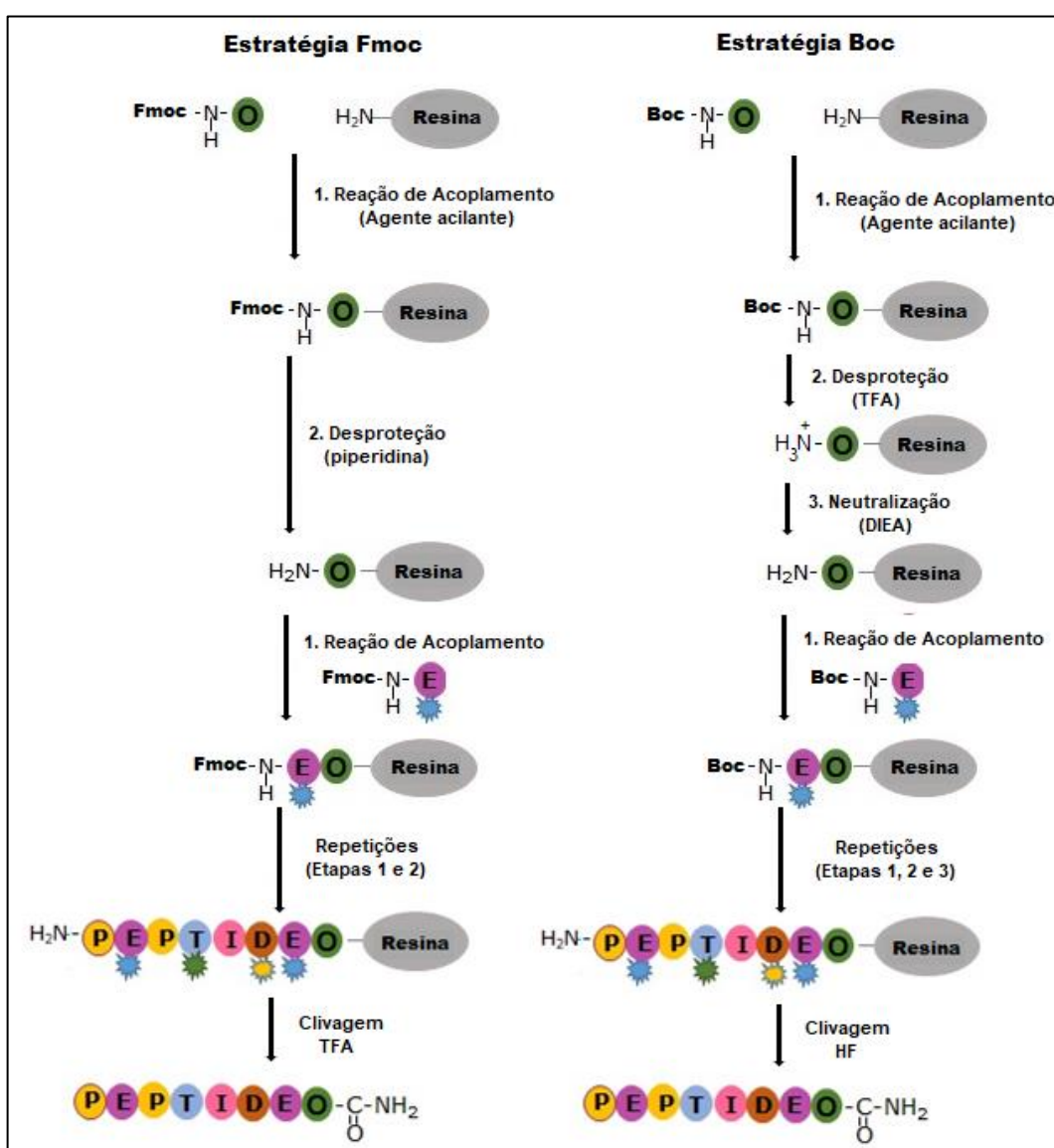
1.6 Justificativa e Hipótese

Estudos realizados apontam a forma dimérica do peptídeo WRWYCRCK como a mais ativa, visto que a adição de DTT neutraliza o efeito inibitório destes peptídeos. A grande sensibilidade ao DTT sugere que os peptídeos podem se ligar à molécula de DNA, especialmente na sua forma dimérica, formando oligômeros e inibindo a clivagem do DNA pela topoisomerase (FUJIMOTO; PINILLA; SEGALL, 2006). Por outro lado, não há nenhuma informação relativa quanto ao número e ao tipo das ligações dissulfeto envolvidas na atividade desta sequência peptídica.

Desta forma, o peptídeo WRWYCRCK representa um grande potencial a ser explorado, sendo que seus derivados dimerizados por oxidação direcionada, podem vir a se tornar potenciais candidatos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos inibidores de DNA topoisomerasas especialmente bacterianas e virais, e em um segundo estágio, enzimas de células tumorais.

Face ao exposto, visando obter ao final deste trabalho informações que ampliem o conhecimento relativo à influência da ligação dissulfeto na capacidade de inibição de de topoisomerasas, foram planejados uma série de dímeros com mudanças direcionadas na quantidade (uma ou duas ligações) e posição das ligações dissulfeto, formando dímeros paralelos e antiparalelos.

Figura 5. Esquema comparativo das estratégias Fmoc e Boc, utilizadas na SPFS. Os círculos coloridos formando a palavra PEPTÍDEO e as estrelas coloridas representam, respectivamente, os resíduos de aminoácidos utilizados na síntese e os protetores permanentes das cadeias laterais reativas dos mesmos.



Fonte: Elaborada pelo autor

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consiste na avaliação do efeito da dimerização na atividade biológica do peptídeo WRWYCRCK.

De modo específico os objetivos são:

- Sintetizar quimicamente análogos lineares do peptídeo WRWYCRCK, pela metodologia de fase sólida;
- Promover a oxidação direcionada dos resíduos de cisteína para a obtenção de dímeros paralelos e antiparalelos do peptídeo WRWYCRCK;
- Investigar o potencial inibitório dos peptídeos frente a diferentes classes de DNA- topoisomerases;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos peptídeos através de ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e tempo de morte “time kill”;
- Investigar a atividade hemolítica dos peptídeos sintetizados;
- Avaliar possível capacidade de inibição dos peptídeos em células de linhagem tumoral por meio dos ensaios de viabilidade celular;
- Analisar o efeito citotóxico dos peptídeos sobre a viabilidade de células humanas não-tumorais;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho e síntese de peptídeos

Uma série de peptídeos lineares análogos do octapeptídeo WRWYCRCK, um potente inibidor de topoisomerase IB de *Plasmodium falciparum* e *Vírus vaccínia* e topoisomerase IA de *Escherichia coli*, foram projetados para estudar a influência de alguns fatores como número e posição das ligações dissulfeto, na atividade de inibição das DNA topoisomerases (Tabela 1). Os peptídeos foram sintetizados quimicamente pelo método de fase sólida (AMBLARD *et al.*, 2006; JARADAT, 2018), de acordo com protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonila) como protetor dos α -amino grupos, e derivados t-butílicos (t-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (CHAN; WHITE, 2000).

Tabela 1. Estrutura primária dos peptídeos sintetizados.

Peptídeo	Sequência
Lin2	${}^1\text{WRWYCR}(\text{Acm})\text{K}^8\text{-NH}_2$
Lin3	${}^1\text{WRWYCR}(\text{Acm})\text{K}^8$
Lin4	${}^1\text{WRWY}(\text{Acm})\text{RC}(\text{Npys})\text{K}^8\text{-NH}_2$
A ⁷ Lin2	${}^1\text{WRWYCR}(\text{Acm})\text{K}^8\text{-NH}_2$
A ⁵ Lin4	${}^1\text{WRWY}(\text{Acm})\text{RC}(\text{Npys})\text{K}^8\text{-NH}_2$

Acm = Acetamidometila; Npys = 5-nitro-2-piridinosulfenila

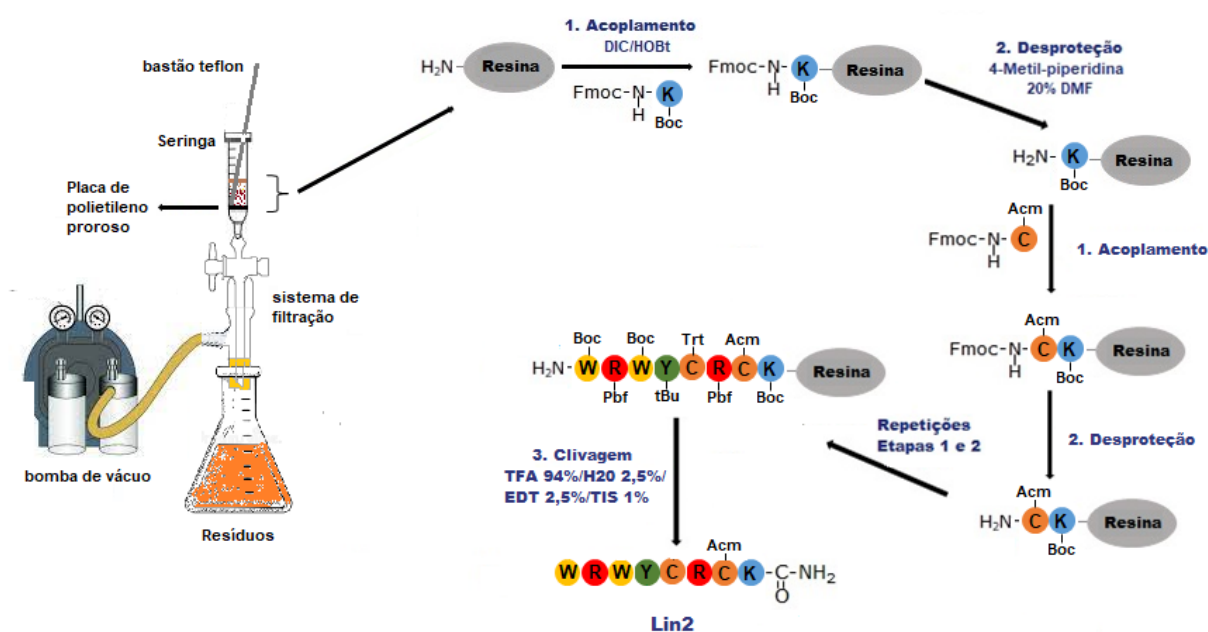
Fonte: Elaborada pelo autor

A resina de partida para todas as sequências, com exceção de Lin3, foi uma Rink amida MBHAR, com substituição inicial de $0,52 \text{ mmol.g}^{-1}$. Para Lin3, empregou-se uma Resina de Wang com o resíduo de Lisina pré incorporado (Fmoc-Lys(Boc)-Resina com $0,32 \text{ mmol.g}^{-1}$). Para a etapa de acoplamento de cada aminoácido, foi utilizado um excesso molar de 3 vezes em relação à quantidade de resina de partida, tanto para o Fmoc-aminoácido quanto para os agentes de condensação *N,N'*-diisopropilcarbodiimida/*N*-hidroxi-benzotriazol (DIC/HOBt) em dimetilformamida (DMF):diclorometano (DCM) (1:1), por aproximadamente 2 horas (Etapa 1 – Figura 6).

Foram utilizados os seguintes grupos protetores de cadeias laterais reativas dos Fmoc-aminoácidos: Lisina (K), Boc; Cisteína (C), Acm e Trt; Arginina (R), Pbf; Tirosina (Y), tBu; Triptofano (W), Boc.

A desproteção dos grupos α -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. (Etapa 2 – Figura 6). A eficiência das etapas de entrada de cada aminoácido foi monitorada pelo teste de ninidrina (KAISER *et al.*, 1970) e, quando positivo (condensação incompleta), o processo era repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes.

Figura 6. Esquema ilustrativo da síntese do peptídeo **Lin2** pela metodologia da fase sólida e estratégia Fmoc (Acm = acetamidometila; Boc = t-butiloxicarbonila; Pbf = 2,2,4,6,7-pentametildi-hidrofurano-5-sulfonila; tBu = t-butila; Trt = tritila).



Fonte: Sanches *et al.*, 2021 modificada.

A clivagem final dos peptídeos das respectivas resinas e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais foi realizada utilizando 1 mL de uma solução de clivagem (Tabela 2) para cada 100 mg de peptidil-resina, à temperatura ambiente por 2 h sob agitação (Etapa 3 - Figura 6).

Tabela 2. Composição das soluções de clivagem.

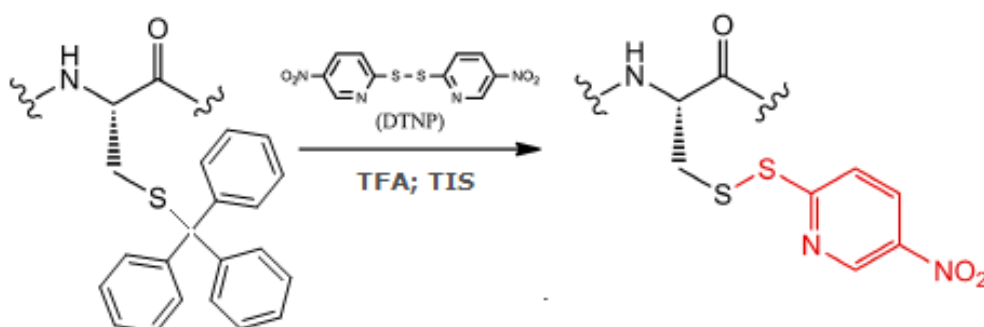
Soluções (%)					
Peptídeo	TFA	TIS	H ₂ O	EDT	2,2'-ditiobis(5-nitropiridina)
Lin2	94	1	2,5	2,5	
Lin3	94	1	2,5	2,5	
Lin4	95	2,5	2,5	-	5 eq.
A ⁷ Lin2	94	1	2,5	2,5	
A ⁵ Lin4	95	2,5	2,5	-	5 eq.

TFA: ácido trifluoracético; TIS: triisopropilsilano; EDT: etanoditiol

Fonte: Elaborada pelo autor

Para obtenção dos peptídeos Lin4 e A⁵Lin4, o protocolo padrão foi alterado pela substituição de EDT pelo 2,2'-ditiobis-(5-nitropiridina) (DTNP), na mistura de clivagem. Neste caso, durante a clivagem, ocorre a desproteção do grupo tiol da cisteína (retirada do grupo tritila) e a sua concomitante oxidação, com a formação de uma ligação dissulfeto com o grupo 5-nitro-2-piridinossulfenila (NPys) derivado da fragmentação do DTNP (Figura 7).

Figura 7. Reação de substituição do grupo protetor do grupo tiol da cisteína (tritila) pelo grupo NPys (5-nitro-2-piridinossulfenila), durante a etapa de desproteção.



Fonte: SCHROLL; HONDAL; FLEMER, 2012, modificado.

Após o período de clivagem, éter etílico gelado foi adicionado ao sistema para precipitação e lavagem, sendo o sobrenadante descartado. Este processo foi repetido por 3 vezes para eliminação dos reagentes presentes na solução de clivagem. O

peptídeo foi então extraído da resina com uma solução aquosa contendo 0,045% de TFA, em sistemas de seringas de polipropileno de 5 mL, equipadas com um filtro de polietileno poroso, acopladas a um sistema de vácuo contendo um frasco coletor, para cada um dos peptídeos extraídos. O sobrenadante contendo cada um dos peptídeos, denominados “brutos” (não purificados) foi liofilizado e caracterizados por espectrometria de massas e posteriormente submetidos a reações de oxidação.

3.2 Reações de oxidação e formação de ligações dissulfeto

A dimerização de Lin2, Lin3 e A⁷Lin2 (Tabela 1), peptídeos obtidos com os grupos sulfidrilas dos resíduos de cisteína da posição 5, na forma livre, após clivagem, foi iniciada dissolvendo-se aproximadamente 5 mg.mL⁻¹ de cada um deles, na sua forma bruta, em água ultrapura. O pH das soluções foi ajustado para 8,0 pela adição de pequenas quantidades de hidróxido de amônio. Cada uma das soluções, permaneceram em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, sob agitação branda e aeração constante promovida por um sistema constituído por um compressor de ar. Cada uma das reações foi acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por espectrometria de massas e, em geral, concluída após aproximadamente 48 horas nestas condições. Este processo resultou na formação de homodímeros constituído de uma ligação dissulfeto formada entre os resíduos de cisteína da posição 5 de cada sequência peptídica.

Para os produtos resultantes do procedimento oxidativo adotado anteriormente para Lin2 e Lin3, uma nova etapa de oxidação foi realizada, agora empregando iodo como agente oxidante. Neste processo, o iodo tem dupla função, atua como agente de desproteção, removendo o grupo protetor de cadeia lateral acetamidometila (Acm) do resíduo de cisteína da posição 7, por iodólise, e como agente oxidante, promovendo a oxidação dos grupos sulfidrilas à medida que estes vão sendo desprotegidos.

Para isso, 120 mg de cada um dos peptídeos Lin2 ou Lin3 pré-oxidados por aeração, foram dissolvidos em 30 mL de uma solução contendo 20 μmols de iodo e 60 mmols de HCl, em ácido acético 95% e mantidos sob agitação magnética por 120 min, sob o abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após o período, o excesso de iodo foi retirado pela adição de éter etílico gelado (excesso de 9X). A mistura foi distribuída em tubos tipo Falcon de 50 mL, resfriada com nitrogênio líquido por aproximadamente 1 minuto e centrifugadas a 3000 rpm por 7 minutos. Essa etapa foi repetida por 3

vezes, e o precipitado obtido foi ressuspenso em água e liofilizado (ZHANG *et al.*, 2008).

Este procedimento objetivou a formação de uma segunda ligação dissulfeto intermolecular, agora envolvendo os resíduos de cisteína presentes na posição 7 de Lin2 e Lin3. Com a oxidação prévia por aeração seguida da oxidação com iodo, evita-se a oxidação aleatória, garantindo-se o direcionamento das ligações dissulfeto para a formação de dímeros paralelos, contendo as ligações dissulfetos C⁵-C^{5'} e C⁷-C^{7'}.

Para a obtenção do dímero antiparalelo contendo apenas uma ligação dissulfeto (C⁵-C^{7'}), foram utilizados os peptídeos monoméricos A⁵Lin4 e A⁷Lin2 (Tabela 1). Inicialmente, 10 μmols de cada um dos peptídeos foram dissolvidos em 5 mL de ácido acético 10% (pH=3,0). Quantidades iguais de cada solução, foram misturadas e colocadas para reagirem à temperatura ambiente, sob agitação branda, sendo acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e tendo sido concluídas após aproximadamente 24 horas nestas condições.

Para o dímero antiparalelo contendo duas ligações dissulfeto, C⁷-C^{5'} e C⁵-C^{7'}, foi adotado inicialmente, o mesmo procedimento, porém utilizando 10 μmols de Lin4 e 10 μmols de Lin2, em 5 mL de ácido acético 10%. Posteriormente, uma nova etapa de oxidação foi realizada, empregando iodo como agente oxidante, como no caso de obtenção do dímero paralelo. O monitoramento das reações foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Ao final de cada etapa, os respectivos peptídeos dimerizados foram isolados, liofilizados e submetidos aos processos de purificação e caracterização.

3.3 Purificação e caracterização

Ao final de todo processo de oxidação e obtenção dos peptídeos dimerizados, uma pequena quantidade de cada peptídeo liofilizado (aproximadamente 1 mg) foi dissolvida em 1 ml de água ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em um sistema Shimadzu Prominense, sob condições analíticas (coluna C18, Waters Symmetry (150 x 2,1 mm); d=5 μm; 300 Å), empregando um gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos (A: 0,045% TFA em H₂O; B: 0,036% TFA em Acetonitrila), fluxo de 1 mL/minuto e comprimento de onda de 220 nm.

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 (coluna C18, Zorbax Eclipse XDB (250 x 10 mm); d=10 µm; 300 Å), efetuada em um cromatógrafo Shimadzu LC-20AT/SPD-20A/CBM-20A.

As condições de purificação foram idênticas para os peptídeos: gradiente de 5 a 95% de B em 30 minutos (A: 0,045% TFA em H₂O; B: 0,036% TFA em Acetonitrila), fluxo de 2,5 mL/minuto e comprimento de onda de 220 nm. 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, com posterior análise por CLAE para confirmação da pureza.

A identificação dos peptídeos foi realizada por determinação da massa molecular, calculadas empregando a equação 1, a partir dos dados de razão massa molecular/carga (MM/z) obtidas em um sistema LC/MS constituído por UFLC Shimadzu acoplado a um espectrômetro de massas Bruker Amazon SL empregando o modo de ionização por eletrospray (ESI-MS positivo).

$$MM_{\text{polipept}} = (MM \cdot z) - (z \cdot MM_{H^+})$$

Equação 1

sendo MM_{polipept} a massa molecular do peptídeo em análise; MM é a razão massa molecular/carga obtida por espectrometria de massas; z o número de cargas que contém o peptídeo ($z = 1, 2, 3, \dots$) e MM_{H^+} a massa molecular do íon hidrogênio, de valor 1,008 g.mol⁻¹.

3.4 Determinação da concentração dos compostos peptídicos

A determinação das concentrações das diferentes soluções contendo os peptídeos sintetizados e utilizados nos diferentes estudos, foi realizada pela medida da absorbância a 280 nm, de cada solução constituída de volumes variáveis, em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601PC. Para o cálculo das concentrações, foram utilizados os coeficientes de extinção molar 5.690 L.mol⁻¹cm⁻¹ para o triptofano, 1.289 L.mol⁻¹cm⁻¹ para a tirosina e 120 L.mol⁻¹cm⁻¹ para a cisteína (GILL; VON HIPPEL,1989).

3.5 Determinação da homologia entre as topoisomerases

A obtenção das sequencias de aminoácidos das diferentes topoisomerases foi feita utilizando o banco de dados da **UniProt** (<https://www.uniprot.org/>) enquanto que

o estudo a comparativo das sequencias foi feito utilizando o sequenciador BLAST - Basic Local Alignment Search Tool - (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.6 Ensaios de inibição da atividade enzimática

As DNA topoisomerasas utilizadas nesse trabalho, com exceção da Topo IA de *Escherichia coli*, foram adquiridas comercialmente da Inspiralis Ltda (<http://www.inspiralis.com>) e fornecidas com os respectivos tampões e substratos, como descrito. A Topo IA de *Escherichia coli*, foi adquirida comercialmente da New England Biolabs (<https://international.neb.com>), sendo fornecida também com o seu tampão de ensaio e substrato, como descrito.

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

3.6.1 Inibição da atividade da DNA girase

Os ensaios de inibição do superenovelamento do DNA (inibição da atividade da DNA girase) de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com 0,5 μg de plasmídeo pBR322 relaxado na presença do peptídeo de interesse, em diferentes concentrações, em um volume de reação de 30 μL , conforme protocolo da *Inspiralis Ltda*. A incubação foi feita a 37°C por 30 min no tampão de ensaio (descrito abaixo). A reação foi então interrompida pela adição de 3 μL de SDS 2% e incubação por 5 minutos a 65°C. Em seguida foram adicionados 15 μL de STEB (sacarose 20%; Tris.HCl 0,05 mol.L^{-1} , pH 7,5; EDTA 0,05 mol.L^{-1} ; azul de bromofenol 0,5 mg.mL^{-1}) e 60 μL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 12.000 rpm e os sobrenadantes recolhidos e analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (ácido bórico 89 mmol.L^{-1} ; EDTA 2 mmol.L^{-1} , pH 8,2), submetidas à tensão constante de 60V ou 4V/cm, à temperatura ambiente por 2 horas. Após a corrida, o gel foi corado durante 15 minutos com uma solução de brometo de etídio (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão de corrida e analisado em um fotodocumentador Alpha Imager EP System da Alpha Innotech.

Tampão de diluição (*E. coli*): Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; KCl 100 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 2 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹; glicerol 50% (v/v); pH = 7,5;

Tampão de ensaio (5x) (*E. coli*): Tris.HCl 35 mmol.L⁻¹; KCl 24 mmol.L⁻¹; MgCl₂, 4 mmol.L⁻¹; Ditioneitol, 2 mmol.L⁻¹; Espermidina 1,8 mmol.L⁻¹; ATP 1 mmol.L⁻¹; glicerol 6,5% (v/v); Albumina 0,1 µg .mL⁻¹; pH = 7,5;

Tampão de diluição (*S. aureus*): Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 1 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹; glicerol 40% (v/v); pH = 7,5;

Tampão de ensaio (5x) (*S.aureus*): HEPES.KOH 40 mmol.L⁻¹; Acetato de magnésio 10 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 10 mmol.L⁻¹; ATP 2 mmol.L⁻¹; Glutamato de potássio 500 mmol.L⁻¹; Albumina 0,05 mg.mL⁻¹; pH = 7,6;

3.6.2 Inibição da atividade da topoisomerase IV

Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da Topo IV de *E. coli* e *S. aureus*) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) de Topo IV com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado, na presença do peptídeo de interesse, em diferentes concentrações, em um volume de reação de 30 µL. A incubação ocorreu a 37°C por 1 hora no respectivo tampão de ensaio (descrito abaixo). Posteriormente as amostras foram tratadas, submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose e analisadas em fotodocumentador, conforme descrito no item anterior.

Tampão de diluição (*E. coli*): HEPES-KOH 40 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 1 mmol.L⁻¹; glutamato de potássio 100 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹; glicerol 40% (v/v); pH = 7,6;

Tampão de ensaio 5x (*E. coli*): HEPES-KOH 50 mmol.L⁻¹; glutamato de potássio 100 mmol.L⁻¹; acetato de magnésio 10 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 10 mmol.L⁻¹; ATP 1 mmol.L⁻¹; Albumina 50 µg.mL⁻¹; pH=7,6;

Tampão de diluição (*S. aureus*): Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; glutamato de potássio 100 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 1 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹; glicerol 40% (v/v); pH = 7,5;

Tampão de ensaio 5x (*S. aureus*): Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; glutamato de potássio 350 mmol.L⁻¹; cloreto de magnésio 5 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 5 mmol.L⁻¹; ATP 1,5 mmol.L⁻¹; Albumina 0,05 mg.mL⁻¹; pH = 7,6.

3.6.3 Inibição da atividade das topoisomerasas tipo II humana

Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da topoisomerase II humana α e β) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado, na presença do peptídeo de interesse, em diferentes concentrações, em um volume de reação de

30 µL. A incubação foi feita a 37°C durante 30 minutos em tampão de ensaio e ATP. Posteriormente as amostras foram tratadas, submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose e analisadas em fotodocumentador, conforme descrito anteriormente.

Tampão de diluição: Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; NaCl 100 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 1 mmol.L⁻¹; EDTA 0,5 mmol.L⁻¹; glicerol 50% (m/v); Albumina 50 µg.mL⁻¹, pH = 7,5;

Tampão de ensaio 10x: Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; NaCl 125 mmol.L⁻¹; MgCl₂, 10 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 5 mmol.L⁻¹; Albumina 100 µg .mL⁻¹; pH = 7,5.

ATP 30x: 30 mmol.L⁻¹.

3.6.4 Inibição da atividade das topoisomerasas tipo I

Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da topoisomerase I de *E. coli*, de *M. tuberculosis* e humana) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado, na presença do peptídeo de interesse, em diferentes concentrações, em um volume de reação de 30 µL. A incubação foi feita a 37°C durante 30 minutos (20 minutos para Topo I de *E. coli*) no respectivo tampão de ensaio. Posteriormente as amostras foram tratadas, submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose e analisadas em fotodocumentador, conforme descrito para DNA girase.

Tampão de diluição (*E. coli*): Tris.HCl 10 mmol.L⁻¹; KCl 50 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 1 mmol.L⁻¹; EDTA 0,1 mmol.L⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 35 mmol.L⁻¹; glicerol 50% (v/v); pH = 7,5;

Tampão de ensaio 10x (*E. coli*): Acetato de potássio 50 mmol.L⁻¹; Tris.Acetato 20 mmol.L⁻¹, acetato de magnésio 10 mmol.L⁻¹; Albumina 100 µg.mL⁻¹; pH = 7,9;

Tampão de diluição (*M. tuberculosis*): Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; NaCl 50 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 1 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹; glicerol 50% (v/v); pH = 7,6;

Tampão de ensaio 5x (*M. tuberculosis*): Tris.HCl 40 mmol.L⁻¹; NaCl 20 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹; MgCl₂, 5 mmol.L⁻¹; Albumina 50 µg.mL⁻¹; pH = 7,6.

Tampão de diluição (*humana*): Tris.HCl 10 mmol.L⁻¹; Ditioneitol 1 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹; glicerol 50% (v/v); Albumina 50 µg.mL⁻¹; pH = 7,5;

Tampão de ensaio 10x (*humana*): Tris.HCl 20 mmol.L⁻¹; NaCl 200 mmol.L⁻¹; EDTA 250 µmol.L⁻¹; glicerol 5% (v/v); Albumina 50 µg.mL⁻¹; pH = 7,5.

3.7 Avaliação da atividade hemolítica

O ensaio de atividade hemolítica é um estudo de grande importância para se ter uma avaliação preliminar da toxicidade dos peptídeos em estudo. Para a realização

de tal experimento, o projeto foi previamente submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP (CEP-FCF), sendo aprovado com o número CAAE: 61293316.4.0000.5426. A atividade hemolítica dos peptídeos foi determinada a partir da análise da liberação da hemoglobina dos eritrócitos (ONUMA *et al.*, 1999). Neste ensaio, realizado em duplicata, foi utilizado eritrócitos humanos obtidos a partir do sangue fresco de doador voluntário, separados do plasma por centrifugação a 3.000 rpm (5 min) e lavadas 3 vezes em tampão PBS (0,01 mol.L⁻¹, contendo 0,15 mol.L⁻¹ NaCl), pH 7,4. Da solução inicial de cada peptídeo a 200 µmol.L⁻¹, em tampão PBS, foram realizadas diluições seriadas em tubos tipo eppendorf, e adicionado a cada um, uma solução de eritrócitos, obtendo um volume final de 200 µL (1% de eritrócitos) 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%) misturado 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 microplacas de 96 poços. A atividade hemolítica foi analisada a partir dos valores de absorbância do sobrenadante a 540 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 2.

$$\% \text{ hemólise} = \frac{(DO_{\text{Amostra}} - DO_{\text{Tampão}})}{(DO_{\text{triton}} - DO_{\text{Tampão}})} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Sendo que “ DO_{Amostra} ” representa a absorbância obtida nas leituras das amostras e “ DO_{triton} ” e “ $DO_{\text{Tampão}}$ ” representam as leituras obtidas para os controles positivos e negativos, respectivamente.

3.8 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeos sintetizados, visando a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs), foi utilizado o método de microdiluição em placa, de acordo com as normas descritas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI – documentos M7-A10, 2015 e M27-A3, 2017),

com modificações. Foram utilizadas as Cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Escherichia coli* (ATCC 43895) e *Candida albicans* (ATCC 90028), todas 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.

3.8.1 Preparação do inóculo

Uma alíquota de cada microrganismo foi descongelada e reativada em seu meio específico sendo Mueller Hinton (MH) para bactérias e caldo Sabouraud Dextrose (SDB) para levedura, por incubação em estufa, a 37°C, por 24 horas. Após este período de crescimento, os microrganismos foram semeados em placas contendo meio ágar específico, sendo ágar MH e ágar SDB para as bactérias e levedura, respectivamente, e então incubadas em estufa de crescimento a 37°C durante 24h para as bactérias e 48h para a levedura. A cultura-estoque obtida foi armazenada em geladeira, a 4°C, por no máximo 3 meses e após esse tempo, o processo descrito era repetido.

Com auxílio de uma alça de platina, transferiu-se 5 colônias isoladas de cada cepa de microrganismo crescida em placa (cultura-estoque), para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio específico estéril, incubando-os a 37°C sob agitação a 140 rpm por 12 horas, para crescimento. Em seguida, cada inóculo foi utilizado nos ensaios de determinação de concentração inibitória mínima.

3.8.2 Determinação da concentração inibitória mínima para bactérias

Inicialmente, a concentração do inóculo foi ajustada espectrofotometricamente, de acordo com o padrão de turbidez McFarland 0,5 que obtém uma absorbância entre 0,08 e 0,10 a 625 nm, para bactérias. Neste padrão, esta suspensão deve conter aproximadamente 1×10^8 UFC.mL⁻¹, sendo que, para a utilização nos ensaios, foi diluída 10 vezes em meio MH, resultando em uma suspensão bacteriana de concentração final de 1×10^7 UFC.mL⁻¹.

A atividade de inibição foi determinada pela técnica de diluição em microplacas. Resumidamente, 80 µL de meio de cultivo MH foram adicionados a cada poço de uma microplaca de 96 poços estéril. Alíquotas de 100 µL de cada peptídeo diluído em série em tampão PBS (100 até 0,5 µmol·L⁻¹) e alíquotas de 20 µL das respectivas suspensões bacterianas, foram adicionados a cada poço da microplaca.

As microplacas foram incubadas em uma estufa a 37°C por 24 horas e os testes foram realizados em triplicata. Como controles positivo e negativo do crescimento microbiano foram empregados, respectivamente, suspensão bacteriana e suspensão bacteriana contendo ciprofloxacina (Sigma N1628) nas mesmas concentrações utilizadas para os peptídeos, em um volume final de 200 µL. Após o período de incubação, as placas foram submetidas à análise espectrofotométrica, utilizando um leitor de microplacas EPOCH da Biotek Instruments, em comprimento de onda de 595 nm. A porcentagem de inibição do crescimento bacteriano para cada uma das amostras peptídicas foi determinada por uma análise comparativa com os controles utilizados. Os resultados da atividade antimicrobiana foram calculados e expressos em porcentagem de inibição de acordo com a equação 3.

$$\% \text{ inibição} = \left(1 - \left(\frac{DO_{amostra} - DO_{meio}}{DO_{controle} - DO_{meio}} \right) \right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$DO_{amostra}$ representa as absorbâncias auferidas na leitura das amostras;

$DO_{controle}$ refere-se ao controle positivo;

DO_{meio} corresponde às leituras obtidas provenientes do meio de cultura.

3.8.3 Determinação da concentração inibitória mínima para fungos

Para *Candida albicans*, a concentração foi ajustada espectrofotometricamente entre 0,10 e 0,15 de densidade ótica (DO), a 530 nm, sendo esta correspondente a uma concentração aproximada de 1×10^6 UFC.mL⁻¹ (RODRÍGUEZ-TUDELA *et al.*, 2001). Para a utilização nos ensaios, a suspensão foi diluída em SDB até a obtenção de uma suspensão de concentração final de 1×10^3 UFC.mL⁻¹.

A atividade inibitória dos peptídeos foi determinada pela técnica de diluição em microplacas. Neste caso, 50 µL de meio de cultivo SDB foram adicionados a cada poço de uma microplaca de 96 poços estéril. Alíquotas de 50 µL de cada peptídeo diluído em série em tampão PBS (50 até 0,39 µmol.L⁻¹) e alíquotas de 100 µL da suspensão padronizada de *C. albicans*, foram adicionados a cada poço da microplaca.

As microplacas foram incubadas em uma estufa a 37°C por 24 horas e os testes foram realizados em triplicata. Como controles positivo e negativo do crescimento

microbiano foram utilizados, meio SDB com *C. albicans* e meio SDB sem os microrganismos, respectivamente.

A porcentagem de inibição do crescimento do fungo para cada uma das amostras peptídicas foi determinada por uma análise comparativa com os controles utilizados. Os resultados da atividade antifúngica foram calculados e expressos em porcentagem de inibição, aplicando-se a equação 2, da mesma forma que na determinação da atividade antibacteriana.

3.8.4 Indicação de viabilidade celular

Para a confirmação da atividade inibitória mínima, após as leituras de DO nos ensaios de determinação de CIM, a cada poço das microplacas, foram adicionados 20 μL de uma solução de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) filtrada em membranas de 0,22 μm , nas concentrações de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para bactérias e 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para a levedura. As placas foram então incubadas em estufa à 37°C por 2 h. A mudança de cor foi avaliada visualmente, considerando-se que houve inibição do crescimento nos poços que apresentaram coloração equivalente a coluna do controle negativo.

3.8.5 Cinética de morte de microrganismos (Time-kill)

No estudo de determinação do tempo de morte das bactérias, o método de microdiluição em microplacas (ZHOU *et al.*, 2013) foi escolhido, por permitir sua realização nas mesmas condições do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Desta forma, 80 μL de meio de cultivo MH foram adicionados a cada poço de uma microplaca de 96 poços estéril. Alíquotas de 100 μL de cada peptídeo diluído em série em tampão PBS (100 até 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e alíquotas de 20 μL das respectivas suspensões bacterianas, foram adicionados a cada poço da microplaca.

As microplacas foram incubadas em uma estufa a 37°C nos tempos de 0, 2, 4, 6, 9, 12 e 24 horas. Após os períodos de incubação, as placas foram submetidas à análise espectrofotométrica, utilizando um leitor de microplacas EPOCH da Biotek Instruments, em comprimento de onda de 595 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. A porcentagem de crescimento relativo foi calculada e expressa em porcentagem de inibição, aplicando-se a equação 4.

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{\text{DO (amostra)} - \text{DO (meio tf)}}{\text{DO (controle crescimento tf)} - \text{DO (meio tf)}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde,

DO_(amostra) representa as absorvâncias das amostras nos diferentes tempos;

DO_(controle crescimento tf), refere-se ao controle de crescimento no tempo final: 24h;

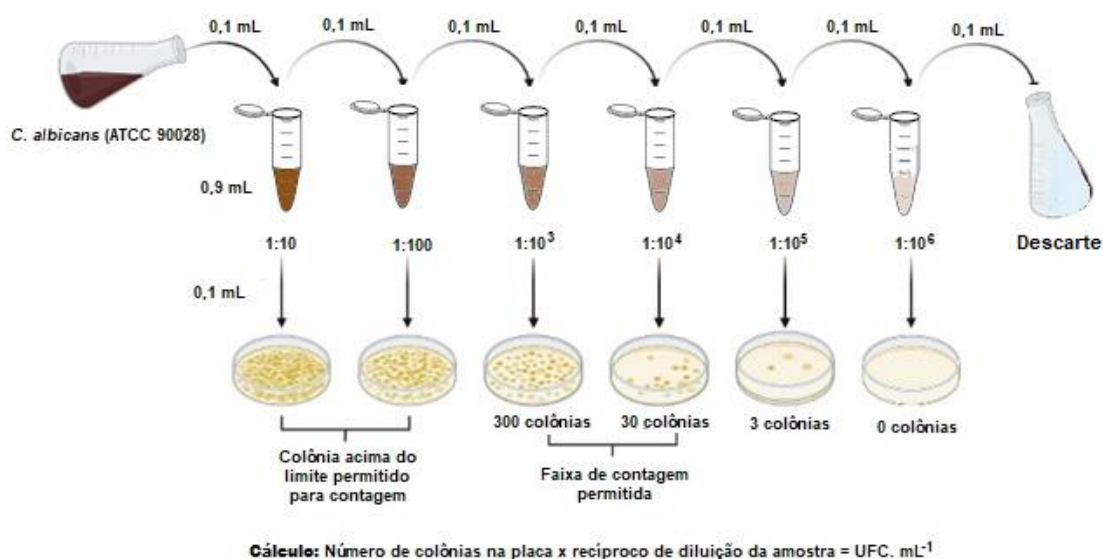
DO_(meio tf) corresponde às leituras obtidas para o meio de cultura, no tempo final: 24h.

3.8.6 Cinética de morte celular para *C. albicans* em macrodiluição

Para a obtenção de informações relativas à velocidade de ação dos peptídeos, assim como seu potencial fungicida, optou-se pelo ensaio de cinética de morte celular (Time-Kill) em macrodiluição (KLEPSEK *et al.*, 1997). Antes do ensaio, *C. albicans* foi subcultivada duas vezes em placas de ágar Sabouraud Dextrose. Três a cinco colônias de uma placa de crescimento de 48 horas foram semeadas em Caldo Sabouraud Dextrose e incubadas por 18 horas a 37°C e em seguida suspensas em 9 mL de NaCl 0,9%. A suspensão fúngica foi ajustada de acordo com métodos espectrofotométricos a 530 nm, para um padrão de turbidez de 0,5 McFarland (aproximadamente 1×10^6 a 5×10^6 UFC.mL⁻¹). Um mililitro da suspensão fúngica ajustada foi então adicionado a um erlenmeyer contendo 9 mL de meio Sabouraud Dextrose, controle positivo, ou uma solução de meio de crescimento mais uma quantidade apropriada de solução estoque de cada peptídeo, na concentração letal pré-determinada no ensaio de CIM. Isso resultou em uma diluição de 1:10 da suspensão fúngica, produzindo um inóculo inicial de aproximadamente 1×10^5 a 5×10^5 CFU.mL⁻¹. O controle negativo utilizado foi preparado com a mesma composição do controle positivo, porém na presença de Fluconazol.

Em seguida, cada erlenmeyer foi incubado a 37°C sob agitação constante, e uma alíquota de 100 µL foi retirada nos tempos 0, 2, 4, 6, 9, 12 e 24h, diluída em série 1:10 em solução 0,9% de NaCl. Uma alíquota de 100 µL de cada diluição, foi transferida para uma placa preparada com Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas por 48 horas (Figura 8). Após o período realizou-se a contagem das colônias formadas.

Figura 8. Esquema do ensaio de cinética de morte celular (Time-kill) para *C.albicans*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.9 Viabilidade celular

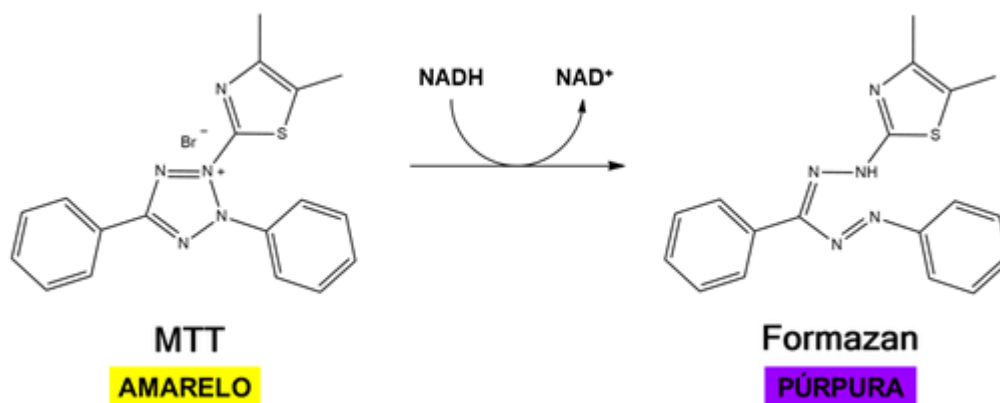
A análise de viabilidade celular foi realizada por meio do método colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), baseado na medida quantitativa da formação de cristais de formazan (Figura 9) a partir da reação de redução do sal de brometo por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis (LOBNER, 2000; MOSMANN, 1983).

O ensaio foi realizado em triplicata, pela técnica de diluição em microplacas de 96 poços (Corning, Inc.). Foram utilizadas células de fibroblastos da linhagem NIH/3T3 e visando analisar o potencial anticancerígeno dos peptídeos sintetizados, optou-se pela escolha da linhagem celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama, ambas sendo semeadas em densidade celular de 5×10^4 células.mL⁻¹. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem relativa. Como controle positivo, que corresponde a 0% de viabilidade celular, foi utilizado apenas o meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), e o controle negativo, correspondente a 100% de viabilidade celular, foi preparado com as células no meio de cultura DMEM. As placas de cultura foram incubadas por 24h em estufa Galaxy 48S, a 37°C com 5% de CO₂ (New Brunswick) para a adesão das células. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 100 µL de solução salina tamponada de fosfatos

(PBS) estéril para lavagem e remoção de células mortas suspensas. As células foram tratadas com uma solução de cada peptídeo 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 contendo L-Glutamina e sem piruvato e incubadas por 24 horas.

Após o período, a solução foi descartada e foram então adicionados 200 μL de uma solução de MTT a 10,0 mg.mL^{-1} 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 μL de álcool isopropílico para dissolução dos cristais de formazan formados. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplaca EPOCH da Biotek Instruments com filtro de 560 nm, descontando-se a absorbância de fundo de 690 nm (FRESHNEY, 1986).

Figura 9. Redução do MTT para cristais de Formazan, pelas células viáveis.



Fonte: Adaptado de KAMILOGLU *et al.*, 2020 .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

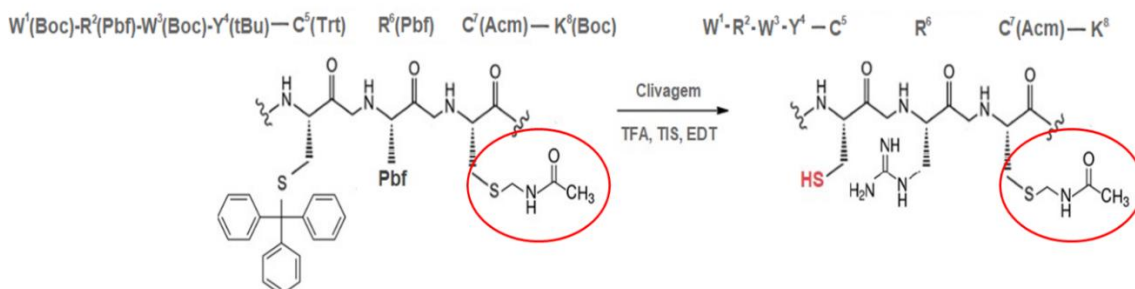
4.1 Desenho e síntese de peptídeos

Com o intuito de desenvolver novos inibidores peptídicos de DNA topoisomerasas, decidiu-se por sintetizar análogos do octapeptídeo WRWYCRCK e, com o uso deles, estudar a influência de fatores como carga, número e posição de ligações dissulfeto deste octapeptídeo, na inibição da atividade desta classe de enzimas. Assim, os peptídeos lineares Lin2, Lin3, Lin4, A⁷Lin2 e A⁵Lin4 (Tabela 1) foram sintetizados empregando o método da fase sólida, como descrito no item 3.1 de Material e Métodos. As sínteses ocorreram sem maiores problemas, sendo necessários poucas repetições de acoplamento. As etapas de clivagem e extração também não apresentaram problemas e ocorreram com sucesso.

Os peptídeos Lin2 e Lin3 diferenciam-se na extremidade C-terminal, tendo Lin2 um grupo carboxiamida e Lin3 um grupo carboxílico. Esta diferenciação foi promovida para mimetizar uma ligação peptídica nesta extremidade em Lin3, de forma a eliminar a presença de uma carga negativa nesta região e, comparativamente a Lin2, avaliar o efeito desta carga na atividade do peptídeo dimérico formado.

Estes dois peptídeos foram sintetizados de forma que os grupos protetores da cadeia lateral dos resíduos de cisteína, tivessem labilidades diferentes, sendo o grupo tritila (Trt), lábil ao tratamento com TFA, para proteção das sulfidrilas do resíduo de cisteína da posição 5 e o grupo acetamidometila (Acm), resistente ao tratamento com TFA, para a cisteína da posição 7 (Figura 10).

Figura 10. Esquema da etapa de clivagem de Lin2 e Lin3. O grupo acetamidometila da cisteína 7 (em destaque) é preservado após clivagem com TFA.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Este procedimento teve como objetivo evitar a formação de ligações dissulfeto aleatórias, que normalmente ocorrem durante um processo oxidativo quando todas sulfidrilas estão livres. O uso de dois protetores diferentes objetivou garantir o direcionamento das ligações dissulfeto em C⁵-C^{5'} e C⁷-C^{7'}, durante os dois processos oxidativos sequenciais.

Por outro lado, Lin4, A⁵Lin4 e A⁷Lin2 foram estrategicamente projetados e sintetizados para que, no processo de oxidação, as ligações dissulfeto formadas fossem antiparalelas. Para isso, os peptídeos foram sintetizados, empregando o grupo tritila como protetor da sulfidrilas do resíduo de cisteína da posição 7 (Lin4 e A⁵Lin4) para que, no processo de clivagem, quando na presença de 2,2'-ditiobis-(5-nitropiridina), pudesse gerar uma cisteína contendo o isômero 5-nitro-2-piridinosulfenila (Npys) como protetor do seu grupo sulfidrilas (Figura 7). Para A⁷Lin2 e Lin4, os protetores utilizados para o grupo sulfidrilas da cisteína da posição 5, foram tritila e acetamidometila, respectivamente.

Após a etapa de clivagem, os peptídeos foram liofilizados e submetidos a avaliação do perfil cromatográfico e caracterização por espectrometria de massas do pico majoritário, e os valores de massa molecular obtidos [ES m/z: (M + H)⁺], estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Massa molecular obtidas para os peptídeos lineares

Peptídeo	Massa Molecular calculada (g.mol ⁻¹)	ES+	ES m/z (g.mol ⁻¹)	Massa Molecular obtida (g.mol ⁻¹)
Lin2	1.270,53	+2	635,8	1.269,58
		+3	424,2	1.269,58
Lin3	1.271,51	+2	636,3	1.270,58
		+3	424,5	1.270,48
Lin4	1.424,68	+2	712,8	1.423,58
		+3	475,5	1.423,48
A ⁷ Lin2	1.167,39	+2	584,2	1.166,38
		+3	389,8	1.166,38
A ⁵ Lin4	1.321,54	+2	661,3	1.320,58
		+3	441,2	1.320,58

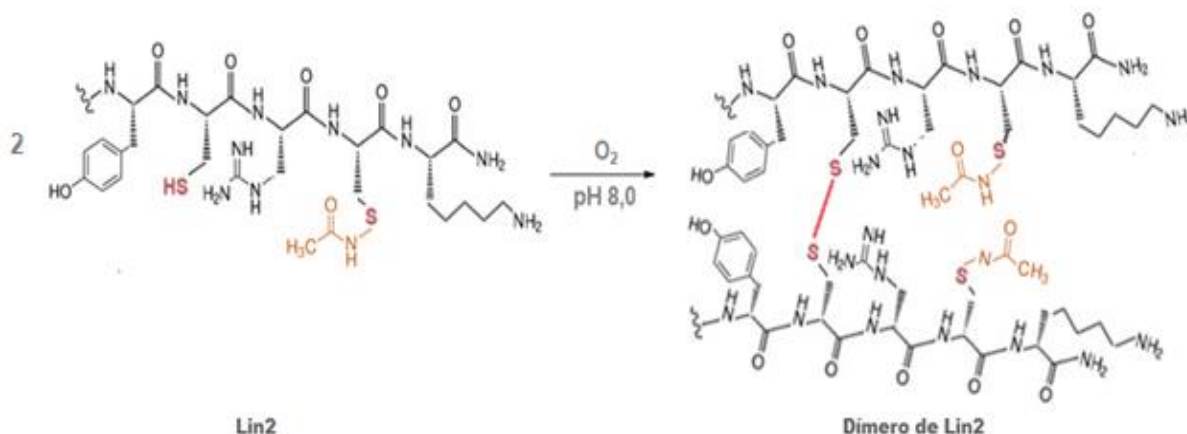
Fonte: Elaborada pelo autor

Os resultados foram coincidentes com o teórico esperado, confirmando a identidade das estruturas peptídicas sintetizadas e levando à conclusão de que os procedimentos utilizados para síntese e clivagem das peptidil-resinas foram eficientes, levando à obtenção das sequências peptídicas desejadas, com grau de pureza considerado satisfatório para a realização das reações de oxidação sem necessidade de purificação prévia.

4.2 Reações de oxidação e formação de ligações dissulfeto

Para a obtenção das formas dimerizadas, os peptídeos lineares Lin2, Lin3 e A⁷Lin2, todos na sua forma bruta (antes da purificação), foram submetidos a reações de oxidação por aeração controlada, em meio levemente alcalino, seguindo o método descrito no item 3.2 de Material e Métodos. Este processo resultou na formação de uma ligação dissulfeto intermolecular entre os resíduos de cisteínas da posição 5, de dois monômeros idênticos (Figura 11). As reações foram monitoradas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por espectrometria de massas (EM). Na maioria dos casos, o tempo máximo de oxidação foi de 48 horas, não sendo observadas alterações significativas nos respectivos cromatogramas após este período, e até 72 horas de reação (Figuras 12-14).

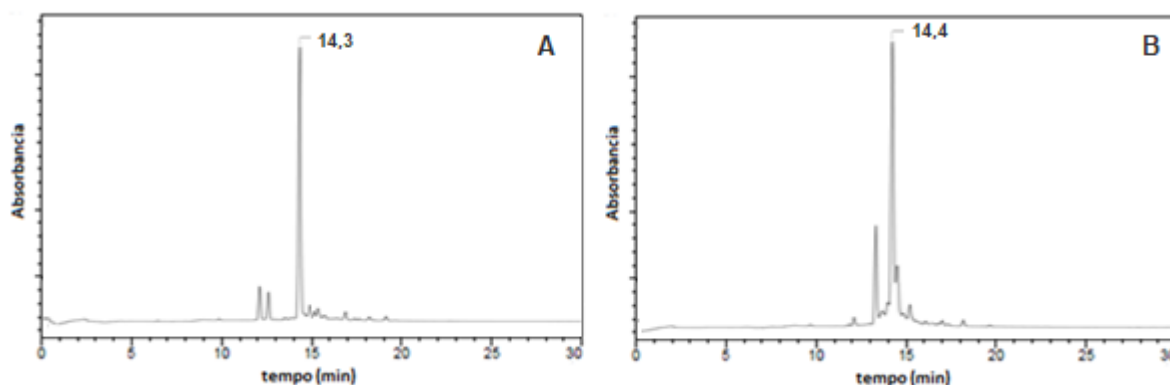
Figura 11. Reação de formação de uma ligação dissulfeto intermolecular entre os resíduos de cisteínas da posição 5 de Lin2.



Fonte: Elaborada pelo autor.

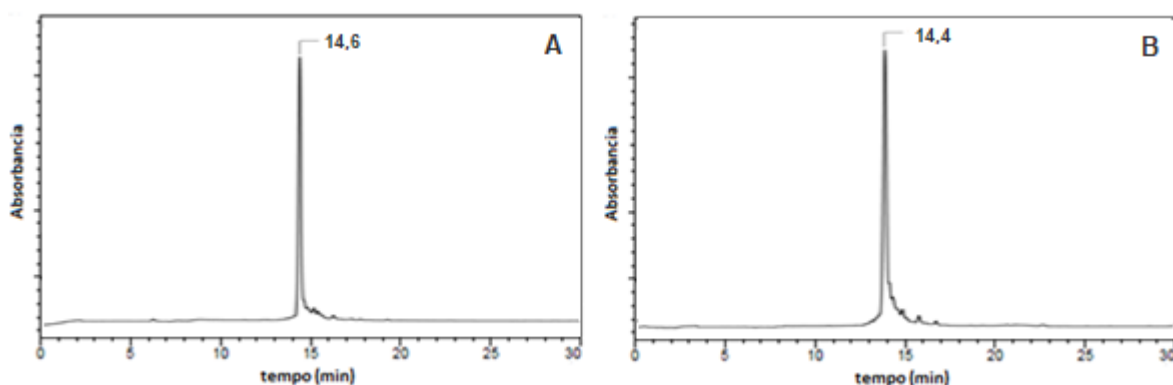
A identidade dos peptídeos oxidados foi confirmada por determinação das correspondentes massas moleculares, 2.332,76, 2.537,04 e 2.541,01 g.mol⁻¹, determinados pela técnica ES-MS positivo [ES m/z = 778,3 (M+3H)⁺³; 846,8 (M+3H)⁺³ e 848,3 (M+3H)⁺³ g.mol⁻¹] para A⁷Lin2, Lin2 e Lin3, respectivamente.

Figura 12. Monitoramento da reação de oxidação de A⁷Lin2 (formação da ligação dissulfeto C⁵-C⁵), por CLAE analítica. A) monômero em condições iniciais de oxidação e B) formação do dímero após 72 horas de reação. Condições gerais de análise (Material e Métodos): gradiente linear 5-95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm.



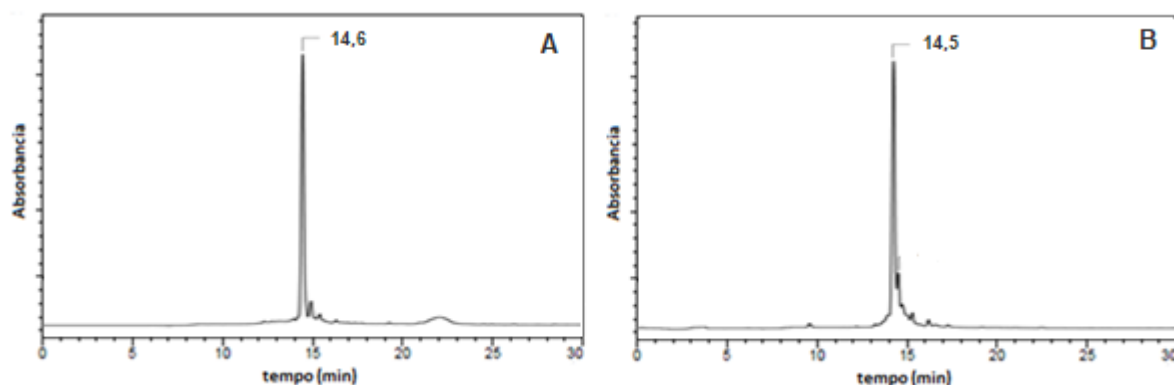
Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 13. Monitoramento da reação de oxidação de Lin2 (formação da ligação dissulfeto C⁵-C⁵), por CLAE analítica. A) monômero em condições iniciais de oxidação e B) formação do dímero após 72 horas de reação. Condições gerais de análise (Material e Métodos): gradiente linear 5-95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14. Monitoramento da reação de oxidação de Lin3 (formação da ligação dissulfeto C⁵-C⁵), por CLAE analítica. A) monômero em condições iniciais de oxidação e B) formação do dímero após 72 horas de reação. Condições gerais de análise (Material e Métodos): gradiente linear 5-95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Com este primeiro processo oxidativo, uma ligação dissulfeto intermolecular C⁵-C⁵ foi formada para os peptídeos A⁷Lin2, Lin2 e Lin3. Assim, o primeiro dímero paralelo, contendo apenas uma ligação dissulfeto, objeto de estudos deste trabalho, foi obtido e denominado DimA⁷Lin2 (Tabela 4). Os demais foram obtidos após etapas oxidativas adicionais.

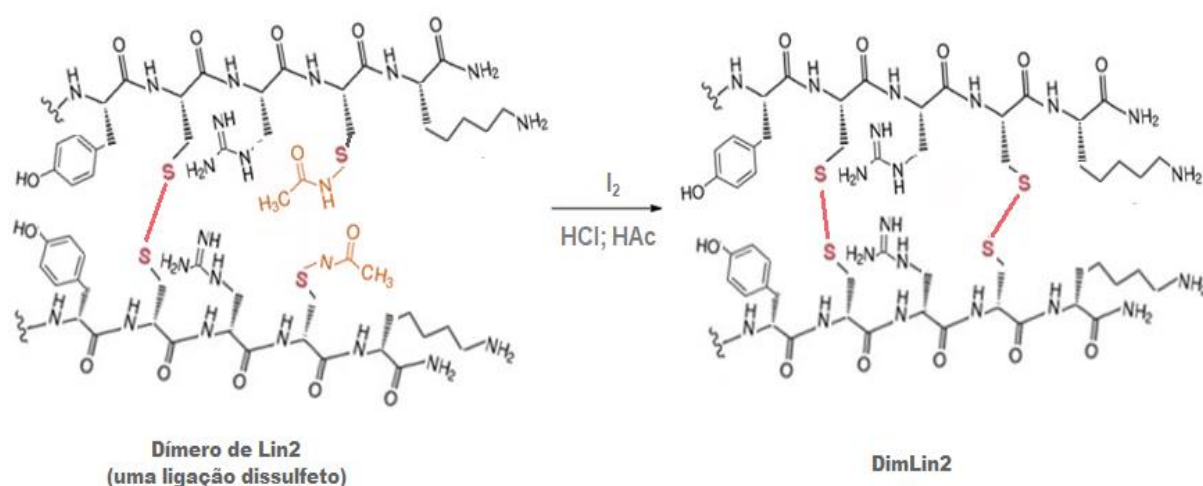
Tabela 4. Estrutura primária dos peptídeos obtidos após processos de oxidação.

Peptídeo	Sequência
DimLin2	WRWYCRCK-NH ₂ WRWYCRCK-NH ₂
DimLin3	WRWYCRCK WRWYCRCK
DimA ⁷ Lin2	WRWYCRAK-NH ₂ WRWYCRAK-NH ₂
DimAP1	WRWYCRAK-NH ₂ H ₂ N-KCRAYWRW
DimAPLin2	WRWYCRCK-NH ₂ H ₂ N-KCRCYWRW

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a conclusão da síntese dos outros dois dímeros paralelos da Tabela 4 (DimLin2 e DimLin3, outra etapa de oxidação foi necessária, para a formação de uma segunda ligação dissulfeto intermolecular, agora na posição C⁷-C^{7'} (Figura 15). Neste caso, o protocolo proposto por Zhang e colaboradores em 2008, foi utilizado, introduzindo variações no processo de extração do iodo remanescente no meio. Para isso, foi feito o uso de excesso de éter etílico gelado com posterior centrifugação e precipitação do peptídeo, obtendo-se bons rendimentos (item 3.2 – Material e Métodos).

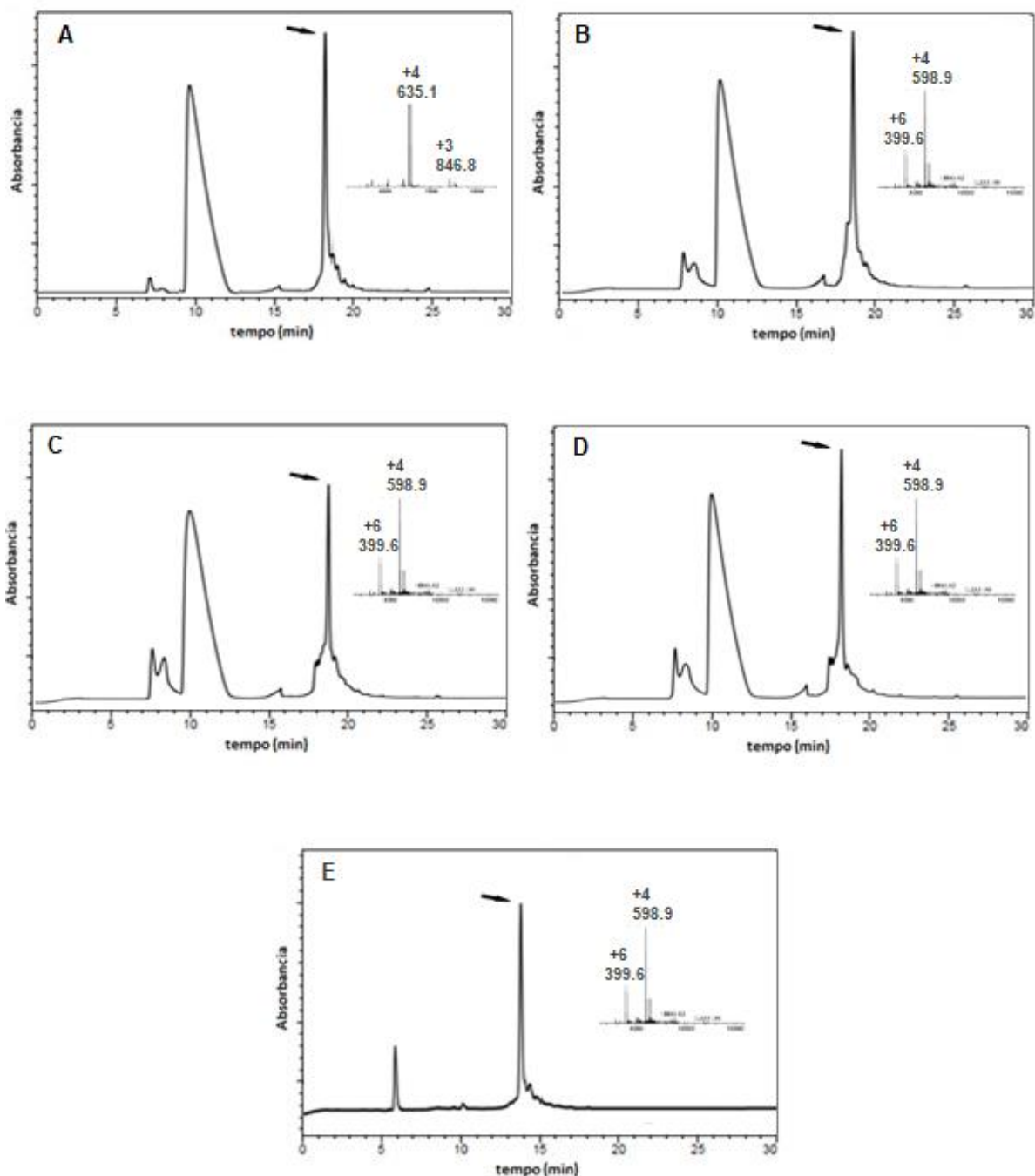
Figura 15. Reação de oxidação para formação da segunda ligação dissulfeto intermolecular para obtenção de DimLin2.



Fonte: Elaborada pelo autor.

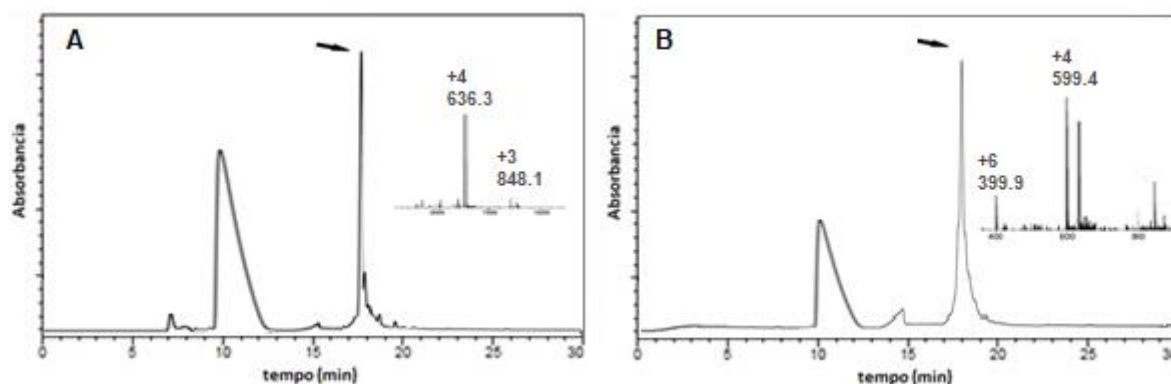
Durante o processo de desproteção do grupo AcM presente na cisteína da posição 7 (iodólise) e concomitante oxidação, como exemplificado na Figura 15, alíquotas foram retiradas para acompanhamento da reação e foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (LC-MS), por um período de até 120 min, como mostrado na Figura 16, na obtenção de DimLin2, e de maneira simplificada para o dímero DimLin3 na Figura 17.

Figura 16. LC-MS de monitoramento da reação de oxidação com iodo, para obtenção do peptídeo DimLin2 (formação da ligação dissulfeto C⁷-C⁷). Tempo de reação: 0 min (A); 30 min (B); 90 min (C) e 120 min (D). Em (E) está representado o cromatograma de 120 min de reação, obtido após remoção do excesso de iodo. Condições gerais de análise (Material e Métodos): gradiente linear 5-95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

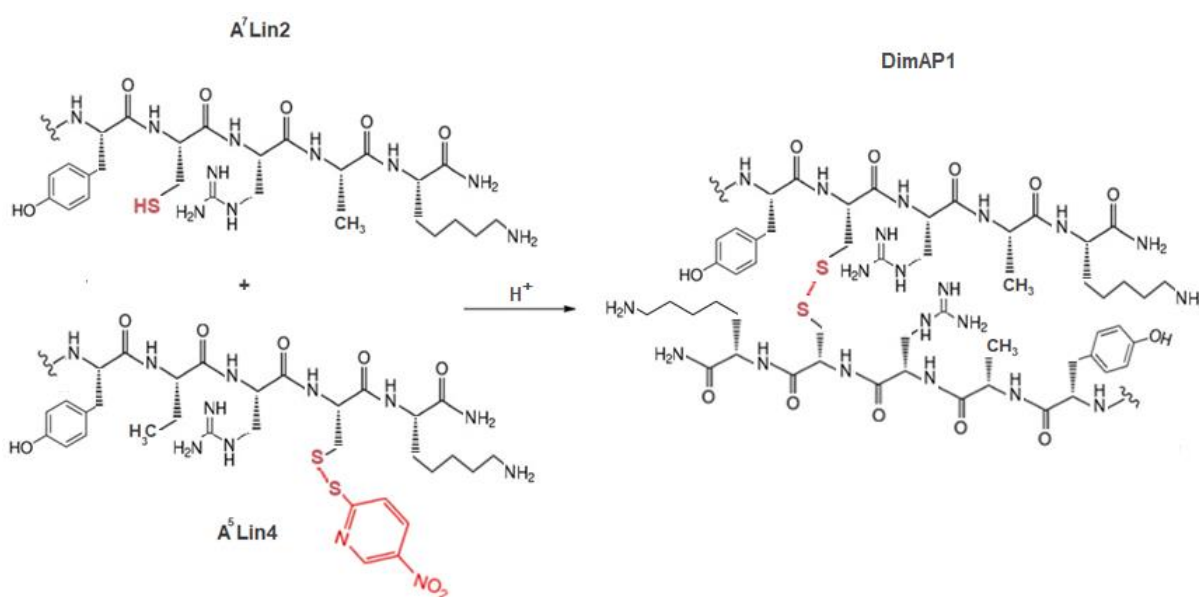
Figura 17. LC-MS de monitoramento da reação de oxidação com iodo, para obtenção do peptídeo DimLin3 (formação da ligação dissulfeto C⁷-C⁷). Tempo de reação: 0 min (A) e 120 min (B); Condições gerais de análise (Material e Métodos): gradiente linear 5-95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a obtenção do dímero antiparalelo contendo apenas uma ligação dissulfeto C⁵-C⁷, os peptídeos monoméricos A⁵Lin4 e A⁷Lin2 foram colocados para reagirem, em meio levemente ácido (pH = 3,0), como descrito em Material e Métodos e esquematizado na Figura 18.

Figura 18. Esquema da reação para obtenção do dímero antiparalelo DimAP1.



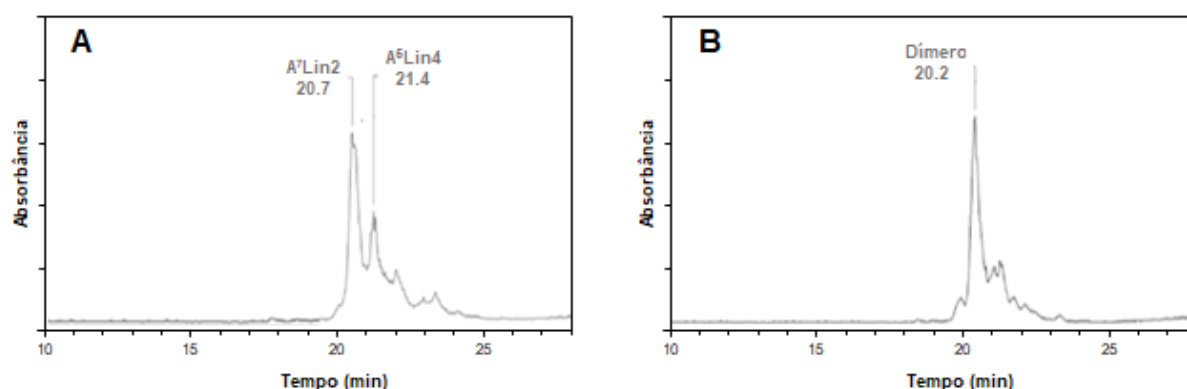
Fonte: Elaborada pelo autor.

A formação de uma ligação dissulfeto assimétrica entre duas cadeias peptídicas, geralmente requer a ativação da função tiol de um dos peptídeos, seguida pela adição do segundo peptídeo na forma de tiol livre. Esta abordagem é necessária para promover a formação de um heterodímero ou um homodímero antiparalelo desejado, caso contrário, moléculas homodiméricas paralelas indesejadas são obtidas com rendimentos apreciáveis.

Diversos métodos podem ser empregados para a formação de dissulfetos mistos, mas cada um com suas especificidades e restrições. Neste trabalho optou-se pelo método que emprega o grupo 5-nitro-2-piridinossulfenila (Npys) como protetor/ativador, no qual a formação da ligação dissulfeto é impulsionada pelo baixo pKa do grupo tiol aromático, o que permite que a reação possa ser realizada sob condições ligeiramente ácidas, necessárias para minimizar as reações indesejadas. A presença do grupo *p*-nitro no anel, aumenta a acidez do grupo tiol correspondente, tornando-o um bom grupo de saída e, portanto, capaz de reagir facilmente em um pH mais baixo (RABANAL, *et al.*, 1996).

A formação do dímero desejado foi acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a qual foi concluída após aproximadamente 24 horas de reação (Figura 19). O produto formado foi denominado DimAP1 (Tabela 4).

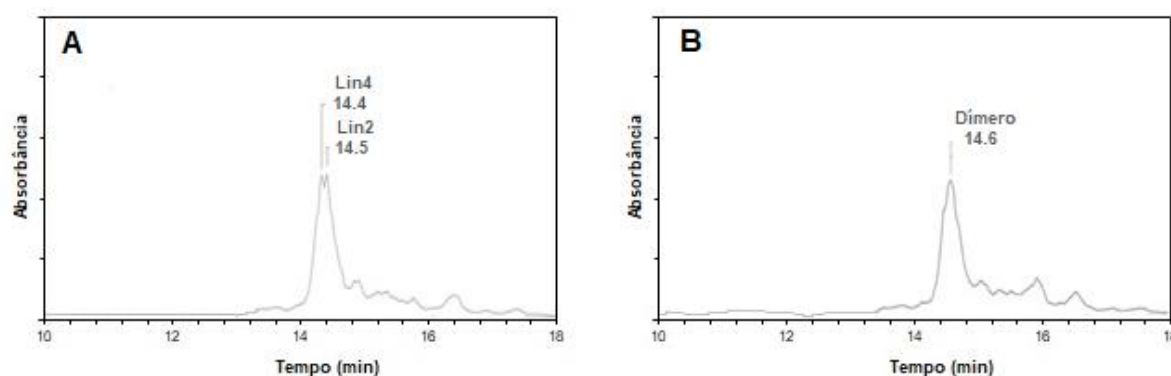
Figura 19. Monitoramento por CLAE, da reação de oxidação, para preparação do peptídeo **DimAP1** (formação da ligação dissulfeto C⁵-C⁷), no início (A) e após 24 horas de reação (B).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o dímero antiparalelo, denominado DimAPLin2, contendo duas ligações dissulfeto (C^7-C^5 e C^5-C^7), foi adotado inicialmente, o mesmo procedimento utilizado na preparação de DimAP1 (Figura 18), porém utilizando Lin4 e Lin2, no mesmo meio levemente ácido. A formação da primeira ligação dissulfeto (C^5-C^7) também foi acompanhada por CLAE, a qual foi concluída após aproximadamente 24 horas de reação (Figura 20).

Figura 20. Monitoramento por CLAE, da reação de oxidação, para formação da primeira ligação dissulfeto (C^5-C^7) do dímero DimAPLin2, no início (A) e após 24 horas de reação (B).

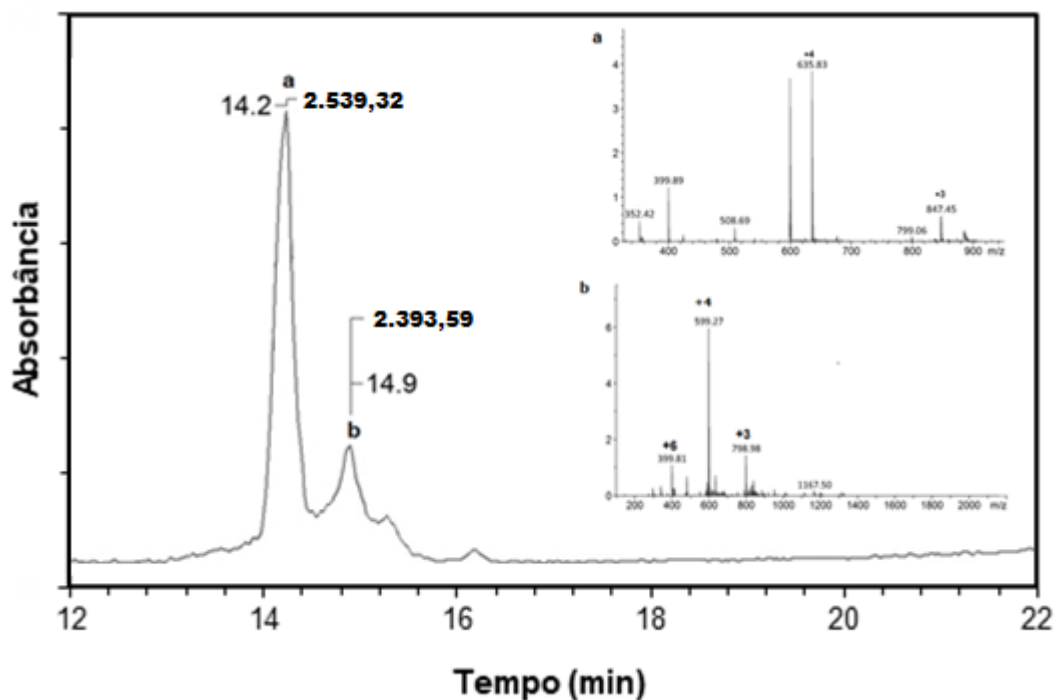


Fonte: Elaborada pelo autor.

Para conclusão da síntese do dímero antiparalelo DimAPLin2, uma nova etapa de oxidação foi realizada com o dímero formado na reação anterior, agora empregando iodo como agente oxidante, a exemplo do dímero paralelo, direcionando para a formação da ligação dissulfeto C^7-C^5 (Figura 15). O monitoramento da reação foi realizado por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS).

O cromatograma representado na Figura 21, é composto por dois picos principais, com tempos de retenção de 14,2 (a) e 14,9 min (b). O primeiro, após análise por espectrometria de massas, resultou em uma massa molecular de 2.539, correspondente ao peptídeo de partida, ou seja, contendo uma ligação dissulfeto C^5-C^7 e as cisteínas C^7 e C^5 protegidas com o grupo acetamidometila (Acm), e o segundo, correspondente ao produto desejado (MM 2.394), contendo as duas ligações dissulfeto antiparalelas. Neste caso, a reação de oxidação com iodo foi incompleta, no período de 120 min, porém resultou na formação do dímero antiparalelo em quantidade suficiente para os estudos propostos.

Figura 21. Monitoramento por LC-MS, da reação de oxidação com iodo, para obtenção do peptídeo DimAPLin2 (formação da ligação dissulfeto C⁷-C⁵). Tempo de reação 120 min, após extração de iodo.



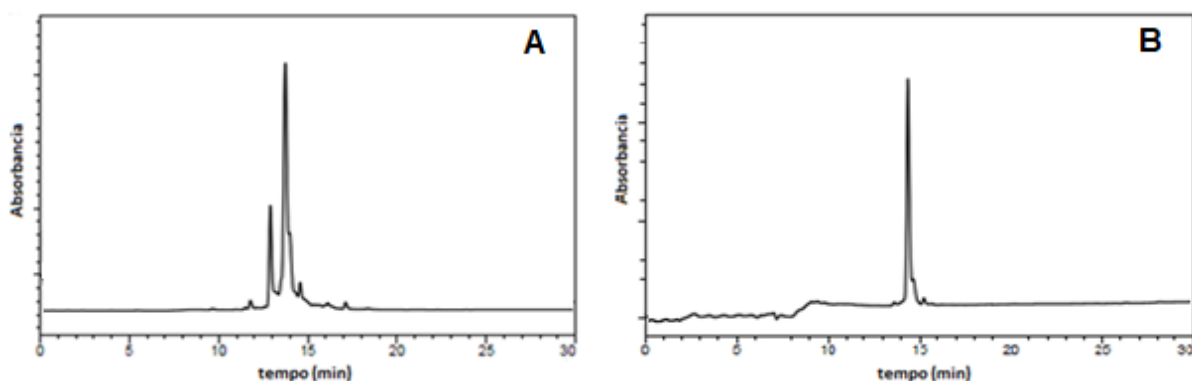
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Purificação e caracterização

Ao final de todo processo de oxidação e obtenção dos peptídeos constantes na Tabela 4, uma pequena quantidade de cada peptídeo liofilizado (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 Material 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 semelhantes para cada um deles (item 3.3 – Material e Métodos). 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. Posteriormente foram analisados por CLAE em modo analítico para confirmação da pureza.

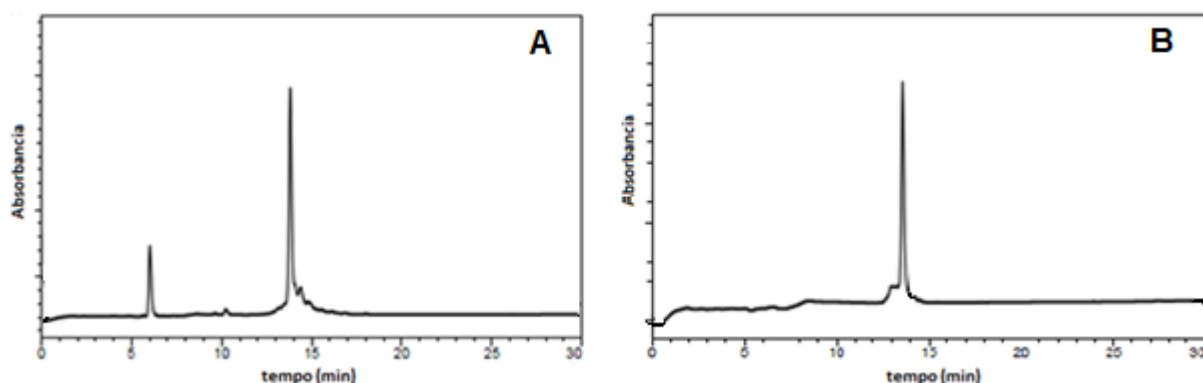
Os perfis cromatográficos dos peptídeos obtidos antes da purificação, bem como os respectivos cromatogramas obtidos após purificação estão representados nas Figuras 22 a 25. Os peptídeos purificados mostraram um único pico em relação aos cromatogramas obtidos a partir das análises do extrato bruto e o parâmetro tempo de retenção foram mantidos.

Figura 22. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o dímero **DimA⁷Lin2**; (A) antes e (B) após purificação. Condições da análise (Material e Métodos): gradiente linear 5-95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm.



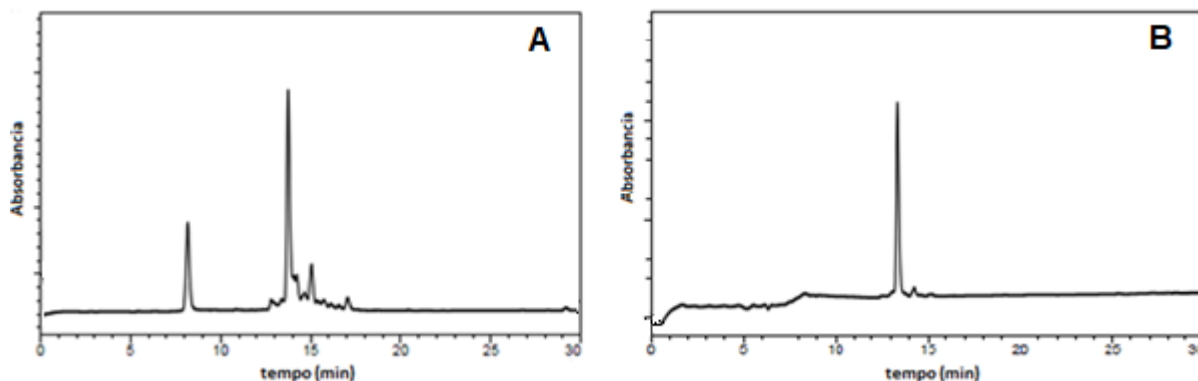
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 23. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **DimLin2**; (A) antes e (B) após purificação. Condições da análise (Material e Métodos): gradiente linear 5-95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm.



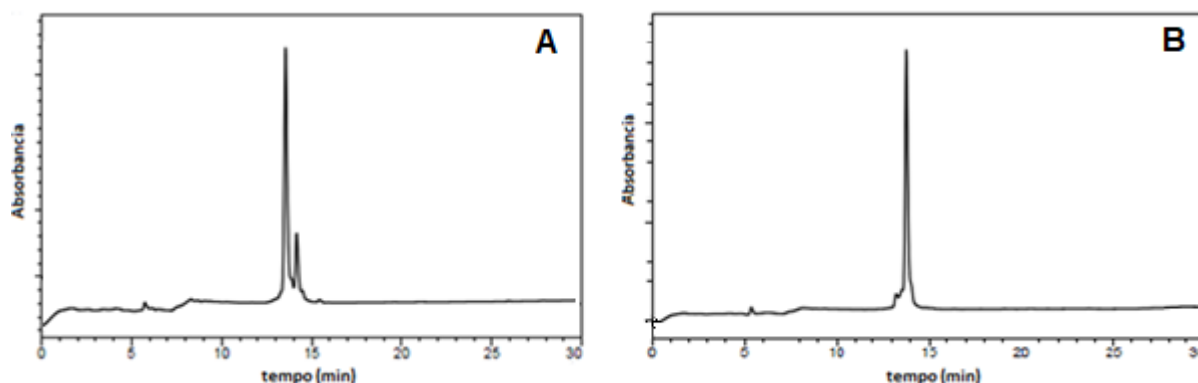
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 24. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **DimAP1**; (A) antes e (B) após purificação. Condições da análise (Material e Métodos): gradiente linear 5-95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 25. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica para o peptídeo **DimAPLin2**; (A) antes e (B) após purificação. Condições da análise (Material e Métodos): gradiente linear 5-95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm.



Fonte: Elaborada pelo autor.

As análises por CLAE das frações puras mostraram que as purificações foram bem-sucedidas, atingindo para todos os peptídeos pureza relativa superior a 90%. A sequência DimLin3 não foi analisada devido ao baixo rendimento no processo de oxidação com iodo, prejudicando seu processo de purificação.

A caracterização dos peptídeos puros foi realizada através de ensaios de espectrometria de massas, como descrito no item Material e Métodos. Os valores de

massa molecular obtidos no modo electrospray positivo [ES m/z: (M + H)⁺], estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Massa molecular obtidas para os peptídeos diméricos

Peptídeo	Massa Molecular calculada (g.mol ⁻¹)	ES+	ES m/z (g.mol ⁻¹)	Massa Molecular obtida (g.mol ⁻¹)
DimA ⁷ Lin2	2.332,78	+3	778,1	2.331,28
		+5	467,5	2.332,46
DimLin2	2.392,98	+4	598,9	2.391,57
		+6	399,6	2.391,55
DimAP1	2.332,78	+3	777,9	2.330,68
		+5	467,4	2.331,96
DimAPLin2	2.394,92	+3	799,0	2.393,98
		+4	599,4	2.393,57

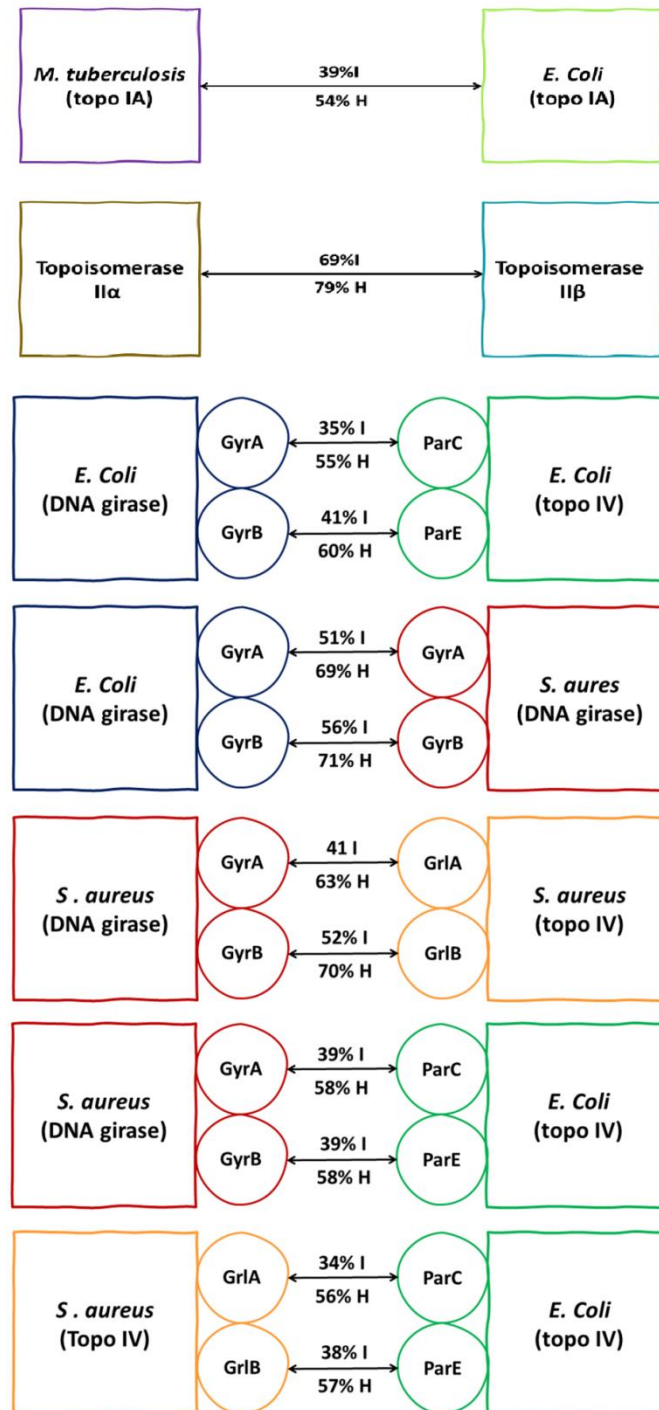
Fonte: Elaborada pelo autor

4.4 Determinação da homologia entre as topoisomerases

A sequência de aminoácidos é responsável pela estrutura tridimensional da proteína, que por sua vez é a determinante para a função específica da mesma. Embora possa ocorrer variações na sequência de aminoácidos sem gerar nenhum efeito negativo (estima-se que 20 a 30% das proteínas humanas são polimórficas), a maioria das proteínas contém regiões altamente conservadas que são determinantes para a manutenção de sua função (NELSON; COX, 2018). Variações em regiões funcionais ou catalíticas, influenciam diretamente a capacidade de interação entre compostos e obter informações relativas a essas regiões possibilita um melhor entendimento sobre os diferentes padrões de inibição apresentados. Por isso foi feita a comparação das sequências de todas as subunidades das diferentes topoisomerases, descritas como homólogas pela literatura, e os resultados estão apresentados na Figura 26. Além disso, baseando-se em estruturas já conhecidas e por meio de técnicas de computacionais é possível inferir sobre estruturas de

proteínas a partir de sua sequência (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019).

Figura 26. Porcentagem de identidade e homologia entre as topoisomerases.



Fonte: Elaborada pelo autor

4.5 Ensaios de inibição enzimática

4.5.1 Inibição da atividade das topoisomerases tipo II bacterianas

Os peptídeos sintetizados e purificados foram testados quanto a suas capacidades inibitórias sobre a atividade de duas diferentes topoisomerases do tipo II bacteriana, DNA girase e topoisomerase IV.

Inicialmente foi proposta a avaliação da inibição da atividade da DNA girase de *Escherichia coli* e de *Staphylococcus aureus*, pelas sequências peptídicas diméricas DimA⁷Lin2, DimLin2, DimAP1 e DimAPLin2. A sequência DimLin3 não foi testada devido a baixo rendimento obtido no processo de oxidação com iodo e posteriormente na sua purificação, resultando em quantidade insuficiente para os testes. Deste modo, a influência da presença de carga na extremidade C-terminal, na atividade inibitória sobre as topoisomerases não pôde ser estudada.

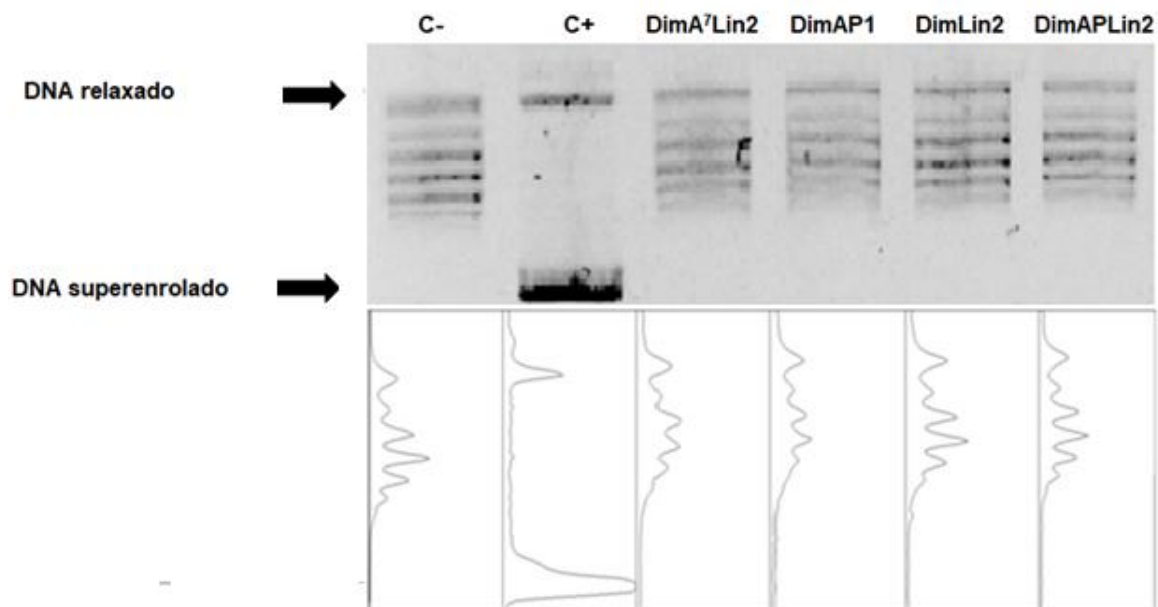
A DNA girase é uma topoisomerase do tipo II que introduz superenrolamento negativo em um DNA circular fechado, gerando uma molécula mais compacta, que migra mais rapidamente em relação ao DNA relaxado durante a corrida em gel de agarose, permitindo deste modo concluir acerca da atividade da enzima na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

As Figuras 27 e 28 mostram a eletroforese em gel com a respectiva densitometria obtida pelo software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>), para a triagem inicial dos peptídeos, na concentração de 100 µmol.L⁻¹.

Nesta concentração, todos os peptídeos diméricos foram capazes de inibir a atividade da DNA girase de *E. coli*. Por outro lado, para a DNA girase de *S. aureus*, somente os peptídeos contendo duas ligações dissulfeto foram capazes de inibir completamente a atividade desta enzima na concentração do teste.

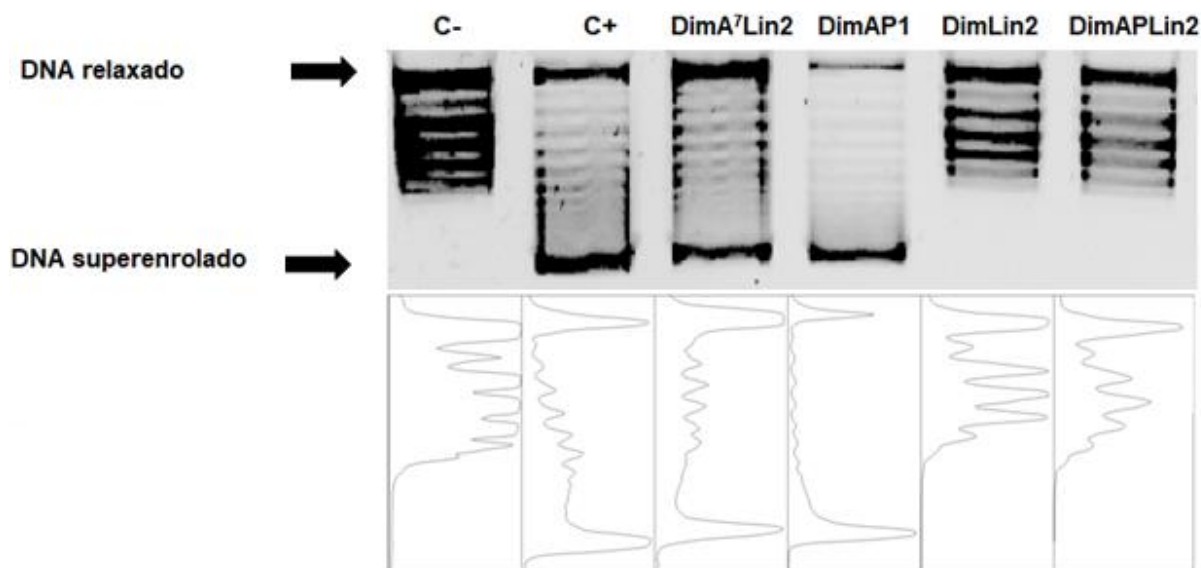
Os peptídeos selecionados nas reações de triagem como inibidores da DNA girase de *Escherichia coli* (DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2) e da DNA girase de *Staphylococcus aureus* (DimLin2 e DimAPLin2) foram então submetidos aos ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (Figuras 29 e 30).

Figura 27. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de 100 μmol.L⁻¹, sobre a inibição da atividade da **DNA girase de *E. coli***. C-: controle negativo (plasmídeo relaxado); C+: controle positivo (plasmídeo relaxado + 1U de DNA girase).



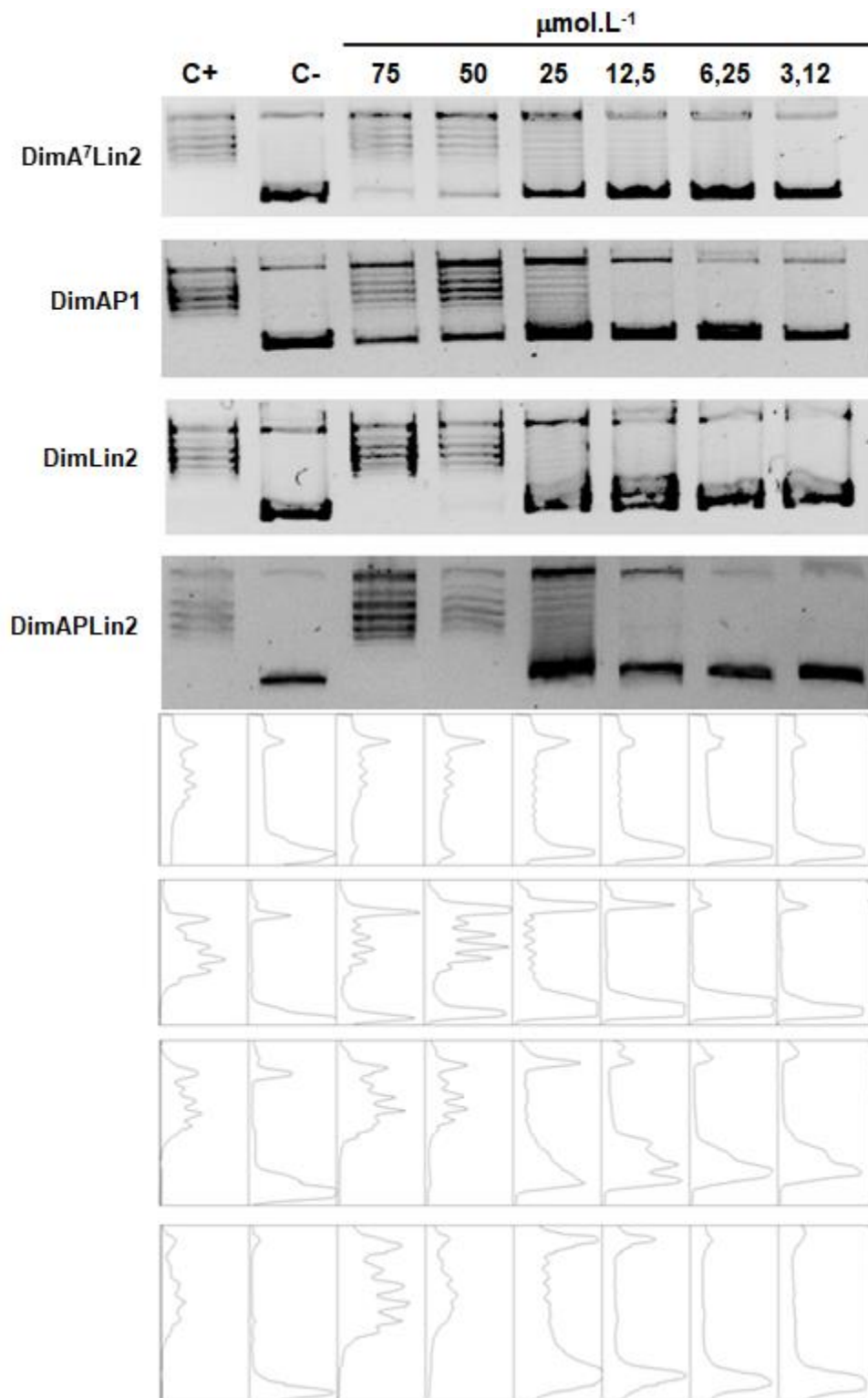
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 28. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2 na concentração de 100 μmol.L⁻¹ sobre a inibição da atividade da **DNA girase de *S. aureus***. C-: controle negativo (plasmídeo relaxado); C+: controle positivo (plasmídeo relaxado + 1U de DNA girase).



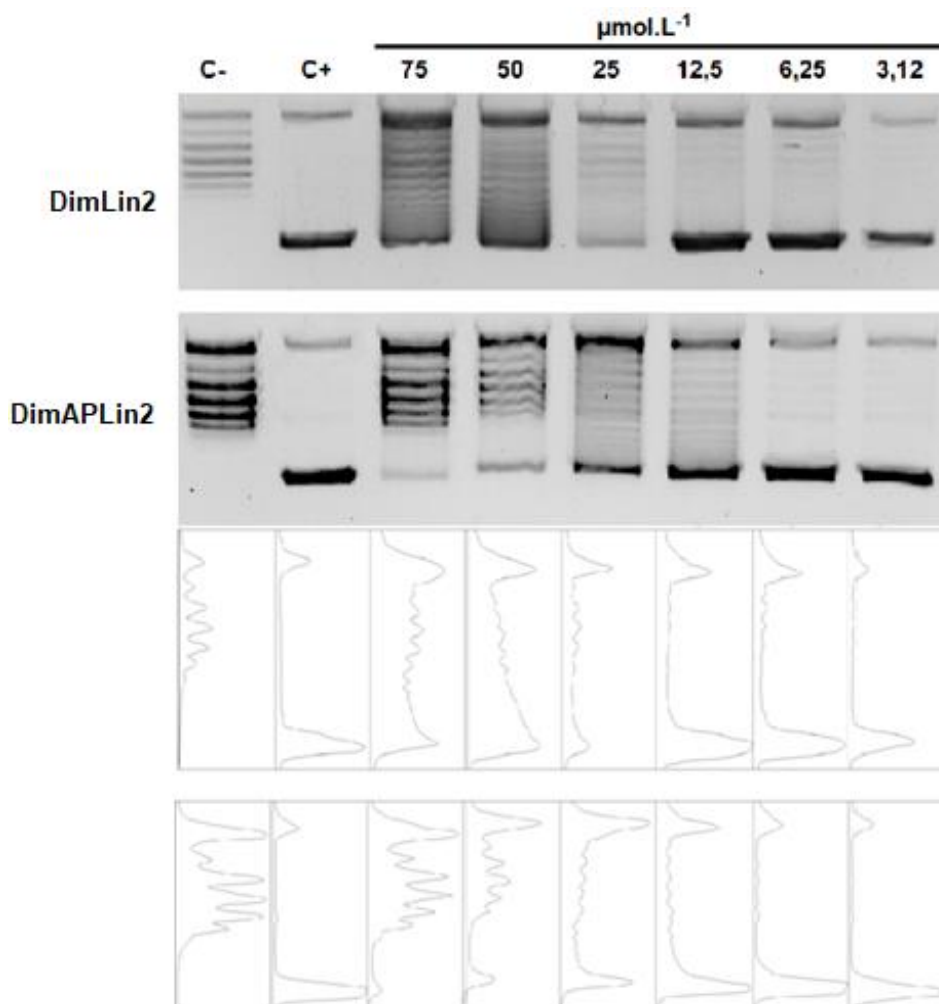
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 29. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos dímeros DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da **DNA girase de E. coli**. C-: controle negativo (plasmídeo relaxado); C+: controle positivo (plasmídeo relaxado + 1U de DNA girase). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração de cada peptídeo em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 30. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos dímeros DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da **DNA girase de *S. aureus***. C-: controle negativo (plasmídeo relaxado); C+: controle positivo (plasmídeo relaxado + 1U de DNA girase). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração de cada peptídeo em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na Figura 29 pode-se observar que os peptídeos DimLin2 e DimAPLin2, caracterizados por possuírem duas ligações dissulfeto intermoleculares foram os que apresentaram maior inibição da atividade da DNA girase de *E. coli*, com valor de IC_{100} de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, independentemente de as ligações serem paralelas ou antiparalelas. Por outro lado, os peptídeos com apenas uma ligação dissulfeto, DimA⁷Lin2 e DimAP1, apresentaram apenas inibições parciais a 75 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com maior eficiência atribuída ao dímero paralelo. Os dímeros foram mais eficientes na inibição da DNA girase comparado ao monômero de origem, que não apresentou inibição da atividade desta enzima (ROCHA, 2018).

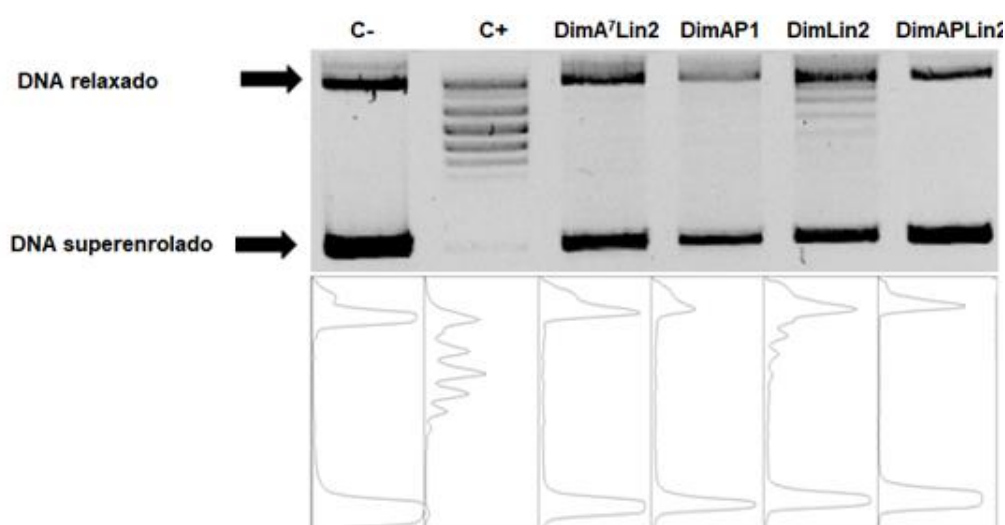
Semelhantemente à DNA girase de *E. coli*, os peptídeos DimLin2 e DimAPLin2 inibiram a DNA girase de *S. aureus*, porém, com menor eficiência inibitória, com valores acima de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 30).

As pequenas diferenças nos valores de inibição observados para as enzimas DNA girase de *E. coli* e *S. aureus* podem estar relacionadas ao grau de identidade entre as subunidades GyrA (39%) e GyrB (55%) de ambos os microrganismos (FERRERO *et al.*, 1994).

Ensaio de inibição da atividade da topoisomerase IV (Topo IV) de *E. coli* e *S. aureus* também foram realizados. 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 de *E. coli* e *S. aureus*, também foi realizada na presença dos peptídeos e submetidos à eletroforese em gel.

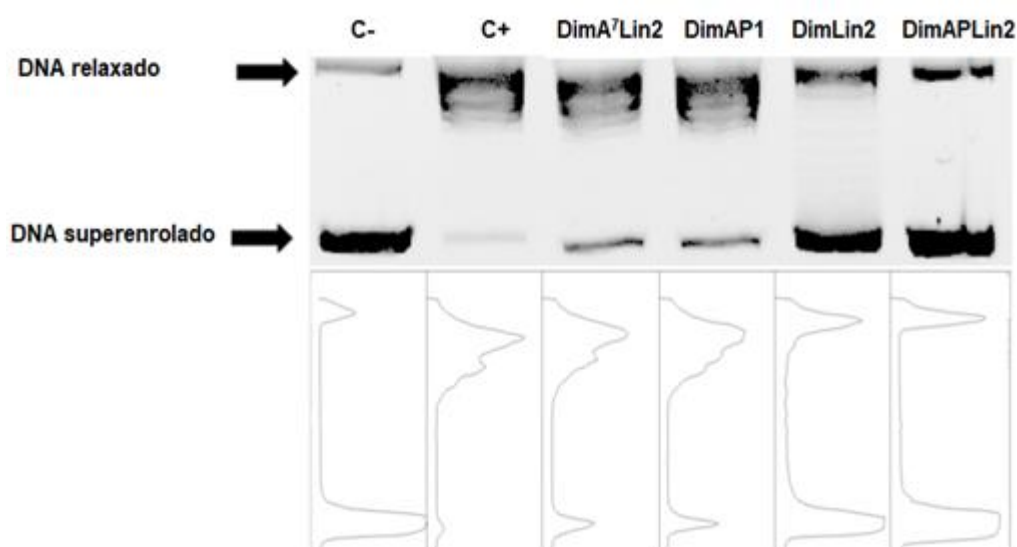
Assim como os resultados obtidos com a DNA girase, todos os peptídeos promoveram a inibição da Topo IV de *E. coli*, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ enquanto a Topo IV de *S. aureus*, somente os peptídeos contendo duas ligações dissulfeto foram capazes de inibir completamente a atividade desta enzima a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figuras 31 e 32).

Figura 31. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, 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).



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 32. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de 100 μmol.L⁻¹, sobre a inibição da atividade da **Topo IV de S. aureus**. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de Topo IV).



Fonte: Elaborada pelo autor

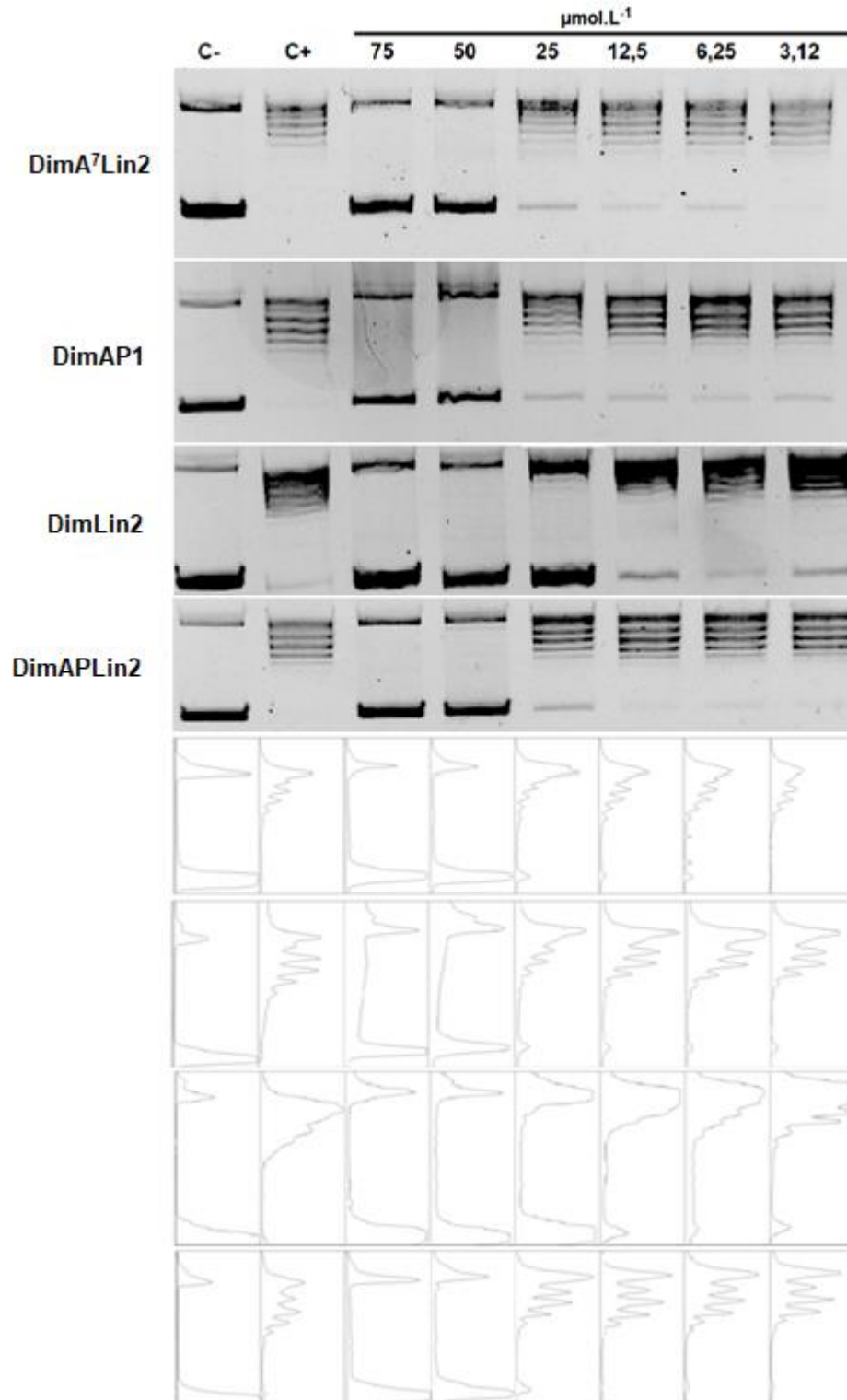
Peptídeos foram selecionados das reações de triagem como inibidores da Topo IV de *E. coli* (DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2) e de *S. aureus* (DimLin2 e DimAPLin2) e submetidos aos ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (Figuras 33 e 34).

Como pode ser observado na Figura 33, os peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1 e DimAPLin2 inibiram de forma semelhante a Topo IV de *E. coli* ($IC_{100} = 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) enquanto o peptídeo DimLin2 foi o melhor inibidor ($IC_{100} = 25 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Para a Topo IV de *S. aureus*, destaque para o peptídeo com dupla ligação dissulfeto antiparalela DimAPLin2 que, da mesma forma que para DNA girase, apresentou o melhor potencial de inibição, porém com valores de IC_{100} bem inferiores (Figura 34).

Comparativamente ao monômero WRWYCRCK, que apresentou uma inibição acima de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (ROCHA, 2018), as respectivas formas diméricas, sempre foram mais eficientes na inibição da atividade da Topo IV.

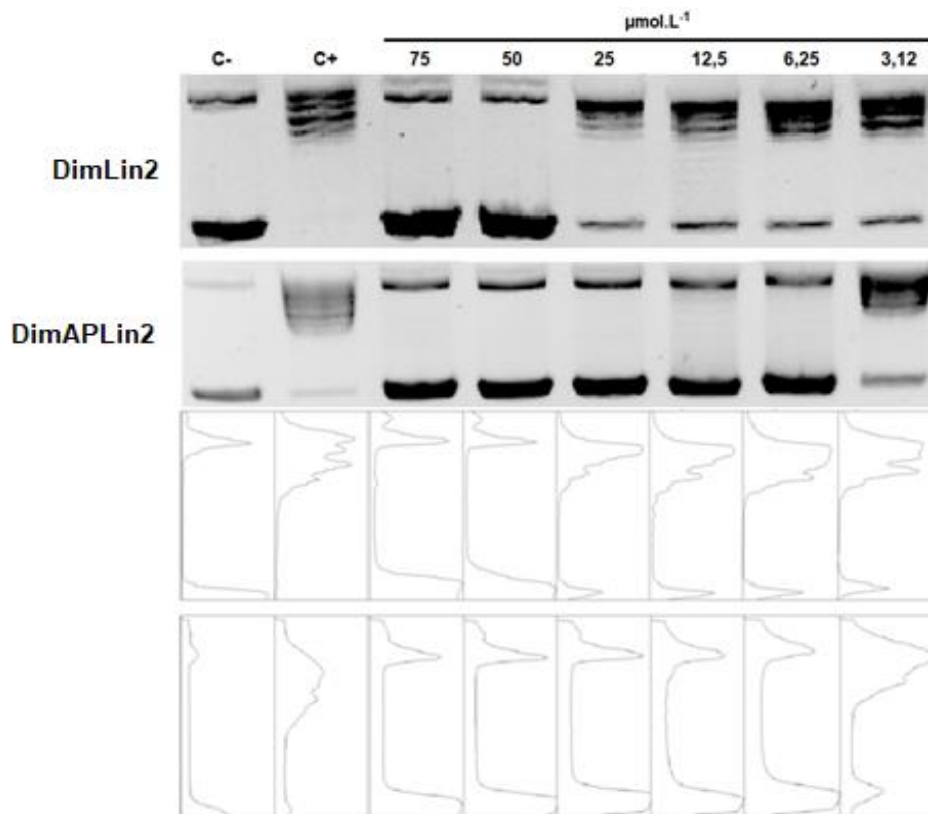
A diferença de inibição apresentada entre as enzimas Topo IV de *E. coli* e *S. aureus* pode ser explicada pela baixa porcentagem de identidade encontradas em ambas enzimas, com 38% de identidade nas subunidades ParE e GrIB e apenas 34% nas subunidades ParC e GrIA, respectivamente (Figura 26).

Figura 33. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos dímeros DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da **Topo IV de *E. coli***. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de Topo IV). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração de cada peptídeo em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 34. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos dímeros DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da **Topo IV de *S. aureus***. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de Topo IV). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração de cada peptídeo em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor

De acordo com os resultados, os peptídeos formados por apenas uma ligação dissulfeto, apresentaram uma maior atividade inibitória sobre a Topo IV da bactéria *E. coli*, independentemente do tipo, paralela ou antiparalela. Diferentemente, peptídeos com duas ligações dissulfeto foram os mais eficientes na inibição da enzima de *S. aureus*, com destaque para o peptídeo contendo as ligações antiparalelas, que inibiu parcialmente a atividade da enzima, a uma concentração de $3,12 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Tal fato pode estar relacionado a diferenças sequenciais de aminoácidos entre ambas as enzimas testadas, visto que as subunidades GrIA e GrIB (Topo IV de *S. aureus*) compartilham apenas 30% de identidade com as respectivas subunidades ParC e ParE da Topo IV de *E. coli* (FERRERO *et al.*, 1994).

Os valores de IC₁₀₀ para cada um dos peptídeos testados para as reações de superenrolamento e relaxamento das enzimas girase e Topo IV, respectivamente, de dois microrganismos diferentes, estão detalhados na Tabela 6.

Tabela 6. Comparação da atividade inibitória de derivados dos peptídeos em topoisomerases bacterianas.

Peptídeos	IC ₁₀₀ (μmol.L ⁻¹) ^a			
	DNA girase		Topo IV	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
DimA ⁷ Lin2	>75	Não inibe	50	>100
DimAP1	>75	Não inibe	50	>100
DimLin2	50	>75	25	>25
DimAPLin2	50	>50	50	>3,12

^a Concentração do inibidor requerida para a completa inibição da atividade da topoisomerase;

Fonte: Elaborada pelo autor

4.5.2 Topoisomerases II α e β humanas

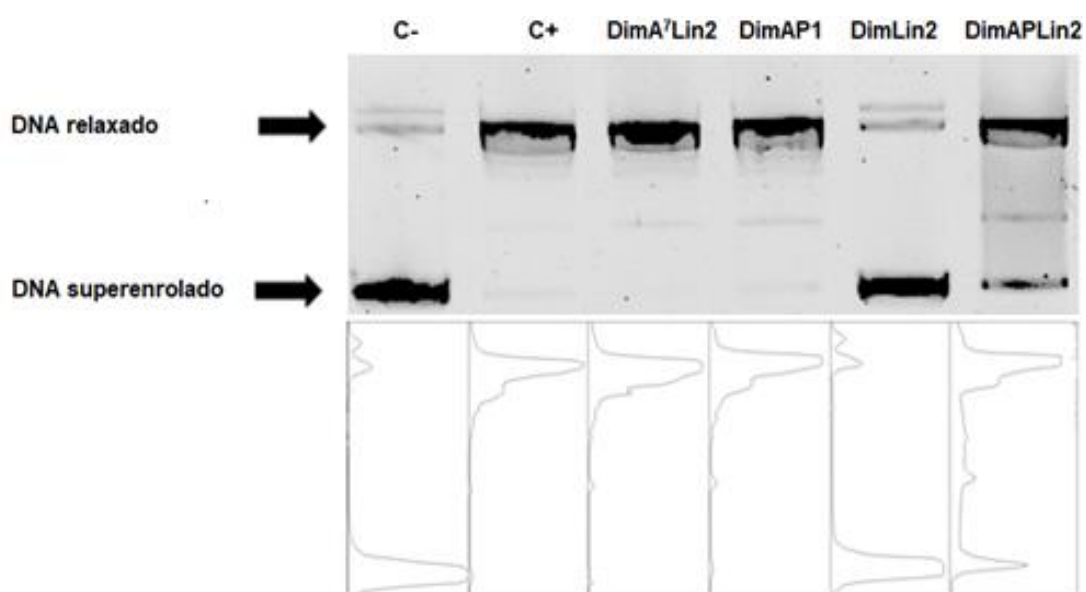
Embora relativamente diversas, a nível molecular, as topoisomerases tipo II bacterianas (DNA girase e Topo IV) e a topoisomerase II humana (Topo II) demonstram homologia estrutural e funcional suficiente, que é a base molecular para o modo conservado de interação entre a enzima e o DNA.

A exemplo das topoisomerases tipo II bacterianas, importantes alvos terapêuticos para antibióticos naturais e sintéticos, a Topo II humana também é alvo de vários fármacos, utilizados na terapia antitumoral (TOPCU, 2001). Duas isoformas de Topo II (α e β) foram descritas em células humanas, diferindo na sua localização subcelular, propriedades bioquímicas e susceptibilidade à inibição por fármacos anticâncer (SANDRI *et al.*, 1996).

Estudos *in vitro* de *binding* (ligação fármaco-enzima) revelaram um domínio comum de interação entre as topoisomerases II humana e os agentes antineoplásicos e antimicrobianos (ELSEA *et al.*, 1997). Desta forma, o efeito dos peptídeos na reação de relaxamento do DNA catalisado pelas duas isoformas da Topo II humana (α e β) também foi avaliado por ensaios de eletroforese em gel.

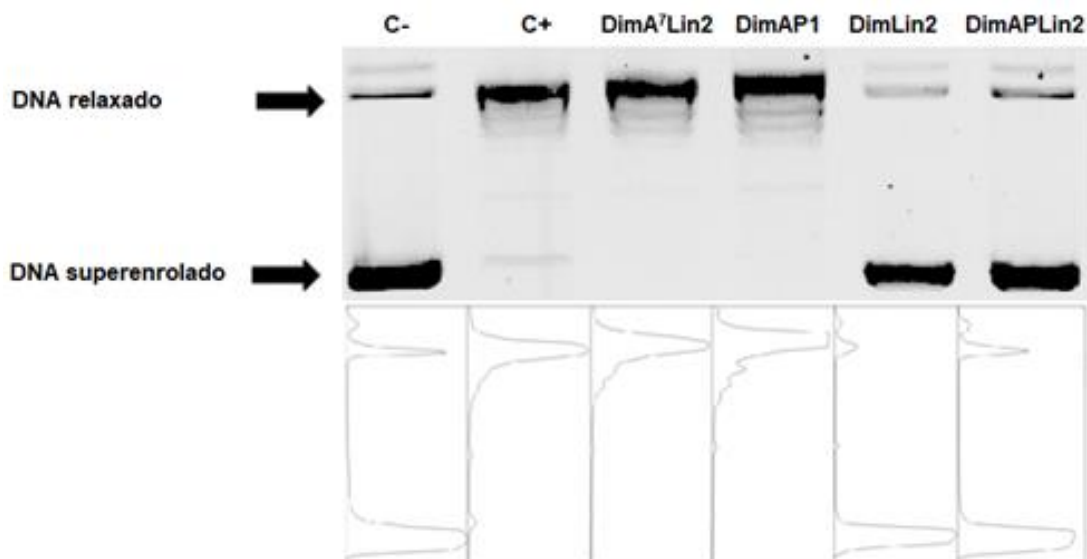
Dentre os peptídeos submetidos ao ensaio de triagem, todos na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, somente os peptídeos contendo duas ligações dissulfeto foram capazes de inibir a atividade da Topo II humana, sendo que ambos inibiram completamente a isoforma β . Os demais peptídeos não inibiram ou inibiram apenas parcialmente as enzimas, na concentração inicial do teste (Figuras 35 e 36).

Figura 35. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da **topoisomerase II α humana**. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de Topo II α).



Fonte. Elaborada pelo autor.

Figura 36. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de 100 μmol.L⁻¹, sobre a inibição da atividade **da topoisomerase IIβ humana**. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de Topo IIβ).



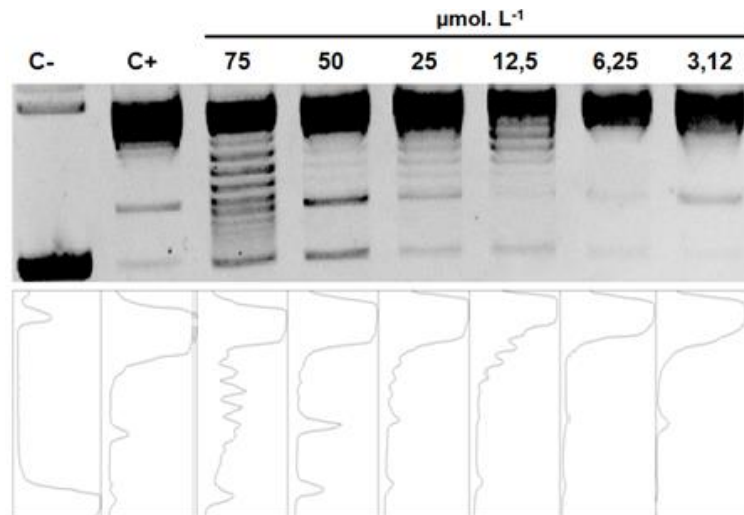
Fonte. Elaborada pelo autor.

Na determinação da concentração inibitória mínima, foram utilizados os peptídeos DimLin2 para as duas isoformas (100% de inibição) e DimAPLin2 para a isoforma β (100% inibição).

Na análise das Figuras 37 e 38, é possível observar que DimLin2, é melhor inibidor da Topo IIα e DimAPLin2 da Topo IIβ já que apresentaram valores de IC₁₀₀ invertidos para as diferentes isoformas da enzima (Tabela 7).

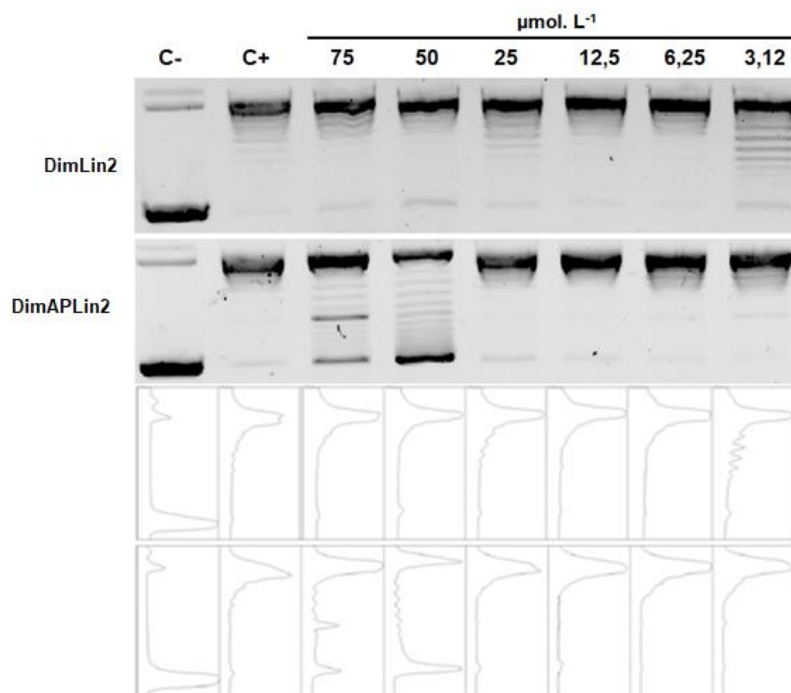
A susceptibilidade da Topo II humana apenas aos peptídeos com duas ligações dissulfeto sugere que ambos os resíduos de cisteína e suas ligações dissulfeto paralelas e antiparalelas são fundamentais para a interação e inibição enzimática. Em adição, os valores invertidos de IC₁₀₀ obtidos para as duas isoformas da enzima podem estar relacionados ao fato de as topoisomerasas humanas IIα e IIβ serem apenas 68% idênticas entre si e compartilharem cerca de 78% de identidade entre suas porções catalíticas (WENDORFF *et al.*, 2012).

Figura 37. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do peptídeo DimLin2 sobre a atividade da **topoisomerase II α humana**. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de Topo II). Os números indicados em cada aplicação no gel representam a concentração dos respectivos peptídeos em $\mu\text{mol. L}^{-1}$.



Fonte. Elaborada pelo autor.

Figura 38. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da **topoisomerase II β humana**. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de topo II β). Os números indicados em cada aplicação no gel representam a concentração dos respectivos peptídeos em $\mu\text{mol. L}^{-1}$.



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 7. Comparação da atividade inibitória dos peptídeos diméricos em topoisomerases II humanas.

Peptídeos	IC ₁₀₀ (μmol L ⁻¹) ^a	
	Topoisomerase II humana	
	α	β
DimA ⁷ Lin2	Não inibe	Não inibe
DimAP1	Não inibe	Não inibe
DimLin2	>75	>100
DimAPLin2	>100	>75

^a Concentração do inibidor requerida para a completa inibição da atividade da topoisomerase;

Fonte: Elaborada pelo autor

4.5.3 Inibição da atividade das topoisomerases tipo I

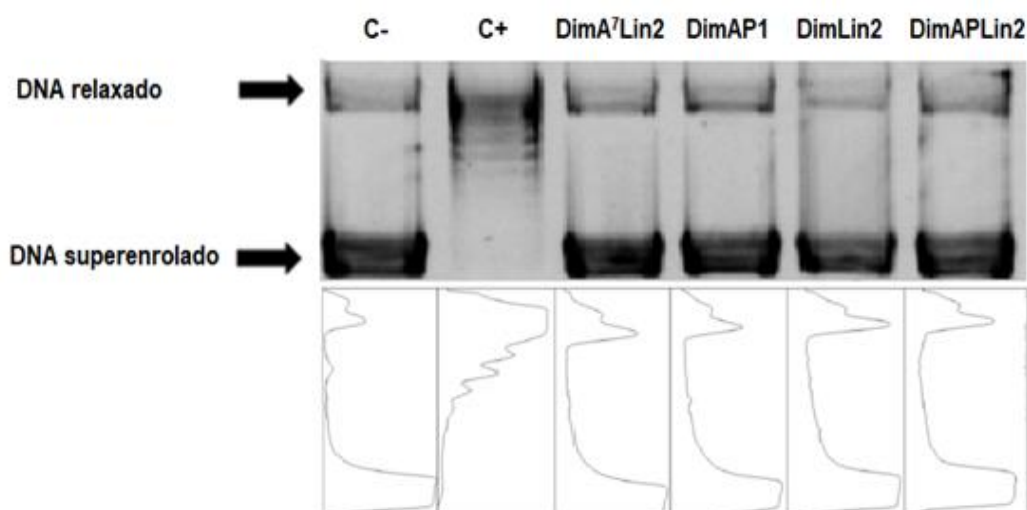
4.5.3.1 Topoisomerase IB humana

A enzima topoisomerase IB humana (hTopoIB) é alvo de diversos fármacos utilizados na quimioterapia do câncer, tais como a camptotecina e seus derivados. A busca por novos agentes antitumorais tais como inibidores de topoisomerases humanas, representa um campo bastante interessante a ser explorado (POMMIER *et al.*, 2010). Nesse contexto, sendo o peptídeo WRWYCRCK descrito como inibidor da topoisomerase IB de *vaccinia* vírus (vvTopoIB) (FUJIMOTO; PINILLA; SEGALL, 2006), enzima que compartilha de propriedades mecânicas e estruturais com a hTopoIB (BAKER; RAJAN; MONDRAGÓN, 2009), decidiu-se por realizar ensaios de avaliação do potencial inibitório da hTopoIB pelos peptídeos diméricos obtidos.

Como pode ser observado na Figura 39, todos peptídeos testados foram capazes de inibir completamente a hTopoIB na concentração inicial de 100 μmol.L⁻¹, o que evidencia a importância dos resíduos de cisteína e as ligações dissulfeto para a atividade de inibição da enzima, resultado que corrobora os resultados obtidos em

estudos semelhantes onde o peptídeo WRWYARAK, no qual os resíduos de cisteína foram substituídos por alanina (A), não apresentou nenhuma atividade inibitória sobre esta enzima e a forma linear WRWYCRCK, apresentou um IC_{100} de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (ROCHA, 2018).

Figura 39. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da **topoisomerase IB humana**. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de hTopoIB).

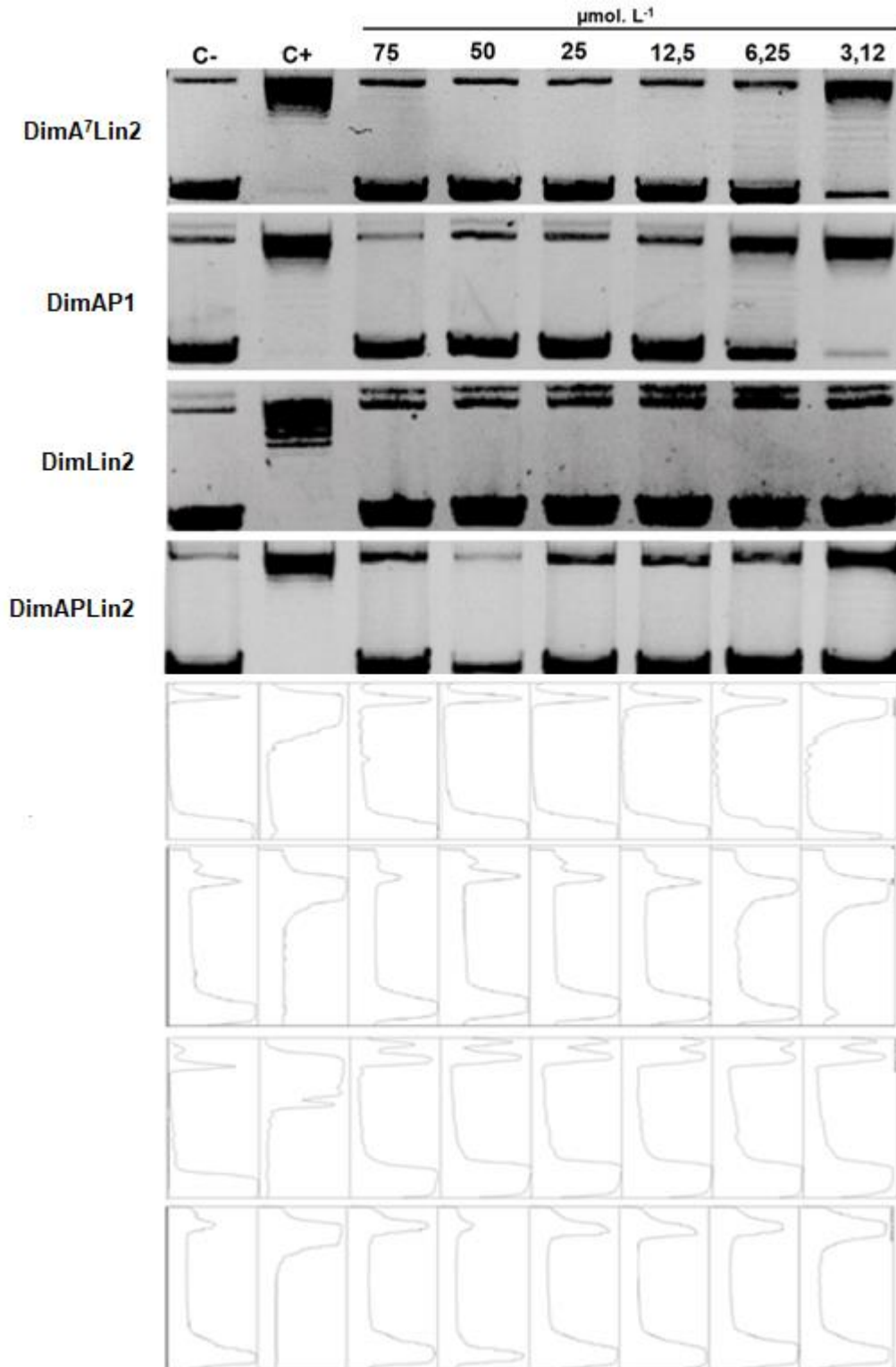


Fonte: Elaborada pelo autor

Os valores de IC_{100} apresentados pelos peptídeos DimA⁷Lin2 e DimAP1 foram bem próximos, sendo DimA⁷Lin2 pouco mais ativo (Figura 40), evidenciando que a posição da única ligação dissulfeto, C⁵-C^{5'} (paralela) ou C⁵-C^{7'} (antiparalela) não exerce influência direta na atividade inibitória sobre a hTopoIB.

Comparativamente, os peptídeos com duas ligações dissulfeto (DimLin2 e DimAPLin2) apresentaram uma maior atividade de inibição da hTopoIB, com valores abaixo de $3,12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Tabela 8), comprovando-se a importância da presença das duas ligações dissulfeto intercadeias no octapeptídeo, para a atividade de inibição enzimática.

Figura 40. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da **topoisomerase IB humana**. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado +1U de hTopoIB). Os números indicados em cada aplicação no gel representam a concentração dos respectivos peptídeos em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 8. Comparação da atividade inibitória dos peptídeos diméricos sobre a topoisomerase IB humana (hTopoIB).

Peptídeos	IC ₁₀₀ (μmol.L ⁻¹) ^a
	Topoisomerase IB humana
DimA ⁷ Lin2	6,25 ^{b*}
DimAP1	6,25 ^{c*}
DimLin2	<3,12
DimAPLin2	<3,12

^a Concentração do inibidor requerida para a completa inibição da atividade da topoisomerase;

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

^{b*} 32% de inibição da hTopoIB na concentração de 6,25 μmol.L⁻¹.

^{c*} 19% de inibição da hTopoIB na concentração de 6,25 μmol.L⁻¹.

Fonte: Elaborada pelo autor

Essa elevada capacidade na inibição da hTopoIB, pode indicar um possível uso das estruturas dimerizadas do peptídeo WRWYCRCK em uma terapia direcionada ao hospedeiro e eficaz contra infecção grave por SARS-CoV-2. Estudos recentes realizados com modelos animais, demonstraram que inibidores sintéticos de Topo I, tal como Topotecan, um derivado da camptotecina, suprime a inflamação induzida por infecção, reduzindo a morbidade e resgatando a mortalidade resultante da Covid-19 (YUIN *et al.*, 2020). O mecanismo de ação decorre da necessidade de resolução de problemas topológicos resultantes da atividade da RNA polimerase para ativação de genes longos (>100 kb), responsáveis pela expressão de proteínas pró-inflamatórias (RIALDI *et al.*, 2016).

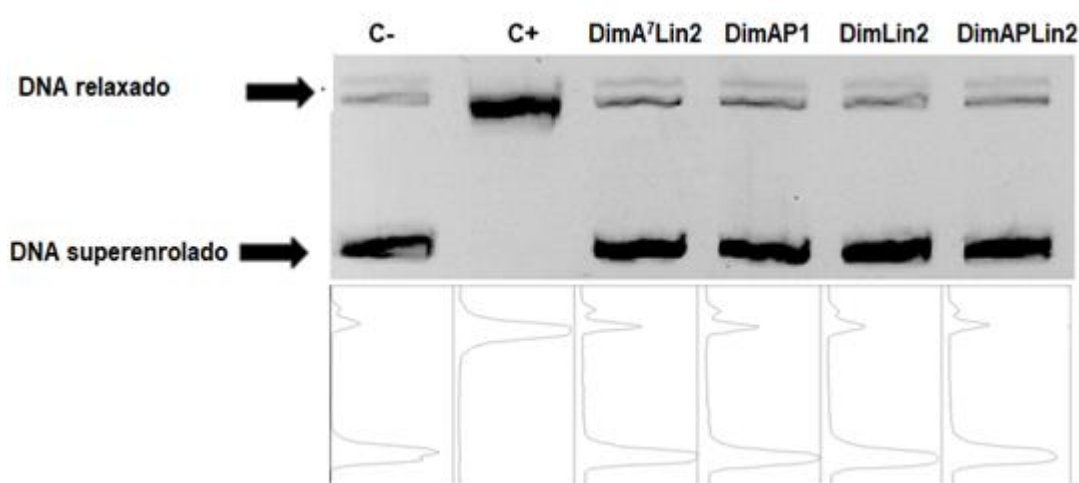
4.5.3.2 Topoisomerase IA bacteriana

As topoisomerasas 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 sendo, a reação de relaxamento do DNA superenrolado catalisada pela topoisomerase IA de *E. coli* e *M. tuberculosis* 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, na inibição da atividade da enzima de *E. coli* (Figura 41).

Figura 41. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da **topoisomerase IA de *E. coli***. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de TopoIA).

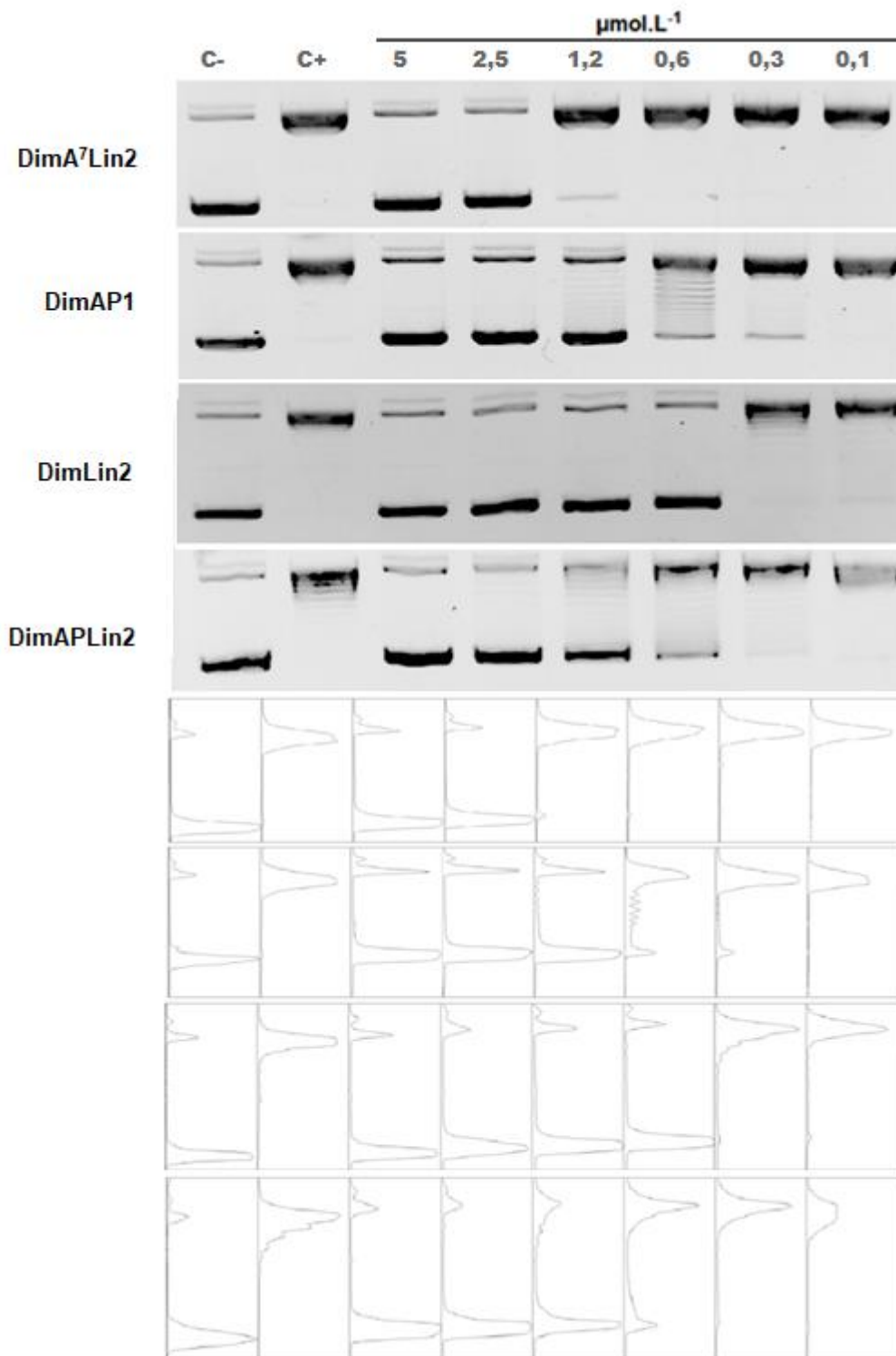


Fonte: Elaborada pelo autor

Todos peptídeos apresentaram o mesmo padrão de inibição da atividade da Topo IA de *E. coli*, na concentração inicial de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, como pode ser observado pelas bandas atribuídas aos respectivos topoisômeros.

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, DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, foram testados no intervalo de concentração desde 75 a 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, para Topo IA de *E. coli* (Figura 42).

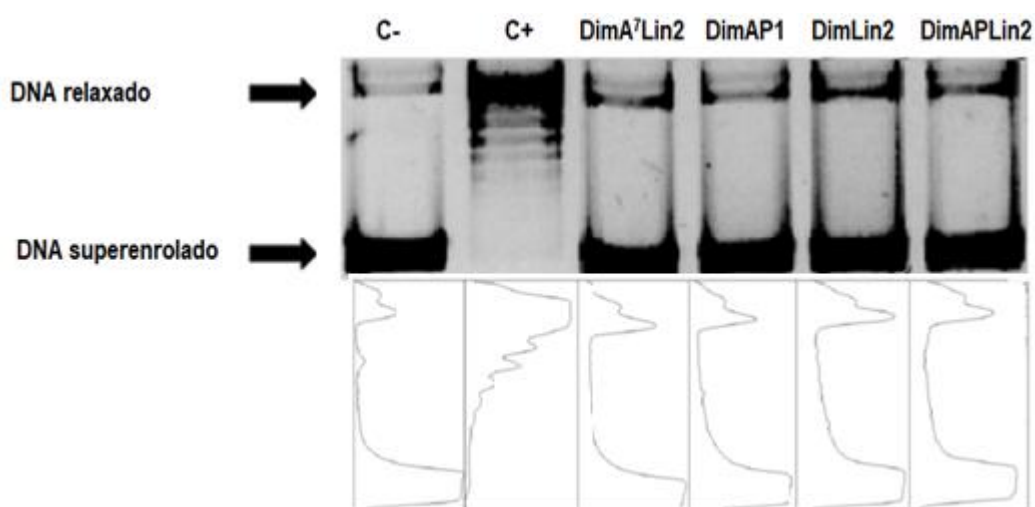
Figura 42. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da **topoisomerase IA de *E. coli***. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado +1U de Topo IA). Os números indicados em cada aplicação no gel representam a concentração dos respectivos peptídeos em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor

A exemplo da enzima de *E. coli*, uma triagem inicial utilizando a concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para cada um dos peptídeos, também foi realizada para a enzima de *M. tuberculosis* e, igualmente, os peptídeos apresentaram o mesmo padrão de inibição da atividade da Topo IA de *E. coli*, ou seja, inibição total nesta concentração (Figura 43).

Figura 43. Eletroforese em gel e densitometria óptica do gel, para triagem inicial da ação dos peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da **topoisomerase IA de *M. tuberculosis***. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado + 1U de Topo IA).



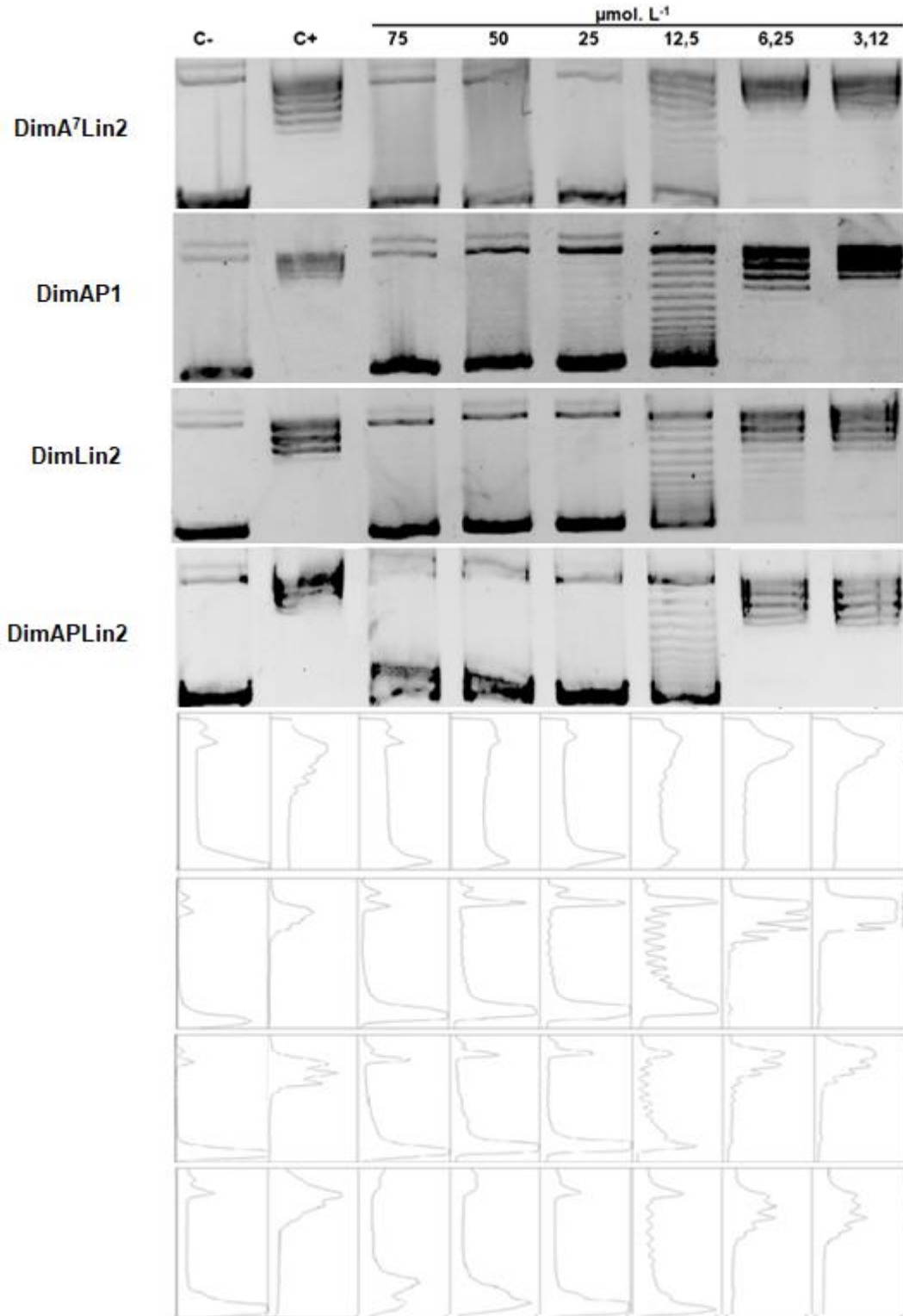
Fonte: Elaborada pelo autor

Assim, a determinação da concentração mínima inibitória (CIM) dos peptídeos também foi realizada para a enzima de *M. tuberculosis*, porém no intervalo de concentração de 75 a $3,12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 44).

Comparativamente, a capacidade inibitória dos diferentes peptídeos frente a enzima deste gênero de bactéria foi inferior, o que pode ser atribuído à baixa porcentagem de identidade (apenas 39%) entre as duas topoisomerases.

Considerando-se o fato de que o octapeptídeo WRWYCRCK, possivelmente na sua forma dimerizada, ter sido descrito como o mais potente inibidor das topoisomerases IB e IA bacteriana (FUJIMOTO; PINILLA; SEGALL, 2006), os resultados obtidos para a ação dos análogos peptídicos sintéticos dimerizados sobre a Topo IA de *E. coli* e *M. tuberculosis* corroboram o descrito por estes autores.

Figura 44. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos peptídeos DimA⁷Lin2, DimAP1, DimLin2 e DimAPLin2 sobre a atividade da **topoisomerase IA de *M. tuberculosis***. C-: controle negativo (plasmídeo superenrolado); C+: controle positivo (plasmídeo superenrolado +1U de Topo IA). Os números indicados em cada aplicação no gel representam a concentração dos respectivos peptídeos em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborada pelo autor

Como pode ser avaliado nas Figuras 42 e 44, os peptídeos apresentaram melhor eficiência inibitória sobre a topoisomerase IA de *E. coli*, e com destaque para aqueles contendo duas ligações dissulfeto. De fato, os valores de IC₁₀₀, obtidos por análise dos picos dos respectivos géis de agarose apresentados nas Figuras 42 e 44, e detalhados na Tabela 9, mostram que os dímeros DimLin2 e DimAPLin2 foram os mais eficientes. Comparativamente, a atividade inibitória dos dímeros frente a Topo IA de *E. coli*, foi de cerca de 10 vezes maior que a sua forma monomérica (ROCHA, 2018).

Apesar da menor eficiência, é importante destacar a capacidade de inibição dos peptídeos diméricos frente a topoisomerase de *M. tuberculosis*, cujos valores de IC₁₀₀ (>12,5 µmol.L⁻¹ ou >30 µg.mL⁻¹) são próximos àqueles obtidos para os fármacos utilizados atualmente na terapia antituberculose e poderia ser uma alternativa nos casos de cepas multirresistentes.

Tabela 9. Comparação da atividade inibitória dos peptídeos diméricos sobre a topoisomerase IA bacteriana.

Peptídeos	IC ₁₀₀ (µmol.L ⁻¹) ^a	
	Topiosomerase IA bacteriana	
	<i>E. coli</i>	<i>M. tuberculosis</i>
DimA ⁷ Lin2	2,5	>12,5 ^{d*}
DimAP1	>0,6 ^{b*}	12,5
DimLin2	0,6	>12,5 ^{e*}
DimAPLin2	>0,6 ^{c*}	>12,5 ^{f*}

^a Concentração do inibidor requerida para a completa inibição da atividade da topoisomerase
* inibição estimada pelo software AlphaView (AlphaMager®EP).

^{b*} 13% de inibição da Topo IA de *E. coli* na concentração de 0,6 µmol.L⁻¹.

^{c*} 22% de inibição da Topo IA de *E. coli* na concentração de 0,6 µmol.L⁻¹.

^{d*} 30% de inibição da Topo IA de *M. tuberculosis* na concentração de 12,5 µmol.L⁻¹.

^{e*} 40% de inibição da Topo IA de *M. tuberculosis* na concentração de 12,5 µmol.L⁻¹.

^{f*} 50% de inibição da Topo IA de *M. tuberculosis* na concentração de 12,5 µmol.L⁻¹.

Fonte: Elaborada pelo autor

Após análise global dos resultados de ensaios enzimáticos, pode-se inferir que a presença de duas ligações dissulfeto parece favorecer a atividade inibitória do

octapeptídeo WRWYCRCK, independentemente do tipo de topoisomerase e da sua origem.

Os peptídeos diméricos DimLin2 e DimAPLin2, que possuem duas ligações dissulfeto específicas e direcionadas, foram mais efetivos na inibição das topoisomerases quando comparado com aqueles contendo apenas uma ligação dissulfeto (DimA⁷Lin2 e DimAP1). Provavelmente, a maior rigidez estrutural dos dímeros contendo duas ligações dissulfeto deve favorecer a inibição das diferentes topoisomerases envolvendo a formação de um complexo peptídeo-enzima mais estável e com menor mobilidade rotacional.

Comparativamente, o dímero antiparalelo DimAPLin2 mostrou ser muito mais efetivo na inibição da Topo IV que o dímero paralelo DimLin2, com valores expressivos para a Topo IV de *S. aureus*.

4.6 Avaliação antimicrobiana

O hexapeptídeo WRWYCR e seu análogo D-estereoisômero (wrwycr) são descritos na literatura como bons agentes bactericidas. Tais compostos possuem um largo espectro de ação, sendo considerados peptídeos antimicrobianos catiônicos. Ressalta-se que a formação de homodímeros via ligação dissulfeto entre dois hexapeptídeos é crucial para a atividade *in vitro* (BOLDT, PINILLA; SEGALL, 2004; KLEMM *et al.*, 2000), bem como para uma potente atividade antibacteriana.

Nesse contexto, para o octapeptídeo WRWYCRCK, cuja sequência WRWYCR está inserida, foram preparados dímeros direcionados os quais foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pela análise do crescimento dos microrganismos, *Escherichia coli* (ATCC 43895), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Candida albicans* (ATCC 90028), em teste de microdiluição em 96 poços, sendo considerado como valor de CIM, a menor concentração capaz de inibir ao menos 90% no crescimento das cepas, no período de 24 horas para as bactérias e 48 horas para a levedura. Todos os resultados obtidos de CIM foram corroborados pelo teste de resazurina, e os dados se encontram na Tabela 10.

Com base nos resultados de CIM obtidos, observou-se que a oxidação de um ou dois resíduos de cisteína, constituindo uma ou duas ligações dissulfeto, parece afetar de modo diferenciado o crescimento dos microrganismos testados. Dentre os

peptídeos estudados, DimA⁷Lin2 apresentou os melhores resultados de inibição do crescimento de todos os grupos de microrganismos.

Tabela 10. Atividade antimicrobiana dos peptídeos dimerizados.

Peptídeos	Concentração Inibitória Mínima (CIM)					
	<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	$\mu\text{mol.L}^{-1}$	%	$\mu\text{mol.L}^{-1}$	%	$\mu\text{mol.L}^{-1}$	%
DimA ⁷ Lin2	2,94	98	2,94	97	3,12	98
DimAP1	5,29	96	5,29	98	6,25	97
DimLin2	5,29	93	9,30	96	6,25	97
DimAPLin2	5,29	96	9,30	97	6,25	96

Fonte: Elaborada pelo autor

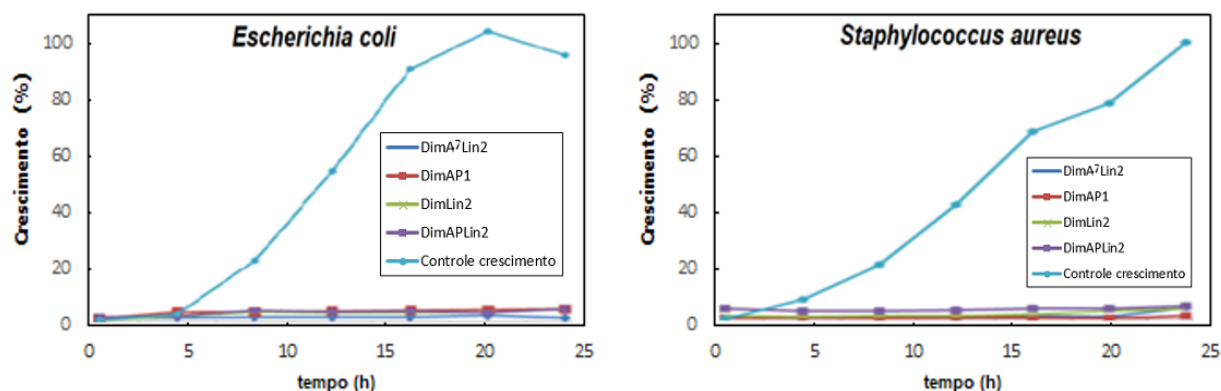
Nos estudos de inibição das topoisomerasas, os peptídeos com duas ligações dissulfeto sempre apresentaram melhor atividade inibitória, incluindo as topoisomerasas humanas, com uma pequena vantagem para o dímero antiparalelo. Nos ensaios de atividade antimicrobiana, apesar de todos apresentarem atividades muito próximas, DimA⁷Lin2 foi o mais efetivo na inibição do crescimento das bactérias testados. Aparentemente, a oxidação da cisteína da posição 5, com a formação da ligação dissulfeto C⁵-C^{5'}, faz com que DimA⁷Lin2 tenha uma maior liberdade rotacional, comparativamente a DimLin2 e DimAPLin2, moléculas mais rígidas, devido a presença de uma outra ligação dissulfeto. Esta característica, somada ao fato de que, no meio intracelular, devido à sua composição e condições de concentração enzimática, distintas do meio de ensaio, reflete em um melhor ajuste da molécula ao seu sítio de ligação na enzima alvo.

Ademais, há de se considerar a permeabilidade da membrana dos microrganismos, que pode favorecer o transporte de moléculas com maior liberdade rotacional, tal como DimA⁷Lin2, comparativamente a DimLin2 e DimAPLin2, moléculas estruturalmente mais rígidas, devido a presença de duas ligações dissulfeto.

Por outro lado, as pequenas diferenças entre as bactérias, com valores menores de CIM para a Gram-negativa, pode estar relacionado à presença de canais de porinas que permitem a passagem de pequenas moléculas tais como peptídeos ou em decorrência da característica catiônica do peptídeo, que promoveria sua interação com a membrana externa da bactéria Gram-negativa, rica em lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídios, deslocando os cátions estabilizadores Ca^{2+} e Mg^{2+} e promovendo a desestabilização do lipopolissacarídeo e a formação de poros na membrana celular e em consequência, um aumento da permeabilização. Em ambos os casos, o resultado é o aumento na concentração do peptídeo no citoplasma (ALFEI; SCHITO, 2020; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

Independentemente do número ou posição das ligações dissulfeto, os peptídeos apresentaram efeito bactericida pois, mesmo em concentrações sub-inibitórias, os peptídeos são capazes de reduzir a população microbiana de *E. coli* e *S. aureus* (Figura 45).

Figura 45. Cinética de morte celular bacteriana.

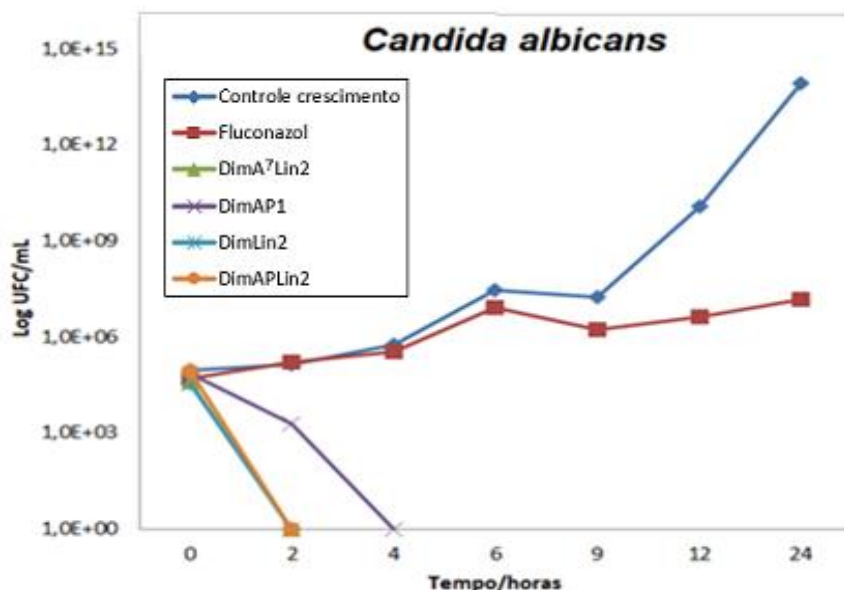


Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação à *C. albicans*, o teste de cinética de morte celular permitiu obter informações importantes referentes ao tempo e atividade antifúngica (Figura 46). De acordo com os resultados obtidos, é possível inferir que as mesmas concentrações inibitórias mínimas determinadas no teste anterior, são fungicidas uma vez que promoveram redução de 99,9% (3 log₁₀) de UFC/mL (ERNST *et al.*, 1999).

Todos os dímeros, com exceção ao dímero antiparalelo com uma ligação dissulfeto (DimAP1), apresentaram inibição total de crescimento em um tempo inferior a duas horas, embora este peptídeo, também tenha sido capaz de promover uma redução significativa neste tempo.

Figura 46. Cinética de morte celular para *C. albicans*.



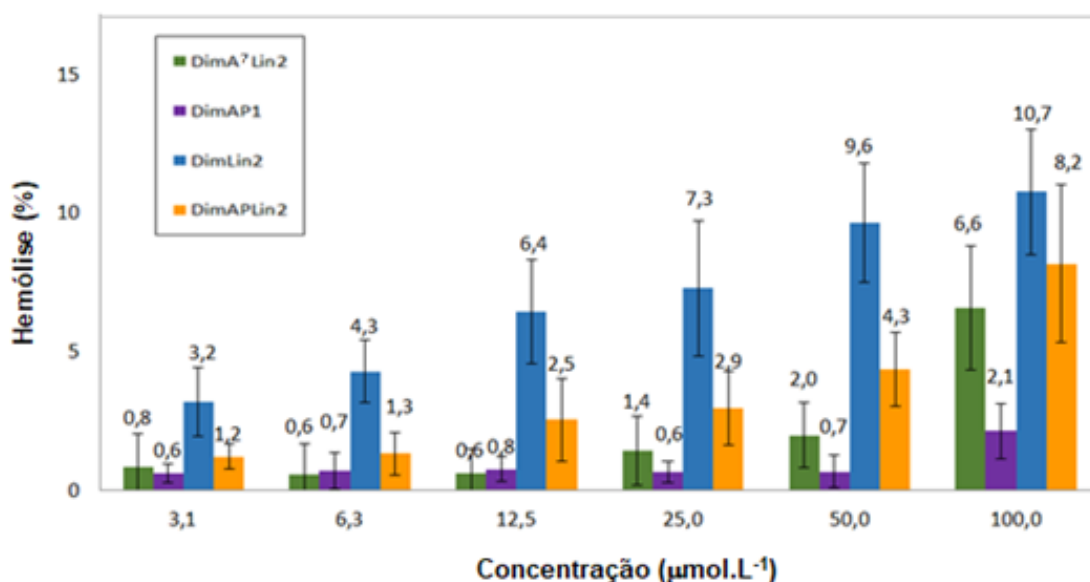
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os peptídeos utilizados apresentaram elevada capacidade bactericida/fungicida para todas as cepas testadas, em destaque os dímeros com apenas uma ligação dissulfeto, que promoveram a inibição em menores concentrações inibitórias. Apesar deste perfil bactericida em inibidores de topoisomerasas, estar relacionado a inibidores do tipo “poison”, típico em bactérias que expressam apenas um tipo de Topoisomerase I, os resultados aqui apresentados somados aos testes de inibição realizados pelo grupo (ROCHA, 2018) corroboram com o mecanismo de ação proposto por ROY e colaboradores (2011), que, por meio de técnicas computacionais, propôs que o octapeptídeo linear, realiza a inibição se ligando ao sítio ativo da enzima, impedindo a clivagem do DNA, e o efeito bactericida e fungicida estaria então relacionado a seu amplo potencial inibitório demonstrado em todas as classes de topoisomerasas do tipo I testadas (ROY *et al.*, 2011; SEDDEK; ANNAMALAI; TSE-DINH, 2021; TSE-DINH, 2009).

4.7 Avaliação da atividade hemolítica

Os resultados apresentados na Figura 47, evidenciam a baixa ou nula capacidade hemolítica de todos os peptídeos ensaiados. Na maior concentração testada, 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, apenas o dímero paralelo DimLin2 apresentou percentual de lise eritrocitária acima de 10% ($11 \pm 2\%$). Por outro lado, o peptídeo correspondente antiparalelo apresentou uma taxa de hemólise de 8%, nesta concentração. Os peptídeos DimA⁷Lin2 e DimAP1, com apenas uma ligação dissulfeto, apresentaram o mesmo comportamento, maior atividade hemolítica para o dímero paralelo (6,6% para DimA⁷Lin2 e 2,1% para DimAP1).

Figura 47. Determinação da atividade hemolítica dos peptídeos diméricos



Fonte: Elaborada pelo Autor.

O comportamento do peptídeo DimAP1 neste experimento chama a atenção pela diferença de potencial hemolítico em relação aos demais dímeros, em especial DimA⁷Lin2, cuja sequência e estrutura são bem semelhantes. Tal fato pode estar relacionado a uma interação de modo diferenciado entre o peptídeo DimAP1 e a bicamada lipídica ou outros componentes da membrana eritrocitária, tais como proteínas e glicoproteínas. A presença de apenas uma ligação dissulfeto e sendo esta antiparalela (C⁵-C⁷) pode resultar em uma maior liberdade e flexibilidade estrutural específica de DimAP1, comparado aos outros dímeros, o que deve dificultar sua

interação com a membrana do eritrócito, promovendo assim uma menor capacidade de lise destas células.

4.8 Viabilidade Celular

Considerando-se que os peptídeos diméricos sintetizados apresentaram uma boa atividade de inibição da topoisomerase tipo I humana, em adição à inibição das topoisomerasas bacterianas, buscou-se avaliar a citotoxicidade desses compostos frente a linhagens de células humanas normais e tumorais. Alguns compostos que possuem concomitante atividade antimicrobiana e antitumoral têm sido descritos nos últimos anos (BISACCH; HALE, 2016; AGRAWAL *et al.*, 2017; JABLONSKI *et al.*, 2017).

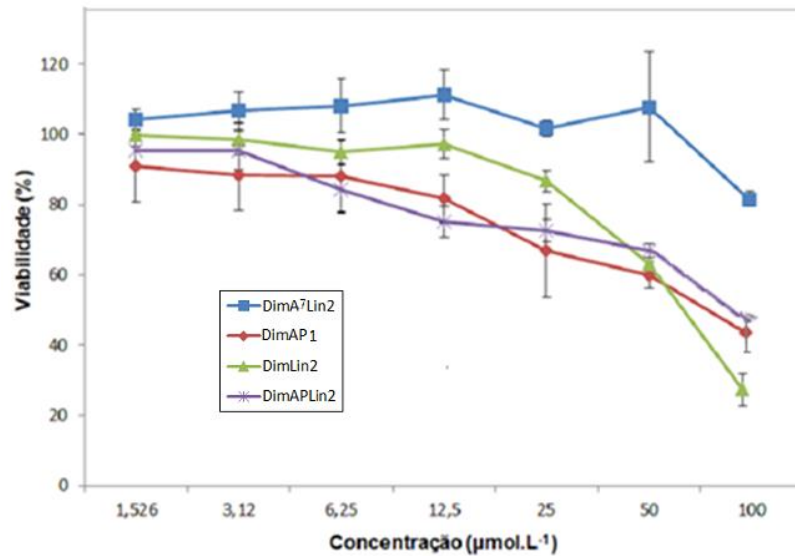
O método colorimétrico de MTT foi utilizado para quantificar a ação antiproliferativa dos dímeros, uma vez que a atividade mitocondrial das células viáveis promove a reação de conversão da molécula de MTT em cristais de formazan, a qual relaciona-se proporcionalmente à viabilidade celular.

4.8.1 Células tumorais

Os peptídeos sintetizados tiveram a sua ação testada frente às células da linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama, no período de 24 horas. Os dímeros DimAP1, DimLin2, DimAPLin2 apresentaram atividade inibitória (IC_{50}), na maior concentração testada, $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Nota-se que DimLin2 também apresentou bons resultados de redução da viabilidade da linhagem MCF-7, apresentando valores da ordem de 25%, contra um pouco mais de 40% para os dímeros antiparalelos. Observa-se na Figura 48, que os peptídeos, de uma maneira geral, passaram a reduzir a viabilidade das células tumorais, na concentração de $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com exceção de DimA⁷Lin2, que reduziu a viabilidade em concentrações acima de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Destaque para os dímeros antiparalelos que, independentemente do número de ligações dissulfeto, apresentaram maior redução da viabilidade deste tipo de célula, com crescimentos relativos de cerca de 80%, 70% e 60%, a $12,5$, 25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados comprovam, mais uma vez, a importância da posição das ligações dissulfeto, na atividade destes dímeros, além de corroborarem com os dados obtidos nos estudos de inibição das DNA topoisomerasas humanas, onde os dímeros antiparalelos apresentaram grande capacidade de inibição da atividade da topoisomerase do tipo IB. Para as topoisomerasas do tipo II, estes

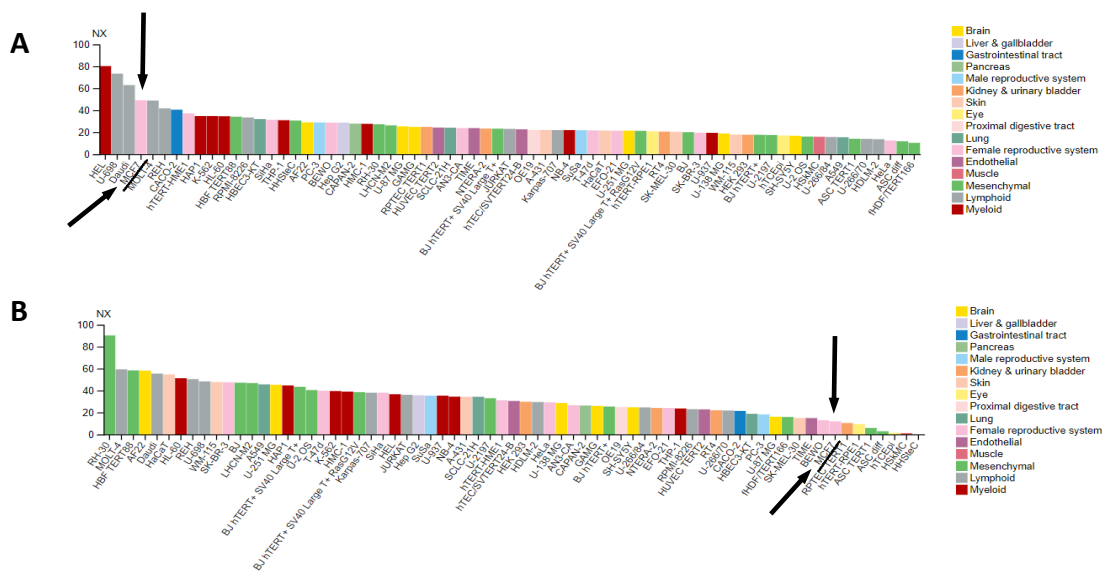
peptídeos não apresentaram ou foram pouco ativos ($IC_{100} > 75 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Considerando-se que a linhagem MCF-7 apresenta uma maior expressão de topoisomerases do tipo I em relação ao tipo II (Figura 49), os resultados de viabilidade para esta linhagem celular foram próximos ao esperado.

Figura 48. Estudo de viabilidade de células MCF-7 de adenocarcinoma de mama após tratamento com diferentes concentrações dos peptídeos diméricos.



Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 49. Expressão das topoisomerases humanas dos tipos I (A) e II (B) em diferentes linhagens celulares. Em destaque (assinalados com setas), a linhagem MCF-7.



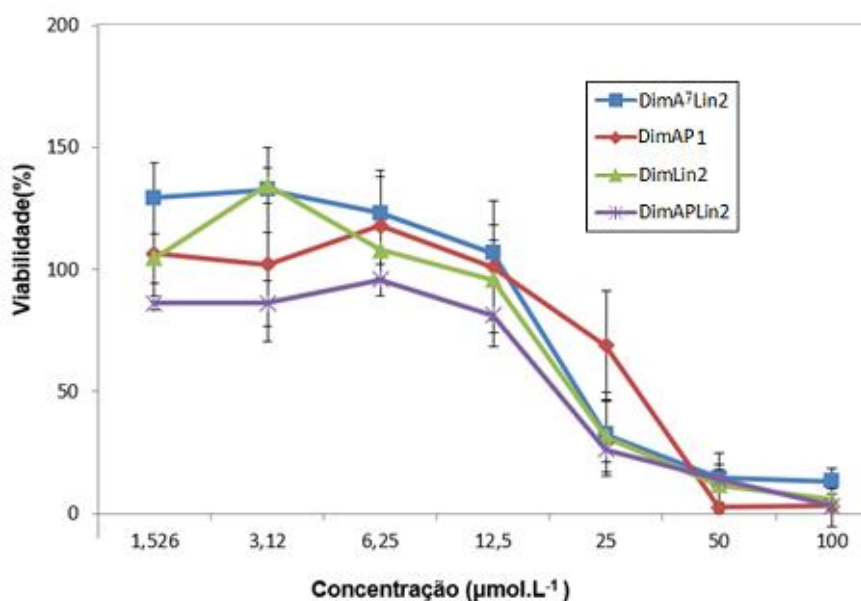
Fonte: Adaptado pelo autor (<https://www.proteinatlas.org/cell>)

4.8.2 Células não tumorais

Um dos maiores desafios para o desenvolvimento de novos fármacos, tais como agentes antimicrobianos e antitumorais, consiste na obtenção de compostos ativos que não sejam tóxicos para células normais do corpo humano. Neste contexto, ensaios de viabilidade celular em células de fibroblastos foram realizados, buscando-se avaliar a toxicidade dos peptídeos diméricos.

Como pode ser observado na (Figura 50), no período de 24 horas, os dímeros DimA⁷Lin2, DimLin2 e DimAPLin2, promoveram redução inibitória (IC₅₀) da viabilidade celular da linhagem NIH/3T3, em concentrações de 25 µmol.L⁻¹, enquanto o dímero DimAP1 em concentrações de 50 µmol.L⁻¹.

Figura 50. Estudo de viabilidade de células de fibroblastos NIH/3T3 após tratamento com diferentes concentrações dos peptídeos diméricos.



Fonte: Elaborada pelo autor

Estes resultados apesar de indicarem citotoxicidade dos peptídeos em relação a este tipo de célula, os valores de concentração para este efeito estão bem acima daqueles observados para a atividade antimicrobiana. Ao fazer uso do índice de seletividade ($IS = IC_{50} / MIC$), é possível observar que os valores necessários para promoção das atividades antibacteriana e antifúngica estão entre 2,7 e 9,5 vezes

menores do que os obtidos no IC₅₀ (Tabela 11). Desta forma, estes peptídeos, especialmente DimA⁷Lin2 e DimAP1, possuem grande potencial para serem utilizados como agentes antimicrobianos.

Tabela 11.Índice de seletividade da ação antimicrobiana

Peptídeos	Índice de Seletividade (IS)		
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C. albicans</i>
DimA ⁷ Lin2	8,5	8,5	8,0
DimAP1	9,5	9,5	8,0
DimLin2	4,7	2,7	4,0
DimAPLin2	4,7	2,7	4,0

Fonte: Elaborada pelo autor

Em um estudo de citotoxicidade realizado recentemente, envolvendo células de queratinócitos da linhagem HaCat com homólogos do peptídeo WRWYCRCK, não foi observado decréscimo na viabilidade celular, mesmo na concentração mais elevada testada de 50 µmol.L⁻¹, o que de certa forma, não corrobora os resultados aqui apresentados. Este fato pode indicar que a citotoxicidade é seletiva e relacionada com o tipo celular. Neste contexto, estudos adicionais, tal como permeabilidade celular, são necessários para um melhor entendimento acerca dos diferentes resultados de citotoxicidade em diferentes linhagens celulares.

5 CONCLUSÕES

- As metodologias empregadas para a síntese, clivagem, oxidação dos grupos sulfidrilas e purificação dos compostos, foram eficientes, levando à obtenção das sequências peptídicas desejadas;
- A dimerização direcionada foi uma boa estratégia para o estudo do efeito do número e posição das ligações dissulfeto, na atividade biológica do peptídeo WRWYCRCK;
- A dimerização envolvendo os dois resíduos de cisteína favorece a atividade inibitória dos peptídeos sobre as DNA topoisomerasas, independentemente da classe e da origem destas enzimas;
- A maior susceptibilidade das topoisomerasas aos dímeros DimLin2 e DimAPLin2 sugere que ambos os resíduos de cisteína e as respectivas ligações dissulfeto nas posições C⁵-C^{5'} e C⁷-C^{7'}, ou C⁵-C^{7'} e C^{5'}-C⁷ são fundamentais para a atividade inibitória destes peptídeos;
- Os peptídeos apresentaram baixa capacidade hemolítica, sendo que os antiparalelos DimAP1 e DimAPLin2 tiveram menor capacidade hemolítica que seus homólogos paralelos, embora tenham apresentado praticamente os mesmos resultados nos ensaios inibitórios.
- Todos os peptídeos apresentaram atividade bactericida e fungicida, tendo sido os dímeros DimA⁷Lin2 e DimAP1 os mais ativos. Tal fato pode estar relacionado com a estruturação destes peptídeos que favorece uma atividade de permeabilização das células microbianas;
- A capacidade de inibição dos peptídeos diméricos frente a topoisomerase de *M. tuberculosis* vislumbra como uma alternativa ao tratamento em casos de cepas multirresistentes.
- A elevada capacidade de inibição da Topoisomerase IB, pode indicar um possível uso terapêutico dos dímeros do peptídeo WRWYCRCK para pessoas infectadas com Sars-CoV-2.
- As modificações estruturais implementadas na sequência peptídica WRWYCRCK resultaram na obtenção de peptídeos inéditos e com grande potencial para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, S.; ACHARYA, D.; ADHOLEYA, A.; BARROW, C.J.; DESHMUKH, S.K. Nonribosomal Peptides from Marine Microbes and Their Antimicrobial and Anticancer Potential. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 828, 2017.
- ALFEI, S.; SCHITO, A. M. Positively Charged Polymers as Promising Devices against Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria: A Review. **Polymers**, 12, n. 5, p. 1195, 2020.
- ALONSO, J.-M.; GUIYOULE, A.; ZARANTONELLI, M. L.; RAMISSE, F. *et al.* A model of meningococcal bacteremia after respiratory superinfection in influenza A virus-infected mice. **FEMS Microbiology Letters**, 222, n. 1, p. 99-106, 2003.
- AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J.-A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Molecular Biotechnology**, 33, n. 3, p. 239-254, 2006.
- 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.; MONDRAGÓN, A. Structural studies of type I topoisomerases. **Nucleic Acids Research**, 37, n. 3, p. 693-701, 2009.
- BAKER, S.; THE, H. C. Recent insights into Shigella. **Current opinion in infectious diseases**, 31, n. 5, p. 449-454, 2018.
- BARBOSA, L. C. B.; GARRIDO, S. S.; GARCIA, A.; DELFINO, D. B. *et al.* Design and synthesis of peptides from bacterial ParE toxin as inhibitors of topoisomerases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 54, p. 591-596, 2012.
- BEADLING, C.; SLIFKA, M. K. How do viral infections predispose patients to bacterial infections? **Current Opinion in Infectious Diseases**, 17, n. 3, 2004.
- BISACCHI, G. S. ; HALE, M. R. A "Double-Edged" Scaffold: Antitumor Power within the Antibacterial Quinolone. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 520-577, 2016.
- BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F. Homology Modeling of Protein Targets with MODELLER. *In*: DE AZEVEDO JR, W. F. (Ed.). **Docking Screens for Drug Discovery**. New York, NY: Springer New York, 2019. p. 231-249.
- BOLDT, J. L.; PINILLA, C.; SEGALL, A. M. Reversible Inhibitors of λ Integrase-mediated Recombination Efficiently Trap Holliday Junction Intermediates and Form the Basis of a Novel Assay for Junction Resolution*. **Journal of Biological Chemistry**, 279, n. 5, p. 3472-3483, 2004.
- BRIDEWELL, D. J.; FINLAY, G. J.; BAGULEY, B. C. Differential actions of aclarubicin and doxorubicin: the role of topoisomerase I. **Oncology research**, 9, n. 10, p. 535-542, 1997.
- BUSH, N.; EVANS-ROBERTS, K.; MAXWELL, A. DNA Topoisomerases. **EcoSal Plus**, 6, n.2, 2015.
- CARPINO, L.A. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. **J. Am. Chem. Soc.** V. 92, p. 5748-5749, 1970.

- CASSELL, G.; KLEMM, M.; PINILLA, C.; SEGALL, A. Dissection of bacteriophage lambda site-specific recombination using synthetic peptide combinatorial libraries. **Journal of molecular biology**, 299, n. 5, p. 1193-1202, 2000.
- CHAMPOUX, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. **Annual Review of Biochemistry**, 70, n. 1, p. 369-413, 2001.
- CHAN, W.; WHITE, P. **Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach**. Oxford University Press, Oxford, UK, 2000.
- CORBETT, K. D.; BERGER, J. M. Structure, Molecular Mechanisms, and Evolutionary Relationships in DNA Topoisomerases. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, 33, n. 1, p. 95-118, 2004.
- COSTA-LOURENÇO, A. P. R. D.; BARROS DOS SANTOS, K. T.; MOREIRA, B. M.; FRACALANZZA, S. E. L. *et al.* Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. **Brazilian journal of microbiology** : v. 48, n. 4, p. 617-628, 2017.
- DAS, B. B.; GANGULY, A.; MAJUMDER, H. K. DNA Topoisomerases of *Leishmania*: The Potential Targets for Anti-*Leishmanial* Therapy. *In*: MAJUMDER, H. K. (Ed.). **Drug Targets in Kinetoplastid Parasites**. New York, NY: Springer New York, 2008. p. 103-115.
- EL SAYYED, H.; ESPÉLI, O. Mapping *E. coli* Topoisomerase IV Binding and Activity Sites. *In*: DROLET, M. (Ed.). **DNA Topoisomerases: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2018. p. 87-94.
- ELSEA, S. H.; WESTERGAARD, M.; BURDEN, D. A.; LOMENICK, J. P. *et al.* Quinolones Share a Common Interaction Domain on Topoisomerase II with Other DNA Cleavage-Enhancing Antineoplastic Drugs. **Biochemistry**, 36, n. 10, p. 2919-2924, 1997/03/01 1997.
- ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **Journal of Medical Microbiology**, 55, n. 7, p. 809-818, 2006.
- ERNST, E. J.; KLEPSEK, M. E.; ERNST, M. E.; MESSER, S. A. *et al.* In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 33, n. 2, p. 75-80, 1999.
- FERRERO, L. *et al.* Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. **Molecular Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 641-53, 1994.
- FORTERRE, P.; GRIBALDO, S.; GADELLE, D.; SERRE, M.-C. Origin and evolution of DNA topoisomerases. **Biochimie**, 89, n. 4, p. 427-446, 2007.
- FORTUNE, J. M.; OSHEROFF, N. Merbarone Inhibits the Catalytic Activity of Human Topoisomerase II α by Blocking DNA Cleavage *. **Journal of Biological Chemistry**, 273, n. 28, p. 17643-17650, 1998.
- FORTUNE, J. M.; OSHEROFF, N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: When enzymes stop being nice. *In*: **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**: Academic Press, 2000. v. 64, p. 221-253.
- FRESHNEY, R. I. *Animal cell culture: a practical approach*. London: IRC Press.1986.

- FUJIMOTO, D. F.; PINILLA, C.; SEGALL, A. M. New Peptide Inhibitors of Type IB Topoisomerases: Similarities and Differences Vis-a-vis Inhibitors of Tyrosine Recombinases. **Journal of Molecular Biology**, 363, n. 5, p. 891-907, 2006.
- GILL, S. C.; VON HIPPEL, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. **Analytical Biochemistry**, v. 182, n.2, p.319-332, 1989.
- GOW, N. A. R.; YADAV, B. Microbe Profile: Candida albicans: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. **Microbiology**, 163, n. 8, p. 1145-1147, 2017.
- GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C.L.; NECKEL, G. L.; LEMOS-SENNA, E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.2, p.129-139, 2007.
- GUNDERSON, C. W.; BOLDT, J. L.; AUTHEMENT, R. N.; SEGALL, A. M. Peptide wrwycr Inhibits the Excision of Several Prophages and Traps Holliday Junctions inside Bacteria. **Journal of Bacteriology**, 191, n. 7, p. 2169, 2009.
- GUNDERSON, C. W.; SEGALL, A. M. DNA repair, a novel antibacterial target: Holliday junction-trapping peptides induce DNA damage and chromosome segregation defects. **Molecular Microbiology**, 59, n. 4, p. 1129-1148, 2006.
- HAKENBECK, R.; BRÜCKNER, R.; DENAPAITE, D.; MAURER, P. Molecular mechanisms of β -lactam resistance in Streptococcus pneumoniae. **Future Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 395-410, 2012.
- HANSEN, S. G.; FRØHLICH, R.; KNUDSEN, B. R. Type IB topoisomerases and tyrosine recombinases-distinct functions within related structural frameworks. **Current Topics in Biochemical Research**, v. 5, p. 149-159, 2003.
- HOLDEN, J. A. DNA Topoisomerases as Anticancer Drug Targets: From the Laboratory to the Clinic. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, 1, n. 1, p. 1-25, 2001.
- JABLONSKI, A; MATCZAC, K.; KOCEVA-CHYLA, A.; DURKA, K. et al. Cymantrenyl-Nucleobases: Synthesis, Anticancer, Antitrypanosomal and Antimicrobial Activity Studies. **Molecules**, v. 22, 2220, 2017.
- JARADAT, D. S. M. M. Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation. **Amino Acids**, 50, n. 1, p. 39-68, 2018.
- JENEN, P. B.; SEHESTED, M. DNA topoisomerase II rescue by catalytic inhibitors: A new strategy to improve the antitumor selectivity of etoposide. **Biochemical Pharmacology**, 54, n. 7, p. 755-759, 1997.
- KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, 34, n. 2, p. 595-598, 1970/04/01/ 1970.
- KAMILOGLU, S.; SARI, G.; OZDAL, T.; CAPANOGLU, E. Guidelines for cell viability assays. **Food Frontiers**, v. 1, n. 3, p. 332-349, 2020.

- KATHIRAVAN, M. K.; KHILARE, M. M.; NIKOOMANESH, K.; CHOTHE, A. S. *et al.* Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 28, n. 3, p. 419-435, 2013.
- KHAN, T.; SANKHE, K.; SUVARNA, V.; SHERJE, A. *et al.* DNA gyrase inhibitors: Progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 103, p. 923-938, 2018.
- KLEMM, M.; CHENG, C.; CASSELL, G.; SHUMAN, S. *et al.* Peptide inhibitors of DNA cleavage by tyrosine recombinases and topoisomerases. **Journal of Molecular Biology**, 299, n. 5, p. 1203-1216, 2000.
- KLEPSE, M.E.; WOLFE, E.J.; JONES, R.N.; NIGHTINGALE, C.H.; PFALLER, M.A. Antifungal Pharmacodynamic Characteristics of Fluconazole and Amphotericin B Tested against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 41, n.6, p. 1392-1395, 1997.
- KNIGHT, G. M.; GLOVER, R. E.; MCQUAID, C. F.; OLARU, I. D. *et al.* Antimicrobial resistance and COVID-19: Intersections and implications. **eLife**, 10, p. e64139, 2021.
- LINKA, R. M.; PORTER, A. C. G.; VOLKOV, A.; MIELKE, C. *et al.* C-Terminal regions of topoisomerase II α and II β determine isoform-specific functioning of the enzymes in vivo. **Nucleic Acids Research**, 35, n. 11, p. 3810-3822, 2007.
- LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **Journal of Neuroscience Methods**, 96, n. 2, p. 147-152, 2000.
- MACHADO, A. *et al.* Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.
- MACHHI, J.; HERSKOVITZ, J.; SENAN, A. M.; DUTTA, D. *et al.* The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, 15, n. 3, p. 359-386, 2020.
- MARTINS, N.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; SILVA, S. *et al.* Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. **Mycopathologia**, 177, n. 5, p. 223-240, 2014.
- MCCLENDON, A. K.; OSHEROFF, N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 623, n. 1, p. 83-97, 2007.
- MCDERMOTT PATRICK, F.; ZHAO, S.; TATE, H.; AARESTRUP FRANK, M. *et al.* Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal Salmonella. **Microbiology Spectrum**, 6, n. 4, p. 6.4.16, 2018.
- MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis. I: the synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 2149-2154, 1963.
- MERRIFIELD, R. B. History of protein synthesis. In GOODMAN, M., FELIX, A., MORODER, L. & TONIOLO, C. (Eds). **Houben-Weyl. Methods of Organic Chemistry**. Vol. E 22b: **Synthesis of Peptides and Peptidomimetics**. Thieme, Stuttgart, New York, 2002, p.3-41.
- MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. **Clinical Microbiology and Infection**, 16, n. 5, p. 411-418, 2010.

MORGAN, D. J.; CASULLI, J.; CHEW, C.; CONNOLLY, E. *et al.* Innate Immune Cell Suppression and the Link With Secondary Lung Bacterial Pneumonia. **Frontiers in immunology**, 9, p. 2943-2943, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, n. 1, p. 55-63, 1983.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica de Lehninger**. 7 ed. 2018.

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.

NITISS, J. L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. **Nature Reviews Cancer**, 9, n. 5, p. 327-337, 2009.

NORI, P.; COWMAN, K.; CHEN, V.; BARTASH, R. *et al.* Bacterial and fungal coinfections in COVID-19 patients hospitalized during the New York City pandemic surge. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, 42, n. 1, p. 84-88, 2021.

PANTOSTI, A.; SANCHINI, A.; MONACO, M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, 2, n. 3, p. 323-334, 2007.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. **Chemistry & Biology**, 17, n. 5, p. 421-433, 2010.

POMMIER, Y.; SUN, Y.; HUANG, S.-Y. N.; NITISS, J. L. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 17, n. 11, p. 703-721, 2016.

POND, C. D.; MARSHALL, K. M.; BARROWS, L. R. Identification of a small topoisomerase I-binding peptide that has synergistic antitumor activity with 9-aminocamptothecin. **Molecular Cancer Therapeutics**, 5, n. 3, p. 739, 2006.

RABANAL, F.; DEGRADO, W. F.; DUTTON, P. L. Use of 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine) for the heterodimerization of cysteine containing peptides. Introduction of the 5-nitro-2-pyridinesulfonyl group. **Tetrahedron Letters**, 37, n. 9, p. 1347-1350, 1996.

REIS ZAMBOM, C.; HENRIQUE DA FONSECA, F.; SANTESSO GARRIDO, S. Bio- and Nanotechnology as the Key for Clinical Application of Salivary Peptide Histatin: A Necessary Advance. **Microorganisms**, 8, n. 7, 2020.

RIALDI, A.; CAMPISI, L.; ZHAO, N.; LAGDA, A. C. *et al.* Topoisomerase 1 inhibition suppresses inflammatory genes and protects from death by inflammation. **Science**, 352, n. 6289, p. aad7993, 2016.

RIDEOUT, M. C.; NAILI, I.; BOLDT, J. L.; FLORES-FUJIMOTO, A. *et al.* wrwyrggrywrw is a single-chain functional analog of the Holliday junction-binding homodimer, (wrwycr)₂. **Peptides**, 40, p. 112-122, 2013.

ROCHA, C.A. **Síntese, estrutura e atividade biológica do peptídeo WRWYCRCK e de seus análogos diméricos.** 2018. 174f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2018.

RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DÍAZ-GUERRA, T. M.; MELLADO, E. Standardization of Antifungal Susceptibility Variables for a Semiautomated Methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, 39, n. 7, p. 2513, 2001.

ROY, A.; D'ANNESSA, I.; NIELSEN, C. J. F.; TORDRUP, D. *et al.* Peptide Inhibition of Topoisomerase IB from *Plasmodium falciparum*. **Molecular Biology International**, v.2011, p. 854626, 2011.

SANCHES, B.C.P, ROCHA, C.A., MARTIN BEDOYA, J.G., *et al.*, Rhamnolipid-Based Liposomes as Promising Nano-Carriers for Enhancing the Antibacterial Activity of Peptides Derived from Bacterial Toxin-Antitoxin Systems. **Int. J. Nanomedicine**. v.16, p. 925-939, 2021.

SANDRI, M. I.; HOCHHAUSER, D.; AYTUN, P.; CAMPLEJOHN, R. C. *et al.* Differential expression of the topoisomerase II α and β genes in human breast cancers. **British Journal of Cancer**, 73, n. 12, p. 1518-1524,1996.

SCHROLL, A. L.; HONDAL, J.; FLEMER, S. 2,2'-Dithiobis(5-nitropyridine) (DTNP) as an effective and gentle deprotectant for common cysteine protecting groups. *J. Pept. Sci.*, v.18, p.1-9, 2012.

SEDDEK, A.; ANNAMALAI, T.; TSE-DINH, Y.-C. Type IA Topoisomerases as Targets for Infectious Disease Treatments. **Microorganisms**, 9, n. 1, p. 86, 2021.

SETHUVEL, D. P. M.; PERUMALLA, S.; ANANDAN, S.; MICHAEL, J. S. *et al.* Antimicrobial resistance, virulence & plasmid profiles among clinical isolates of Shigella serogroups. **The Indian journal of medical research**, 149, n. 2, p. 247-256, 2019.

SHAIKH, S.M.; NALAWADE, A.S.; DOIJAD, R.C. A review on combinatorial chemistry. **Res. & Rev.: J. Chem.**, v. 6, p. 14–26, 2017.

SINGH, S. K.; MAITHAL, K.; BALARAM, H.; BALARAM, P. Synthetic peptides as inactivators of multimeric enzymes: inhibition of Plasmodium falciparum triosephosphate isomerase by interface peptides. **FEBS Letters**, 501, n. 1, p. 19-23, 2001.

TAKAHASHI, T. S.; DA CUNHA, V.; KRUPOVIC, M.; MAYER, C. *et al.* Expanding the type IIB DNA topoisomerase family: identification of new topoisomerase and topoisomerase-like proteins in mobile genetic elements. **NAR Genomics and Bioinformatics**, 2, n. 1, 2020.

THABIT, A. K.; CRANDON, J. L.; NICOLAU, D. P. Antimicrobial resistance: impact on clinical and economic outcomes and the need for new antimicrobials. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, 16, n. 2, p. 159-177, 2015.

THELEN, J. M.; BUENEN, A. G.; VAN APELDOORN, M.; WERTHEIM, H. F. *et al.* Community-acquired bacteraemia in COVID-19 in comparison to influenza A and influenza B: a retrospective cohort study. **BMC Infectious Diseases**, 21, n. 1, p. 199, 2021.

TOPCU, Z. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, 26, n. 6, p. 405-416, 2001.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016. 8582713541.

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

VOS, S. M.; TRETTER, E. M.; SCHMIDT, B. H.; BERGER, J. M. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 12, n. 12, p. 827-841, 2011.

WANG, J. C. DNA Topoisomerases as Targets of Therapeutics: An Overview. *In*: LIU, L. F. (Ed.). **Advances in Pharmacology**: Academic Press, 1994. v. 29, p. 1-19.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. WHO Press, Geneva, Switzerland, 232p. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2020**. Geneva: World Health Organization; 2020.
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf> Acesso em fevereiro, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. 2021. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acessado em: 20 Abril. 2021.

YANG, H. LU, S. Covid-19 and Tuberculosis. **J. Transl. Int. Med.**, 8, n.2, p. 59-65, 2020.

YUIN HO, J. S.; WING-YEE MOK, B.; CAMPISI, L.; JORDAN, T. *et al.* Topoisomerase 1 inhibition therapy protects against SARS-CoV-2-induced inflammation and death in animal models. **bioRxiv**, preprint, <https://doi.org/10.1101/2020.12.01.404483>, 2020.

ZHANG, S.; LIN, F.; HOSSAIN, M. A.; SHABANPOOR, F. *et al.* Simultaneous Post-cysteine(S-Acm) Group Removal Quenching of Iodine and Isolation of Peptide by One Step Ether Precipitation. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 14, n. 4, p. 301-305, 2008.

ZHOU, Y.; HOU, Z.; FANG, C.; XUE, X. *et al.* Comparison of microplate and macrodilution methods in time–kill study of new antimicrobial drugs. **Folia Microbiologica**, 58, n. 1, p. 9-16, 2013.