

JOSÉ GREGORIO MARTÍN BEDOYA

Peptídeo-conjugados derivados da toxina ParE: Design, síntese e estudos biológicos

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

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto

Araraquara - SP
2024

B412p	Bedoya, Jose Gregorio Martin Peptídeo-conjugados derivados da toxina ParE : design, síntese e estudos biológicos / Jose Gregorio Martin Bedoya. -- Araraquara, 2024 83 f. : il. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientador: Reinaldo Marchetto 1. Peptídeos. 2. DNA polimerases. 3. Antimicrobianos. 4. Toxinas bacterianas. 5. Antitoxinas. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A proposta de obtenção de peptídeo-conjugados como compostos antimicrobianos multifuncionais com atividades moleculares sinérgicas pode aliviar a situação crítica e atual da resistência microbiana, atendendo as necessidades urgentes da população, além de contrabalancear o peso financeiro exponencialmente crescente sobre os sistemas de saúde globais.

POTENTIAL RESEARCH IMPACT

The proposal of peptide-conjugates obtention as multifunctional antimicrobial compounds with synergic molecular activities could alleviate the critical and actual situation of microbial resistance, besides to counterbalancing the exponentially growing financial burden on global health systems.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Peptídeo-conjugados derivados da toxina ParE: Design, síntese e estudos biológicos

AUTOR: JOSÉ GREGORIO MARTÍN BEDOYA

ORIENTADOR: REINALDO MARCHETTO

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



Documento assinado digitalmente
gov.br REINALDO MARCHETTO
Data: 13/03/2024 13:43:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. EDUARDO FESTOZO VICENTE (Participação Virtual)
Departamento Engenharia de Biosistemas-FCE/UNESP / Tupã/SP

Prof. Dr. CLOVIS RYUICHI NAKAIE (Participação Virtual)
Universidade Federal de São Paulo / UNIFESP / São Paulo

Prof. Dr. WILTON ROGÉRIO LUSTRI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara - UNIARA - Araraquara

Araraquara, 13 de março de 2024

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: José Gregorio Martín Bedoya

Nome em citação Bibliográfica: Martín J. G. B.

Filiação: María Rubiela Bedoya

Data de nascimento: 03/08/1985, Bogotá-Co

Estado civil: Solteiro

Telefone: (16) 9967621728

E-mail: martins385@gmail.com

- 2. Resumo das Qualificações:** Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho- UNESP, na área de síntese de peptídeos com ênfase no desenvolvimento compostos antimicrobianos.

3. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2019 – Atual

Doutorado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química-Araraquara. Título: Peptídeos derivados da proteína ParE: Design, síntese e estudos de atividade biológica. Orientador: Reinaldo Marchetto. Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2017 – 2019

Mestrado em Biotecnologia.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química - Araraquara. Título: Biomaterial a base de celulose bacteriana com aplicação na regeneração de tecido cutâneo. Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Marchetto. Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

2009 – 2012

Químico industrial

Universidade Tecnológica de Pereira. Título: Evaluación de las actividades antibacteriana y alelopática del extracto en acetato de etilo y de algunas fracciones de *Miconia caudata* (Bonpl.) DC. Orientadora: Prof. Dr. Luz Stella Ramírez Aristizabal. Co-orientador: Francisco Javier Jiménez

4. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Antek S.A.S. Laboratório de análises ambiental e Geoquímico. Analista químico. Análise de qualidade do ar em PST, PM₁₀, PM_{2.5}, NO₂, SO₂ e ozônio no ar. Isocinéticos, Material particulado, NO₂ e SO₂. Antek S.A.S. Laboratório de análises ambiental e geoquímico. Maio/2013 a Março/2015.

Professor de química no ensino médio em Escolas do Estado de Risaralda-Co. colégio Liceo de Occidente, La Celia, Santo Domingo Savio, Balboa y Santa Ana, Guática. 100 horas. Chefe: Nancy Janeth Castillo Rodríguez, e-mail: nancycastle@utp.edu.co., Agosto a Setembro de 2016.

5. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

52ª Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, SP, 3 a 6 de junho de 2023.

- Peptides Derived from ParE Protein: Design, Synthesis, Conjugation and Biological Activity.

1º Encontro Brasileiro de Biocelulose, Araraquara, SP, 4 e 5 de junho de 2018.

- Bacterial Cellulose Membranes Modified with RGD Peptides for Skin Tissue Repair.

46ª Reunião Anual da SBBq, Águas de Lindóia, SP, 27 a 30 de junho de 2017.

- Bacterial Cellulose Membranes Modified with RGD Peptides for Skin Tissue Repair

6. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

6.1. Artigos completos publicados em periódicos

Sanches BCP, Rocha CA, **Bedoya JGM**, Da Silva VL, Da Silva PB, Fusco-Almeida AM, Chorilli M, Contiero J, Crusca E, Marchetto R. Rhamnolipid-based liposomes as promising nano-carriers for enhancing the antibacterial activity of peptides derived from bacterial toxin-antitoxin systems. **Int J Nanomed.**, v.16, p.925-936, 2021.

RAMÍREZ, LSA., MONTES, AMO, **MARTÍN, JGB.**, JIMÉNEZ, FJG. Allelopathic activity evaluation of ethyl acetate extract from *Miconia caudata* (BONPL.) DC. **Cienc. Básicas.**, v. 13(2), p.100-104, 2017.

7. ATIVIDADES ACADÊMICAS RELEVANTES

- Monitoria do Edital PROPG 17/2023, de acordo com a Estratégia 1, 2º semestre de 2023: Fundamentos de Bioquímica, CH 60 horas.
- Estágio docência 2º semestre de 2022: Disciplina Bioquímica Geral e Experimental I, curso Bacharelado em Química, CH 45 horas.
- Seminários Gerais do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares que me incentivaram e apoiaram imensamente para eu alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador Reinaldo Marchetto pela atenção, paciência, ensinamentos e pela oportunidade de realizar o presente trabalho e Edson Crusca por toda a ajuda com o projeto e amizade.

Aos meus companheiros de “salinha de estudos”, Beatriz Sanchez, Naiara Maia, Jonatas Angelo, Carolina Zambom, Gabriela Zolin, Fauller Henrique, Jessica Allen, André Torres e o Prof. Dr. Saulo Santesso pela convivência diária, pela amizade, por todo seu apoio e colaboração.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Instituto de Química - UNESP pela atenção.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de financiamento 001.

E a todos aqueles que de uma forma ou de outra participaram na realização desta pesquisa.

Resumo

O desenvolvimento de novos fármacos com ação antibacteriana e antitumoral requer a identificação de um alvo celular específico. Um grupo de moléculas que se tornou alvo celular efetivo para agentes terapêuticos é o das topoisomerases. As topoisomerases, são enzimas essenciais para os processos de replicação e transcrição do DNA e, portanto, para a viabilidade celular. Inúmeros agentes antibacterianos atuam inibindo a atividade destas enzimas, como as quinolonas, cumarinas, microcinas e toxinas bacterianas, tais como ParE e CcdB. ParE inibe a síntese de DNA agindo diretamente na ação de duas topoisomerases: DNA girase e topoisomerase IV. Peptídeos derivados de ParE têm sido descritos como inibidores de topoisomerases bacterianas *in vitro* e, portanto, agentes antibacterianos em potencial. No entanto, a baixa capacidade destes peptídeos em permear a membrana plasmática bacteriana impede o uso dos mesmos para fins terapêuticos. Para contornar esta limitação, decidiu-se neste trabalho, projetar e sintetizar peptídeo-derivados de ParE, conjugados com fluoroquinolonas e moléculas contendo grupos cumarínicos, e avaliar a capacidade de inibir a atividade de diferentes topoisomerases bem como, em prevenir o crescimento bacteriano. Para isso, peptídeo-conjugados foram sintetizados pela metodologia de fase sólida, purificados e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência e caracterizados por espectrometria de massas. Análise de dicroísmo circular revelou uma conformação predominante em folha- β nos peptídeos, e que as conjugações em ParELC3M não alteraram de forma significativa sua estruturação secundária. A capacidade de inibição destes compostos sobre a atividade das topoisomerases foi testada por ensaios de eletroforese em gel. Atividades antibacteriana e antifúngica avaliadas pelo método de microdiluição em caldo e a viabilidade celular pelo método de MTT. Um peptídeo derivado de ParE (ParELC3M) e seus conjugados CFX-ParELC3M, CICPOQ-ParELC3M, HOCAc-ParELC3M e CFXPip-ParELC3M foram obtidos e testados. Tentativa de expressão da proteína ParE também foi realizada, objetivando a obtenção da toxina para estudos comparativos. Em ensaios padrão de superenrolamento e relaxamento do DNA, o peptídeo ParELC3M e seus conjugados, não inibiram completamente a atividade da DNA girase de *E. coli* e *S. pneumoniae*, mas inibiram a DNA girase de *M. tuberculosis* em concentrações entre 50 e 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Por outro lado, todos peptídeo-conjugados inibiram a reação de relaxamento catalisada pelo topo IV de *E. coli* e *S. pneumoniae* com valores de IC_{100} entre 50 e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Adicionalmente, os peptídeo-conjugados CFX-ParELC3M e CFXPip-ParELC3M inibiram a topo IA de *E. coli* e Topo II de levedura com valores de IC_{100} menores que 6,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 3,125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Somente CFXPip-ParELC3M foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, com um valor de MIC de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Mas em relação à atividade antifúngica, os peptídeos-conjugados não apresentaram inibição de crescimento de *C. albicans*. Estes resultados indicam que a conjugação de grupos fluoquinolônicos a peptídeos inibidores de topoisomerases, tal como ParELC3M, podem facilitar sua passagem através da membrana bacteriana para atingir seu alvo intracelular, as topoisomerases. Além disso, os peptídeo-conjugados não demonstraram toxicidade em células MRC-5. Os resultados indicam que os conjugados derivados de ParE representam uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Palavras chave: Peptídeos, DNA polimerases, Antimicrobianos, Toxinas bacteriana, Antitoxinas.

Abstract

The development of new drugs with antibacterial and antitumor action requires the identification of a specific cellular target. A group of molecules that has become an effective cellular target for therapeutic agents is the topoisomerases. Topoisomerases are enzymes essential for DNA replication and transcription processes, and therefore for cell viability. Numerous antibacterial agents act by inhibiting the activity of these enzymes, such as quinolones, coumarins, microcins, and bacterial toxins such as ParE and CcdB. ParE inhibits DNA synthesis by directly targeting the action of two topoisomerases: DNA gyrase and topoisomerase IV. Peptides derived from ParE have been described as inhibitors of bacterial topoisomerases *in vitro* and, therefore, potential antibacterial agents. However, the low capacity of these peptides to penetrate the bacterial plasma membrane prevents their use for therapeutic purposes. To circumvent this limitation, it was decided in this work, to design and synthesize peptide derivatives of ParE, conjugated with fluoroquinolones and molecules containing coumarin groups, and to evaluate their ability to inhibit the activity of different topoisomerases as well as to prevent bacterial growth. Therefore, peptide-conjugates were synthesized using solid-phase methodology, purified, and analyzed by high-performance liquid chromatography, and characterized by mass spectrometry. Circular dichroism analyses revealed a predominant β -sheet conformation in the peptide, and that the conjugations did not significantly alter their secondary structure. The inhibitory capacity of these compounds on topoisomerases activity was tested by gel electrophoresis assays. Antibacterial and antifungal activity were evaluated by broth microdilution method, and cell viability by MTT method. A peptide derived from ParE (ParELC3M) and its conjugates CFX-ParELC3M, CICPOQ-ParELC3M, HOAc-ParELC3M, and CFXPip-ParELC3M were obtained and tested. Attempted expression of the ParE protein was also performed, aiming to obtain the toxin for comparative studies. In standard DNA supercoiling and relaxation assays, the ParELC3M peptide and its conjugates did not completely inhibit the activity of *E. coli* and *S. pneumoniae* DNA gyrase, but inhibited *M. tuberculosis* DNA gyrase at concentrations ranging 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ to 12.5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. On the other hand, all peptide-conjugates inhibited the relaxation reaction catalyzed by *E. coli* and *S. pneumoniae* topoisomerase IV with IC_{100} values ranging from 50 to 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Additionally, the peptide-conjugates CFX-ParELC3M and CFXPip-ParELC3M inhibited *E. coli* topoisomerase IA and yeast Topo II with IC_{100} values lower than 6.25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ and 3.125 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectively. Only CFXPip-ParELC3M was able to inhibit bacterial growth, with an MIC value of 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. However, regarding antifungal activity, the peptide-conjugates showed no inhibition against *C. albicans*. These results indicate that conjugating fluoroquinolone groups to topoisomerase inhibitor peptides, such as ParELC3M, may facilitate their passage through the bacterial membrane to reach their intracellular target, the topoisomerases. Additionally, the peptide-conjugates showed no toxicity in MRC-5 cells. The results suggest that conjugates derived from ParE represent a promising strategy for the development of new antimicrobial agents.

Keywords: Peptides, DNA polymerases, antimicrobials, Bacterial toxins, Antitoxins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração dos diferentes tipos de DNA topoisomerases.....	3
Figura 2. Mecanismo de um sistema TA. (a) manutenção da estabilidade do plasmídeo; (b) morte celular.....	6
Figura 3. Estrutura primária de ParE e de ParD de <i>E. coli</i> (plasmídeo RK2).	7
Figura 4. Abordagem de hibridização no desenvolvimento de antimicrobianos.....	9
Figura 5. Esquema ilustrativo da síntese de peptídeo pela metodologia da fase sólida e estratégia Fmoc.	11
Figura 6. Estruturas da ciprofloxacina (CFX), Ácido 7-cloro-1-ciclopropil-6-fluor- 1,4dihidro-4-oxoquinolona-3-carboxílico (CICPOQ) e Ácido 7-Hidroxycumarinil-4- acético (HOCAc).....	13
Figura 7. Esquema de síntese de Boc-CFX	13
Figura 8. Esquema de síntese dos peptídeo-conjugados CFX-ParELC3M, CICPOQ- ParELC3M e HOCAc-ParELC3M.....	14
Figura 9. Esquema de síntese do peptídeo-conjugado CFXPip-ParELC3M	15
Figura 10. Espectros de DC mostrando o perfil característico das principais estruturas secundárias de peptídeos e proteínas: α -hélice, folha- β e randômica.	17
Figura 11. Mapa do vetor pSMT3 utilizado na clonagem de parE	19
Figura 12. Mapa do vetor pSUMO _{Ulp1} utilizado na clonagem de parE	20
Figura 13. Diagrama de fita de ParE de <i>E. coli</i> . A α -hélice C-terminal e as três folhas beta, β 2, β 3 e β 4, estão coloridas em vermelho, laranja, azul e magenta, respectivamente.	30
Figura 14. (a) Estrutura primária de ParELC3M e b) diagrama de fita do peptídeo ParELC3M, a α -hélice no C-terminal e a folha β 4, utilizada no desenho do peptídeo	31
Figura 15. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo ParELC3M antes (A) e após purificação (B). Condições gerais de análise (Materiais e Métodos): gradiente linear 30 a 90% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min ⁻¹ e detecção a 220 nm. Figura inserida, espectro de massas ES+.	33
Figura 16. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo-conjugado CFX-ParELC3M antes (A) e após purificação (B). Condições gerais de análise (Materiais e Métodos): gradiente linear 5 a 95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min ⁻¹ e detecção a 220 nm. Figura inserida, espectro de massas ES+.	33

Figura 17. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo-conjugado CICPOQ-ParELC3M antes (A) e após purificação (B). Condições gerais de análise (Materiais e Métodos): gradiente linear 5 a 95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min ⁻¹ e detecção a 220 nm. Figura inserida, espectro de massas ES+.	34
Figura 18. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo-conjugado HOAc-ParELC3M antes (A) e após purificação (B). Condições gerais de análise (Materiais e Métodos): gradiente linear 5 a 95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min ⁻¹ e detecção a 220 nm. Figura inserida, espectro de massas ES+.	34
Figura 19. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo-conjugado CFXPip-ParELC3M antes (A) e após purificação (B). Condições gerais de análise (Materiais e Métodos): gradiente linear 5 a 95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min ⁻¹ e detecção a 220 nm. Figura inserida, espectro de massas ES+.	35
Figura 20. Espectros de CD obtidos para ParELC3M e seus conjugados em (A) solução aquosa, (B) TFE 60%,	36
Figura 21. Amplificação da ORF de parE por PCR <i>HF</i> a partir do vetor pETDuet-1, utilizando os primers específicos. (A) Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Thermoscientific), (B) produto amplificado, indicado pela seta.	38
Figura 22. Confirmação da clonagem pela clivagem do vetor pSUMO _{Ulp1} mais inserto. (A) Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Thermoscientific), (B) Alíquota de clivagem, indicado pela seta em 311 pb. Revelado por electroforese em gel de agarose 1% e brometo de etídeo.	38
Figura 23. Análise de SDS-PAGE da proteína ParE em <i>E. coli</i> origami. (1) Marcador molecular BlueClassic Prestained Protein Marker-Jena Bioscience.; (2) lavagem; (3) lavagem com imidazol 10 mmol.L ⁻¹ ; (4) imidazol 25 mmol.L ⁻¹ ; (5) imidazol 50 mmol.L ⁻¹ ; (6) imidazol 75 mmol.L ⁻¹ ; (7) imidazol 100 mmol.L ⁻¹ ; (8) imidazol 250 mmol.L ⁻¹ ; (9) imidazol 500 mmol.L ⁻¹ ; (10) imidazol 1000 mmol.L ⁻¹ em SDS-PAGE 15 %. A seta aponta onde estaria a banda da proteína expressa.	39
Figura 24. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos a. ParELC3M, b. HOAc-ParELC3M, c. CICPOQ-ParELC3M, d. CFX-ParELC3M e e. CFXPip-ParELC3M, na concentração de 100 µmol.L ⁻¹ , sobre a inibição da atividade da DNA girase de <i>E. coli</i> . C-: controle negativo (pBR322 relaxado); C+: controle positivo (pBR322 relaxado + 1U de DNA girase)	40
Figura 25. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos a. ParELC3M, b. HOAc-ParELC3M, c. CICPOQ-ParELC3M, d. CFX-ParELC3M e e. CFXPip-	

ParELC3M, na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da DNA girase de <i>S. pneumoniae</i> . C-: controle negativo (pBR322 relaxado); C+: controle positivo (pBR322 relaxado + 1U de DNA girase).	40
Figura 26. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos a. ParELC3M, b. HOCAc-ParELC3M, c. CICPOQ-ParELC3M, d. CFX-ParELC3M e e. CFXPip-ParELC3M, na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da DNA girase de <i>M. tuberculosis</i> . C-: controle negativo (pBR322 relaxado); C+: controle positivo (pBR322 relaxado + 1U de DNA girase).	41
Figura 27. Eletroforese em gel para determinação de IC ₁₀₀ de a. ParELC3M, b. CFX-ParELC3M e c. CFXPip-ParELC3M sobre a atividade da DNA girase de <i>E. coli</i> . C -: controle negativo (pBR322 relaxado); C+: controle positivo (pBR322 relaxado + 1U de DNA girase). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo ou conjugado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$	42
Figura 28. Eletroforese em gel para determinação de IC ₁₀₀ para a. ParELC3M, b. HOCAc-ParELC3M, c. CICPOQ-ParELC3M, d. CFXPip-ParELC3M e e. CFX-ParELC3M sobre a atividade da DNA girase de <i>M. tuberculosis</i> . C-: controle negativo (pBR322 relaxado); C+: controle positivo (pBR322 relaxado + 1U de DNA girase). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo ou conjugado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$	43
Figura 29. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos a. ParELC3M, b. HOCAc-ParELC3M, c. CICPOQ-ParELC3M, d. CFX-ParELC3M e e. CFXPip-ParELC3M, na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da Topo IV de <i>E. coli</i> . C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo IV).	45
Figura 30. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos a. ParELC3M, b. HOCAc-ParELC3M, c. CICPOQ-ParELC3M, d. CFX-ParELC3M e e. CFXPip-ParELC3M, na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da Topo IV de <i>S. pneumoniae</i> . C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo IV).	45
Figura 31. Eletroforese em gel para determinação de IC ₁₀₀ para a. ParELC3M, b. HOCAc-ParELC3M, c. CICPOQ-ParELC3M, d. CFX-ParELC3M e e. CFXPip-ParELC3M sobre a atividade da Topo IV de <i>E. coli</i> . C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo IV). Os	

números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo ou conjugado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$	46
Figura 32. Eletroforese em gel para determinação de IC_{100} para a. ParELC3M, b. HOCAc-ParELC3M, c. CICPOQ-ParELC3M, d. CFX-ParELC3M e e. CFXPip-ParELC3M sobre a atividade da Topo IV de <i>S. pneumoniae</i> . C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo IV). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo ou conjugado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$	47
Figura 33. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos a. ParELC3M, b. HOCAc-ParELC3M, c. CICPOQ-ParELC3M, d. CFX-ParELC3M e e. CFXPip-ParELC3M, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da Topo IA de <i>E. coli</i> . C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo IA).	48
Figura 34. Eletroforese em gel para determinação de IC_{100} para a. ParELC3M, b. CFX-ParELC3M e c. CFXPip-ParELC3M sobre a atividade da Topo IA de <i>E. coli</i> . C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo IA). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo ou conjugado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$	49
Figura 35. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos a. ParELC3M, b. HOCAc-ParELC3M, c. CICPOQ-ParELC3M, d. CFX-ParELC3M e e. CFXPip-ParELC3M, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da Topo II de levedura. C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo II).	51
Figura 36. Eletroforese em gel para determinação de IC_{100} para a. ParELC3M, b. HOCAc-ParELC3M, c. CICPOQ-ParELC3M, d. CFX-ParELC3M e e. CFXPip-ParELC3M sobre a atividade da Topo II de levedura. C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo II). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo ou conjugado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$	52
Figura 37. Ensaio de viabilidade celular para as células MRC-5, na presença do peptídeo ParELC3M e seus conjugados, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 72 horas. As barras indicam o desvio padrão dos dados.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pares de <i>primers</i> utilizados para clonagem em vetores de expressão heteróloga	18
Tabela 2. Massas moleculares teóricas e obtidas por espectroscopia de massas.	35
Tabela 3. Massa obtida de cada produto sintetizado, após o processo de purificação.	36
Tabela 4. Comparação da atividade inibitória do peptídeo ParELC3M e respectivos conjugados em topoisomerases bacterianas.	50
Tabela 5. Atividade antimicrobiana de ParELC3M e seus conjugados.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. Aminoácidos

Ala (A) - alanina

Arg (R) - arginina

Asn (N) - asparagina

Asp (D) - ácido aspártico

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

Val (V) - valina

2. Outras

ACN Acetonitrila

Ahx Acido ϵ -aminocapróico

AMH Ágar Mueller Hinton

ATCC American Type Culture Collection

ATP Adenosina trifosfato

Boc *t*-Butiloxicarbonila

Boc₂O Dicarbonato de di-terc-butila

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CSD Sabouraud Dextrose

CFX Ciprofloxacina

CICPOQ 7-cloro-1-ciclopropil-6-fluor-1,4dihidro-4-oxoquinolona-3-carboxílico

CIM Concentração Inibitória Mínima

CMH Caldo Mueller Hinton

CPP Peptídeo de penetração celular (Cell Penetration Peptide)

DC Dicroísmo circular

DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIEA	N-Diisopropiletilamina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	N, N-Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonila
HF	<i>High Fidelity</i>
HOBt	N-Hidroxibenzotriazol
HOCAc	Ácido 7-Hidroxicumarinil-4-acético
IC ₁₀₀	Concentração requerida para inibição completa da atividade enzimática
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria Bertani
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas
MRC-5	<i>Medical Research Council cell 5</i>
MS	Espectroscopia de Massas
MTT	Brometo de 3-4,5-dimethyliazol-2,5-difeniltetrazolium
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PSK	Morte pós-segregacional (<i>postsegregational killing</i>)
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
RNAs	Ácido ribonucleico pequeno
RPM	Rotação por Minuto
SDP	Sabouraud Dextrose
SDS-Page	Dodecil Sulfato de Sódio - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
STEB	Carregador de DNA: Sacarose, Tris, EDTA e Azul de Bromofenol
SUMO	Pequeno modificador semelhante à Ubiquitina (<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>)
TA	Sistema Toxina-Antitoxina
TBE	Tampão para eletroforese tris/borato/EDTA
<i>t</i> Bu	<i>terc</i> -butila
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido Trifluoroacético
TFE	Trifluoroetanol
UV	Ultra-Violeta

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Novos agentes antimicrobianos: um cenário preocupante	1
1.2. DNA topoisomerasas: alvos estratégicos para novos agentes antimicrobianos ...	3
1.3. Sistemas toxina-antitoxina (TAs)	5
1.4. Peptídeos conjugados	8
2. Objetivos Gerais	10
3. Materiais e Métodos	11
3.1. Síntese de peptídeos	11
3.2. Peptídeo-conjugados	12
3.2.1. <i>Síntese da Boc-CFX</i>	13
3.2.2. <i>Síntese dos peptídeo-conjugados</i>	14
3.3. Purificação e Caracterização	16
3.4. Dicroísmo Circular (DC)	17
3.5. Produção da Proteína ParE	18
3.5.1. <i>Amplificação por PCR de parE</i>	18
3.5.2. <i>Construção de vetores de expressão</i>	21
3.5.3. <i>Clonagem nos vetores pSMT3 e pSUMO_{Ulp1}</i>	21
3.5.4. <i>Transformação de parE-pSUMO_{Ulp1} e parE-pSMT3 em E. coli Origami (DE3)</i>	22
3.5.5. <i>Purificação da proteína ParE</i>	22
3.6. Ensaios de inibição da atividade enzimática	23
3.6.1. <i>Inibição da atividade da DNA girase</i>	23
3.6.2. <i>Inibição da atividade da Topoisomerase IV (Topo IV)</i>	24
3.6.3. <i>Inibição da atividade da topoisomerase IA de E. coli</i>	25
3.6.4. <i>Inibição da atividade da Topoisomerase II de levedura</i>	25
3.7. Avaliação da atividade antimicrobiana	26
3.7.1. <i>Preparação do inoculo</i>	26
3.7.2. <i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para bactérias</i>	26
3.7.3. <i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para fungos</i>	27
3.8. Ensaios de toxicidade	28
4. Resultados e Discussão	30
4.1. Design e síntese de peptídeo e peptídeo-conjugados	30
4.2. Purificação e caracterização	32
4.3. Dicroísmo Circular	36
4.4. Produção de ParE	37
4.4.1. <i>Amplificação</i>	37
4.4.2. <i>Clonagem</i>	38

4.4.3. <i>Expressão e purificação da toxina ParE em E. coli origami</i>	39
4.5. Ensaio de inibição da atividade das topoisomerasas bacterianas	39
4.5.1. <i>Ensaio de inibição da atividade de DNA girase</i>	40
4.5.2. <i>Ensaio de inibição da atividade de topoisomerases IV</i>	44
4.5.3. <i>Ensaio de inibição da atividade de Topo IA de E. coli</i>	48
4.5.4. <i>Ensaio de inibição da atividade da Topo II de levedura</i>	51
4.6. Avaliação da atividade antimicrobiana.	54
4.7. Ensaio de toxicidade	56
5. Conclusões	58
6. Referências	59

1. Introdução

1.1. Novos agentes antimicrobianos: um cenário preocupante

A descoberta e o uso clínico de antibióticos, como a penicilina, podem ser considerados uma das maiores conquistas da história da medicina. Apesar de seu valor essencial na medicina moderna, os antibióticos também pertencem a única classe de medicamentos que perdem sua eficácia com o uso em larga escala à medida que as bactérias desenvolvem resistência aos mesmos (GAYNES, 2017). A resistência, assim como a tolerância, é um fenômeno natural onde uma série de mecanismos bioquímicos auxilia os patógenos a escaparem dos efeitos letais dos antibióticos, ameaçando a capacidade de tratamento de doenças comuns (ALI, RAFIQ, RATCLIFFE, 2018). Apesar destes mecanismos variarem de patógeno para patógeno, a resistência é causada por alguns fatores básicos (ou combinações deles), como a inativação do antibiótico por alterações químicas, modificação do alvo que leva à perda de sensibilidade ao antibiótico, mudanças na bomba de efluxo e na permeabilidade externa da membrana e efluxo plasmidico, alterações nos genes que codificam as topoisomerasas, entre outros (AKINWALE et al., 2018, CHANDRA et al., 2017; GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010). Diferentemente da resistência que é baseada em mutação gênica e cria um processo ativo de defesa, a persistência é fundamentada na formação e manutenção de subpopulações metabolicamente pouco ativas (BALABAN et al., 2019). A persistência é um estado de tolerância transitório em que a tolerância ao antibiótico não é genética e persiste dentro de uma população suscetível. Apesar de células persistentes terem desvantagens óbvias a despeito do crescimento e divisão celular, elas são menos suscetíveis a situações de mudanças repetidas de ambiente que normalmente trazem agentes químicos e/ou físicos perigosos. Tais subpopulações possuem uma grande probabilidade de serem tolerantes a agentes estressantes por conta da inatividade de certos alvos metabólicos (HARMS, MAISONNEUVE, GERDES, 2016). Neste caso, as células persistentes não são resistentes, mas apenas tolerantes, ou seja, as células não crescem na presença de antibióticos, mas também não morrem (HELAINÉ; KUGELBERG, 2014; KEREN et al., 2004).

A capacidade de as bactérias desenvolverem resistência aos antibióticos está bem documentada. Inicialmente, o arsenal de novos antibióticos era suficiente para superar a resistência observada e os antibióticos eram muitas vezes tidos como garantidos. No entanto, à medida que a oferta de novos antibióticos diminuiu, houve um aumento simultâneo e preocupante do fenômeno da resistência aos antibióticos

(DHINGRA et al., 2020). Nos últimos 40 anos, nenhuma classe importante de antibióticos foi introduzida no mercado, sendo que a nova classe mais recente de antibióticos foi descoberta na década de 1980 (MIETHKE et al., 2021). Embora agentes antimicrobianos como linezolida, daptomicina e retamolina tenham sido lançados na década de 2000, suas classes químicas foram suplantadas na década de 1950 (oxazolidinona, ácido lipopeptídico e pleuromutilina, respectivamente), e estas são ativas apenas contra patógenos Gram-positivos (PICCONI et al., 2020, CHIN et al., 2023).

Impulsionado pelo consumo excessivo e pelo uso imprudente de antibióticos clinicamente utilizados, e pela evolução e disseminação contínua de elementos de resistência genética móvel, um número crescente de patógenos bacterianos multirresistentes (MDR) e até mesmo extremamente resistentes a medicamentos (XDR) têm emergido. Estas bactérias MDR aumentam a morbidade, a mortalidade dos pacientes e os custos de saúde. (BANIN; HUGHES; KUIPERS, 2017). Isso tudo evidencia que novos candidatos a medicamentos são cada vez mais difíceis de serem identificados e levados ao mercado. Como resultado, há uma lacuna crescente entre a necessidade clínica e a inovação de medicamentos (URBAN-CHMIEL et al., 2022).

Vários relatórios publicados pelas principais autoridades mundiais de saúde pública, como a OMS, o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (CEPC) e os Centros de Controle e Prevenção de Doenças nos EUA (CCD), têm destacado a situação urgente e crítica da resistência antimicrobiana. Estima-se que pelo menos 700.000 pessoas em todo o mundo morrem todos os anos em consequência de infecções resistentes aos medicamentos, e este número poderá aumentar para 10 milhões até 2050 se o problema da resistência antimicrobiana não for resolvido (MIETHKE et al., 2021).

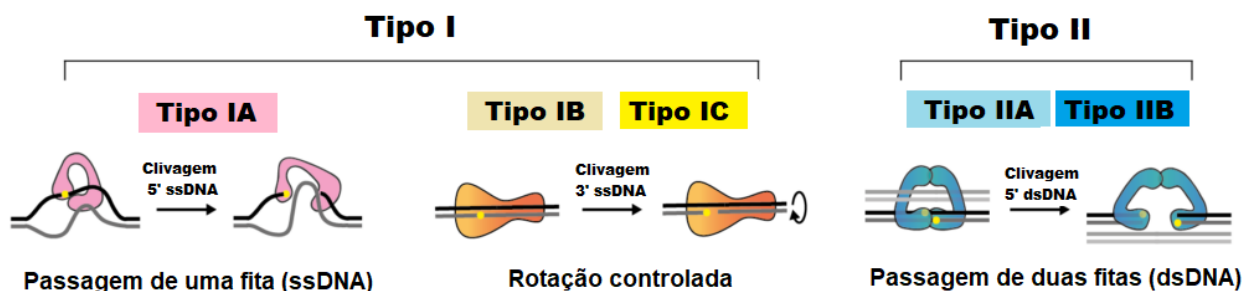
Infelizmente, o dramático aumento mundial de bactérias resistentes a agentes antibacterianos não pode ser contrabalanceado pelo atual baixo ritmo de desenvolvimento de novos produtos terapêuticos incluindo aqueles com novos modos de ação (KIM et al., 2020). Assim, um investimento estratégico em novas opções terapêuticas para combater a resistência aos antimicrobianos é urgentemente necessário para atender às necessidades não satisfeitas dos pacientes e, além disso, para contrabalançar o peso financeiro exponencialmente crescente sobre os sistemas de saúde globais (MIETHKE et al., 2021).

Diante deste cenário, é urgente e de suma importância o desenvolvimento de novos e aprimorados agentes antibacterianos, mais potentes e menos susceptíveis aos diversos mecanismos de resistência bacteriana. (GAJDÁCS, 2019).

1.2. DNA topoisomerases: alvos estratégicos para novos agentes antimicrobianos

As DNA topoisomerases constituem um grupo de enzimas que se tornou alvo efetivo para vários agentes terapêuticos. São enzimas que mantêm o nível estacionário de superenrolamento global e resolvem problemas topológicos do DNA (McKIE; NEUMAN; MAXWELL, 2021). O princípio catalítico comum consiste na clivagem de uma ou duas fitas de DNA, na manipulação da topologia e na vedação da lacuna nas fitas de DNA (SCHOEFFLER e BERGER, 2008). As enzimas são classificadas em topoisomerases tipo I e tipo II em relação ao número de fitas de DNA que são clivadas. Eles são ainda divididos em tipo IA, IB e IC de acordo com diferenças mecânicas, e em tipo IIA e IIB de acordo com mecanismo e características estruturais das enzimas (Figura 1).

Figura 1. Ilustração dos diferentes tipos de DNA topoisomerases



Fonte: Elaborado pelo autor

As topoisomerases do tipo I, também conhecidas como Topo I, cliva uma fita simples do DNA e não requer ATP para realizar essa clivagem. Especificamente, a subfamília IA das Topo I, é constituída pelas topoisomerases I e III bacterianas, topoisomerases III de eucariotos e girase reversa de arqueobactérias (CHAMPOUX, 2001). Estas enzimas são todas monoméricas, com exceção da girase reversa da bactéria *Methanopyrus kandleri*, a qual consiste em um heterodímero (KRAH et al., 1996). Elas requerem íons metálicos bivalentes (Mg^{+2} e Zn^{+2}) e a exposição de uma

região de fita simples do DNA para realização da atividade catalítica. A clivagem de uma cadeia de DNA é acompanhada pela ligação covalente 5'-fosfotirosinil, formando uma ponte enzima/fita única com o DNA, permitindo assim a passagem da outra fita através da abertura gerada (MILLS; TSE-DINH; NEUMAN, 2018), o que resulta no relaxamento de superenrolamentos negativos do DNA (CHAMPOUX, 2002; TEREKHOVA et al., 2012). Em contraste, as topoisomerases tipo IB e tipo IC não requerem íons bivalentes para catálise e estão ligadas ao grupo 3'-fosfato no intermediário covalente. Não há sequência ou homologia estrutural entre as topoisomerases tipo IA, tipo IB e tipo IC (CORBETT e BERGER, 2004).

Constituintes de todos os patógenos bacterianos, as topoisomerases tipo IA têm sido consideradas alvos potenciais para a descoberta de novos agentes antimicrobianos (TSE-DINH, 2009, 2015) porém, as Topo IA ainda não constituem alvos terapêuticos clínicos. Embora não existam medicamentos aprovados que utilizem topoisomerases do tipo IA como alvos celulares, pode-se argumentar que, uma vez que todas as topoisomerases tem um resíduo de tirosina no sítio ativo, para formar o intermediário covalente, também deve ser possível que um inibidor possa capturar e estabilizar o complexo covalente formado pelas topoisomerases do tipo IA (SEDDEK; ANNAMALAI; TSE-DINH, 2021).

As topoisomerases do tipo II (Topo II), ao contrário das Topo I, são enzimas ATP dependentes que catalisam a clivagem simultânea de ambas as fitas da hélice de DNA (Figura 1), para gerenciar emaranhados e superenrolamentos do DNA (HIRSCH e KLOSTERMEIER, 2021). As Topo II alteram a topologia do DNA, gerando uma quebra transitória da fita dupla em um segmento de DNA, formando uma ligação covalente 5'-fosfotirosina, e permitindo que outro segmento passe pela abertura gerada (KENDRA; OVIATT; OSHEROFF, 2021).

Em relação às subclasses das Topo II, as enzimas dos tipos IIA e IIB compartilham subunidades B homólogas que abrangem o sítio de ligação do ATP, mas possuem subunidades A não homólogas que catalisam a clivagem do DNA. As topoisomerases do tipo IIA são onipresentes em bactérias e eucariotos, enquanto os membros da família IIB estão presentes principalmente em archaea e plantas (JIAN e OSHEROFF, 2023).

As topoisomerases do tipo IIA incluem a topoisomerase II eucariótica (Topo II) e as enzimas bacterianas topoisomerase IV (Topo IV) e DNA girase (HIRSCH e KLOSTERMEIER, 2021).

A DNA girase e a topoisomerase IV são topoisomerasas bacterianas essenciais que controlam a topologia do DNA durante a replicação, transcrição e outros processos associados ao DNA (McKIE; NEUMAN; MAXWELL, 2021). A DNA girase introduz superenrolamentos negativos no DNA bacteriano através de um mecanismo dependente de ATP, enquanto a topoisomerase IV elimina principalmente os emaranhados de DNA que ocorrem durante a replicação do DNA. Ambas as enzimas são compostas por duas proteínas, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* para DNA girase, e pelos genes *parC* e *parE* no caso da topoisomerase IV (BUSH et al., 2020). Esses dois conjuntos de proteínas são compostos por quatro subunidades proteicas, formando complexos heterotetraméricos: A_2B_2 para DNA girase e C_2E_2 para topoisomerase IV. São alvos bem documentados para a terapia antimicrobiana, sendo as fluoroquinolonas conhecidas por possuírem um mecanismo de “direcionamento duplo” com a possibilidade de inibir ambas as enzimas simultaneamente. O duplo direcionamento é uma perspectiva atraente para a descoberta de medicamentos antimicrobianos, uma vez que a inibição de duas enzimas simultaneamente apresenta às bactérias um desafio significativo para a evolução da resistência (TSE-DINH, 2016).

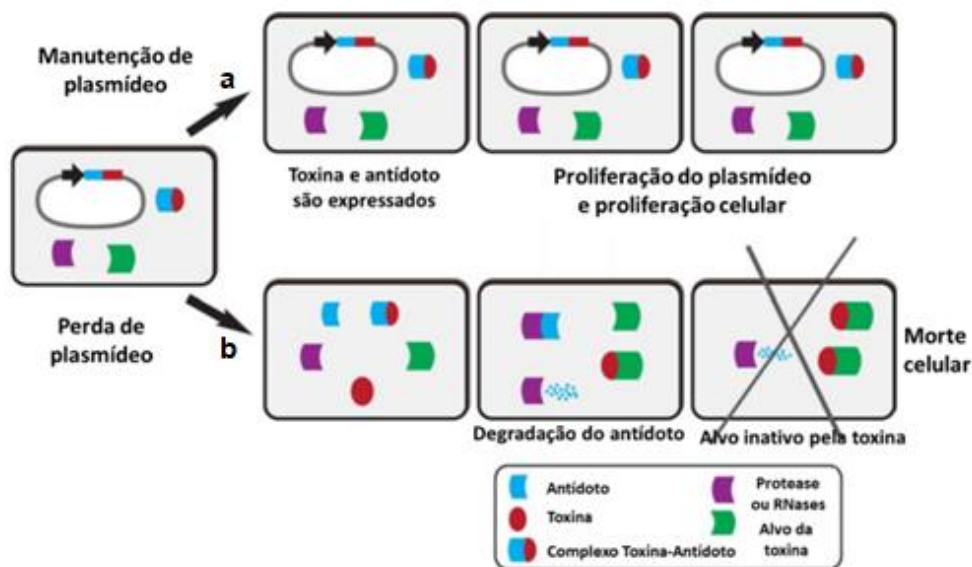
Assim, o estudo de sistemas toxina-antitoxina bacterianos (TAs), que exercem atividades importantes no contexto da resistência e persistência bacteriana (HARMS, MAISONNEUVE, GERDES, 2016; PATEL, 2016), podem não só ajudar a compreender o seu papel na disseminação e evolução da resistência bacteriana aos antibióticos, mas também servir de modelo para o desenho racional de moléculas tais como peptídeos derivados, com ação inibitória simultânea que resultem em atividades antimicrobianas específicas e, acima de tudo, que as exerçam através de mecanismos de ação alternativos aos antibióticos disponíveis (BELETE, 2019; PICCONI et al., 2020).

1.3. Sistemas toxina-antitoxina (TAs)

Os TAs, originalmente vinculados a sistemas de manutenção de plasmídeos (OGURA e HIRAGA, 1983), são pequenos módulos genéticos encontrados em estruturas genéticas móveis bacterianas, como plasmídeos, bem como em cromossomos bacterianos. Os loci TA codificam sistemas de dois componentes que consistem em uma toxina estável cuja superexpressão mata a célula bacteriana ou interrompe o crescimento celular, e uma antitoxina cognata instável (YANG e WALSH, 2017). Em condições favoráveis ao crescimento celular a toxina é normalmente neutralizada pela antitoxina. Contudo, quando um plasmídeo que codifica o TA é perdido de uma célula ou sob condições de

estresse (tal como na escassez de nutrientes e presença de substâncias nocivas), as antitoxinas são rapidamente degradadas por proteases e RNases, tornando as toxinas livres para agir sobre os seus alvos com consequente interferência em processos celulares fundamentais, como a replicação do DNA, a transcrição, tradução de proteínas, síntese da parede celular e produção de ATP (Figura 2) e consequentemente no crescimento ou viabilidade celular (GERDES; RASMUSSEN; MOLIN, 1986, MASUDA; INOUE, 2017).

Figura 2. Mecanismo de um sistema TA. (a) manutenção da estabilidade do plasmídeo; (b) morte celular.



Fonte: Adaptado de HERNÁNDEZ-ARRIAGA et al., 2016.

Os TAs não são essenciais para o crescimento celular normal, mas participam de outros eventos celulares importantes, tais como a formação de biofilmes, proteção contra bacteriófagos, reparação do DNA cromossomal e resposta a condições adversas (BUSTAMANTE; IREDELL, 2017), além de estarem diretamente associados à persistência bacteriana (HALL; GOLLAN; HELAINE, 2017). Desta forma, os módulos TA podem ser compreendidos basicamente como entidades genéticas que regulam o crescimento celular em procariotos.

Os TAs são classificados em oito grupos (tipo I a VIII), de acordo com a natureza molecular e o modo de ação pelo qual as antitoxinas neutralizam as toxinas (SONG e WOOD, 2020). Com exceção do tipo VIII recentemente descoberto, no qual as toxinas são RNAs, em todas as outras classes de TA, as toxinas são proteínas. As antitoxinas

são RNAs não codificantes (tipo I, III e VIII) ou pequenas proteínas (tipo II, IV, V, VI e VII) (HARMS et al., 2018, SONG e WOOD, 2020).

O grupo mais amplamente estudado de todos os módulos TA são os módulos do tipo II, onde tanto a toxina quanto a antitoxina são pequenas proteínas (SINGH et al., 2021). Para a neutralização da toxina, a antitoxina forma um complexo com a toxina e atua como um inibidor de forte ligação (GOEDERS e VAN MELDEREN, 2013). Sob condições de estresse, como privação de nutrientes, perda de plasmídeo, alta temperatura, estresse oxidativo, infecção por bacteriófagos ou pressão de antibióticos, a célula garante a degradação proteolítica da antitoxina, diminuindo assim a concentração de antitoxina e liberando a toxina para sua ação tóxica (WANG e WOOD, 2011, CHUKWUDI e GOOD, 2015, COUSSENS e DAINES, 2016).

As toxinas exibem toxicidade de várias maneiras. As toxinas MqsR, MazF, HigB e RelE atuam como endorribonucleases específicas de sequência (CHRISTENSEN e GERDES, 2003; HURLEY e WOYCHIK, 2009; ZHANG et al., 2003), enquanto as toxinas CcdB e ParE afetam a replicação do DNA inibindo o superenrolamento mediado pela DNA girase (DAO-THI et al., 2005; JIANG et al., 2002)

O sistema ParDE, identificado pela primeira vez no plasmídeo RK2 de um amplo espectro de hospedeiros, está entre os primeiros sistemas TA identificados, e foi denotado como “Par” por seu papel no particionamento do plasmídeo através de um sistema de morte pós-segregacional (PSK) (AMES, et.al, 2019). Neste sistema, ParE (103 aminoácidos) é a toxina e ParD (83 aminoácidos) a antitoxina (Figura 3). ParD existe como um dímero em solução e se liga à forma dimérica da toxina ParE para formar um complexo tetramérico capaz de neutralizar a ação de ParE. A ação de ParE resulta no acúmulo de quebras de DNA, promovendo a letalidade em modelos de morte por segregação de plasmídeo (PSK) e, assim, invocando a resposta SOS *in vivo* (JIANG et al., 2002).

Figura 3. Estrutura primária de ParE e de ParD de *E. coli* (plasmídeo RK2).

¹ MTAYILTTDAEADLRGIIRYTRKQWGTAQVRRYIARLEHGIADLAAGRGSRFRDMSSELFPELRMIHCEHHY VFCLPHGSAPALVVAIFHERMDLMARLSERLNIES ¹⁰⁵ ParE ¹ MSRLTIDMTDQQHQSLKALAALQGKTIKQYALERLFPGDADADQAWQELKTMLGNRINDGLAGKVSTKS VGEILDEELSGDRA ⁸³ ParD
--

Fonte: Elaborado pelo autor

Estudos realizados com peptídeos derivados de ParE apresentaram resultados promissores em termos de inibição da atividade tanto da DNA girase quanto da topoisomerase IV *in vitro*, porém ensaios *in vivo* foram insatisfatórios, basicamente devido à baixa permeabilidade da membrana celular bacteriana a estes peptídeos (BARBOSA et al., 2012).

Dada esta dificuldade, uma abordagem inovadora seria a hibridação destes peptídeos derivados de ParE, com uma segunda entidade funcional, tal como um antibiótico ou seu análogo que, de um lado, poderia facilitar a permeação e inserção intracelular do peptídeo, e de outro, melhorar a especificidade, promovendo um efeito sinérgico das moléculas conjugadas, na capacidade inibitória de diferentes topoisomerases.

1.4. Peptídeos conjugados

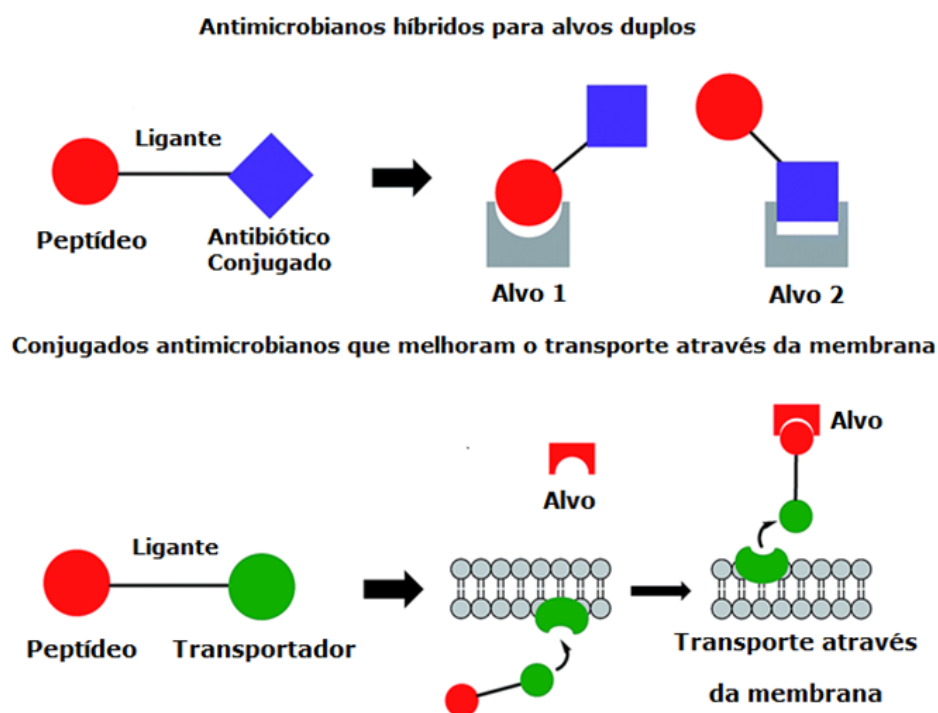
Dentre a abordagem inovadora de desenvolvimento de medicamentos peptídicos, está a hibridação de um antibiótico ou seu análogo, com uma segunda entidade funcional, tal como um peptídeo, conectados por um ligante, formando os chamados conjugados antibiótico-peptídeo (APCs) que possam atuar como um antimicrobiano multifuncional (WANG et al., 2017).

Estes conjugados podem ser agrupados em duas categorias principais (Figura 4). Na primeira (híbridos antimicrobianos), ambos os elementos funcionais do híbrido exercem atividade antimicrobiana (p.ex. peptídeo+antibiótico). Devido ao direcionamento duplo, o desenvolvimento da resistência pode ser significativamente prejudicado, as propriedades farmacocinéticas podem ser superiores em comparação às terapias combinadas com os antibióticos isolados, e a potência antibacteriana é frequentemente aprimorada de maneira sinérgica. Na segunda categoria (conjugados antimicrobianos), uma porção funcional controla o acúmulo da outra parte do conjugado, p.ex. mediando um transporte para a célula bacteriana ou bloqueando o efluxo (KLAHN; BRÖNSTRUP, 2017).

O propósito destes híbridos é produzir um composto antimicrobiano multifuncional que induza atividades antibacterianas sinérgicas que ofereçam poucas possibilidades de que as bactérias desenvolvam resistência e melhorem as deficiências conhecidas dos antibióticos ou peptídeos, tais como a instabilidade sérica, citotoxicidade, hemólise e especialmente na penetração celular (AKINWALE et al., 2018; KLAHN; BRÖNSTRUP, 2017).

Neste contexto, peptídeos derivados de ParE, com reconhecida atividade inibitória da DNA girase, conjugados com antibióticos quinolônicos ou cumarínicos, bem como seus análogos, poderiam resultar em um APC, com atividades antibacterianas sinérgicas, grande capacidade de permeação e inserção intracelular, menor resistência antibacteriana e potencial inibitório de DNA topoisomerases.

Figura 4. Abordagem de hibridização no desenvolvimento de antimicrobianos



Fonte: KLAHN; BRÖNSTRUP (2017), modificado.

2. Objetivos Gerais

O objetivo principal deste trabalho foi a síntese química de estruturas moleculares obtidas pela conjugação de um peptídeo derivado da toxina ParE e derivados quinolônicos ou cumarínicos, que permeiem a membrana plasmática de microrganismos e atuem sinergicamente na inibição de diferentes topoisomerasas.

Objetivos Específicos

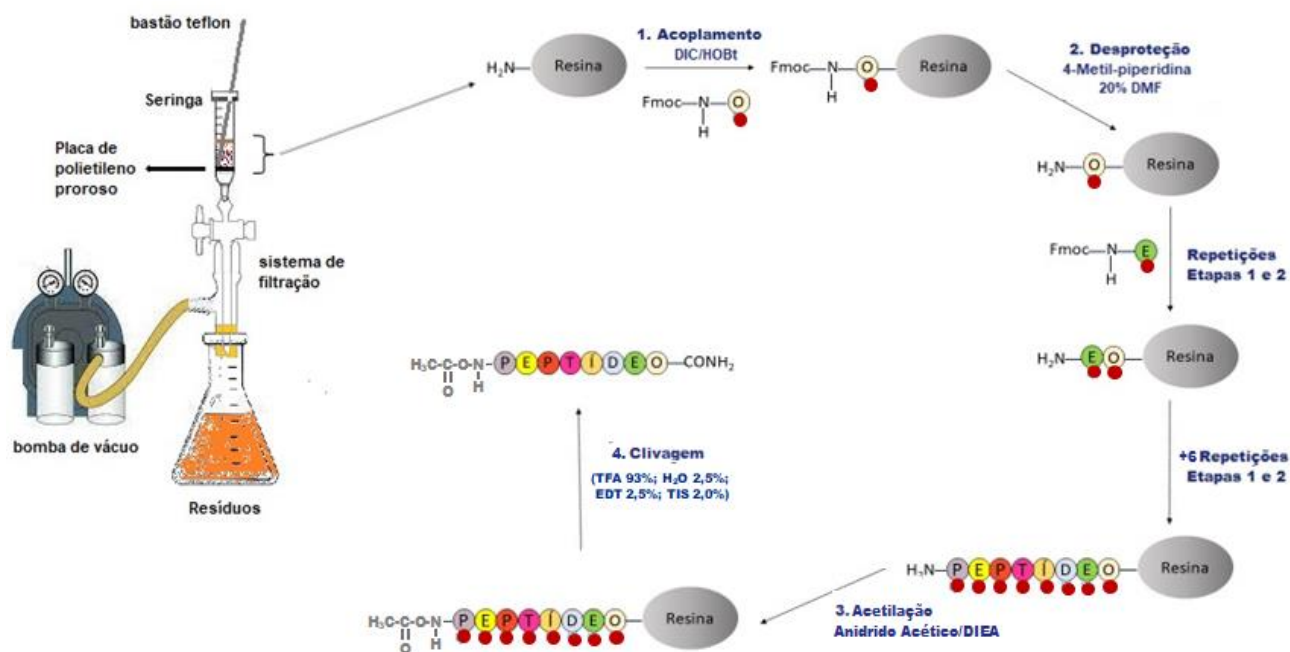
1. Sintetizar quimicamente, um peptídeo derivado da toxina ParE;
2. Conjugar antibióticos e seus análogos ao peptídeo projetado e sintetizado;
3. Obter a toxina ParE de *E. coli* por técnicas de expressão heteróloga;
4. Avaliar, comparativamente à toxina ParE, a capacidade inibitória dos peptídeo livre e peptídeo-conjugados, sobre a atividade de diferentes topoisomerasas;
5. Verificar a atividade antimicrobiana dos peptídeo-conjugados, comparativamente a toxina ParE, por meio de ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e viabilidade celular;
6. Analisar o efeito citotóxico dos peptídeos livres e seus conjugados;

3. Materiais e Métodos

3.1. Síntese de peptídeos

Um peptídeo derivado de ParE, denominado ParELC3M, foi sintetizado quimicamente pelo método da fase sólida (AMBLARD et al., 2006), de acordo com o protocolo padrão que emprega o grupamento base-lábil Fmoc como protetor dos α -amino grupos, e derivados *t*-butílicos (*t*-Bu) para a proteção das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (BEHRENDT; WHITEB; OFFERC, 2016) em seringa de polipropileno de 10 mL, munida de um filtro de polietileno poroso, conectada a um sistema à vácuo com frasco coletor de resíduos (Figura 5).

Figura 5. Esquema ilustrativo da síntese de peptídeo pela metodologia da fase sólida e estratégia Fmoc.



* (● = representa um protetor de cadeia lateral de um resíduo de aminoácido trifuncional genérico)

Fonte: Elaborado pelo autor

Foi inicialmente utilizado 1g de uma Rink amida MBHA com grau de substituição de $0,55 \text{ mmol.g}^{-1}$, empregando DIC/HOBt (Diisopropilcarbodiimida/1-hidroxibenzotriazol) como agentes de condensação. Na etapa de acoplamento (Etapa 1 - Figura 5) de cada

aminoácido, foi empregado um excesso molar de 3 vezes em relação à quantidade de resina de partida (1,65 mmol), tanto para o Fmoc-aminoácido quanto para os agentes de condensação, inicialmente em uma mistura Diclorometano (DCM):Dimetilformamida (DMF) (1:1), por um período de 2 horas. A desproteção dos grupos α -amínicos (remoção do grupo base lábil Fmoc), após a entrada de cada aminoácido, foi realizada empregando-se uma solução de 4-metilpiperidina 20% (v/v) em DMF (Etapa 2 - Figura 5). 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 foi repetido com 50% da quantidade inicial dos reagentes. Uma fração da peptidil-resina obtida (ParELC3M-Resina) foi separada para ser utilizada na preparação dos conjugados e o restante foi acetilado, empregando 10 equivalentes de anidrido acético, em DMF, por 45 min (Etapa 3 - Figura 5).

A clivagem final do peptídeo da resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais, após acetilação, foi efetuada pelo tratamento da peptidil-resina com uma solução de clivagem contendo TFA (93,0%), água deionizada (2,5%), etanoditiol (2,5%) e triisopropilsilano (2,0%), a 25°C por 3 h (Etapa 4 - Figura 5).

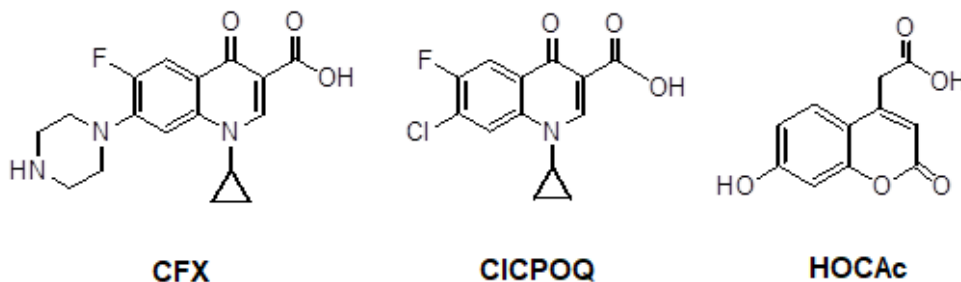
O peptídeo bruto (ParELC3M) foi precipitado, lavado com éter dietílico gelado (repetição de cinco vezes). A cada repetição o conteúdo era submetido à agitação e posteriormente centrifugação a 4500 rpm por 5 min, seguidos da retirada e descarte do sobrenadante. Ao final, o resíduo de éter foi evaporado e o conteúdo seco à vácuo. Para a extração do peptídeo, o produto seco obtido, foi solubilizado em uma solução de ácido acético 15% (v/v) seguida de centrifugação (4500 rpm por 5 min) por 5 vezes. Todo o sobrenadante proveniente desta etapa foi submetido a filtração simples em placa de polietileno porosa, seguido de rotoevaporação (aproximadamente 45 min) e liofilização por 24 h. Após essas etapas, o extrato bruto foi liofilizado, analisado, purificado e caracterizado, juntamente com os peptídeos conjugados obtidos.

3.2. Peptídeo-conjugados

Na preparação dos peptídeo-conjugados, foram utilizados a ciprofloxacina (CFX), o Ácido 7-cloro-1-ciclopropil-6-fluor-1,4-dihidro-4-oxoquinolona-3-carboxílico (CICPOQ) e o Ácido 7-Hidroxycumarinil-4-acético (HOCAc) (Figura 6). O primeiro, um antibiótico do grupo das quinolonas, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de DNA, especialmente em bactérias Gram-negativas, atuando na inibição da atividade da cadeia A (GyrA) da DNA girase; o segundo, um precursor da CFX contendo um átomo de cloro em substituição ao anel de piperazina na posição 7 do anel quinolônico; e o terceiro, uma

cumarina substituída precursora da Novobiocina, um inibidor da cadeia B (GyrB) da DNA girase, especificamente da sua atividade de ATPase.

Figura 6. Estruturas da ciprofloxacina (CFX), Ácido 7-cloro-1-ciclopropil-6-fluor-1,4dihidro-4-oxoquinolona-3-carboxílico (CICPOQ) e Ácido 7-Hidroxicumarinil-4-acético (HOCAc)

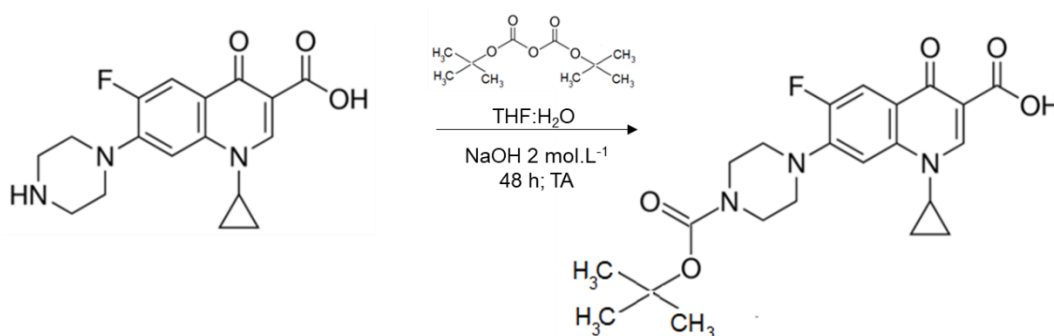


Fonte: Elaborado pelo autor

3.2.1. Síntese da Boc-CFX

Para a síntese do conjugado com ciprofloxacina, inicialmente foi necessário proteger o nitrogênio da piperazina com o grupo *t*-Butiloxicarbonila (Boc). Para isso, 2 mmol de CFX foram dissolvidas em 20 mL de uma mistura THF:água (1:1) contendo 4 mL de NaOH 2 mol.L⁻¹. Em seguida, a solução foi resfriada a 0°C e então, 3 mmol de dicarbonato de di-*tert*-butila (Boc₂O) foram adicionados gota-a-gota. A reação foi então mantida a temperatura ambiente, por 48 horas, no escuro sob agitação constante. Ao final do período, o volume foi reduzido por rotaevaporação e a solução resultante, acidificada com HCl 2 mol.L⁻¹, para eliminar o excesso de Boc₂O. O precipitado formado foi filtrado, lavado com água ultrapura (2×50 mL), seco sob vácuo e caracterizado (Figura 7).

Figura 7. Esquema de síntese de Boc-CFX

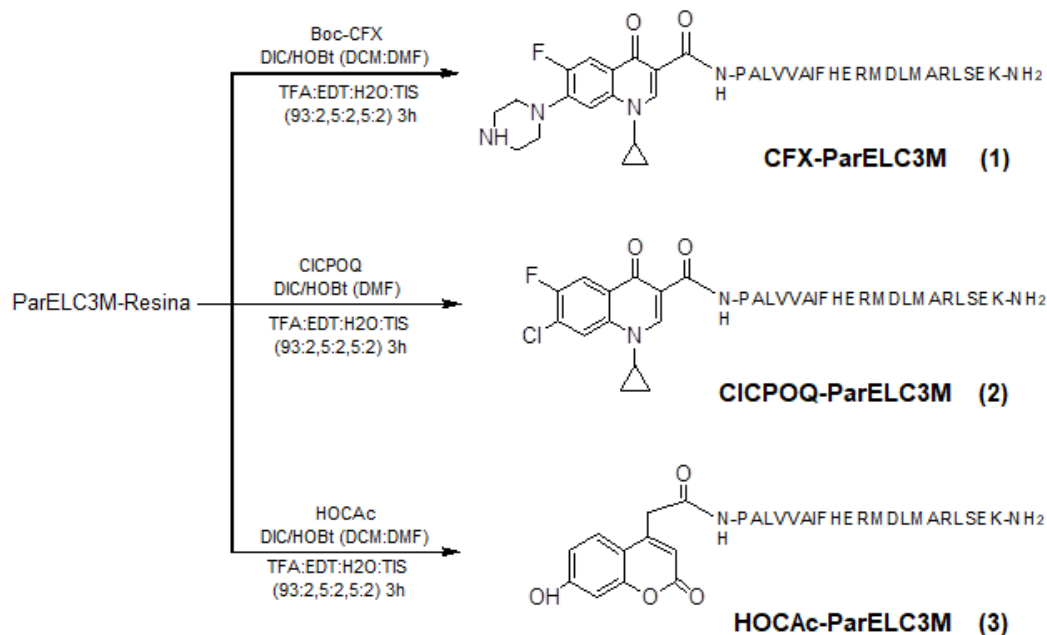


Fonte: Elaborado pelo autor

3.2.2. Síntese dos peptídeo-conjugados

Em cada uma de 3 seringas de polipropileno de 5 mL, munidas de um filtro de polietileno poroso, foram adicionados 100 mg da ParELCM-resina (item 3.1) pré-solvatadas em DMF. Às duas primeiras foram adicionados 70 μ mol de Boc-CFX e HOAc, respectivamente, dissolvidos na mistura DCM:DMF (1:1). À terceira, foi adicionado 70 μ mol de CICPOQ dissolvido apenas em DMF. A reação de condensação foi iniciada, adicionando a cada uma das seringas, a mesma quantidade de DIC e HOBt (70 μ mol cada), e mantendo a reação por um período de 2 horas, no escuro, à temperatura ambiente. No caso da condensação de CICPOQ, foi necessário a repetição do processo para a negativação do teste de ninidrina. A clivagem final de cada peptídeo-conjugado da resina e a desproteção dos grupos protetores das cadeias laterais, foi efetuada pelo tratamento da peptidil-resina com uma solução de clivagem contendo TFA (93,0%), água deionizada (2,5%), etanoditiol (2,5%) e triisopropilsilano (2,0%), a 25°C por 3 h (Figura 8).

Figura 8. Esquema de síntese dos peptídeo-conjugados CFX-ParELC3M, CICPOQ-ParELC3M e HOAc-ParELC3M.

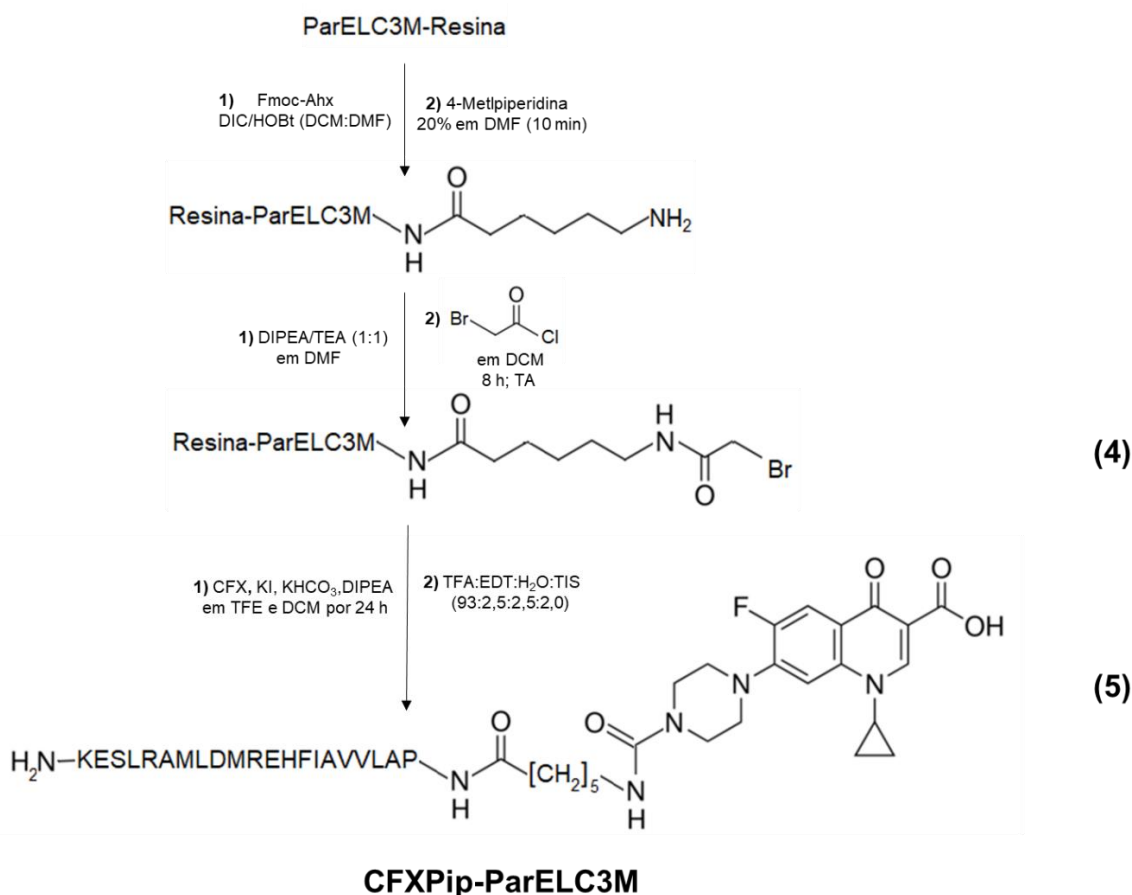


Fonte: Elaborado pelo autor

Na síntese do peptídeo-conjugado CFXPip-ParELC3M (Figura 9), também foi utilizada 100 mg da ParELCM-Resina, porém acoplando-se inicialmente ácido Fmoc- ϵ -aminocaprílico (Fmoc-Ahx), empregando DIC/HOBt como agentes de condensação, em DCM:DMF. Após a condensação, o grupo Fmoc foi removido empregando-se uma solução

de 4-metilpiperidina 20% (v/v) em DMF, por 10 min à temperatura ambiente, seguida de lavagens com DMF. Para a preparação da bromo acetamida **4**, adicionou-se à resina, 1,5 mL de uma mistura gelada de DIPEA:TEA (1:1) em DMF. Em seguida foram adicionados 1,5 mL de uma solução contendo 0,16 mmol de cloreto de bromoacetila em DCM gelado (QANDIL et al., 2014; MUSTAEV et al., 2014). Após agitação durante 15 min a 0° C, a reação foi mantida à temperatura ambiente por 8 h, sob agitação ocasional. A reação foi monitorada pelo teste de ninidrina, sendo necessária a repetição da reação por duas vezes, para obtenção da resina bromo acetamida funcionalizada **4** (Figura 9). Para a alquilação da amina do anel de piperazina da CFX, uma mistura contendo 0,065 mmol de CFX (21 mg), 0,065 mmol de KI (13,2 mg), 0,065 mmol de KHCO₃ (6,6 mg) e 0,106 mmol de DIPEA (18,5 µL) em 1 mL de 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE) e 2 mL de DCM, foi adicionada à resina **4**, e a reação mantida por um período de 24 h, no escuro, em agitação constante à temperatura ambiente. A reação de alquilação foi repetida duas vezes. A clivagem final foi realizada com uma solução de TFA, como descrito no item 3.1, para resultar no conjugado **5** (Figura 9).

Figura 9. Esquema de síntese do peptídeo-conjugado CFXPip-ParELC3M



3.3. Purificação e Caracterização

Ao final de todo processo de síntese e obtenção dos peptídeo-conjugados, uma pequena quantidade de cada produto 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, Júpiter Phenomenex (250 x 4,6 mm); d=5 µm; 300 Å), empregando um gradiente de 30 a 90% (ParELC3M) e 5 a 95% (peptídeo-conjugados) 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, 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 as amostras: 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 cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) em modo analítico. O conteúdo dos tubos denominados puros foi reunido e liofilizado, com posterior análise por CLAE-FR para confirmação da pureza.

A caracterização dos produtos foi realizada por determinação da massa molecular, calculadas aplicando 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. Condições de ESI-MS: capilar: 3kV, cone: 37 kV, eletrospray modo de ionização positivo (ES+).

$$MM_{amostra} = (MM \cdot z) - (z \cdot MM_{H^+}) \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$MM_{amostra}$ é a massa molecular do produto em análise;

MM é a razão massa molecular/carga obtida por espectrometria de massas;

z é o número de cargas que contém o peptídeo ou peptídeo-conjugado ($z = 1, 2, 3$);

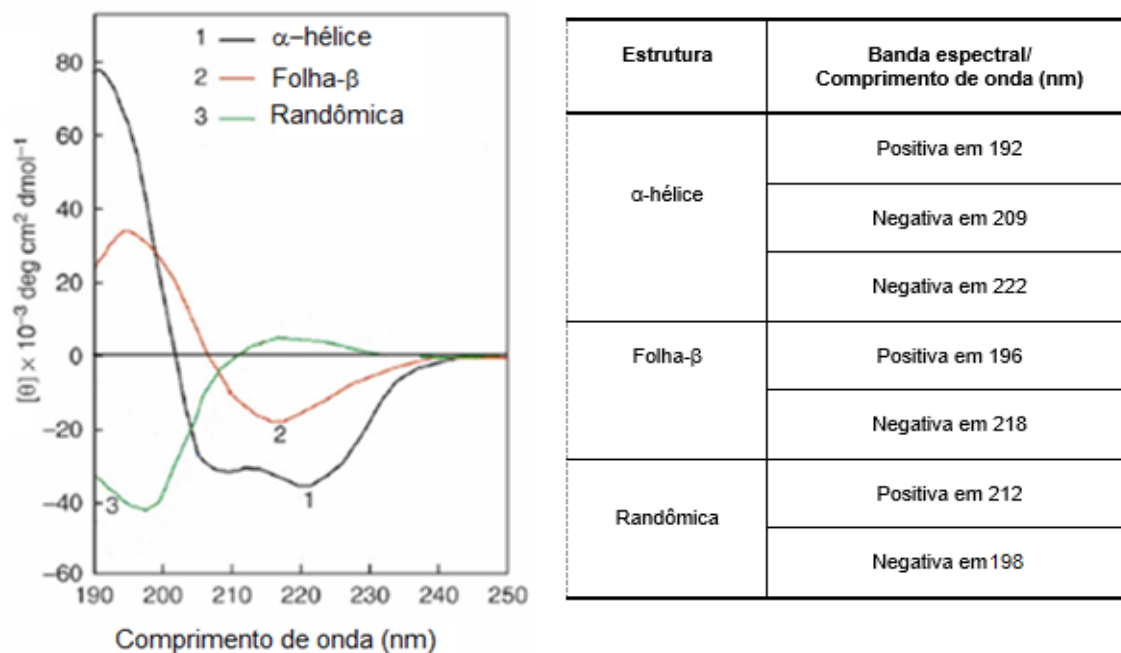
MM_{H^+} a massa molecular do íon hidrogênio, de valor $1,008 \text{ g.mol}^{-1}$

3.4. Dicroísmo Circular (DC)

A espectroscopia de DC é um poderoso método em biologia estrutural usado desde 1960 para examinar estruturas secundárias de proteínas e peptídeos em solução (WHITMORE e WALLACE, 2007). O fenômeno de dicroísmo circular se baseia no desvio da luz circularmente polarizada incidente em compostos opticamente ativos, onde o componente circularmente polarizado à direita é absorvido em diferente intensidade em relação ao polarizado à esquerda (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Em peptídeos e proteínas, devido ao caráter de dupla ligação resultante da coplanaridade dos átomos CONH, a rotação ao redor da ligação peptídica é restrita, sendo permitida apenas na ligação entre o átomo de nitrogênio e o carbono alfa (HN-C α), cujo ângulo de rotação é Φ (phi), e na ligação entre o átomo de carbono alfa e a carbonila (C α -C=O), representado pelo ângulo de rotação Ψ (psi). A rotação dos ângulos específicos Φ e Ψ e a interação das cadeias laterais formarão, assim, as estruturas secundárias básicas das proteínas: α -hélice, folha- β e estrutura randômica (desordenada), responsáveis por espectros de DC característicos (Figura 10)

Figura 10. Espectros de DC mostrando o perfil característico das principais estruturas secundárias de peptídeos e proteínas: α -hélice, folha- β e randômica.



Fonte: Adaptado de WHITMORE e WALLACE (2007).

Assim sendo, a análise da estrutura secundária de cada peptídeo foi feita pela técnica espectroscópica de DC, empregando em espectropolarímetro JASCO J-815, localizado no Instituto de Química de Araraquara - UNESP (equipamento multiusuário). Neste trabalho, os peptídeos foram estudados numa concentração de $60 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em duas diferentes condições: solução aquosa e trifluoretanol (TFE) 60%. Foram utilizadas celas de 1 mm de caminho óptico, acúmulo de 7 varreduras nos comprimentos de onda entre 190 e 250 nm e temperatura de 25°C. Para todos os experimentos o tempo de integração foi de 3 segundos por ponto e a leitura foi feita a cada 0,2 nm.

3.5. Produção da Proteína ParE

A sequência do gene *parE* foi obtida pela empresa GO (GenOne), isolada e amplificada por PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir do DNA genômico de *E. coli* O157, sendo a ORF (Open Reading Frame) do gene clonado no vetor de expressão pETDuet-1 no sítio de multiclonagem 1 entre *Bam*HI e *Sal*I.

3.5.1. Amplificação por PCR de *parE*

A sequência de DNA que codifica para ParE foi amplificada por PCR, utilizando como molde o vetor pETDuet-1 e foram desenhados os *primers* complementares às extremidades da ORF do gene (Tabela 1).

Tabela 1. Pares de *primers* utilizados para clonagem em vetores de expressão heteróloga

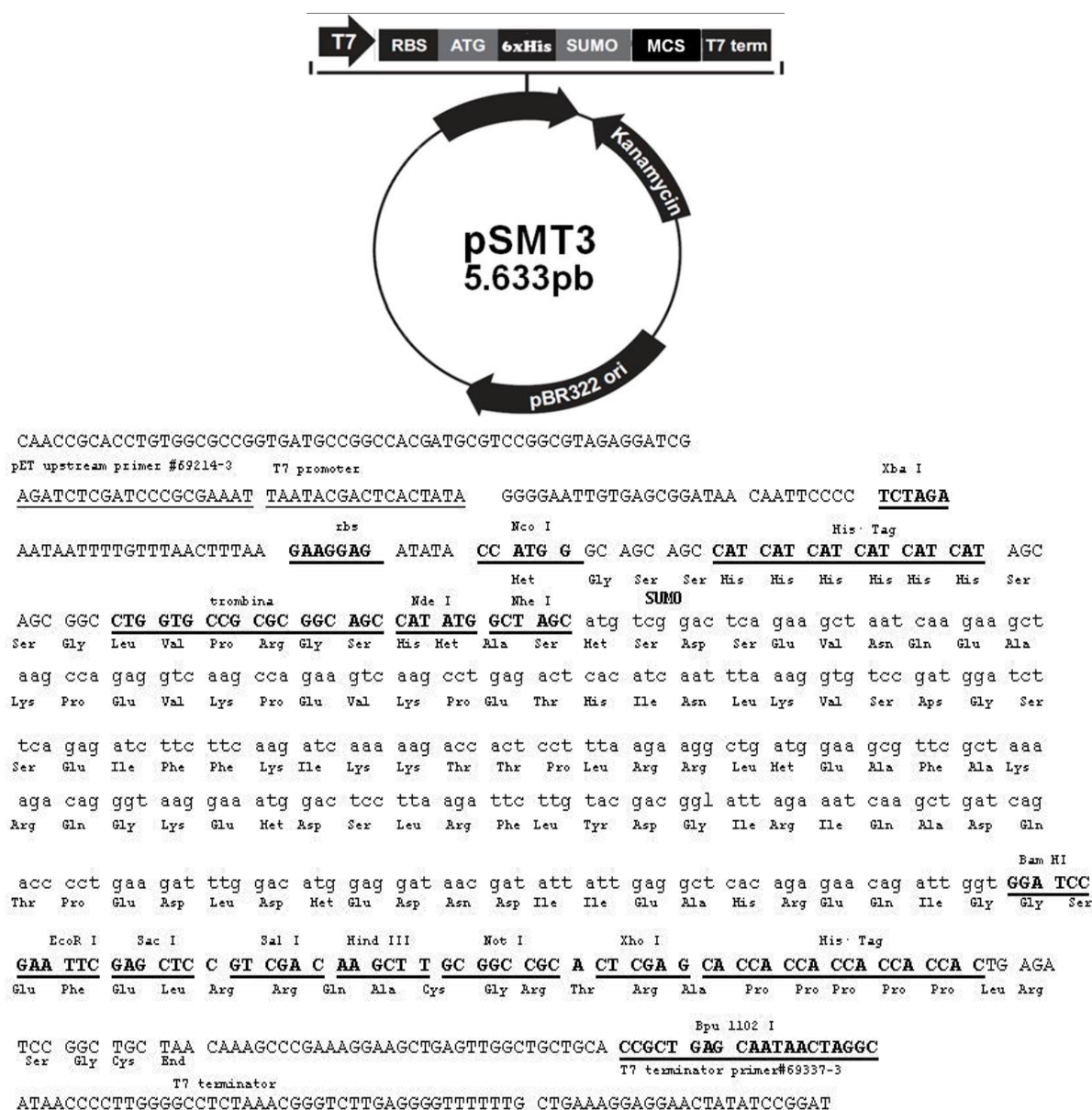
Nome do <i>primer</i>	Sequências do <i>primer</i>	Sítio de restrição
BamHI_F <Forward>	5'-ATATGATCCATGACGGCGTACATCCTGAC-3'	<i>Bam</i> HI
EcoRI_R: <Reverse>	5'- AACAGAATTCACCTTTCAGACGGTCCG CCAG -3'	<i>Eco</i> RI
EcoRI_TER_R <Reverse>	5'- AACAGAATTCTTAACCTTTCAGACGGTCCGCCAG -3'	<i>Eco</i> RI

Fonte: Elaborado pelo autor

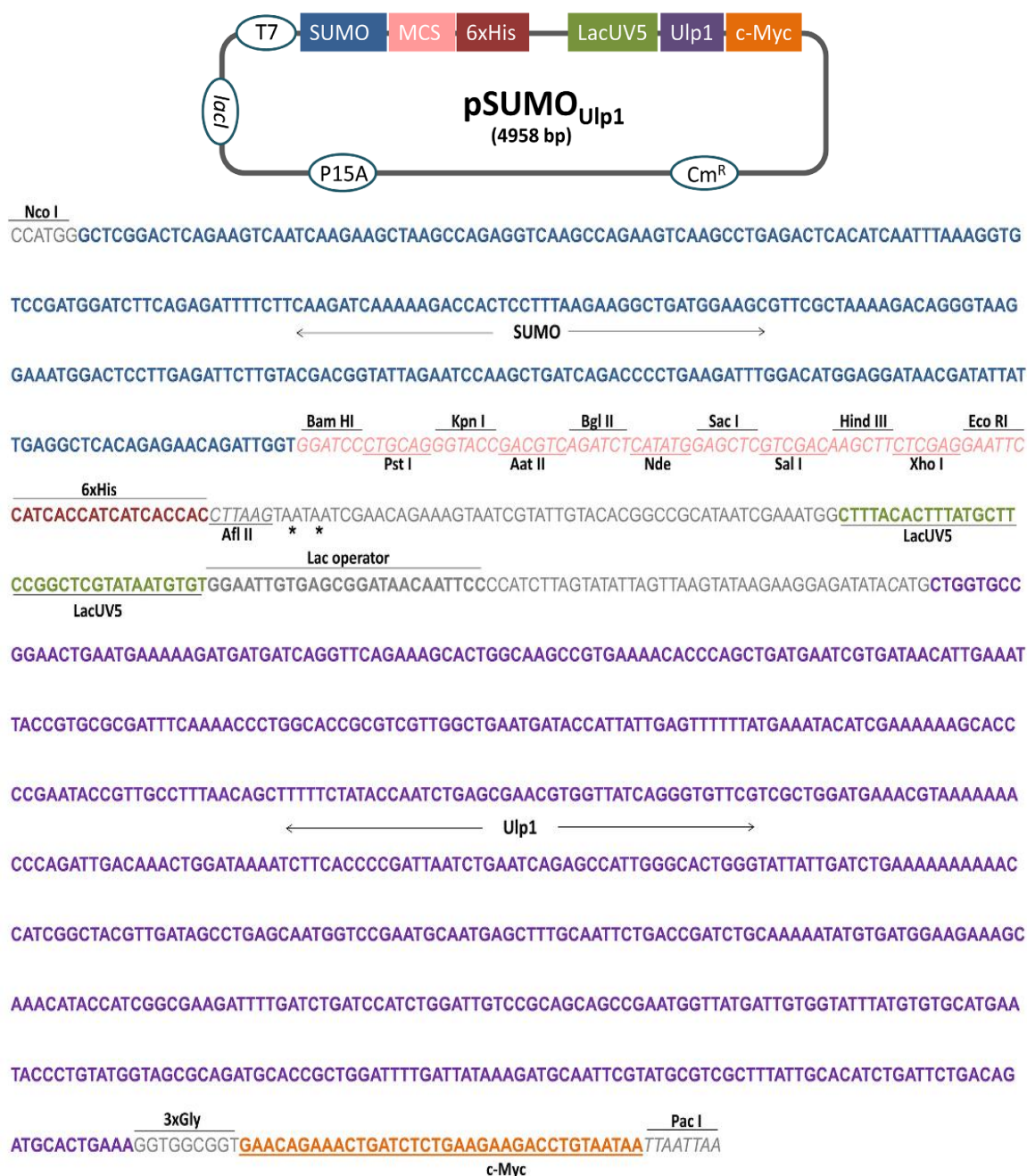
Estes *primers* contém os sítios de restrição reconhecidos para as enzimas de restrição *Bam*HI_F e *Eco*RI_TER_R para usar o vetor de expressão pSMT3 (Figura 11) e os primers para *Bam*HI_F e *Eco*RI_R para o vetor de expressão pSUMO_{Ulp1} (Figura 12). Sendo pSMT3 e pSUMO_{Ulp1} vetores de expressão fusionada a proteína SUMO (*Small*

Ubiquitin-like Modifier) e contém sítios de clivagem para trombina, Ulp1. O vetor pSMT3 expressa a proteína SUMO junto com uma cauda de 6xHis na porção N-terminal da toxina parE (BUTT et al., 2015), mas no vetor pSUMO_{Ulp1}, a proteína SUMO é expressa na porção N-terminal e a cauda de 6xHis é expressa na porção C-terminal, tornando possível sua purificação através da ligação com uma coluna de níquel (SHIMOKAWA-FALCÃO et al., 2017).

Figura 11. Mapa do vetor pSMT3 utilizado na clonagem de parE



Fonte: Adaptado de BUTT et al., 2015

Figura 12. Mapa do vetor pSUMO_{Ulp1} utilizado na clonagem de parE

Fonte: Adaptado SHIMOKAWA-FALCÃO et al., 2017

O protocolo de amplificação foi realizado com um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de buffer High Fidelity, 0,5 µL de dNTP, 0,5 µL de Taq High Fidelity Pol(Cellco®), 1,25 µL de cada *primer* (concentração final de 10 pmol/µL de cada *primer*), e aproximadamente 2 ng de DNA molde. Com isso, foi ajustado o volume final da reação de 25,0 µL com água. As reações de desnaturação foram realizadas em Termociclador Veriti (Applied Biosystems) na condição inicial de desnaturação a 95°C por 3 minutos, posteriormente 35

ciclos de 95°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos. Os produtos foram purificados utilizando o kit PCR (Cellco®). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV.

De acordo com a sequência de nucleotídeos de *parE*, foram desenhados e sintetizados *primers* complementares à extremidade da ORF do gene, os quais se ligam ao mesmo, servindo de ancoragem para a enzima Taq polimerase, responsável pela polimerização do DNA.

3.5.2. Construção de vetores de expressão

Para a expressão heteróloga das ORF's de *parE* foram utilizados os vetores de expressão pSMT3 e pSUMO_{Ulp1}. Os vetores e a sequência de *parE* foram clivadas com as mesmas enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI* os quais permitiriam a clonagem do gene no vetor de expressão pSMT3 e pSUMO_{Ulp1}. O produto purificado da reação de PCR foi utilizado para ligação nos vetores de expressão. Para a reação de ligação foram usados 100 ng do plasmídeo, 30 ng do produto amplificado purificado, 1 µL da enzima T4 DNA ligase 3 U.µL⁻¹, 2 µL do tampão de reação 5x em um volume total de 20 µL. A reação de ligação foi mantida a 4°C *overnight*.

3.5.3. Clonagem nos vetores pSMT3 e pSUMO_{Ulp1}

A reação de ligação foi utilizada para transformar por choque térmico, células de *E. coli* DH5α quimio competentes. A transformação foi realizada adicionando 200 µL de células de *E. coli* DH5α a 10 µL de produto de ligação (construção de *parE*-pSUMO_{Ulp1} e *parE*-pSMT3), em seguida cada solução foi incubada em banho-maria a 42°C por 1,5 minutos e novamente em gelo por 3 minutos. Após o choque térmico, foram adicionados 800 µL de meio Luria Bertani (LB) e incubado a 37°C por 1 h. Após esse período, 200 µL da cultura foi plaqueada em meio LB ágar contendo 25 µg.mL⁻¹ de canamicina para *parE*-pSMT3 e cloranfenicol para pSUMO_{Ulp1} e incubadas por 37°C por 16 h.

Uma das colônias positivas foi repicada em 5 mL de meio LB contendo 25 µg.mL⁻¹ de canamicina para *parE*-pSMT3 e cloranfenicol para *parE*-pSUMO_{Ulp1}. O DNA plasmidial foi extraído com o kit de mini-prep (Promega) utilizando o protocolo segundo fabricante. Posteriormente, esses plasmídeos foram utilizados para as reações de sequenciamento e clivagem com enzimas de restrição, com o intuito de confirmar a identidade da construção. O material extraído foi quantificado no nanodrop sendo obtidas aproximadamente para *parE*-pSMT3 99 ng.µL⁻¹ e para *parE*-pSUMO_{Ulp1} 83,6 ng.µL⁻¹ de DNA.

3.5.4. Transformação de *parE*-pSUMO_{Ulp1} e *parE*-pSMT3 em *E. coli* Origami (DE3)

O mesmo procedimento de transformação de células competentes de *E. coli* foi utilizado com as construções *parE*-pSMT3 e *parE*-pSUMO_{Ulp1}, por choque térmico em células quimio competentes que, após transformação, uma das colônias foi repicada em um pré-inóculo de 5 mL de meio LB líquido contendo 25 µg.mL⁻¹ de canamicina e cloranfenicol e incubadas por 37°C por 16 h a 250 rpm. Após esse período, foi realizada uma diluição de 1:100 de pré-inóculo em 500 mL de LB líquido com 25 µL.mL⁻¹ dos mesmos antibióticos, e a cultura foi mantida nas mesmas condições de temperatura e agitação até chegar em sua fase logarítmica de crescimento (DO=0,5 e λ=600 nm). A produção de proteínas foi induzida pela adição de IPTG (isopropil β-d-1-tio-galactopiranósideo) na concentração final de 0,4 mmol.L⁻¹ por 16 horas. A presença da proteína no sobrenadante foi verificada tomando alíquotas de 500 µL da cultura em intervalos de 1 hora para análise da expressão em SDS-PAGE 15%.

Após o período de indução, o volume total da cultura foi submetido à centrifugação em centrífuga Sorvall RC5C plus rotor SLA15000 (3000 x g; 4°C por 10 min). O precipitado contendo as bactérias foi ressuscitado em 25 mL de tampão de lise (Tris 10 mmol.L⁻¹, NaH₂PO₄ 50 mmol.L⁻¹ e NaCl 300 mmol.L⁻¹, pH 8,0) por litro de cultura e submetido à sonicação com 8 pulsos de 1 minuto com 20% de potência, intercalados por pausas de 30 segundos, em sonicador Sonic Desmembrator 500 (Fischer Scientific), para lise celular.

O lisado foi centrifugado em Sorvall RC5C plus rotor SS34 (3000 x g a 4°C por 10 min), para a separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado). A fração solúvel foi filtrada a vácuo em filtro de 0,45 µm e a fração insolúvel foi ressuscitada em tampão de lise (50 mL por litro de cultura), sendo coletados 500 µL de sobrenadante e 500 µL do precipitado ressuscitado em 5 mL de tampão de lise pH 8,0, os quais foram utilizados para posterior análise em um teste de solubilidade em SDS-PAGE 15%.

3.5.5. Purificação da proteína ParE

A presença da proteína (ParE-pSMT3 e ParE-pSUMO_{Ulp1} contendo uma sequência de seis histidinas na região N-terminal e uma na região C-terminal) no sobrenadante foi verificada em SDS-PAGE 15%. A purificação foi realizada em cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni-NTA *superflow* (Qiagen) a 4°C. A coluna foi pré-equilibrada, com 5 volumes de tampão de lise (pH 8,0), o sobrenadante da cultura induzida previamente filtrado foi adicionado. Após ligação da proteína à resina, foi realizada uma lavagem da coluna com

3 volumes de tampão de lise e seguiu-se para eluição da proteína em tampão de lise contendo concentrações crescentes de imidazol (10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 e 1000 mmol.L⁻¹), sendo 2 volumes das soluções com 10 a 100 mmol.L⁻¹ e 3 volumes da solução com 250 mmol.L⁻¹ de imidazol. As amostras eluídas foram analisadas em SDS-PAGE 15% corado com azul de comassie.

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. 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. Para todos os ensaios de inibição enzimática, inicialmente foram feitas triagens, utilizando ParELC3M e os peptídeo-conjugados sintetizados, em uma concentração inicial de 100 µmol.L⁻¹, afim de avaliar o potencial de inibição frente a cada uma das enzimas. Posteriormente, aqueles com atividade inibitória nesta concentração, foram selecionados e testados em concentrações decrescentes, a fim de se determinar a mínima concentração que venha a inibir 100% da atividade da topoisomerase (IC₁₀₀).

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*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Streptococcus pneumoniae*, foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 relaxado em tampão de ensaio na presença do peptídeo ou peptídeo-conjugado de interesse em diferentes concentrações, em um volume de reação total de 30 µL, conforme protocolo da Inspiralis Ltda. A incubação foi feita a 37°C por 30 min no tampão de ensaio (descrito abaixo). Posteriormente a reação foi interrompida pela adição de 3 µL de SDS 2% e incubação por 5 minutos a 65°C. Em seguida foram adicionados 15 µL de solução de STEB (sacarose 20%; Tris.HCl 0,05 mol.L⁻¹, pH 8,0, EDTA 0,05 mol.L⁻¹ e 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 min a 12.000 rpm e os sobrenadantes recolhidos e analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89 mmol.L⁻¹, ácido bórico 89 mmol.L⁻¹; EDTA 2 mmol.L⁻¹, pH 8,0), submetidas à tensão constante de 60 V a 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 TBE e analisado em um fotodocumentador Alpha Imager EP System da Alpha Innotech.

Escherichia coli

Tampão de diluição: Tris.HCl 50 mmol.L^{-1} ; KCl 100 mmol.L^{-1} ; DTT 2 mmol.L^{-1} ; EDTA 1 mmol.L^{-1} ; glicerol 50% (m/v); pH = 7,5;

Tampão de ensaio (5x): Tris.HCl 35 mmol.L^{-1} ; KCl 24 mmol.L^{-1} ; MgCl_2 , 4 mmol.L^{-1} ; Spermidina $1,8 \text{ mmol.L}^{-1}$; DTT, 2 mmol.L^{-1} ; ATP 1 mmol.L^{-1} ; glicerol 6,5% (v/v); Albumina $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$; pH = 7,5;

Streptococcus pneumoniae

Tampão de diluição: Tris.HCl 50 mmol.L^{-1} ; KCl 100 mmol.L^{-1} ; EDTA 1 mmol.L^{-1} ; DTT 2 mmol.L^{-1} ; glicerol 50% (m/v); pH = 7,5;

Tampão de ensaio (5x): Tris.HCl 35 mmol.L^{-1} ; KCl 24 mmol.L^{-1} ; MgCl_2 , 4 mmol.L^{-1} ; DTT 2 mmol.L^{-1} ; ATP 1 mmol.L^{-1} ; Spermidina $1,8 \text{ mmol.L}^{-1}$; Albumina $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$; glicerol 6,5% (m/v) pH = 7,5;

Mycobacterium tuberculosis

Tampão de diluição: Tris.HCl 50 mmol.L^{-1} ; DTT 5 mmol.L^{-1} ; glicerol 30% (m/v); pH = 7,9.

Tampão de ensaio (5x): HEPES.KOH 50 mmol.L^{-1} ; Acetato de magnésio 6 mmol.L^{-1} ; DTT 4 mmol.L^{-1} ; ATP 1 mmol.L^{-1} ; Glutamato de potássio 100 mmol.L^{-1} ; Spermidina 2 mmol.L^{-1} ; Albumina $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$; pH = 7,9.

3.6.2. Inibição da atividade da topoisomerase IV (Topo IV)

Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado pela atividade da Topo IV de *E coli*, e *S. pneumoniae* foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com $0,5 \mu\text{g}$ de plasmídeo pBR322 superenovelado na presença do peptídeo-conjugado de interesse em diferentes concentrações, em um volume total de reação de $30 \mu\text{L}$, conforme protocolo da Inspiralis Ltda. A incubação ocorreu a 37°C por 30 min 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.

Escherichia coli

Tampão de diluição: HEPES-KOH 40 mmol.L^{-1} ; DTT 1 mmol.L^{-1} ; EDTA 1 mmol.L^{-1} ; glutamato de potássio 100 mmol.L^{-1} ; glicerol 40% (m/v); pH = 7,6;

Tampão de ensaio 5x: HEPES-KOH 50 mmol.L^{-1} ; glutamato de potássio 100 mmol.L^{-1} ; acetato de magnésio 10 mmol.L^{-1} ; DTT 10 mmol.L^{-1} ; ATP 1 mmol.L^{-1} ; Albumina $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$; pH=7,6;

Streptococcus pneumoniae

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

Tampão de ensaio (5x): Tris.HCl 40 mmol.L⁻¹; NaCl 10 mmol.L⁻¹; MgCl₂ 6 mmol.L⁻¹; glutamato de potássio 200 mmol.L⁻¹; DTT 10 mmol.L⁻¹; ATP 1 mmol.L⁻¹; Soroalbumina bovina 0,05 mg.mL⁻¹; pH = 7,5;

3.6.3. Inibição da atividade da topoisomerase IA de E. coli

Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da topoisomerase IA de *E. coli*) foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado na presença do peptídeo-conjugado de interesse em diferentes concentrações, em um volume total de reação de 30 µL, conforme protocolo da New England Biolabs. A incubação foi feita a 37°C por 20 min no respectivo tampão de ensaio. Após o período de reação, a enzima foi inativada a 65°C por 20 min. Posteriormente as amostras foram tratadas, submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose e analisadas em fotodocumentador, conforme descrito no item 3.5.1.

Tampão de diluição: Tris.HCl 10 mmol.L⁻¹; KCl 50 mmol.L⁻¹; DTT 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): Acetato de potássio 50 mmol.L⁻¹; Tris.Acetato 20 mmol.L⁻¹, acetato de magnésio 10 mmol.L⁻¹; Albumina 100 µg /mL; pH = 7,9;

3.6.4. Inibição da atividade da Topoisomerase II de levedura

Os ensaios de inibição do relaxamento do DNA superenovelado (inibição da atividade da Topo II) de levedura foram realizados incubando-se 1 unidade (U) da enzima com 1 µL de ATP mais 0,5 µg de plasmídeo pBR322 superenovelado em tampão de ensaio na presença do peptídeo-conjugado de interesse em diferentes concentrações, em um volume total de reação de 30 µL, conforme protocolo da Inspiralis Ltda. A incubação foi realizada a 37°C por 30 min no tampão de ensaio. Posteriormente as amostras foram tratadas, submetidas à análise de eletroforese em gel de agarose e analisadas em fotodocumentador, conforme descrito no item 3.5.1.

Tampão de diluição: Tris.HCl 50 mmol.L⁻¹; NaCl 200 mmol.L⁻¹; DTT 5 mmol.L⁻¹; EDTA 1 mmol.L⁻¹; glicerol 50% (m/v); pH = 7,5;

Tampão de ensaio (5x): Tris.HCl 20 mmol.L⁻¹; KCl 200 mmol.L⁻¹; MgCl₂, 10 mmol.L⁻¹; glicerol 4% (v/v); pH = 7,9;

3.7. Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeo-conjugados sintetizados, visando a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs), foi utilizado o método de microdiluição, de acordo com o protocolo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M7-A10, 2015 e M27-A3, 2008, com modificações.

Foram utilizadas as cepas padrão de *E. coli* O153:H17 (ATCC 43895), *S. aureus* resistente (ATCC 14458) 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.

3.7.1. Preparação do inoculo

Uma alíquota de cada microrganismo armazenadas a -80°C , foi descongelada e subcultivada em meio específico sendo Muller Hinton (MH) para bactérias e caldo Sabouraud Dextrose (SDB) para leveduras, em estufa, a 37°C , por 24 horas. Após o período de crescimento, os microrganismos foram semeados em placas contendo meio ágar específico, sendo ágar MH e SDB para as bactérias e levedura, respectivamente, e então incubadas em estufa de crescimento a 37°C durante 24 h para as bactérias e 48 h para a levedura. A cultura-estoque assim obtida foi armazenada em geladeira, a 4°C , por no máximo 3 meses e após esse tempo, o processo descrito era repetido.

Após o período de incubação e com auxílio de uma alça de platina, transferiu-se 3 a 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 18 horas, para crescimento. Em seguida, cada inoculo foi utilizado nos ensaios de determinação de concentração inibitória mínima.

3.7.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para bactérias

Inicialmente, a concentração do inoculo foi ajustada espectrofotometricamente, de acordo com o padrão de turbidez McFarland 0,5 que obtém uma absorbância de 0,10 a 625 nm. Neste padrão, esta suspensão deve conter aproximadamente 1×10^8 UFC.mL⁻¹, sendo que, para a utilização nos ensaios, foi diluída em meio MH, resultando em uma suspensão bacteriana de concentração final de 1×10^6 UFC.mL⁻¹.

A atividade de inibição foi determinada pela técnica de diluição em microplacas. Resumidamente, 20 μL de tampão PBS foram adicionados a cada poço de uma microplaca

de 96 poços estéril. Alíquotas de 20 µL de cada peptídeo-conjugado foi diluído em série nos poços (100 até 0,39 µmol·L⁻¹) seguidas de adição de 80 µL de meio de cultivo MH. Finalmente, foram adicionados 100 µL de suspensão bacteriana em cada poço da microplaca, totalizando um volume final de 200 µL por poço.

As microplacas foram incubadas em uma estufa a 37°C por 24 horas e os testes foram realizados em duplicata. Como controles positivo e negativo do crescimento microbiano, foram empregados respectivamente, suspensão bacteriana e suspensão bacteriana contendo ciprofloxacina (Sigma N1628) nas mesmas concentrações utilizadas para os peptídeo-conjugados, 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 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 2.

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

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.

3.7.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 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 1x10⁶ 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 1x10³ UFC.mL⁻¹.

A atividade inibitória dos peptídeo-conjugados foi determinada pela técnica de diluição em microplacas. Neste caso, 20 µL de meio de tampão PBS foram adicionados a cada poço de uma microplaca de 96 poços estéril. Alíquotas de 20 µL de cada peptídeo-conjugado foi diluído em série nos poços (200 até 0,39 µmol·L⁻¹) seguidas da adição de 80 µL de meio

de cultivo SDB. Foram adicionados então, 100 μL da suspensão padronizada de *C. albicans*, em cada poço, totalizando um volume final de 200 μL por poço.

As microplacas foram incubadas em uma estufa a 37°C por 48 horas e os testes foram realizados em duplicata. Como controles positivo e negativo do crescimento microbiano foram empregados, respectivamente, suspensão de leveduras e suspensão de leveduras contendo fluconazol, nas mesmas concentrações utilizadas para os peptídeo-conjugados, 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 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. Ensaios de toxicidade

A análise de viabilidade celular foi realizada empregando o método colorimétrico de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio, Sigma), que se baseia na análise quantitativa dos cristais de formazana formados pela reação de redução do MTT por desidrogenases mitocôndrias. Desta forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (LOBNER, 2000; MOSMANN, 1983).

Foram utilizadas células da linhagem MRC-5 (ATCC CCL-171), correspondente a fibroblastos de tecido pulmonar derivado de um embrião caucasiano humano, em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Lonza), suplementado pela adição de 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco), gentamicina a 4 mg.100 mL⁻¹ de meio de cultura, estreptomicina a 1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de meio de cultura (denominado DMEM-C).

Inicialmente as células foram lavadas com solução salina tamponada de fosfato (PBS), removidas da garrafa com auxílio de tripsina e ajustadas para uma concentração de 5x10⁴ células.mL⁻¹, com auxílio de uma Câmara de Neubauer.

Posteriormente, 100 μL da cultura foram adicionados à uma placa de 96 poços e incubados a 37°C por 24 horas com 5% de CO₂. Como controle positivo de crescimento, foram utilizadas células em meio DMEM-C e como controle negativo de crescimento, apenas meio DMEM-C, sem células. Após o período, com as células já aderidas à placa, o

meio de cultura foi removido e foram adicionados 100 µL de solução PBS estéril para lavagem. Logo após o descarte do sobrenadante, inoculou-se 100 µL de solução de peptídeo diluído em DMEM-C nas concentrações: 200, 100, 50 e 25 µmol.L⁻¹ e mantidos em contato com as células durante 72 horas sob as mesmas condições de incubação.

Após o período, a solução foi descartada e foram adicionados 100 µL de solução PBS estéril para lavagem. Em seguida, após descartar o sobrenadante, foram adicionados aos poços 180 µL de solução composta por DMEM e PBS estéril, na proporção de 1:4, e então 20 µL de solução de MTT a 1,0 mg.mL⁻¹. Após, as placas foram incubadas por 4 horas a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 100 µL de álcool isopropílico e DMSO na proporção de 1:1 para dissolver dos cristais de formazan formados. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro de microplaca EPOCH da Biotek Instruments com filtro de 540 nm. Os testes foram realizados em triplicata, para os diferentes períodos e foram calculados e expressos em porcentagem de inibição de acordo com a equação 3.

$$\% Viabilidade = \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{(-)})}{Abs_{(+)} - Abs_{(-)}} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

Abs_{amostra}: representa a média da absorbância de cada amostra analisada;

Abs₍₋₎, representa a média da absorbância do controle negativo de meio (DMEM);

Abs₍₊₎ controle positivo de crescimento, média da absorbância do controle positivo, considerando-se como a maior viabilidade celular (100%) aquelas culturas celulares realizadas somente em presença de meio DMEM.

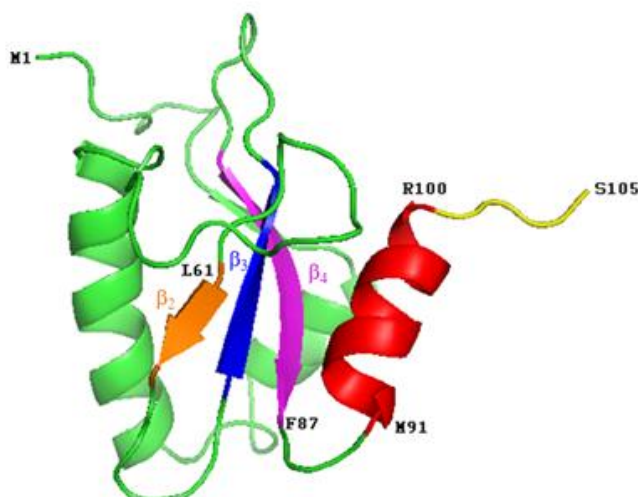
4. Resultados e Discussão

4.1. Design e síntese de peptídeo e peptídeo-conjugados

A sequência peptídica básica obtida e utilizada neste trabalho foi projetada tendo como base a estrutura primária da toxina bacteriana ParE (Figura 3), considerada um inibidor do processo de replicação, cujo alvo é a enzima DNA girase (JIANG et al., 2002).

Algumas evidências têm indicado que a região C-terminal desta toxina (contendo uma α -hélice e três folhas β) é uma região crítica para sua estabilidade e toxicidade e, portanto, com maior probabilidade de estar envolvida na interação com a DNA girase (FIEBIG et al., 2010; DALTON e CROSSON, 2010; BARBOSA et al., 2010). A estrutura de ParE de *E. coli* predita por modelagem molecular (Figura 13) foi utilizada como base para o design de uma série de peptídeos derivados, os quais foram estudados quanto a capacidade de inibir a atividade de topoisomerases bacterianas, dentre eles ParELC3.

Figura 13. Diagrama de fita de ParE de *E. coli*. A α -hélice C-terminal e as três folhas beta, β_2 , β_3 e β_4 , estão coloridas em vermelho, laranja, azul e magenta, respectivamente.



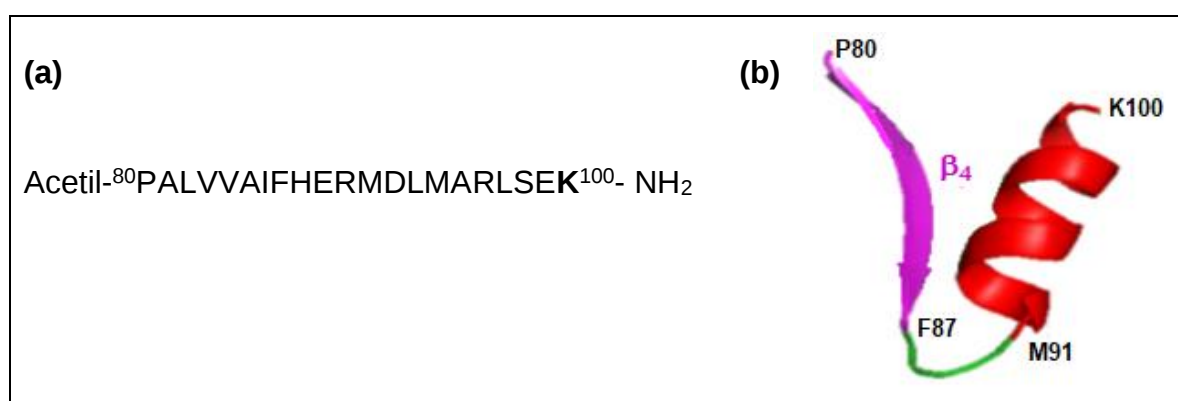
Fonte: BARBOSA et al., 2012.

Resultados promissores foram obtidos com este peptídeo, sendo obtidos valores de IC_{100} (concentração necessária para inibição completa da atividade da topoisomerase) de 20 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para DNA girase e topoisomerase IV, respectivamente (BARBOSA et al., 2012). No entanto, ParELC3 foi inativo contra bactérias devido à sua incapacidade de atravessar as membranas bacterianas. Para

contornar essa limitação, decidiu-se por conjugar a este peptídeo, estruturas moleculares complexas, tais como antibióticos ou seus análogos, na tentativa de um lado, facilitar a permeação e inserção intracelular do peptídeo e, de outro, melhorar sua especificidade, promovendo um efeito sinérgico com as moléculas conjugadas e aumentar a capacidade inibitória sobre as diferentes topoisomerases.

Nesse contexto, o peptídeo ParELC3M (Figura 14) foi projetado semelhantemente ao peptídeo ParELC3, que mantém uma das folhas beta (β_4) e a alfa hélice C-terminal, substituindo o resíduo de arginina na posição 100 (R100) por Lisina (Figura 14). Esta substituição teve como objetivo a criação de um sítio intramolecular (N_ϵ da Lisina) para a possível conjugação de outras estruturas moleculares não peptídicas, caso necessário.

Figura 14. (a) Estrutura primária de ParELC3M e b) diagrama de fita do peptídeo ParELC3M, a α -hélice no C-terminal e a folha β_4 , utilizada no desenho do peptídeo



Fonte: Elaborado pelo autor

Assim, o peptídeo ParELC3M foi sintetizado, utilizando uma resina do tipo Rink-amida MBHA com grau de substituição inicial de 0,55 mmol.g⁻¹, de acordo com a metodologia descrita no item 3.1. A síntese ocorreu sem maiores problemas, sendo necessários poucos reacoplamentos. Após o acoplamento dos aminoácidos, a massa de peptidil-resina obtida foi de 1.724 mg, das quais 1.200 mg foram armazenadas e o restante acetilado para obtenção de ParELC3M. O uso de Rink Amida MBHA resina e o procedimento de acetilação, foram necessários para mimetizar as ligações peptídicas nestas regiões, visto que nestes peptídeos, os resíduos das extremidades C- e N-terminais correspondem a um resíduo interno da sequência da toxina. As etapas de clivagem e extração também não apresentaram problemas e ocorreram com sucesso, resultando ao final 140 mg do peptídeo ParELC3M (Figura 14).

Com o intuito de desenvolver novos inibidores peptídicos de DNA topoisomerases, decidiu-se por adotar uma abordagem que envolve a hibridação de ParELC3M com estruturas moleculares com ação antibiótica ou seus precursores, formando os denominados peptídeo-conjugados. Para a síntese de cada um dos peptídeo-conjugados, foram utilizados 100 mg de peptidil-resina previamente armazenada, e a quantidade correspondente de CFX, CICPOQ e HOCAc, empregando-se a metodologia descrita no item 3.2.2. As reações de condensação exigiram algumas alterações no sistema solventes habitualmente utilizados, devido a diferença de solubilidade dos componentes, mudanças nos agentes de condensação, além da necessidade de repetições nas reações de condensação, especialmente para o CICPOQ. No caso do conjugado CFX-ParELC3M, foi necessário promover a proteção do anel piperazínico, com o grupo Boc, antes da condensação com o peptídeo, a fim de se evitar reações cruzadas entre moléculas de CFX. As etapas de clivagem e extração não apresentaram problemas e ocorreram com sucesso após algumas adaptações, resultando ao final 84, 35 e 30 mg dos peptídeo-conjugados CFX-ParELC3M, CICPOQ-ParELC3M e HOCAc-ParELC3M, respectivamente, todos na forma denominada bruta ou impura.

Para o peptídeo-conjugado CFXPip-ParELC3M, primeiramente foi acoplado um espaçador (ácido ϵ -aminocaprílico), o qual foi ativado com cloreto de bromoacetila para direcionar a reação ao anel piperazínico da CFX. Esta metodologia foi desenvolvida para a obtenção de um conjugado pertencente à categoria dos híbridos antimicrobianos onde ambos os elementos funcionais do híbrido exercem atividade antimicrobiana (p.ex. peptídeo + antibiótico), diferente dos demais que estão inseridos na categoria de conjugados antimicrobianos, onde uma porção funcional controla o acúmulo da outra parte do conjugado na célula (Figura 4). Ao final, após etapas de clivagem e extração, foram obtidos 60 mg do produto esperado, na sua forma bruta.

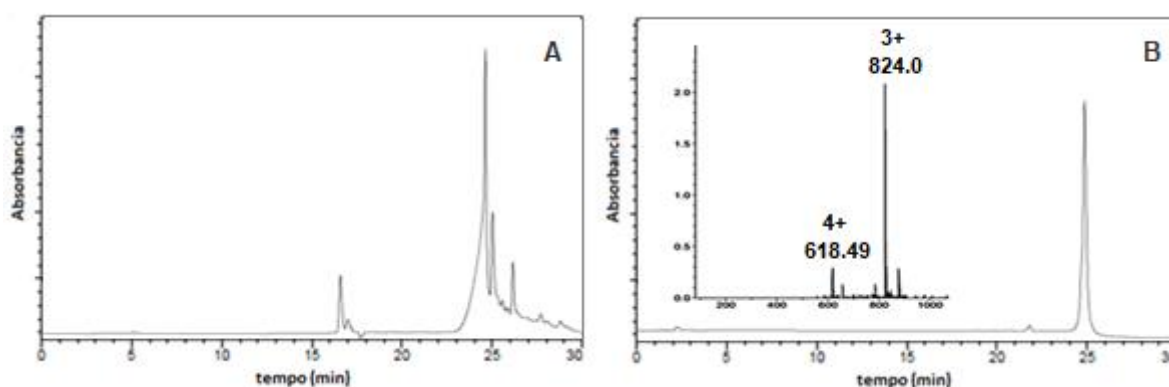
4.2. Purificação e caracterização

Após as etapas de síntese, clivagem e extração, uma pequena quantidade de ParELC3M e de cada peptídeo-conjugado liofilizado (aproximadamente 1 mg) foi dissolvida em 1 mL de água ultrapura, filtrada e submetida à análise qualitativa por CLAE-FR, como descrito no item 3.3. 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 – Metodologia).

As frações provenientes do processo de purificação, foram submetidas novamente a análises por CLAE-FR em modo analítico. O conteúdo dos tubos denominados puros foi reunido e liofilizado. Posteriormente, foram analisados por CLAE-FR em modo analítico para confirmação da pureza.

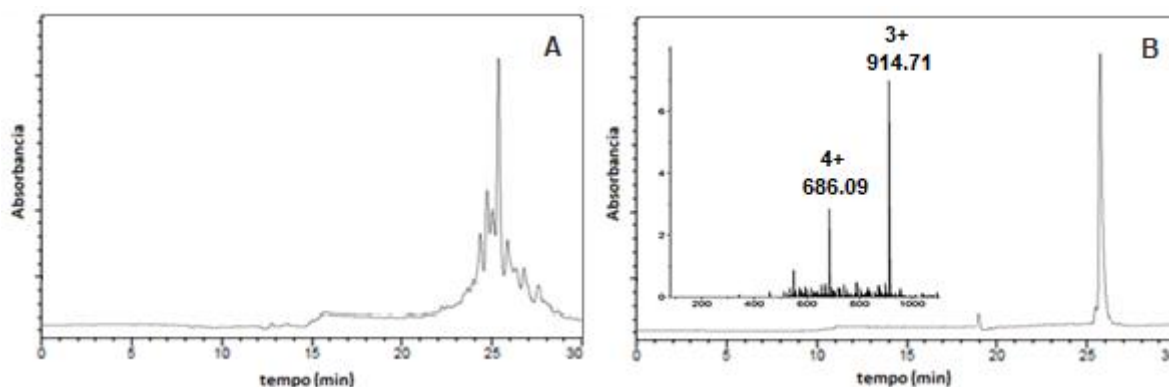
Os perfis cromatográficos dos peptídeos obtidos antes da purificação, bem como os respectivos cromatogramas obtidos após purificação estão representados nas Figuras 15 a 19. Os peptídeos purificados mostraram um único pico em relação aos cromatogramas obtidos a partir das análises do extrato bruto e o parâmetro tempo de retenção foram mantidos.

Figura 15. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo **ParELC3M** antes (A) e após purificação (B). Condições gerais de análise (Materiais e Métodos): gradiente linear 30 a 90% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. Figura inserida, espectro de massas ES+.



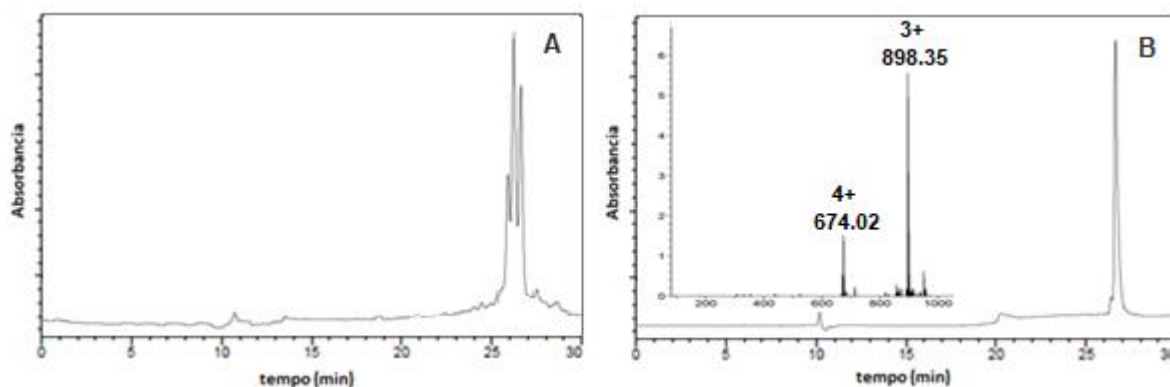
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo-conjugado **CFX-ParELC3M** antes (A) e após purificação (B). Condições gerais de análise (Materiais e Métodos): gradiente linear 5 a 95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. Figura inserida, espectro de massas ES+.



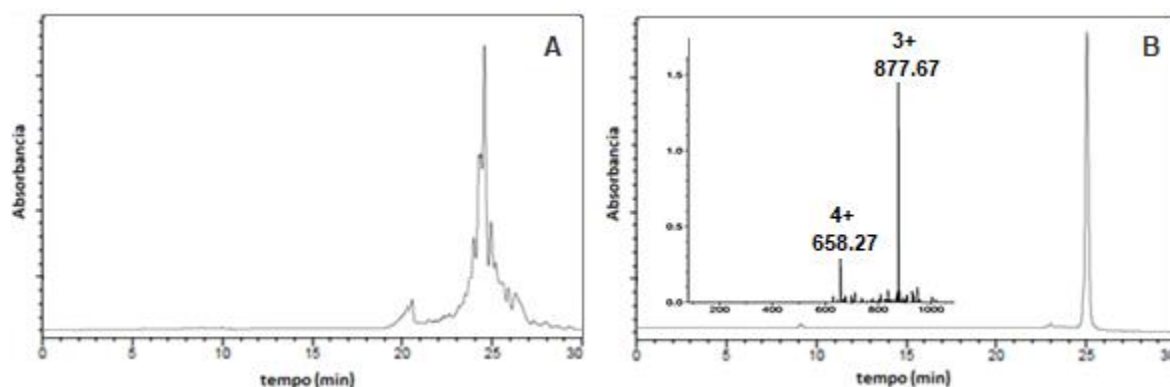
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo-conjugado **CICPOQ-ParELC3M** antes (A) e após purificação (B). Condições gerais de análise (Materiais e Métodos): gradiente linear 5 a 95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. Figura inserida, espectro de massas ES+.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo-conjugado **HOCAC-ParELC3M** antes (A) e após purificação (B). Condições gerais de análise (Materiais e Métodos): gradiente linear 5 a 95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. Figura inserida, espectro de massas ES+.

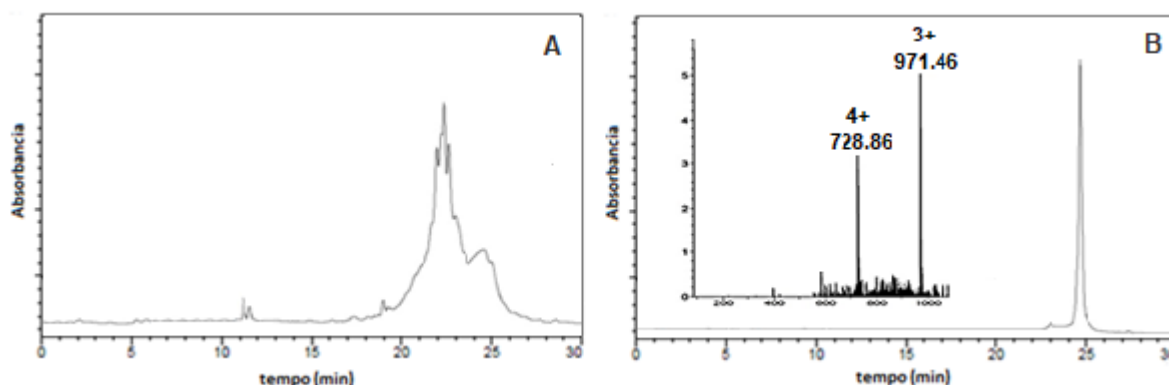


Fonte: Elaborado pelo autor.

As análises por CLAE-FR das frações puras mostraram que as purificações foram bem-sucedidas, atingindo para todas as amostras pureza relativa superior a 95%.

A caracterização dos peptídeo-conjugados puros foi realizada através de ensaios de espectrometria de massas, como descrito no item 3.3 e representados como figuras inseridas nos respectivos cromatogramas. Os valores de massa molecular obtidos no modo electrospray positivo [ES m/z: (M+H)⁺], apresentados na Tabela 2.

Figura 19. Perfis cromatográficos obtidos em escala analítica do peptídeo-conjugado **CFXPip-ParELC3M** antes (**A**) e após purificação (**B**). Condições gerais de análise (Materiais e Métodos): gradiente linear 5 a 95% de solvente B em 30 min, fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 220 nm. Figura inserida, espectro de massas ES+.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2. Massas moleculares teóricas e obtidas por espectroscopia de massas.

Amostra	Massa Molecular teórica (g/mol)	ES+ (z)	ES m/z (MM)
ParELC3M	2.467,99	+3 +4	824,00 618,49
CFX-ParELC3M	2.739,30	+3 +4	914,71 686,09
CICPOQ-ParELC3M	2.689,61	+3 +4	898,35 674,02
HOCAc-ParELC3M	2.628,13	+3 +4	877,67 658,27
CFXPip-ParELC3M	2.910,77	+3 +4	971,46 728,86

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados foram coincidentes com o teórico esperado, confirmando a identidade das estruturas sintetizadas. O conjunto de resultados, permite concluir que os procedimentos utilizados para síntese, clivagem de peptidil-resina e metodologias de purificação desenvolvidas foram adequados, levando à obtenção da sequência peptídica esperada e seus respectivos conjugados. O rendimento de cada produto, após o processo de purificação está representado na Tabela 3.

Tabela 3. Massa obtida de cada produto sintetizado, após o processo de purificação.

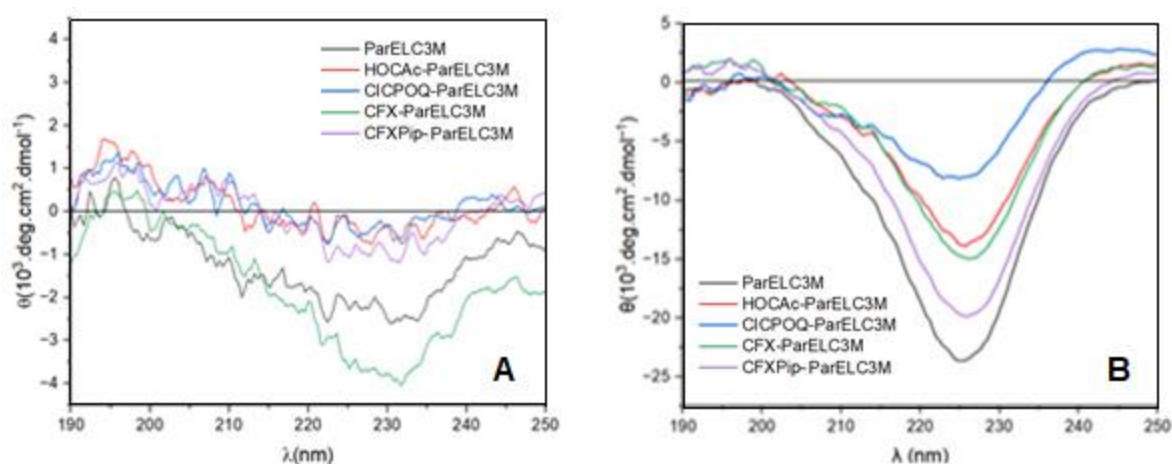
Amostra	Massa (mg)
ParELC3M	7,0
CFX-ParELC3M	7,1
CICPOQ-ParELC3M	2,6
HOAc-ParELC3M	8,8
CFXPip-ParELC3M	3,6

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3. Dicroísmo Circular

O conhecimento da estrutura secundária de proteínas e peptídeos de interesse biológico é de fundamental importância para ajudar a entender o modo de ação destas moléculas. Neste sentido, buscou-se avaliar o efeito da conjugação na estrutura secundária do peptídeo ParELC3M, por meio da técnica de dicroísmo circular. Os ensaios de DC para ParELC3M e seus conjugados foram conduzidos nas condições descritas em Materiais e Métodos, em duas diferentes condições: solução aquosa e TFE 60% em água (Figura 20), Utilizando como referência para a análise dos espectros, a Figura 10, que mostra as diferentes formas de espectros de CD, que são referentes às possíveis estruturas secundárias de proteínas.

Figura 20. Espectros de CD obtidos para ParELC3M e seus conjugados em (A) solução aquosa, (B) TFE 60%,



Fonte: Elaborado pelo autor

É na ligação peptídica (mais especificamente, no grupo amida) que o principal cromóforo das proteínas e dos peptídeos é encontrado. As transições eletrônicas presentes neste grupo acontecem principalmente na região do UV-distante (160-240nm), sendo assim esta é a região mais utilizada para investigar a estrutura secundária dessas moléculas. O grupo amida possui três orbitais π e dois pares não ligantes de elétrons (n) presentes no oxigênio. Assim, as transições possíveis são do tipo $\pi\pi^*$, que levam a molécula do estado ligante (π) para o antiligante (π^*), e as do tipo $n\pi^*$ (BULHELLER; RODGER; HIRST, 2007; WALLACE; JANES, 2009). A interpretação padrão do DC, considera duas transições, a transição $n\pi^*$ em comprimentos de onda mais longos (~215–230 nm) e a primeira transição $\pi\pi^*$ (NV 1) em comprimentos de onda mais curtos (~185– 200nm) (WOODY e KOSLOWSKI, 2002).

A análise do espectro de CD de ParELC3M em solução aquosa (Figura 20A), apesar de ruidoso, possivelmente à baixa concentração, apresentou uma tendência predominante de estruturação em folha- β , cuja banda positiva na região de 195 nm, está associada a uma transição $\pi\pi^*$ e a banda negativa em 225 nm, à transição $n\pi^*$ (WOODY, 1996). Este resultado confirma a existência da folha β_4 de ParE introduzida na estrutura do peptídeo. Os espectros referentes aos conjugados de ParELC3M, mostraram poucas variações, porém mantendo o mesmo perfil, evidenciando pouca ou nenhuma alteração da estrutura secundária do peptídeo após conjugação.

Em solução aquosa contendo TFE 60% (Figura 20B), ParELC3M mostrou a mesma estruturação observada em água, porém com maior definição. Há uma forte e definida banda negativa a 225 nm, o que reforça a tendência de estruturação em folha- β , já que TFE é um indutor de estrutura secundária. A conjugação, assim como em solução aquosa, promoveu pequenos *shifts* nos comprimentos de onda, possivelmente devido a interferência dos ligantes nas transições $\pi\pi^*$ das ligações amida de ParELC3M, mas sem modificar as características comuns de uma estruturação em folha- β .

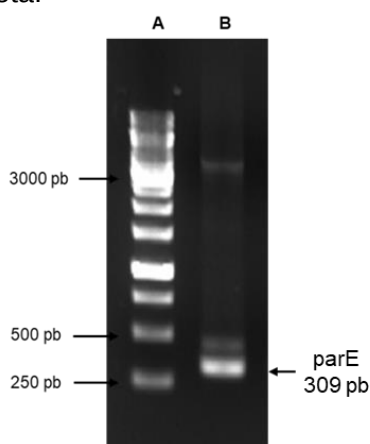
4.4. Produção de ParE

4.4.1. Amplificação

As reações de amplificação por PCR *High Fidelity* (HF) usando os oligonucleotídeos iniciadores contendo a sequência do sítio de restrição da enzima *BamHI* foi realizada com sucesso utilizando as condições descritas no item 3.5.1.

O fragmento amplificado, de 311 pb, pode ser visualizado na Figura 21. Este fragmento, após ter sido purificado, foi usado na reação de ligação nos vetores pSMT3 e pSUMO_{Ulp1}.

Figura 21. Amplificação da ORF de *parE* por PCR *HF* a partir do vetor pETDuet-1, utilizando os primers específicos. (A) Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Thermoscientific), (B) produto amplificado, indicado pela seta.

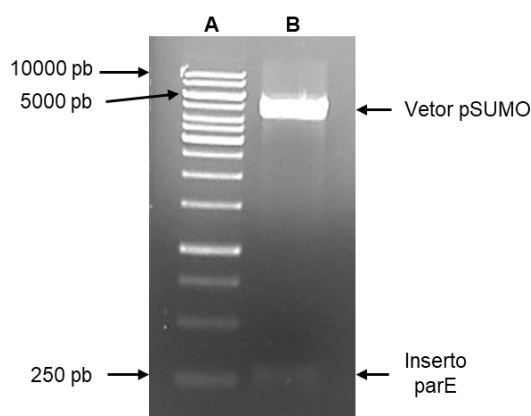


Fonte: Elaborado pelo autor

4.4.2. Clonagem

O produto da amplificação foi digerido e transformado em células de *E. coli* DH5 α . Dentre as colônias obtidas selecionaram-se algumas, ao qual foram submetidas a uma análise de PCR de colônia e pela clivagem dos vetores com as enzimas de restrição apropriadas para confirmação da clonagem (Figura 22). A PCR de colônia no vetor pSMT3 não teve sucesso.

Figura 22. Confirmação da clonagem pela clivagem do vetor pSUMO_{Ulp1} mais inserto. (A) Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Thermoscientific), (B) Alíquota de clivagem, indicado pela seta em 311 pb. Revelado por electroforese em gel de agarose 1% e brometo de etídeo.

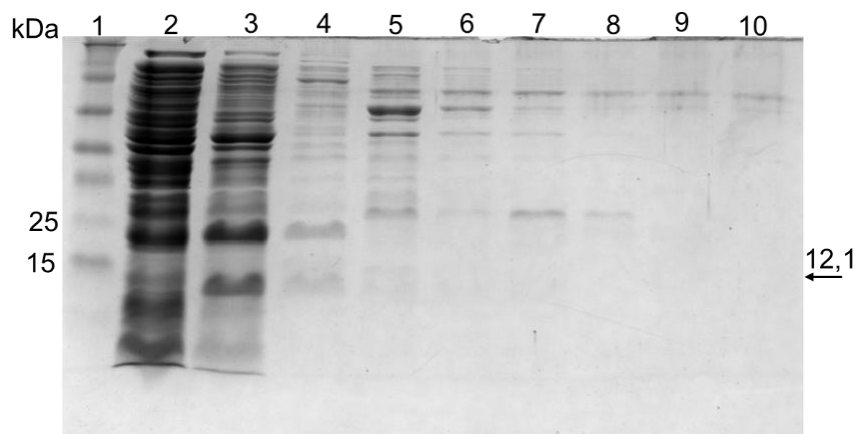


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.3. Expressão e purificação da toxina ParE em *E. coli* origami

O processo de produção e purificação de proteínas foi realizado de acordo ao descrito nos itens 3.5.4. e 3.5.5. As amostras coletadas permitiram a avaliação o perfil de expressão da proteína ParE de forma gradual a partir do início até a quarta hora de indução, bem como as frações solúveis confirmado em gel de poliacrilamida (SDS-Page 15%; Figura 23). Neste sentido, na análise em SDS-PAGE não foi constatada a presença de bandas com a massa molecular de 12.087 kDa nos clones induzidos utilizando o vetor pSUMO_{Ulp1}. Dado este resultado, poder-se supor que a atividade citotóxica da toxina ParE acarretou a morte da bactéria, o que impossibilitou sua obtenção e consequentemente o uso desta toxina, nos estudos comparativos de inibição de atividade das DNA topoisomerases.

Figura 23. Análise de SDS-PAGE da proteína ParE em *E. coli* origami. (1) Marcador molecular BlueClassic Prestained Protein Marker-Jena Bioscience.; (2) lavagem; (3) lavagem com imidazol 10 mmol.L⁻¹; (4) imidazol 25 mmol.L⁻¹; (5) imidazol 50 mmol.L⁻¹; (6) imidazol 75 mmol.L⁻¹; (7) imidazol 100 mmol.L⁻¹; (8) imidazol 250 mmol.L⁻¹; (9) imidazol 500 mmol.L⁻¹; (10) imidazol 1000 mmol.L⁻¹ em SDS-PAGE 15 %. A seta aponta onde estaria a banda da proteína expressa.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.5. Ensaios de inibição da atividade das topoisomerases bacterianas

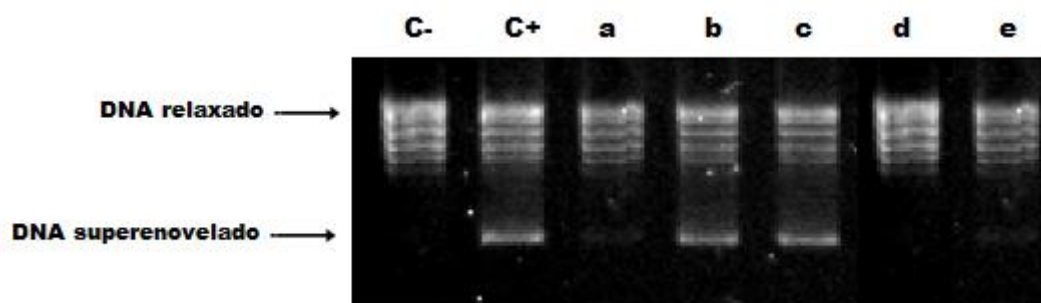
ParELC3M e seus conjugados, foram testados quanto a suas capacidades inibitórias sobre a atividade de duas diferentes topoisomerases do tipo II bacteriana (DNA girase e topoisomerase IV), bem como de uma do tipo I, a topoisomerase IA de *E. coli*.

4.5.1. Ensaios de inibição da atividade de DNA girase

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, na presença de ParELC3M e dos peptídeo-conjugados sintetizados.

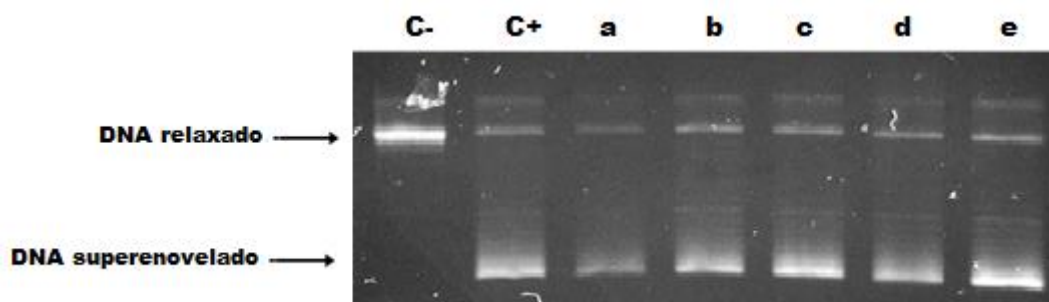
As Figuras 24, 25 e 26 mostram a eletroforese em gel, para a triagem inicial da ação dos produtos sintetizados, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a DNA girase de *E. coli*, de *S. pneumoniae* e *M. tuberculosis*, respectivamente.

Figura 24. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos **(a)** ParELC3M, **(b)** HOAc-ParELC3M, **(c)** CICPOQ-ParELC3M, **(d)** CFX-ParELC3M e **(e)** CFXPip-ParELC3M, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da **DNA girase de *E. coli***. C-: controle negativo (pBR322 relaxado); C+: controle positivo (pBR322 relaxado + 1U de DNA girase)



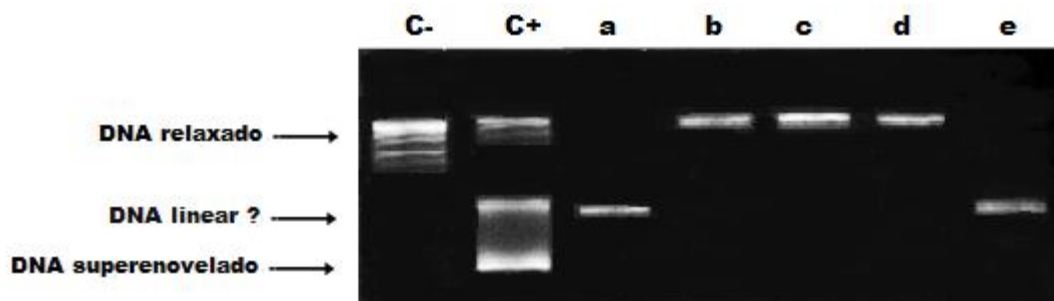
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 25. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos **(a)** ParELC3M, **(b)** HOAc-ParELC3M, **(c)** CICPOQ-ParELC3M, **(d)** CFX-ParELC3M e **(e)** CFXPip-ParELC3M, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da **DNA girase de *S. pneumoniae***. C-: controle negativo (pBR322 relaxado); C+: controle positivo (pBR322 relaxado + 1U de DNA girase).



Fonte: Elaborado pelo auto

Figura 26. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos **(a)** ParELC3M, **(b)** HOAc-ParELC3M, **(c)** CICPOQ-ParELC3M, **(d)** CFX-ParELC3M e **(e)** CFXPip-ParELC3M, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da **DNA girase de *M. tuberculosis***. C-: controle negativo (pBR322 relaxado); C+: controle positivo (pBR322 relaxado + 1U de DNA girase).



Fonte: Elaborado pelo autor.

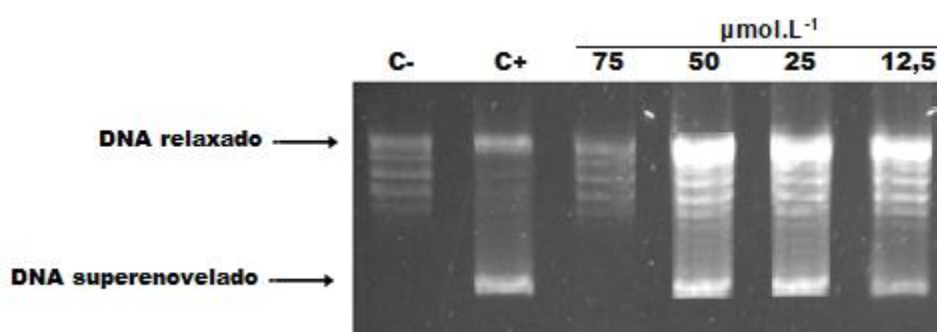
É possível observar nestas figuras, a especificidade inibitória dos produtos testados, na atividade da DNA girase de diferentes espécies. O peptídeo ParELC3M e os seus conjugados CFX-ParELC3M e CFXPip-ParELC3M, foram capazes de inibir a atividade da DNA girase de *E. coli*, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, porém, a exemplo dos demais peptídeo-conjugados, não inibiram a DNA girase de *S. pneumoniae*. Essa diferença de inibição apresentada entre as enzimas pode ser explicada pelas variações nas regiões funcionais ou catalíticas, que devem estar influenciando diretamente a capacidade de interação com os diferentes compostos.

Por outro lado, na triagem realizada para a DNA girase de *M. tuberculosis*, todos os peptídeos apresentaram inibição de atividade enzimática, no entanto, as bandas produzidas na ação do peptídeo ParELC3M e do conjugado CFXPip-ParELC3M, diferem daquelas produzidas por HOAc-ParELC3M, CICPOQ-ParELC3M e CFX-ParELC3M (Figura 26), o que pode levar a duas conclusões possíveis, em relação aos produtos formados: 1) inibição com formação de topoisômeros distintos, ou seja DNAs de diferentes números de ligação ou 2) produção de DNA linear. Neste último, o peptídeo e o seu conjugado com ciprofloxacina (CFXPip-ParELC3M), podem estar inibindo a atividade da DNA girase, logo após a etapa de clivagem da dupla fita, levando a um aumento na quantidade de DNA circular aberto e possivelmente à produção de DNA linear, o que justificaria o aparecimento da única banda entre as bandas de DNA relaxado e DNA superenovelado.

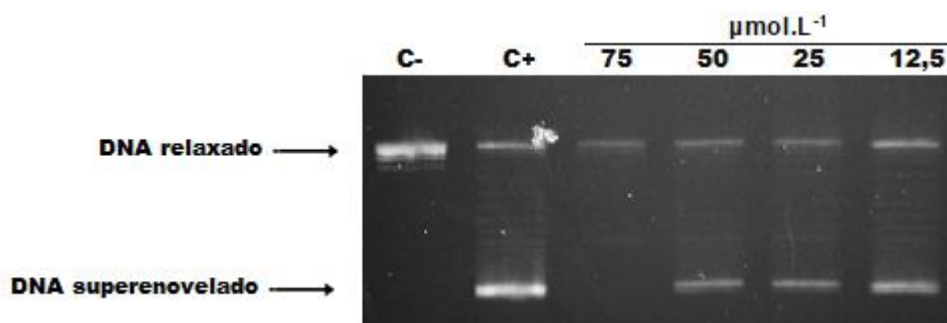
Após os ensaios de triagem, o peptídeo e os conjugados selecionados como inibidores da DNA girase foram então submetidos aos ensaios de determinação da concentração requerida para inibição completa da atividade enzimática (IC_{100}) (Figuras 27 e 28).

Figura 27. Eletroforese em gel para determinação de IC_{100} de (a) ParELC3M, (b) CFX-ParELC3M e (c) CFXPip-ParELC3M sobre a atividade da **DNA girase de *E. coli***. C -: controle negativo (pBR322 relaxado); C+: controle positivo (pBR322 relaxado + 1U de DNA girase). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo ou conjugado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

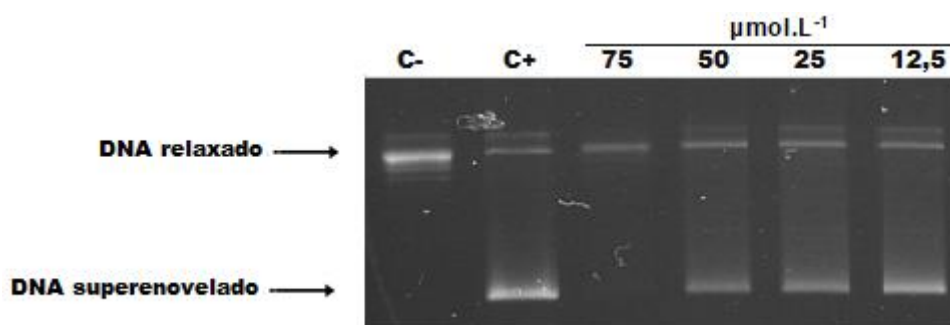
(a)



(b)

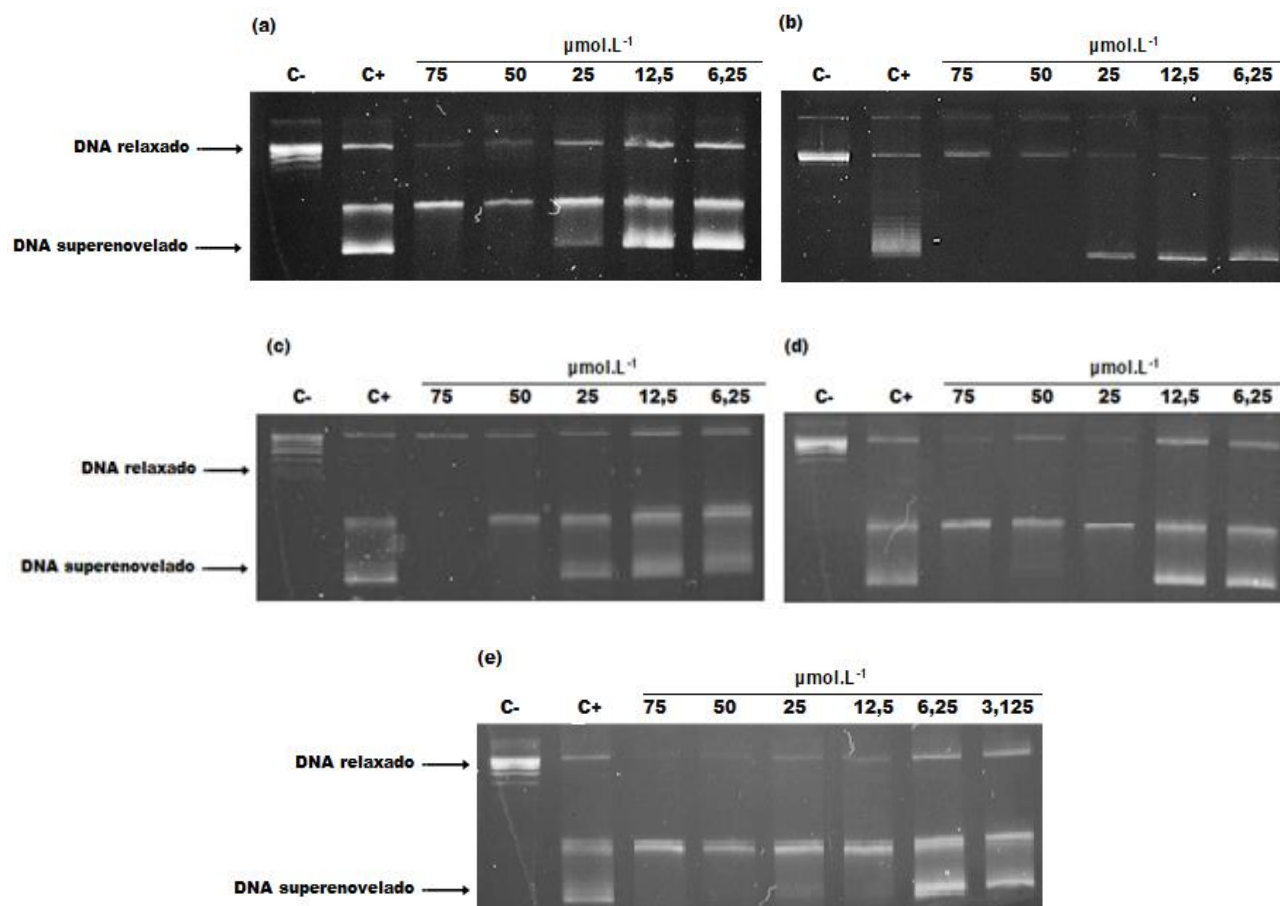


(c)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 28. Eletroforese em gel para determinação de IC_{100} para **(a)** ParELC3M, **(b)** HOAc-ParELC3M, **(c)** CICPOQ-ParELC3M, **(d)** CFXPip-ParELC3M e **(e)** CFX-ParELC3M sobre a atividade da **DNA girase de *M. tuberculosis***. C-: controle negativo (pBR322 relaxado); C+: controle positivo (pBR322 relaxado + 1U de DNA girase). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo ou conjugado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 27 observa-se um padrão de inibição muito parecido tanto para o peptídeo ParELC3M quanto aos seus conjugados com ciprofloxacina, ou seja, todos apresentaram um IC_{100} de $75 \mu\text{mol.L}^{-1}$, o que mostra que a conjugação deste antibiótico, seja no seu grupo carboxílico ou no seu anel de piperazina, não provocam qualquer alteração no perfil inibitório do peptídeo, na atividade da DNA girase de *E. coli*. Comparativamente ao peptídeo ParELC3, cujo IC_{100} foi de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, para esta mesma enzima (BARBOSA et al., 2012), a troca de um resíduo de arginina da posição 100, por uma lisina em ParELC3M foi suficiente para reduzir a atividade inibitória do peptídeo em cerca de 75%, evidenciando a importância deste resíduo para a manutenção da α -hélice C-terminal e consequentemente na interação com a enzima.

Em relação à DNA girase de *M. tuberculosis*, os valores de IC₁₀₀ obtidos foram sempre inferiores àqueles obtidos pela respectiva isoforma de *E. coli*. O peptídeo ParELC3M mostrou um IC₁₀₀ de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 28a), valor semelhante aos obtidos para os conjugados HOCAc-ParELC3M e CICPOQ-ParELC3M (Figuras 28b e 28c), evidenciando novamente que a conjugação com o derivado cumarínico (HOCAc) ou com o derivado quinolônico sem o anel da piperazina (CICPOQ), não altera a ação inibitória de ParELC3M sobre a DNA girase. O efeito da troca de resíduo de aminoácido na posição 100, não pôde ser avaliado pois não há estudos relativos à inibição da DNA girase de *M. tuberculosis*, pelo peptídeo ParELC3.

Por outro lado, os peptídeo-conjugados CFXPip-ParELC3M e CFX-ParELC3M, apresentaram os melhores valores de IC₁₀₀ para a DNA girase de *M. tuberculosis*, 25 e 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente (Figuras 28d e 28e). Aparentemente, o anel de piperazina, presente nestes dois conjugados, é o responsável pela melhora sensível, na ação inibitória do peptídeo, haja vista que o ligante CICPOQ, que não contém este anel na sua estrutura, resultou em um maior IC₁₀₀. Ademais, este anel aparenta exercer um papel importante na interação com a enzima, caracterizada pelo menor IC₁₀₀ observado para o peptídeo-conjugado CFX-ParELC3M, que contém este anel livre na sua estrutura, diferentemente de CFXPip-ParELC3M cujo anel se encontra ligado covalentemente com um ligante que o conecta ao peptídeo.

Estes ensaios de determinação de IC₁₀₀ também foram importantes para se concluir quanto aos produtos formados na ação de ParELC3M e do conjugado CFXPip-ParELC3M sobre a DNA girase de *M. tuberculosis*, que a princípio poderia vir a ser um topoisômero diferente ou um DNA linear. Aparentemente, trata-se de diferentes topoisômeros uma vez que a banda que foi observada na triagem, apenas para estes dois compostos, também foi observada para os demais. Inclusive esta mesma banda aparece durante a ação da DNA girase, na ausência de inibidores, o que caracteriza o aparecimento de um novo topoisômero durante a atividade enzimática, que permanece mesmo após a adição de um dos inibidores testados.

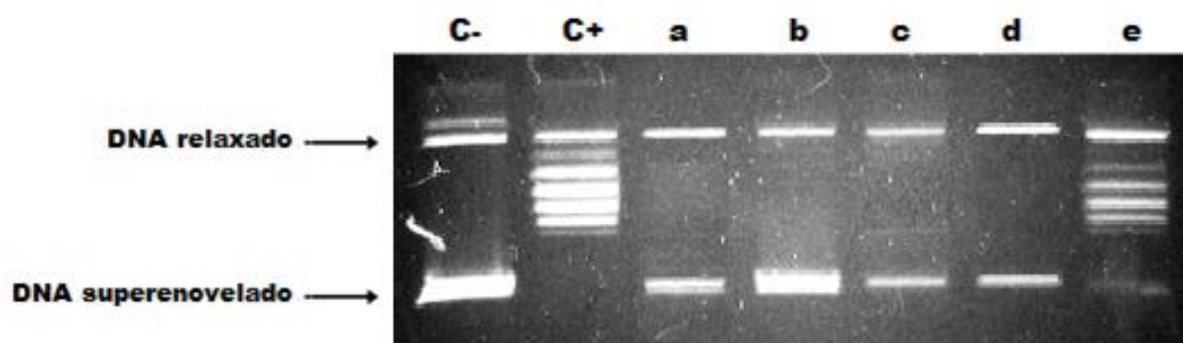
4.5.2. Ensaios de inibição da atividade de topoisomerasas IV

Ensaios de inibição da atividade da topoisomerase IV (Topo IV) de *E. coli* e *S. pneumoniae* 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. pneumoniae*, também foi realizada na presença de ParELC3M e seus conjugados e submetidos à eletroforese em gel

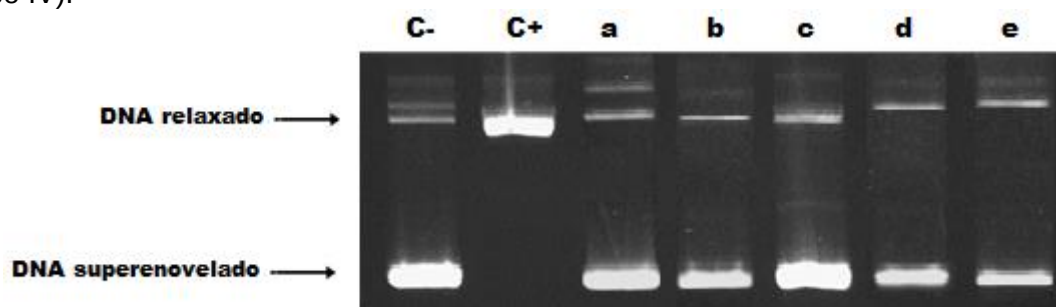
Diferentemente dos resultados obtidos para a DNA girase, tanto o peptídeo ParELC3M e seus respectivos conjugados, inibiram a atividade da Topo IV de *E.coli* e de *S. pneumoniae* na reação de triagem inicial, a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figuras 29 e 30).

Figura 29. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos **(a)** ParELC3M, **(b)** HOCAc-ParELC3M, **(c)** CICPOQ-ParELC3M, **(d)** CFX-ParELC3M e **(e)** CFXPip-ParELC3M, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da **Topo IV** de *E. coli*. C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo IV).



Fonte: Elaborado pelo autor.

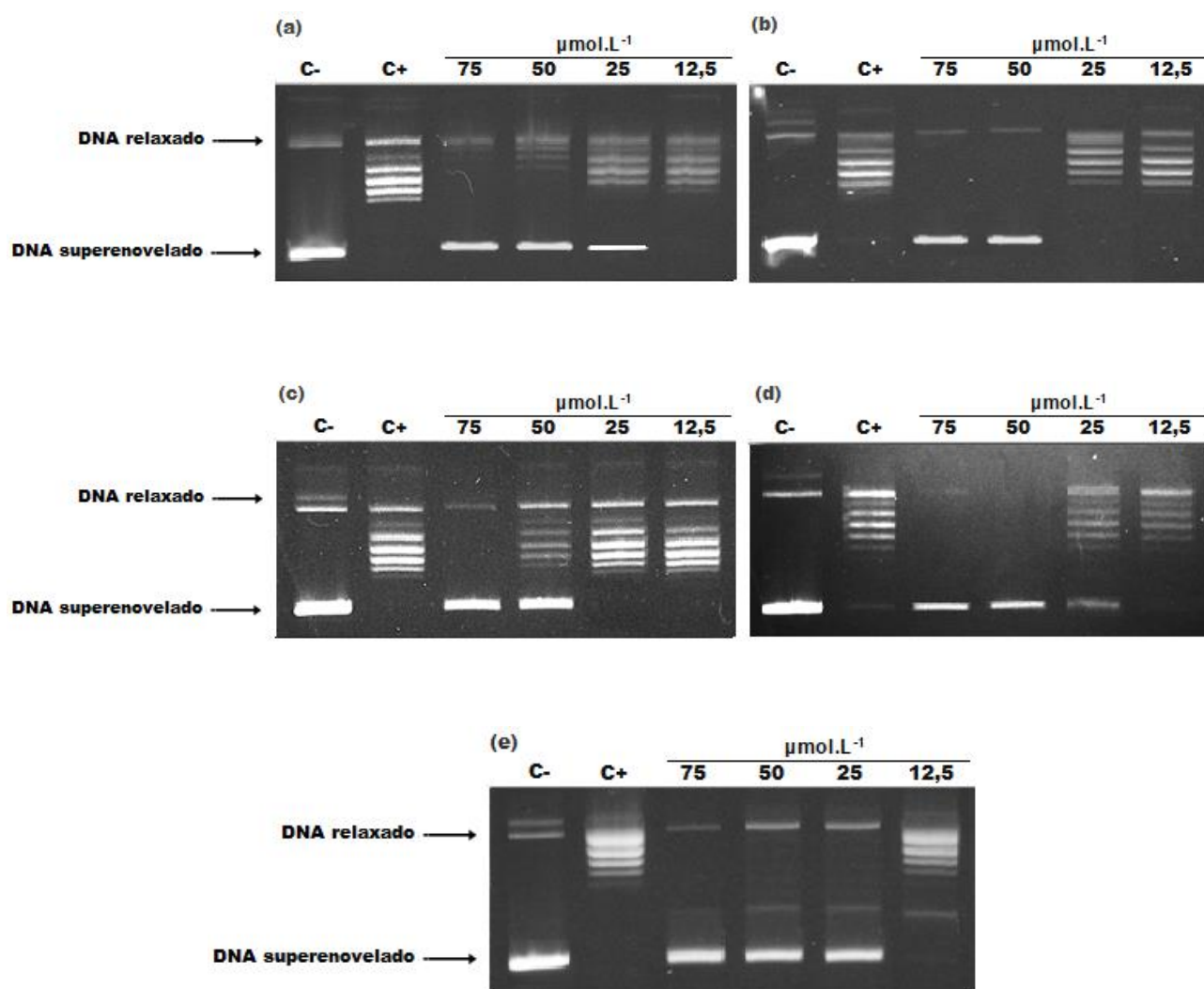
Figura 30. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos **(a)** ParELC3M, **(b)** HOCAc-ParELC3M, **(c)** CICPOQ-ParELC3M, **(d)** CFX-ParELC3M e **(e)** CFXPip-ParELC3M, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da **Topo IV** de *S. pneumoniae*. C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo IV).



Fonte: Elaborado pelo autor.

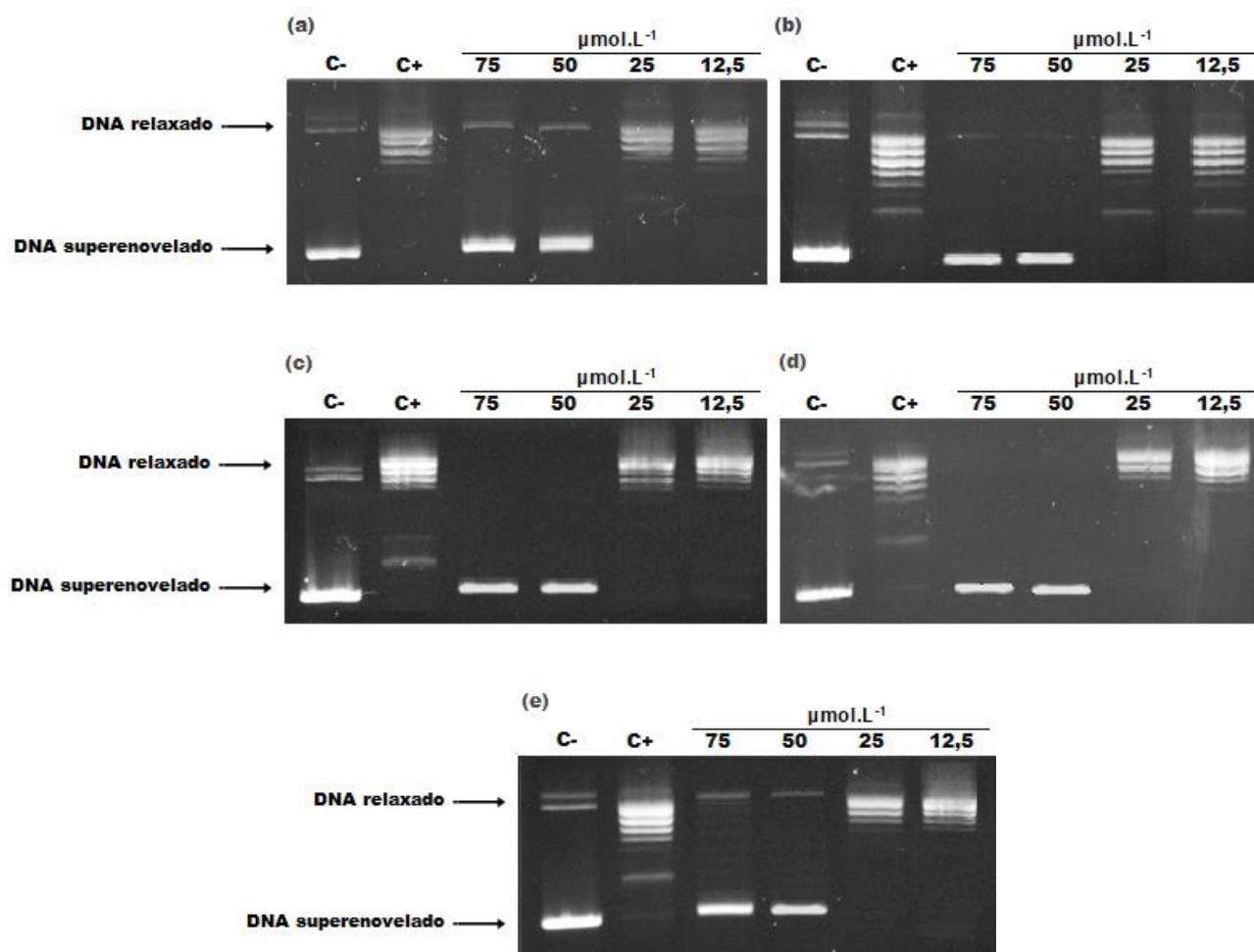
Todas as amostras foram então selecionadas como inibidores da Topo IV de *E. coli* e de *S. pneumoniae* e, portanto, submetidas aos ensaios de determinação da concentração requerida para inibição completa da atividade enzimática (IC₁₀₀) (Figuras 31 e 32).

Figura 31. Eletroforese em gel para determinação de IC₁₀₀ para (a) ParELC3M, (b) HOAc-ParELC3M, (c) CICPOQ-ParELC3M, (d) CFX-ParELC3M e (e) CFXPip-ParELC3M sobre a atividade da **Topo IV de *E. coli***. C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo IV). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo ou conjugado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32. Eletroforese em gel para determinação de IC_{100} para **(a)** ParELC3M, **(b)** HOAc-ParELC3M, **(c)** CICPOQ-ParELC3M, **(d)** CFX-ParELC3M e **(e)** CFXPip-ParELC3M sobre a atividade da **Topo IV de *S. pneumoniae***. C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo IV). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo ou conjugado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparativamente à DNA girase, os valores de IC_{100} obtidos para a topoisomerase IV de *E. coli*, foram de duas a três vezes inferiores (duas vezes para a topoisomerase de *S. pneumoniae*) independentemente da amostra testada. Esse resultado mostra que análogos de ParE, conjugados ou não, e provavelmente a toxina ParE, interagem diferentemente com as duas enzimas, a despeito da origem das mesmas. Por outro lado, ParELC3M, CFX-ParELC3M e CFXPip-ParELC3M foram mais eficientes na inibição da atividade da topoisomerase IV de *E. coli* ($IC_{100} = 25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em comparação à enzima de *S. pneumoniae* ($IC_{100} = 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Novamente, esta diferença na inibição entre as enzimas, pode ser explicada pela baixa porcentagem de

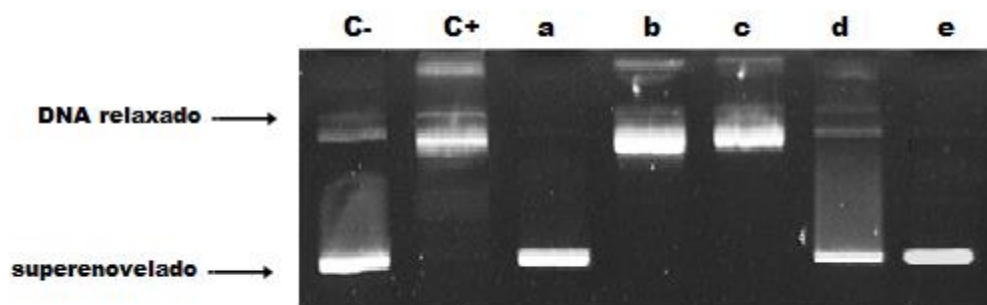
identidade entre as enzimas de diferentes microrganismos, o que resulta em variações nas regiões funcionais e que devem estar influenciando diretamente na capacidade de interação com os diferentes compostos. Vale ressaltar novamente a importância do resíduo constante na posição 100 do peptídeo. A troca deste resíduo por uma lisina em ParELC3M levou a um aumento no valor de IC_{100} para a enzima de *Escherichia coli*, de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (ParELC3 - BARBOSA et al., 2012) para $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (ParELC3M - Figura 31a). Esta perda de eficiência inibitória evidencia novamente a importância deste resíduo para a manutenção da α -hélice C-terminal e consequentemente na interação do peptídeo com a enzima.

4.5.3. Ensaios de inibição da atividade de Topo IA de *E. coli*

Na sequência de investigação do potencial inibitório de ParELC3M e seus conjugados, também foram realizados ensaios de inibição da topoisomerase IA de *E. coli*. Topoisomerases do tipo IA, presentes em todos os patógenos bacterianos, têm sido consideradas como alvos potenciais para novos antibacterianos (TSE-DINH, 2015). Estas enzimas participam de vários processos essenciais ao metabolismo celular, promovendo o relaxamento de superenrolamentos negativos do DNA (VOS et al., 2011). Assim, a reação de relaxamento do DNA superenrolado catalisada pela topoisomerase IA de *E. coli* foi realizada na presença de ParELC3M e seus conjugados, e submetidos à eletroforese em gel.

Com exceção de HOCAc-ParELC3M e CICPOQ-ParELC3M, os demais inibiram completamente a atividade da enzima na concentração inicial de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, como pode ser observada pelas bandas atribuídas aos respectivos topoisômeros da Figura 33.

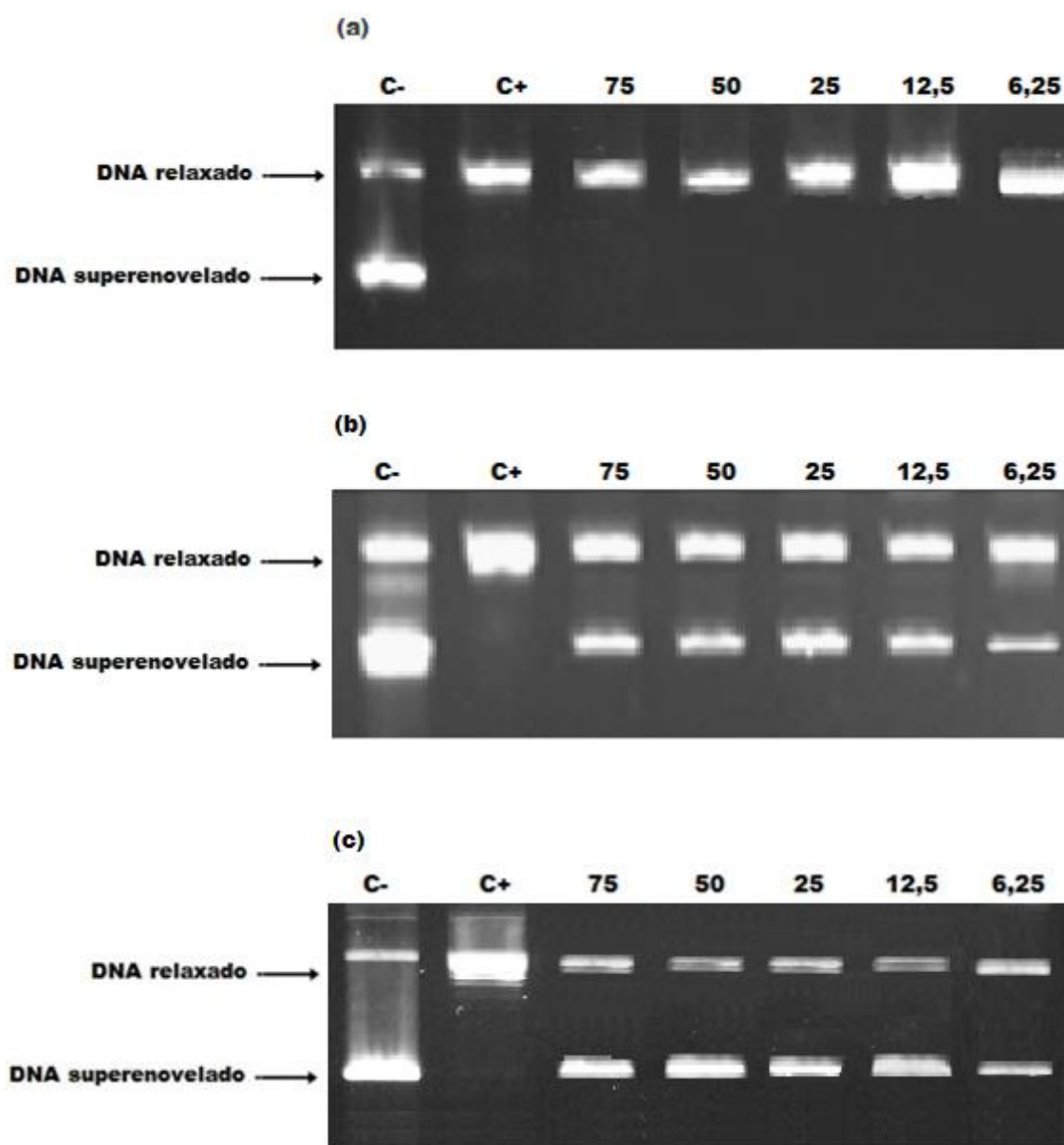
Figura 33. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos **(a)** ParELC3M, **(b)** HOCAc-ParELC3M, **(c)** CICPOQ-ParELC3M, **(d)** CFX-ParELC3M e **(e)** CFXPip-ParELC3M, na concentração de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da **Topo IA de *E. coli***. C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo IA).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas reações de determinação IC_{100} (Figura 34), o peptídeo ParELC3M não inibiu a atividade da enzima nas concentrações inferiores a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 34a), enquanto CFX-ParELC3M e CFXPip-ParELC3M inibiram a enzima de modo semelhante ($IC_{100} = 6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Figura 34. Eletroforese em gel para determinação de IC_{100} para **(a)** ParELC3M, **(b)** CFX-ParELC3M e **(c)** CFXPip-ParELC3M sobre a atividade da **Topo IA de *E. coli***. C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo IA). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo ou conjugado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nestes ensaios de determinação da IC₁₀₀ (Figura 34), os peptídeo-conjugados CFX-ParELC3M e CFXPip-ParELC3M, constituídos por uma molécula de CFX conjugada ao peptídeo, mas que diferem na posição onde se encontra ligada a cadeia peptídica, inibiram a enzima de modo idêntico (6,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), enquanto os demais, conjugados com ligantes distintos, não inibiram a enzima.

Interessante é o fato que os dois melhores inibidores de Topo IA de *E. coli* foram aqueles conjugados com a CFX. CFX é uma fluoroquinolona que atua como agente bacteriano de amplo espectro e que tem como alvo intracelular as topoisomerases do tipo II, tal como a DNA girase e a Topo IV, e não topoisomerases do tipo I. O fato de conjugar este tipo de fármaco a um peptídeo que também inibe essa enzima permite concluir que CFX-ParELC3M e CFXPip-ParELC3M são os mais recentes inibidores da Topoisomerase IA bacteriana desenvolvidos até o momento. Esses resultados destacam a importância de realizar um estudo de modelagem molecular mais aprofundado sobre o mecanismo de ação desses compostos, o que merece atenção em pesquisas futuras.

Os valores de IC₁₀₀ para cada uma das amostras testadas para as reações de superenrolamento e relaxamento, catalisadas pelas enzimas DNA girase, Topo IV e Topo IA das diferentes bactérias, estão detalhados na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação da atividade inibitória do peptídeo ParELC3M e respectivos conjugados em topoisomerases bacterianas.

Peptídeo	IC ₁₀₀ ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)					
	DNA Girase			Topo IV		Topo I
	<i>E. coli</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
ParELC3M	75	Não inibe	50	25	50	100
HOAc-ParELC3M	Não inibe	Não inibe	50	50	50	Não inibe
CICPOQ-ParELC3M	Não inibe	Não inibe	50	50	50	Não inibe
CFX-ParELC3M	75	Não inibe	12,5	25	50	6,25
CFXPip-ParELC3M	75	Não inibe	25	25	50	6,25

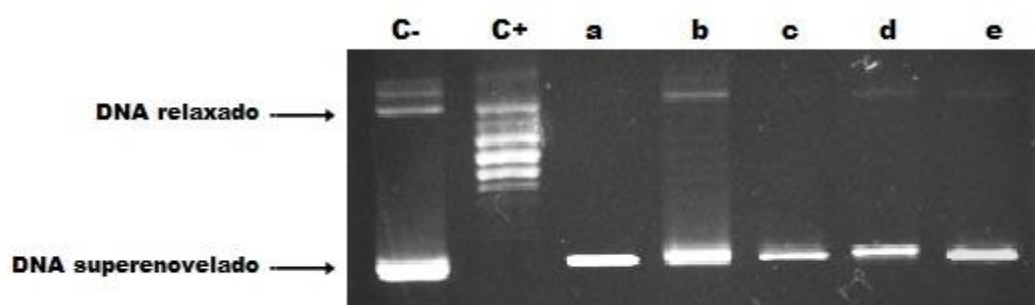
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.4. Ensaios de inibição da atividade da Topo II de levedura

As leveduras pertencente ao reino fungi, são organismos eucarióticos. Expressam uma única Topo II, enquanto eucariotos superiores expressam duas formas distintas da enzima, topoisomerase II α e II β (MCCLENDON e OSHEROFF, 2007). A Topo II de levedura catalisa a catenação e o decatenação de dois DNAs duplex, bem como o relaxamento negativo ou positivo do DNA superenrolado. Todas as reações são dependentes de ATP e requerem Mg²⁺ (GOTO & WANG, 1982).

Foram realizadas reações de relaxamento do DNA superenrolado catalisada pela Topo II dependente de ATP na presença das amostras sintetizadas e submetidas à eletroforese em gel. Inicialmente foi proposta uma triagem utilizando a concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para cada uma das amostras. Como pode ser observado na Figura 35, todas as amostras promoveram a inibição da Topo II de levedura, na concentração testada.

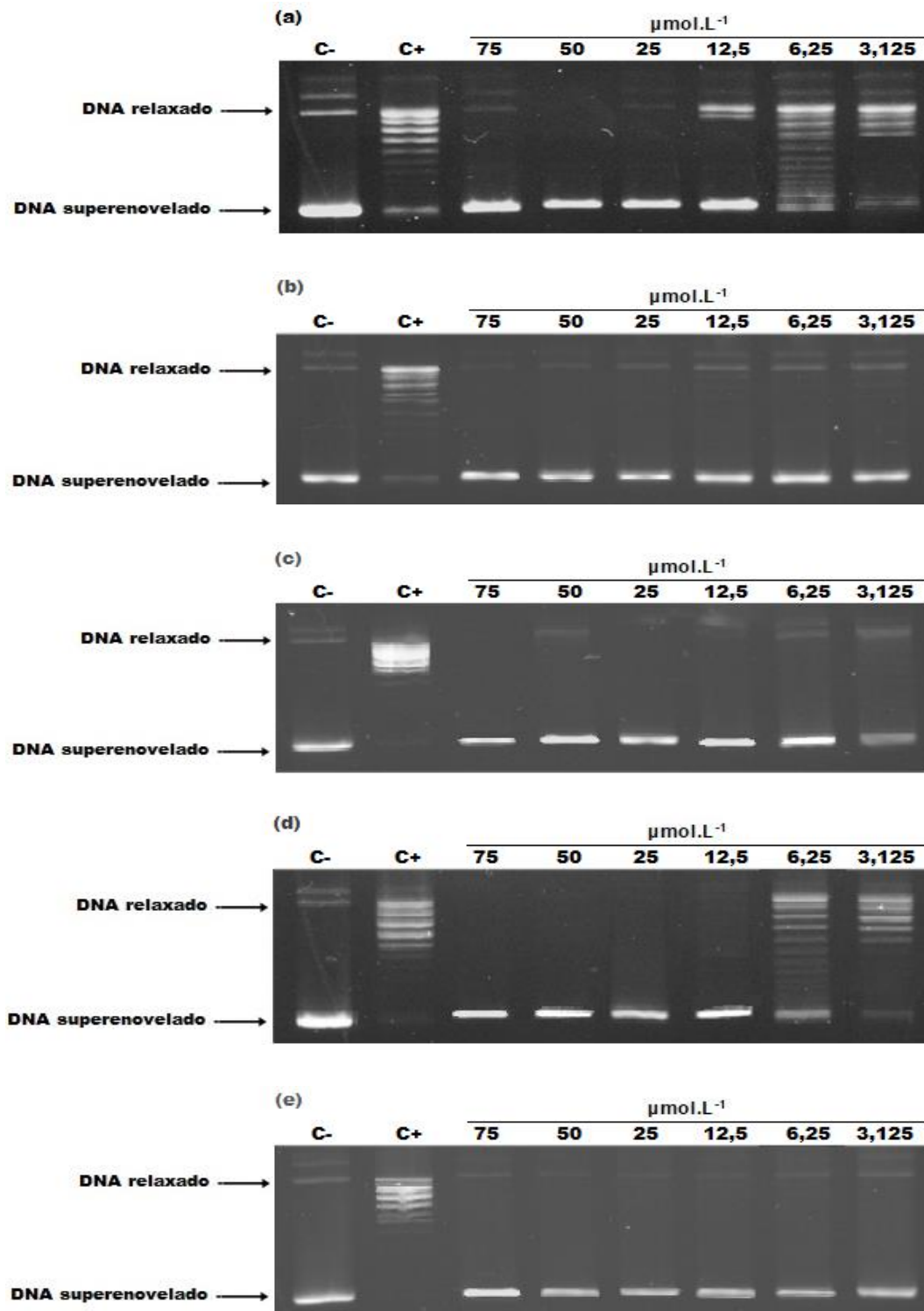
Figura 35. Eletroforese em gel, para triagem inicial da ação dos produtos **(a)** ParELC3M, **(b)** HOCAc-ParELC3M, **(c)** CICPOQ-ParELC3M, **(d)** CFX-ParELC3M e **(e)** CFXPip-ParELC3M, na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sobre a inibição da atividade da **Topo II de levedura**. C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo II).



Fonte: Elaborado pelo autor.

O peptídeo ParELC3M e seus conjugados foram então submetidos aos ensaios para determinação de IC₁₀₀. Na Figura 36, pode-se observar as concentrações de inibição sobre a enzima Topo II de levedura. O peptídeo ParELC3M apresentou um valor de IC₁₀₀ de 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Por outro lado, os peptídeo-conjugados foram os mais eficientes.

Figura 36. Eletroforese em gel para determinação de IC_{100} para **(a)** ParELC3M, **(b)** HOAc-ParELC3M, **(c)** CICPOQ-ParELC3M, **(d)** CFX-ParELC3M e **(e)** CFXPip-ParELC3M sobre a atividade da **Topo II de levedura**. C-: controle negativo (pBR322 superenrolado); C+: controle positivo (pBR322 superenrolado + 1U de Topo II). Os números em cada aplicação no gel representam a concentração do peptídeo ou conjugado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As infecções fúngicas são de grande preocupação médica, especialmente em pacientes que sofrem de doenças imunossupressoras (PALMIERI et al., 2022). Além disso, as infecções fúngicas invasivas complicam o curso clínico da COVID-19 e estão associadas a um aumento significativo da mortalidade, especialmente em pacientes críticos internados em uma unidade de terapia intensiva (CASALINI et al., 2021). Assim, com os atuais aumentos maciços de infecções microbianas resistentes a medicamentos, bem como um papel significativo de infecções fúngicas no número de mortes por COVID-19, descobrir novos compostos antifúngicos é extremamente importante. Alvos antifúngicos alternativos são necessários para expandir o leque de opções terapêuticas, especialmente as enzimas que são importantes para a biossíntese de proteínas, aminoácidos ou processamento de DNA (KONDAKA e GABRIEL, 2022).

A topoisomerase II fúngica é considerada como sendo necessária para a segregação de moléculas filhas no término da replicação do DNA e é essencial para o crescimento adequado da célula (DINARDO; VOELKEL; STERNGLANZ, 1984). Assim, novos fármacos antifúngicos que também possam inibir a atividade das DNA topoisomerases de fungos, seria uma importante alternativa terapêutica antifúngica. Neste sentido, os peptídeos conjugados, especialmente aqueles conjugados com ciprofloxacina, que inibiram a atividade da Topo II de levedura, com valores expressivos de IC₁₀₀, podem ser excelentes candidatos para este tipo de terapia.

Tem sido demonstrado que os agentes antibacterianos fluoroquinolônicos conhecidos, tal como ciprofloxacina, levofloxacina ou moxifloxacina não apresentam atividade antifúngica (STERGIOPOULOU et al., 2008). Porém, a conjugação destes antibióticos com um peptídeo de penetração celular (CPP), alterou acentuadamente as propriedades biológicas desses fármacos. Particularmente, ao contrário das fluoroquinolonas, seus conjugados com o CPP inibiram a atividade da DNA topoisomerase II de fungos, na concentração de 10 µmol.L⁻¹ (PTASZYŃSKA et al., 2020). Os resultados aqui apresentados são sensivelmente melhores (< 3,125 µmol.L⁻¹), e representam o efeito esperado inicialmente, uma atividade antibiótica sinérgica, onde a atividade antimicrobiana de ParELC3M foi potencializada pela conjugação de um antibiótico quinolônico que, uma vez conjugado também apresentou atividade e ademais, superior aos conjugado quinolônicos já descritos.

4.6. Avaliação da 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. Todos os resultados obtidos de CIM foram corroborados pelo teste de resazurina, e os dados se encontram na Tabela 5.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana de ParELC3M e seus conjugados.

Amostras	Concentração Inibitória Mínima (CIM)					
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	$\mu\text{mol.L}^{-1}$	%	$\mu\text{mol.L}^{-1}$	%	$\mu\text{mol.L}^{-1}$	%
ParELC3M	100	ND	100	ND	200	ND
HOCAc-ParELC3M	100	ND	100	ND	200	ND
CICPOQ-ParELC3M	100	ND	100	ND	200	ND
CFX-ParELC3M	75	96	75	86	200	ND
CFXPip-ParELC3M	25	95	25	88	200	ND

ND = Não determinado. Não foi observada inibição no crescimento do microrganismo
 % = Percentual de inibição no crescimento do microrganismo

Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação de atividade antibacteriana mostrou que a conjugação com ciprofloxacina, potencializou a atividade do peptídeo ParELC3M, especialmente quando conjugado pelo anel piperazínico (CFXPip-ParELC3M), embora a atividade tenha sido inferior ao antibiótico isolado ($<1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Nos estudos de inibição das topoisomerases, os peptídeo-conjugados com ciprofloxacina, sempre apresentaram melhor atividade inibitória, especialmente sobre as topoisomerases IA bacteriana e IIA de levedura, com uma pequena vantagem para CFXPip-ParELC3M. O mesmo foi observado nos ensaios de atividade antibacteriana.

A ligação das quinolonas à DNA topoisomerases é mediada por uma ponte de íon água-metal. Especificamente, a região cetoácida C3/C4 da quinolona é quelada por um

íon Mg^{2+} não catalítico que também é coordenado por quatro moléculas de água. As águas de coordenação formam ligações de hidrogênio com íon magnésio mediando a interação entre a quinolona e a proteína (WOHLKONIG et al., 2010). Esta coordenação do íon Mg^{2+} explica por que a carbonila em C4 é essencial para a ação das quinolonas. No conjugado CFXPip-ParELC3M, a região cetoácida está livre, favorecendo a interação com as topoisomerasas, o que explica a maior atividade inibitória observada para este conjugado.

No caso do conjugado CFX-ParELC3M, apesar do grupo carboxílico em C3 estar envolvido com a ligação com o peptídeo, o anel piperazínico está livre para interagir com a outra subunidade da topoisomerase (GyrB da DNA girase ou ParC da Topo IV). Com base em estudos cristalográficos, o sistema de anéis C-7 das quinolonas se estende até a subunidade GyrB da DNA girase ou ParC da Topo IV, onde os resíduos de aminoácidos formam um ambiente favorável, mas não específico para o anel em C-7 (BLOWER et al., 2016). Mutações nestas subunidades também foram associadas à resistência a quinolonas (DRLICA et al., 2009), o que explicaria uma importância secundária deste grupo, na atividade dos conjugados e os resultados obtidos.

Com relação à atividade antifúngica, o peptídeo e seus conjugados não apresentaram atividade inibitória contra *C. Albicans*, mesmo na máxima concentração testada de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Essa ausência de inibição, possivelmente está relacionada a baixa permeabilidade da parede celular microbiana ao peptídeo e seus conjugados. Este fato já havia sido destacado por Stergiopoulou e colaboradores em estudos envolvendo interações farmacodinâmicas *in vitro* entre agentes antifúngicos e fluoroquinolonas contra *C. albicans*. Foram encontradas atividades sinérgicas entre anfotericina B, voriconazol e caspofungina e fluoroquinolonas como ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina, sendo que a ciprofloxacina apresentou interações sinérgicas mais fortes com os agentes antifúngicos, comparada as demais fluoroquinolonas. (STERGIOPOULOU et al, 2008 e 2009).

Os mecanismos dessas interações não são bem compreendidos. As fluoroquinolonas, por si só, não possuem uma atividade inibitória do crescimento fúngico significativa. No entanto, as fluoroquinolonas têm a capacidade de se ligar à topoisomerase fúngica. Assim, as fluoroquinolonas podem inibir a replicação do DNA fúngico e, assim, exibir um efeito antifúngico. Uma vez que este efeito só é aparente quando as fluoroquinolonas são combinadas com agentes antifúngicos, pode ser possível que estes agentes alterem a permeabilidade da membrana celular fúngica e,

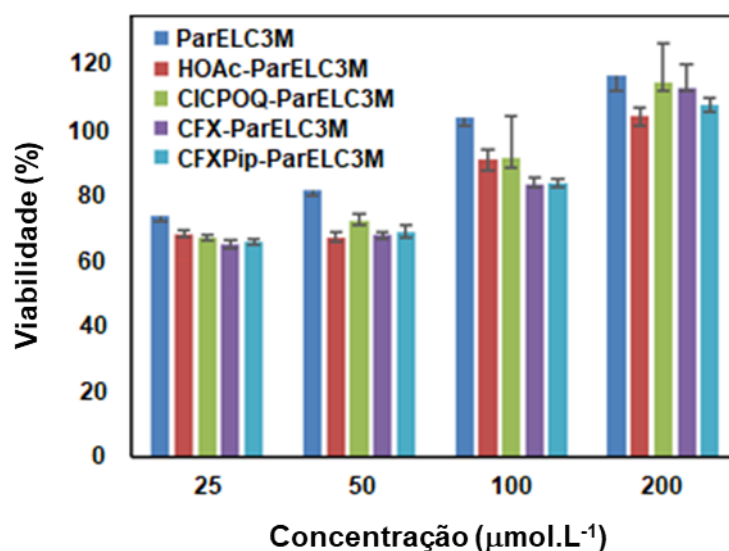
assim, aumentem as concentrações intracelulares de fluoroquinolonas, o que poderia explicar as interações sinérgicas entre agentes antifúngicos e fluoroquinolonas, o que não foi observado com os conjugados, os quais não foram testados com a adição de um reconhecido antifúngico

4.7. Ensaio de toxicidade

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 da linhagem MRC-5, correspondente a fibroblastos de tecido pulmonar foram realizados, buscando avaliar a toxicidade do peptídeo ParELC3M e seus conjugados.

Os resultados obtidos foram expressos em percentual de viabilidade (considerando C+ como 100%) e estão demonstrados na Figura 37, para um período único de 72 h de incubação.

Figura 37. Ensaio de viabilidade celular para as células MRC-5, na presença do peptídeo ParELC3M e seus conjugados, expressa em %, com tempo de incubação das amostras de 72 horas. As barras indicam o desvio padrão dos dados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para este período e independente da concentração testada, ParELC3M não apresentou citotoxicidade para o tipo de célula testado, de acordo com o padrão da ISO

10993- 5:2009 (International Standards Organization, 2009) que preconiza o mínimo de 70% de viabilidade celular para que um material seja considerado não citotóxico. Este resultado corrobora aqueles obtidos por Sanches e colaboradores (2021), com o análogo não mutado ParELC3 o qual não apresentou toxicidade em células HepG2 (células de fígado humano) nas concentrações testadas entre 6,25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (SANCHES et al., 2021). O mesmo foi observado para os diferentes peptídeo-conjugados.

Uma observação interessante é que os valores de toxicidade foram inversamente proporcionais ao aumento da concentração, ou seja, em valores de concentração acima de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, a viabilidade celular foi acima de 100%, independente da amostra testada. Este fato pode estar relacionado com a disponibilidade do peptídeo, reconhecidamente hidrofóbico, e de seus conjugados que, devido a presença de grupos mais hidrofílicos, resultam em produtos anfifílicos. Devido a este caráter, pode ocorrer auto agregação, que pode bloquear a acessibilidade da molécula às células, aumentando assim a viabilidade a concentrações mais elevadas ou maior toxicidade a baixas concentrações, onde a auto agregação não deve ocorrer (PETHŐ et al., 2020).

Esta suposição poderia ser comprovada por medições de espalhamento dinâmico de luz (DLS), medindo o tamanho e o índice de dispersão dos conjugados, comparativamente nas diferentes concentrações, o que não pôde ser realizado no período desejado, pela indisponibilidade do sistema de medição, porém, este ensaio está na pauta de futuros estudos a serem concluídos.

De qualquer forma, os resultados de viabilidade ora apresentados, indicam que o peptídeo ParELC3M e seus conjugados não apresentam toxicidade, ao menos para o tipo de célula utilizada nos ensaios.

5. Conclusões

- As metodologias empregadas para a síntese, conjugação, clivagem das resinas, e purificação dos compostos foram eficientes, levando à obtenção dos produtos desejados e com boa pureza;
- O sistema de expressão heteróloga da toxina ParE não se mostrou eficiente, nas condições utilizadas;
- Os melhores resultados de IC₁₀₀ dos peptídeo-conjugados sobre as topoisomerases tipo II foram obtidos para a topoisomerase IV, embora a enzima DNA girase seja o principal alvo para a toxina ParE e para as fluoroquinolonas;
- Diferentemente das fluoroquinolonas livres, os estudos com ParELC3M conjugado com ciprofloxacina mostraram que a Topo IV é o alvo tóxico primário e que a DNA girase é um alvo secundário destes compostos;
- Aparentemente, na maioria dos casos, o alvo primário dos peptídeo-conjugados em bactérias Gram-negativas é a Topo IV e a Topo IA e nas Gram-positivas a DNA girase.
- Os peptídeo-conjugados, especialmente aqueles conjugados com ciprofloxacina inibiram a atividade da Topo II de levedura, com valores expressivos de IC₁₀₀. No entanto, esses conjugados não conseguiram inibir o crescimento de *C. albicans* devido à sua incapacidade de permear a membrana celular fúngica.
- Peptídeo-conjugados com CFX podem servir de base para a obtenção de novos conjugados, com o mesmo potencial inibitório de topoisomerases e que, possam permear a membrana celular do fungo.
- Os peptídeo-conjugados com CFX apresentaram atividade bactericida tendo sido CFXPip-ParELC3M o mais ativo. Tal fato pode estar relacionado com a região cetoácida C3/C4 da quinolona, que está livre neste conjugado.

6. Referências

- AKINWALE, A.D.; SHANG, E. P.; KEYKAVOUS, P.; RAKESH, K. T. Antibiotics-Peptide Conjugates Against Multidrug-Resistant Bacterial Pathogens. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 1926-1936, 2018.
- ALI, J.; RAFIQ, Q.A.; RATCLIFFE, E. Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. **Future Sci.** v. 4, FSO290, 2018.
- AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J. A.; MARTINEZ, J.; SUBRA, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Mol. Biotechnol.** v. 33, p. 239–254, 2006.
- AMES, J.R.; MUTHURAMALINGAM, M.; MURPHY, T.; NAJAR, F.Z.; BOURNE, C.R. Expression of different ParE toxins results in conserved phenotypes with distinguishable classes of toxicity. **Microbiologyopen**. v. 8(10), e902, 2019.
- BALABAN, N.Q.; HELAINE, S.; LEWIS, K.; ACKERMANN, M.; ALDRIDGE, B.; ANDERSSON, D.I., et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. **Nat. Rev. Microbiol.** v.17(7), p. 441-448, 2019.
- BANIN, E.; HUGHES, D.; KUIPERS, O. P. Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 41, n. 3, p. 450-452, 2017.
- BARBOSA, L.C.B.; GARRIDO, S.S.; GARCIA, A.; DELFINO, D.B.; SANTOS, L.N.; MARCHETTO, R. Design and synthesis of peptides from bacterial ParE toxin as inhibitors of topoisomerases. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 54, p. 591-596, 2012.
- BARBOSA, L.C.B; GARRIDO, S.S.; GARCIA, A.; DELFINO, D.B.; MARCHETTO, R. Function inferences from a molecular structural model of bacterial ParE toxin. **Bioinformation**, v. 4, p. 438-440, 2010.
- BEHRENDT, R.; WHITEB, P.; OFFER, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. **J. Pept. Sci.** v. 22, p. 4–27, 2016.
- BELETE, T.M. Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents. **Human Microbiome Journal**, v.11, p. 2019.
- BLOWER, T.; WILLIAMSON, B.; KERNS, R.; BERGER, J. Crystal structure and stability of gyrase-fluoroquinolone cleaved complexes from *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 113, p. 1706–1713, 2016.
- BULHELLER, B.M.; RODGER, A.; HIRST, J.D. Circular and linear dichroism of proteins. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 9 (17), p. 2020, 2007.
- BUSH, N.G.; DIEZ-SANTOS, I.; ABBOTT, L.R.; MAXWELL, A. Quinolones: Mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance. **Molecules**. v. 25(23), p. 5662, 2020.
- BUSTAMANTE, P.; IREDELL, J. R. Carriage of type II toxin-antitoxin systems by the growing group of IncX plasmids. **Plasmid**, v. 91, p. 19-27, 2017.
- BUTT, T.R.; EDAVETAL, S.C.; HALL, J.P.; MATTERN, M.R. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. **Protein. Expr. Purif.**, v.43, p.1-9, 2005.

- CASALINI G.; GIACOMELLI A.; RIDOLFO A.; GERVASONI C.; ANTINORI S. Invasive Fungal Infections Complicating COVID-19: A Narrative Review. **J. Fungi**. v. 7, 921, 2021.
- CHAMPOUX, J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 70, p. 369-413, 2001.
- CHAMPOUX, J.J. Type IA DNA topoisomerases: Strictly one-step at a time. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, v. 99, p. 11998-12000, 2002.
- CHANDRA, H.; BISHNOI, P.; YADAV, A.; PATNI, B.; MISHRA, A. P.; NAUTIYAL, R. A. Antimicrobial Resistance and the Alternative Resources with Special Emphasis on Plant-Based Antimicrobials - A Review. **Plants**., v. 6, p. 1-11, 2017.
- CHIN, K.W.; TIONG, H.L.M.; LUANG-IN, V.; MA, N.L. An overview of antibiotic and antibiotic resistance. **Environ. Advances**, v.11, 100331. 2023.
- CHOI, J.S.; KIM, W.; SUK, S.; PARK, H.; BAK, G.; YOON, J.; LEE, Y. The small RNA, SdsR, acts as a novel type of toxin in *Escherichia coli*. **RNA Biology**, v. 15, p. 1319-1335, 2018.
- CHRISTENSEN, S.K.; GERDES, K. RelE toxins from Bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. **Mol. Microbiol.**, v. 48 (5), p. 1389-1400, 2003.
- CHUKWUDI, C.U.; GOOD, L. The role of the hok /sok locus in bacterial response to stressful growth conditions. **Microb. Pathog.**, v.79, p. 70-79, 2015.
- CLSI. Reference Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria. That Grow Aerobically; Approved Standard-10th Ed. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard- 3th Ed. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- CORBETT K.D.; BERGER J.M. Structure, Molecular Mechanisms, and Evolutionary Relationships in DNA Topoisomerases. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** v.33, p. 95–118, 2004.
- COUSSENS, N.P.; DAINES, D.A. Wake me when it's over – Bacterial toxin–antitoxin proteins and induced dormancy. **Exp. Biol. Med.**, v. 241, p. 1332-1342, 2016.
- DAO-THI, M.H.; VAN MELDEREN, L.; DE GENST, E.; AFIF, H.; BUTS, L.; WYNS, L.; LORIS, R. Molecular basis of gyrase poisoning by the addiction toxin CcdB. **J. Mol. Biol.** v. 348, p.1091-1102, 2005.
- DALTON, K.M.; CROSSON, S. A conserved mode of protein recognition and binding in a ParD-ParE toxin-antitoxin complex. **Biochemistry**., v. 49, p. 2205-2215, 2010.
- DHINGRA, S., RAHMAN, N.A.A., PEILE, E., RAHMAN, M., SARTELLI, M., HASSALI, M.A., ISLAM, T., ISLAM, S. HAQUE, M. Microbial Resistance Movements: An Overview of Global Public Health Threats Posed by Antimicrobial Resistance, and How Best to Counter. **Front. Public Health** v. 8, n. 535668, 2020.
- DINARDO S.; VOELKEL K.; STERNGLANZ R. DNA Topoisomerase II Mutant of *Saccharomyces Cerevisiae*: Topoisomerase II Is Required for Segregation of Daughter Molecules at the Termination of DNA Replication. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 81, p. 2616–2620, 1984.

- DRLICA, K.; HIASA, H.; KERNS, R.; MALIK, M.; MUSTAEV, A.; ZHAO, X. Quinolones: Action and resistance updated. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 9, p. 981–998, 2009.
- FIEBIG, A.; ROJAS, C.M.C.; SIEGAL-GASKINS, D.; CROSSON, S. Interaction specificity, toxicity and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin–antitoxin systems. **Mol. Microbiol.** v. 77, p. 236-251, 2010.
- GAYNES, R. The Discovery of Penicillin—New Insights after More Than 75 Years of Clinical Use. **Emerg. Infect. Dis.** v. 23, p. 849–853, 2017.
- GAJDÁCS, M. The Concept of an Ideal Antibiotic: Implications for Drug Design. **Molecules.**, v. 24, 892. 2019.
- GERDES, K.; RASMUSSEN, P.B; MOLIN, S. Unique type of plasmid maintenance function: postsegregational killing of plasmid-free cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v.83, p. 3116-3120, 1986.
- GOEDERS, N.; VAN MELDEREN, L. Toxin-antitoxin systems as multilevel interaction systems. **Toxins** (Basel), v. 6, p. 304-324, 2013.
- GOTO, T.; WANG, J. C. Yeast DNA topoisomerase II. An ATP-dependent type II topoisomerase that catalyzes the catenation, decatenation, unknotting, and relaxation of double-stranded DNA rings. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 5866-5872, 1982.
- GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova.**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- HALL, A. M.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Toxin–antitoxin systems: reversible toxicity. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 36, p. 102-110, 2017.
- HARMS, A.; MAISONNEUVE, E.; GERDES, K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. **Science.** v. 354(6318), aaf4268, 2016.
- HARMS, A.; BRODERSEN, D.E.; MITARAI, N.; GERDES, K. Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. **Mol. Cell.**, v. 70 (5), p. 768-784, 2018.
- HELAINE, S.; KUGELBERG, E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. **Trends Microbiol.**, v. 22, p. 417-424, 2014.
- HERNÁNDEZ-ARRIAGA, A.M.; CHAN, W.T.; ESPINOSA, M.; DÍAZ-OREJAS, R. Conditional Activation of Toxin-Antitoxin Systems: Postsegregational Killing and Beyond. **Microbiol. Spectrum.** ASM Journals, v. 2, n. 5, p. 1-17, 2016.
- HIRSCH, J.; KLOSTERMEIER, D. What makes a type IIA topoisomerase a gyrase or a Topo IV?, *Nucleic Acids Res.*, v. 49 (11), p. 6027–6042, 2021.
- HURLEY, J.M.; WOYCHIK, N.A. Bacterial toxin HigB associates with ribosomes and mediates translation-dependent mRNA cleavage at A-rich sites. **J. Biol. Chem.**, v. 284 (28), p. 18605-18613, 2009.
- JIAN, J.Y.; OSHEROFF, N. Telling Your Right Hand from Your Left: The Effects of DNA Supercoil Handedness on the Actions of Type II Topoisomerases. **Int. J. Mol. Sci.**, v.24,11199, 2023.

- JIANG, Y., POGLIANO, J., HELINSKI, D.R., KONIECZNY, I. ParE toxin encoded by the broad-host-range plasmid RK2 is an inhibitor of *Escherichia coli* gyrase. **Mol. Microbiol.** v. 44, p. 971, 2002.
- 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**, v.34 (2) 1970.
- KELLY, S.M.; JESS, J.J.; PRICE, N.C. How to study proteins by circular dichroism. **Bioch. Biophys. Acta-Proteins and Proteomics**, v. 1751(2), p. 119-139, 2005.
- KENDRA, R.V.; OVIATT, A.A.; OSHEROFF, N. Topoisomerase II Poisons: Converting essential enzymes into molecular scissors. **Biochemistry**, v. 60 (21), p. 1630-1641, 2021.
- KEREN, I.; KALDALU, N.; SPOERING, A.; WANG, Y.; LEWIS, K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 230, p. 13-18, 2004.
- KIM, W.; PROSEN, K.R.; LEPORE, C.J.; COUKELL, A. On the road to discovering urgently needed antibiotics: so close yet so far away. **ACS Infect. Dis.** v.6, p.1292–1294, 2020.
- KLAHN, P.; BRONSTRUP, M. Bifunctional antimicrobial conjugates and hybrid antimicrobials. **Natural Product Reports**, v. 34, p. 832-885, 2017.
- KONDAKA, K.; GABRIEL, I. Targeting DNA Topoisomerase II in Antifungal Chemotherapy. **Molecules**, v. 27, 7768, 2022.
- KRAH, R.; KOZYAVKIN, S.A.; SLESAREVt, A.I.; GELLERT, M. A Two-Subunit Type I DNA Topoisomerase (reverse Gyrase) from an Extreme Hyperthermophile. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 106-110, 1996.
- LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **J. Neurosci. Methods**, 96 (2), p. 147-152, 2000.
- MASUDA, H.; INOUE, M. Toxins of Prokaryotic Toxin-Antitoxin Systems with Sequence-Specific Endoribonuclease Activity. **Toxins**, v. 9, n. 4, p. 140, 2017.
- McCLENDON, A. K.; OSHEROFF, N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. **Mutat. Res.**, v. 623 (1-2), p. 83-97, 2007.
- McKIE, S.J.; NEUMAN, K.C.; MAXWELL, A. DNA topoisomerases: advances in understanding of cellular roles and multi-protein complexes via structure-function analysis. **BioEssays**. v 4, 2000286, 2021.
- MIETHKE, M.; PIERONI, M.; WEBER, T.; BRÖNSTRUP, M.; HAMMANN, P.; HALBY, L.; MÜLLER, R., et al. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. **Nat. Rev. Chem.** v. 5, p.726-749, 2021.
- MILLS, M.; TSE-DINH, Y.C.; NEUMAN, K.C. Direct observation of topoisomerase IA gate dynamics. **Nat. Struct. Mol. Biol.** v. 25, p. 1111–1118, 2018.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65 (1), p. 55-63, 1983.

- MUSTAIEV, A.; MALIK, M.; ZHAO, X.; KUREPINA, N.; LUAN, G.; OPPEGARD, L.M.; HIASA, H.; MARKS, R.K.; KERNS, R.J.; BERGER, J.M.; DRLICA, K. Fluoroquinolone-Gyrase-DNA Complexes. Two modes of drug binding. **J. Biol. Chem.**, v. 289, p. 12300–12312. 2014.
- OGURA, T.; HIRAGA, S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 80, p.4784-4788, 1983.
- PALMIERI, F.; KOUTSOKERA, A.; BERNASCONI, E.; JUNIER, P.; VON GARNIER, C.; UBAGS, N. Recent Advances in Fungal Infections: From Lung Ecology to Therapeutic Strategies with a Focus on *Aspergillus* spp. **Front. Med.** v. 9, 832510, 2022.
- PATEL, S. Drivers of bacterial genomes plasticity and roles they play in pathogen virulence, persistence and drug resistance. **Infect. Genet. Evol.** v.45, p.151-164, 2016.
- PETHŐ, L.; KASZA, G.; LAJKÓ, E.; LÁNG, O.; KÓHIDAI, L.; IVÁN, B.; MEZŐ, G. Amphiphilic drug–peptide–polymer conjugates based on poly(ethylene glycol) and hyperbranched polyglycerol for epidermal growth factor receptor targeting: the effect of conjugate aggregation on in vitro activity. **Soft Matter**, v. 16, p. 5759-5769, 2020.
- PICCONI, P.; HIND, C.K.; NAHAR, K.S.; JAMSHIDI, S.; DI MAGGIO, L.; SAEED, N.; EVANS, B.; SOLOMONS, J.; WAND, M.E.; SUTTON, J.M.; RAHMAN, K.M. New Broad-Spectrum Antibiotics Containing a Pyrrolobenzodiazepine Ring with Activity against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Journal of Medicinal Chemistry.** v. 63, p. 6941-6958, 2020.
- PTASZYŃSKA, N.; GUCWA, K.; OLKIEWICZ, K.; HELDT, M.; SEROCKI, M.; STUPAK, A.; MARTYNOW, D.; DĘBOWSKI, D.; GITLIN-DOMAGALSKA, A.; LICA, J.; ŁĘGOWSKA, A.; MILEWSKI, S.; ROLKA, K. Conjugates of Ciprofloxacin and Levofloxacin with Cell-Penetrating Peptide Exhibit Antifungal Activity and Mammalian Cytotoxicity. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 21, 4696, 2020.
- QANDIL, A.M.; AL-ZOUBI, L.O.; AL-BAKRI, A.G.; AMAWI, H.A.; AL-BALAS, Q.A.; ALKATHERI, A.M.; ALBEKAIRY, A.M. Synthesis, Antibacterial Evaluation and QSAR of α -Substituted-N4-Acetamides of Ciprofloxacin and Norfloxacin. **Antibiotics.** v. 3, p. 244-269, 2014.
- RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DÍAZ-GUERRA, T.M.; MELLADO, E. Standardization of Antifungal Susceptibility Variables for a Semiautomated Methodology. **J. Clin. Microbiol.** v. 39 (7), p. 2513, 2001.
- SANCHES, B.C.P.; ROCHA, C.A.; BEDOYA, J.G.M.; DA SILVA, V.L.; DA SILVA, P.B.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; CHORILLI, M.; CONTIERO, J.; CRUSCA, E.; MARCHETTO, R. 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.
- SCHOEFFLER, A.J., BERGER, J.M. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. **Q. Rev. Biophys.** v.41, p. 41–101, 2008.
- SEDDEK, A.; ANNAMALAI, T.; TSE-DINH, Y.C. Type IA Topoisomerases as Targets for Infectious Disease Treatments. **Microorganisms.** v. 9(1), 86, 2021.
- SHIMOKAWA-FALCÃO, L.H.A.L.; CAPORRINO, M.C.; BARBARO, K.C.; DELLA-CASA, M.S.; MAGALHÃES, G.S. Toxin fused with SUMO tag: a new expression vector strategy to obtain recombinant venom toxins with easy tag removal inside the bacteria. **Toxins**, v. 9, 82, 2017.

- SINGH, G.; YADAV, M.; GHOSH, C.; RATHORE, J.S. Bacterial toxin-antitoxin modules: classification, functions, and association with persistence. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, 100047, 2021.
- SONG, S.; WOOD, T.K. Toxin/Antitoxin system paradigms: Toxins bound to antitoxins are not likely activated by preferential antitoxin degradation. **Adv. Biosyst.**, v. 4, 1900290, 2020.
- STERGIOPOULOU, T.; SEIN, T.; PAPAIOANNIDOU, P.; TSIOURIS, I.; ROILIDES, E.; WALSH, T.J. Isobolographic analysis of pharmacodynamic interactions between antifungal agents and ciprofloxacin against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52(6), p. 2196-2204, 2008.
- STERGIOPOULOU, T.; MELETIADIS, J.; SEIN, T.; PAPAIOANNIDOU, P.; TSIOURIS, I.; ROILIDES, E.; WALSH, T.J. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 63(2), p. 343-348, 2009.
- TEREKHOVA, K.; GUNN, K.H.; MARKO, J.F.; MONDRAGÓN, A. Bacterial topoisomerase I and topoisomerase III relax supercoiled DNA via distinct pathways. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. 10432-10440, 2012.
- TSE-DINH, Y.C. Bacterial topoisomerase I as a target for discovery of antibacterial compounds. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. 731-737, 2009.
- TSE-DINH, Y.C. Targeting bacterial topoisomerase I to meet the challenge of finding new antibiotics. **Future Med. Chem.**, v. 7, p. 459-471, 2015.
- TSE-DINH, Y.C. Targeting bacterial topoisomerases: how to counter mechanisms of resistance. **Future Med. Chem.**, v. 8 (10), p. 1085-1100, 2016.
- URBAN-CHMIEL, R.; MAREK, A.; STĘPIEŃ-PYŚNIAK, D.; WIECZOREK, K.; DEC, M.; NOWACZEK, A.; OSEK, J. Antibiotic Resistance in Bacteria - A Review. **Antibiotics** (Basel). v. 11, p.1079, 2022.
- 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**, v.12, p. 827-841, 2011.
- WALLACE, B.A.; JANES, R.W. (ed.). **Modern Techniques for Circular Dichroism and Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy**. Amsterdam: Ios Press Bv, 232 p. 2009.
- WANG, X.; WOOD, T.K. Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5577-5583, 2011.
- WANG, Y.; CHEETHAM, A.G.; ANGACIAN, G.; SU, H.; XIE, L.; CUI, H. Peptide-drug conjugates as effective prodrug strategies for targeted delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.110-111, p. 112-126, 2017.
- WHITMORE, L.; WALLACE, B.A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. **Biopolymers**, v. 89 (5), p. 392-400, 2007.

WOHLKONIG, A.; CHAN, P.; FOSBERRY, A.; HOLMES, P.; HUANG, J.; KRANZ, M.; LEYDON, V.; MILES, T.; PEARSON, N.; PERERA, R.; et al. Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 17, p.1152–1153, 2010.

WOODY, R.W. Theory of Circular Dichroism of Proteins. In: FASMAN, Gerald D. (ed.). Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. New York: Springer Science, Cap. 2. p. 25-67, 1996.

WOODY, R.W.; KOSLOWSKI, A. Recent developments in the electronic spectroscopy of amides and α -helical polypeptides. **Biophysical Chemistry**, v. 101-102, p 535-551, 2002.

YANG, Q.E.; WALSH, T.R. Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 41, p. 343-353, 2017.

ZHANG, Y.; ZHANG, J.; HOEFLICH, K.P.; IKURA, M.; QING, G.; INOUE, M. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. **Mol. Cell.**, v. 12 (4), p. 913-923, 2003.