

NOVAS ESTRATÉGIAS DE COMBATE A MICRORGANISMOS COM BASE EM PEPTÍDEOS INTRAGÊNICOS ANTIMICROBIANOS (IAPS) DERIVADOS DO GENOMA HUMANO

Mariano, G.H.S.¹, Cardozo Filho, J.L.², Correa, R.³, Ribeiro, D.J.S.³, Leite, J.R.S.A.⁴, Moreira, D.C.⁵, Magalhães, K.G.⁶, Ramada, M.H.S.⁷, Bloch Jr., C.⁸, Brand, G.D.⁹

¹ Estudante - Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

² Pesquisador - Laboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

³ Doutorando - Laboratório de Imunologia e Inflamação, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

⁴ Estudante - Faculdade de Medicina, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

⁵ Doutor - Faculdade de Medicina, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

⁶ Professora / Pós-Doutorado - Laboratório de Imunologia e Inflamação, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

⁷ Professor/ Doutor - Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

⁸ Pesquisador - Laboratório de Espectrometria de Massa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

⁹ Orientador/ Pos-Doutorado - Laboratório de Síntese e Análise de Biomoléculas, Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

Resumo

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) atuam como promotores da assepsia do local lesionado ao serem ativados por meio da clivagem de seu contexto proteico original, a catelecidina LL-37 é um exemplo deste conceito, uma vez que este é um fragmento do precursor proteico Hcap18. Além alguns AMPs produzidos pela pele de vertebrados interagem de forma complexa com o Sistema imune e são frequentemente citados como uma conexão entre o Sistema imune inato e adaptativo, os chamados Host Defense Peptides (HDP's). Baseado em moléculas membrano-ativas previamente caracterizadas pelo nosso grupo, um peptídeo batizado de Chim1 foi racionalmente desenhado, com o objetivo de impedir o crescimento de microorganismos, inibir a casacata inflamatória associada e ainda promover a migração celular. O Chim1 é constituído de uma porção antimicrobiana (HS02) e outra responsável pela comunicação com o sistema imune mediante a ativação de receptores de peptídeos formilados (FPR2a), mais especificamente o receptor FPR2. A ativação deste receptor é capaz de promover a aceleração do processo de re-epitelização, como demonstrado na literatura. O Chim1 foi sintetizado quimicamente via síntese manual em fase sólida (SPPS) seguido de purificação em escala preparativa por cromatografia líquida de alta performance e sua sequência comprovada por espectrometria de massa MALDI-TOF. Testes antimicrobianos foram conduzidos pela determinação da mínima concentração inibitória (MIC) contra leveduras e bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas. Experimentos estruturais utilizando difração circular foram realizados em solução tampão e em vesículas compostas por DMPC e 2:1 DMPC:DMPG. Quantificação de citocinas (TNF- α , IL-6 and IL-12) foram realizadas em macrófagos murinos via ELISA a fim de se obter o potencial imunomodulatório do Chim1 e de suas porções individuais HS02 e FPR2a. Os experimentos demonstram que o Chim1 tem atividade antimicrobiana contra bactérias, porém tem uma redução de potência quando comparado com a porção HS02 isolada. A porção FPR2a, isolada do Chim1 foi capaz de estimular a produção de interleucinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-12 porém não de TNF- α . Chim1 estruturou-se em α -hélice em vesículas de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG, atingindo uma maior porcentagem de hélice em vesículas negativamente carregadas. Nossos resultados indicam que se corretamente clivada o peptídeo Chim1 pode ser uma alternativa para o tratamento de doenças ou inflamações de pele. Para um melhor entendimento da dupla ação antimicrobiana e quimiotática do Chim1 novos estudos em microambientes proteolíticos devem ser executados.

Palavras-chave: Antimicrobial peptides (AMPs); receptores de peptídeos formilados (FPR2); inflamação/doenças de pele

Introdução

A pele é a primeira barreira contra agentes externos causadores de doenças, porém, ao ser danificada, ela se torna suscetível a entrada de microorganismos capazes de sensibilizar o sistema imunológico. Dentre as principais moléculas efetoras na defesa contra invasores patogênicos estão os peptídeos antimicrobianos (AMPs), compondo o sistema imune inato dos seres vivos. AMPs da família das catelecidinas são encontradas em diferentes mamíferos¹. Em humanos a única proteína integrante desta família é a hCAP-18. Após a entrada do antígeno e o seu reconhecimento por agentes do sistema imune, como macrófagos, proteases são responsáveis pela clivagem da hCAP-18 liberando assim um peptídeo antimicrobiano e citotóxico chamado LL-37^{2,3}.

Com base neste conceito de peptídeos encriptados em moléculas precursoras, uma ferramenta de sondagem *in silico* de sequências proteicas foi utilizada na busca de peptídeos antimicrobianos encriptados no genoma humano. O Kamal, software desenvolvido em parceria com a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, faz uma varredura em um banco de dados prospectando fragmentos proteicos com propriedades físico-químicas similares a moléculas antimicrobianas dentro do genoma de interesse⁴. Os fragmentos proteicos com atividade antimicrobiana são denominados IAPs (Intragenic Antimicrobial Peptides)^{4,5,6}.

Dentre as sequências obtidas, algumas foram sintetizadas e testadas em ensaios como prova de conceito para evidenciar a eficácia do método de prospecção. Um peptídeo em especial, denominado Hs02, apresentou resultados interessantes quanto a sua capacidade antimicrobiana (dados não publicados).

AMPs atuam por diversos mecanismos no combate contra agentes externos, podendo ser de maneira direta como na formação de poros em membranas bacterianas ou por meio da sinalização do sistema imune, via receptores transmembrana de células defensoras^{7,8,9}. Determinadas sequências de aminoácidos, ao se ligarem a receptores de peptídeos formilados (do inglês Formyl-peptide receptors, ou FPR), são responsáveis pela sinalização de invasores, modulando assim uma resposta inflamatória através da produção de citocinas pró (TNF- α , IL-12) e anti-inflamatórias (IL-10, IL-4)¹⁰. Além disso, foi constatado que AMPs podem ser moléculas protagonistas na re-epitelização^{11,12}, atuando através da ativação de FPRs a qual desencadeia uma cascata sinalizadora que atrai neutrófilos para o sítio de injúria, culminando em uma cicatrização mais rápida⁸.

Como forma de atuar através dessas duas vias reguladoras contra microorganismos, um peptídeo foi desenhado racionalmente e batizado de "Chim1". Este peptídeo é resultante da fusão de dois peptídeos, um antimicrobiano, capaz de interagir com membranas, o HS02, e um agonista de FPR2 (FPR2a), com um sítio de clivagem entre eles.



Figura 1 - Esquema estrutural da Chim1.

O presente trabalho tem como objetivo a síntese e purificação de Chim1, além da avaliação do potencial biológico desta molécula, tanto para promoção de assepsia quanto para sua capacidade quimiotática por meio dos testes de concentração mínima inibitória e indução de liberação de citocinas por macrófago murinos. Adicionalmente pretende verificar a interação do Chim1 com vesículas que mimetizam membranas bacterianas a fim de compreender como ocorre o desbalanceamento osmótico dos microorganismos.

Metodologia

2.1. Síntese em fase sólida (SPFS) do peptídeo Chim1. Síntese manual utilizando oxima e DIC como reagentes de acoplamento de aminoácidos e 4-metilpiperidina como reagente de desproteção. A resina utilizada foi do tipo Rink e testes de Kaiser foram feitos para comprovar a desproteção e o acoplamento de aminoácidos. Uma vez sintetizado, o peptídeo foi clivado da resina utilizando 15 mL de uma solução de clivagem contendo Ácido Tri-Fluoroacético na presença de Tioanisol, Água, Fenol e Etanoditiol. O peptídeo foi precipitado com éter diisopropílico, filtrado e liofilizado.

2.3. Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência. O perfil cromatográfico dos produtos brutos obtidos foi feito por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC – Shimadzu Co), em fase reversa, com monitoramento em dois comprimentos de onda: 216nm e 280nm. A coluna Vydac 218TP54 c18 foi utilizada para corridas preparativas (coluna Phenomenex Jupiter C18), em gradiente de acetronitrila + 0,1% TFA (v/v) e água.

2.4. Análise de Chim1 por espectrometria de massa. Para confirmação de sequência e controle de pureza foi utilizado um espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Extreme, Bruker Daltonics) para confirmação da sua razão massa carga. 3µL de solução de peptídeo foi misturada com 9µL de matriz ácido alfa-ciano-4- hidroxicinâmico e 1µL desta mistura foi pipetada na placa de MALDI. A mistura foi seca em atmosfera ambiente. Após a calibração do equipamento os produtos foram analisados em modo positivo refletido no software Flexanalysis. Foram também adquiridos espectros de MS/MS para verificação da estrutura primária da molécula.

2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana. Os protocolos M7-A10 e M27-A3 do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) foram utilizados para testar a susceptibilidade das bactérias e levedura frente a presença do Hs02 e da Chim1. As concentrações dos peptídeos variaram de 0,5 a 256 µM em um volume final de 100 µL. O experimento foi feito em placa de 96 poços e cada teste consistiu em três replicatas biológicas. A mínima concentração inibitória (MIC) foi definida como a concentração em que não foi detectada turbidez no poço quando visualizado a olho nu.

2.6. Ensaio estrutural de dicroísmo circular. Vesículas de DMPC:DMPG na proporção 2:1 (w/w) e DMPC foram preparadas de acordo com a literatura e quantificadas usando o método do amônio ferrocianato¹³ O dicroísmo circular foi conduzido num espectropolarímetro Jasco-J815 (Jasco International Co.) de acordo com a literatura¹⁴. O espectro foi adquirido em temperatura ambiente, de 200 a 260 nm com uma média de 4 leituras e usando uma célula de 0,1 cm de caminho óptico. O peptídeo foi escaneado a uma concentração de 40µM em tampão de fosfato, então foi adicionada concentrações cada vez maiores de 2:1 DMPC:DMPG e DMPC, dobrando a quantidade de vesícula a cada adição.

2.7. Testes inflamatórios. A atividade imunomodulatória e a caracterização do perfil da modulação da resposta inflamatória das IAPs foi avaliada através da investigação dos níveis da citocina pró-inflamatórias IL-12, IL-6 e TNF-α (R&D Systems) seguindo as recomendações dos fabricantes. A produção de interleucinas foi avaliada em macrófagos murinos (células BMDM) e a de TNF-α em monócitos humanos (células THP-1). As dosagens de citocinas foram quantificadas via ELISA.

Resultados e Discussão

3.1. Síntese em fase sólida do peptídeo Chim1. A síntese química de Chim1 utilizando DIC/oxima como reagente mostrou-se eficaz uma vez que o teste Kaiser não acusou nenhuma falha nos acoplamentos. Das observações feitas durante a síntese, cabe ressaltar que foi necessário realizar o procedimento de desproteção mais e uma vez para alguns aminoácidos que acusavam coloração amarelada no teste de Kaiser.

3.1. Purificação do peptídeo Chim1 por cromatografia líquida de alta eficiência. O peptídeo Chim1 foi eluído em 15 minutos de corrida cromatográfica, em uma porcentagem de acetoneitrila próxima a 69%, o que indica elevada hidrofobicidade de sua estrutura. O cromatograma referente a purificação de Chim1 prova que a síntese em fase sólida se deu de maneira eficiente, uma vez que o pico mais abundante é o produto de síntese esperado, além de notar-se poucos subprodutos. A amostra foi então coletada e analisada em espectrômetro de massa.

3.2. A massa monoisotópica experimental de Chim1 coincide com a calculada teoricamente. A análise das

frações coletadas após a purificação por espectrometria de massa MALDI-TOF MS indicam a presença de molécula com $[M+H]^+ = 2939,76$ Da (Figura 2), em acordo com a massa teórica para o peptídeo Chim1, calculada como $[M+H]^+ = 2939,72$ Da. O espectro demonstra ainda a inexistência de outros picos de intensidade relevante (dados não mostrados), indicando sucesso no processo de purificação do peptídeo sintético. Chim1 foi ainda submetido a experimentos de MS/MS, os quais atestaram a identidade da estrutura primária da molécula (dados não mostrados).

3.3. Atividade antimicrobiana da Chim1 é reduzida em comparação com o HS02. A avaliação do potencial antimicrobiano da Chim1 e do HS02 foi efetuada frente a patógenos humanos, entre eles a levedura *C. albicans*, a bactéria Gram positiva *S. aureus*, e a bactéria Gram negativa *P. aeruginosa*, estas duas últimas representando as bactérias mais comumente isoladas de lesões cutâneas^{15,16}. Os peptídeos da secreção cutânea de anfíbios, DS01 e ASC-08, foram utilizados como controle. Esse resultado era esperado uma vez que a adição de outros resíduos de amino ácidos jusantes ao HS02 altera o balanço físico-químico da estrutura, modificando sua interação com as membranas dos microrganismos

Tabela 1: Dados comparativos de mínima concentração inibitória executado de acordo com os protocolos do CLSI.

Minimum inhibitory concentration (μ M)				
Peptídeos	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Chim1	32	128	128	128
HS02	1,67	1	1,67	-
ASC-8	10,67	1,67	4	-
DS01	5	8	2	-

3.4. O peptídeo Chim1 estrutura-se em α -hélice na presença de vesículas de DMPC e DMPC:DMPG. A estrutura de Chim1 foi avaliada em uma razão de 1:38 peptídeo:fosfolípidos. Leituras no UV distante foram realizadas para o peptídeo em tampão somente e junto das vesículas de DMPC e de 2:1 DMPC:DMPG (Figura 3).

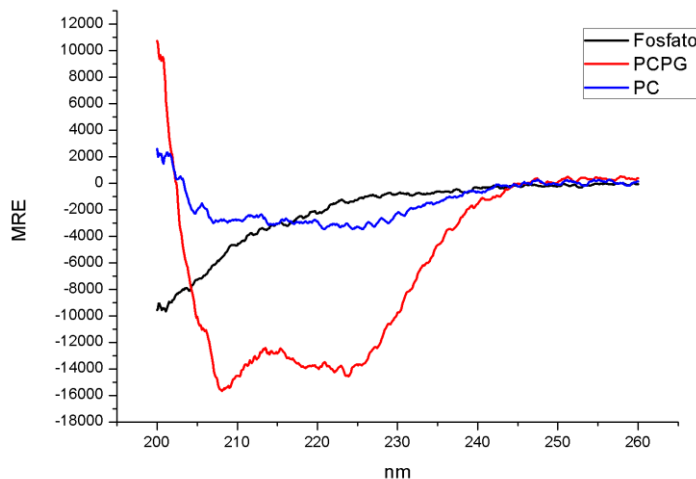


Figura 3: Espectro dicróico comparativo de estruturação da Chim1 em vesículas de DMPC e vesículas DMPC:DMPG, tendo como controle o tampão fosfato.

A varredura do espectro do peptídeo indica que o Chim1 não possui estrutura definida em solução aquosa (Figura 3). Além disso, este peptídeo apresenta maior grau de estruturação em vesículas do tipo 2:1 DMPC:DMPG, do que em vesículas contendo somente o fosfolípidos DMPC. As bandas negativas em 222 nm e 208 nm e a positiva próxima a 190 nm indicam que Chim1 se estrutura como uma α -hélice ao interagir com as vesículas fosfolípídicas. Esse dado está de acordo com o esperado, já que o peptídeo HS02 apresenta alto conteúdo de hélice ao interagir com vesículas de mesma composição (dados não publicados).

3.5. A porção peptídica isolada FPR2a estimula a liberação de IL-6 e IL-12. Atuando de modo sinérgico, estas citocinas contribuem para a infiltração de células capazes de lutar contra as infecções e provocar o reparo de tecido lesionado.⁸ Fatores de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$) estão relacionados com o desencadeamento do processo de apoptose celular¹⁷. Já as interleucinas 6 e 12, entre outras funções, são responsáveis pelo estímulo de produção de outras células como neutrófilos¹⁸, diferenciação celular¹⁹ e pelo recrutamento indireto de leucócitos

Neste contexto foi quantificado a produção de IL-12, IL-6 e $TNF-\alpha$ para as porções isoladas HS02 e FPR2a da Chim1 (Figuras 5 e 6). Para quantificações de $TNF-\alpha$ utilizou-se a porção FPR2a de Chim1 em concentrações

de 0,1, 1 e 10 μM , já para as dosagens de interleucinas uma concentração fixa de 10 μM foi utilizada.

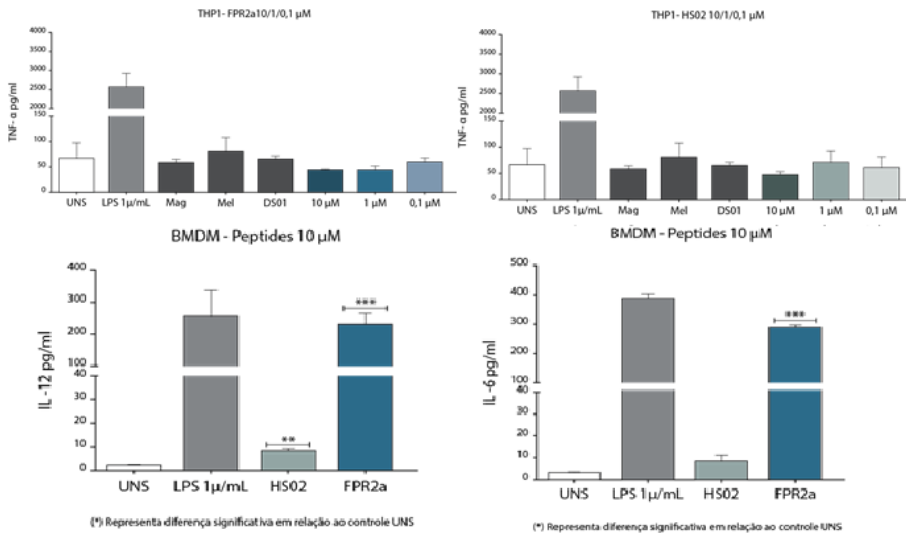


Figura 4: Quantificação de produção de $\text{TNF-}\alpha$ (superior) e interleucinas (inferior) produzidas por monócitos humanos (THP1) macrófagos murinos (BMDM) pelo estímulo com as porções HS02 e FPR2a

A porção FPR2a é capaz de estimular a produção de interleucinas de forma semelhante ao controle de LPS. Deste modo, propõe-se que, uma vez inserida em um contexto proteolítico e clivada de forma esperada, a Chim1 pode atuar indiretamente, ao estimular a produção de interleucinas, no recrutamento de células do sistema imune para o combater o antígeno via liberação da porção FPR2a⁸. A produção de interleucinas via estímulo com a porção HS02 foi estatisticamente diferente apenas para IL-12, entretanto, novos experimentos serão efetuados para verificar tal afirmação. Isso sugere que a Chim1 pode adquirir uma dupla função se clivada após interação com membranas bacterianas, antimicrobiana e imunomodulatória.

Células THP-1 estimuladas pelas frações HS02 e FRP2a de Chim1 não produziram quantidades significativas de $\text{TNF-}\alpha$ até a concentração máxima de peptídeo testada (Figura 4). Isso sugere que ambas as frações podem contribuir para limpeza do local da infecção ao estimular a apoptose de células que fagocitaram os microrganismos ou os antígenos responsáveis pela inflamação²¹.

Conclusões

Embora os dados sejam ainda preliminares, acredita-se que se clivado de forma precisa, o peptídeo Chim1 pode ser uma alternativa interessante no tratamento de doenças de pele ou lesões/infecções cutâneas. Estudos em meio proteolítico deverão ser realizados para se compreender como se dará a dupla atuação, antimicrobiana e quimiotática, do peptídeo Chim1 neste microambiente.

Referências bibliográficas

- Reinholz M, Ruzicka T, Schaub J. Cathelicidin LL-37: An antimicrobial peptide with a role in inflammatory skin disease. *Ann Dermatol.* 2012;24(2):126-135. doi:10.5021/ad.2012.24.2.126
- Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol.* 2012;280(1):22-35. doi:10.1016/j.cellimm.2012.11.009
- Sørensen OE, Föllin P, Johnsen AH, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood.* 2001. doi:10.1182/blood.V97.12.3951
- Brand GD, Magalhães MTQ, Tinoco MLP, et al. Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. *PLoS One.* 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0045848
- Ramada MHS, Brand GD, Abrão FY, et al. Encrypted Antimicrobial Peptides from Plant Proteins. *Sci Rep.* 2017. doi:10.1038/s41598-017-13685-6
- Brand GD, Ramada MHS, Genaro-Mattos TC, Bloch C. Towards an experimental classification system for membrane active peptides. *Sci Rep.* 2018. doi:10.1038/s41598-018-19566-w
- Brogden KA. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005. doi:10.1038/nrmicro1098
- Liu M, Chen K, Yoshimura T, et al. Formylpeptide receptors mediate rapid neutrophil mobilization to accelerate wound healing. *PLoS One.* 2014. doi:10.1371/journal.pone.0090613
- Chen K, Bao Z, Gong W, Tang P, Yoshimura T, Wang JM. Regulation of inflammation by members of the formyl-peptide receptor family. *J Autoimmun.* 2017. doi:10.1016/j.jaut.2017.06.012
- Le Y, Murphy PM, Wang JM. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol.* 2002. doi:10.1016/S1471-4906(02)02316-5
- Di Grazia A, Cappiello F, Imanishi A, et al. The Frog Skin-Derived Antimicrobial Peptide Esculentin-1a(1-21)NH₂ Promotes the Migration of Human HaCaT Keratinocytes in an EGF Receptor-Dependent Manner: A Novel Promoter of Human Skin Wound Healing? *PLoS One.* 2015. doi:10.1371/journal.pone.0128663
- De Yang, Chen Q, Schmidt AP, et al. LL-37, the Neutrophil Granule-And Epithelial Cell-Derived Cathelicidin, Utilizes Formyl Peptide Receptor-Like 1 (Fpr1) as a Receptor to Chemoattract Human Peripheral Blood Neutrophils, Monocytes, and T Cells. *J Exp Med.* 2000. doi:10.1084/jem.192.7.1069
- Stewart JCM. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrioxalate. *Anal Biochem.* 1980. doi:10.1016/0003-2697(80)90269-9
- Corrêa DHA, Ramos CHI. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *J Biochem.* 2009;3(5):164-173. doi:10.1089/wound.2015.0673
- Suleman L. Extracellular Bacterial Proteases in Chronic Wounds: A Potential Therapeutic Target? *Adv Wound Care.* 2016. doi:10.1089/wound.2015.0673
- Sohlenkamp C, Geiger O. Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol Rev.* 2015. doi:10.1093/femsre/fuv008
- Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. In: *Biochemical Pharmacology.* 2003. doi:10.1016/S0006-2952(03)00490-8
- Fielding CA, McLoughlin RM, McLeod L, et al. IL-6 Regulates Neutrophil Trafficking during Acute Inflammation via STAT3. *J Immunol.* 2008. doi:10.4049/jimmunol.181.3.2189
- Rincón M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. *J Exp Med.* 1997. doi:10.1084/jem.185.3.461
- Kurosaka K, Chen Q, Yarovinsky F, Oppenheim JJ, Yang D. Mouse Cathelin-Related Antimicrobial Peptide Chemoattracts Leukocytes Using Formyl Peptide Receptor-Like 1/Mouse Formyl Peptide Receptor-Like 2 as the Receptor and Acts as an Immune Adjuvant. *J Immunol.* 2005. doi:10.4049/jimmunol.174.10.6257
- Nagaoka I, Tamura H, Hirata M. An Antimicrobial Cathelicidin Peptide, Human CAP18/LL-37, Suppresses Neutrophil Apoptosis via the Activation of Formyl-Peptide Receptor-Like 1 and P2X7. *J Immunol.* 2006. doi:10.4049/jimmunol.176.5.3044