

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FLÁVIO MAURÍCIO PERINI

**Análise teórica do potencial antibacteriano de peptídeos oriundos
da clivagem *in silico* da Eritropoetina humana**

**VITÓRIA
2013**

**ANÁLISE TEÓRICA DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE
PEPTÍDEOS ORIUNDOS DA CLIVAGEM *IN SILICO* DA
ERITROPOETINA HUMANA**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Espírito Santo, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, para
obtenção do título de Mestre.**

**Orientador: Marco Cesar Cunegundes
Guimarães**

**VITÓRIA
2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Perini, Flávio Maurício, 1975-

P445a Análise teórica do potencial antibacteriano de peptídeos
oriundos da clivagem in silico da eritropoetina humana / Flávio
Maurício Perini. – 2013.

137 f. : il.

Orientador: Marco Cesar Cunegundes Guimarães.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Peptídeos. 2. Antibacterianos. 3. Eritropoetina. I. Guimarães,
Marco Cesar Cunegundes. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU:61

**ANÁLISE TEÓRICA DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE
PEPTÍDEOS ORIUNDOS DA CLIVAGEM *IN SILICO* DA
ERITROPOETINA HUMANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM:

**Prof. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
(Orientador)**

**Prof. Ricardo Schuenck
(Membro Interno)**

**Prof. Denise Coutinho Endringer
(Membro Externo)**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar a sabedoria necessária para conseguir direcionar essa caminhada.

Ao meu Orientador, Marco, que desde o primeiro dia me apoiou, soube compreender minhas dificuldades e esteve sempre pronto a proporcionar as oportunidades para que eu pudesse alcançar o sucesso. Sem seus direcionamentos nada disso teria se concretizado, assim ficam meus sinceros agradecimentos para quem teve a maior participação nessa minha conquista.

A minha família, pai, mãe, irmãos e todos outros que sempre estiveram prontos para uma palavra de auxílio. Ao meu filho, Matheus, que é e sempre será um orgulho em minha vida. A minha namorada, Lorena, que sempre esteve ao meu lado para me apoiar e me animar em todos os momentos. Ao apoio recebido por Miton, Lilian e Lucian, sempre com uma palavra de incentivo.

A todos os amigos e colegas de trabalho que de alguma forma puderam contribuir para essa conquista e que sempre torceram por mim.

Aos colegas de laboratório que sempre estiveram prontos para um auxílio em vários momentos.

Ao professor Alexandre Martins Costa Santos e a Débora Gouveia pelo apoio no desenvolvimento de parte do trabalho.

RESUMO

A relação estabelecida entre os micro-organismos causadores de doenças e a humanidade vem de longa data, sendo as bactérias um dos principais agentes causadores de doenças na espécie humana, cujo controle pode ser por meio do uso de antibióticos, entretanto, com o passar do tempo, o surgimento e o aumento da resistência bacteriana ao uso de tais medicamentos tem se tornado uma preocupação crescente. Diante de perspectivas negativas ocasionadas pela multirresistência, o investimento em pesquisas que permitam a obtenção de novos medicamentos tem se tornado uma necessidade, porém, por mais dinâmicas que sejam as empresas farmacêuticas, a busca por novos antibacterianos não tem acompanhado o desenvolvimento da multirresistência. Desta forma, a elaboração de novas estratégias para o combate crescente a essa resistência tem recebido maior atenção, e os peptídeos antibacterianos (PAMs) surgem como uma perspectiva. Muitos PAMs já foram isolados de animais e plantas apresentando eficácia comprovada. Além de isolados diretamente de organismo diversos, outra possibilidade de obtenção de PAMs é a síntese artificial de peptídeos projetados ou ainda a utilização de peptídeos obtidos da fragmentação de moléculas orgânicas existentes na composição biológica normal dos seres vivos. Modelações computacionais permitem escolhas de peptídeos com maior eficácia e que possam exercer um combate efetivo contra micro-organismos multirresistentes, assim, o desenvolvimento e a validação de técnicas que usem a bioinformática para facilitar a descoberta desses PAMs e minimizar custos de pesquisa estão se destacando no campo da biotecnologia. Neste trabalho, foi selecionada a proteína eritropoetina humana (EPO) para a obtenção de PAMs por meio de simulações *in silico*. Os peptídeos obtidos foram avaliados e testados em diferentes modelos computacionais visando a predição de possíveis efeitos antibacterianos, pensando em uma eventual síntese para testes futuros, com a perspectiva de que esses agentes atuem como novas armas contra a constante evolução da resistência bacteriana, desde que não gerem respostas imunológica de rejeição, alergenicidade ou citotoxicidade ao serem usados em terapias.

Palavras-chave: peptídeos antimicrobianos, antibacterianos, predição, predição *in silico*, eritropoetina, antibióticos.

ABSTRACT

The relationship established between the micro-organisms disease causing and humanity has a long history, the bacteria being one of the main causative agents of disease in humans, some easily controlled others less, usually through the use of antibiotics, however, with the passage of time, the emergence and spread of bacterial resistance to the use of such medications has become a growing concern. In the face of negative perspectives caused by multi-resistance, investment in research that allows the obtaining of new drugs has become a necessity, however, even the pharmaceutical companies had been dynamic, the search for new anti-bacterials has not accompanied the development of multidrug resistance. Therefore, the development of new strategies to combat this growing resistance have received more attention, and antibacterial peptides (PAMs) arise as a perspective. Many PAMs have been isolated from animals and plants showing proven effectiveness. Beyond directly isolated from various organisms, another possibility of obtaining PAMs is design artificial synthesis of peptides or the use of peptides obtained from the fragmentation of organic molecules in the biological composition existing in the standard of living beings. Computational modeling allow choices of peptides more effectively and that may have an effective combat against multidrug-resistant micro-organisms, thus, the development and validation of techniques that use bioinformatics to facilitate the discovery of these PAMs and minimize search costs are excelling in the biotechnology field. In this work, we selected the human erythropoietin protein (EPO) to obtain PAMs through simulations *in silico*. The peptides were evaluated and tested in different computational models aimed at predicting possible antibacterial effects, considering a possible synthesis for future testing, with the prospect that these agents act as new weapons against the constant evolution of bacterial resistance, since there do not generate immune responses of rejection, allergenicity and cytotoxicity when used in therapies.

Keywords: antimicrobial peptides, antibacterial, prediction, in silico prediction, erythropoietin, antibiotics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1. Antibióticos.....	12
2.2. Resistência.....	14
2.2.1.Aspectos gerais.....	14
2.2.2. Bactérias Gram positiva e Gram negativa	16
2.3. Caracterização dos peptídeos antimicrobianos	18
2.4. Mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos	27
2.5. Eritropoetina humana	30
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. METODOLOGIA	36
4.1. Desenho experimental.....	36
4.2. Análise estrutural da ERITROPOETINA.....	37
4.2.1. Busca em banco de dados da sequência da Eritropoetina Humana (EPO) 37	
4.2.2. Identificação da estrutura funcional da eritropoetina humana com análise comparativa	38
4.2.3. Fragmentação <i>in silico</i> para obtenção de peptídeos com efeito antimicrobiano	39
4.3. Seleção de fragmentos.....	40
4.3.1. Seleção por número de resíduos de aminoácidos.....	40
4.3.2. Seleção por carga total	40
4.3.3. Seleção por ponto isoelétrico	41
4.3.4. Seleção pelo índice Boman	41
4.3.5. Seleção pelo método descrito por Lata	41
4.4. Predição de estrutura secundária:.....	42
4.5. Predição da estabilidade dos peptídeos	43
4.6. Predição de energia livre após minimização.....	43
4.7. Predição de antigenicidade	43
4.7.1. Previsão de MHC classe I e classe II	44
4.7.2. Previsão para interação com linfócito B	45
4.8. Análise da alergenicidade.....	46

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1. Peptídeos	47
5.2. Estrutura secundária e estrutura média	50
5.3. Fragmentação in silico: cortes da sequência funcional da eritropoetina realizados por enzimas em simulação computacional	55
5.3.1. Seleção por número de resíduos de aminoácidos.....	56
5.3.2. Seleção pela carga total positiva.....	57
5.3.3. Seleção dos peptídeos pelo ponto isoelétrico	59
5.3.4. Seleção pelo índice Boman	59
5.3.5. Seleção pelo método descrito por Lata	60
5.4. Estrutura secundária dos peptídeos analisados: resultado de predição de estrutura	63
5.5. Resultados para avaliação de antigenicidade.....	84
5.5.1. Previsão de ligação a MHC classe I e MHC classe II.....	84
5.5.2. Delimitação de epítomos de células B	100
5.5.3. Previsão para alergenicidade	103
6. CONCLUSÃO	105
7. PERSPECTIVAS	106
8. REFERÊNCIAS	107
ANEXOS.....	118

1. INTRODUÇÃO

Desde o surgimento do homem, os micro-organismos estiveram associados a doenças inicialmente desconhecidas e incuráveis. Entretanto, as causas destas doenças começaram a serem descobertas a partir de 1878 com o trabalho de Pasteur e Koch (ANDERSSON et al., 2010).

A partir dos trabalhos realizados por Alexander Fleming que levaram a descoberta da penicilina, inúmeros outros foram desenvolvidos, porém a velocidade de surgimento de micro-organismos resistentes cria uma grande preocupação em ordem mundial, tornando a busca por novos compostos que possam atuar como novas drogas e alternativa para tratamento de doenças causadas por micro-organismos um fator fundamental na indústria farmacêutica.

Segundo Davies (2010), com o melhoramento da produção em larga escala e a crescente utilização os agentes antibacterianos contribuíram significativamente com o desenvolvimento de resistência bacteriana funcionando como um fator responsável pela seleção de bactérias resistentes, por isso, mesmo que esses antimicrobianos tenham revolucionado a história da medicina e salvado incontáveis vidas, a sua utilização vem sendo acompanhada por um rápido aparecimento de linhagens bacterianas resistentes.

Atualmente, a resistência bacteriana vem sendo considerada um crescente problema de saúde pública mundial e o maior obstáculo para o sucesso de um tratamento, já que continua a reduzir o número de antibióticos válidos disponíveis (OLIVEIRA et al., 2008; BANGHEZAL et al., 2007).

A resistência bacteriana é um fenômeno relacionado à formação de cepas não sensíveis aos antibióticos, que são capazes de se multiplicar mesmo na presença de concentrações de antimicrobianos mais elevadas do que as provenientes de doses terapêuticas convencionais e; ocorre devido à evolução natural dos micro-organismos, além do uso desmedido e irracional destes agentes nas práticas médicas, agrárias e veterinárias (WANNMACHER, 2004; HOEFLER et al., 2006). Apesar de todos os esforços da comunidade científica, a descoberta de novos antibióticos tem atingido sucesso limitado (WANG et al., 2006).

Nesse contexto, a pesquisa, a purificação, e a caracterização química, biológica e estrutural de novas substâncias antimicrobianas provenientes da fauna e da flora brasileira são valiosas, uma vez que a própria evolução tratou de selecionar um

vastíssimo espectro de substâncias eficientes que defendem contra infecções (FREITAS, 2003).

Nas últimas décadas, novas classes de antibióticos, incluindo peptídeos ou proteínas antimicrobianas de origem animal, têm sido extensivamente investigadas como alternativas a crescente resistência observada em diversos tipos de microorganismos patogênicos. Esses peptídeos são elementos primitivos da resposta imune de todas as espécies de ser vivo, cujas vias de indução são relativamente conservadas em vertebrados, insetos e plantas (HOFFMAN et al., 1999, DANGL & JONES, 2001).

A descoberta da ocorrência de peptídeos antimicrobianos e seu papel importante como efetores da defesa frente a patógenos microbianos foram enormemente motivados pelo surgimento e propagação de resistência múltipla aos antibióticos. Nas últimas décadas, tem merecido destaque as inúmeras pesquisas com os peptídeos antimicrobianos relacionados com seu uso potencial na luta contra microorganismos multirresistentes (ROTEM & MOR, 2009). Uma série de peptídeos “antibióticos” faz parte do sistema imune inato da maioria das espécies, desde plantas a mamíferos (ZASLOFF, 2002). Estes peptídeos possuem como principal alvo de interação os lipídios das membranas celulares dos organismos (PAPO et al., 2003).

A emergente resistência de vários grupos de bactérias aos antibióticos disponíveis, inclusive os de última geração, tem levado os laboratórios produtores a procurar novas substâncias que possam ser utilizadas com eficácia contra bactérias resistentes. Assim, vários bancos com sequências peptídicas, com potencial efeito microbicida, têm sido criados com a utilização da química combinatória (HOUGHTEN et al., 1991; BLONDELLE & HOUGHTEN, 1996; HONG et al., 1998). Embora muitos dos peptídeos identificados tenham atividade bactericida menor que os agentes antimicrobianos em uso, vários aspectos os tornam uma boa alternativa como futuros agentes antimicrobianos.

Além de peptídeos antimicrobianos de origem animal, muitos de origem vegetal foram descritos e tem sido constantemente estudados. Embora por um mecanismo mais complexo, porém semelhante, os peptídeos antibióticos codificados por genes de plantas mostram um padrão de expressão que é também consistente com uma função de resposta ao ataque de patógenos (GARCÍA-OLMEDO et al., 2001).

Diante das necessidades estabelecidas, buscamos desenvolver um desenho *in silico* de ferramentas de bioinformática para a geração e caracterização de peptídeos com potencial antibacteriano.

Com o intuito de tentar minimizar os impactos financeiros da síntese de peptídeos pretendemos estabelecer critérios teóricos os quais consideramos importantes para que uma sequência predita tenha atividade *in vitro*.

Dentro desse contexto, utilizamos como modelo para obtenção das sequências de peptídeos a eritropoetina humana.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Antibióticos

Vuillemin, em 1889, criou o termo antibiose para explicar o processo natural de seleção pelo qual um ser vivo destrói outro para assegurar a sua própria existência. Mais tarde surgiu o conceito atual de antibióticos relacionado a substâncias de origem biológica e que têm efeito deletério sobre micro-organismos (TORTORA et al., 2005).

O surgimento do primeiro antibiótico, a penicilina G ou benzilpenicilina, ocorreu em 1928, no laboratório do St. Mary's Hospital, em Londres, durante os estudos com uma cultura de bactérias do gênero *Staphylococcus*. O médico e professor de bacteriologia Alexander Fleming observou a presença de um bolor contaminando uma de suas culturas, o qual havia provocado a morte dessas bactérias (GOODMAN e GILMAN, 2010). Após essa constatação, o bolor foi isolado e descobriu-se que pertencia ao gênero *Penicillium*, atribuindo, assim, o nome de *penicilina* à substância antibacteriana. Em 1939, Florey e Chain isolaram das culturas do *Penicillium*, a penicilina, viabilizando assim o primeiro antibiótico de uso clínico (apud RAVAT et al., 2010).

Desde a penicilina, um grande número de antibióticos foi identificado, desenvolvido e usado clinicamente como opções terapêuticas. Inicialmente, o acesso aos primeiros antibióticos sistêmicos disponíveis (sulfonamidas e penicilina) era restrito, de uso reservado para as forças armadas durante a Segunda Guerra Mundial. Contudo, com o aumento do número de novos antibióticos, a simplificação do processo de manufatura e o desenvolvimento de novas formulações mais eficazes e econômicas, o acesso aos antibióticos foi consideravelmente facilitado (ALANIS, 2005).

Em 1943, Waksman e colaboradores, após terem estudado diferentes culturas de fungos, descobriram a estreptomicina que foi obtida a partir de 22 culturas do fungo *Streptomyces griseus* e introduzida no uso clínico em 1944. De forma importante, a estreptomicina mostrou-se eficaz contra bactérias gram-negativas e contra a *Mycobacterium tuberculosis*, inovando o tratamento contra a tuberculose (EBRAHIM et al., 2010).

Nos anos que se seguem, entre 1945 e 1961, novos medicamentos para combate aos micro-organismos foram descobertos, dentre eles destacam-se: cloranfenicol,

tetraciclina, rifamicina, metilicina, oxacilina e vancomicina (STRYJEWski e COREY 2010).

A produção do antibiótico em larga escala teve um avanço decisivo a partir do procedimento de fermentação profunda para a biossíntese da penicilina. De uma produção inicial total de algumas centenas de milhões de unidades por mês, a quantidade fabricada atingiu mais de duzentos trilhões de unidades em 1950 (GOODMAN e GILMAN, 2010).

Nessa época, a primeira penicilina comercializada custava valores dispendiosos por dose. Em 1976, o pesquisador Beecham descobriu um intermediário biosintético, o ácido 6-amino penicilâmico. Com isso, a obtenção da penicilina passou a ser semissintética, que reduziu significativamente os custos de comercialização (MENEGATTI et al., 2001).

Assim a produção de antibióticos, incluindo moléculas como as oxazolidinonas (ex: linezolida) e os lipopeptídeos (ex: daptomicina) tem sido estimulada para que seja possível o tratamento de infecções causadas pelas chamadas vulgarmente de superbactérias (STRYJEWski e COREY 2010 e EBRAHIM et al., 2010).

Pouco tempo depois do início da sua aplicação à utilização dos antibióticos generalizou-se, muito além do tratamento humano e animal. A ampla eficácia dos antibióticos foi precisamente o fio condutor para o cenário atual; por serem drogas muito eficazes no controle dos vários microrganismos, foram ao longo do tempo cada vez mais massivamente aplicados (DIAS e MONTEIRO et al., 2010).

2.2 Resistência

2.2.1 Aspectos gerais

Atualmente, um dos grandes problemas da saúde pública é o uso abusivo e indiscriminado dos antibióticos, o que pode levar a seleção de linhagem bacteriana com resistência a esses tipos de medicamentos além de contribuir com o aumento do número de intoxicações. O uso indevido se deve à fatores como a automedicação e ao uso de doses incompletas desses medicamentos, e o aumento da resistência ocorre por adaptação biológica, processo pelo qual o microrganismo desenvolve mecanismos de defesa contra a ação do antibiótico. Com isso, surge a necessidade do desenvolvimento frequente de novas drogas, mais potentes e mais ativas. (CALIXTO e CAVALHEIRO, 2012).

O uso indiscriminado destas drogas tem levado ao surgimento de cepas de micro-organismos cada vez mais resistentes, onde a emergência de micro-organismos resistentes a múltiplas drogas tem se revelado como mais um problema de saúde pública (PARK et al., 2011). Além de causar graves infecções hospitalares, afetando pacientes hospitalizados, recentemente essas bactérias vêm se espalhando na comunidade provocando doenças severas em pacientes previamente saudáveis (ALANIS, 2005).

Nos anos 60 e 70, o uso indiscriminado de penicilinas semissintéticas resistentes a penicilinases e de cefalosporinas favoreceu o aparecimento de linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e na mesma época, o uso extensivo de ampicilina favoreceu o aparecimento de cepas de *Escherichia coli* ampicilina-resistentes. Entre os anos 70 e 80, as bactérias Gram-negativas eram o grande obstáculo terapêutico, mas no novo milênio, as Gram-positivas passaram também a ocupar um lugar de destaque (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Segundo Swartz (2000), uma discrepância entre o surgimento de bactérias resistentes e as pesquisas para a descoberta de novos antibióticos vinha se estabelecendo, ele destaca que o percentual de artigos relacionados a novas resistências microbianas publicados no *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* aumentou de 11% no período de 1972-1973 para 34% no período de 1997-1998. De acordo com Livmore (2004), nos últimos anos, a maioria das grandes empresas farmacêuticas diminiu de forma muito significativa a busca por novos compostos antimicrobianos devido a questões econômicas, uma vez que as drogas contra

doenças crônicas oferecem um fluxo de receita melhor do que os agentes antimicrobianos.

A situação atual da resistência às drogas tem sua origem em muitos fatores, incluindo a seleção de mutantes resistentes por exposição a agentes antimicrobianos, transferência de determinantes genéticos de resistência entre cepas bacterianas e disseminação clonal de cepas resistentes entre pacientes hospitalizados e entre instituições hospitalares. Como consequência está o aumento da morbidade e mortalidade entre pacientes, a redução do número de drogas utilizáveis por futuras gerações de pacientes, além do impacto econômico trazido pelos custos com infecções (MCGOWAN JR, 2004). Neste contexto, o uso incorreto dos antimicrobianos, uma das principais causas do aparecimento da resistência, pode estar associado a fatores como doses subterapêuticas, inefetividade da droga selecionada, esquemas terapêuticos curtos, baixa penetração no local de infecção, conhecimento inadequado das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos para escolha terapêutica, além de fatores relacionados ao paciente, como idade, status imunológico e não adesão ao tratamento (QUINTILIANI et al., 1994).

Apesar da emergência de bactérias resistentes serem um fenômeno natural e decorrente do contato dos microrganismos com os antibióticos, a rápida evolução verificada acontece na proporção da utilização dessas drogas (DIAS e MONTEIRO et al., 2010).

Tal como Charles Darwin previu um século antes do aparecimento dos antibióticos, os organismos adaptam-se para sobreviver e os mais adaptados prevalecem. A utilização intensiva exerceu uma pressão seletiva crescente no meio, acelerando o desenvolvimento pelas bactérias de formas de adaptação e resistência aos principais antibióticos, que são transmitidas vertical e horizontalmente (DIAS e MONTEIRO et al., 2010).

Mundialmente existem cada vez mais bactérias resistentes e há cada vez um número maior de estirpes resistentes a múltiplas drogas (particularmente em meio hospitalar), aumentando a morbidade, os custos inerentes às prestações dos cuidados de saúde, bem como as taxas de mortalidade por infecções (KLEVENS, 2002).

O perfil da resistência bacteriana aos antibióticos é muito variável entre as regiões do globo. Nos vários continentes, e à escala dos países, existem também

importantes diferenças que continuam a ser expressivas ao nível regional, em locais geograficamente próximos. Desde 2001, a União Europeia publica recomendações que reúnem as medidas estratégicas a adotar pelos estados membros no combate à resistência bacteriana, enfatizando, entre outras áreas de intervenção: criação de sistemas de vigilância epidemiológica, prevenção da infecção, otimização do uso dos antibióticos, investigação e desenvolvimento de novos fármacos, bem como a necessidade da cooperação internacional (DIAS e MONTEIRO et al., 2010).

Por todo o mundo, existem redes de vigilância epidemiológica, que reúnem dados referentes a padrões de susceptibilidade microbiana, sua variação regional e temporal, de forma a orientar as recomendações terapêuticas e a decisão na prática clínica (DIAS e MONTEIRO et al., 2010).

Na Europa, o sistema de monitorização da evolução das resistências bacterianas, *The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)*, existe desde 1998 e integra atualmente um conjunto de 32 países. Disponibiliza em tempo real dados, validados, recolhidos a partir de laboratórios públicos hospitalares, nos vários países, sobre a susceptibilidade de sete bactérias relevantes no continente europeu. Permite assim a análise dos padrões de resistência bacteriana ao longo do tempo, entre diferentes regiões e países (DIAS e MONTEIRO et al., 2010).

Há muito tempo a utilização dos antibióticos é alvo de estratégias, visando o seu emprego adequado e o controle da evolução de estirpes resistentes. A otimização dos padrões de prescrição e a redução da má utilização dos antibióticos são incontornáveis, mas a diversidade dos fatores (profissionais, culturais, sociais, económicos, entre outros) implicados dificulta o sucesso das medidas teóricas. São necessários estudos de base populacional para avaliação dos fatores determinantes e facilitadores da utilização e não utilização dos antibióticos (DIAS e MONTEIRO et al., 2010).

2.2.2 Bactérias Gram positiva e Gram negativa

As bactérias são seres unicelulares procariontes, portadores de uma estrutura celular simplificada, sem a presença de organelas citoplasmáticas membranosas e com o material genético disperso pelo citoplasma compondo o nucleóide. Além da membrana plasmática, do citoplasma, do material genético e dos ribossomos, que são constituintes essenciais para qualquer bactéria, a maioria apresenta, também, a

parede celular. A parede celular é variável em sua composição química o que determina a existência de grupos de bactérias, como as Gram positivas e Gram negativas, que possuem grande importância médica.

A parede celular bacteriana é uma estrutura rígida que recobre a membrana citoplasmática e confere forma às bactérias. Ela é constituída por ácido diaminopimérico (DPA), ácido murâmico e ácido teicóico além de aminoácidos, carboidratos e lipídeos. Todos esses compostos estão reunidos para formar substâncias poliméricas complexas que por sua vez estruturam a parede celular. Uma macromolécula complexa denominada peptidoglicana (também chamada de mucopeptídeo ou mureína) forma a estrutura rígida da parede. Além disso, a parede celular protege a célula, mantém a pressão osmótica intrabacteriana, impedindo o rompimento da célula devido à entrada de água, e funciona como suporte de antígenos somáticos bacterianos (TRABULSI, 1991; BIER, 1994).

A divisão das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, de acordo com sua resposta à coloração de Gram é decorrente das diferenças na composição e estrutura da parede celular (Figura 1).

Bactérias Gram positivas possuem uma quantidade maior de peptidoglicano em sua parede celular, o que torna a parede dessas bactérias mais espessa e rígida do que a das bactérias Gram negativas. Composta de proteínas, lipídeos, peptidoglicano e ácidos teicóicos (cadeias de polifosfato com resíduos de ribitol e glicerol), essas bactérias são sensíveis à lisozima e sua parede constitui o local de ação de alguns antibióticos além de apresentar elementos básicos para identificação sorológica. (TRABULSI, 1991; BIER, 1994).

Em bactérias Gram negativas a parede celular é menos espessa e elas são mais complexas do que as Gram positivas por apresentarem uma membrana externa cobrindo a fina camada de peptidoglicano. A membrana externa é o que distingue as bactérias Gram negativas, servindo como uma barreira seletiva para a entrada e saída de algumas substâncias da célula e podendo ainda causar efeitos tóxicos sérios em animais infectados. A estrutura da membrana externa é composta por fosfolipídios, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPSs). Os lipopolissacarídeos estão localizados exclusivamente na camada externa da membrana, enquanto que os fosfolipídeos estão presentes quase completamente na camada interna. (TRABULSI, 1991; BIER, 1994).

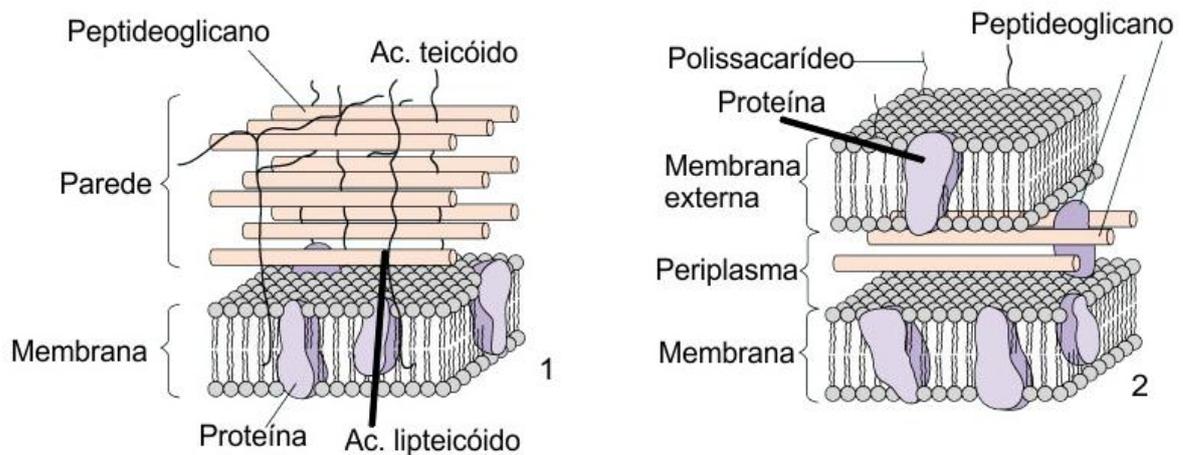


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da parede celular de bactérias Gram positiva (1) e Gram negativa (2). Fonte: MIMS et al. (1995), modificado.

2.3 Caracterização dos peptídeos antimicrobianos

Diferentes grupos de peptídeos antimicrobianos (PAMs) que já foram isolados até o momento apresentam algumas características em comum. Geralmente possuem baixo peso molecular (abaixo de 10kDa), possuindo, normalmente, de 10 a 50 aminoácidos, e se caracterizam por serem moléculas anfipáticas, possuindo tanto uma região hidrofóbica que interage com lipídeos quanto uma região hidrofílica carregada positivamente. São portadores de alto conteúdo dos aminoácidos lisina, arginina e/ou histidina, sendo moléculas capazes de interagir com resíduos aniônicos. Muitas são também ricas em resíduos de cisteína, o que favorece a formação de ligações dissulfeto na estrutura molecular, tornando-as bastante resistentes às proteases presentes no soro/plasma (HOFFMAN, 1997; BULET, 2004).

Alguns destes peptídeos tendem a se apresentar sem estrutura definida em solução aquosa, adotando uma forma anfipática ao interagir com membranas, atributo crucial tanto para atividade quanto para citotoxicidade (OREN et al., 1998). Apesar da estrutura tridimensional e propriedades físicas serem bastante semelhantes entre os diversos peptídeos antimicrobianos, os mesmos tem sido classificado normalmente em famílias estruturais baseadas nos padrões de enovelamentos, pois esse grandes grupos apresentam pouca homologia entre sequências primárias (JASON, KINDRACHUK, 2010).

Os PAMs participam da primeira linha de defesa de uma grande variedade de organismos que vão desde procariotas até mamíferos (JENSSEN, 2006). São componentes do sistema imune inato de virtualmente todas as formas e vida, que foram retidos durante a co-evolução entre eucariotos e procariotos (PESCHEL et al., 2006). Nos seres humanos, os PAMs são componentes essenciais da imunidade inata onde desempenham papéis chave de defesa e como imunomodulador (BROWN, 2006).

Para os organismos que não possuem uma resposta imune adaptativa, os peptídeos antimicrobianos formam o componente central do sistema imune inato contra a invasão de patógenos. No sistema imune dos organismos mais derivados, os peptídeos antimicrobianos fazem parte tanto da resposta inata como adaptativa, contribuindo significativamente para o combate das infecções (VICTOR E NIZET, 2001).

Os peptídeos antimicrobianos são, em geral, codificados por genes, sintetizados ribossomalmente e produzidos constitutivamente ou em resposta a eventos patológicos (GALLO et al., 2002). Muitos deles são sintetizados como precursores inativos, que são processados até sua forma ativa por clivagem proteolítica de uma região pré-pró-peptídica. Nas plantas, além de agir nos sítios infecciosos, eles também podem se acumular em diversas estruturas vegetais, em um fenômeno conhecido como resistência sistêmica adquirida (BENKO-ISEPPON, GALDINO, et al., 2010).

Atualmente, é descrita uma grande variedade de organismos vivos capazes de produzir moléculas de peptídeos que atuam na primeira linha de suas defesas. Tais moléculas podem ser sintetizadas constantemente pelo organismo ou somente após uma lesão ou infecção, tendo-se revelado responsáveis pelo sistema imune inato com amplo espectro de atividade biológica. Embora o estudo seja relativamente recente, milhares destas moléculas já foram isoladas e tiveram suas atividades biológicas comprovadas. Destas, a grande maioria apresenta atividade antimicrobiana, de grande importância no sistema de defesa do organismo (JENSSEN et al., 2006; WANG et al., 2008), são muito diversificados quanto à sequência de aminoácidos que apresentam, bem como a estrutura secundária, porém possuem muita semelhança quanto a algumas propriedades que levam ao efeito antimicrobiano desejado. Possuem, por exemplo, afinidade a fosfolipídios carregados negativamente que estão presentes na face externa da membrana

plasmática de inúmeras espécies de micro-organismos, apresentado um largo espectro de atividade, sendo descritas atividade contra bactérias (Gram-positiva e Gram-negativa), fungos, vírus, protozoários além de outras atividades como ação anti-tumoral, ação mitógena e sinalização química celular. São moléculas relativamente pequenas de grande ação antimicrobiana e, em muitos casos, apresentam baixa toxicidade para mamíferos. (YEAMAN, 2003; POWERS, 2003; LOHNER, 2005).

No entanto, existem vários obstáculos para o uso dos peptídeos antibacterianos como agentes anti-infecciosos. Dentre eles, destaca-se a sua toxicidade, principalmente se forem administrados sistematicamente, e a pequena meia-vida na circulação. A síntese de peptídeos contendo D-aminoácidos tem sido sugerida como uma alternativa ao seu uso sistêmico, visto que tais peptídeos não são degradados pelas enzimas plasmáticas, mantêm a atividade antimicrobiana e, muitas vezes, apresentam redução na atividade hemolítica (MANGONI et al., 2006).

O mecanismo de ação mais bem conhecido é através da sua inserção na membrana celular que causa a destruição ou a permeabilização da mesma, levando o micro-organismo à morte. Alternativamente, os peptídeos antimicrobianos podem se ligar a receptores da membrana, levando a uma perda específica de sua função. Além disso, ao se translocarem através da membrana, essas moléculas podem atuar intracelularmente, impedindo a síntese de metabólitos importantes para o micro-organismo. Por atuarem em diferentes compartimentos celulares, esses compostos tornam-se candidatos promissores para o desenvolvimento de drogas importantes no combate a patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (LOHNER, 2001).

De posse das grandes possibilidades de aplicação que os peptídeos antimicrobianos apresentam pesquisas que buscam a identificação, o método de ação, a caracterização, a síntese *in vivo* e *in vitro* e sua aplicação tem sido desenvolvidas.

Inúmeros trabalhos têm relatado a existência de diversos peptídeos em animais e plantas de uso antimicrobiano, bem como a síntese artificial de peptídeos de eficácia comprovada, e uma das ferramentas mais marcantes para a identificação e caracterização do efeito antimicrobiano é a bioinformática. Com bancos de dados que acumulam informações a respeito de inúmeros peptídeos já descritos, essa tecnologia vem se tornando muito eficaz na busca de potenciais peptídeos antimicrobianos antes mesmo de sua síntese para testes *in vivo*, reduzindo muito os

gastos com pesquisas que não gerariam resultados satisfatórios além de poupar muito tempo nas pesquisas.

Informações sobre peptídeos antimicrobianos têm sido recolhidas e compiladas em bancos de dados importantes, tais como ANTIMIC, AMSDb, Peptaibol, GenBank, EMBL, Swiss-Prot, sapD, *RCSB Protein Data Bank* entre inúmeros outros. Nesses bancos podem ser encontradas informações químicas e biológicas sobre os diversos peptídeos descritos, informações sobre síntese e testes, entre outras, de grande importância científica.

Peptídeos antibacterianos são moléculas de pouca homologia de sequência, apesar de apresentarem várias propriedades comuns (HAMCOCK, 1999), sendo difícil o desenvolvimento de um método para prever os peptídeos antibacterianos com base na semelhança. Além do que, os métodos experimentais para a identificação e construção de peptídeos antibacterianos consomem muito tempo e recurso, desta forma, é cada vez mais crescente a necessidade de desenvolver ferramentas computacionais para predição de peptídeos antibacterianos, que poderiam ser utilizadas para a identificação de peptídeos que presente potencial efeito contra os agentes patogênicos bacterianos (LATA, 2007).

Atualmente, os estudos envolvendo os peptídeos antimicrobianos estão cada vez mais evidentes, justamente pelo fato de serem reconhecidos agentes de elevado potencial antimicrobiano, produzidos pela maioria das espécies de seres vivos, e com grande importância no processo de defesa do organismo. Além do interesse no potencial antibacteriano, podendo ser eficazes no combate a bactérias resistentes a várias drogas comerciais, é relatada ainda a possibilidade de utilização junto a outros antibióticos comerciais já conhecidos, visando à obtenção de um efeito sinérgico. Também há o interesse de uso na indústria de alimentos, baseando-se no fato de que tais peptídeos poderiam inibir o desenvolvimento de algumas bactérias junto aos mesmos.

Devido à alta toxicidade de alguns peptídeos antimicrobianos e também devido ao seu alto custo de produção, o uso disseminado desta classe terapêutica de antimicrobianos ainda é limitado (DUVAL et al., 2009), sendo que apenas uma pequena parcela desses agentes tem sido empregado na medicina (KAMYSZ, 2005).

Nos últimos anos, tem surgido alternativas que diminuem os custos da sua produção (CASTRO et al., 2006) e assim uma ampla gama de utilizações clínicas vem sendo

sugeridas para essa classe de antimicrobianos, como o seu uso no tratamento de úlceras gástricas (BRAUNSTEIN et al., 2004) e de pele, onde, neste último caso, o pexiganan, um análogo da maganina, se tornou um atrativo candidato no desenvolvimento de agentes antimicrobianos de uso tópico (GE et al., 1999). Há também estudos envolvendo o uso destes agentes em doenças da cavidade oral (KOMATSUZAWA et al., 2007), doenças oftálmicas (MANNIS, 2002), doenças sexualmente transmissíveis (PENBERTHY et al., 2011), sepse (JERALA & PORRO, 2004), bem como espermicidas (YERDERY & REDDY, 2005).

Os peptídeos antimicrobianos podem ser agrupados de acordo com suas propriedades químicas e estruturais em 2 classes: lineares e cíclicos. Os lineares, não apresentam o aminoácido cisteína em sua composição, e podem ser subdivididos nos que formam uma α -hélice anfipática após contato com a membrana celular (por exemplo, maganina de sapo, HARA et al., 2001) e os ricos em um determinado tipo de aminoácido, tais como prolina, histidina e triptofano (por exemplo, indolicidina de bovino, ROZEK et al., 2000). Os cíclicos são peptídeos que apresentam resíduos de cisteína em sua estrutura, podendo ter as extremidades aminoterminal abertas (por exemplo, drosomicina da mosca *Drosophila melanogaster*, LANDON et al. 1997) ou as extremidades fechadas (por exemplo, tetadefensina de macaco, TRABI et al. 2001).

Os PAMs podem apresentar uma grande diversidade estrutural, porém, de acordo com Jenssen et al. (2006), os peptídeos antibacterianos podem ser agrupados em quatro classes distintas de estruturas secundárias:

- 1- Alfa-hélice: são as estruturas mais comumente observadas, sendo formadas apenas quando os peptídeos entram em contato com a membrana.
- 2- Folhas-beta: são estruturas estabilizadas por ligações dissulfeto 2-4 e podem, ocasionalmente, apresentar pequenas porções de estrutura alfa-hélice.
- 3- Estrutura curvada: formadas por ligações dissulfeto simples ou devido à presença de resíduos de prolinas na estrutura (RESENDE et al., 2008)
- 4- Estruturas estendidas: são caracterizadas pela predominância de um ou dois resíduos de aminoácidos na sequência primária.

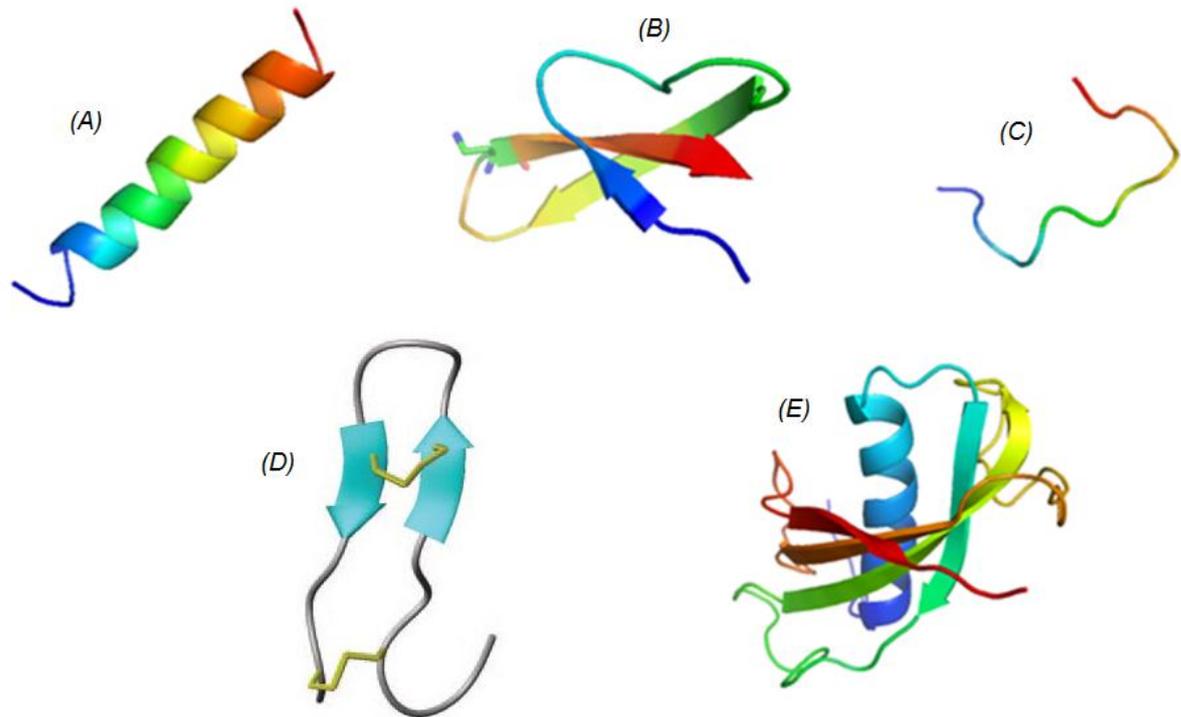


Figura 2. Em (A) estrutura alfa-helicoidal; em (B) estrutura folha beta; em (C) estrutura estendida; em (D) estrutura em curva e em (E) peptídeo enovelado, nota-se a diversidade das estruturas presentes na molécula. (Fonte: RCSB – Protein Data Bank, acessível em <<http://www.rcsb.org/pdb>>)

Segundo Papo et al. (2003), o principal alvo de interação dos peptídeos antibacterianos são os lipídios das membranas celulares dos organismos. A ação pode envolver uma desestabilização das membranas plasmáticas, resultando em lise celular.

A atividade dos peptídeos dirigida aos lipídios de membranas representa uma grande vantagem aos peptídeos antibióticos naturais, devido ao fato da composição lipídica dessas membranas serem altamente conservadas durante a evolução dos organismos e apresentar diferenças significativas, fundamentalmente na parte lipídica, entre as células procarióticas e eucarióticas (ZALOFF, 2002).

A ação antimicrobiana dos PAMs depende, em geral, de perturbações na membrana bacteriana por interações eletrostáticas e hidrofóbicas. A desestabilização das membranas biológicas tem sido considerada, por muitos, o mecanismo pelo qual os peptídeos antimicrobianos exercem sua função, agindo como detergentes, ou formando poros (MEINCKEN et al., 2005; MECKE et al., 2005), no entanto, evidências sugerem que tal desestabilização pode ser apenas um dos mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos atuam (SAHL et al., 2005).

De qualquer forma, a interação entre os peptídeos antimicrobianos e as membranas biológicas alvo e, aparentemente, imprescindível para a ação destes, sendo a atividade lítica independente de receptores na membrana, o que dificulta o desenvolvimento de mecanismos de resistência, conferindo a estes peptídeos um grande potencial para serem utilizados como substitutos de antibióticos convencionais (POWERS & HANCOCK, 2003; YEAMAN & YOUNT, 2003).

Os fatores determinantes dos mecanismos microbicidas desses peptídeos estão relacionados às características das membranas celulares das células microbianas e a natureza físico-química do peptídeo (LIANG & KIM, 1999). A atividade e a seletividade dos peptídeos catiônicos são determinadas pelo modo de interação com as membranas celulares dos microrganismos. A maioria possui carga catiônica e hidrofobicidade relativamente alta em pH fisiológico, o que facilita a ligação e inserção a membrana das células microbianas.

A maior parte dos PAMs caracterizados até hoje apresentam uma carga líquida positiva, que varia de +2 a +9, podendo conter um domínio catiônico altamente definido. Esta cationicidade é, sem dúvida, de grande importância para a atração eletrostática do PAM pela membrana fosfolipídica carregada negativamente das bactérias e outros micro-organismos, o que garante aos PAMs certa seletividade no que diz respeito aos tecidos do hospedeiro (YEAMAN & YOUNT, 2003).

Em bactérias Gram-positivas, a interação ocorrerá com a única membrana citoplasmática que envolve a célula bacteriana, enquanto que em bactérias Gram-negativas a interação com a membrana externa e com a membrana citoplasmática se faz necessária para efetivação da atividade bactericida.

Os peptídeos catiônicos interagem possivelmente com o lipopolissacarídeo (LPS) encontrado na membrana externa das bactérias Gram-negativas e, subsequentemente, criam uma via de transporte rápida para transporte do próprio peptídeo. Nessa via, a primeira etapa é a interação de polícatíons com as moléculas de LPS da superfície celular. Esse fato aparentemente ocorre devido aos peptídeos possuírem uma afinidade três vezes maior com as moléculas de LPS do que com os cátions divalentes nativos como Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Assim, a propriedade de barreira seletiva da membrana é destruída e a célula bacteriana fica exposta à passagem de uma grande variedade de moléculas, incluindo compostos hidrofóbicos, pequenas proteínas e/ou compostos antimicrobianos, e, o mais importante, a importação do próprio peptídeo que causou o efeito perturbador no envoltório celular. Esse

mecanismo explica como os peptídeos catiônicos ligam-se e inibem a endotoxemia (LPS liberado) e como eles podem ser utilizados sinergicamente aos antibióticos convencionais (BROGDEN, 2005).

Os diferentes peptídeos diferem em sua eficácia; certamente alguns deles são específicos para bactérias Gram-positivas porque não possuem a capacidade de criar um sistema de transporte próprio, necessário para a atividade bactericida contra Gram-negativos (CRISTENSEN et al., 1988; TEJADA et al., 1995). A morte de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas está ligada à formação de canais na membrana citoplasmática (LIANG & KIM, 1999). Os agregados moleculares formam um aglomerado com sua face hidrofóbica voltada para o interior da membrana e sua face hidrofílica voltada para o meio extracelular e para o interior do citoplasma ou para o espaço interplasmático, formando um canal. Tendo a integridade da membrana destruída, a célula morre. A capacidade de formar canais é favorecida pelo grande potencial da membrana, pelo alto nível de lipídeos negativamente carregados, a falta de lipídeos catiônicos e colesterol, características da célula bacteriana. As células eucarióticas, por outro lado, têm baixo potencial de membrana, altos níveis de colesterol e uma quantidade modesta de lipídeos aniônicos.

Tem sido demonstrado que os PAMs, além da participação direta na eliminação dos patógenos, podem atuar como reguladores da resposta do sistema imune. Eles podem regular respostas inflamatórias, como por exemplo, aquelas desencadeadas por endotoxinas, tais como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas e suprimir a expressão de genes pró-inflamatórios. Além disso, os PAMs podem induzir a produção de diferentes citocinas e quimiocinas, agir como agente quimioatrativo para determinados tipos de células, como monócitos, neutrófilos, linfócitos T e eosinófilos, além de influenciar na diferenciação de células dendríticas imaturas. Dessa forma, os PAMs possuem, indiretamente, um papel no desenvolvimento dos linfócitos e disparo das respostas do sistema imune adaptativo (MOOKHERJEE & HANCOCK, 2007).

Os micro-organismos têm coexistido, há milhões de anos, com seus hospedeiros e, portanto, desenvolveram estratégias que permitem evitar ou impedir a atividade microbicida do hospedeiro ao agente microbiano. A resistência adquirida está frequentemente associada à resistência a vários antibióticos disponíveis ou a combinações de antibióticos (MURRAY, 1995). Esse tipo de resistência parece não

ocorrer nos peptídeos catiônicos. Por exemplo, não foi registrada nenhuma tendência a resistência à vancomicina, nos últimos 30 anos Cooper & Given, 1986 e o fato parece ser verdade, também para a teicoplanina (WILLIAMS & CRÜNENBERG, 1988). Por outro lado, os agentes patogênicos de insetos *Serratia marsceceus* e *Bacillus thurigiensis* são resistentes a cecropina, uma família de peptídeos presentes na hemolinfa da *Cecropia moth* e outros insetos. Outro exemplo é o patógeno *Salmonella typhimurium*, que possui vários loci de resistência peptídica, que permitem a ele colonizar tecidos do hospedeiro ricos em peptídeos antimicrobianos. Consequentemente, a resistência a peptídeos parece ser inata e/ou não adquirida e controlada transcricionalmente.

O determinante para a resistência bacteriana aos peptídeos antimicrobianos pode ser dividido em três tipos ou classes (GRISMAN, 1998): (I) interferência na capacidade de achar o alvo (ex. modificação do LPS); (II) inibição ou destruição da atividade biológica do peptídeo (membrana externa ou atividade peptidásica); (III) restauração do balanço fisiológico perturbado como consequência da ação do peptídeo, controlado por loci específicos.

É sabido que há uma grande diversidade de fosfolipídios nas membranas biológicas, e que eles estão relacionados às funções específicas da membrana. O componente básico de praticamente todas as biomembranas é a bicamada fosfolipídica. Por definição, tais bicamadas são anfipáticas, tendo ambos os domínios, hidrofóbicos e hidrofílicos. No entanto, com base em sua composição, as biomembranas de células procariotas e eucariotas diferem significativamente. (YEAMAN & YOUNT, 2003). Especialmente as propriedades físico-químicas dos fosfolipídios presentes nas membranas dos micro-organismos têm despertado um grande interesse, uma vez que se sugere que a composição lipídica das membranas bacterianas tem um papel importante na interação com peptídeos antimicrobianos (LOHNER & PRENER, 1999; LOHNER, 2001).

Os PAMs catiônicos se ligam preferencialmente às membranas ricas em cardiolipina e fosfolipídios ácidos, tais como fosfatidilglicerol e fosfatidilserina, devido às fortes interações eletrostáticas (MATSUZAKI et al., 1991; MATSUZAKI, 1998). Em vários casos, uma correlação direta é encontrada entre eficácia em permeabilizar membranas e a potência de destruir bactérias (OREN et al., 1997). Da mesma forma, a fluidez e a curvatura da bicamada lipídica influenciam a interação entre os peptídeos e os lipídios. Bicamadas fluidas geralmente são mais suscetíveis aos

peptídeos, como por exemplo, no caso das magaininas, as quais atuam permeabilizando de forma mais eficaz bicamadas lipídicas em fase líquida do que aquelas em fase gel (MATSUZAKI et al., 1991). O colesterol afeta a fluidez e o potencial de dipolo dos fosfolipídios das membranas e, portanto, modula a atividade de inserção dos peptídeos nestas membranas (MATSUZAKI et al., 1995). Conforme demonstrado por Silvestro et al., o colesterol diminui os efeitos líticos da cecropina sobre membranas, porém sem aboli-lo. A imposição de um obstáculo à inserção do peptídeo na membrana permite que proteases atuem sobre estes peptídeos removendo-os da superfície celular (RESNICK et al., 1991; SILVESTRO et al., 1997; ANDREU & RIVAS, 1999).

2.4 Mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos

Diferentemente dos mecanismos de ação de antibióticos clássicos, que se baseiam em inibições enzimáticas, sendo relativamente lentos (LOHNER e PRENNER, 1999), peptídeos antimicrobianos interagem na superfície de células bacterianas causando perturbações na estrutura da bicamada lipídica, ocasionando lise celular (ZASLOFF, 2002).

Atualmente, vários modelos indicam que o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos ocorre pela combinação de efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos (SANDERSON, 2005). Estes peptídeos carregados positivamente são atraídos pela superfície aniônica das membranas bacterianas, onde sofrem mudanças conformacionais adotando uma estrutura anfipática (BECHINGER, 2004). Entretanto, o mecanismo pelo qual os peptídeos permeabilizam a membrana bacteriana e como exercem sua atividade antimicrobiana ainda não são completamente definidos, e vários mecanismos têm sido propostos para descrever a interação entre peptídeos e bicamadas lipídicas. (BECHINGER, 1999; SHAI, 2002; BECHINGER e LOHNER, 2006).

Em princípio, dois mecanismos foram propostos para peptídeos em α -hélice, denominados Carpet-like (formação de carpete) e barrel-stave (formação de barril) (SHAI, 2002). Outro modelo que define o modo de interação da maioria dos peptídeos antimicrobianos é conhecido como Shai, Matsuzaki e Huang (SMH), e explica como moléculas de colesterol presente em membranas fosfolipídicas influenciam a atividade biológica do peptídeo (ZASLOFF, 2002b). Mais recentemente, um mecanismo de ação denominado de detergent-like ou mecanismo

de detergente, mostrou-se ainda mais geral, abrangendo um grande número de peptídeos antimicrobianos (BECHINGER E LOHNER, 2006).

✓ Modelo Barrel-stave (mecanismo de formação de barril): Neste modelo, peptídeos helicoidais ligam-se a superfície da bicamada lipídica orientando-se de acordo com sua anfipaticidade com a face catiônica voltada para os grupos fosfatos presentes na superfície da bicamada lipídica. Ao atingir uma determinada concentração na superfície da membrana, monômeros do peptídeo agregam-se e inserem-se perpendicularmente na bicamada lipídica, formando um poro linear de peptídeo e lipídeo (SANDERSON, 2005; PUKALA et al., 2006). Neste estágio, o peptídeo mantém as regiões hidrofóbicas ligadas à região apolar da membrana enquanto as regiões hidrofílicas ficam expostas para facilitar o fluxo livre de íons e moléculas pequenas através da bicamada lipídica (SHAI, 2002). O tamanho dos poros formados pode variar consideravelmente de acordo com a concentração de monômeros de peptídeo na membrana (PUKALA et al., 2006).

✓ Modelo Carpet-like (formação de carpete): Nesse modelo as moléculas de peptídeo são adsorvidas paralelamente na superfície da membrana, formando um agregado que cobre a superfície da bicamada lipídica, como um “carpete” de moléculas. Inicialmente os peptídeos ligam-se ao grupamento fosfato dos fosfolipídios através de suas faces hidrofílicas. Em seguida, o peptídeo se reorienta, direcionando as cadeias laterais de resíduos hidrofóbicos para o interior da bicamada lipídica (região hidrofóbica da membrana). Conseqüentemente, ocorre uma redistribuição dos lipídeos, o que resulta em uma tensão na curvatura da membrana. O aumento da concentração de peptídeo na bicamada leva também a um aumento desta tensão, causando a desintegração da membrana pelo rompimento de sua curvatura (REDDY et al., 2004; SANDERSON, 2005)

✓ O modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) ou Poro Toroidal: O modelo SMH pode ser explicado como uma combinação de interações superficiais e formação de poros. O peptídeo interage com a superfície da membrana como ocorre no mecanismo de “carpete” e desloca as moléculas de fosfolipídios, levando a uma desorganização da estrutura da membrana (SHAI, 2002; HUANG, 2006). Em alguns casos, a desorganização pode levar ao rompimento parcial da estrutura da bicamada lipídica permitindo a entrada de moléculas de peptídeo para o interior da célula-alvo. Assim, o mecanismo SMH propõe modos de ação distintos para peptídeos antimicrobianos, sendo por rompimento da bicamada lipídica ou ainda por

interação com alvos intracelulares (WANG et al., 2005). Esse modelo aplica-se a grande parte dos peptídeos antimicrobianos, inclusive a peptídeos menores, os quais seriam incapazes de formar poros segundo um mecanismo Barrel-stave.

✓ O mecanismo de detergente (detergent-like): Baseia-se na intercalação de peptídeos em bicamadas lipídicas e representa um mecanismo mais geral para a atividade de moléculas anfipáticas. Sabe-se que moléculas de detergentes acima da concentração micelar crítica (CMC) interagem com membranas lipídicas, formando um estado micelar bastante complexo. Da mesma forma, peptídeos antimicrobianos podem agregar-se formando estruturas oligoméricas que interagem de forma diferente que seus monômeros e de modo similar a um detergente (BECHINGER e LOHNER, 2006). Estes oligômeros formados pelos peptídeos agregados ao chocarem-se com a membrana adsorvem algumas moléculas de fosfolipídios e podem ainda formar um agregado micelar na própria bicamada. Ao contrário dos detergentes que, em concentrações baixas (abaixo de sua concentração micelar crítica) não alteram a estrutura da membrana ou ainda as estabilizam, peptídeos antimicrobianos podem desestabilizar a membrana mesmo em concentrações intermediárias (MADDEN e CULLIS, 1982). Assim sendo, o fator predominante neste modelo de detergente é o potencial de agregação e cada peptídeo deve ser analisado separadamente de acordo com sua natureza, como carga e caráter hidrofóbico, as quais são características que influenciam diretamente o grau de agregação das moléculas.

Além dos mecanismos pelos quais os peptídeos antimicrobianos exercem seus efeitos via membrana, há também aqueles onde seus efeitos provêm da inibição da síntese de DNA, bloqueios na síntese de RNA, inibição de funções ribossômicas e síntese de proteínas, dentre outros.

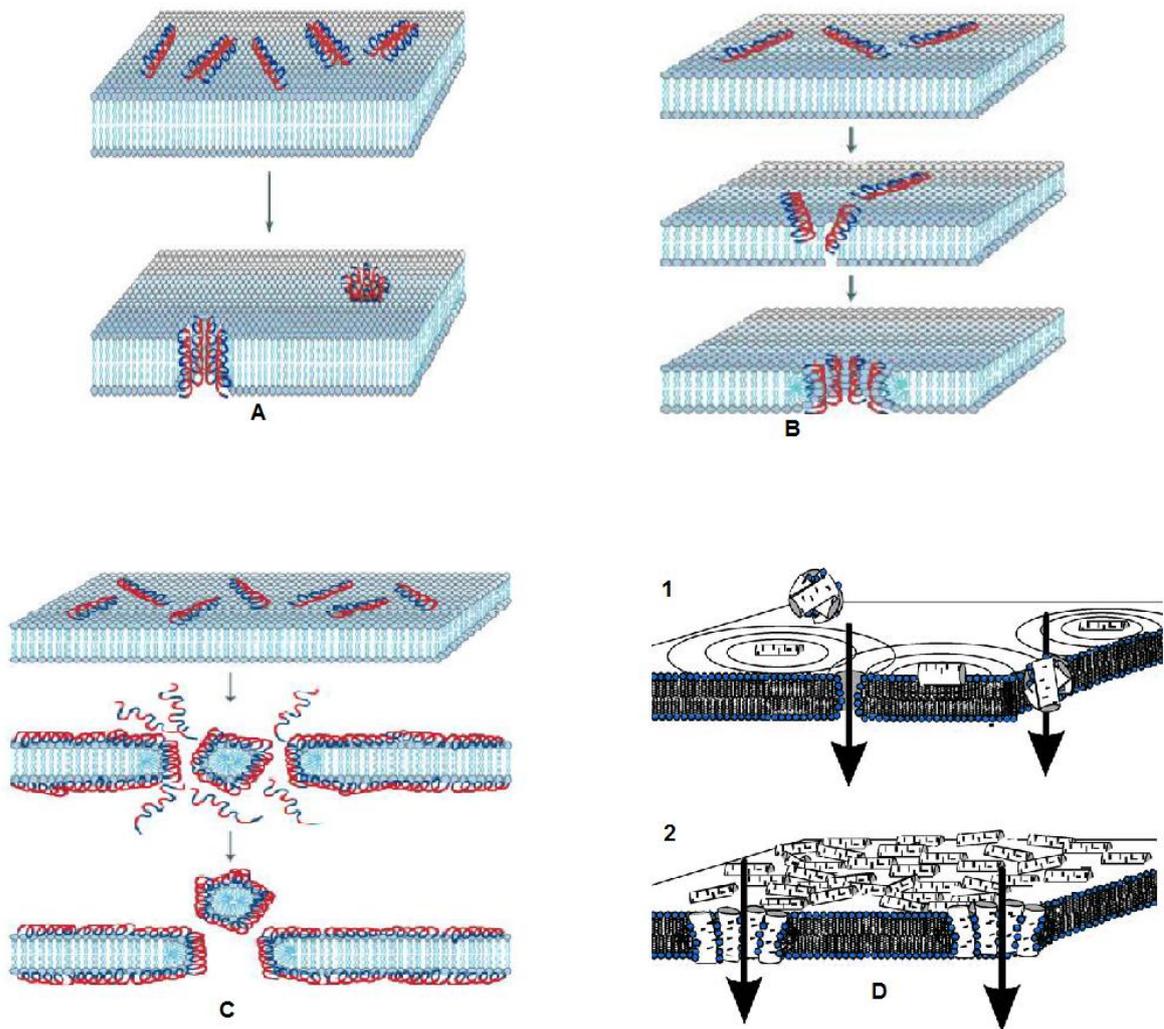


Figura 2. Representação esquemática de cada um dos modelos de ação dos peptídeos antibacterianos sobre a membrana dos micro-organismos. Em A, mecanismo de formação de barril. Em B, modelo Poro Toroidal. Em C, formação de tapete. (BROGDEN, 2005). Em D o mecanismo de detergente (BECHINGER, 2006).

2.5 Eritropoetina humana

A eritropoetina (EPO) é um hormônio glicoproteico essencial a vida, que tem como função primordial a regulação da eritropoiese (SCHMIDT et al., 2003).

Segundo o proposto em UniprotKB, um banco de dados vinculado à RCSB Protein Data Bank e disponível em <<http://www.uniprot.org/uniprot/>>, a eritropoetina humana é uma glicoproteína que possui um comprimento de sequência de 193 aminoácidos ao ser sintetizada, porém, após um processamento pós-traducional, a sequência passa a apresentar um total de 166 aminoácidos (forma madura). Possui uma massa molar que varia entre 34 e 40 kDa, sendo que cerca de 40% são carboidratos que contribuem para sua solubilidade, metabolismo *in vivo* e processamento celular. Sua estrutura terciária é globular, caracterizada por 4 alfa hélices (A,B,C e D) e 2

folhas beta anti-paralela e nela são encontrados 3 sítios de N-glicosilação (asparagina nas posições 24, 38 e 83) e um de O-glicosilação (serina na posição 126).

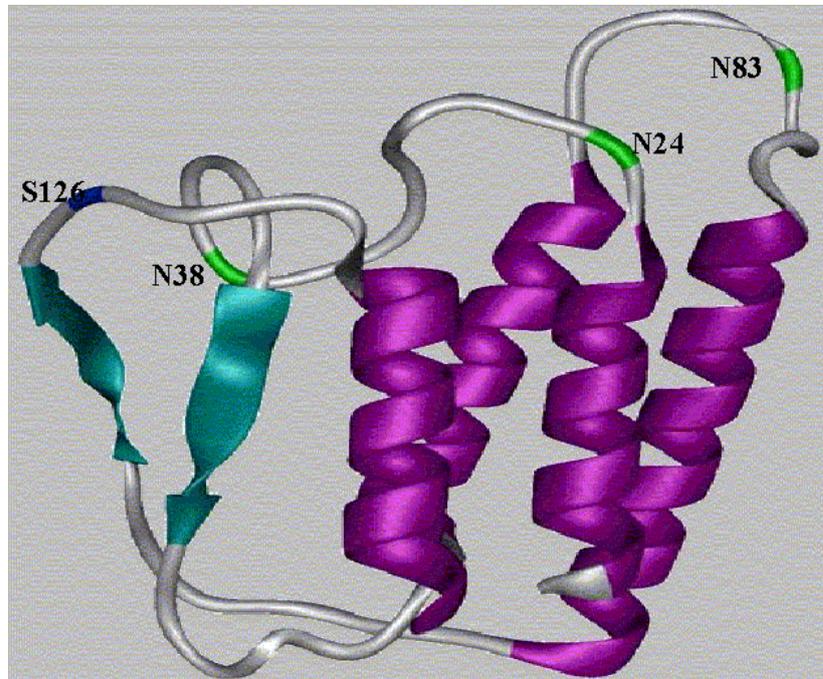


Figura 3. Representação da estrutura tridimensional da EPO demonstrando as quatro alfa-hélices e as duas folhas beta, além das regiões de glicosilação.(Protein Data Bank)

Esse hormônio é produzido no indivíduo adulto principalmente pelas células peritubulares fibroblásticas do interstício do córtex renal e também, em menor quantidade, por células hepáticas. No feto e em recém-natos, é produzido no fígado (JACOBSON et al., 1957; FRIED, 1972; ZANJANI et al., 1981; KOURY et al., 1993; FISHER et al., 1996). A ausência ou diminuição desse hormônio na corrente sanguínea pode gerar anemia severa (KAUSHANSKY; KIPPS, 2005).

A EPO possui meia-vida de aproximadamente cinco horas, o que requer uma taxa de produção em torno de 2 UI/Kg/dia. A produção da EPO é constante; alguns fatores, como níveis de ferro, *status* nutricional, condições ambientais, estados patológicos e fatores genéticos podem afetar os níveis de EPO circulante (ELLIOTT; PHAM; MACDOUGALL, 2008).

A EPO é secretada no plasma e, ao chegar à medula óssea, liga-se a receptores específicos na superfície de células progenitoras eritróides, estimulando assim, a diferenciação delas em hemácias. Ela atua como fator hormonal de estimulação mitótica e diferenciação, aumentando a formação de eritrócitos maduros a partir das

células progenitoras eritróides (Weiss, 2003; FRIED, 2009). Alguns estudos tem demonstrado ainda que a EPO apresenta atividade antiapoptótica (MINAMINO ; KITAKAZE , 2006).

Em 1972, surge o que conhecemos hoje como tecnologia do DNA recombinante (rDNA). De forma inédita, Berg utiliza enzimas de restrição para cortar e reunir pedaços de DNA de espécies diferentes (MATTE, 1999). Essa tecnologia permite reproduzir proteínas idênticas as naturais, bem como elaborar outras totalmente novas, mediante alterações correspondentes a inserção de genes nesses micro-organismos ou células. Tais moléculas podem se revelar mais vantajosas do que as naturais para uma determinada função, podendo, por exemplo, apresentar maior atividade biológica, meia-vida mais apropriada ao uso terapêutico ou efeitos colaterais mais brandos.

Desde 1980, esses produtos baseados na tecnologia do DNA recombinante têm sido produzidos e comercializados. No Brasil, as principais aplicações dessa tecnologia estão na produção de medicamentos biológicos, tais como vacinas, reagentes para diagnósticos e hemoderivados (SOARES, 2005). Os medicamentos biológicos, também chamados de biofármacos, produtos biológicos ou ainda biomedicamentos, podem ser definidos como aqueles obtidos de fluidos biológicos ou de tecidos de origem animal, e de procedimentos biotecnológicos (FARDELONE; BRANCHI, 2006; BRASIL, 2010).

Em 1977, a EPO foi extraída e purificada da urina de pacientes anêmicos. Utilizando-se da tecnologia do rDNA, baseada na sequencia de aminoácidos dos dados da purificação, em 1983, o gene da EPO humana foi então clonado permitindo o desenvolvimento da eritropoetina humana recombinante (rhEPO), um avanço tecnológico que revolucionou o tratamento da anemia.

A primeira utilização da EPO recombinante com finalidade terapêutica foi em 1989 para o tratamento de anemia associada à doença crônica dos rins. Além de fortalecer a produção de eritrócitos, o tratamento com EPO melhora o bem estar do paciente e reduz ou elimina a necessidade de transfusão de sangue. Existem outras aplicações não-renais para EPO como tratamento da anemia causada pela quimioterapia e prematuridade, redução de transfusão de sangue após uma cirurgia e prevenção de anemia após transplante de medula óssea (WALSH, 1999).

Disponível sob os nomes Epogen (Amgen), Epogin (Chugai), Epomax (Elanex), Eprex (Janssen-Cilag), NeoRecormon ou Recormon (Roche), Dynepo (Shire

Pharmaceuticals) e Procrit (Ortho Biotech). As variações no padrão de glicosilação da EPO distingue estes produtos. Epogen, Epogin, Eprex e Procrit são genericamente conhecidos como a epoetina alfa, NeoRecormon e Recormon como epoetina beta, Dynepo como epoetina delta e Epomax como epoetina omega. Epoetina zeta é o nome usado para formas de epoetina alfa alguns "biossimilares" e está disponível sob os nomes SILAPO (Stada) e Retacrit (Hospira). Darbepoetina alfa é uma forma criada por 5 substituições (Asn-57, Tre-59, Val-114, Asn-115 e Thr-117) que criam dois novos locais de N-glicosilação. Tem uma meia-vida de circulação mais longa in vivo. Encontra-se disponível sob o nome de Aranesp (Amgen). EPO está sendo muito utilizada como uma droga para melhorar o desempenho de atletas de endurance (UniProtKB, 2013)

Antes do desenvolvimento da rhEPO, a transfusão de sangue foi o mais comum tratamento para pacientes com anemia, contudo, desde o seu advento, a rhEPO vem sendo amplamente utilizada na prática clínica, para redução da necessidade de transfusão sanguínea em processos cirúrgicos, para aumentar os níveis de hemoglobina (FARIS; RITTER; ABELS, 1996) e no tratamento de anemias de várias etiologias, incluindo anemia devido a doença renal crônica, anemia relacionada ao câncer ou ao tratamento dele (RIZZO et al., 2001; ELLIOTT; PHAM; MACDOUGALL, 2008), anemia relacionada ao uso de zidovudina, em pacientes infectados pelo HIV (SAAG; LEVINE; LEITZ, 2002) e anemia relacionada a utilização de ribavirina, em pacientes portadores de hepatite C (SOLKOWSKY; WASSERMAN; BRAU, 2001).

Existem estudos que avaliaram o uso de rhEPO em outras etiologias, sugerindo a interação da rhEPO com seus receptores, os quais tem sido identificados em células tumorais (FANDRY, 2008), e ainda que a rhEPO possa reagir com receptores em células endoteliais para estimular a angiogênese (RIBATTI et al., 2007). Tais estudos levantam a possibilidade de funções não eritróides para a EPO.

Uma pesquisa mostrou que o uso da rhEPO melhora o sistema imune por estar associada com efeitos em uma variedade de parâmetros e funções imunológicas, sugerindo também uma função antimieloma. (PRUTCHI-SAGIV et al., 2006).

Algumas investigações mostraram que a administração de rhEPO antes ou logo depois do início da isquemia, reduziu o tamanho do infarto no miocárdio e melhorou a função cardíaca em fases agudas (CALVILLO et al., 2003; HIRATA et al., 2005; MINAMINO ; KITAKAZE , 2006).

A rhEPO tem demonstrado ter efeito antioxidante. O exato mecanismo não está completamente elucidado, porém várias hipóteses têm sido sugeridas. Uma delas é que a EPO apresenta ação antioxidante direta pela remoção de radicais livres (YANG et al., 2011).

Apesar dos benefícios do uso da EPO, que são de grande importância, é preciso cautela quanto a sua aplicação clínica, uma vez que alguns efeitos colaterais também podem ser observados com o uso, como aumento da hipertensão arterial pré-existente, crises convulsivas, hiperemia conjuntival, eventos trombóticos e cefaleia (BIO MANGUINHOS, 2011; ABENSUR, 2000).

De posse da grande aplicabilidade da eritropoetina, buscamos, nesse trabalho avaliar a possibilidade de uma nova aplicação desse hormônio, com um contexto antibacteriano. Porém, ao invés do uso da proteína integral, levantamos a possibilidade do uso de fragmentos de eritropoetina humana como peptídeos antibacterianos. Como a utilização requer uma série de testes de viabilidade, buscamos uma primeira iniciativa, a análise *in silico* para predição de efeito antibacteriano de peptídeos obtidos da fragmentação da EPO. Uma simulação com base em programas de confiabilidade disponíveis em diversos bancos de dados, visando uma perspectiva de síntese para testes em cepas bacterianas de interesse médico.

A escolha da EPO foi realizada pelo fato de nosso laboratório já apresentar essa proteína disponível em quantidade significativa para realização de experimentos, uma vez que outras linhas de pesquisa com esse hormônio já são aqui desenvolvidas, além da facilidade de acesso comercial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar por métodos preditivos se peptídeos obtidos da fragmentação do hormônio glicoproteico eritropoetina humana teriam efeito antimicrobiano.

3.2 Objetivos Específicos:

- 1- Geração de peptídeos antimicrobianos a partir de fragmentação *in silico* da proteína eritropoetina humana.
- 2- Análise, *in silico*, das sequências de aminoácidos dos fragmentos obtidos visando reconhecer os que se enquadram nos padrões compatíveis com peptídeos antimicrobianos.
- 3- Predição de estrutura secundária e terciária dos peptídeos obtidos visando reconhecer padrões físico-químicos de estabilidade estrutural.
- 4- Predição *in silico* da antigenicidade e alergenicidade dos fragmentos obtidos.

4. METODOLOGIA:

4.1 Desenho experimental

O experimento foi delineado com o intuito de estabelecermos um sistema de filtros em todas as análises. Com o propósito de identificarmos nos peptídeos oriundos da fragmentação características que permitisse que os mesmos pudessem ser utilizados como antimicrobiano efetivo, ou seja, que não induzissem nenhum tipo de estimulação antigênica, desencadeando possíveis reações alérgicas, inflamatórias ou de estímulo à produção de anticorpos.

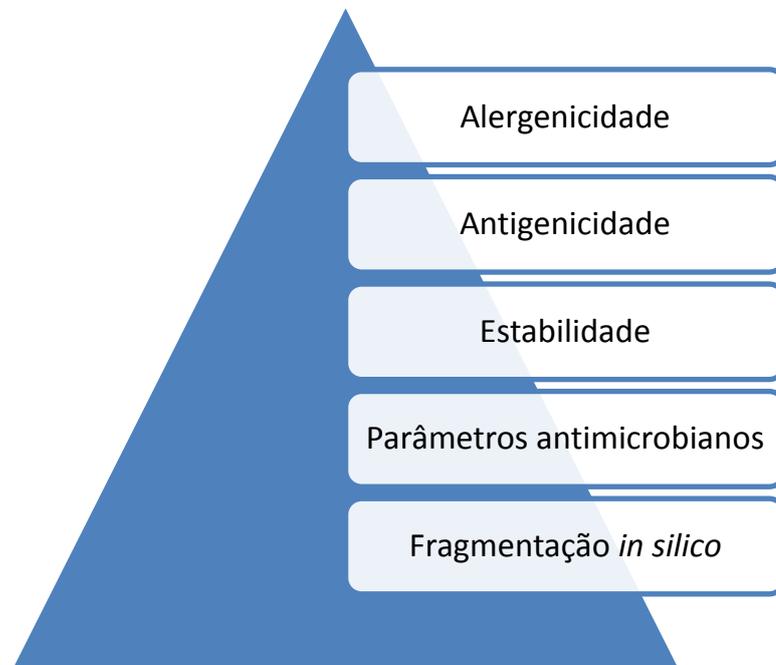


Figura 4. Esquema do desenho experimental demonstrando o sistema de filtros empregado para geração dos peptídeos antimicrobianos.

4.2 Análise estrutural da ERITROPOETINA

4.2.1 Busca em Banco de Dados da Sequência da Eritropoetina Humana (EPO)

O primeiro passo do trabalho consistiu na busca, em bancos de dados, da sequência de aminoácidos da eritropoetina humana. Para tal tarefa foi usado o banco de dados “RCSB Protein Data Bank” (disponível em <<http://www.rcsb.org>>) banco usado inicialmente para reconhecimento da composição em aminoácidos da proteína eritropoetina humana, identificando ser ela uma proteína funcional portadora de 166 resíduos de aminoácidos.

No campo de pesquisa, presente na página inicial do programa, foi introduzida a molécula desejada – eritropoetina humana (erythropoietin) – selecionando a opção macromolécula (figura 5A). Após as opções fornecidas quanto a EPO, houve a seleção apenas da estrutura média minimizada (HUMAN ERYTHROPOIETIN, NMR MINIMIZED AVERAGE STRUCTURE) (figura 5B).

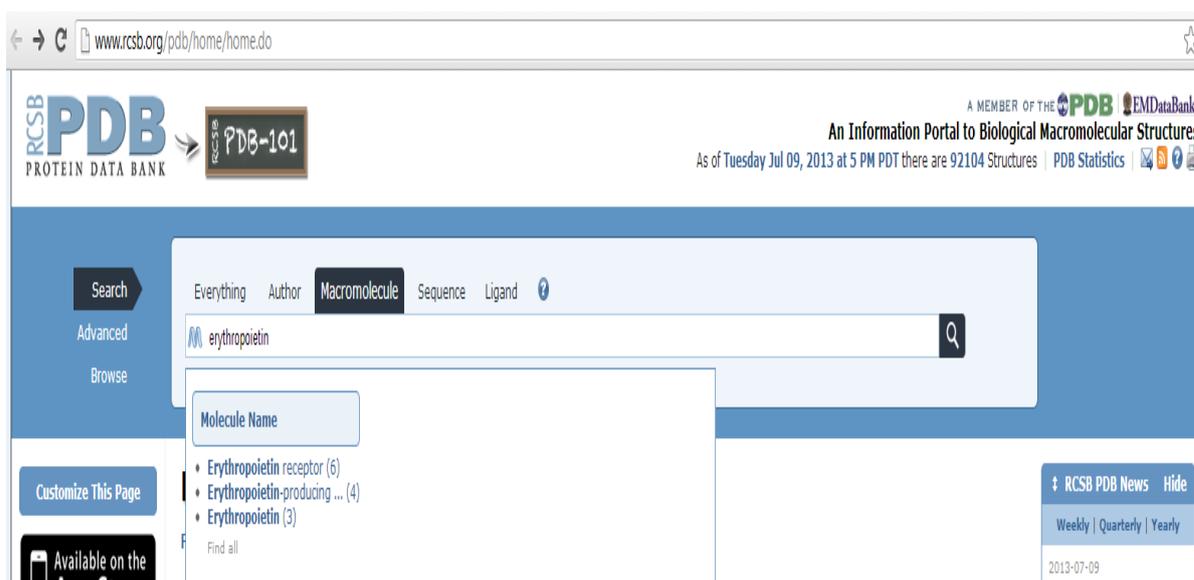


Figura 5A: Nesta figura observa-se o campo de seleção da macromolécula da eritropoetina humana disponível em <<http://www.rcsb.org>>. O banco de dados PDB permite que seja feita a busca da macromolécula desejada, obtendo-se vários níveis de informações a respeito.

Filter: Custom View: Detailed Reports: Select one... Sort: Release Date

1CN4 ERYTHROPOIETIN COMPLEXED WITH EXTRACELLULAR DOMAINS OF ERYTHROPOIETIN RECEPTOR
 Supercedes: 1BLW
 Authors: Stroud, R.M., Reid, S.W.
 Release: 1999-08-11 Classification: Hematopoietic Cytokine
 Experiment: X-RAY DIFFRACTION with resolution of 2.80 Å Residue Count: 622
 Compound: 2 Polymers [Display Full Polymer Details | Display for All Results]
 Citation: Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. (1998) Nature 395: 511-516 [Display Full Abstract | Display for All Results]

1BUY HUMAN ERYTHROPOIETIN, NMR MINIMIZED AVERAGE STRUCTURE
 Authors: Cheetham, J.C., Smith, D.M., Aoki, K.H., Stevenson, J.L., Hoeffel, T.J., Syed, R.S., Egrie, J., Harvey, T.S.
 Release: 1999-09-10 Classification: Cytokine
 Experiment: SOLUTION NMR Residue Count: 166
 Compound: 1 Polymer [Display Full Polymer Details | Display for All Results]
 Citation: NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. (1998) Nat.Struct.Biol. 5: 861-866 [Display Full Abstract | Display for All Results]

1EER CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN ERYTHROPOIETIN COMPLEXED TO ITS RECEPTOR AT 1.9 ANGSTROMS
 Authors: Syed, R.S., Li, C.
 Release: 1999-10-01 Classification: Complex (cytokine/receptor)
 Experiment: X-RAY DIFFRACTION with resolution of 1.90 Å Residue Count: 620
 Compound: 2 Polymers [Display Full Polymer Details | Display for All Results]
 Citation: Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. (1998) Nature 395: 511-516 [Display Full Abstract | Display for All Results]

Figura 5B: Seleção da estrutura desejada para trabalho – HUMAN ERYTHROPOIETIN, NMR MINIMIZED AVERAGE STRUTCTURE, da qual foi realizado o reconhecimento da composição da eritropoetina quanto aos aminoácidos constituintes. (disponível em <http://www.rcsb.org>)

Após a seleção da estrutura a ser trabalhada, vários parâmetros foram abertos para que a pesquisa pudesse ser iniciada, passando para a etapa inicial desejada – a determinação da sequência de aminoácidos a ser usada (Figura 6).

Summary Sequence Annotations Seq. Similarity 3D Similarity Literature Biol. & Chem. Methods Geometry Links

HUMAN ERYTHROPOIETIN, NMR MINIMIZED AVERAGE STRUCTURE

1BUY Display Files Download Files Share this Page

Sequence Display

The sequence display provides a graphical representation of the UniProtKB, PDB - ATOM and PDB - SEQRES sequences. Different 3rd party annotations can be graphically mapped on the sequence and displayed in the Jmol viewer.

The structure 1BUY has in total 1 chains.

Currently viewing unique chains only. [show all chains](#)

Sequence & Structure Relationships

Display Jmol

Enable Jmol to view annotations in 3D.

SELEÇÃO DE PARÂMETROS E INFORMAÇÕES A SEREM ACESSADAS A RESPEITO DA PROTEÍNA PESQUISADA

Figura 6: Nessa figura observa-se a barra aberta, como vários parâmetros a serem analisados. Inicialmente foi identificada a sequência de aminoácidos-padrão.

4.2.2 Identificação da estrutura funcional da eritropoetina humana com análise comparativa

Com a sequência de aminoácidos definida, o segundo passo foi selecionar a estrutura da EPO. A estrutura secundária e estrutura terciária média 3D foram

obtidas em mesma página, alternado as caixas de parâmetros presentes, de acordo com o desejado (figura 6).

Após o reconhecimento das estruturas secundárias e de domínio (terciária), foi realizada uma análise comparativa, visando o reconhecimento, na estrutura de domínio, cada segmento de estrutura secundária da proteína.

4.2.3 Fragmentação *in silico* para obtenção de peptídeos com efeito antimicrobiano

Com a sequência de aminoácidos da EPO selecionada para o trabalho, foi feita a fragmentação *in silico* da mesma usando para isso o programa “*Protein Cutter*”, disponível em <<http://citimsexskvele.eu/bch/index.php>> (figura 7), um cortador de proteínas que usa um banco de dados com 19 possibilidades de cortes enzimáticos, como pode ser observado na tabela 1.

ENZIMA	CORTE	ENZIMA	CORTE
<i>Tripsina</i>	(após KR)	<i>Pepsina</i>	(após FL)
<i>Arg-C</i>	(após R)	<i>Tryp-CNBR</i>	(após KMR)
<i>Asp-N</i>	(antes BD)	<i>TrypChymo</i>	(após FKLRWY)
<i>Asp-N_ambic</i>	(antes de ED)	<i>Tripsina / P</i>	(após KR)
<i>Quimiotripsina</i>	(após FLWY)	<i>V8-DE</i>	(após BDEZ)
<i>CNBR</i>	(após M)	<i>V8-E</i>	(após EZ)
<i>CNBR + Tripsina</i>	(após MRK)	<i>semiTrypsin</i>	(após KR)
<i>Formic_acid</i>	(antes D depois de D)	<i>LysC + ASPN</i>	(BD antes, depois K)
<i>Lys-C</i>	(depois de C)	<i>Prolyl_endoprotease</i>	(depois PA)
<i>Lys-C / P</i>	(após K)		

Tabela 1. Enzimas e cortes enzimáticos presentes no cortador *Protein Cutter* usado para obtenção dos fragmentos (peptídeos).

Foram realizados os cortes da sequência de aminoácidos da eritropoetina humana com todos os cortes enzimáticos disponíveis, sem modificação nos parâmetros presentes originalmente no programa, obtendo ao todo 337 fragmentos (anexo 1) que passaram a serem analisados um a um em programas que visam a identificação das características dos peptídeos que apresentassem possível efeito antibacteriano, sofrendo um processo de seleção a partir de parâmetros reconhecidos como importantes para peptídeos antibacterianos.

Figura 7. Cortador utilizado para fragmentação da eritropetina (Fonte: <http://citimseskvele.eu/bch/index.php>).

4.3. Seleção dos fragmentos

4.3.1. Seleção por número de resíduos de aminoácidos

A primeira seleção foi realizada a partir do número de aminoácidos. Dos 337 fragmentos obtidos foram selecionados 95, que se enquadravam dentro do número que se considera ideal para um peptídeo antimicrobiano, sendo adotado entre 12 e 50 resíduos. Os fragmentos que não se enquadraram nesse parâmetro foram descartados da análise.

4.3.2. Seleção por carga total

O próximo passo foi a análise da carga total dos peptídeos e selecionar os que possuem carga total positiva. Foram descartados todos que possuísem carga total negativa ou neutra.

4.3.3. Seleção por ponto isoelétrico

Foi realizada a análise dos pontos isoelétricos, sendo selecionados apenas os peptídeos que apresentassem ponto isoelétrico elevado (acima de 8,0), todos os outros peptídeos foram desconsiderados.

4.3.4. Seleção pelo índice Boman

O índice Boman é um parâmetro capaz de prever o potencial de interação de um determinado peptídeo ou proteína com outras proteínas. A ligação das proteínas à membrana é baseada tanto em interações hidrofóbicas quanto em interações de cargas entre a membrana e as proteínas (BOMAN, 2003). O cálculo do índice de interação é baseado em propriedades termodinâmicas de solubilidade das cadeias laterais dos aminoácidos (RADZEKA, WOLFEDEN, 1988) de modo que a soma dos valores da solubilidade de todos os resíduos de um peptídeo representa uma estimativa geral do seu potencial em se ligar com outras proteínas, inclusive a diferentes receptores celulares. Desta forma reconhece-se que o índice Boman não está diretamente ligado a atividade antibacteriana, já que esta atividade envolve interação do peptídeo com lipídios ao invés de proteína. Contudo, pode-se afirmar que esse cálculo consiste em um modo simples e eficiente de distinguir a atividade antibacteriana de uma possível ação hormonal de um peptídeo (BOMAN, 2003). Assim, dentre os peptídeos que sobraram, foram selecionados aqueles que apresentassem índice Boman baixo, sendo adotado índice abaixo de 1,0.

4.3.5. Seleção pelo método descrito por Lata

Visando confirmar se a seleção até o momento forneceria peptídeos com potencial efeito antibacteriano, para que os mesmos pudessem ser sintetizados futuramente e testados, algumas propriedades relatadas como boas para a ação antimicrobiana foram identificadas. Segundo Lata (2007) certos tipos de resíduos são preferidos sobre outros em peptídeos antibacterianos, particularmente nas extremidades N e C terminais. Essas características foram enumeradas de forma resumida:

- 1 - Presença de aminoácidos G, F, V, R na primeira posição;
- 2 - Presença de aminoácidos L, I, W, F na segunda posição;
- 3 - Presença de G, R, K, L como resíduos dominantes;
- 4 - Presença de c-terminal K, G, C, R;

5 - Presença de n-terminal G, F na primeira posição e W, I, L, M na 2ª posição;

6 - Ausência de resíduos D, E, S e P, preferencialmente.

Não necessariamente todas as características descritas estariam presentes nos fragmentos, porém a presença de uma ou mais podem favorecer ao potencial antibacteriano, elevando as chances do fragmento ser reconhecido como antimicrobiano e conseqüentemente ser sintetizado para eventuais testes junto a cepas bacterianas.

4.4. Predição de estrutura secundária:

Uma estabilidade estrutural é um fator importante para que os peptídeos possam exercer o efeito antibacteriano, principalmente com formação de alfa-hélice e com a presença dos aminoácidos capazes de interagir com a membrana bacteriana na região estabilizada de hélice, sendo assim, após a identificação dos peptídeos que se enquadraram nos melhores parâmetros selecionados, a predição de estrutura secundária foi feita para cada um deles, usando o programa “*The PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench*”, disponível em <<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk>>. Além disso foi realizada uma comparação com a estrutura da proteína integral, visando identificar a localização conformacional de cada peptídeo na molécula de EPO, comparando a sequência de aminoácidos do segmento (peptídeos) na proteína com a estrutura prevista em *RCSB Protein Data Bank*.

Outra opção usada para predição de estrutura 3D está presente em NCBI – Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia – acessível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>, nesse endereço, uma ferramenta para a análise de estruturas tridimensionais de biomoléculas é o Banco de Dados Modelagem Molecular (MMDB), um banco de dados que facilita o acesso a dados da estrutura, ligando-os com a literatura associada. Foi feito o acesso a esse banco de dados obtendo-se a estrutura da eritropoetina humana para análise, identificando a posição dos peptídeos na estrutura média de domínio da EPO.

4.5. Predição da estabilidade dos peptídeos

Uma maior segurança para identificação de estrutura visando eventual síntese se dá por meio de métodos mais precisos de validação de estrutura. De posse disso a estrutura secundária/terciária dos peptídeos também foi prevista usando o programa “*BHAGEERATH-H: A Homology ab-initio Hybrid Web server for Protein Tertiary Structure Prediction*”, disponível em <http://www.scfbio-iitd.res.in/bhageerath/bhageerath_h.jsp>, sendo realizada a modelação de estrutura secundária/terciária dos quatro peptídeos. O programa "Bhageerath-H" aceita uma sequência de aminoácidos e realiza a predição de cinco estruturas possíveis para o peptídeo nativo. Esta abordagem é frequentemente referida como um método *ab initio* (SCHERAGA, 1992; VASQUEZ, 1994) e baseia-se na hipótese formulada pelo termodinâmico Anfinsen (1973), de acordo com a qual, a estrutura de uma proteína nativa corresponde ao mínimo global da energia livre, sob dadas condições (ANFINSEN, 1973).

4.6. Predição de energia livre após minimização

Outra ferramenta para modelação e determinação de alguns parâmetros bioquímicos de proteína e peptídeos é o servidor SWISS-MODEL, um servidor de homologia de modelagem da estrutura de proteínas totalmente automatizado, acessível através do servidor web ExPASy, ou a partir do programa DeepView (Swiss PDB-Viewer), disponível em <<http://swissmodel.expasy.org/>>. O objetivo deste servidor é fazer modelação de proteína acessível a todos bioquímicos e biólogos moleculares a nível mundial (Fonte: <http://swissmodel.expasy.org/>). Além da previsão de estrutura secundária e/ou terciária, de ligações de hidrogênio e de ligações dissulfeto, a energia livre após minimização das estruturas também podem ser previstas no programa DeepView Swiss – Pdb Viewr 4.1.0. (disponível em <<http://spdbv.vital-it.ch/>>).

4.7. Predição de antigenicidade

Uma etapa importante a ser realizada antes da síntese dos peptídeos para testes é procurar reconhecer se possuem ou não capacidade de estimularem resposta imunológica junto a MHC classe I e II e a linfócitos B, de modo que peptídeos com potencial antigênico não seriam bons candidatos a serem utilizados como fármacos,

desta forma, a predição de antigenicidade também se torna um fator importante antes de uma etapa de síntese.

4.7.1. Previsão de MHC classe I e classe II

Durante a última década, uma série de abordagens computacionais tem sido introduzida na predição de ligação de peptídeos à MHC, reduzindo de forma muito significativa o número de candidatos a ligantes que precisam ser testados experimentalmente. Procurando a realização dessa atividade de predição, o servidor SVMHC, disponível em <http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/SVMHC>, se apresenta como uma das principais opções para predição de ligação de peptídeos tanto de MHC de classe I como de classe II. O servidor SVMHC oferece uma análise rápida de uma ampla gama de alelos e os resultados de predição são dados em vários formatos abrangentes (DÖNNES, 2006).

Usando o servidor SVMHC foi feita a predição de antigenicidade dos peptídeos selecionados com todos os alelos disponíveis. A página inicial do servidor fornece os possíveis alelos de MHC classes I e II, um campo para introdução da sequência a ser analisada no banco de dados ou código de referência, bem como um campo para análise de polimorfismo de aminoácidos (figura 8). As sequências foram introduzidas no campo devido e testadas para cada um dos alelos.

A previsão utiliza uma abordagem Support Vector Machine (SVM), para a previsão da ligação dos peptídeos a MHC classe I. O SVM é uma classe de algoritmos que efetua padrões de reconhecimento e regressão e, por ser muito eficiente para conjuntos extensos de informações, é bastante utilizado em classificações de dados biológicos (VAPNIK, 1995; MULLER et al., 2001). O desempenho desse método de predição foi avaliado pelo Coeficiente de Correlação de Matthews (tradução livre do inglês *Matthews Correlation Coefficient* - MCC), gerando valor 0,82, o que indica que o método possui boa sensibilidade e especificidade.

A previsão de peptídeos de ligação a MHC de classe II baseia-se nas matrizes descritas por Sturniolo et al.. Brevemente, através de estudos de similaridade de sequência, foram definidos sítios modulares na molécula MHC envolvidos na interação com os peptídeos. Estes sítios são independentes do resto da fenda de ligação e um número limitado de cavidades podem ser combinados em matrizes de ligação virtuais para uma ampla gama de alelos do MHC da classe II. A previsão é disponível para 51 diferentes alelos de MHC de classe II.



Dear visitor, welcome to SVMHC.

[Prediction](#)

Please note, that [EpiToolKit](#) also provides SVMHC as one of its prediction methods.

[Information](#)

[Back to SBS](#)

MHC class I alleles		MHC class II alleles
None	None	None
A_0201 decamer	A_01 nonamer	DRB1_0101
A_0201 nonamer	A_0201 decamer	DRB1_0102
A_0301 decamer	A_0201 nonamer	DRB1_0301
A_0301 nonamer	A_03 nonamer	DRB1_0305
A_1101 nonamer	A_03 decamer	DRB1_0306
A_11 decamer	A_1101 nonamer	DRB1_0307
A_11 nonamer	A_1101 decamer	DRB1_0308
A_1 nonamer	A_2402 nonamer	DRB1_0309
A_2402 nonamer	A_24 nonamer	DRB1_0311
(MHCPEP data)	(SYFPEITHI data)	

Please paste a sequence (only one at a time, plain sequence, no FASTA formatting) or use a database ID.

OR

Input a SWISSPROT AC/ID (e.g P05917/VPX_SIVM1) or RefSeq Id (e.g NP_055147):

Analysis of single amino acid polymorphisms

SVMHC also enables analysis of single point polymorphisms. Paste a sequence or use a database ID together with a given mutation to perform a comparative analysis. An example of a mutation is **A23P**, meaning that an alanine in position 23 of the protein is changed to a proline.

Figura 8. Visualização da página do SVMHC, mostrando os campos de interação para que a predição dos peptídeos possa ser realizada.

4.7.2. Previsão para interação com linfócito B

Para predição de antigenicidade para produção de resposta de anticorpos por linfócitos B foi usado o programa *PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES*, um programa que prevê quais segmentos dentro de uma proteína ou peptídeo são susceptíveis a serem antigênicos e induzirem uma resposta de anticorpos. O programa pode ser acessado em < <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>>.

Os peptídeos antigênicos são determinados usando o método de Kolaskar e Tongaonkar (1990). As previsões são feitas com base em uma tabela que reflete a presença de resíduos de aminoácidos reconhecidos como epítomos em segmentos

experimentais. Os segmentos são notificados como antigênicos apenas se apresentarem um tamanho mínimo de 8 resíduos. A precisão do método é relatada de cerca de 75%. (Disponível em < <http://imed.med.ucm.es>>, acessado em 24/07/13).

4.8. Análise da alergenicidade

Procurando reconhecer um possível efeito alérgico dos peptídeos analisados, uma vez que a resposta alérgica poderia ser uma restrição ao uso de tais peptídeos em possíveis terapias, foi feita a predição desse parâmetro usando o servidor *AlgPred: Prediction of Allergenic Proteins and Mapping of IgE Epitopes*, disponível em <www.imtech.res.in/raghava/algpred/>.

As sequências foram submetidas à predição. O módulo SVM, baseado na composição de aminoácidos, foi a escolha de abordagem para predição.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Peptídeos

O primeiro resultado obtido para busca da sequência de aminoácidos da EPO fornece a sequência funcional de aminoácidos e a estrutura secundária ao longo da molécula. A exibição da sequência da eritropoetina pode ser visualizada na figura 9. Ela mostra um apanhado geral da proteína de estrutura minimizada, após ser processada e ter uma sequência inicial removida. Nessa representação, que será usada como base para o trabalho, a cadeia polipeptídica se apresenta com um comprimento de 166 resíduos de aminoácidos, sendo representada pelo servidor como “estrutura 1BUY”. A representação obtida mostra uma série de parâmetros a serem explorados, porém, houve uma preocupação apenas com a análise da sequência de aminoácidos, de estrutura secundária e domínios da proteína simplesmente para uma análise comparativa com os peptídeos que serão selecionados para a predição de efeito antimicrobiano, uma vez que aqui o foco será apenas a análise de tais peptídeos obtidos da fragmentação dessa proteína.

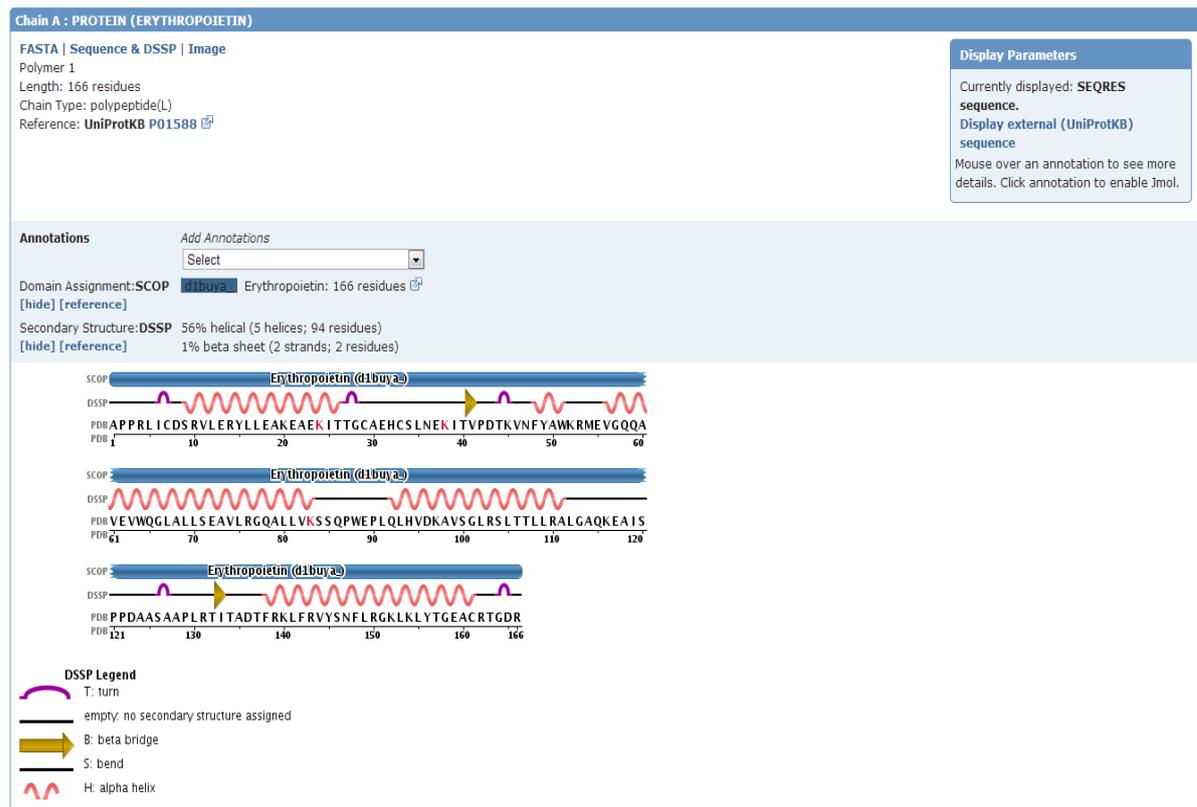


Figura 9. Representação inicial da estrutura secundária da eritropoetina a ser trabalhada mostra uma série de parâmetros a serem explorados (Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb>).

O primeiro resultado obtido quanto à estrutura da eritropoetina mostra algumas informações básicas por meio de uma representação gráfica como pode ser observado na figura 10. Nessa figura, pode ser notada a representação da estrutura da proteína completa e da proteína processada. A molécula sintetizada inicialmente apresenta-se como uma sequência inicial, identificada como “signal peptide”, que será removida da cadeia polipeptídica, resultando na molécula funcional, identificada como erythropoietin. A EPO é sintetizada inicialmente com 193 resíduos de aminoácidos e sofre, posteriormente, um processamento pós-traducional em que os 27 primeiros resíduos de aminoácidos são removidos dando origem a forma processada da proteína com 166 resíduos de aminoácidos.

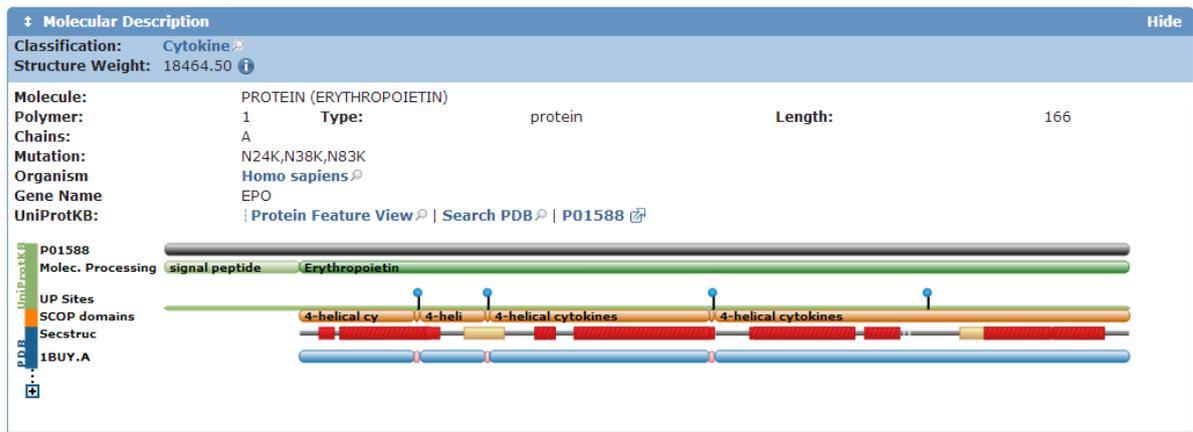


Figura 10. Resultado do primeiro conjunto de informações a respeito da descrição molecular da eritropoetina (indicado por signal peptide).

As sequências de aminoácidos da proteína completa (193 aminoácidos) e da proteína processada (166 aminoácidos) estão representadas nas figuras 11 e 12. Após a identificação dessas sequências, ficou decidido que seria usada apenas a sequência funcional, e todo trabalho de fragmentação *in silico* seria feito a partir dela.

```

      10      20      30      40      50      60
MGVHECPAWL WLLSLLSLP LGLPVLGAPP RLICDSRVLE RYLLEAKEAE NITGCAEHC
      70      80      90     100     110     120
SLNENITVPD TKVNFYAWKR MEVGQQAVEV WQGLALLSEA VLRGQALLVN SSQPWEPLQL
      130     140     150     160     170     180
HVDKAVSGLR SLTLLRALG AQKEAISPPD AASAAPLRTI TADTFRKLFR VYSNFLRGKL
      190
KLYTGEACRT GDR

```

Figura 11. Sequência de aminoácidos da proteína completa, sem processamento, totalizando 193 aminoácidos. (Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb>)

```

      10      20      30      40      50      60
MGVHECPAWL WLLSLLSLP LGLPVLGAPP RLICDSRVLE RYLLEAKEAE NITGCAEHC
      70      80      90     100     110     120
SLNENITVPD TKVNFYAWKR MEVGQQAVEV WQGLALLSEA VLRGQALLVN SSQPWEPLQL
      130     140     150     160     170     180
HVDKAVSGLR SLTLLRALG AQKEAISPPD AASAAPLRTI TADTFRKLFR VYSNFLRGKL
      190
KLYTGEACRT GDR

```

Figura 12. A sequência inicial com 193 aminoácidos com processamento pós traducional dando origem à proteína funcional cuja sequência passará a apresentar 166 aminoácidos. (Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb>).

5.2 Estrutura secundária e estrutura média

A estrutura da eritropoetina humana também foi reconhecida usando o banco de dados *RCSB Protein Data Bank*. Os resultados para a estrutura secundária e de domínio (estrutura média) são demonstrados na figura 13 e 14. Nota-se uma estrutura secundária prevista com cerca de 53% da disposição protéica em alfa hélice (4 hélices; 94 resíduos) e 1% em cadeia beta (2 filamentos; 2 resíduos).

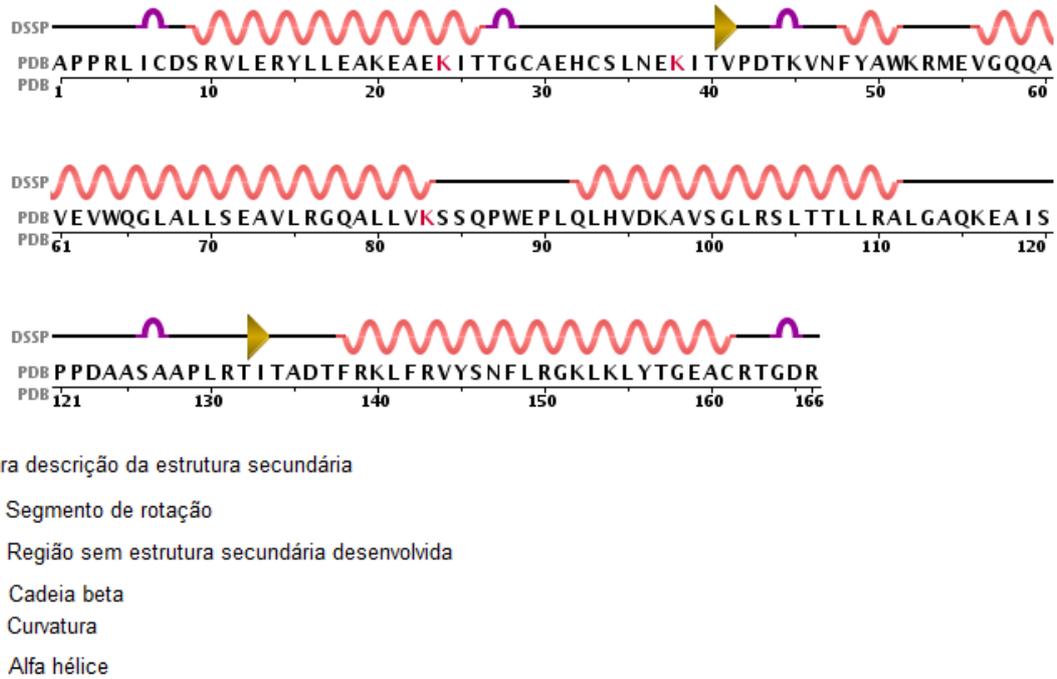


Figura 13. Descrição da estrutura secundária da proteína funcional (Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb>).

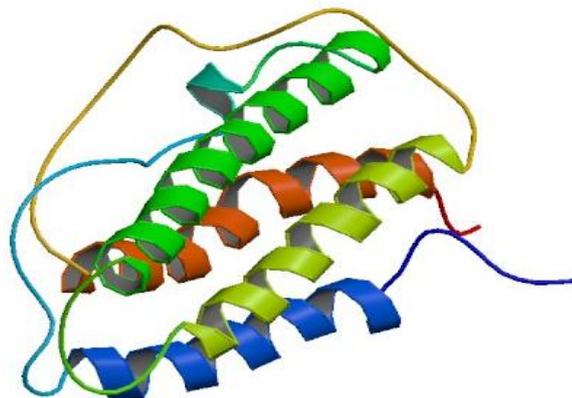


Figura 14. Estrutura média 3D obtida em *RCSB Protein Data Bank* (Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb>).

Ainda em *RCSB Protein Data Bank* foi possível visualizar a presença das ligações de hidrogênio e pontes dissulfeto na estrutura principal da eritropoetina, sendo tais ligações representadas na figura 15. Essas ligações interferem diretamente na integridade estrutura da molécula e as suas presenças ou não nos peptídeos terão

efeito significativo na estrutura secundária e terciária. Como a estrutura dos peptídeos pode ter influência direta na ação antibacteriana, uma comparação quanto o que se observa na proteína integral e nos peptídeos formados mostram que as modificações no comprimento da cadeia polipeptídica alteram as interações entre os aminoácidos.

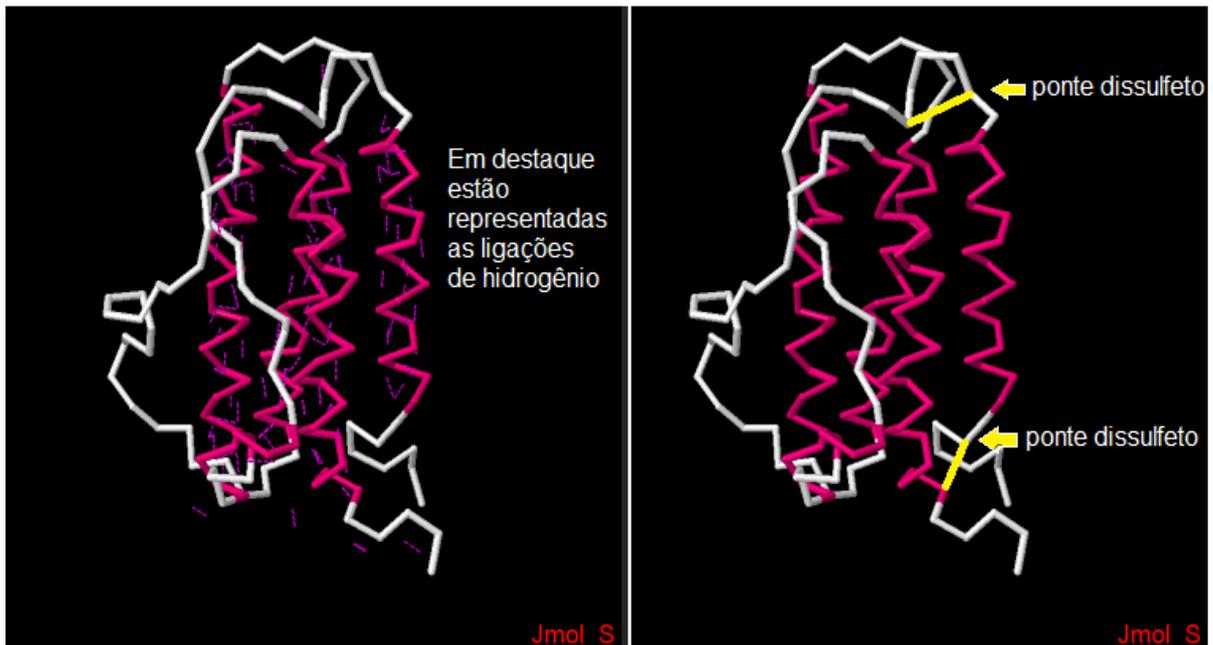


Figura 15. Representação da cadeia principal da eritropoetina humana demonstrando a presença das ligações de hidrogênio e, ao lado, das pontes dissulfeto. (Fonte:<http://www.rcsb.org/pdb>).

Do Banco de Dados Modelagem Molecular (MMDB), foi obtida a modelagem da estrutura da eritropoetina identificada na figura 16. Essa modelagem será utilizada para uma análise de posicionamento dos peptídeos que serão avaliados com efeito antimicrobiano.

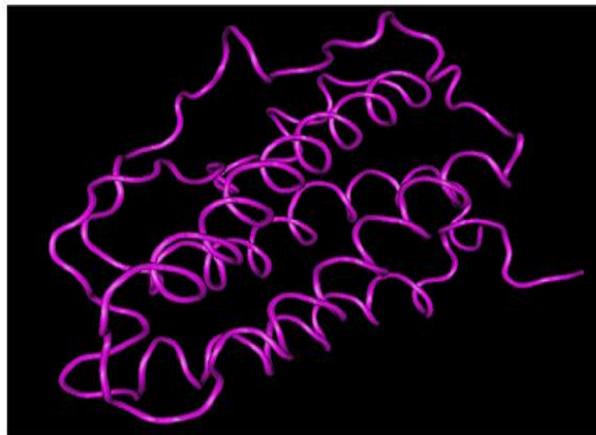


Figura 16. Estrutura média da eritropoetina humana. (Fonte:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure>)

Após o reconhecimento da disposição da estrutura secundária e de domínio, foi feita uma comparação entre elas com o intuito de reconhecer a distribuição total das organizações secundárias da proteína. Na figura 17, pode ser observada, a sequência de aminoácidos (A) com a estrutura de domínio (B).

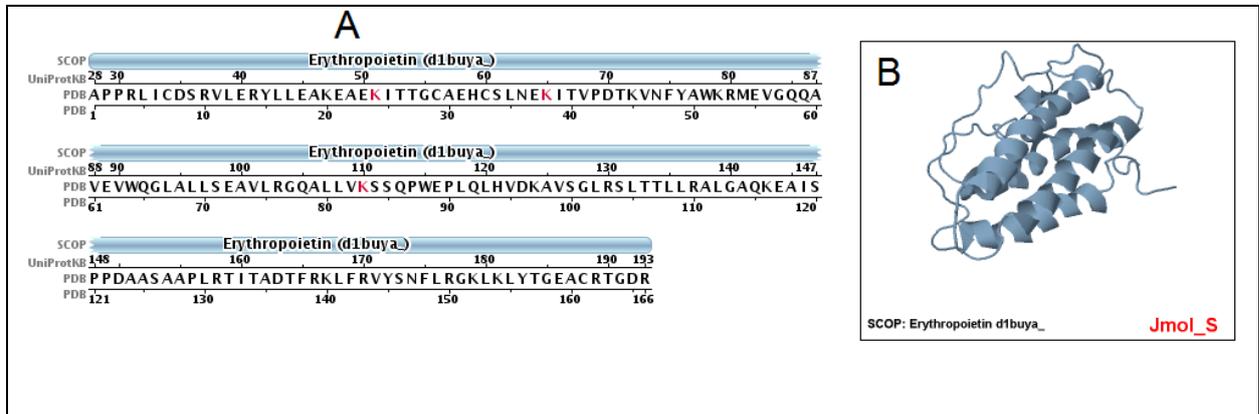


Figura 17. Em A, observa-se a sequência de aminoácidos da eritropoetina funcional, já em B a mesma proteína com representação da estrutura de domínio (Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb>).

O próximo passo foi realizar uma análise comparativa da estrutura secundária, procurando reconhecer o posicionamento de cada segmento na molécula da eritropoetina com a análise inicial das regiões que não possuem definição do tipo de cadeia (alfa-hélice, cadeia beta, cadeia em curva, cadeia estendida). A figura 18 mostra o resultado dessa comparação.

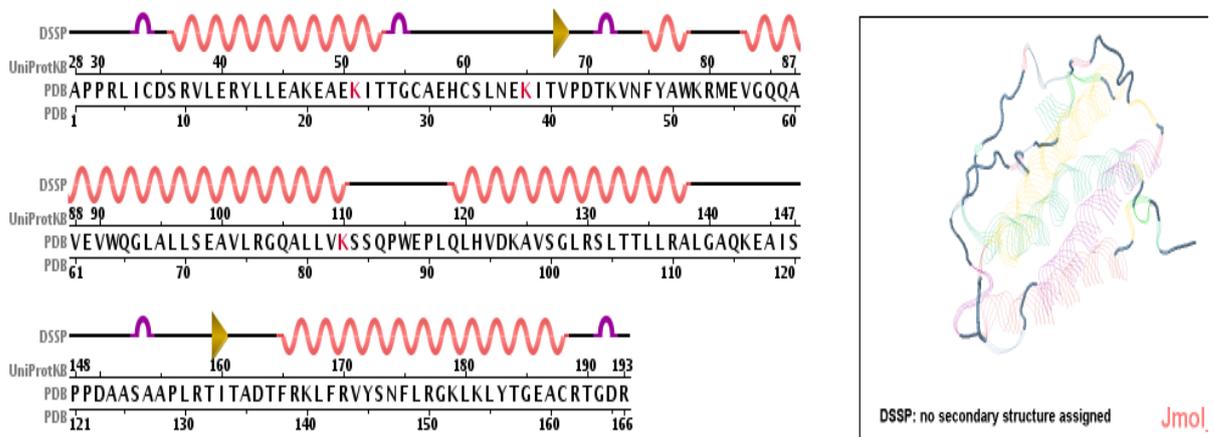


Figura 18. Nessa representação observa-se a sequência de aminoácidos e a presença de regiões sem estrutura secundária com cadeia definida (Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb>).

A análise comparativa da estrutura da eritropoetina humana destacando-se cada região de estrutura secundária definida, e em seguida as regiões na molécula 3D também foi realizada. As regiões, na proteína completa, que representam as variações de estrutura secundária foram identificadas a partir de *RCSB Protein Data*

Bank, possibilitando a comparação com as estrutura 3D. A figura 19 mostra a descrição dos padrões estruturais possíveis: alfa-hélice (alpha helix), cadeia beta (beta bridge) e cadeia em curva (turn).

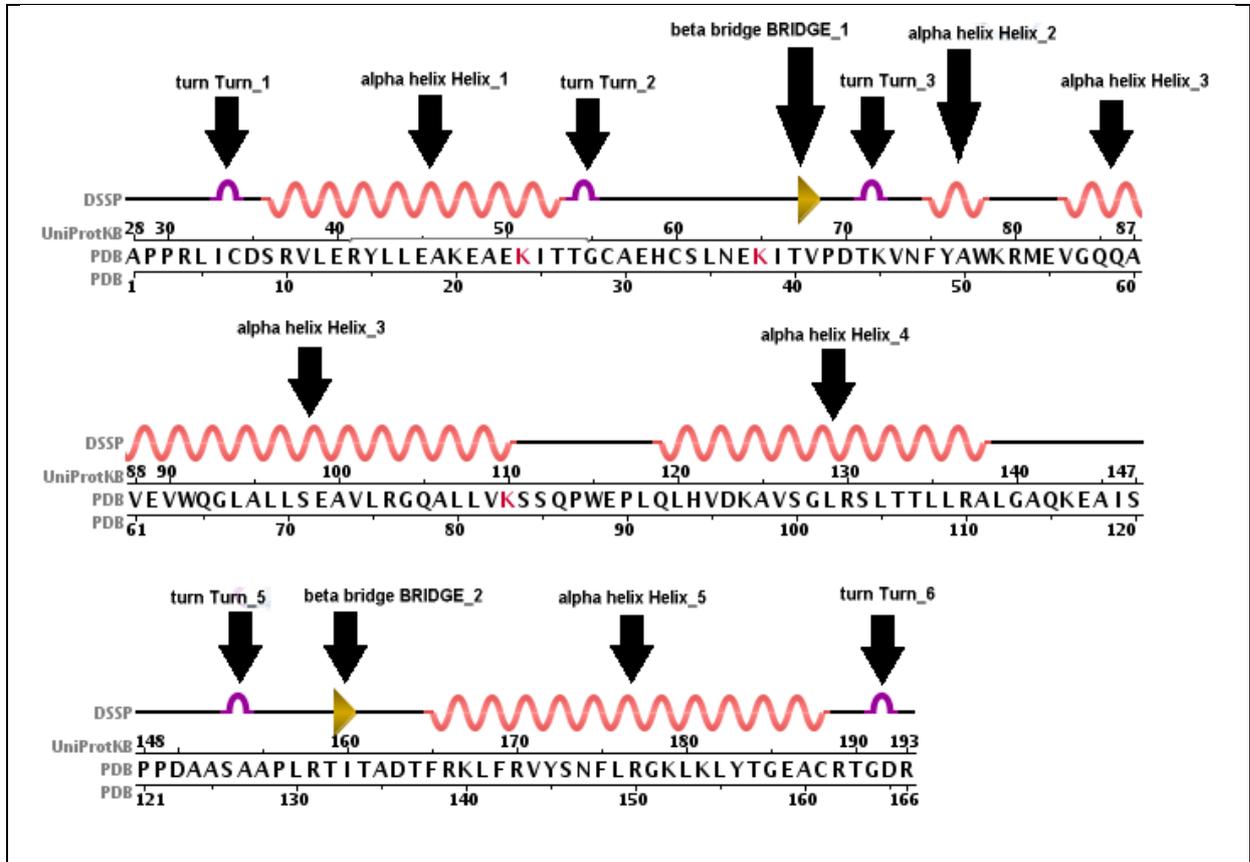


Figura 19. Representação da sequência de aminoácidos da eritropoetina humana mostrando a distribuição da diversidade de estrutura secundária presente ao longo da cadeia. As setas indicam cada região observada, e que serão comparadas na estrutura de domínio. (Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb>; imagem modificada).

A análise comparativa da estrutura secundária na estrutura de domínio pode ser representada, na cadeia principal da eritropoetina humana. Utilizando a figura 20 como referência, cada segmento foi posicionado na estrutura de domínio e o resultado foi representado na figura 20. A comparação tem por finalidade identificar se a estrutura secundária é mantida com a mesma conformação quando na proteína integral e nos peptídeos obtidos por meio da fragmentação *in silico* da proteína.

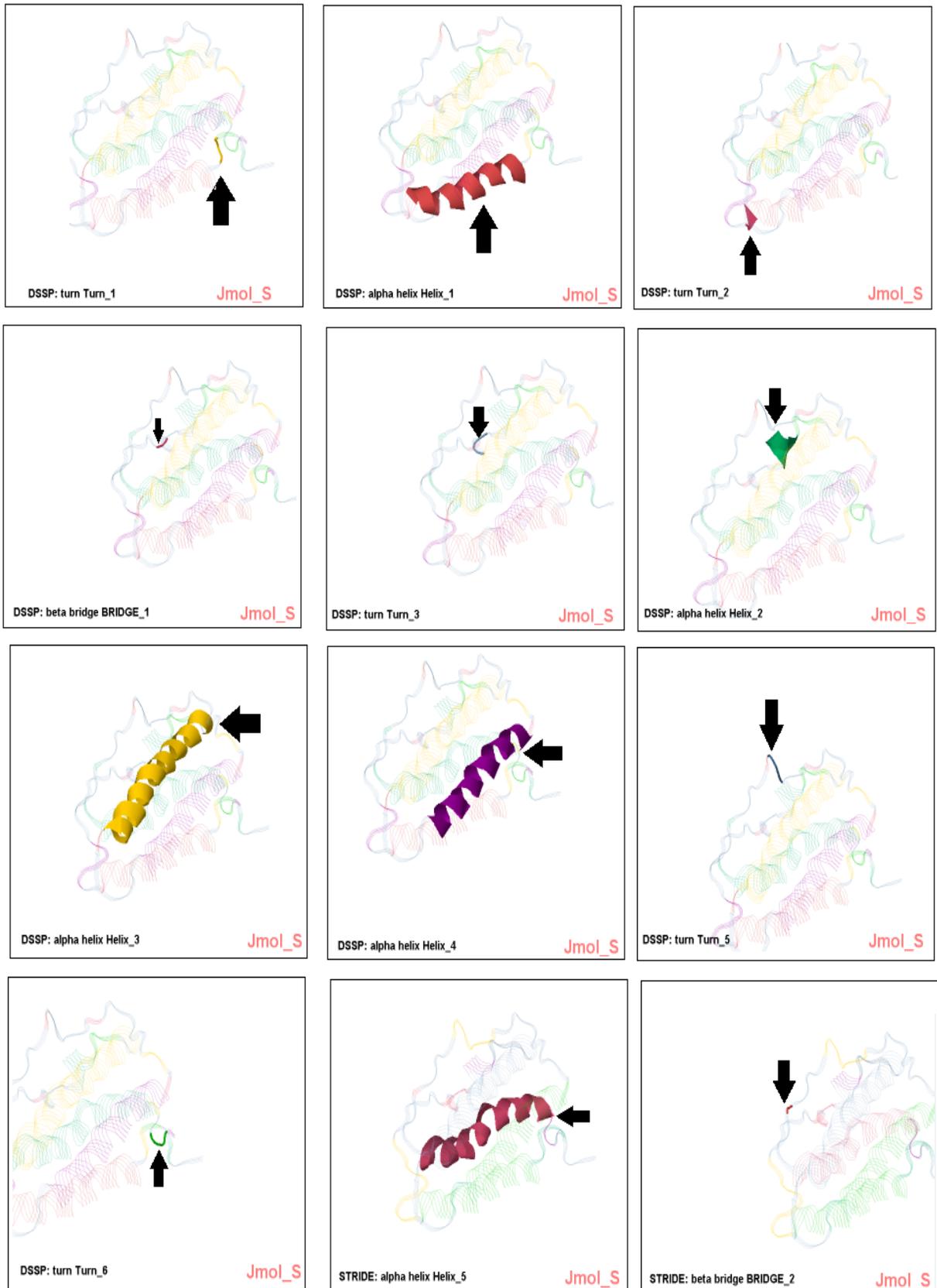


Figura 20. A figura mostra a posição de cada segmento de estrutura de alfa-hélice (alpha-helix), cadeia beta (beta bridge) e região em curva (turn). As setas indicam as correspondências para cada região na proteína em análise comparativa com a sequência de aminoácidos. (Fonte: <http://www.rcsb.org/pdb>; imagem modificada).

5.3 Fragmentação *in silico*: cortes da sequência funcional da eritropoetina realizados por enzimas em simulação computacional

Após a passagem da sequência de aminoácidos da eritropoetina pelo programa “*Protein Cutter*”, foram obtidos 337 fragmentos (peptídeos), sendo o número de fragmentos obtidos a partir da fragmentação simulada, realizada por todas enzimas disponíveis no baco de dados, apresentados na tabela 2. Esses fragmentos passaram a sofrer um processo de seleção para escolha de potenciais peptídeos antimicrobianos.

ENZIMA	CORTE	Nº DE FRAGMENTOS OBTIDOS
Tripsina	após KR	21
Arg-c	após R	13
Asp-N	antes de BD	7
Asp-N_Ambic	antes de DE	19
Quimiotripsina	após FLWY	19
CNBr	após N	3
CNBr + Tripsina	após MRK	22
Formic_acid	antes D, depois D	8
Lys-c	depois K	9
Ly_C/P	após K	9
PepsinA	após FL	31
Tryp-CNBr	após KMR	23
TrypChymo	após FKRLWY	39
Tripsina / P	após KR	21
V8-DE	após BDEZ	18
V8-E	após EZ	12
semiTrypsin	após KR	21
LysC + ASPN	antes de BD e depois de K	15
Prolyl Endoprotease	após PA	27

Tabela 2. Indicativo da enzima usada, do local de realização de corte e o número de fragmentos obtidos após a ação da enzima. (Fonte: Protein Cutter).

Os resultados obtidos apresentaram alguns dados que foram adotados como parâmetro para seleção ou exclusão dos peptídeos. Eles são mostrados em uma série de tabelas geradas quando da realização dos cortes enzimáticos, podendo ser vistos em anexo.

5.3.1 Seleção por número de resíduos de aminoácidos

Normalmente os peptídeos antimicrobianos são moléculas pequenas, de até 5 kDa, exibindo alto teor de aminoácidos básicos e hidrofóbicos. Em geral, são caracteristicamente definidos por conterem uma cadeia curta de aminoácidos (10 a 50 a.a.) e por apresentarem atividade antimicrobiana. A maioria apresenta uma grande quantidade de resíduos hidrofóbicos e carga total positiva em pH fisiológico, devido a grande proporção de resíduos de lisina e arginina (KAMYSZ *et al.*, 2003). Desta forma, a primeira triagem foi feita, adotando como parâmetro, o número de aminoácidos no peptídeo obtido.

Apesar de muitas referências da literatura adotar entre 10 e 100 o número de resíduos de aminoácidos possíveis para ação antimicrobiana dos peptídeos, neste trabalho foi adotada uma referência de 12 até 50 resíduos de aminoácidos. Foram descartados todos os peptídeos que possuíssem menos de 12 e mais de 50 aminoácidos, restando uma amostra de 95 peptídeos a serem analisados.

5.3.2 Seleção pela carga total positiva

Os fatores determinantes dos mecanismos microbicidas dos peptídeos antimicrobianos estão relacionados às características das membranas celulares das células microbianas e a natureza físico-química do peptídeo (Liang & Kim, 1999).

Segundo Park (1998), o principal alvo dos peptídeos antimicrobianos seja a membrana plasmática, sendo que muitos desses agentes antimicrobianos provocam a morte celular por meio da lise da membrana, o que proporciona alteração nas propriedades da membrana e do balanço osmótico celular. Além desse mecanismo de lise, outros estudos apontam outros mecanismos cujos alvos são intracelulares.

Estudos com microscopia de força atômica e microscopia eletrônica, realizados por Bechinger e Lohner (2006), mostraram efeito lítico desses peptídeos em membranas. Perturbação de membranas, mesmo em casos quando o alvo é

intracelular, deve ser um evento essencial para o processo de morte celular. (IZADPANAHA & GALLO, 2005).

A presença de resíduos com carga positiva é uma propriedade importante para a ação lítica da maioria dos peptídeos, pois o ajuda a alcançar seu alvo, incluindo especialmente moléculas aniônicas, como a membrana plasmática e ácidos nucléicos (HANCOCK, ROZEK, 2002).

A maior parte dos PAMs caracterizados até hoje apresentam uma carga líquida positiva, podendo conter um domínio catiônico altamente definido. Esta cationicidade é, sem dúvida, de grande importância para a atração eletrostática do PAM pela membrana fosfolipídica carregada negativamente das bactérias e outros micro-organismos, o que garante aos PAMs certa seletividade no que diz respeito aos tecidos do hospedeiro (YEAMAN & YOUNT, 2003).

De acordo com Lata et al. (2007), estes peptídeos são muito diversos em relação à sequência de aminoácidos e a estrutura secundária, mas partilham certas propriedades, tais como afinidade para os fosfolipídios carregados negativamente que estão presentes nas superfícies exteriores da membrana citoplasmática de muitas espécies microbianas, além do que, uma maior frequência dos resíduos carregados positivamente pode ajudar o C-terminal a interagir com a membrana bacteriana carregada negativamente, resíduos carregados positivamente no terminal-N pode ajudar na interação entre estes peptídeos e componentes intracelulares, como ADN e ARN, prejudicando assim funções cruciais bacterianas. A proporção de aminoácidos de carga negativa (D e E) deve ser muito baixa, uma vez que estes podem interferir durante o curso de penetração da membrana da célula carregada negativamente das bactérias.

Se uma bactéria é exposta a um peptídeo, mais e mais peptídeos associam-se sobre a superfície da membrana bacteriana. Finalmente, a membrana colapsa quando ele está completamente envolta por moléculas peptídicas. Esta saturação foi estimada para ocorrer em torno 1-10.000.000.000 moléculas (STEINER; ANDREU; MERRIFIELD, 1988). Membranas modelo com e sem colesterol mostram que o colesterol previne o dano à membrana. Como este lipídio é um componente essencial nas membranas eucarióticas existe um consenso de que o colesterol na maioria dos casos explica porque as concentrações naturais de peptídeos antibacterianos não causam dano a célula eucariota (BOMAN, 2003).

Peptídeos catiônicos conseguem se ligar aos lipopolissacarídeos, moléculas carregadas negativamente que constituem o principal componente da parede celular das bactérias Gram-negativas. A ligação desses peptídeos aos lipopolissacarídeos envolve o deslocamento de cátions bivalentes (Mg^{2+} e Ca^{2+}) essenciais para a estabilidade da superfície celular, o que resulta no rompimento da camada e facilita a entrada do peptídeo na célula bacteriana. Um mecanismo similar também capaz de favorecer a passagem desses peptídeos pela parede celular de bactérias Gram-positivas (HANCOCK 1997; PIER E HANCOCK, 1994).

Como a atividade e a seletividade dos peptídeos catiônicos são determinadas pelo modo de interação com as membranas celulares dos microrganismos. A maioria possui carga catiônica e hidrofobicidade relativamente alta em pH fisiológico, o que facilita a ligação e inserção a membrana das células microbianas. Seguindo esse princípio de cargas positivas, foram descartados os que possuíssem carga total negativa ou neutra, selecionando apenas os peptídeos de carga total positiva, mantendo-se assim a propriedade essencial para a ação antimicrobiana.

5.3.3 Seleção dos peptídeos pelo ponto isoelétrico

O valor de pH no qual o aminoácido, peptídeo ou proteína ficam eletricamente neutros (igual número de cargas positivas e cargas negativas) corresponde ao ponto isoelétrico (pI). O valor de pI é uma constante de um composto em particular em condições específicas de força iônica e temperatura. Além disso, representa um pH onde o número de grupos ácidos desprotonados (COO^-) e grupos básicos protonados (NH_3^+) se igualam, sendo que a relação entre o pH e o ponto isoelétrico possibilita reconhecer a carga líquida de um peptídeo ou proteína, de modo que, em pH menor que o pI, a carga elétrica líquida será positiva; em pH maior que o pI, a carga elétrica líquida será negativa. (PIHLASALO et al., 2012)

Desta forma, em pH fisiológico (pH = 7) espera-se peptídeos com pI acima de 7,0, o que proveria uma carga elétrica líquida positiva, tornando esse peptídeo viável para ação antibacteriana, uma vez que a membrana plasmática bacteriana tem carga negativa. Assim, um peptídeo de carga líquida positiva teria capacidade de ligação à membrana, possibilitando sua ação.

Baseado nos critérios apresentados, as sequências escolhidas são mostradas na tabela 3.

5.3.4 Seleção pelo índice Boman

O índice Boman representa a soma das energias livres das cadeias laterais respectivas para transferência a partir de ciclohexano para água tirada e dividido pelo número total de resíduos de um peptídeo antimicrobiano. A base de dados “The Antimicrobial Peptides Database” definiu como Índice Boman, em 2003, em memória de Hans Boman, que o chamou de potencial de ligação-proteína.

Em experimentos desenvolvidos por Hans Boman (BOMAN, 2003), ficou descrito que a maioria dos peptídeos antimicrobianos apresentava índices baixos, por isso foram definidos valores abaixo de 1,0 para esse parâmetro, desta forma, todos os peptídeos selecionados apresentaram índice menor que 1,0 (tabela 3) concluindo-se que eles têm probabilidade reduzida de interagir com receptores e, portanto, são potenciais candidatos antibacterianos sem muitos efeitos adversos (BOMAN, 2003). Apesar da preferência por índice baixo, existem vários peptídeos com índices mais elevados que são inteiramente capazes de exercer ação antibacteriana sem apresentar outras funções aparentes.

Sequência	Número de aminoácidos	Potencial Isoelétrico	Carga	Índice Boman
<i>AASAAPLRTITA</i>	12	9,79	+1	0,38
<i>EAVLRGQALLVKSSQPW</i>	17	8,85	+1	0,9
<i>AVSGLRSLTLLRALGAQK</i>	19	12,01	+3	0,89
<i>KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP</i>	26	11,00	+3	0,99

Tabela 3. Representação das quatro sequências escolhidas baseados nos critérios acima estabelecidos.

5.3.5 Seleção pelo método descrito por Lata

Após a aplicação dos parâmetros finais sobre os quatro peptídeos selecionados, alguns dos parâmetros reconhecidos como importantes para peptídeos antibacterianos foram observados nos peptídeos em análise, de modo que, não necessariamente todas as características estariam presentes no peptídeo reconhecidos como importantes para a ação antimicrobiana, porém, todos apresentaram algum ou alguns desses parâmetros, desta forma uma possível síntese desses peptídeos se tornaria viável para eventuais testes da ação antibacteriana.

Em 2007, Lata et al, desenvolveram um método que utiliza uma abordagem com N-terminal e C-terminal para reconhecer algumas propriedades consideradas importantes para a ação antimicrobiana. A região C-terminal é responsável pela interação de membrana e formação de poros, enquanto que a região N-terminal é importante em processos específicos de interação com bactérias (Otvos, 2005), dessa forma determinaram algumas preferências de resíduos de aminoácidos em peptídeos antibacterianos quando comparados a peptídeos não antibacterianos.

Inicialmente os resíduos N-terminais foram utilizados para predição de peptídeos antibacterianos usando Artificial Neural Network (ANN), Quantitative Matrices (QM) e Support Vector Machine (SVM), o que resultou em uma precisão de 83,63%, 84,78% e 87,85%, respectivamente. Em seguida, os resíduos C-terminais foram usados para o desenvolvimento de métodos de previsão, o que resultou em uma precisão de 77,34%, 82,03% e 85,16%, usando ANN, QM e SVM, respectivamente. Finalmente, os modelos de ANN, QM e SVM foram desenvolvidos utilizando os resíduos N e C terminal, obtendo uma precisão de 88,17%, 90,37% e 92,11%, respectivamente. Todos os modelos desenvolvidos neste estudo foram avaliados por meio de cinco vezes a técnica de validação cruzada. Estes modelos foram testados em um conjunto de dados independentes.

As conclusões tiradas por Lata et al (2007) sugerem que entre os peptídeos antibacterianos, existe preferência de determinados resíduos de N e C terminais, o que ajuda a diferenciação de peptídeos antibacterianos de não antibacterianos e que ambos os terminais desempenham um papel crucial em conferir a propriedade antibacteriana para estes peptídeos. Entre os métodos desenvolvidos, SVM mostrou o melhor desempenho na predição de peptídeos antibacterianos seguido por QM e ANN, nessa ordem.

Lata et al. (2007), a fim de demonstrar preferência dos 20 resíduos de aminoácidos em diferentes posições de peptídeos antibacterianos sequenciaram logotipos utilizando o programa plogo. Identificaram que determinados resíduos são mais abundantes em posições específicas, por exemplo, G, F, V, R na primeira posição; L, I, W, F na segunda posição, etc. Geralmente, peptídeos antibacterianos são dominados por certo tipo de resíduos como G, R, K, L, etc., estes estão presentes na maioria das posições. Do mesmo modo, certos resíduos são preferidos no C-terminal, por exemplo, resíduos de K, G, C e R são os preferidos na maior parte das posições.

A fim de compreender a apresentação de resíduos nos peptídeos antibacterianos, Lata et al. (2007) calcularam a frequência de cada tipo de resíduo nos peptídeos antibacterianos e não antibacteriana e demonstraram que os resíduos G e F são significativamente mais frequentes na primeira posição N-terminal de peptídeos antibacterianos do que a de não antibacterianos. Da mesma forma os resíduos de W, I, L, F são mais frequentes na segunda posição do N-terminal de peptídeos antibacterianos em comparação com não antibacterianos. Realizaram também o cálculo de resíduos polares, resíduos não polares, resíduos de carga positiva, etc. em diferentes posições de peptídeos antibacterianos e compararam com não bacterianos. Embora ambos os terminais possuísse maior frequência de resíduos carregados positivamente (K e R), a diferença entre a frequência destes resíduos entre os peptídeos antibacterianos e não antibacteriana é mais elevada no C-terminal. A diferença na frequência de resíduos carregados positivamente em relação aos carregados negativamente, mostra, por exemplo, um aumento dos positivos da posição 1 a 5 na extremidade N-terminal, enquanto que ela tende a diminuir a partir da posição 1-5 na C-terminal. Enquanto a maior frequência dos resíduos carregados positivamente pode ajudar o C-terminal a interagir com a membrana bacteriana carregada negativamente, resíduos carregados positivamente

no terminal-N pode ajudar na interação entre estes peptídeos e componentes intracelulares, como DNA e RNA, prejudicando assim as funções cruciais bacterianas. A proporção de cisteína é mais elevada no também N-terminal. A proporção de aminoácidos de carga negativa (D e E) encontrados foi muito baixa, como esperado, uma vez que estes podem interferir durante o curso de penetração da membrana da célula carregada negativamente das bactérias.

Desta forma, foi feita a análise dos peptídeos selecionados visando reconhecer a presença dessas características identificadas como importantes para a ação antimicrobiana. Os resultados da análise podem ser observados na figura 21.

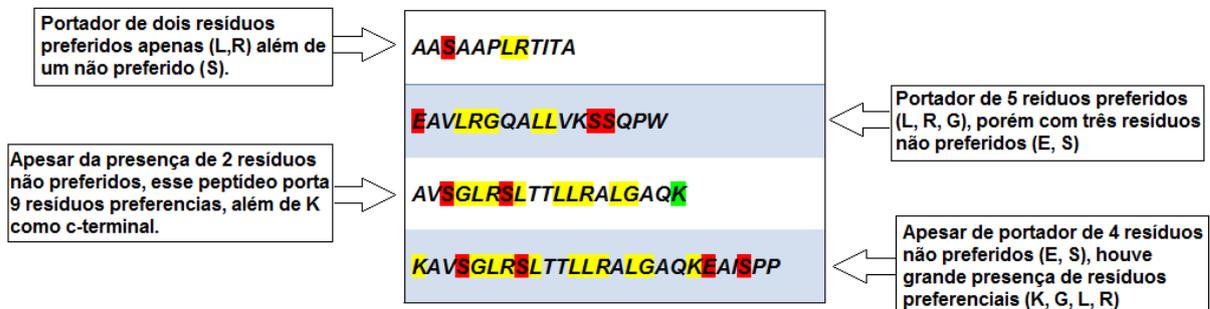


Figura 21. Identificação dos resíduos de aminoácidos determinados pelo descrito por Lata et al., 2007.

5.4 Estrutura secundária dos peptídeos analisados: resultado de predição de estrutura

Os peptídeos foram analisados no programa PSIPRED e as previsões de estruturas secundárias fornecidas mostram a presença de alfa-hélice, cadeia beta e cadeia estendida, podendo ser observadas na figura 22.

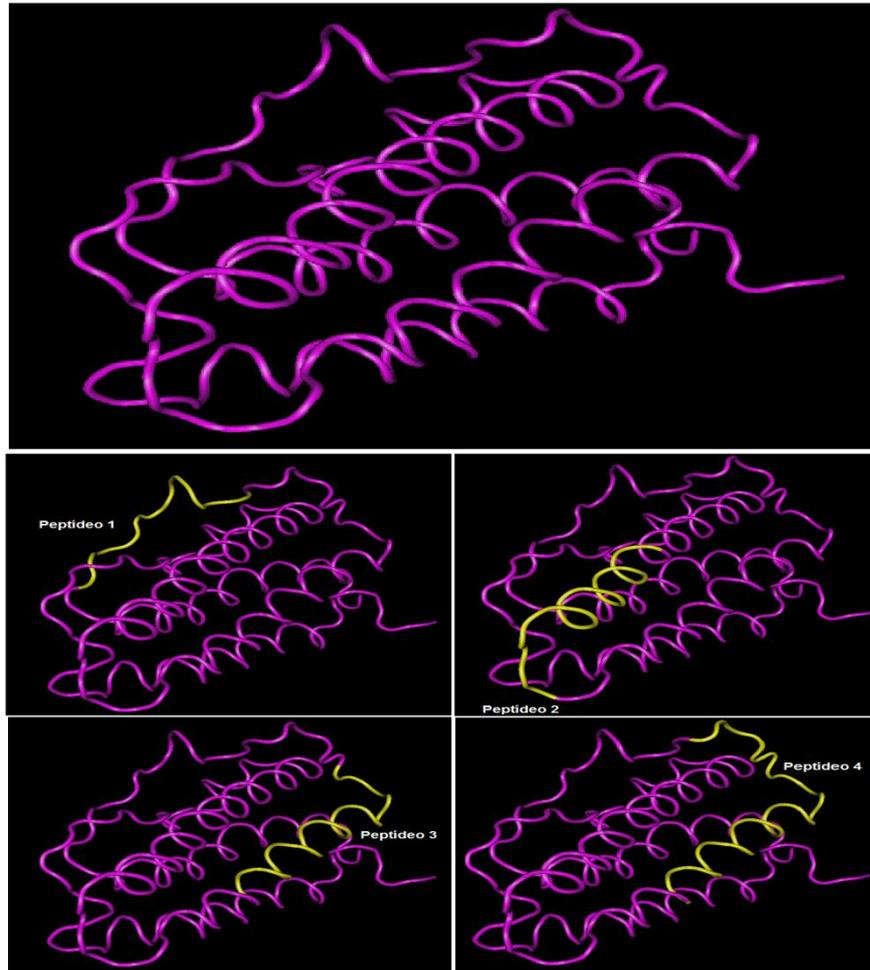


Figura 23. Inicialmente a EPO integral e posteriormente quatro quadrantes com a demarcação, na EPO, dos peptídeos identificados como peptídeo 1, peptídeo 2, peptídeo 3 e peptídeo 4.

A análise individual de cada peptídeo permitiu mostrar uma perspectiva de estrutura secundária, segundo PSIPRED, com a presença de algumas características estruturais que poderiam ser favoráveis para a ação antimicrobiana.

O peptídeo 1 (AASAAPLRTITA) está representado, na molécula original de EPO, pelos resíduos de número 124 a 135, da cadeia de 166 resíduos de aminoácidos. Apresenta na molécula original uma configuração com regiões em curva, cadeia estendida e cadeia beta. A comparação entre o trecho que caracteriza o peptídeo 1 na molécula de eritropoetina, bem como a representação de sua estrutura secundária estão representados na figura 24.

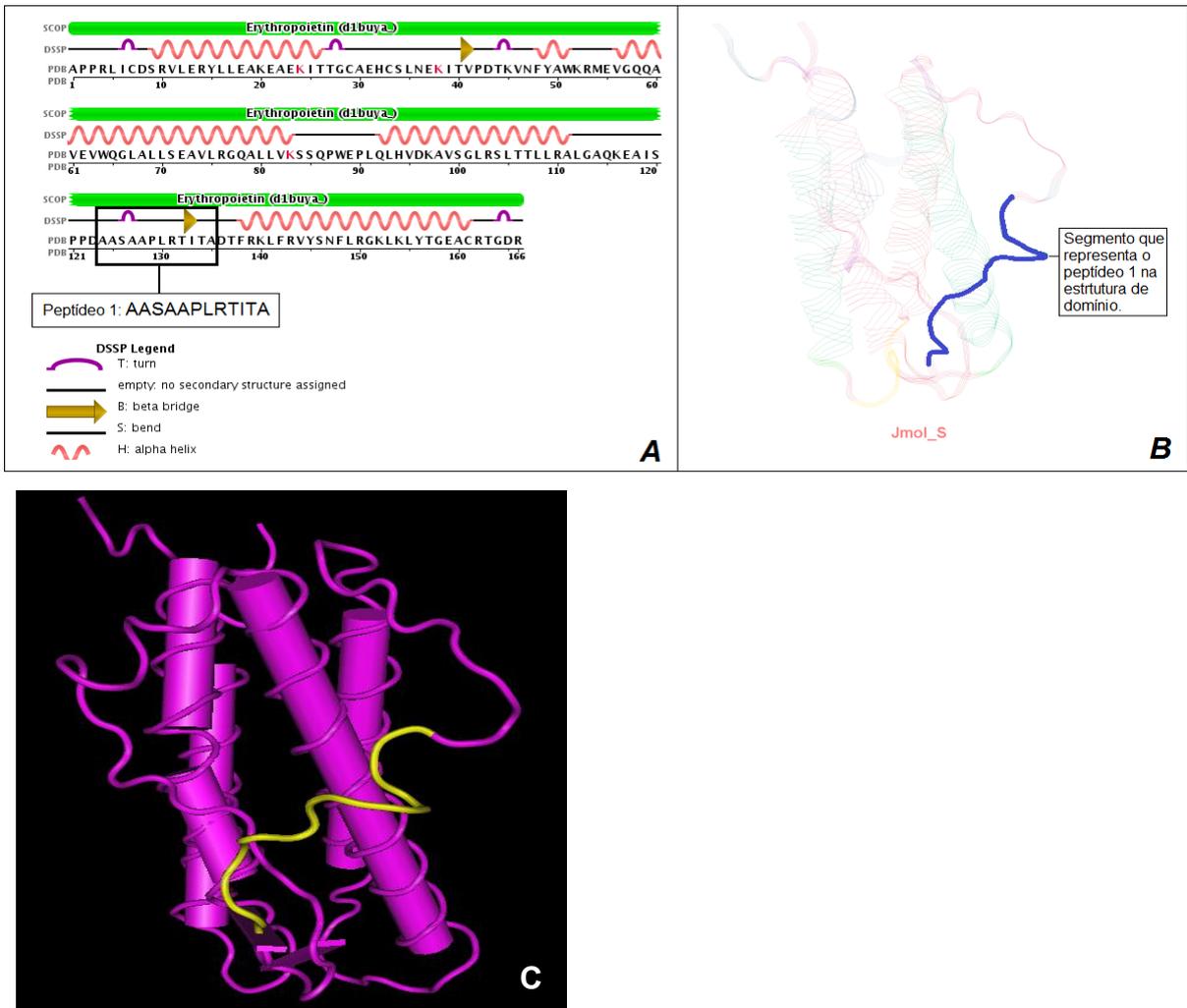


Figura 24. Em **A** pode ser observada a sequência de aminoácidos do peptídeo 1 dentro da estrutura secundária da molécula de eritropoetina integral. Em **B** o posicionamento do peptídeo na estrutura de domínio (Fonte: <http://www.rcsb.org>, imagens modificadas). Em **C** a representação da estrutura terciária de EPO destacando a localização do peptídeo 1 (Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/).

A previsão de estrutura secundária do peptídeo 1 no programa PSIPRED foi realizada (figura 25) e o resultado permitiu a constatação de que a estrutura do peptídeo isolado não corresponde ao que ocorre com o segmento na molécula completa, havendo o surgimento de um pequeno segmento com capacidade de formação de alfa-hélice. No segmento original eram observadas regiões em curva, região estendida e cadeia beta (figura 24A). O peptídeo apresenta na sua predição a estrutura em hélice com três resíduos –TIT– todos os outros foram simulados com estrutura estendida. Apesar da menor estabilidade dessa estrutura estendida, a mesma apresenta dois resíduos preferenciais bem próximos à hélice prevista, o que pode favorecer a interação com membranas biológicas. Além de ser um peptídeo

bem pequeno, o que viabiliza a sua síntese caso seja realmente previsto como antibacteriano.

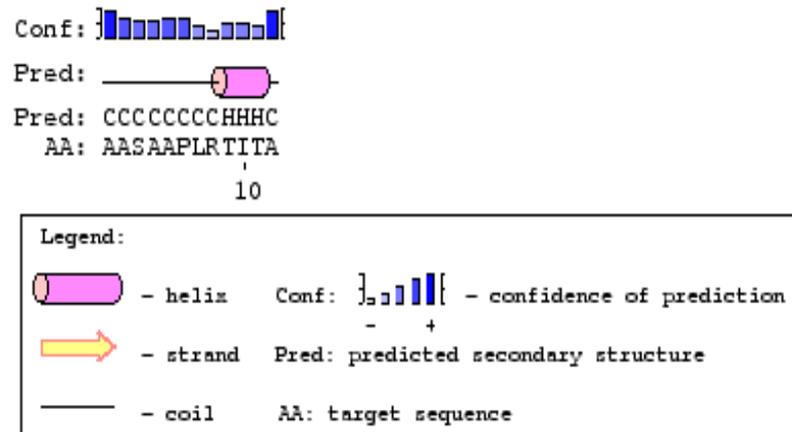


Figura 25. Resultado da predição de estrutura secundária do peptídeo 1 obtido em PSIPRED (Disponível em <<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>>).

O peptídeo 2 (**EAVLRGQALLVKSSQPW**) está representado, na molécula original da eritropoetina, pelos resíduos de número 72 a 88, da cadeia de 166 resíduos de aminoácidos. A sua estrutura secundária é representada principalmente por alfa-hélice na molécula integral, com segmentos sem cadeia definida em curva. A figura 26 representa a distribuição da estrutura secundária na proteína completa e na estrutura de domínio.

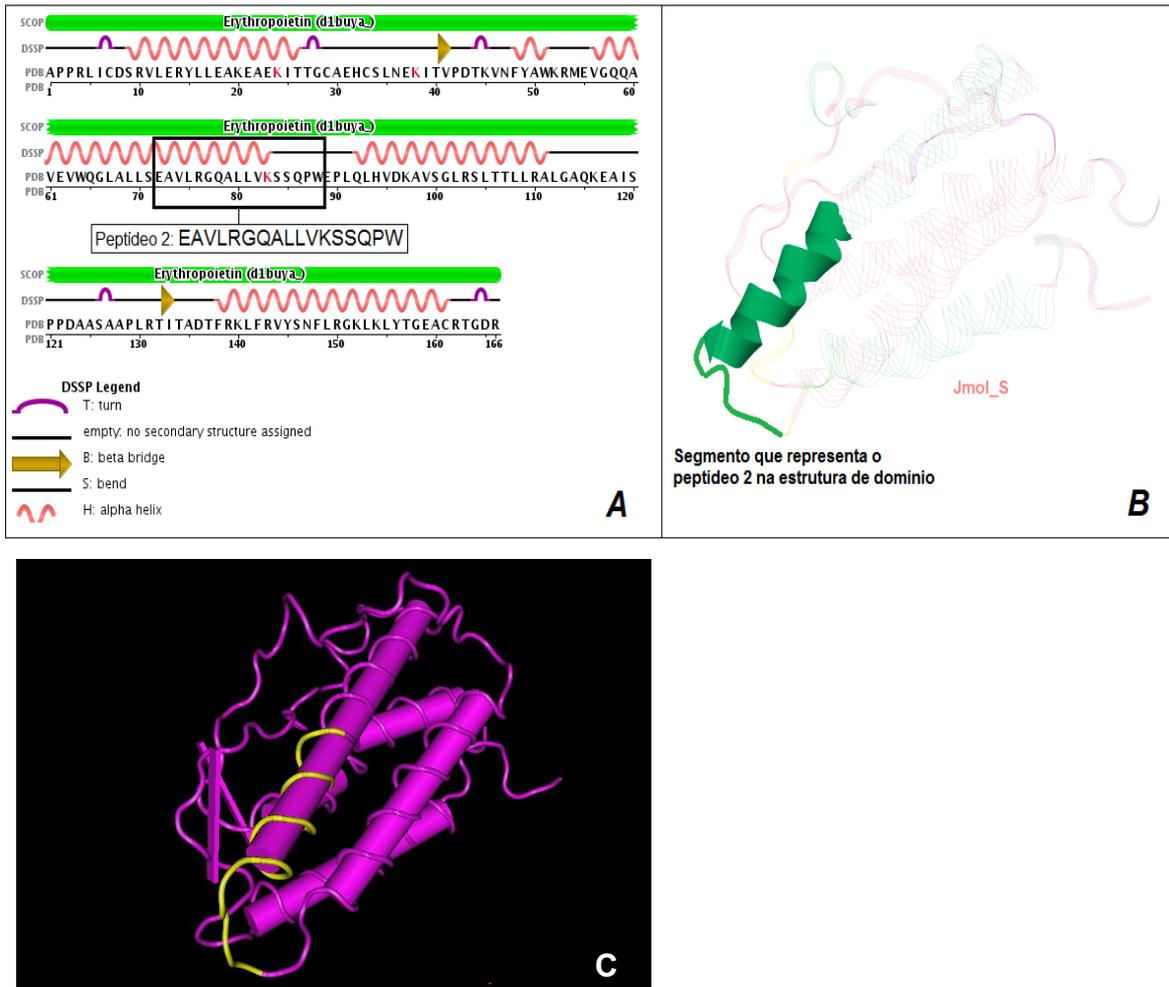


Figura 26. Em **A** pode ser observada a sequência de aminoácidos do peptídeo 2 dentro da estrutura secundária da molécula de eritropoetina integral. Em **B** o posicionamento do peptídeo na estrutura de domínio (Fonte: <http://www.rcsb.org>, imagens modificadas). Em **C** a representação da estrutura terciária de EPO destacando a localização do peptídeo 2 (Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/).

O proposto em PSIPRED para o peptídeo 2 (figura 27) é que o mesmo apresente uma estrutura com alternância entre estrutura estendida (coil) e folha beta, porém na molécula original o mesmo peptídeo tem uma organização estrutural em alfa-hélice seguida de um segmento estendido, que na estrutura terciária origina uma curvatura. Essa comparação nos leva a conclusão que o peptídeo 2 isolado passa a ter as interações entre os resíduos de aminoácidos estabelecidas de modo a apresentar total modificação na estrutura prevista. A disposição molecular prevista pressupõe a presença dos resíduos VL e QALLVK em folha. Dentre esses, pode-se destacar a presença de L e K como resíduos dominantes para um bom efeito antimicrobiano, porém, os resíduos E e S, presentes em regiões terminais com cadeia estendida, poderia promover uma dificuldade de interação com as membranas biológicas. A predição desse peptídeo para efeito antimicrobiano poderia ser mais bem avaliada.

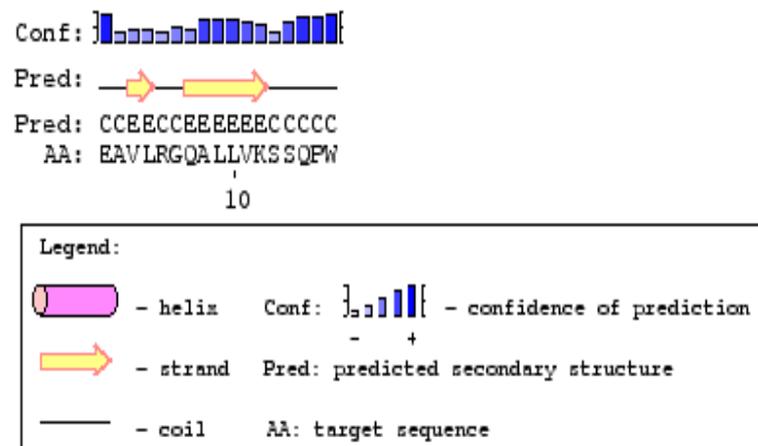


Figura 27. Resultado da predição de estrutura secundária do peptídeo 2 obtido em PSIPRED (Disponível em <<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>>).

O peptídeo 3 (**AVSGLRSLTLLRALGAQK**) está representado na molécula original da eritropoetina, pelos resíduos de número 98 a 116, da cadeia de 166 resíduos de aminoácidos, apresentando-se com grande parte de sua sequência em alfa-hélice e um trecho de cadeia estendida (figura 28).

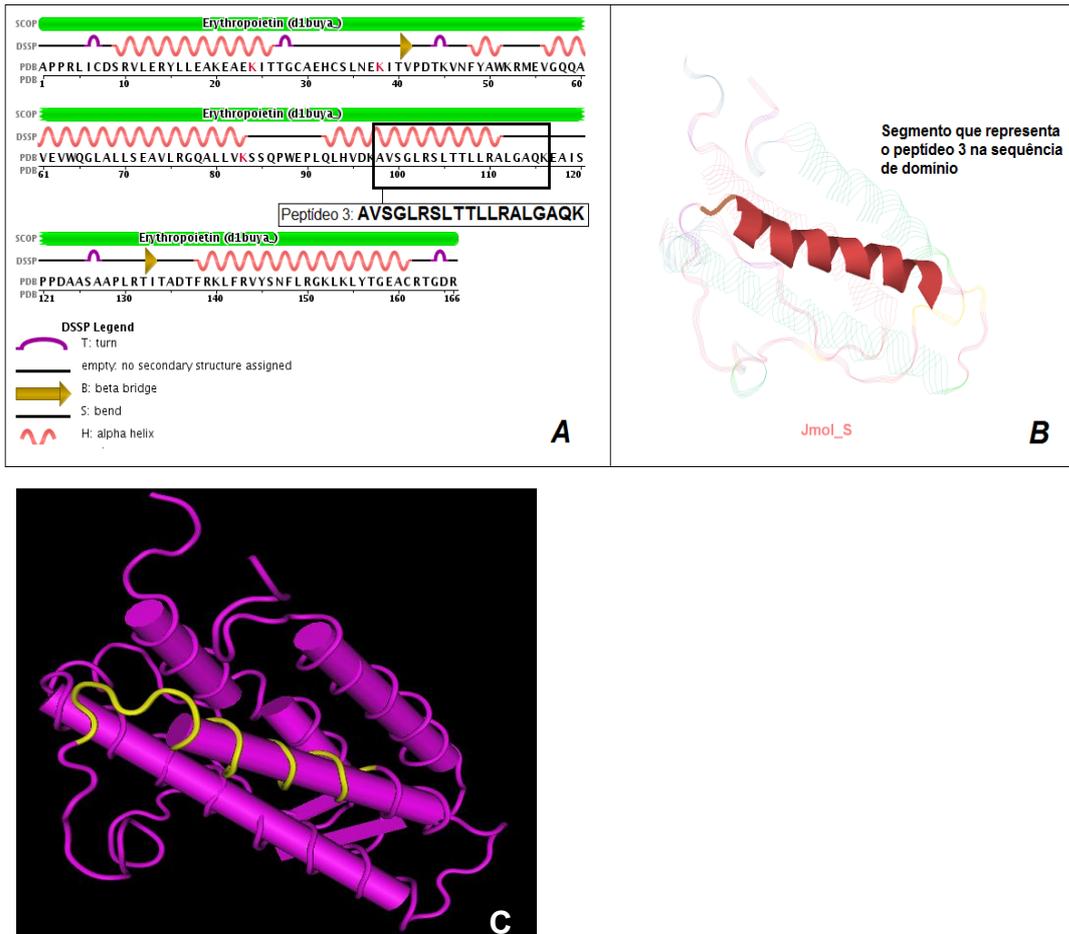


Figura 28. Em **A** pode ser observada a sequência de aminoácidos do peptídeo 3 dentro da estrutura secundária da molécula de eritropoetina integral. Em **B** o posicionamento do peptídeo na estrutura de domínio (Fonte: <http://www.rcsb.org>, imagens modificadas). Em **C** a representação da estrutura terciária de EPO destacando a localização do peptídeo 3 (Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/).

O proposto para o peptídeo 3 em PSIPRED foi mais próximo ao observado na molécula integral de EPO. Isolado, o peptídeo é previsto com uma estrutura predominantemente alfa-hélice (figura 29), o mesmo ocorrendo na proteína integral. A diferença se faz quanto ao posicionamento da hélice, que no peptídeo isolado é prevista para em uma posição mais centralizada, com cadeias estendidas nas extremidades terminais, já na proteína integral a alfa-hélice se dispõe no início do segmento com uma continuidade de cadeia estendida. Neste caso as alterações não mudaram a essência estrutural do peptídeo, pois essencialmente a alfa-hélice foi prevista como estrutura provável, porém os aminoácidos responsáveis pela formação das hélices não serão os mesmos, desta forma o peptídeo pode apresentar aminoácidos capazes de interagir com as membranas biológicas de micro-organismos em posições acessíveis da hélice ou da cadeia estendida, levando a um efeito antibacteriano possível. Mesmo assim, a possível presença de vários

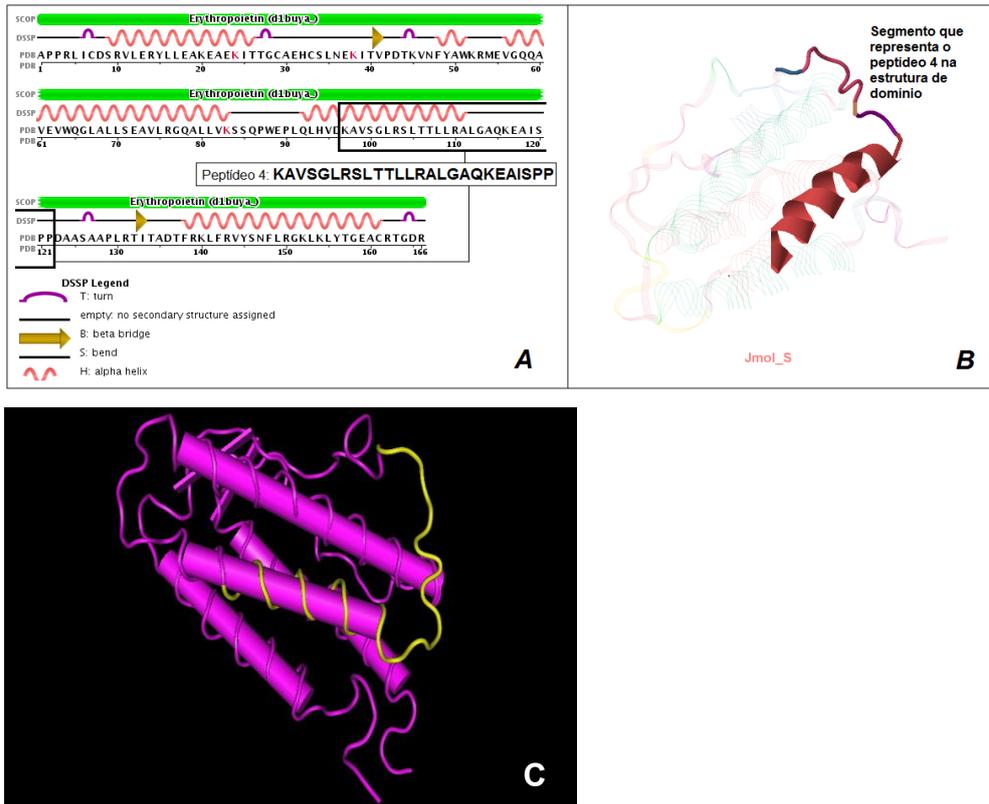


Figura 30. Em **A** pode ser observada a sequência de aminoácidos do peptídeo 4 dentro da estrutura secundária da molécula de eritropoetina integral. Em **B** o posicionamento do peptídeo na estrutura de domínio (Fonte: <http://www.rcsb.org>, imagens modificadas). Em **C** a representação da estrutura terciária de EPO destacando a localização do peptídeo 4 (Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/).

O peptídeo 4 teve sua predição em PSIPRED com uma estrutura essencialmente em alfa-hélice, portando apenas as extremidades terminais com pequeno trecho de cadeia estendida (figura 31). Em relação ao observado na EPO integral, a diferença diz respeito a maior sequência de cadeia estendida na EPO. Inicialmente o segmento apresenta uma cadeia alfa-hélice, porém a cadeia estendida passa a ser bem significativa na molécula, interferindo, inclusive, na presença de uma dobra na proteína terciária. A disposição estrutural do peptídeo poderia representar uma estabilidade estrutural para a molécula o que poderia favorecer a interação com as membranas biológicas de micro-organismos, além de ser um sítio que pode apresentar grande número de aminoácidos que possam exercer efeito interativo com as membranas. Apesar de a hélice prevista apresentar três resíduos não preferenciais (KSE), o número de resíduos reconhecidos como preferenciais é elevado (7 resíduos) além de um resíduo preferencial na extremidade N-terminal, desta forma uma possível interação com as membranas biológicas poderia ser favorável e assim, um agente antibacteriano poderia ser previsto.

estrutura secundária/terciária dos peptídeos também foi prevista usando o programa “*BHAGEERATH-H: A Homology ab-initio Hybrid Web server for Protein Tertiary Structure Prediction*”, disponível em <http://www.scfbio-iitd.res.in/bhageerath/bhageerath_h.jsp>, sendo realizada a modelação de estrutura secundária/terciária dos quatro peptídeos. O programa "Bhageerath-H" aceita uma sequência de aminoácidos e realiza a predição de cinco estruturas possíveis para o peptídeo nativo. Esta abordagem é frequentemente referida como um método *ab initio* (SCHERAGA, 1992; VASQUEZ, 1994) e baseia-se na hipótese formulada pelo termodinâmico Anfinsen (1973), de acordo com a qual, a estrutura de uma proteína nativa corresponde ao mínimo global da energia livre, sob dadas condições (ANFINSEN, 1973).

Outra ferramenta para modelação e determinação de alguns parâmetros bioquímicos de proteína e peptídeos é o servidor SWISS-MODEL, um servidor de homologia de modelagem da estrutura de proteínas totalmente automatizado, acessível através do servidor web ExPASy, ou a partir do programa DeepView (Swiss PDB-Viewer), disponível em <<http://swissmodel.expasy.org/>>. O objetivo deste servidor é fazer Modelling Protein acessível a todos bioquímicos e biólogos moleculares a nível mundial (Fonte: <http://swissmodel.expasy.org/>).

Foi feita a predição dos três peptídeos usando três passos de 100 agitações, de onde foram obtidas, para cada peptídeo, 5 possíveis estruturas, cada uma delas com o mínimo de energia livre em cada passo. Os resultados para predição de estrutura secundária/terciária para cada um dos quatro peptídeos passam a ser apresentados nas figuras 32, 33, 34 e 35.



Figura 32. Visualização das possíveis estruturas secundárias para o peptídeo 1. Mostrando diferentes conformações baseadas em no nível de energia livre. Fonte: SPDB-Viewer.

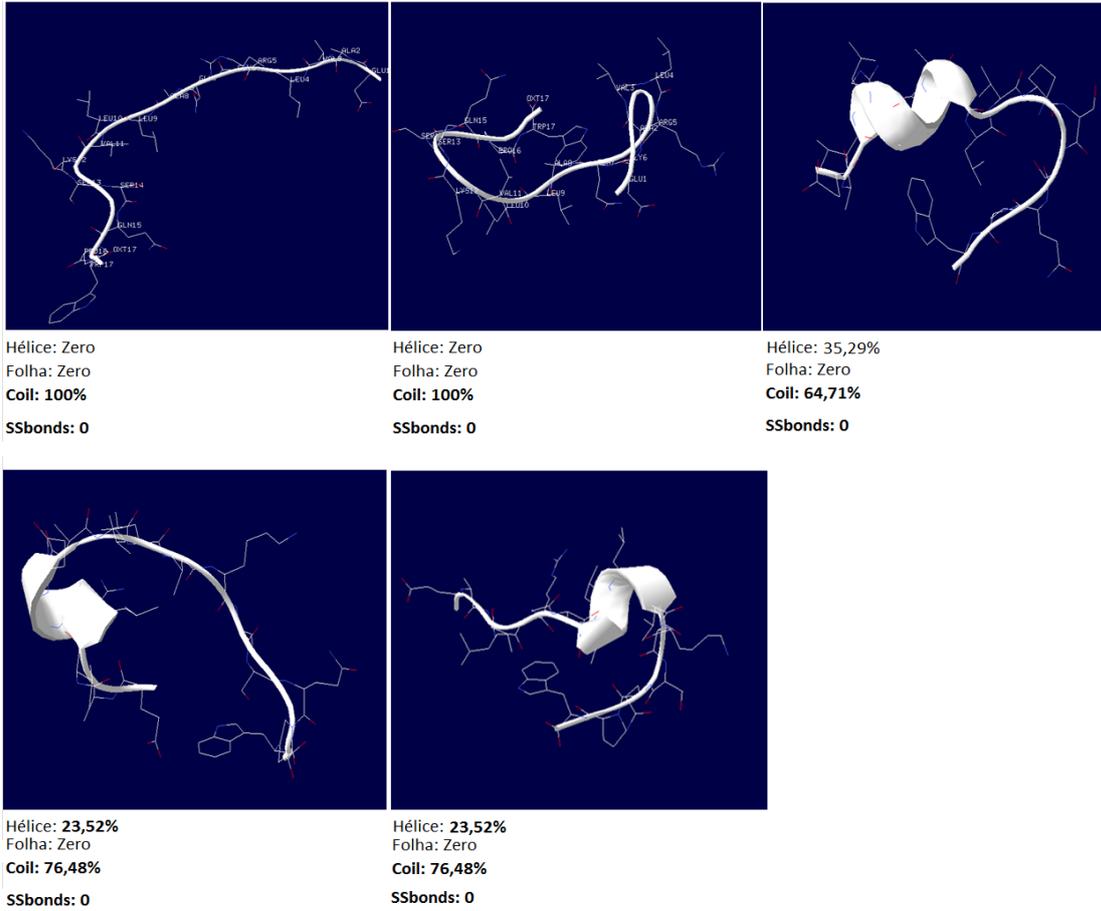


Figura 33. Visualização das possíveis estruturas secundárias para o peptídeo 2, mostrando diferentes conformações baseadas em no nível de energia livre. Fonte: SPDB-Viewer.

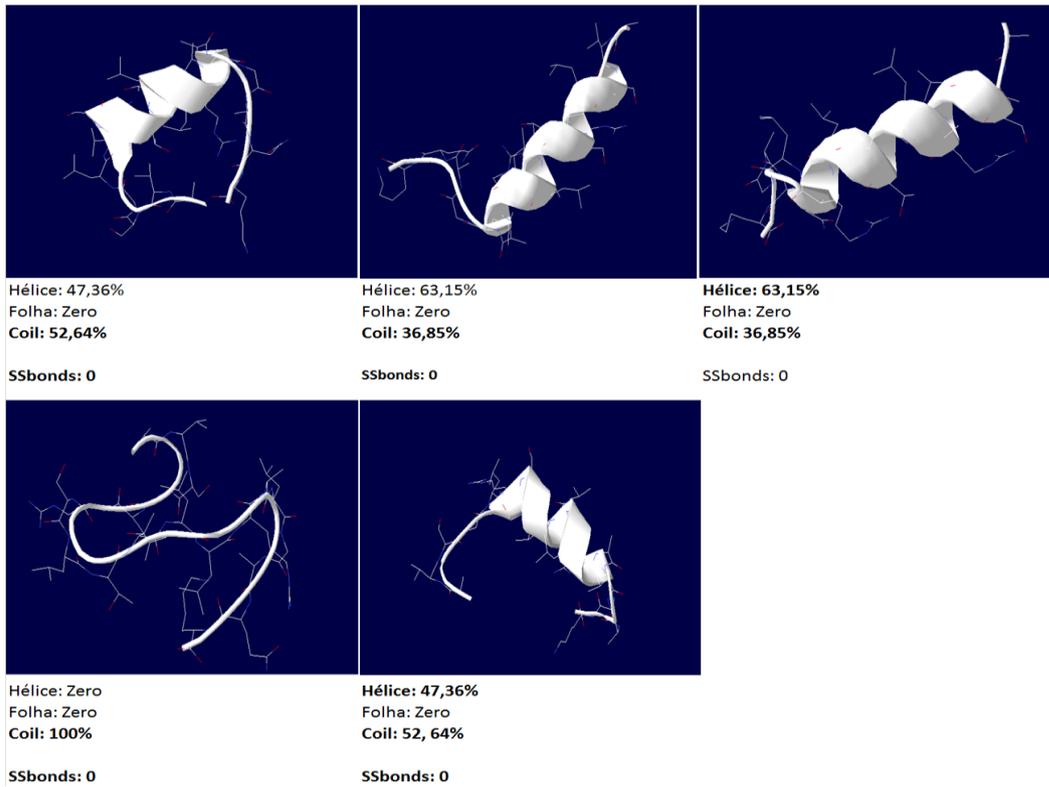


Figura 34. Visualização das possíveis estruturas secundárias para o peptídeo 3. Mostrando diferentes conformações baseadas em no nível de energia livre. Fonte: SPDB-Viewer.

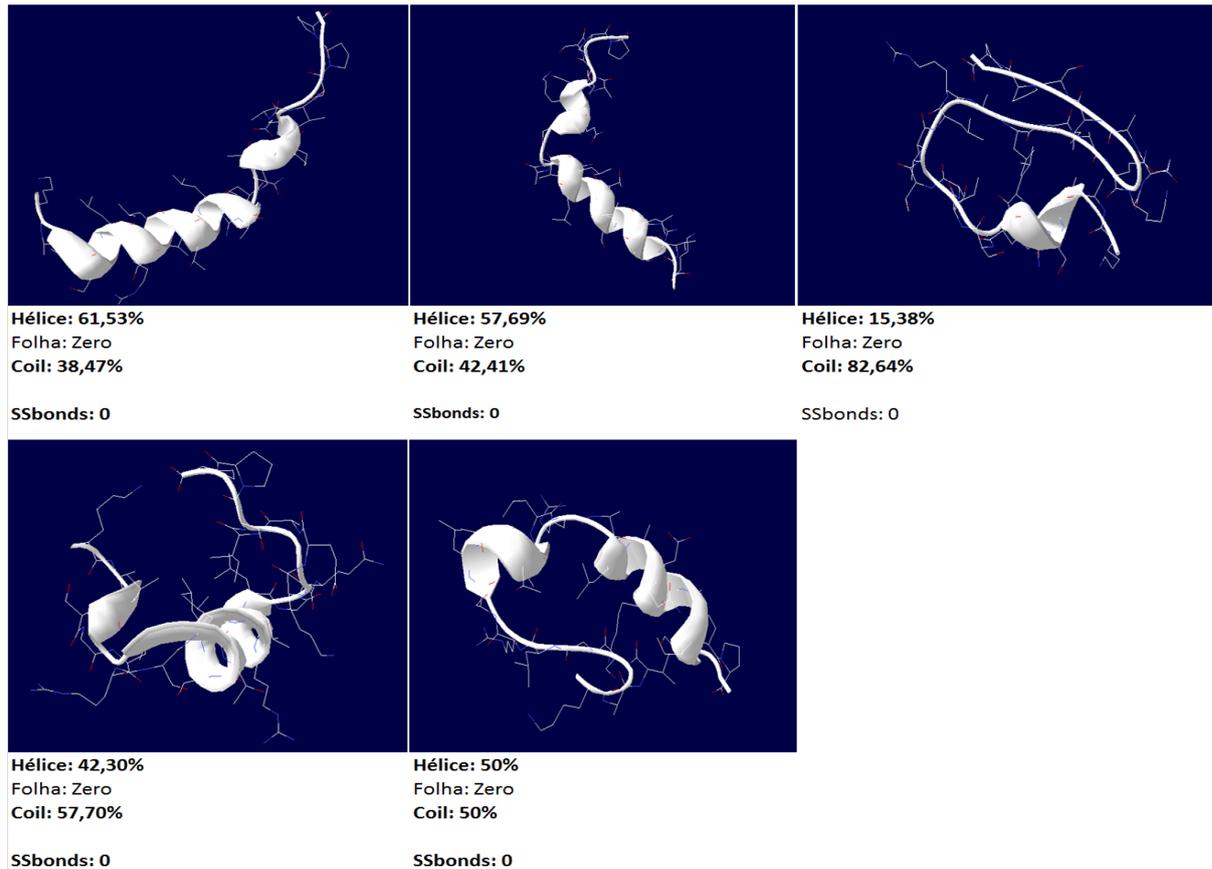


Figura 35. Visualização das possíveis estruturas secundárias para o peptídeo 4. Mostrando diferentes conformações baseadas em no nível de energia livre. Fonte: SPDB-Viewer.

A estrutura do peptídeo pode auxiliar de forma decisiva na descoberta de um potencial agente antibacteriano, favorecendo ou dificultando a interação com a membrana das bactérias, o alvo de ação principal dos peptídeos antibacterianos.

A modelagem por homologia é bastante satisfatória em presumir estruturas 3D de proteínas, pois se baseia em alguns padrões gerais observados em nível molecular, onde a homologia entre sequências de aminoácidos envolve uma semelhança estrutural e funcional, além disso, proteínas homólogas apresentam regiões internas conservadas, mas as regiões das alças, que são regiões mais externas são onde as principais diferenças estruturais entre proteínas homólogas ocorrem (FILHO; ALENCASTRO, 2003). Desta forma os modelos previstos permitem que possa ser feita uma avaliação da possível eficácia dos peptídeos frente à ação antibacteriana.

A modelagem de proteínas está baseada na semelhança entre estruturas primárias de uma proteína-molde e de proteínas homólogas de estruturas 3D conhecidas que trazem consigo uma similaridade estrutural (CHOTIA; LESK, 1986). Deste modo, um

modelo 3D de uma proteína alvo pode ser construído a partir de proteínas que possuem relação de similaridade estrutural (GINALSKI, 2006).

Além da previsão de estrutura secundária e/ou terciária, de ligações de hidrogênio e de ligações dissulfeto, a energia livre após minimização das estruturas também podem ser previstas no programa DeppView Swiss – Pdb Viewr 4.1.0. A presença de ligações de hidrogênio e ligações dissulfeto favorecem uma estabilidade da estrutura formada, e caso na região de estabilidade haja aminoácidos que possibilitem a interação com a membrana, os peptídeos podem ser considerados de boa ação antimicrobiana, já que possuirão sítio de interação sempre estáveis. A tabela 4 apresenta os dados referente a análise das predições estabelecidas, mostrando para cada estrutura possível dos quatro peptídeos o percentual de hélice, folha ou coil (estendida), as possíveis ligações dissulfeto e ligações de hidrogênio. A tabela 5 apresenta os dados referentes a energia livre após a minimização de cada uma das estruturas.

Peptídeo analisado	Estruturas possíveis para os peptídeos	Estrutura prevista (%)			Ligações dissulfeto	Ligações hidrogênio
		HÉLICE	FOLHA	COIL		
PEPTÍDEO 1	Estrutura 1	0	0	100	0	1
	Estrutura 2	0	0	100	0	1
	Estrutura 3	0	0	100	0	4
	Estrutura 4	0	0	100	0	0
	Estrutura 5	0	0	100	0	0
PEPTÍDEO 2	Estrutura 1	0	0	100	0	4
	Estrutura 2	0	0	100	0	3
	Estrutura 3	35,29	0	64,71	0	12
	Estrutura 4	23,52	0	76,48	0	7
	Estrutura 5	23,52	0	76,48	0	8
PEPTÍDEO 3	Estrutura 1	47,36	0	52,64	0	14
	Estrutura 2	63,15	0	36,85	0	16
	Estrutura 3	63,15	0	36,85	0	20
	Estrutura 4	0	0	100	0	6
	Estrutura 5	47,36	0	52,64	0	16
PEPTÍDEO 4	Estrutura 1	61,53	0	38,47	0	21
	Estrutura 2	57,69	0	42,41	0	26
	Estrutura 3	15,38	0	82,64	0	14
	Estrutura 4	42,30	0	57,70	0	15
	Estrutura 5	50	0	50	0	19

Tabela 4. Representação do previsto nas estruturas secundárias para os peptídeos 1, 2, 3 e 4. Fonte: SPDB-Viewer.

Estrutura	Passo	Energia			
		Peptídeo 1	Peptídeo 2	Peptídeo 3	Peptídeo 4
1	1	(-50.649)	(-340.548)	(-692.833)	(-850.919)
	2	(-61.018)	(-358.089)	(-711.202)	(-885.907)
	3	(-67.426)	(-367.778)	(-721.494)	(-904.078)
2	1	(-25.918)	(-415.875)	(-618.090)	(-821.686)
	2	(-35.609)	(-435.741)	(-646.261)	(-850.247)
	3	(-42.837)	(-447.326)	(-666.220)	(-862.990)
3	1	(-12.117)	(-484.517)	(-658.962)	(-613.857)
	2	(-24.586)	(-507.138)	(-689.187)	(-648.372)
	3	(-30.313)	(-519.579)	(-703.566)	(-669.359)
4	1	(-81.043)	(-279.381)	(-486.900)	(-707.257)
	2	(-101.523)	(-328.350)	(-504.666)	(-747.313)
	3	(-111.882)	(-349.336)	(-513.588)	(-772.289)
5	1	(-63.466)	(-368.332)	(-501.939)	(-588.858)
	2	(-87.227)	(-418.503)	(-535.820)	(-637.296)
	3	(-98.882)	(-440.581)	(-548.566)	(-666.553)

Tabela 5. Energia livre após minimização das cinco estruturas de cada um dos quatro peptídeos em KJ/mol.

Uma comparação das estruturas previstas e da energia livre foi realizada com o intuito de identificar a predição mais provável para os peptídeos, visando reconhecer um possível candidato para síntese e posteriores testes junto a cepas bacterianas de interesse médico. As comparações podem ser mais bem visualizadas nos gráficos 1, 2, 3, e 4, construídas a partir da análise dos 3 passos de 100 agitações para minimização da estrutura, da energia livre em KJ/mol e a comparação de cada uma das cinco estruturas previstas como possíveis para os peptídeos.

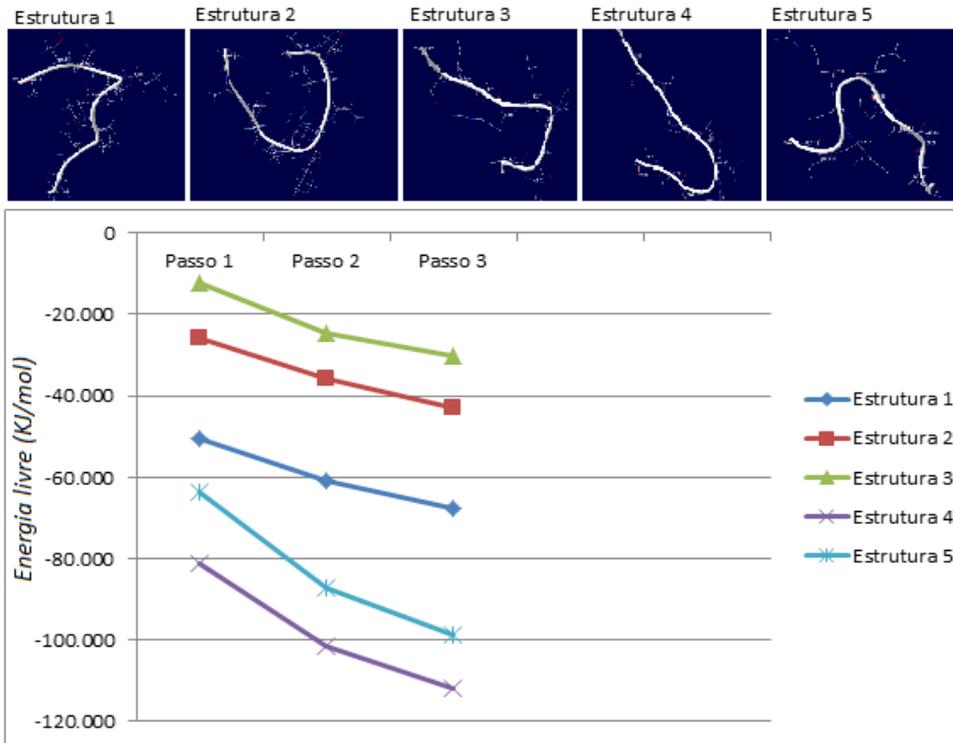


Gráfico 1. Peptídeo 1 analisado visando o reconhecimento da estrutura secundária mais provável seguindo a menor energia livre.

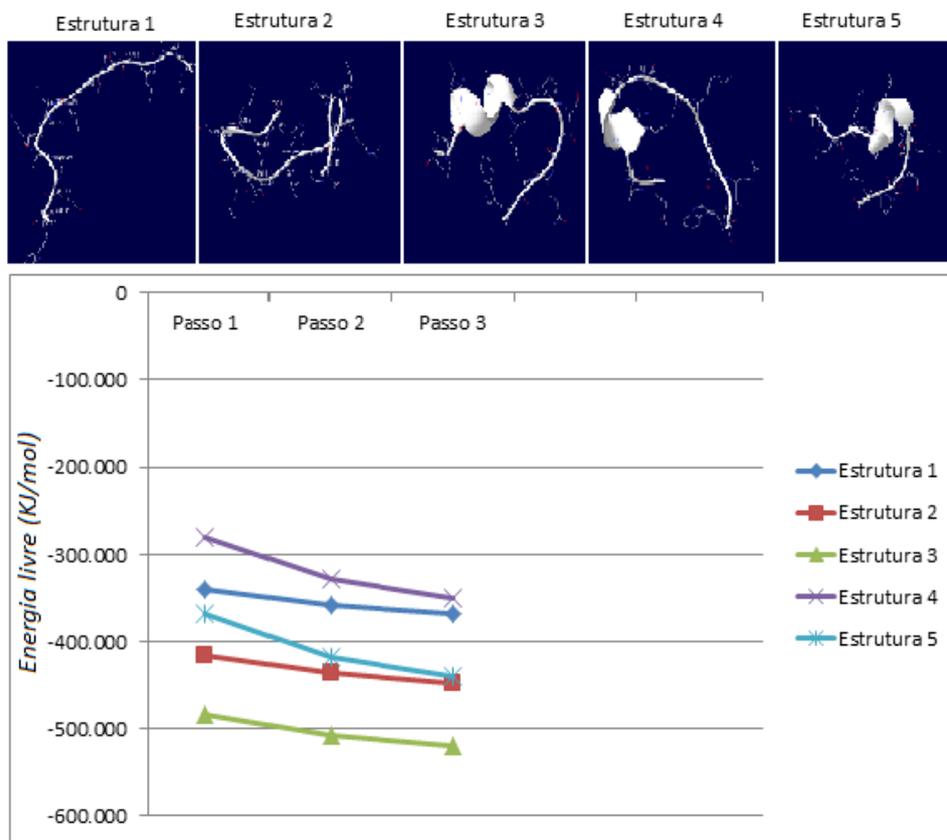


Gráfico 2. Peptídeo 2 analisado visando o reconhecimento da estrutura secundária mais provável seguindo a menor energia livre. A estrutura 3 foi reconhecido como a mais provável.

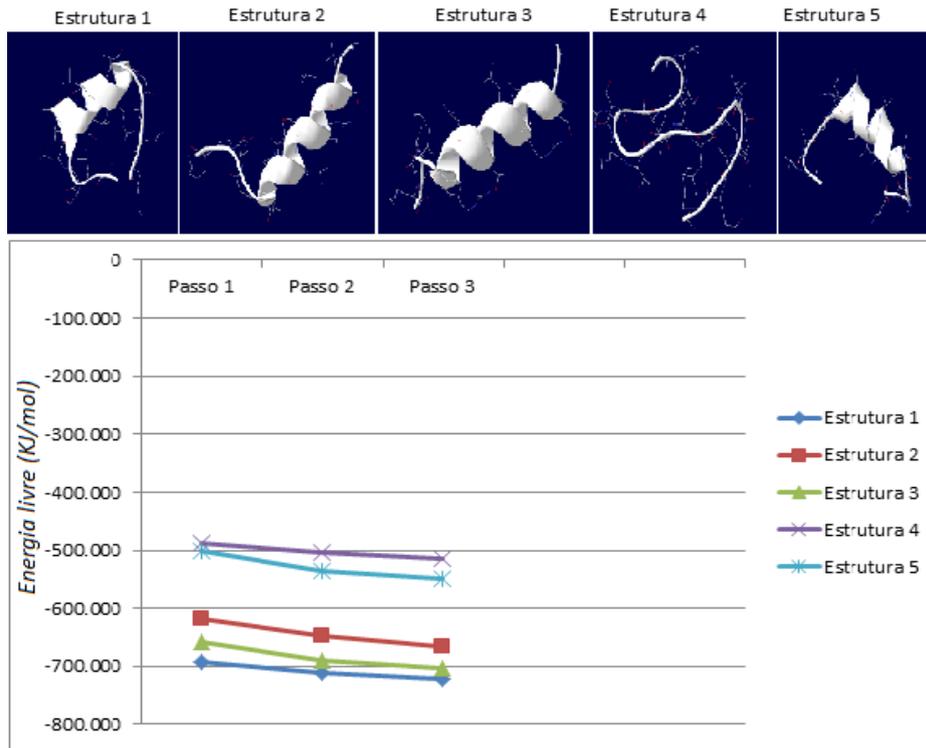


Gráfico 3. Peptídeo 3 analisado visando o reconhecimento da estrutura secundária mais provável seguindo a menor energia livre. A estrutura 1 foi reconhecido como a mais provável.

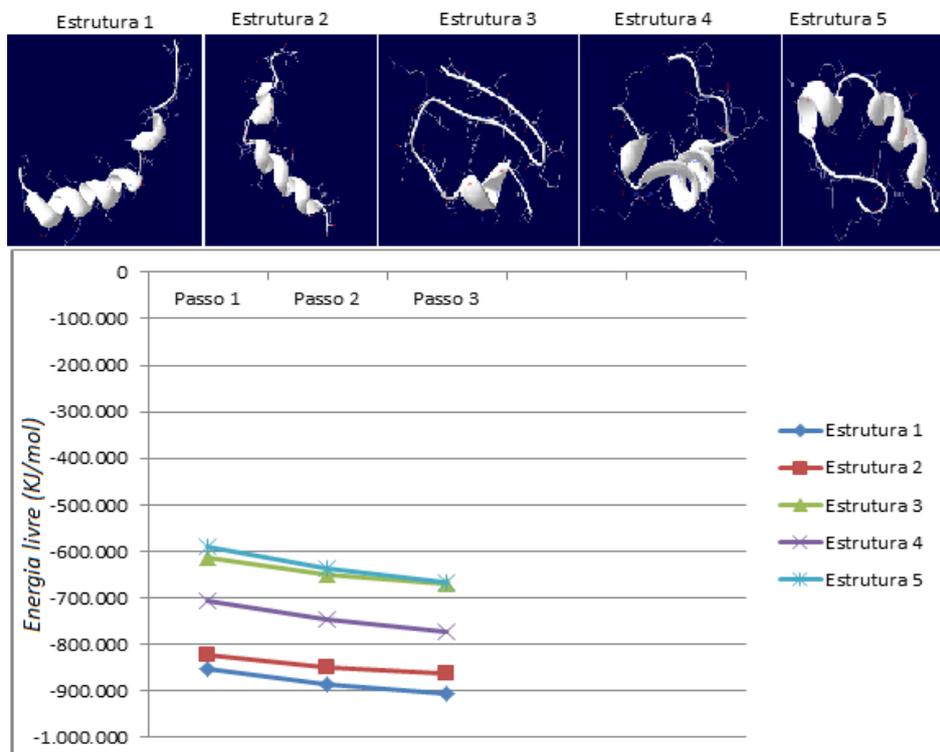


Gráfico 4. Peptídeo 4 analisado visando o reconhecimento da estrutura secundária mais provável seguindo a menor energia livre. A estrutura 1 foi reconhecido como a mais provável.

A análise das energias livres após a minimização das estruturas fornece uma predição do que seria mais provável para o peptídeo. Como a estrutura de uma proteína nativa corresponde ao mínimo global da energia livre, a análise dos dados presentes na tabela 5 permite uma dedução mais provável da estrutura secundária de cada um dos peptídeos.

O peptídeo 1 apresenta-se, mais provavelmente, como o demonstrado na estrutura 4, uma vez que esta possui a menor energia livre após os três passos de minimização (-111.882), desta forma a estrutura provável do peptídeo 1 apresenta uma cadeia estendida (quarto quadrante na figura 33). O peptídeo 2 apresentou a menor energia livre (-519.579) após os três passos de minimização com a estrutura 3 (terceiro quadrante na figura 34), desta forma esse peptídeo deve se apresentar com uma região de alfa-hélice (35,29%) e o restante da molécula com cadeia estendida (64,71%). O peptídeo 3 apresenta a menor energia livre (-721.494), após os três passos de minimização, com a estrutura 1 (primeiro quadrante da figura 35), que se apresenta com 47,36% de alfa-hélice e 52,64% de estrutura estendida. Já o peptídeo 4 apresentou a menor energia livre (-904.078) também com a estrutura 1 (primeiro quadrante na figura 36), totalizando 61,53% de alfa-hélice e 38,47% de estrutura estendida.

Os modelos obtidos apresentaram basicamente estrutura com alfa-hélice e estendida. Nenhum peptídeo apresentou potencial de formação de folha-beta, diferentemente do que havia sido previsto em PSIPRED. Em PSIPRED o peptídeo 1 foi previsto como formador de alfa-hélice e cadeia estendida, já na modelação com base a energia livre a estrutura prevista para o peptídeo 1 foi de cadeia estendida apenas. O peptídeo 2 foi previsto em PSIPRED como formador de cadeia estendida e folha beta, porém na modelação prevista em Bhageerath-H o peptídeo 2 apresentou-se como uma estrutura mais provável com 35,29% de alfa-hélice e 64,71% de estrutura estendida. Os outros dois peptídeos apresentaram, em ambas as predições, uma alternância de alfa-hélice e cadeia estendida. Esses resultados mostram a necessidade de uma avaliação mais precisa da predição de estrutura com métodos que permitam resultados mais precisos, e a validação por meio da homologia de estrutura com avaliação da energia liberada é uma boa opção para previsão antes de uma síntese. A junção de métodos de predição pode fornecer mais confiabilidade no momento da escolha de peptídeos a serem sintetizados.

5.5 Resultados para avaliação de antigenicidade

A análise de antigenicidade também se faz necessário antes da síntese de um peptídeo com fins antibacterianos. Peptídeo que tenham eficácia comprovada contra bactérias diversas, mas que, ao mesmo tempo, sejam capazes de sensibilizar resposta imunológica junto a MHC classe I e classe II e junto a linfócitos B não seriam bons fármacos para uso em humanos, devido a possível rejeição e alergenicidade. Desta forma só se faz racional a produção de peptídeos que tenha possibilidade de uso sem riscos de rejeição aos pacientes.

Visando o reconhecimento desse potencial efeito antigênico e alergênicos a predição de tais efeitos se faz necessária. Um bom resultado é alcançado com uma resposta negativa quanto a predição de antigenicidade, significando ser o peptídeo um agente que não sensibiliza resposta imunológica de rejeição.

5.5.1 Previsão de ligação a MHC classe I e MHC classe II

O trabalho de predição de antigenicidade dos peptídeos junto ao SVMHC permitiu que pudesse ser feita uma análise de cada um dos quatro peptídeos junto aos alelos de MHC de classes I e II, procurando identificar possíveis ligantes. Os resultados são apresentados nas tabelas 6, 7, 8 e 9, e representados pelos gráficos 5, 6, 7 e 8.

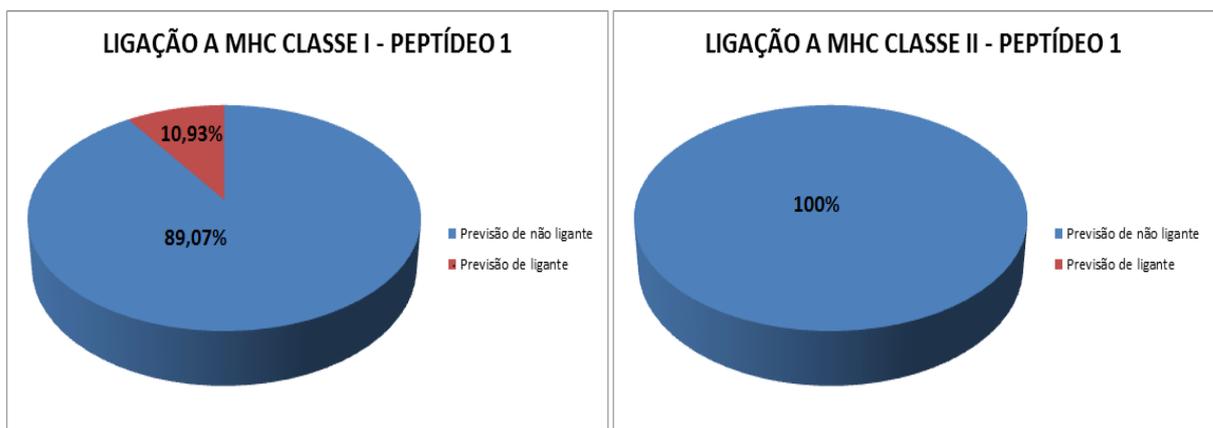


Gráfico 5. Representação do percentual de previsão para ligantes em MHC Classe I e II para o peptídeo 1.

ALELOS MHC CLASSE I	PEPTÍDEO	RESULTADO DA PREDIÇÃO		
A_0201(m)10mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_0201(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_0301(m)10mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_0301(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_1101(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_11(m)10mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_11(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_1(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_2402(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_2(m)10mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_2(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_31(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_3301(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_3(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_6801(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_0702(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_2703(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_2705(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_2706(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_27(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_3501(m)10mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_3501(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_35(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_5101(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_5102(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_5103(m)9mer	AASAAPLRTITA	Posição	Sequência	Score
		4	AAPLRTITA	0.52
		2	ASAAPLRTI	0.49
B_51(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_5301(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_5401(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_7(m)9mer	AASAAPLRTITA	Posição	Sequência	Score
		2	ASAAPLRTI	0.12
B_8(m)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_01(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_0201(s)10mer	AASAAPLRTITA	Posição	Sequência	Score
		3	SAAPLRTITA	0.12
A_0201(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_03(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_03(s)10mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_1101(s)9mer	AASAAPLRTITA	Posição	Sequência	Score
		2	ASAAPLRTI	0.14
A_1101(s)10mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_2402(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_24(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_25(s)10mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_25(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_07(s)9mer	AASAAPLRTITA	Posição	Sequência	Score
		2	ASAAPLRTI	0.29
		3	SAAPLRTIT	0.02
B_08(s)9mer	AASAAPLRTITA	Posição	Sequência	Score
		4	AAPLRTITA	0.02
B_08(s)8mer	AASAAPLRTITA	Posição	Sequência	Score
		4	AAPLRTITA	0.38
B_1501(s)10mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_1501(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_1801(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_1801(s)8mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_2705(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		

B_27(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_27(s)10mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_3501(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_3701(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_40(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_44(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_5101(s)8mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
B_5101(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
Cw_0401(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
H2_Db(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
H2_Kb(s)8mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
H2_Kd(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
H2_Ld(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
H2_Kk(s)8mer	AASAAPLRTITA	Posição	Sequência	Score
		3	SAAPLRTI	0.45
ALELOS MHC CLASSE II	PEPTÍDEO	RESULTADO DA PREDIÇÃO		
A_0201(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0101(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0102(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0301(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0305(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0306(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0307(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0308(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0309(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0311(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
A_0201(s)9mer	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0401(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0402(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0404(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0405(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0408(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0410(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0423(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0426(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0701(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0703(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0801(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0802(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0804(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0806(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0813(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_0817(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1101(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1102(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1104(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1106(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1107(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1114(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1120(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1121(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1128(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1301(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1302(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1304(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1305(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1307(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1311(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1321(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		
DRB1_1322(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante		

DRB1_1323(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante
DRB1_1327(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante
DRB1_1328(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante
DRB1_1501(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante
DRB1_1502(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante
DRB1_1506(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante
DRB1_5_0101(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante
DRB1_5_0105(II)9	AASAAPLRTITA	Previsão de não ligante

Tabela 6. Resultado de predição de antigenicidade para peptídeo 1 em relação ao MHC I e II.

Os resultados para predição de antigenicidade para o peptídeo 1 frente a MHC classe I e MHC classe II mostra que apenas 7 alelos, todos eles de MHC classe I, reconhecem como possíveis ligantes e, conseqüentemente, promoveriam resposta imunológica de rejeição. Desta forma, o peptídeo 1, se mostra como um possível agente antimicrobiano sem grandes riscos de promover sensibilização de MHC de classe I e com ausência de riscos de classe II.

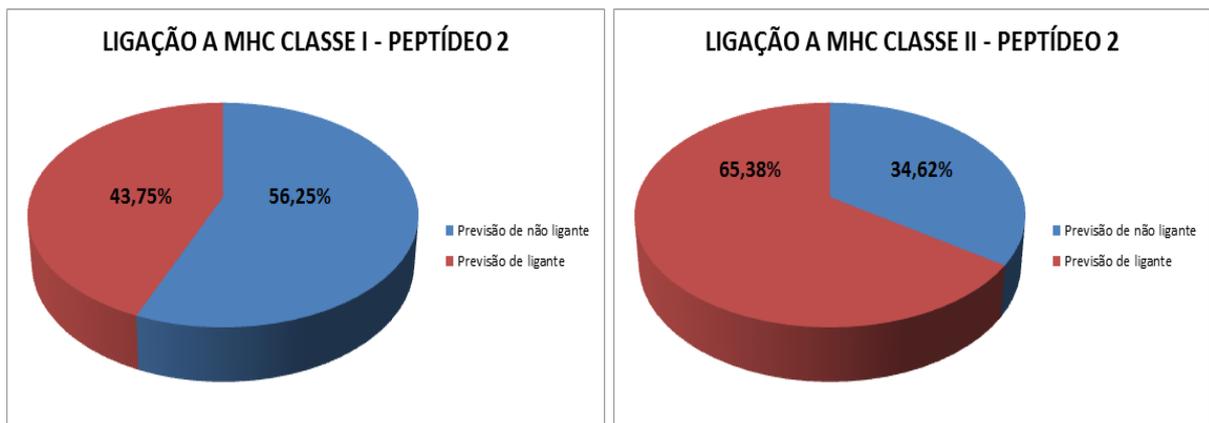


Gráfico 6. Representação do percentual de previsão para ligantes em MHC Classe I e II para o peptídeo 2.

ALELOS MHC CLASSE I	PEPTÍDEO	RESULTADO DA PREDIÇÃO		
A_01(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_0201(s)10mer	EA <u>V</u> LRGQALLV <u>K</u> SSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLVK	0.79
A_0201(s)9mer	EA <u>V</u> LRGQALLV <u>K</u> SSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLV	1.17
A_03(s)9mer	EA <u>V</u> LRGQALLV <u>K</u> SSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	0.38
		3	VLRGQALLV	0.25
A_03(s)10mer	EA <u>V</u> LRGQALLV <u>K</u> SSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLVK	0.51
A_1101(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_1101(s)10mer	EA <u>V</u> LRGQALLV <u>K</u> SSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLVK	0.34
A_2402(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_24(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_25(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_25(s)10mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_07(s)9mer	<u>E</u> A <u>V</u> LRGQALLV <u>K</u> SSQPW	Posição	Sequência	Score

		1	EAVLRGQAL	0.63
		2	AVLRGQALL	0.43
B_08(s)8mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALL	0.14
B_08(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		1	EAVLRGQAL	0.63
		2	AVLRGQALL	0.01
B_1501(s)10mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_1501(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_1801(s)8mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_1801(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_2705(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	0.6
B_27(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	0.29
B_27(s)10mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVKS	0.2
B_3501(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		2	AVLRGQALL	0.22
		1	EAVLRGQAL	0.06
B_3701(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		2	AVLRGQALL	0.1
		1	EAVLRGQAL	0.05
B_40(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_44(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_5101(s)8mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_5101(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
Cw_0401(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
H2_Db(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		2	AVLRGQALL	0.19
H2_Kb(s)8mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
H2_Kd(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
H2_Ld(s)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
H2_Kk(s)8mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_0201(m)10mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_0201(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLV	0.91
		9	LLVKSSQPW	0.07
A_0301(m)10mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLVK	2.11
		8	ALLVKSSQPW	0.12
A_0301(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		8	ALLVKSSQP	0.29
		7	QALLVKSSQ	0.19
		4	LRGQALLVK	0.09
A_1101(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_11(m)10mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_11(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	0.27
A_1(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_2402(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_2(m)10mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_2(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLV	0.55
A_31(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_3301(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
A_3(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	0.76
A_6801(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_0702(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		

B_2703(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	0.33
B_2705(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	0.67
B_2706(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	0.41
B_27(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	0.12
B_3501(m)10mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_3501(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		1	EAVLRGQAL	0.37
B_35(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		1	EAVLRGQAL	1.03
		7	QALLVKSSQ	0.65
B_5101(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		1	EAVLRGQAL	0.41
B_5102(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_5103(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		1	EAVLRGQAL	0.33
		7	QALLVKSSQ	0.16
B_51(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_5301(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_5401(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_7(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
B_8(m)9mer	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
ALELOS MHC-II	PEPTÍDEO	RESULTADO DA PREDIÇÃO		
DRB1_0101(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0102(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0301(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLV	2.7
		4	LRGQALLVK	2.6
DRB1_0305(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0306(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.0
		3	VLRGQALLV	2.2
DRB1_0307(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.0
		3	VLRGQALLV	2.2
DRB1_0308(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.0
		3	VLRGQALLV	2.2
DRB1_0309(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLV	1.7
DRB1_0311(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.0
		3	VLRGQALLV	2.2
DRB1_0401(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0402(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		9	LLVKSSQPW	2.7
DRB1_0404(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0405(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0408(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0410(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0423(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0426(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0701(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLV	3.8
		9	LLVKSSQPW	1.7
DRB1_0703(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLV	3.8

		9	LLVKSSQPW	1.7
DRB1_0801(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0802(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0804(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0806(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		9	LLVKSSQPW	2.4
DRB1_0813(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_0817(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_1101(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	2.4
DRB1_1102(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.3
DRB1_1104(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.4
DRB1_1106(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.4
DRB1_1107(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	2.5
		3	VLRGQALLV	1.7
DRB1_1114(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	2.3
DRB1_1120(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	2.4
DRB1_1121(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.3
DRB1_1128(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	2.5
DRB1_1301(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.4
DRB1_1302(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	2.4
DRB1_1304(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	2.6
		9	LLVKSSQPW	1.7
DRB1_1305(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	2.5
DRB1_1307(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Previsão de não ligante		
DRB1_1311(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.4
DRB1_1321(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	1.7
DRB1_1322(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.3
DRB1_1323(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	2.3
DRB1_1327(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.4
DRB1_1328(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.4
DRB1_1501(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLV	3.9
DRB1_1502(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	4	LRGQALLVK	2.0
		Posição	Sequência	Score

		3	VLRGQALLV	2.9
DRB1_1506(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		3	VLRGQALLV	3.9
		4	LRGQALLVK	2.0
DRB1_5_0101(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	Posição	Sequência	Score
		4	LRGQALLVK	3.0
		Posição	Sequência	Score
DRB1_5_0105(II)9	EAVLRGQALLVKSSQPW	4	LRGQALLVK	3.0

Tabela 7. Resultado de predição de antigenicidade do peptídeo 2 para o MHC I e II.

Os resultados para predição de antigenicidade para o peptídeo 2 frente a MHC classe I e MHC classe II mostra que existem 28 possibilidades de reconhecimento de segmentos do peptídeo como epítipo por MHC classe I e 34 possibilidades de reconhecimento de segmentos do peptídeo como epítipo por MHC classe II. Nesse caso julga-se que há grande possibilidade de desencadeamento de resposta imunológica de rejeição junto à sensibilidade de MHC, sendo assim, o uso do peptídeo 2 em terapia antimicrobiana deve ser avaliado por meio de compatibilidade de MHC.

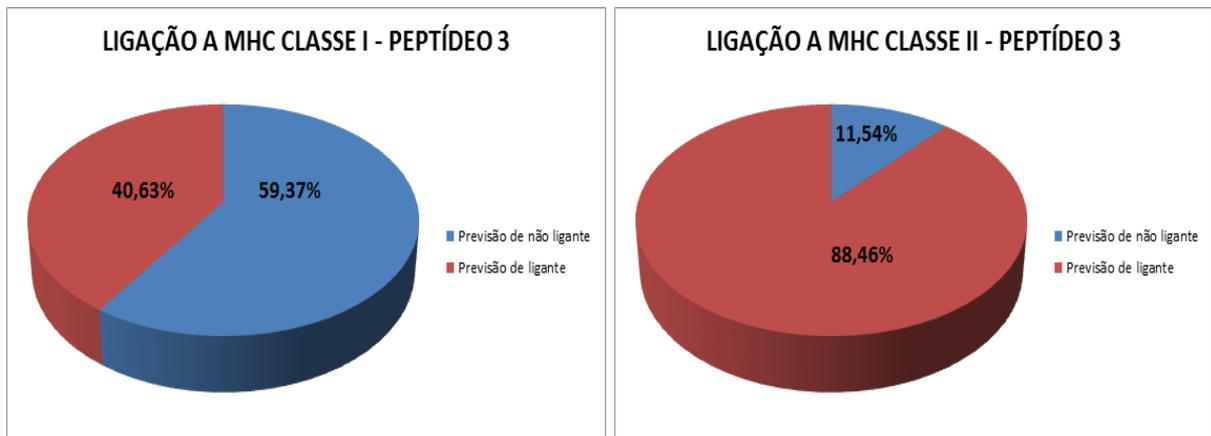


Gráfico 7. Representação do percentual de previsão para ligantes em MHC Classe I e II para o peptídeo 3

ALELOS MHC CLASSE I	PEPTÍDEO	RESULTADO DA PREDIÇÃO		
A_01(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_0201(s)10mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		1	AVSGLRSLTT	0.57
		2	VSGLRSLTTL	0.43
A_0201(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		9	TLLLRALGAQ	0.06
		7	SLTLLRAL	0.53
A_03(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		4	GLRSLTLL	0.47
		11	LLRALGAQK	0.78
A_03(s)10mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		2	VSGLRSLTTL	0.46
		4	GLRSLTLLR	0.1
		9	TLLLRALGAQ	0.04

A_1101(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_1101(s)10mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_2402(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_24(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_25(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_25(s)10mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_07(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		7	SLTLLRAL	0.33
		3	SGLRSLTTL	0.06
B_08(s)8mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLL	0.1
B_08(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		3	SGLRSLTTL	0.37
		4	GLRSLTLL	0.18
B_1501(s)10mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_1501(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_1801(s)8mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_1801(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		7	SLTLLRAL	0.12
B_2705(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	0.39
B_27(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	0.51
B_27(s)10mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_3501(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_3701(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_40(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_44(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_5101(s)8mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_5101(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
Cw_0401(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
H2_Db(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
H2_Kb(s)8mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
H2_Kd(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		7	SLTLLRAL	0.03
H2_Ld(s)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		7	SLTLLRAL	0.07
H2_Kk(s)8mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_0201(m)10mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_0201(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		4	GLRSLTLL	0.84
		7	SLTLLRAL	0.02
A_0301(m)10mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		10	TLLRALGAQK	1.07
		4	GLRSLTLLR	0.31
		9	TLLRALGAQ	0.19
A_0301(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		11	LLRALGAQK	0.13
A_1101(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_11(m)10mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_11(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		11	LLRALGAQK	0.46
A_1(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_2402(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_2(m)10mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_2(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		7	SLTLLRAL	0.47
		4	GLRSLTLL	0.38
A_31(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
A_3301(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score

		11	LLRALGAQK	0.5
		4	GLRSLTLL	0.08
A_3(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		11	LLRALGAQK	0.84
		5	LRLSTLLR	0.04
A_6801(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		11	LLRALGAQK	0.11
B_0702(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_2703(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	0.32
B_2705(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	0.39
B_2706(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	0.26
B_27(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	0.1
B_3501(m)10mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_3501(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_35(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_5101(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_5102(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_5103(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		3	SGLRSLTTL	0.23
B_51(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_5301(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_5401(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
B_7(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		4	GLRSLTLL	0.25
		1	AVSGLRSLT	0.08
B_8(m)9mer	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
ALELOS MHC CLASSE II		PEPTÍDEO		RESULTADO DE PREDIÇÃO
DRB1_0101(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
DRB1_0102(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
DRB1_0301(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	3.9
DRB1_0305(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
DRB1_0306(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	2.9
DRB1_0307(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	2.9
DRB1_0308(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	2.9
DRB1_0309(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	2.9
DRB1_0311(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	2.9
DRB1_0401(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	3.8
DRB1_0402(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	3.7
DRB1_0404(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	4.6
DRB1_0405(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	3.6
DRB1_0408(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	3.6
DRB1_0410(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRLSTLLR	4.6
		2	VSGLRSLTT	1.9
DRB1_0423(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score

		5	LRSLTLLR	4.6
DRB1_0426(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	3.8
DRB1_0701(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	1.92
DRB1_0703(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	1.92
DRB1_0801(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
DRB1_0802(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Previsão de não ligante		
DRB1_0804(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	2.6
DRB1_0806(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	2.6
		8	LTLLRALG	2.0
DRB1_0813(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	2.2
DRB1_0817(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	3.4
DRB1_1101(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	3.8
DRB1_1102(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	3.0
DRB1_1104(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	4.8
DRB1_1106(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	4.8
DRB1_1107(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	2.4
DRB1_1114(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	2.0
DRB1_1120(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	3.5
DRB1_1121(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	3.0
DRB1_1128(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	5.3
DRB1_1301(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	4.5
		8	LTLLRALG	1.8
DRB1_1302(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	3.5
DRB1_1304(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	3.0
		8	LTLLRALG	1.7
DRB1_1305(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	5.3
DRB1_1307(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	2.0
DRB1_1311(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	4.8
DRB1_1321(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	3.8
DRB1_1322(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	3.0
DRB1_1323(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	2.0
DRB1_1327(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	4.5
		8	LTLLRALG	1.8
DRB1_1328(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score

		5	LRSLTLLR	4.5
		8	LTLLRALG	1.8
DRB1_1501(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	3.76
		2	VSGLRSLTT	2.7
DRB1_1502(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	2.76
		2	VSGLRSLTT	1.7
DRB1_1506(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	3.76
		2	VSGLRSLTT	2.7
DRB1_5_0101(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	4.3
		11	LLRALGAQK	3.1
DRB1_5_0105(II)9	AVSGLRSLTLLRALGAQK	Posição	Sequence	Score
		5	LRSLTLLR	4.3
		11	LLRALGAQK	3.1

Tabela 8. Resultado de predição de antigenicidade do peptídeo 3 para o MHC I e II.

Os resultados para predição de antigenicidade para o peptídeo 3 frente a MHC classe I e MHC classe II mostra que existem 26 possibilidades de reconhecimento de segmentos do peptídeo como epítipo por MHC classe I e 46 possibilidades de reconhecimento de segmentos do peptídeo como epítipo por MHC classe II. Nesse caso julga-se que há grande possibilidade de desencadeamento de resposta imunológica de rejeição junto à sensibilidade de MHC, principalmente MHC classe II, desta forma, o uso do peptídeo 3 em terapia antimicrobiana deve ser avaliado por meio de compatibilidade de MHC.

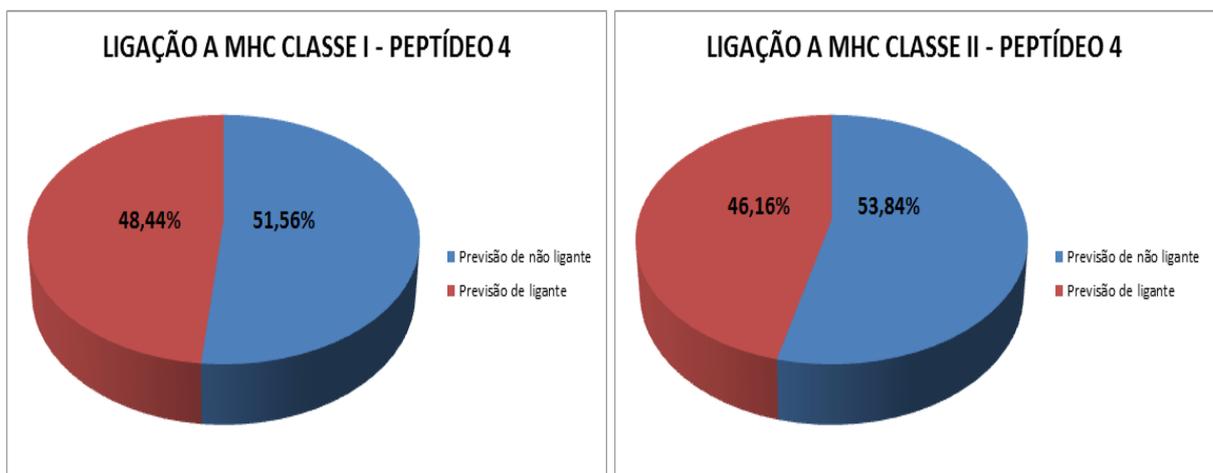


Gráfico 8. Representação do percentual de previsão para ligantes em MHC Classe I e II para o peptídeo 4.

ALELOS MHC CLASSE I	PEPTÍDEO	RESULTADO DE PREDIÇÃO		
A_0201(m)10mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_0201(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		5	GLRSLTLL	0.84
		8	SLTLLRAL	0.02
A_0301(m)10mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		11	TLLRALGAQK	1.07
		5	GLRSLTLLR	0.31
		10	TLLRALGAQ	0.19
A_0301(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	12	LLRALGAQKE	0.06
		Posição	Sequence	Score
A_1101(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_11(m)10mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_11(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		12	LLRALGAQK	0.46
A_1(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_2402(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_2(m)10mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_2(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		8	SLTLLRAL	0.47
		5	GLRSLTLL	0.38
A_31(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_3301(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		12	LLRALGAQK	0.5
		5	GLRSLTLL	0.08
A_3(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		12	LLRALGAQK	0.84
		6	LRSLTLLR	0.04
A_6801(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		12	LLRALGAQK	0.11
B_0702(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_2703(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	0.32
B_2705(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		13	LRALGAQKE	0.63
		6	LRSLTLLR	0.39
B_2706(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		13	LRALGAQKE	0.4
		6	LRSLTLLR	0.26
B_27(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	0.1
		13	LRALGAQKE	0.1
B_3501(m)10mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_3501(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		1	KAVSGLRSL	0.25
B_35(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		1	KAVSGLRSL	0.42
		17	GAQKEAISP	0.14
B_5101(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		1	KAVSGLRSL	0.22
B_5102(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_5103(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		4	SGLRSLTLL	0.23
B_51(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_5301(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_5401(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_7(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		5	GLRSLTLL	0.25
		2	AVSGLRSLT	0.08

B_8(m)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_01(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_0201(s)10mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		2	AVSGLRSLTT	0.57
		3	VSGLRSLTTL	0.43
		10	TLLRALGAQ	0.06
A_0201(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		8	SLTLLRAL	0.53
		5	GLRSLTLL	0.47
A_03(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
A_03(s)10mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	12	LLRALGAQK	0.78
		Posição	Sequence	Score
		3	VSGLRSLTTL	0.46
		5	GLRSLTLLR	0.1
10	TLLRALGAQ	0.04		
A_1101(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_1101(s)10mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_2402(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_24(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_25(s)10mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
A_25(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_07(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		1	KAVSGLRSL	0.4
		8	SLTLLRAL	0.33
		4	SGLRSLTTL	0.06
B_08(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		4	SGLRSLTTL	0.37
		5	GLRSLTLL	0.18
B_08(s)8mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLLTLL	0.1
		16	LGAQKEAI	0.05
B_1501(s)10mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_1501(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_1801(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		8	SLTLLRAL	0.12
B_1801(s)8mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_2705(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		13	LRALGAQKE	0.52
		6	LRSLLTLLR	0.39
B_27(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		13	LRALGAQKE	0.52
		6	LRSLLTLLR	0.51
B_27(s)10mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_3501(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_3701(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_40(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_44(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_5101(s)8mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
B_5101(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
Cw_0401(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
H2_Db(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		1	KAVSGLRSL	0.42
H2_Kb(s)8mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
H2_Kd(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		8	SLTLLRAL	0.03
H2_Ld(s)9mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		8	SLTLLRAL	0.07
H2_Kk(s)8mer	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
ALELOS MHC CLASSE II	PEPTÍDEO	RESULTADO DE PREDIÇÃO		
DRB1_0101(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		

DRB1_0102(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
DRB1_0301(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	3.9
		13	LRALGAQKE	1.8
DRB1_0305(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
DRB1_0306(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	2.9
DRB1_0307(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	2.9
DRB1_0308(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	2.9
DRB1_0309(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	2.9
DRB1_0311(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	2.9
DRB1_0401(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	3.8
DRB1_0402(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	3.7
DRB1_0404(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	4.6
DRB1_0405(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	3.6
		13	LRALGAQKE	3.3
DRB1_0408(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	3.6
DRB1_0410(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	4.6
		13	LRALGAQKE	4.3
		3	VSGLRSLTT	1.9
DRB1_0423(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	4.6
DRB1_0426(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	3.8
DRB1_0701(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	1.92
DRB1_0703(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	1.92
DRB1_0801(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		13	LRALGAQKE	2.0
DRB1_0802(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Previsão de não ligante		
DRB1_0804(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	2.6
DRB1_0806(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		13	LRALGAQKE	3.0
		6	LRSLTLLR	2.6
DRB1_0813(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		9	LTLLRALG	2.0
DRB1_0817(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	2.2
DRB1_1101(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	3.4
		13	LRALGAQKE	2.1
DRB1_1102(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	3.8
DRB1_1104(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	3.0
DRB1_1104(II)9	KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP	Posição	Sequence	Score
		6	LRSLTLLR	4.8

Tabela 9. Resultado de predição de antigenicidade do peptídeo para o MHC I e II.

Os resultados para predição de antigenicidade para o peptídeo 4 frente a MHC classe I e MHC classe II mostram que existem 31 possibilidades de reconhecimento de segmentos do peptídeo como epítopo por MHC classe I e 24 possibilidades de reconhecimento de segmentos do peptídeo como epítopo por MHC classe II. Nesse caso, julga-se que há grande possibilidade de desencadeamento de resposta imunológica de rejeição junto à sensibilidade de MHC, sendo assim, o uso do peptídeo 4 em terapia antimicrobiana deve ser avaliado por meio de compatibilidade de MHC.

O gráfico 9 apresenta os resultados compactados para a predição de ligação a MHC classes I e II para os peptídeos avaliados.

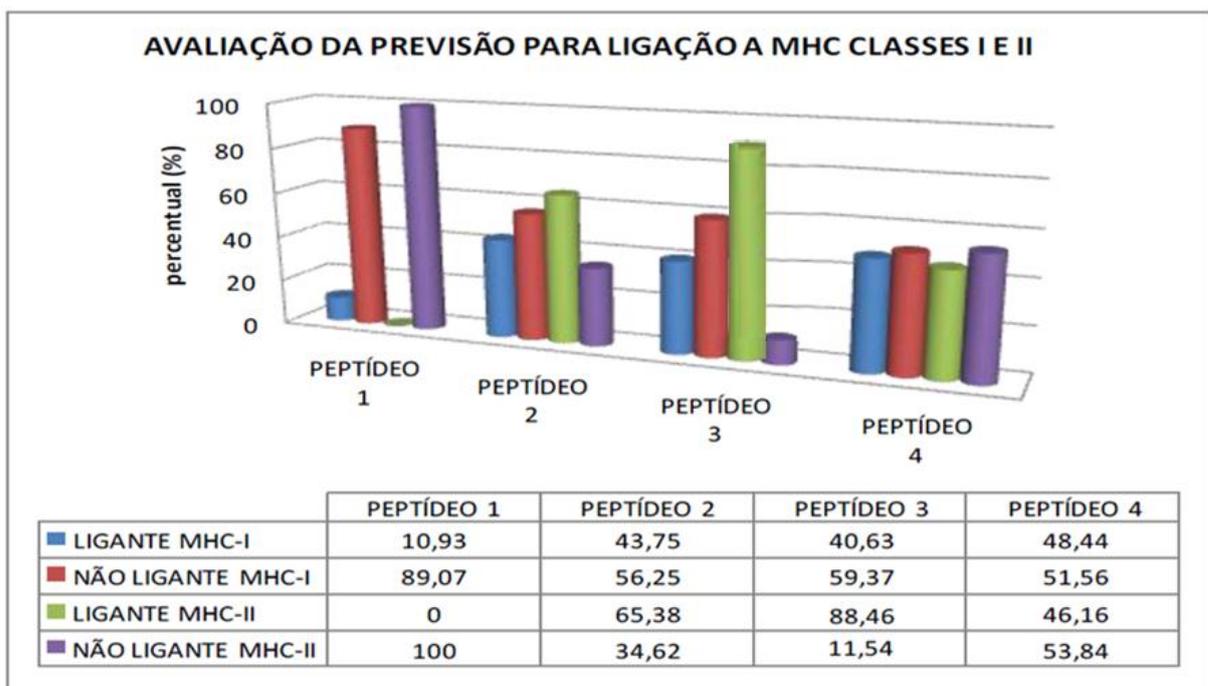


Gráfico 9. Comparação dos percentuais de predição para ligante ou não ligante a MHC classe I e II.

Para que um peptídeo tenha um bom resultado como agente antimicrobiano, a não ligação com MHC seria um fator positivo, uma vez que dessa forma não haveria estímulo de resposta imunológica que pudesse neutralizar rapidamente tais peptídeos.

Os resultados de predição de antigenicidade sugerem que o peptídeo 1 seria o mais provável candidato a síntese e eventuais testes pois, a partir da predição estabelecida, ele deve ser incapaz de ligação a MHC-II e tem baixa capacidade de ligação a MHC-I. Em seguida, o peptídeo 3 seria o mais favorável, pois, apesar de

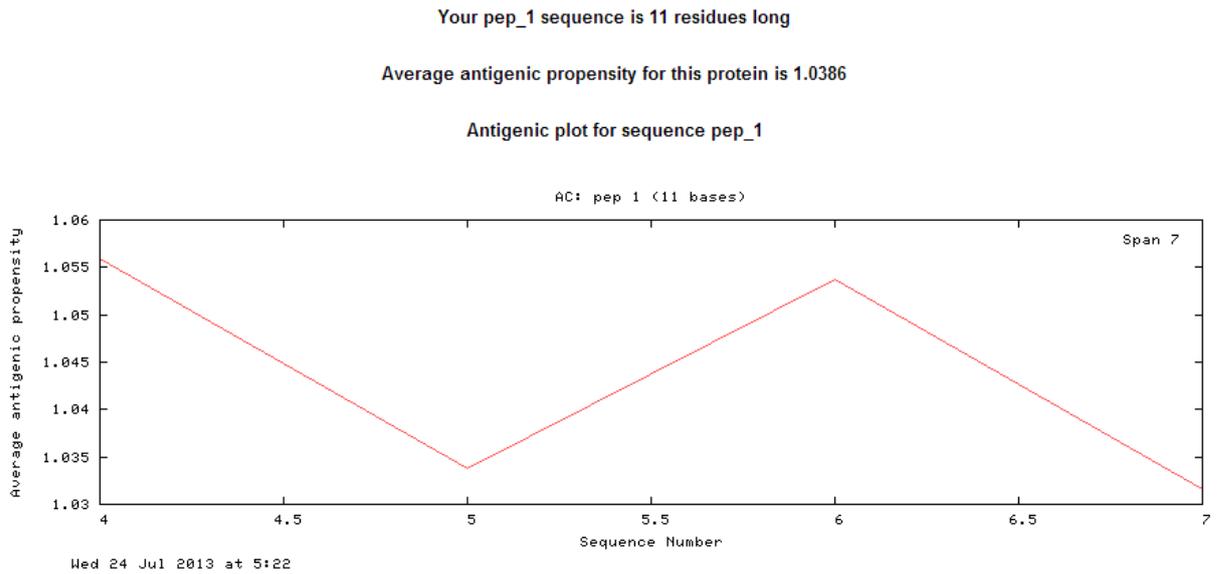
apresentar uma predição elevada de ligação a MHC-I a chance de ligação a MHC-II foi prevista como reduzida. Os peptídeos 2 e 4 apresentaram os piores resultados quanto a predição de ligação a MHC.

5.5.2 Delimitação de epítomos de células B

Para predição de antigenicidade foi usado o programa *PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES*. Esse programa prevê quais segmentos dentro de uma proteína ou peptídeo são suscetíveis a indução de uma resposta através da síntese de anticorpos. O programa pode ser acessado em < <http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>>.

Os peptídeos antigênicos são determinados usando o método de Kolaskar e Tongaonkar (1990). As previsões são feitas com base em uma tabela que reflete a presença de resíduos de aminoácidos reconhecidos como epítomos em segmentos experimentais. Os segmentos são notificados como antigênicos apenas se apresentarem um tamanho mínimo de 8 resíduos. A precisão do método relatada é de cerca de 75%. (Disponível em < <http://imed.med.ucm.es>>, acessado em 24/07/13).

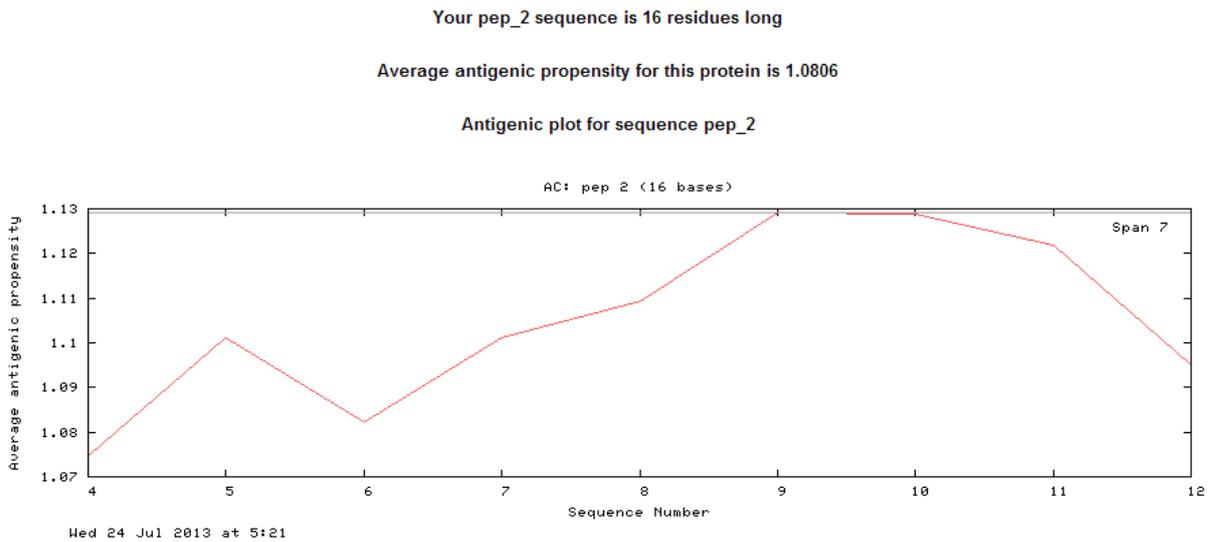
Os resultados para a predição de epítomos imunogênicos são apresentados nos gráficos 10, 11, 12, e 13, que mostram as sequencias com potencial para estimular a síntese de anticorpos.



There are 0 antigenic determinants in your sequence:

n	Start Position	Sequence	End Position
---	----------------	----------	--------------

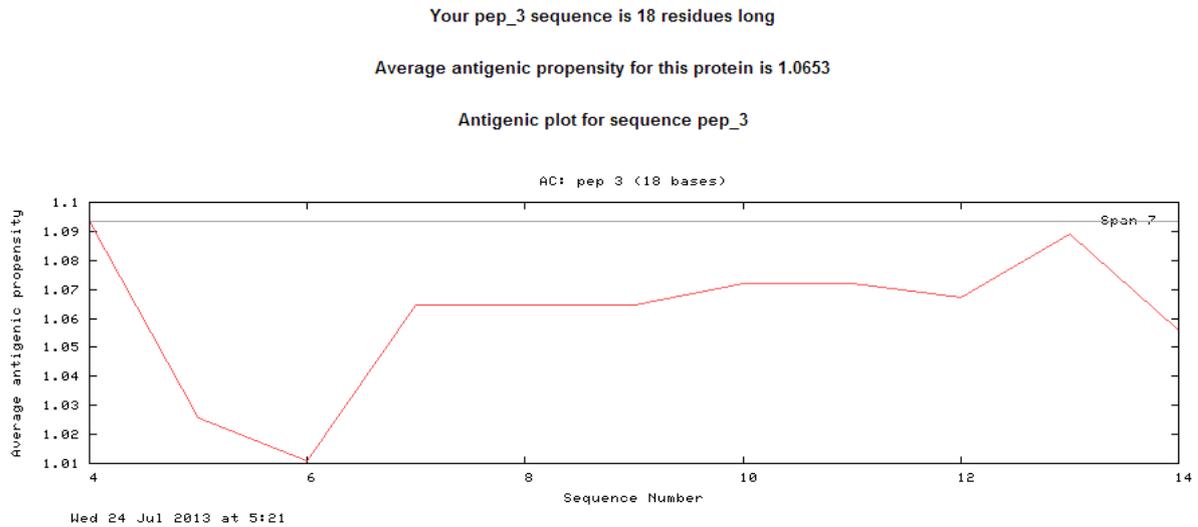
Gráfico 10. Previsão de antigenicidade para o peptídeo 1 (Fonte:Predicted Antigenic Peptides).



There are 1 antigenic determinants in your sequence:

n	Start Position	Sequence	End Position
1	4	LRGQALLVK	12

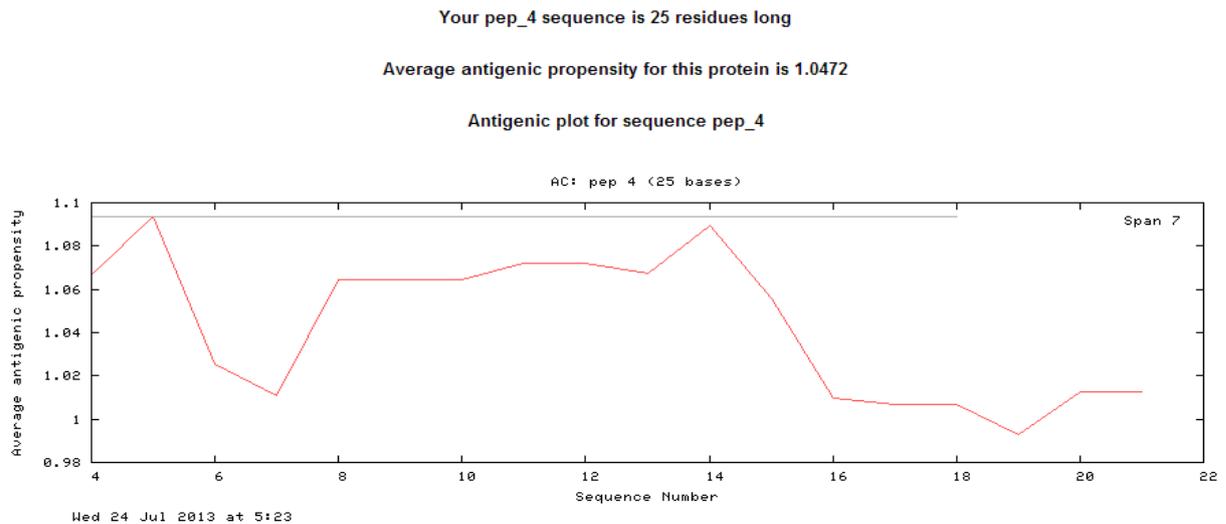
Gráfico 11. Previsão de antigenicidade para o peptídeo 2 (Fonte:Predicted Antigenic Peptides).



There are 1 antigenic determinants in your sequence:

n	Start Position	Sequence	End Position
1	4	GLRSLTLLRA	14

Gráfico 12. Previsão de antigenicidade para o peptídeo 3 (Fonte:Predicted Antigenic Peptides).



There are 1 antigenic determinants in your sequence:

n	Start Position	Sequence	End Position
1	4	SGLRSLTLLRALGA	18

Gráfico 13. Previsão de antigenicidade para o peptídeo 4 (Fonte:Predicted Antigenic Peptides).

Pela observação das previsões de antigenicidade para estimular a produção de anticorpos por linfócitos B, dos quatro peptídeos analisados, pode-se reconhecer uma tendência a ação antigênica para os peptídeos 2, 3 e 4. O peptídeo 1 não apresentaria, segundo a predição, epítomos para estímulo a produção de anticorpos por linfócito B, sendo assim, seria um potencial peptídeo de ação antimicrobiana que

não desencadearia resposta imunológica com linfócitos B para produção de anticorpos.

5.5.3 Previsão para alergenicidade

Procurando reconhecer um possível efeito alergênico dos peptídeos analisados, uma vez que a resposta alérgica poderia ser uma restrição ao uso de tais peptídeos em possíveis terapias, foi feita a predição desse parâmetro usando o servidor *AlgPred: Prediction of Allergenic Proteins and Mapping of IgE Epitopes*, disponível em <www.imtech.res.in/raghava/algpred/>.

A página disponível na internet sugere que a previsão de proteínas alergênicas está se tornando muito importante, principalmente devido ao uso de proteínas modificadas em alimentos, como em alimentos geneticamente modificados, e em terapêutica e bio-farmacêutica, com o uso dos peptídeos antibacterianos, entre outras aplicações. A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização para Alimentação e Agricultura (FAO) perceberam a importância da previsão e propuseram diretrizes para avaliar o potencial de alergenicidade de proteínas. No passado, inúmeras abordagens e métodos foram desenvolvidos para prever alérgenos, cada um com seus próprios méritos e deméritos. E AlgPred foi feita uma tentativa sistemática para integrar várias abordagens, a fim de prever proteínas alergênicas com elevada precisão.

As sequências foram submetidas à predição. O módulo SVM, baseado na composição de aminoácidos, foi a escolha de abordagem para predição, e os resultados estão representados a seguir, nas figuras 36, 37, 38 e 39.

Score= -0.2792306 [Threshold= -0.4]
Positive Predictive Value= 47.13%
Negative Predictive Value= 89.71%
Resultado: Alérgeno

Figura 36. Predição de alergenicidade para o peptídeo 1.

Score= -0.71832283 [Threshold= -0.4]
Positive Predictive Value= 22.82%
Negative Predictive Value= 92.94%
Resultado: Não é alérgeno

Figura 37. Predição de alergenicidade para o peptídeo 2.

Score= -0.61637417 [Threshold= -0.4]
Positive Predictive Value= 22.82%
Negative Predictive Value= 92.94%
Resultado: Não é alérgeno

Figura 38. Predição de alergenicidade para o peptídeo 3.

Score= -1.1946312 [Threshold= -0.4]
Positive Predictive Value= 15.19%
Negative Predictive Value= 94.18%
Resultado: Não é alérgeno

Figura 39. Predição de alergenicidade para o peptídeo 4.

A predição de alergenicidade apresentou resultados satisfatórios para os peptídeos 2, 3 e 4, porém, o peptídeo 1 foi reconhecido com potencial alérgeno, o que leva a uma necessidade de melhor avaliação para o uso, caso seja um peptídeo sintetizado e utilizado como agente antimicrobiano.

6 CONCLUSÃO

Pretendemos com esse trabalho gerar uma rota teórica para o desenvolvimento de um método eficiente que condicionasse a síntese racional de peptídeos antibacterianos. E para isso, testamos alguns parâmetros que consideramos importantes e ou tivemos possibilidade de acesso. Começamos o trabalho com a fragmentação *in silico* da eritropoetina humana o qual gerou 337 peptídeos. Após as análises de parâmetros antimicrobianos, foram selecionados quatro fragmentos, identificados por peptídeo 1 (AASAAPLRTITA), peptídeo 2 (EAVLRGQALLVKSSQPW), peptídeo 3 (AVSGLRSLTLLRALGAQK) e peptídeo 4 (KAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPP) que passaram por análises de estabilidade, antigenicidade e alergenicidade. Dentre os quatro peptídeos que demonstraram boas propriedades antibacterianas os que apresentaram melhores resultados foram os peptídeos 1 e 3, sendo que, em uma eventual escolha para síntese e posteriores testes estes seriam os dois peptídeos sugeridos, de acordo com o observado nos resultados das predições realizadas.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos da predição *in silico* fornecem muitos indícios de que os peptídeos obtidos da fragmentação de proteínas, como neste caso a EPO, podem ser moléculas de efeito antimicrobiano, criando muitas perspectivas de uso em substituição aos antibióticos atualmente usados, porém, para que o efeito seja realmente oficializado e os peptídeos possam ser vistos como potenciais fármacos, testes *in vitro*, usando cepas bacterianas devem ser realizados visando comprovação de eficácia, bem como testes de citotoxicidade se fazem necessários para avaliação da possível utilização de tais fármacos (caso sejam identificados com tal) em diversos pacientes, humanos ou não humanos. O uso deve ser avaliado como possível antimicrobiano de uso oral, uso tópico, uso injetável, entre outras possibilidades.

Desta forma, sugere-se, em oportunidades futuras, a validação de testes que possibilitem um próximo passo na busca da eficácia dos peptídeos obtidos da fragmentação de EPO, ou outros tipos de peptídeos obtidos de outras moléculas, realizando então a síntese de peptídeos e os devidos testes de mortalidade bacteriana e citotoxicidade. Além disso, estudos a respeito da farmacocinética e farmacodinâmica precisam ser feitos.

8 REFERÊNCIAS

- ABENSUR, H. Reações adversas associadas à eritropoetina. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, São Paulo, v. 22, supl. 5, p. 39-41, jan./mar. 2000.
- ANFINSEN, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181, 223.
- ANDEU, D.; Merrifield, R.B.; Steiner, H.; Boman, H.G. Solid-phase synthesis of cecropin A and related peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 6475-6479.
- ANDREU, D.; Rivas, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, 1998, 47, 415-443.
- ALANIS A.J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Mes Res*. 2005, 36, 697-705.
- ANDERSSON D. I., HUGHES D. (2010) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* 8:260-71.
- BERTECHINI, A.G. *Nutrição de monogástricos*. Lavras: UFLA/FAEPE, 2003. 341p. Bio-Manguinhos / FIOCRUZ. Eritropoetina humana recombinante: monografia do produto. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/monografia_epo.pdf>. Acesso em: 15 agosto 2013.
- BENGHEZAL M, ADAM E, LUCAS A, BURN C, ORCHARD MG, DEUSCHEL C, VALENTINO E, BRAILLARD S, PACCAUD JP, COSSON P 2007. Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. *Cell Microbiol* 9: 1336-1342.
- BENKO-ISEPPON, A.M.; GALDINO, S.L.; CALSA, T., JR.; KIDO, E.A.; BELARMINO, L.C.; CROVELLA, S. Overview on plant antimicrobial peptides. *Curr Protein Pept Sci*, v.11, n.3, p.181-8, May 1 2010.
- BECHINGER, B. (1999). "The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v.1462, n.1-2, p.157-183.
- BECHINGER, B. (2004). "Structure and function of membrane-lytic peptides". *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.23, n.3, p.271-292.
- BECHINGER, B. e LOHNER, K. (2006). "Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v.1758, n.9, p.1529-1539.
- BIER, O. *Morfologia Bacteriana*. In: *Microbiologia e Imunologia*. V. 1, 30ª ed, c. 2, p. 17-42. São Paulo, Comp. Melhoramentos de São Paulo, 1994.
- BLONDELLE SE AND HOUGHTEN RAS (1996). *Trends Biotechnol.* 14:60-65.

BOMAN HG, Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine* 2003; 254: 197–215.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N.º 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o Registro de Produtos Biológicos novos e produtos biológicos e das outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 17 de dezembro de 2010a. Seção 1, n. 241, p. 110-113.

BRAUSTEIN, A.; PAPO, N.; SHAI, Y. In vitro activity and potency of an intravenously injected antimicrobial peptide and its DL amino acid analog in mice infected with bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, 48, 3127-3129.

BROGDEN, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?". *Nature Reviews Microbiology*, v.3, n.3, p.238-250.

BROWN, K.L., AND HADCOCK, R.E.W., Cationic Host Defense (Antimicrobial) Peptides, *Current Opinion in Immunology*, v.206, n.2, p.143 – 149, 2006.

BULET, P.; C. HETRU, J. L. DIMARCO, D. HOFFMANN. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol.* 23:329-44, 1999.

CALVILLO, L. et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proceedings of the National Academy of Science*, Washington, v. 100, n. 8, p. 4802-4806, apr. 2003. doi: 10.1073/pnas.0630444100

CALIXTO C.M.F e CAVALHEIRO E.T.G, Penicilina: Efeito do Acaso e Momento Histórico no Desenvolvimento Científico. *Química Nova na Escola*, Vol. 34, Nº 3, p. 118-123, AGOSTO 2012

CASTRO, M.S.; CILI, E.M.; FONTES, W. Directed evolution applied to the production of alpha-helix forming antimicrobial peptide analogues. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2006, 7:473-478.

Chan, W. C. e White, P. D. "Fmoc solid phase peptide synthesis". Oxford University Press; New York, 2000.

CUNHA, B. Antibiotic resistance: control strategies. *Critical Care Clinics*, v. 14, n. 2, p.309 – 27, 1998

DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833, 2001.

DAVIES, J, DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microb Mol Bio Ver.* v.74, n.3, p.417-433, 2010.

DELVES, P.J.; ROITT, D. The Immune System – First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343:37-50.

DIAS, M. e MONTEIRO M.S., ANTIBIÓTICOS E RESISTÊNCIA BACTERIANA, VELHAS QUESTÕES, NOVOS DESAFIOS. Cadernos Otorrinolaringologia . CLÍNICA, INVESTIGAÇÃO E INOVAÇÃO, dezembro 2010.

DIAS, M., MONTEIRO, M. S. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, Novos Desafios. Cadernos Otorrinolaringologia. Clínica Investigação e Inovação, Lisboa, p. 1-11, 2010.

DÖNNES, P.; KOHLBACHER, O. SVMHC: a server for prediction of MHC-binding peptides. Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, Web Server issue doi:10.1093/nar/gkl284.

DUVAL, E.; ZATYLN, C.; LAURENCIN, M.; A cationic peptide designed to exert antibacterial activity. Peptides, 2009, 30, 1608-1612.

EBRAHIM G. J. J. (2010) Bacterial resistance to antimicrobials. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 56:141-3.

ELLIOTT, S.; PHAM, E.; MACDOUGALL, I. C. Erythropoietins: A common mechanism of action. Experimental Hematology, Philadelphia, v. 36, n. 12, p. 1573-1584, dec. 2008. doi: 10.1016/j.exphem.2008.08.003.

FANDRY, J. Erythropoietin receptors on tumor cells: what do they mean. The Oncologist, Durham, v. 13, suppl. 3, p. 16-20, jan. 2008. doi: 10.1634/theoncologist.13-S3-16

FARIS, P.M; RITTER , M.A; ABELS, R.I. The effects of recombinant human erythropoietin on perioperative transfusion requirements in patients having major orthopedic operation. The American Erythropoietin Study Group. Journal of Bone and Joint Surgery, Boston, v. 78, n. 1, p. 62-72, jan. 1996.

FARDELONE, I.C; BRANCHI, B.A. O setor de biofarmacos e as oportunidades para o Brasil. Revista da FAE, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 29-38, out. 2006.

FISHER , J. W. et al. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. British Journal of Haematology, Oxford, v. 95, n. 1, p. 27-32, oct. 1996. doi: 10.1046/j.1365-2141.1996.d01 -1864.x

FLEMING, A. Penicilina e suas aplicações práticas. São Paulo: Progresso, 1947.

FREITAS, C.I.A. ESTUDO SOBRE A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE SUBSTÂNCIAS EXTRA IDAS E PURIFICADAS DE SECREÇÕES DA PELE DE ANFÍBIOS; Tese para obtenção do título de doutor em farmacologia; Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, 2003.

FRIED, W. The liver as a source of extrarenal erythropoietin production. Blood, Washington, v. 40, n. 5, p.671-677, nov. 1972.

FRIED, W. Erythropoietin and erythropoiesis. *Experimental Hematology*. Netherlands, v. 37, n. 9, p.1007-1015, sep. 2009. doi: 10.1016/j.exphem.2009.05.010

GALLO, R.L.; MURAKAMI, M.; OHTAKE, T.; ZAIYOU, . Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.110, n.6, p.823-31, Dec 2002.

GARRET, R.H. AND GRISHAM, C.H., *Biochemistry, International Edition*, Saunders College Publishing.

GARCIA.OLMEDO F, RODRIGUESPALENZUELA P, MOLINA A, ALAMILLO JM, LÓPEZ-SOLANILLA E, BERROCAL-LOBO M AND POZACARRI ÓN C (2001). *FEBS Letters*. 498: 219-222.

GE, Y.; MacDONALD, D.; HENRY, M.M. In vitro susceptibility to pexiganan of bacteria isolated from infected diabetic foot lcers. *Diagn. Microbiol. Infected, Dis.*, 1999.

GERMAIN RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994; 76:287-99.

GOODMAN, L.S. e GILMAN, A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

GREENSTEIN, J.P., WINITZ, M.; *Chemistry of the amino acids*, volume II, Krieger Publishing Compay, 1961.

GUTTE, B.; *Peptides: Synthesis, Structure, and Applications*, Academic Press: New York, 1995.

HANCOCK, R.E.W.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defense. *Trends in Microbiology* 8: 402-410, 2000.

HANCOCK, R. E. W. e SCOTT, M. G. (2000)."The role of antimicrobial peptides in animal defenses". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.97, n.16, p.8856-8861, 2000.

HARA T.; KODAMA, H.; KONDO; M.; WAKAMATSU, K.; TAKEDA, A.; TACHI T.; MATSUZAKI, K. Effects of peptide dimerization on pore formation: Antiparallel disulfide-dimerized magainin 2 analogue. *Biopolymers* 58:437-446, 2001.

HIRATA, a. et al. Erythropoietin just before reperfusion reduces both lethal arrhythmias and infarct size via the phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway in canine hearts. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, Norwell, v. 19, n. 1, p. 33-40, jan. 2005. doi: 10.1007/s10557-005-6895-1

HOEFEL R, VIDOTTI CCF, MENEZES ES, PINHEIRO S 2006. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. *Bol Farmacot* 11: 1-4.

HONG SY, OH JE, KWON MY, CHOI MJ, LEE JH, LEE BL, MOON HM AND LEE KH. *Antimicrob. Agent Chemotherapy* 42: 2534-2541, 1998.

HOUGHTEN RA, PINILLA C, BLONDELLE SE, APPLEL JR, DOOLEY CT AND CUERVO JH (1991). *Nature* 354: 84-86.

HOFFMAN, J.A.; KAFATOS, F.C.; JANEWAY, C.A.; EZEKOWITZ, R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284:1313-1318, 2000.

HOLLUM, J.R., *Fundamentals of General, Organic and Biological Chemistry*, Fifth Edition, John Wiley & Sons, 1994.

JACOBSON, L.O. et al. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature*, London, v. 179, n. 4560, p. 633-634, mar. 1957. doi:10.1038/179633a0

JASON KINDRACHUK, A.N.A.R.E.W.H. Host Defence Peptides: Bridging Antimicrobial and Immunomodulatory Activities. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*, v.5, p. 175-216, 2010.

JENSSEN, H.; HAMILL, P. e HANCOCK, R. E. W. (2006). "Peptide antimicrobial agents". *Clinical microbiology reviews*, v.19, n.3, p.491-511.

JERALA, R.; PORRO, M. Endotoxin neutralizing peptides. *Curr, Top. Ed. Chem*, 2004, 4, 1173 – 1184.

JONES, S.R., KINNEY, W.A., ZANG, X., JONES, L.M., SELINSKY, B.S. The synthesis and characterization of analogs of the antimicrobial compound squalamine: 6-hydroxy-3aminoserols synthesized from hydroxycholic acid. *Steroids*, v.61, p.565-71, 1996.

KAUSHANSKY, K; KIPPS, T. Hematopoietic agents: growth Factors, minerals and vitamins. In: Brunton , L.L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L. Goodman and Gilman´s *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11. ed. New York: McGraw-Hill, 2005. p. 1433-1465.

KAMYSZ, W. Are antimicrobial peptides na alternative for conventional antibiotics?

KIM A.B. ANTIMICROBIAL PEPTIDES: PORE FORMERS OR METABOLIC INHIBITORS IN BACTERIA? *Nature Review*. MARCH 2005 | VOLUME 3

KLEIN J, SATO A. The HLA System. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343:702-9.

KLEVENS, E.R. et al. Burden of Healthcare- Associated Infections in the United States, 2002. *Pub Rep* 2007;122:160-6.

KO, L.; *Ann. Thorac. Surg.* 2002, 73, 1185.

KOMATSUZAWA, H.; OUHARA, K.; KAWAI, T.; YAMADA, S.; FUJIWARA, T.; SHIBA, H.; KURIHARA, H.; TAUBMAN, M.A.; SUGAI, M. Susceptibility of

periodontopathogenic and cariogenic bacteria to defensins and potential therapeutic use of defensins in oral diseases. *Curr. Pharm. Des.*; 2007, 13, 3084-3095.

KOURY, S.T. et al. The use of in situ hybridization to study erythropoietin gene expression in murine kidney and liver. *Microscopy Research and Technique*, New York, v. 25, n.1 p. 29-29, may 1993. doi: 10.1002/jemt.1070250106

LANDON, C.; SODANO, P.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.; PTAK M. Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. *Protein Science* 6: 1878-1884, 1997.

LATA, S.; SHARMA, B.K.; RAGHAVA, G.P.S.; Analysis and prediction of antibacterial peptides, *BMC Bioinformatics* 2007, 8:263 doi:10.1186/1471-2105-8-263.

LEVY, S.B. The challenge of antibiotic resistance. *Sci. Amer.*, v. 278, p. 32 – 9, 1998.

RAVAT F., LE-FLOCH R., VINSONNEAU C., AINAUD P., BERTIN-MAGHIT M., CARLIN H., PERRO G. (2010) Antibiotics and the burn patient. *SFETB .Burns*. 5: 20510-518.

LIVEMORE, D.M. The need for new antibiotics. *Clin. Microbiol. Infect*, 2004, 10, 19.

LOHNER, K. The role of membrane lipid composition in cell targeting of antimicrobial peptides. In *.Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies*. Lohner, K. (ed), Horizon Scientific Press, England pp 149-165, 2001.

LOHNER, K.; STAUDEGGER, E. Are we on the threshold of the post-antibiotic era? In *.Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies*. Lohner, K. (ed), Horizon Scientific Press, England, pp 1-15, 2001.

LOHNER, K.; PRENNER, E.J. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimic systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1462, 141-156.

MACDOUGALL, I.C. et. al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and subcutaneous continuous erythropoietin receptor activator (C.E.R.A.) in patients with chronic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, Washington, v. 1, n. 6, p. 1211–1215, nov. 2006. doi: 10.2215/CJN.00730306

MANNIS, A.K.; The use of antimicrobial peptides in ophthalmology: an experimental study in corneal preservation and the management of bacterial keratitis. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, 2002, 100, 243-271.

MANGONI, M.L.; Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. *Cell. Mol. Life Sci*, 2006, 63(9), 1060-1069.

MARTINS, P., Estudo da interação entre alumínio e aminoácidos que compõem soluções de nutrição parenteral. Dissertação de mestrado, UFSM, 2000.

MATZUZAKI, K.; HARADA, M.; FUNAKOSHI, S.; FUJII, N.; MIYAJIMA, M. Physicochemical determinants for the interactions of magainins 1 and 2 with acidic lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, 1063, 162-170.

MATZUZAKI, K.; SUGISHITA, K.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry*, 1995, 34 (10), 3423-3429.

MATZUZAKI, K.; MURASE, O.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. Na antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry*, 1996, 35(35), 11361-11368.

MATZUZAKI, K.; Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, 1376, 391-400.

MATZUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interaction utilized for self-defense? Magainins and Tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1462, 1-10.

MATZUZAKI, K.; SUGISHITA, K.; MIYAJIMA, K. Interactions of an antimicrobial peptide, Magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative bacteria. *FEBS Lett.*, 1999, 449, 221-224.

MATZUZAKI, K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, 1788, 1687-1692.

MATTE, U. Histórico de Fatos Relevantes em Genética 1859-1999. Texto incluído em 21/07/1999. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/bioetica/crogen.htm>>. Acesso em: 15 agosto 2013.

MEDZHITOV, R. JANEWAY, C.A.Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343:338-44.

MEDZHITOV R.; PRESTON-HURLBURT, P; JANEWAY C.A.Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-7.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A. e BARREIRO, E.J. A importância da síntese de fármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 3, p. 17-22, 2011.

MIAMANO, T.; KITAKAZE, M. New therapeutic application of erythropoietin against ischemic heart diseases. *Journal of Pharmacological Sciences, Kyoto*, v. 101, n.2, p. 179 -181, jun., 2006.

MIMS, C.A., PLAYFAIR, J.H., ROITT, I.M., WAKELIN, D., WILLIAMS, R. *Microbiologia médica*. São Paulo: Manole, 1995, p.18-38.

MIRANDA, M.T.M.; Tese de Livre Docência, Universidade de São Paulo, Brasil, 2000.

MOTTA WT. Bioquímica básica. p.32

MULLER, K. R, et al. An introduction to kernel-based learning algorithms. IEEE Trans. Neural Netw. v.12, p.181–201, 2001.

NETO M.V.P.; ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA REJEIÇÃO AGUDA AO ALOENXERTO RENAL; Medicina On line - Revista Virtual de Medicina, 1999, Vol. 1, Nº 5, Ano II.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger princípios de bioquímica. 5.ed. Porto Alegre: Artmed – Sarvier, 2011. 1274p.

NUNES, J.I. Nutrição animal básica. 2.ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998. 387p.

OLIVEIRA, A.C.; SILVA R.S.; 2008. Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. Rev Elet Enferm 10: 189-197.

OREN, Z.; HONG, J.; SHAI, Y. A repertoire of novel antibacterial diastereomeric peptides with selective cytolytic activity. J. Biol. Chem., 1997, 272, 14643-14649.

OREN, Z.; HONG, J.; SHAI, Y. A comparative study on the structure and function of a cytolytic alpha-helical peptide and its antimicrobial beta-sheet diastereomer. Eur. J. Biochem., 1999, 259, 260-369.

OTVOS, L.Jr: Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. J Peptide Sci 2005, 11:697-706.

PAPO N. & SHAI, Y. New lytic peptides based on the DL-amphipathic heix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. Biochemistry. V. 42, p. 9346-9354, 2003.

PARK, S.C.; PARK, Y.; HAHM, K.S. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12, 5971-5992.

PENBERTHY, W.T.; CHARI, S.; COLE, A.L.; COLE, A.M. Retrocyclins and their activity against HIV-1. Cell. Mol. Life Sci.; 2011, 68, 128 – 186.

POWERS, J.P.; HANCOCK, R.E. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. Peptides, v.24, n.11, p.1681-91. 2003.

PRUTCHI-SAGIV, S. et al. Erythropoietin treatment in advanced multiple myeloma is associated with improved immunological functions: could it be beneficial in early disease? British Journal of Haematology, Oxford, v. 135, n. 5, p. 660-672, dec. 2006. doi: 10.1111/j.1365- 2141.2006.06366.x

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versalite. Clin. Microbiol. Rev., 2007, 20, 440-458.

RAVAT F., LE-FLOCH R., VINSONNEAU C., AINAUD P., BERTIN-MAGHIT M., CARLIN H., PERRO G. (2010) Antibiotics and the burn patient. *SFETB .Burns*. 5: 20510-518.

RESENDE, J. M.; MORAES, C. M.; PRATES, M. V.; CESAR, A.; ALMEIDA, F. C. L.; MUNDIM, N.; VALENTE, A. P.; BEMQUERER, M. P.; PILÓ-VELOSO, D. e BECHINGER, B. (2008)."Solution NMR structures of the antimicrobial peptides phylloseptin-1,-2, and-3 and biological activity: the role of charges and hydrogen bonding interactions in stabilizing helix conformations". *Peptides*, v.29, n.10, p.1633-1644.

YERDERY, A.T.; GELLATLY, S.L.; HANCOCK, R.E.; Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, 68(13), 2161-2176.

RESNICK, N.M.; MALOY, W.L.; ZASLOFF, M. A novel endopeptidase from *Xenopus* that recognizes alpha-helical secondary structure. *Cell*, 191, 66, 541-554.

RIBATTI, D. et al. Erythropoietin/erythropoietin receptor system is involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Histopathology*, Oxford, v. 50, n.5, p. 591–596, apr., 2007. doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02654.x

RIZZO, J.D. et al. Erythropoietin: a paradigm for the development of practice guidelines. *Hematology/ The Education Program of the American Society of Hematology*, Washington, v. 2001, n. 1, p. 10-30, jan. 2001. doi:10.1182/asheducation-2001.1.10

ROZEK A.; FRIEDRICH, C.L.; HANCOCK, R.E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* 39:15765-15774, 2000.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, DB. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. 2005, São Paulo: Ed. Atheneu.

ROTEM, S. & MOR, A. Antimicrobial peptide mimics for improved therapeutic properties. *Biochimica et biophysica acta*. V. 1788(8), p. 1582-1592, 2009.

SAAG, M.S. et al. Once-weekly epoetin alfa improves quality of life and increases hemoglobin in anemic HIV+ patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*, New York, v. 20, n. 10, p. 1037-1045, oct. 2004. doi: 10.1089/aid.2004.20.1037

PIHLASALO, S.; AURANEN, L., HÄNNINEN, P. and HÄRMÄ, H. Method for Estimation of Protein Isoelectric Point. *Anal. Chem.* 2012, 84, 8253–8258.

SCHERAGA, H.A. (1992) Some approaches to the multiple-minima problem in the calculation of polypeptide and protein structures. *Int. J. Quantum Chem.*, 42, 1529-1536.

SCHERAGA, H.A. (1996) Recent developments in the theory of protein folding: searching for the global energy minimum. *Biophys. Chem.*, 59, 329–339.

SCHNEIDER, D.; STEPHENS, R.M.: Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Research* 1990, 18:6097-6100.

SCHIMDT, C.A. et al. Avaliação da atividade e caracterização de Eritropoetina humana recombinante em produtos farmacêuticos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, Sao Paulo, v. 47, n. 2, p. 183- 189, abr. 2003. doi: 10.1590/S0004-27302003000200012

SILVESTRO, L.; GUPTA, K.; WEISER, J.N.; AXELSEN, P.H. The concertation-dependent membrane activity of cecropin A. *Biochemistry*, 1997, 36, 11457-11460.

SOLKOWSKY, M.; WASSERMAN, R.; BRAU, N. Once Weekly recombinant human erythropoietin (epoetin alfa) facilitates optimal ribavirin (RBV) doping in hepatitis C virus-infected patients receiving interferon alfa 20b (IFN/RBV therapy). In: THE HEPATITIS single topic Conference, June, 2001, Chicago, Illinois.

SOARES, E.E.O.; Setor de biotecnologia. Mesa redonda: bionegócios. In: Simposio Nacional de Bioprocessos , 15., 2005, Recife. Anais.. Recife: UFPE, 2005.

STEINER, H.; ANDREU, D.; MERRIFIELD, R.B. Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects. *Biochim Biophys Acta* 1988; 939: 260–6.

STRYJEWSKI M. E., COREY G. R. (2009) New treatments for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Crit Care*. 15:403-12.

STURNIOLO T., BONO, E., DING, J., RADDRIZZANI, L., TUERECI, O., SAHIN, U., BRAXENTHALER, M., GALLAZZI, F., PROTTI, M.P., SINIGAGLIA, F., MARTELO, J. Geração de tecido-específica e bancos de dados promíscuas HLA ligante utilizando microarrays de DNA e matrizes virtuais HLA de classe II. *NAT. Biotechnol.* de 1999;17 . :555-561

TRABI, M.; SCHIRRA, H.J.; CRAIK, D.J.T. Three-dimensional structure of RTD- 1, a cyclic antimicrobial defensin from Rhesus macaque leukocytes. *Biochemistry*, 2001: 4211-4221, 2001.

TRABULSI, L. R., et al. Morfologia e estrutura da célula bacteriana. In: *Microbiologia*. V. 1, 2ª ed., c.1, p. 3-11. Livraria Atheneu Editora, São Paulo – Rio de Janeiro, 1991.

TORTORA, G. J., FUNKE R. B., CASE C. L. (2005) *Microbiologia*. Editora Atheneu, São Paulo, 6ª edição.

UniProtKB, disponível em <http://www.uniprot.org/uniprot/P01588#section_comments>, acesso em 15/08/13.

VAPNIK, V. *The Nature of Statistical Learning Theory*. 2ª Edição. Springer, 1995.

VASQUEZ, M., NEMETHY, G. and SCHERAGA, H.A. (1994) Conformational energy calculations on polypeptides and proteins. *Chem. Rev.*, 94, 2183.

VILEGAS, M.V. LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J.N. LOPEZ, J.A. QUIN, J.P. the Colobian Nosocomial Resistance Studi Group First identification of *Peudomonas aeruginosas* isolates producing a KPC-type carbanem-hydrolozing Electamase. *Antimicrob. Agentes Chemother.*; 2007, 51, 1553 +- 1555.

WALSH, G., 1999, *Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology*, 1ª edição, Chichester, John Wiley & Sons.

WANG J, SOISSON SM, YOUNG K, SHOOP W, KODALI S, GALGOCI A, PAINTER R, PARTHASARATHY G, TANG YS, CUMMINGS R, HaS, DORSO K, MOTYL M, JAYASURIYA H, ONDEYKA J, HERATH K, ZHANG C, HERNANDEZ L, ALLOCCO J, BASILIO A, TORMO JR, GENILLOUD O, VICENTE F, PELAEZ F, COLWELL L, LEE SH, MICHAEL B, FELCETTO T, GILL C, SILVER LL, HERMES JD, BARTIZAL K, BARRETT J, SCHMATZ D, BECKER JW, CULLY D, SINGH SB 2008. Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature* 441: 358-361.

WANNMACHER L 2004. Uso indiscriminado de antibiótico e resistência microbiana: Uma guerra perdida? *URM: Temas Seleccionados* 1: 1-6.

WEISS, M. J. New Insights into erythropoietin and Epoetin Alfa: mechanisms of action, target tissues, and clinical applications. *The Oncologist*, Dayton, v. 8, suppl. 3, p. 18-29, dec. 2003. doi:10.1634/theoncologist.8-suppl_3-18

YANG, W.S. et al. Darbepoetin alfa suppresses tumor necrosis factor- α -induced endothelin-1 production through antioxidant action in human aortic endothelial cells: Role of sialic acid residues. *Free Radical Biology & Medicine*, Oxford, v. 50, n. 10, p. 1242-1251, may 2011. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.02.005

YEAMAN, MR.; YOUNT, NY: Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 2003, 55:27-55.

ZANJANI , E. D. et al. Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *The Journal of Clinical Investigation*, New Haven, v. 67, n. 4, p. 1183-1188, apr. 1981. doi: 10.1172/JCI1110133

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicelular organisms. *Nat.* v. 415, p.389-395, 2002.

ANEXOS

Anexo 1 – Resultado dos cortes realizados em Protein Cuter

Enzima: Tripsina (após KR)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Comprimento	Hydropathicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP R	3347.8653	3350.1433	31	0,9871	0,6129	7,0004
31, 37, 41, 81, 104, 131, 138, 159, 167, 171, 178, 190, 194	R	174.1117	174.2029	1	-4,5000	0,0000	10,3400
32	LICDSR	705.3479	705.8336	6	0,3333	0,3333	6,0347
38	VLQR	514.3227	514.6258	4	0,0000	0,5000	10,3400
42	YLLEAK	735.4167	735.8788	6	0,1167	0,5000	6,2037
47, 73, 80, 125, 144, 168, 180, 182	K	146.1055	146.1894	1	-3,9000	0,0000	9,3700
48	EAENITTGCA EHCSLNENNI TVPDTK	2802.2436	2804.0228	26	-0,7154	0,1923	3,9712
74	VNFYAWK	926.4650	927.0707	7	-0,1143	0,5714	9,1878
82	MEVGQQAVEV WQGLALLSEA VLR	2525.3311	2526.9408	23	0,4913	0,3913	3,9680
105	GQALLVNSSQ PWEPLQLHVD K	2358.2332	2359.6682	21	-0,4190	0,4286	5,2297
126	AVSGLR	601.3547	601.7040	6	0,6833	0,3333	10,3400
132	SLTTLLR	802.4912	802.9698	7	0,6714	0,4286	10,3400
139	ALGAQK	586.3438	586.6894	6	-0,0667	0,1667	9,3700
145	EAISPPDAAS AAPLR	1464.7572	1465.6269	15	-0,0400	0,3333	4,1860
160	TITADTFR	923.4712	924.0218	8	-0,1250	0,2500	6,1478
169	LFR	434.2641	434.5390	3	0,7000	0,6667	10,3400
172	VYSNFLR	897.4708	898.0298	7	0,1000	0,5714	9,3276
179	GK	203.1270	203.2414	2	-2,1500	0,0000	9,3700
181	LK	259.1896	259.3489	2	-0,0500	0,5000	9,3700
183	LYTGEACR	911.4171	912.0347	8	-0,2875	0,2500	6,0918
191	TGDR	447.2078	447.4486	4	-2,2750	0,0000	6,1478

Enzima: Arg-c (após R)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP R	3347.8653	3350.1433	31	0,9871	0,6129	7,0004
32	LICDSR	705.3479	705.8336	6	0,3333	0,3333	6,0347
38	VLQR	514.3227	514.6258	4	0,0000	0,5000	10,3400
42	YLLEAKEAEN ITTGCAEHCS LNENNITVPD TKVNFYAWKR	4584.2053	4587.1294	40	-0,5800	0,3000	4,7555
82	MEVGQQAVEV WQGLALLSEA VLR	2525.3311	2526.9408	23	0,4913	0,3913	3,9680
105	GQALLVNSSQ PWEPLQLHVD KAVSGLR	2941.5773	2943.3570	27	-0,1741	0,4074	7,1244
132	SLTTLLR	802.4912	802.9698	7	0,6714	0,4286	10,3400
139	ALGAQKEAIS PPDAASAAPL R	2033.0905	2034.3010	21	-0,0476	0,2857	6,2922
160	TITADTFR	923.4712	924.0218	8	-0,1250	0,2500	6,1478
168	KLFR	562.3591	562.7132	4	-0,4500	0,5000	11,5112
172	VYSNFLR	897.4708	898.0298	7	0,1000	0,5714	9,3276
179	GKCLKLYTGEA CR	1337.7125	1338.5944	12	-0,5583	0,2500	9,3060
191	TGDR	447.2078	447.4486	4	-2,2750	0,0000	6,1478

Enzima: Asp-N (antes de BD)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP RLIC	3677.0426	3679.6071	34	1,2176	0,6176	6,9201
35	DSRVLQRYLL EAKEAENITT GCAEHCSLNE NNITVP	4029.9524	4032.4834	36	-0,5167	0,2778	4,3884
71	DTKVNIFYAWK RMEVGQQAVE VWQGLALLSE AVLRGQALLV NSSQPWEPLQ LHV	6031.1570	6034.9419	53	-0,0660	0,4151	5,4462
124	DKAVSGLRSL TLLLRALGAQ KEAISPP	2791.5919	2793.2610	27	-0,0074	0,3333	10,5250
151	DAASAAPLRT ITA	1256.6724	1257.4099	13	0,4231	0,2308	6,1478
164	DTRKLFYRVY SNFLRGKLLK YTGEACRTG	3438.8346	3441.0219	29	-0,5103	0,3448	10,6657
193	DR	289.1386	289.2916	2	-4,0000	0,0000	6,1478

Enzima: Asp-N_Ambic (antes de DE)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Comprimento	Hydropathicity	NPS	Isoel.point
1	MGVH	442.1998	442.5396	4	0,6250	0,2500	7,1211
5	ECPAWLWLLL SLLSLPLGLP VLGAPPRLIC	3252.8534	3255.0827	30	1,2967	0,6667	6,0183
35	DSRVLQRYLL	1261.7142	1262.4753	10	-0,2500	0,5000	9,3253
45, 48, 100, 145, 187	EA	218.0903	218.2096	2	-0,8500	0,0000	3,8600
45	EAK	346.1852	346.3838	3	-1,8667	0,0000	6,2048
50	ENITTGCA	807.3433	807.8801	8	-0,0000	0,1250	3,8599
58	EHCSLN	701.2803	701.7585	6	-0,7833	0,1667	5,1326
64	ENNITVP	785.3919	785.8526	7	-0,5857	0,4286	3,8600
71	RM DTKVNIFYAWK	1557.7762	1558.8248	12	-0,9583	0,3333	10,2145
83	EVGQQAV	729.3657	729.7884	7	-0,1000	0,2857	3,8600
90	EVWQGLALLS	1114.6022	1115.2950	10	0,8300	0,5000	3,8600
100	EAVLRGQALL VNSSQPW	1866.9952	1868.1237	17	0,0235	0,4118	6,2058
117	EPLQLHV	834.4599	834.9711	7	0,0000	0,5714	5,1337
124	DKAVSGLRSL TLLLRALGAQ K	2197.2906	2198.5955	21	0,0476	0,2857	11,5106
145	EAISPP	612.3119	612.6808	6	-0,2000	0,5000	3,8600
151	DAASAAPLRT ITA	1256.6724	1257.4099	13	0,4231	0,2308	6,1478
164	DIFRKLFRVY SNFLRGKLLK YTG	2821.5755	2823.3380	23	-0,4348	0,4348	11,0549
187	EACRTG	635.2697	635.6992	6	-0,8000	0,0000	6,0926
193	DR	289.1386	289.2916	2	-4,0000	0,0000	6,1478

Enzima: Quimiotripsina (após FLWY)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Comprimen to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1	MGVH	442.1998	442.5396	4	0,6250	0,2500	7,1211
5	ECPAWLWLLL SLLSLPLGLP VLGAPPR LIC	3252.8534	3255.0827	30	1,2967	0,6667	6,0183
35	DSRVLQRYLL	1261.7142	1262.4753	10	-0,2500	0,5000	9,3253
45, 48, 100, 145, 187	EA	218.0903	218.2096	2	-0,8500	0,0000	3,8600
45	EAK	346.1852	346.3838	3	-1,8667	0,0000	6,2048
50	ENIT TGCA	807.3433	807.8801	8	-0,0000	0,1250	3,8599
58	EHCSLN	701.2803	701.7585	6	-0,7833	0,1667	5,1326
64	ENNITVP	785.3919	785.8526	7	-0,5857	0,4286	3,8600
71	RM DTKVN FYAWK	1557.7762	1558.8248	12	-0,9583	0,3333	10,2145
83	EVGQQAV	729.3657	729.7884	7	-0,1000	0,2857	3,8600
90	EVWQGLALLS	1114.6022	1115.2950	10	0,8300	0,5000	3,8600
100	EAVLRGQALL VNSSQPW	1866.9952	1868.1237	17	0,0235	0,4118	6,2058
117	EPLQLHV	834.4599	834.9711	7	0,0000	0,5714	5,1337
124	DKAVSGLRSL TLLRALGAQ K	2197.2906	2198.5955	21	0,0476	0,2857	11,5106
145	EAI SPP	612.3119	612.6808	6	-0,2000	0,5000	3,8600
151	DAASAAPLRT ITA	1256.6724	1257.4099	13	0,4231	0,2308	6,1478
164	D TFRKLF RVY SNFLRGK LKL YTG	2821.5755	2823.3380	23	-0,4348	0,4348	11,0549
187	EACRTG	635.2697	635.6992	6	-0,8000	0,0000	6,0926
193	DR	289.1386	289.2916	2	-4,0000	0,0000	6,1478

Enzima: CNBr (após N)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1, 82	M	149.0510	149.2139	1	1,9000	0,0000	5,9250
2	GVHECPAWLW LLLSLLSLPL GLPVLGAPPR LICDSRVLQR YLLEAKEAEN ITTGCAEHCS LNENNITVPD TKVNFYAWKR M	9097.7096	9103.6862	81	0,1160	0,4321	6,0805
83	EVGQQAVEVW QGLALLSEAV LRGQALLVNS SQPWEPLQLH VDKAVSGLRS LTLLRALGA QKEAISPPDA ASAAPLRTIT ADTFRKLFRV YSNFLRGKLLK LYTGEACRTG DR	12195.5867	12203.0556	112	-0,0848	0,3571	10,1159

Enzima: CNBr + Tripsina (após MRK)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1, 82	M	149.0510	149.2139	1	1,9000	0,0000	5,9250
2	GVHECPAWLW LLLSLLSLPL GLPVLGAPPR	3216.8249	3218.9447	30	0,9567	0,6333	7,0004
31, 37, 41, 81, 104, 131, 138, 159, 167, 171, 178, 190, 194	R	174.1117	174.2029	1	-4,5000	0,0000	10,3400
32	LICDSR	705.3479	705.8336	6	0,3333	0,3333	6,0347
38	VLQR	514.3227	514.6258	4	0,0000	0,5000	10,3400
42	YLLEAK	735.4167	735.8788	6	0,1167	0,5000	6,2037
47, 73, 80, 125, 144, 168, 180, 182	K	146.1055	146.1894	1	-3,9000	0,0000	9,3700
48	EAENITGCA EHCSLNENNI TVPDTK	2802.2436	2804.0228	26	-0,7154	0,1923	3,9712
74	VNFYAWK	926.4650	927.0707	7	-0,1143	0,5714	9,1878
83	EVGQQAVEVW QGLALLSEAV LR	2394.2907	2395.7422	22	0,4273	0,4091	3,9680
105	GQALLVNSSQ PWEPLQLHVD K	2358.2332	2359.6682	21	-0,4190	0,4286	5,2297
126	AVSGLR	601.3547	601.7040	6	0,6833	0,3333	10,3400
132	SLTTLLR	802.4912	802.9698	7	0,6714	0,4286	10,3400
139	ALGAQK	586.3438	586.6894	6	-0,0667	0,1667	9,3700
145	EAISPPDAAS AAPLR	1464.7572	1465.6269	15	-0,0400	0,3333	4,1860
160	TITADTFR	923.4712	924.0218	8	-0,1250	0,2500	6,1478
169	LFR	434.2641	434.5390	3	0,7000	0,6667	10,3400
172	VYSNFLR	897.4708	898.0298	7	0,1000	0,5714	9,3276
179	GK	203.1270	203.2414	2	-2,1500	0,0000	9,3700
181	LK	259.1896	259.3489	2	-0,0500	0,5000	9,3700
183	LYTGEACR	911.4171	912.0347	8	-0,2875	0,2500	6,0918
191	TGDR	447.2078	447.4486	4	-2,2750	0,0000	6,1478

Enzima: Formic_acid (antes D, depois D)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP RLIC	3677.0426	3679.6071	34	1,2176	0,6176	6,9201
31, 37, 41, 81, 104, 131, 138, 159, 167, 171, 178, 190, 194	R	174.1117	174.2029	1	-4,5000	0,0000	10,3400
35, 71, 124, 151, 164, 193	D	133.0375	133.1039	1	-3,5000	0,0000	3,7750
36	SRVLQRYLLE AKEAENITTG CAEHCSLNEN NITVP	3914.9254	3917.3948	35	-0,4314	0,2857	4,6936
72	TKVNFYAWKR MEVGQQAVEV WQGLALLSEA VLRGQALLVN SSQPWEPLQL HV	5916.1300	5919.8532	52	0,0000	0,4231	7,1279
125	KAVSGLRSLT TLLRALGAQK EAI SPP	2676.5650	2678.1724	26	0,1269	0,3462	11,5106
152	AASAAPLRTI TA	1141.6455	1142.3213	12	0,7500	0,2500	10,3400
165	TFRKLF RVYS NFLRGK LKLY TGEACRTG	3323.8077	3325.9332	28	-0,4036	0,3571	11,0403

Enzima: Lys-c (depois K)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP RLICDSRVLQ RYLLEAK	5248.9210	5252.4356	47	0,7085	0,5532	8,0127
48	EAENITGCA EHCSLNENNI TVPDTK	2802.2436	2804.0228	26	-0,7154	0,1923	3,9712
74	VNFYAWK	926.4650	927.0707	7	-0,1143	0,5714	9,1878
81	RMEVGQQAVE VWQGLALLSE AVLRGQALLV NSSQPWEPLQ LHVDK	5021.6548	5024.7814	45	-0,0444	0,4000	4,6672
126	AVSGLRSLTT LLRALGAQK	1954.1687	1955.3327	19	0,4421	0,3158	12,4897
145	EAI SPPDAAS AAPLRTITAD TFRK	2498.3128	2499.8076	24	-0,2292	0,2917	6,3545
169	LFRVYSNFLR GK	1498.8408	1499.7796	12	-0,1250	0,5000	11,4914
181	LK	259.1896	259.3489	2	-0,0500	0,5000	9,3700
183	LYTGEACRTG DR	1340.6143	1341.4680	12	-0,9500	0,1667	6,1791

Enzima: Ly_C/P (após K)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP RLICDSRVLQ RYLLEAK	5248.9210	5252.4356	47	0,7085	0,5532	8,0127
48	EAENITGCA EHCSLNENNI TVPDTK	2802.2436	2804.0228	26	-0,7154	0,1923	3,9712
74	VNFYAWK	926.4650	927.0707	7	-0,1143	0,5714	9,1878
81	RMEVGGQAVE VWQGLALLSE AVLRGQALLV NSSQPWEPLQ LHVDK	5021.6548	5024.7814	45	-0,0444	0,4000	4,6672
126	AVSGLRSLTT LLRALGAQK	1954.1687	1955.3327	19	0,4421	0,3158	12,4897
145	EAI SPPDAAS AAPLRTITAD TFRK	2498.3128	2499.8076	24	-0,2292	0,2917	6,3545
169	LFRVYSNFLR GK	1498.8408	1499.7796	12	-0,1250	0,5000	11,4914
181	LK	259.1896	259.3489	2	-0,0500	0,5000	9,3700
183	LYTGEACRTG DR	1340.6143	1341.4680	12	-0,9500	0,1667	6,1791

Enzima: PepsinA (após FL)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHECPAWL	1141.5048	1142.3683	10	0,4600	0,4000	5,1326
9, 11	WL	317.1739	317.3880	2	1,4500	1,0000	5,9250
10, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 23, 26, 32, 39, 43, 44, 62, 95, 97, 98, 103, 108, 109, 119, 121, 130, 133, 136, 137, 140, 158, 169, 177, 181, 183	L	131.0946	131.1748	1	3,8000	1,0000	5,9250
12, 13, 16, 43, 97, 108, 136	LL	244.1787	244.3342	2	3,8000	1,0000	5,9250
15, 18, 61, 132	SL	218.1267	218.2530	2	1,5000	0,5000	5,9250
20, 118, 157	PL	228.1474	228.2915	2	1,1000	1,0000	5,9250
22, 94, 129	GL	188.1161	188.2267	2	1,7000	0,5000	5,9250
24	PVL	327.2158	327.4241	3	2,1333	1,0000	5,9250
27	GAPPRL	609.3598	609.7266	6	-0,4167	0,5000	10,3400
33	ICDSRVL	804.4164	804.9662	7	0,8857	0,4286	6,0347
40	QRYL	578.3176	578.6692	4	-1,3750	0,5000	9,3276
45	EAKEAENITT GCAEHCSL	1904.8244	1906.0822	18	-0,4722	0,1111	4,1660
63	NENNITVPDT KVNF	1603.7842	1604.7375	14	-0,8714	0,3571	4,1860
76, 166, 170, 176	F	165.0790	165.1919	1	2,8000	1,0000	5,9250
77	YAWKRMEVGQ QAVEVWQGL	2277.1364	2278.6206	19	-0,4158	0,3684	6,3229
96, 107, 139	AL	202.1317	202.2536	2	2,8000	0,5000	5,9250
99	SEAVL	517.2748	517.5800	5	1,1000	0,4000	3,8600
104	RGQAL	543.3129	543.6240	5	-0,5600	0,2000	10,3400
110	VNSSQPWEPL	1155.5560	1156.2608	10	-0,8200	0,5000	3,8600
120	QL	259.1532	259.3056	2	0,1500	0,5000	5,9250
122	HVDKAVSGL	924.5029	925.0530	9	0,2444	0,3333	7,1217
131	RSL	374.2278	374.4406	3	-0,5000	0,3333	10,3400
134	TTL	333.1900	333.3850	3	0,8000	0,3333	5,9250
138	RAL	358.2328	358.4412	3	0,3667	0,3333	10,3400
141	GAQKEAISPP	1692.8682	1693.8750	18	-0,1167	0,2778	4,1860

	DAASAAPL						
159	RTITADTF	923.4712	924.0218	8	-0,1250	0,2500	6,1478
167	RKL	415.2907	415.5366	3	-1,5333	0,3333	11,5112
168, 180, 182	KL	259.1896	259.3489	2	-0,0500	0,5000	9,3700
171	RVYSNF	784.3868	784.8703	6	-0,5167	0,5000	9,3276
178	RGKL	472.3122	472.5885	4	-1,2500	0,2500	11,5112
184	YTGEACRTGD R	1227.5302	1228.3086	11	-1,3818	0,0909	6,1791

Enzima: Tryp-CNBr (após KMR)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1, 82	M	149.0510	149.2139	1	1,9000	0,0000	5,9250
2	GVHECPAWLW LLLSLLSLPL GLPVLGAPPR	3216.8249	3218.9447	30	0,9567	0,6333	7,0004
31, 37, 41, 81, 104, 131, 138, 159, 167, 171, 178, 190, 194	R	174.1117	174.2029	1	-4,5000	0,0000	10,3400
32	LICDSR	705.3479	705.8336	6	0,3333	0,3333	6,0347
38	VLQR	514.3227	514.6258	4	0,0000	0,5000	10,3400
42	YLLEAK	735.4167	735.8788	6	0,1167	0,5000	6,2037
47, 73, 80, 125, 144, 168, 180, 182	K	146.1055	146.1894	1	-3,9000	0,0000	9,3700
48	EAENITGCA EHCSLNENNI TVPDTK	2802.2436	2804.0228	26	-0,7154	0,1923	3,9712
74	VNFYAWK	926.4650	927.0707	7	-0,1143	0,5714	9,1878
83	EVGQQAVEVW QGLALLSEAV LR	2394.2907	2395.7422	22	0,4273	0,4091	3,9680
105	GQALLVNSSQ PWEPLQLHVD K	2358.2332	2359.6682	21	-0,4190	0,4286	5,2297
126	AVSGLR	601.3547	601.7040	6	0,6833	0,3333	10,3400
132	SLTTLLR	802.4912	802.9698	7	0,6714	0,4286	10,3400
139	ALGAQK	586.3438	586.6894	6	-0,0667	0,1667	9,3700
145	EAISPPDAAS AAPLR	1464.7572	1465.6269	15	-0,0400	0,3333	4,1860
160	TITADTFR	923.4712	924.0218	8	-0,1250	0,2500	6,1478
169	LFR	434.2641	434.5390	3	0,7000	0,6667	10,3400

172	VYSNFLR	897.4708	898.0298	7	0,1000	0,5714	9,3276
179	GK	203.1270	203.2414	2	-2,1500	0,0000	9,3700
181	LK	259.1896	259.3489	2	-0,0500	0,5000	9,3700
183	LYTGEACR	911.4171	912.0347	8	-0,2875	0,2500	6,0918
191	TGDR	447.2078	447.4486	4	-2,2750	0,0000	6,1478

Enzima: TrypChymo (após FKRLWY)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Comprimento	Hydropathicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHECPAW	1028.4208	1029.2088	9	0,0889	0,3333	5,1326
8, 78	AW	275.1270	275.3074	2	0,4500	0,5000	5,9250
9, 11, 79, 92, 116	W	204.0899	204.2286	1	-0,9000	1,0000	5,9250
10, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 23, 26, 32, 39, 43, 44, 62, 95, 97, 98, 103, 108, 109, 119, 121, 130, 133, 136, 137, 140, 158, 169, 177, 181, 183	L	131.0946	131.1748	1	3,8000	1,0000	5,9250
12, 13, 16, 43, 97, 108, 136	LL	244.1787	244.3342	2	3,8000	1,0000	5,9250
15, 18, 61, 132	SL	218.1267	218.2530	2	1,5000	0,5000	5,9250
18	SLPL	428.2635	428.5292	4	1,3000	0,7500	5,9250
22	GLPVL	497.3213	497.6355	5	1,9600	0,8000	5,9250
25, 38, 102	VL	230.1630	230.3074	2	4,0000	1,0000	5,9250
27	GAPPR	496.2758	496.5672	5	-1,2600	0,4000	10,3400
31, 37, 41, 81, 104, 131, 138, 159, 167, 171, 178, 190, 194	R	174.1117	174.2029	1	-4.5000	0.0000	10.3400
33	ICDSR	592.2639	592.6741	5	-0.3600	0.2000	6.0347
40	QR	302.1703	302.3337	2	-4.0000	0.0000	10.3400
42, 77, 173, 184	Y	181.0739	181.1913	1	-1.3000	1.0000	5.9238
45	EAK	346.1852	346.3838	3	-1.8667	0.0000	6.2048
47, 73, 80, 125, 144, 168, 180, 182	K	146.1055	146.1894	1	-3.9000	0.0000	9.3700
48	EAENITGCA EHCSL	1576.6497	1577.7137	15	-0.1933	0.1333	3.9641

63	NENNITVPDT K	1243.6044	1244.3244	11	-1.4273	0.2727	4.1860
74	VNF	378.1903	378.4284	3	1.1667	0.6667	5.9250
76, 166, 170, 176	F	165.0790	165.1919	1	2.8000	1.0000	5.9250
82	MEVGQQAVEV W	1274.5965	1275.4484	11	0.0909	0.3636	3.6155
93	QGL	316.1747	316.3575	3	-0.0333	0.3333	5.9250
96, 107, 139	AL	202.1317	202.2536	2	2.8000	0.5000	5.9250
99	SEAVL	517.2748	517.5800	5	1.1000	0.4000	3.8600
105	GQAL	387.2118	387.4364	4	0.4250	0.2500	5.9250
110	VNSSQPW	816.3766	816.8691	7	-0.9857	0.4286	5.9250
117	EPL	357.1900	357.4070	3	-0.4333	0.6667	3.8600
120	QL	259.1532	259.3056	2	0.1500	0.5000	5.9250
122	HVDK	497.2598	497.5519	4	-1.6000	0.2500	7.1217
126	AVSGL	445.2536	445.5164	5	1.7200	0.4000	5.9250
134	TTL	333.1900	333.3850	3	0.8000	0.3333	5.9250
141	GAQK	402.2227	402.4510	4	-1.5000	0.0000	9.3700
145	EAISPPDAAS AAPL	1308.6561	1309.4392	14	0.2786	0.3571	3.5613
160	TITADTF	767.3701	767.8342	7	0.5000	0.2857	3.7750
172	VY	280.1423	280.3239	2	1.4500	1.0000	5.9238
174	SNF	366.1539	366.3740	3	-0.5000	0.3333	5.9250
179	GK	203.1270	203.2414	2	-2.1500	0.0000	9.3700
185	TGEACR	635.2697	635.6992	6	-0.8000	0.0000	6.0926
191	TGDR	447.2078	447.4486	4	-2.2750	0.0000	6.1478

Tripsina / P (após KR)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP R	3347.8653	3350.1433	31	0,9871	0,6129	7,0004
31, 37, 41, 81, 104, 131, 138, 159, 167, 171, 178, 190, 194	R	174.1117	174.2029	1	-4,5000	0,0000	10,3400
32	LICDSR	705.3479	705.8336	6	0,3333	0,3333	6,0347
38	VLQR	514.3227	514.6258	4	0,0000	0,5000	10,3400
42	YLLEAK	735.4167	735.8788	6	0,1167	0,5000	6,2037

47, 73, 80, 125, 144, 168, 180, 182	K	146.1055	146.1894	1	-3,9000	0,0000	9,3700
48	EAENITGCA EHCSLNENNI TVPDTK	2802.2436	2804.0228	26	-0,7154	0,1923	3,9712
74	VNFYAWK	926.4650	927.0707	7	-0,1143	0,5714	9,1878
82	MEVGQQAVEV WQGLALLSEA VLR	2525.3311	2526.9408	23	0,4913	0,3913	3,9680
105	GQALLVNSSQ PWEPLQLHVD K	2358.2332	2359.6682	21	-0,4190	0,4286	5,2297
126	AVSGLR	601.3547	601.7040	6	0,6833	0,3333	10,3400
132	SLTTLLR	802.4912	802.9698	7	0,6714	0,4286	10,3400
139	ALGAQK	586.3438	586.6894	6	-0,0667	0,1667	9,3700
145	EAISPPDAAS AAPLR	1464.7572	1465.6269	15	-0,0400	0,3333	4,1860
160	TITADTFR	923.4712	924.0218	8	-0,1250	0,2500	6,1478
169	LFR	434.2641	434.5390	3	0,7000	0,6667	10,3400
172	VYSNFLR	897.4708	898.0298	7	0,1000	0,5714	9,3276
179	GK	203.1270	203.2414	2	-2,1500	0,0000	9,3700
181	LK	259.1896	259.3489	2	-0,0500	0,5000	9,3700
183	LYTGEACR	911.4171	912.0347	8	-0,2875	0,2500	6,0918
191	TGDR	447.2078	447.4486	4	-2,2750	0,0000	6,1478

Enzima: V8-DE (após BDEZ)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Co mpr ime nto	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHE	571.2424	571.6552	5	-0,2000	0,2000	5,1337
6	CPAWLWLLLS LLSLPLGLPV LGAPPR LICD	3238.8377	3241.0558	30	1,2967	0,6667	5,9606
31, 37, 41, 81, 104, 131, 138, 159, 167, 171, 178, 190, 194	R	174.1117	174.2029	1	-4,5000	0,0000	10,3400
36	SRVLQRYLLE	1275.7299	1276.5022	10	-0,2500	0,5000	9,3253
46	AKE	346.1852	346.3838	3	-1,8667	0,0000	6,2048
49, 57	AE	218.0903	218.2096	2	-0,8500	0,0000	3,8600
51	NITGCAE	807.3433	807.8801	8	0,0000	0,1250	3,8599
59	HCSLNE	701.2803	701.7585	6	-0,7833	0,1667	5,1326
65	NNITVPD	771.3763	771.8257	7	-0,5857	0,4286	3,7750

72	TKVNFYAWKR ME	1571.7918	1572.8517	12	-0,9583	0,3333	10,2145
84	VGQQAVE	729.3657	729.7884	7	-0,1000	0,2857	3,8600
91	VWQGLALLSE	1114.6022	1115.2950	10	0,8300	0,5000	3,8600
101	AVLRGQALLV NSSQPWEPLQ LHVD	2669.4289	2671.0526	24	0,0167	0,4583	5,2298
125	KAVSGLRSLT TLLRALGAQK E	2211.3062	2212.6224	21	0,0476	0,2857	11,5106
146	AISPPD	598.2962	598.6539	6	-0,2000	0,5000	3,7750
152	AASAAPLRTI TAD	1256.6724	1257.4099	13	0,4231	0,2308	6,1478
165	TFRKLFVYS NFLRGKLY TGE	2835.5911	2837.3648	23	-0,4348	0,4348	11,0549
188	ACRTGD	621.2540	621.6723	6	-0,8000	0,0000	6,0347

Enzima: V8-E (após EZ)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.poin t
1	MGVHE	571.2424	571.6552	5	-0,2000	0,2000	5,1337
6	CPAWLWLLLS LLSLPLGLPV LGAPPRICD SRVLQRYLLE	4496.5571	4499.5427	40	0,9100	0,6250	8,0077
46	AKE	346.1852	346.3838	3	-1,8667	0,0000	6,2048
49, 57	AE	218.0903	218.2096	2	-0,8500	0,0000	3,8600
51	NITTGCAE	807.3433	807.8801	8	0,0000	0,1250	3,8599
59	HCSLNE	701.2803	701.7585	6	-0,7833	0,1667	5,1326
65	NNITVPDTKV NFYAWKRME	2325.1576	2326.6621	19	-0,8211	0,3684	9,0990
84	VGQQAVE	729.3657	729.7884	7	-0,1000	0,2857	3,8600
91	VWQGLALLSE	1114.6022	1115.2950	10	0,8300	0,5000	3,8600
101	AVLRGQALLV NSSQPWEPLQ LHVDKAVSGL RSLTLLRAL GAQKE	4862.7246	4865.6597	45	0,0311	0,3778	10,5162
146	AISPPDAASA APLRTITADT FRKLFVYSN FLRGKLYT GE	4654.5387	4657.3981	42	-0,1357	0,3810	10,6640

188	ACRTGDR	777.3552	777.8600	7	-1,3286	0,0000	8,2850
-----	---------	----------	----------	---	---------	--------	--------

Enzima: semiTrypsin (após KR)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Comprimen to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP R	3347.8653	3350.1433	31	0,9871	0,6129	7,0004
31, 37, 41, 81, 104, 131, 138, 159, 167, 171, 178, 190, 194	R	174.1117	174.2029	1	-4,5000	0,0000	10,3400
32	LICDSR	705.3479	705.8336	6	0,3333	0,3333	6,0347
38	VLQR	514.3227	514.6258	4	0,0000	0,5000	10,3400
42	YLLEAK	735.4167	735.8788	6	0,1167	0,5000	6,2037
47, 73, 80, 125, 144, 168, 180, 182	K	146.1055	146.1894	1	-3,9000	0,0000	9,3700
48	EAENITTGCA EHCSLNENNI TVPDTK	2802.2436	2804.0228	26	-0,7154	0,1923	3,9712
74	VNFYAWK	926.4650	927.0707	7	-0,1143	0,5714	9,1878
82	MEVGQQAVEV WQGLALLSEA VLR	2525.3311	2526.9408	23	0,4913	0,3913	3,9680
105	GQALLVNSSQ PWEPLQLHVD K	2358.2332	2359.6682	21	-0,4190	0,4286	5,2297
126	AVSGLR	601.3547	601.7040	6	0,6833	0,3333	10,3400
132	SLTLLR	802.4912	802.9698	7	0,6714	0,4286	10,3400
139	ALGAQK	586.3438	586.6894	6	-0,0667	0,1667	9,3700
145	EAI SPPDAAS AAPLR	1464.7572	1465.6269	15	-0,0400	0,3333	4,1860
160	TITADTFR	923.4712	924.0218	8	-0,1250	0,2500	6,1478
169	LFR	434.2641	434.5390	3	0,7000	0,6667	10,3400
172	VYSNFLR	897.4708	898.0298	7	0,1000	0,5714	9,3276
179	GK	203.1270	203.2414	2	-2,1500	0,0000	9,3700
181	LK	259.1896	259.3489	2	-0,0500	0,5000	9,3700
183	LYTGEACR	911.4171	912.0347	8	-0,2875	0,2500	6,0918
191	TGDR	447.2078	447.4486	4	-2,2750	0,0000	6,1478

Enzima: LysC + ASPN (antes de BD e depois de K)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP RLIC	3677.0426	3679.6071	34	1,2176	0,6176	6,9201
35	DSRVLQRYLL EAK	1589.8889	1590.8438	13	-0,6231	0,3846	9,1853
48	EAENITGCA EHCSLNENNI TVP	2458.0740	2459.6549	23	-0,4565	0,2174	3,8041
71	DTK	362.1801	362.3832	3	-2,7000	0,0000	6,1467
74	VNFYAWK	926.4650	927.0707	7	-0,1143	0,5714	9,1878
81	RMEVGQQAVE VWQGLALLSE AVLRGQALLV NSSQPWEPLQ LHV	4778.5329	4781.5186	43	0,1256	0,4186	4,5880
124	DK	261.1325	261.2781	2	-3,7000	0,0000	6,1467
126	AVSGLRSLTT LLRALGAQK	1954.1687	1955.3327	19	0,4421	0,3158	12,4897
145	EAISPP	612.3119	612.6808	6	-0,2000	0,5000	3,8600
151	DAASAAPLRT ITA	1256.6724	1257.4099	13	0,4231	0,2308	6,1478
164	DTRFK	665.3497	665.7474	5	-1,9600	0,2000	9,3672
169	LFRVYSNFLR GK	1498.8408	1499.7796	12	-0,1250	0,5000	11,4914
181	LK	259.1896	259.3489	2	-0,0500	0,5000	9,3700
183	LYTGEACRTG	1069.4862	1070.1918	10	-0,3400	0,2000	6,0918
193	DR	289.1386	289.2916	2	-4,0000	0,0000	6,1478

Enzima: Prolyl Endoprotease (após PA)

Posição	Fragmento cadeia	Mono.mass	Avg.mass	Com pri men to	Hydropa thicity	NPS	Isoel.point
1	MGVHECP	771.3044	771.9167	7	-0,0143	0,2857	5,1326
7, 20, 24, 29, 30, 70, 115, 118, 149, 150, 157	P	115.0633	115.1320	1	-1,6000	1,0000	5,9250
8, 28, 46, 49, 57, 78, 88, 96, 101, 107, 126, 139, 142, 146, 152, 153, 155, 156, 163, 188	A	89,0477	89,0941	1	1,8000	0,0000	5,9250
9	WLWLLLSLLS LP	1452.8744	1453.8314	12	1,8000	0,8333	5,9250
21	LGLP	398.2529	398.5029	4	1,4000	0,7500	5,9250
25	VLGA	358.2216	358.4382	4	2,3500	0,5000	5,9250
26, 140	LGA	259.1532	259.3056	3	1,7333	0,3333	5,9250
31	RLICDSRVLQ RYLLEA	1947.0724	1948.3211	16	0,1313	0,4375	8,2792
47, 144	KEA	346.1852	346.3838	3	-1,8667	0,0000	6,2048
50	ENITTGCA	807.3433	807.8801	8	-0,0000	0,1250	3,8599
58	EHCSLNENNI TVP	1468.6616	1469.5958	13	-0,6769	0,3077	4,2369
71	DTKVNFYA	956.4603	957.0512	8	-0,5125	0,3750	6,1456
79	WKRMEVGQQA	1231.6131	1232.4295	10	-1,2300	0,2000	9,3672
89	VEVWQGLA	900.4705	901.0304	8	0,7125	0,5000	3,8600
97	LLSEA	531.2904	531.6068	5	1,0200	0,4000	3,8600
102	VLRGQA	642.3813	642.7566	6	0,2333	0,3333	10,3400
108	LLVNSSQP	856.4654	856.9748	8	0,2000	0,5000	5,9250
116	WEP	430.1852	430.4608	3	-2,0000	0,6667	3,8600
119	LQLHVDKA	922.5236	923.0805	8	-0,0625	0,3750	7,1217
127	VSGLRSLTTL LRA	1385.8354	1386.6586	13	0,6769	0,3846	12,4800
143	QKEA	474.2438	474.5146	4	-2,2750	0,0000	6,2048
147	ISP	315.1794	315.3697	3	0,7000	0,6667	5,9250
151	DA	204.0746	204.1828	2	-0,8500	0,0000	3,7750
154	SA	176.0797	176.1724	2	0,5000	0,0000	5,9250
158	LRTITA	673.4123	673.8110	6	0,7000	0,3333	10,3400
164	DTRKLFVRVY SNFLRGKLLK YTGEA	3021.6552	3023.5323	25	-0,4680	0,4000	10,6691

189	CRTGDR	706.3180	706.7811	6	-1,8500	0,0000	8,2850
-----	--------	----------	----------	---	---------	--------	--------

Anexo 2: Representação dos símbolos e massa monoisotópica dos 20 aminoácidos

Aminoácido	Símbolo de uma letra	Símbolo de três letras	Massa monoisotópica
Ácido aspártico	D	Asp	115,026
Ácido glutâmico	E	Glu	129,042
Alanina	A	Ala	71,037
Arginina	R	Arg	156,101
Asparagina	N	Asp	114,042
Cisteína	C	Cys	103,009
Fenilalanina	F	Phe	147,068
Glicina	G	Gly	57,021
Glutamina	Q	Gln	128,058
Histidina	H	His	137,058
Isoleucina	I	Ile	113,084
Leucina	L	Leu	113,084
Lisina	K	Lys	128,094
Metionina	M	Met	131,040
Prolina	P	Pro	97,052
Serina	S	Ser	87,032
Tirosina	Y	Tyr	163,063
Treonina	T	Thr	101,047
Triptofano	W	Trp	186,079
Valina	V	Val	99,068