

ARÁDIA GONZALES DE OLIVEIRA FERNANDES

**ATIVIDADE CICATRIZANTE DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS RICOS EM
PROLINA E ARGINA EM MODELO DE ESCISÃO CUTÂNEA DO DORSO DE *Mus
musculus swiss***

Ouro Preto – MG, maio de 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ATIVIDADE CICATRIZANTE DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS RICOS EM
PROLINA E ARGINA EM MODELO DE ESCISÃO CUTÂNEA DO DORSO DE *Mus
musculus swiss***

AUTOR: Arádia Gonzales de Oliveira Fernandes

ORIENTADOR: Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Genômica e Proteômica.

Ouro Preto – MG, maio de 2018

F39a

Fernandes, Arádia Gonzales de Oliveira.

Atividade cicatrizante de peptídeos sintéticos ricos em prolina e arginina em modelo de excisão cutânea do dorso de *Mus musculus* Swiss [manuscrito] / Arádia Gonzales de Oliveira Fernandes. - 2018.

xvi, 58f.: il.: color; graf; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Genômica e Proteômica.

1. Peptídeos. 2. Cicatrização de feridas. 3. Inibidores enzimáticos. 4. Agentes antiinflamatórios. I. Andrade, Milton Hércules Guerra de. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616-003.9

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 29 dias do mês de junho do ano de 2018, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Aradia Gonzales de Oliveira Fernandes, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Milton Hercules Guerra de Andrade (Presidente - UFOP), pelo Prof. Elio Hideo Baba (Membro - Externo), pelo Prof. Leonardo Maximo Cardoso (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Aradia Gonzales de Oliveira Fernandes 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Atividade Cicatrizante de Peptídeos Sintéticos Ricos em Prolina e Argina em Modelo de Excisão Cutânea do Dorso de Mus Musculus Swiss", na área de concentração: Genômica e Proteômica. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Prof. Elio Hideo Baba; segundo, Prof. Leonardo Maximo Cardoso; terceiro, Prof. Milton Hercules Guerra de Andrade. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 29 de junho de 2018.

Presidente: *Milton Hercules Guerra de Andrade*

Membro: *Leonardo Maximo Cardoso*

Membro: *Ca. Hideo Baba*

Mestrando: *Aradia Gonzales de Oliveira Fernandes*

Esta pesquisa é resultado de um trabalho realizado no LABORATÓRIO DE ENZIMOLOGIA E PROTEÔMICA - ICEB/NUPEB/UFOP, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

ÍNDICE

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de abreviaturas	ix
Lista de figuras	xii
Lista de tabelas	xv
1. Introdução	2
1.1. Cicatrização da pele.....	2
1.2. Peptídeos ricos em prolina e arginina.....	10
2. Justificativa	17
3. Objetivos	19
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. Materiais e métodos	21
4.1- Síntese de peptídeos em fase sólida.....	21
4.1.1- Ativação da resina.....	22
4.1.2- Ativação e adição dos aminoácidos a serem acoplados.....	22
4.1.3- Clivagem do peptídeo.....	22
4.1.4- Purificação dos peptídeos por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC.....	23
4.1.5- Caracterização dos peptídeos por espectrometria de massas Q-exactive, Thermo Scientific®.....	23
4.2- Tratamento de feridas geradas através de excisão cutânea em <i>Mus musculus</i> swiss com peptídeos sintéticos análogos ao PR-39.....	24
4.2.1- Avaliação do tratamento de feridas geradas através de excisão cutânea em <i>Mus musculus</i> com peptídeos sintéticos análogos ao PR-39.....	25
4.3- Produção de cultura de fibroblastos primária de <i>Rattus norvegicus</i> wistar.....	25
4.3.1- Ensaio de internalização de peptídeos sintéticos análogos ao PR-39.....	26
4.3.2- Avaliação do ensaio de internalização de peptídeos sintéticos análogos ao PR-39.....	26

4.4- Análise estatística.....	27
5. Resultados e discussão.....	29
5.1 – Síntese, purificação e confirmação da estrutura dos peptídeos.....	29
5.2 - Análise da atividade cicatrizante dos análogos do PR-39 em modelo de excisão cutânea de <i>Mus musculus</i>	34
5.3 – Análise do mecanismo de internalização do PR-11.....	41
6. Conclusões.....	43
7. Referências bibliográficas.....	45

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo humano e possui funções cruciais na manutenção da homeostase assim como na saúde geral. As feridas são o resultado de lesões na pele e podem ser causadas por queimaduras, insetos, agentes microbianos, diabetes, isquemia e trauma. A cura de feridas é um processo essencial para reestabelecer a barreira protetora que defende o corpo do ambiente. Tipicamente, a cicatrização aguda de feridas é um processo bem organizado que leva a um reparo tecidual previsível, com plaquetas, queratinócitos, células imunológicas, células microvasculares e fibroblastos desempenhando papéis importantes na restauração da integridade tecidual. A cicatrização é um processo evolutivo conservado entre as espécies e abrange processos distintos, entretanto sobrepostos espacialmente e temporalmente que incluem a hemostasia/coagulação, inflamação, proliferação celular/reepitelização e a remodelação da matriz extracelular. Proteínas possuem um papel fundamental em todos os processos biológicos, sendo o equilíbrio finamente regulado entre a síntese e degradação fator decisivo na homeostase celular. O peptídeo natural da família das cateciclinas PR-39 (RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPP) é um peptídeo natural rico em prolina e arginina secretado por macrófagos que teve sua capacidade de inibir a atividade catalítica do proteassoma 20S demonstrada assim como capacidade anti-inflamatória, através da inibição da degradação de fatores I κ B, e angiogênica pela inibição da degradação de HIF-1 α . Em estudos anteriores, foi demonstrado uma atividade inibitória sobre o proteassoma assim como uma atividade angiogênica de análogos ao PR-39. A análise do resultados da área da ferida, demonstra aumento da velocidade cicatrizante para o PR-11 e F-12 no décimo dia na concentração de 10^{-5} M, e no sétimo e décimo dia nas concentrações de 10^{-4} M e 10^{-3} M. O Bephanol® a 10^{-4} M, um cicatrizante clássico com dexpanthenol (pré-vitamina B5), foi utilizado como controle positivo. Este apresenta aumento da velocidade de fechamento da ferida apenas no décimo dia de tratamento. Os análogos PR-11 e F12 apresentaram uma presença inferior de exudado indicativo de infecção na concentração avaliada de 10^{-4} M a partir do sétimo dia e o controle positivo com Bephanol® 10^{-4} M apresentou essa atividade apenas no décimo dia de tratamento. Esses resultados indicam a atividade antimicrobiana apresentada pelos análogos. Assim, a capacidade de aumento na velocidade de cicatrização da ferida assim como a diminuição da infecção das mesmas, torna os análogos PR-11 e F-12 ótimos candidatos a criação de formulação para utilização como cicatrizante.

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the human body and has crucial functions in maintaining homeostasis as well as general health. Wounds are the result of skin damage and can be caused by burns, insects, microbial agents, diabetes, ischemia and trauma. Wound healing is an essential process to re-establish the protective barrier that protects the body from the environment. Typically, acute wound healing is a well-organized process leading to predictable tissue repair, with platelets, keratinocytes, immune cells, microvascular cells and fibroblasts playing important roles in restoring tissue integrity. Healing is an evolutionary process conserved between species and encompasses distinct processes, however spatially and temporally overlapping, including hemostasis / coagulation, inflammation, cell proliferation / reepithelialization, and remodeling of the extracellular matrix. Proteins play a key role in all biological processes, with the finely regulated balance between synthesis and degradation a decisive factor in cellular homeostasis. The natural peptide of the PR-39 catechin family (RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFP) is a macrophage-secreted proline-rich natural peptide and arginine that has been shown to inhibit the catalytic activity of the demonstrated 20S proteasome as well as anti-inflammatory capacity by inhibiting degradation I κ B, and angiogenic factors by the inhibition of HIF-1 α degradation. In previous studies, an inhibitory activity on the proteasome has been demonstrated as well as an angiogenic activity of PR-39 analogues. Analysis of the wound area results showed increased healing velocity for PR-11 and F-12 on the 10th day at the concentration of 10^{-5} M, and on the seventh and tenth day at concentrations of 10^{-4} M and 10^{-3} M. Bephanol® at 10^{-4} M, a classic healer with dexpanthenol (pre-vitamin B5), was used as a positive control. This shows an increase in wound closure speed only on the tenth day of treatment. PR-11 and F12 analogues exhibited a lower exudate presence indicative of infection at the assessed concentration of 10^{-4} M from the seventh day and the positive control with Bephanol® 10^{-4} M presented this activity only on the tenth day of treatment. These results indicate the antimicrobial activity of the analogues. Thus, the ability to increase the wound healing rate as well as the decrease in wound infection makes PR-11 and F-12 analogues a good candidate for formulation for use as a healing agent.

LISTA DE ABREVIATURAS

α – alfa

β – beta

γ – gama

κ – kappa

μ – micro

°C – graus célsius

C8C15 – RRRPRPPCLPRWRPCG

C-terminal – carboxil terminal

COX-2 – ciclooxigenase-2

DMF – Dimetilformamida

DIPC – Diisopropilcabodiimida

DMSO – dimetilsulfóxido

F-12 - RRRPRPPYLPRF

FGF – Fator de crescimento de fibroblastos

FGFR-1 – Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos 1

FLT1 – gene que codifica o receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1

g – grama

HIF-1 α – fator induzível por hipóxia 1 alfa

hnRNP D – Ribonucleoproteína nuclear heterogênia D

I κ B – inibidor de kappa B

I κ B α – inibidor de kappa B alfa

ICAM-1 – Molécula de Adesão Intercelular-1

IL-6 – interleucina seis

iNOS – Óxido nítrico sintase indutível

INTER – GCGKRK

INTER-fluo – CGKRK-carboxifluoresceína

KCl – cloreto de potássio

kD – kilo daltons

kV – kilo volts

L – litro

m – mili

M – molar

min – minuto

MgSO₄ – sulfato de magnésio

m/z – massa/carga

M1 – classicamente ativados

M2 – alternativamente ativados

NaCl – cloreto de sódio

Na₂HPO₄ – fosfato dissódico

NFκB – Fator Nuclear kappa B

N-terminal – amino terminal

PC – computador

PR-11 – RRRPRPPYLPR

PR-11-fluo – RRRPRPPYLPR-carboxifluoresceína

PR-39 – RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIIPPGFPPRFPPRFPP

ROS – espécies reativas de oxigênio

TFA – Ácido Trifluoro Acético

TNFα – Fator de Necrose Tumoral Alfa

UTR – região não traduzida

UV – ultra violeta

VCAM-1 – Molécula de Adesão Vascular Celular-1

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-1 – Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular 1

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: estrutura da pele (epiderme associada a derme e ao tecido subcutâneo) (adaptado de Kumar <i>et al.</i> , 2012).....	2
Figura 02: Exemplificação das respostas a diferentes intensidades de dano (superficial e profundo) e a forma de cura da lesão (regeneração e cicatrização) (adaptado de Kumar <i>et al.</i> , 2012).....	3
Figura 03: Exemplificação entre as quatro fases da reparação tecidual, homeostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (adaptado de Maynard, 2015).....	4
Figura 04: Esquema de uma ferida perto do final do estágio inflamatório e o início do estágio proliferativo ilustrando a interação entre as diferentes células e promotores envolvidos (Singer & Clarck, 2005).....	6
Figura 05: Ilustração demonstrando as funções que possivelmente são exercidas através das integrinas dos queratinócitos. (1) indicando a reepitelização mediada pela proliferação de queratinócitos, remodelamento da matriz extracelular e migração. (2) sinalização parácrina da epiderme para células endoteliais vasculares promotoras da angiogênese. (3) sinalização parácrina da epiderme para outras células presentes na ferida, incluindo células inflamatórias (células azuis) e fibroblastos/miofibroblastos que promovem a contração da ferida (células verdes). A ferida está indicada pelo gradiente vermelho-rosa (Adaptado de DiPersio <i>et al.</i> , 2016).....	8
Figura 06: Estrutura do proteassoma 20S em eucariotos exemplificando a conformação heptamérica das subunidades α e β , destacando-se as subunidades catalíticas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$, responsáveis pelas atividades proteolíticas semelhantes às de caspase, tripsina e quimotripsina, respectivamente (Jung <i>et al.</i> , 2009).....	12
Figura 07: Diferentes sítios de ligação de inibidores do proteassoma. O inibidor reversível bortezomib e os inibidores irreversíveis carfilzomib, ONX 0192 e NPI 0052 (salinosporide A) se ligam diretamente à subunidade proteolítica $\beta 5$. A cloroquina interage com a interface entre as subunidades α e β . O peptídeo PR-39 liga-se às subunidades α , o que dificulta a interação de partículas regulatórias como o 19S (Ruschak <i>et al.</i> , 2011).....	13
Figura 08: Regulação do fator de transcrição NF κ B pelo proteassoma. O inibidor I κ B é duplamente fosforilado e degradado pelo proteassoma 26S, o que libera o fator NF κ B, formado pelas subunidades p50 e p65, que dispara uma cascata de transcrição de diversos genes (VCAM:	

Vascular Cell Adhesion Molecule; ICAM: Intercellular Adhesion Molecule) (adaptado Jung <i>et al.</i> , 2009).....	14
Figura 09: Estrutura 3D dos peptídeos sintetizados PR-11 (1), F-12 (2) e C8C15 nos formatos <i>Ribbons</i> (A) e <i>Wireframe</i> (B) (Modificado de Freitas, 2013).....	30
Figura 10: Atividade de inibição do proteossoma 20S pelos peptídeos sintéticos PR-11, F-12 e C8C15 (Modificado de Freitas, 2013).....	31
Figura 11: Atividade angiogênica dos peptídeos sintéticos PR-11, F-12, C8C15 e controle positivo com estradiol em relação ao controle negativo com salina. As estrelas destacam os grupos com atividade superior ao controle positivo com estradiol (Modificado de Freitas, 2013).....	32
Figura 12: Perfil cromatográfico em sistema HPLC dos peptídeos PR-11, F-12, C8C15 e INTER. Foi utilizado gradiente de acetonitrila com TFA 0,1% de 20 a 60% em 30 minutos com fluxo de 1mL/min (fase estacionária: coluna C18 - 250 mm x 4,6mm - Shim-pack CLD-ODS). A seta indica o componente principal da eluição que foi utilizado para a caracterização em espectrômetro de massas.....	33
Figura 13: Espectro de massas obtido em espectrômetro Q-Exactive <i>electrospray</i> dos peptídeos PR-11, F-12, C8C15 e INTER. Os picos destacados apresentam a relação massa/carga (m/z) da massa molecular esperada. As massas teóricas foram indicadas abaixo dos espectros.....	34
Figura 14: Locais de excisão cutânea no dorso de <i>Mus musculus</i> swiss.....	35
Figura 15: Análise da área da ferida do grupo controle negativo com salina e dos grupos tratados com os peptídeos sintéticos PR-11, F-12 e C8C15 nas concentrações de 10^{-5} M, 10^{-4} M e 10^{-3} M. As imagens dos dias 0, 3, 7, 10 e 14 foram capturadas com microscópio digital e analisadas com o programa Image J®. Os grupos com diferença estatística em relação ao controle negativo foi destacado com um seta azul.....	36
Figura 16: Análise da área da ferida do grupo controle negativo com salina e positivo com Bephanol® 10^{-4} M assim como dos grupos tratados com os peptídeos sintéticos PR-11 e F-12 na concentração de 10^{-4} M. As imagens dos dias 0, 3, 7, 10 e 14 foram capturadas com microscópio digital e analisadas com o programa Image J®. Os grupos com diferença estatística em relação ao controle negativo foi destacado com um seta.....	37
Figura 17: Análise semiquantitativa do fechamento relativo da ferida do grupo controle negativo com salina e positivo com Bephanol® 10^{-4} M assim como dos grupos tratados com os peptídeos sintéticos PR-11 e F-12 na concentração de 10^{-4} M. As imagens dos dias 0, 3, 7, 10 e 14 foram capturadas com microscópio digital e as análises realizadas por três pesquisadores	

distintos com imagens embaralhadas em uma classificação de 10 (ferida com maior profundidade) até 0 (ferida fechada) sendo a média dos valores utilizada para montagem do gráfico.....38

Figura 18: Análise semiquantitativa da presença de exudado indicativo de infecção da ferida do grupo controle negativo com salina e positivo com Bephanol® 10^{-4} M assim como dos grupos tratados com os peptídeos sintéticos PR-11 e F-12 na concentração de 10^{-4} M. As imagens dos dias 0, 3, 7, 10 e 14 foram capturadas com microscópio digital e as análises realizadas por três pesquisadores distintos com imagens embaralhadas em uma classificação de 10 (ferida totalmente coberta por exudado) até 0 (ferida sem presença de exudado) sendo a média dos valores utilizada para montagem do gráfico.....40

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Lista dos peptídeos utilizados no presente estudo e suas respectivas sequências de aminoácidos (a carboxifluoresceína foi abreviada como “fluo”).....21

Tabela 02: Peptídeos sintéticos PR-11, F-12, C8C15 e INTER e suas respectivas sequências e massas teóricas obtidas pela ferramenta *ExPASy – Compute PI/Mw tool* em unidades de massa atômica (u.m.a).....33

1. Introdução

1- Introdução

1.1- Cicatrização da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e possui funções cruciais na manutenção da homeostase assim como na saúde geral, uma vez que funciona como barreira contra influências externas como raios ultra violetas, invasão de patógenos nocivos e evaporação da água. Constituída por uma estrutura intrincada formada pela epiderme e derme, incluindo a camada de gordura subcutânea (Figura 01), essa barreira protetora também é responsável pela regulação de funções metabólicas, mantendo sua estrutura através da reposição constante de sua camada mais externa pela divisão e diferenciação dos queratinócitos basais.

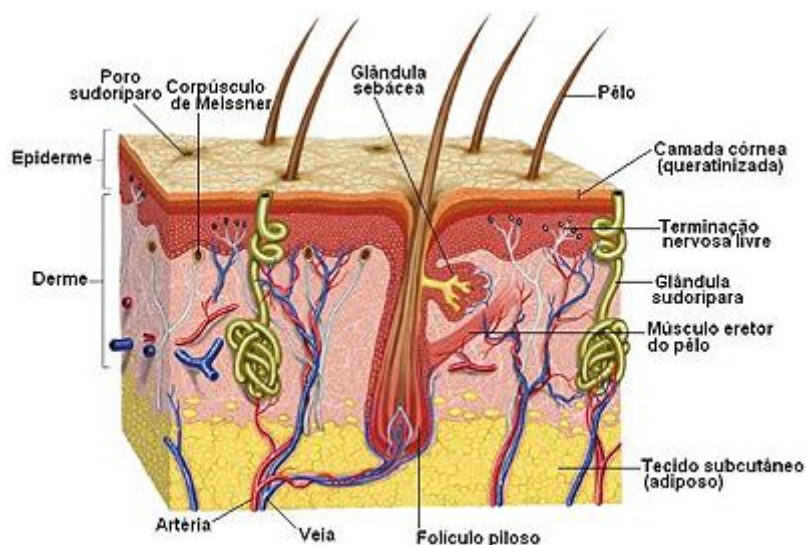


Figura 01: estrutura da pele (epiderme associada a derme e ao tecido subcutâneo) (adaptado de Kumar *et al.*, 2012).

À medida que as células epidérmicas basais se diferenciam e se movem em direção à superfície, elas dão origem às células suprabasais e à camada granular e eventualmente se diferenciam terminalmente em corneócitos enucleados que compõem o estrato córneo. Como a camada mais externa do organismo, a epiderme é constantemente exposta a múltiplas formas de lesão e, assim, a cicatrização de feridas é um processo vital para a sobrevivência de todos os organismos superiores. Os mamíferos são capazes de reparar rapidamente pequenas rupturas nesse tecido, entretanto lesões maiores resultam em um remodelamento incompleto do tecido,

manifestando-se parcialmente através de cicatrizes fibróticas (Figura 02) (Gurtner *et al.*, 2008; Takeo, Lee & Ito, 2015; Erickson *et al.*, 2016; Qiang *et al.*, 2017).

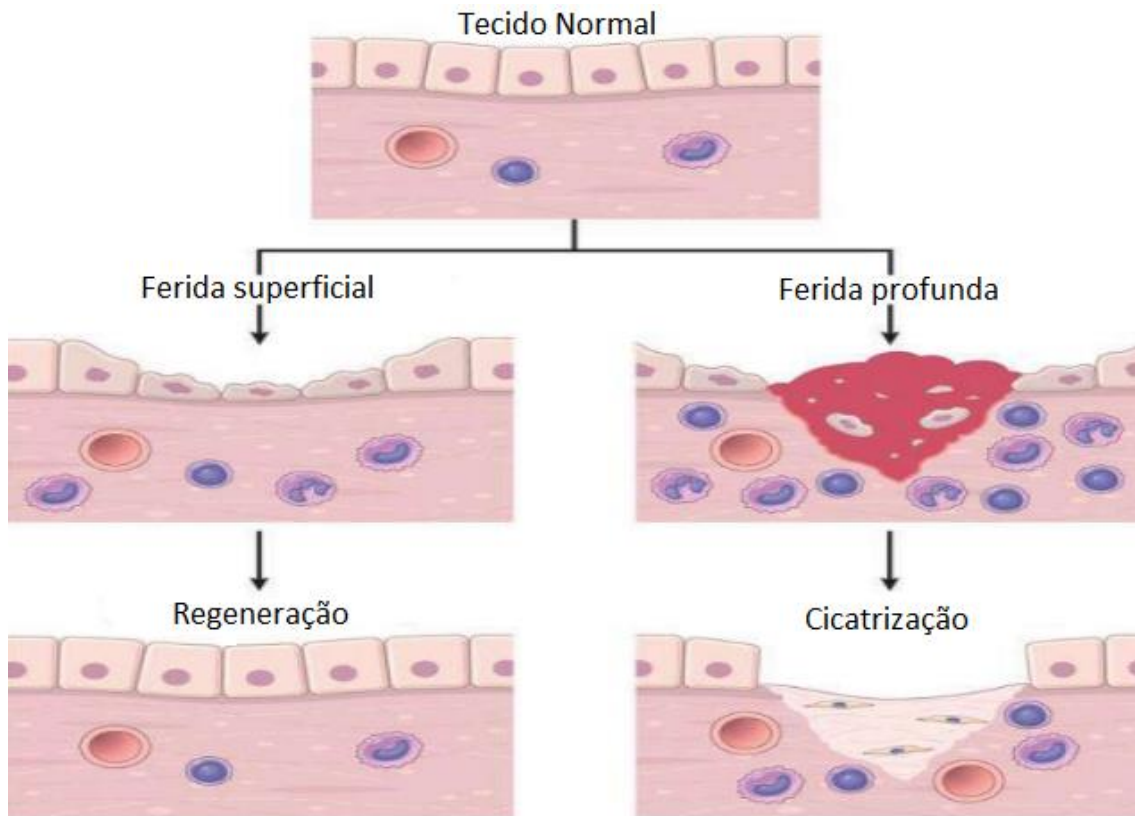


Figura 02: Exemplificação das respostas a diferentes intensidades de dano (superficial e profundo) e a forma de cura da lesão (regeneração e cicatrização) (adaptado de Kumar *et al.*, 2012).

As feridas são o resultado de lesões na pele e podem ser causadas por queimaduras, insetos, agentes microbianos, diabetes, isquemia e trauma (Moghadam *et al.*, 2017). A cura de feridas é um processo essencial para reestabelecer a barreira protetora que defende o corpo do ambiente. Tipicamente, a cicatrização aguda de feridas é um processo bem organizado que leva a um reparo tecidual previsível, com plaquetas, queratinócitos, células imunológicas, células microvasculares e fibroblastos desempenhando papéis importantes na restauração da integridade tecidual, o que é essencial para a redução do risco de contaminação bacteriana, inibição da perda de água e supressão da formação de cicatrizes que possam afetar a função do tecido. Um balanço coordenado entre a resposta imune do organismo e a proliferação e diferenciação de células epiteliais é essencial para o funcionamento da pele como barreira assim como na sua reparação normal (McGee *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013; Nelson *et al.*, 2013; Celli *et al.*, 2016; Lanial *et al.*, 2017; Qiang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017).

A cicatrização de feridas é um processo evolutivo conservado entre as espécies e abrange processos distintos, entretanto sobrepostos espacialmente e temporalmente que incluem a hemostasia/coagulação, inflamação, proliferação celular/reepitelização e a remodelação da matriz extracelular (Figura 03) (Martin, 1997; Gurtner *et al.*, 2008; Seifert *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2013; Kitano *et al.*, 2017). Esse evento é controlado pela atividade cruzada de várias citocinas, fatores de crescimento e tipos celulares, incluindo queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (Gurtner *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Moghadam *et al.*, 2017).

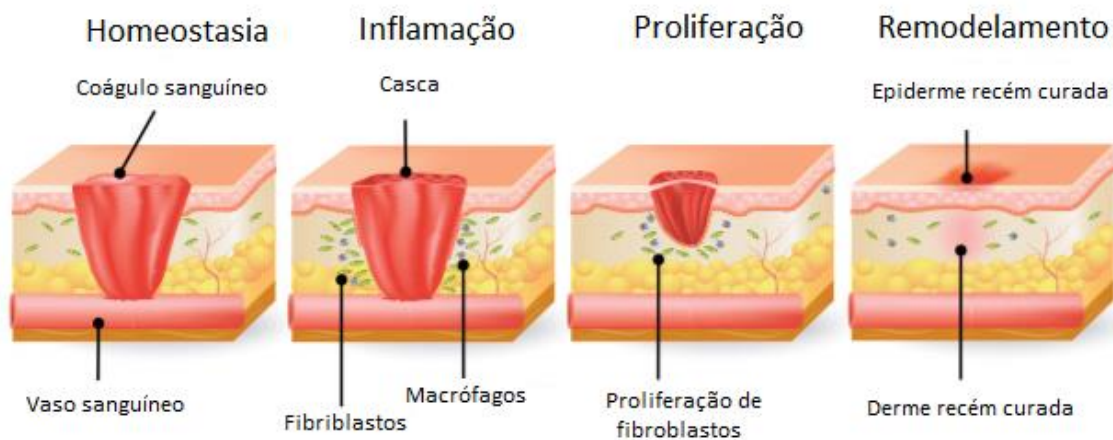


Figura 03: Exemplificação entre as quatro fases da reparação tecidual, homeostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (adaptado de Maynard, 2015).

Estudos demonstram que, durante esse processo, vários fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios são produzidos localmente ou sistemicamente, incluindo leptina (Nascimento & Costa, 2006), interleucina 2, interleucina 4, interleucina 6 e fator de crescimento relacionado à insulina 1 como substâncias pró-cicatrizantes, importantes durante os estágios iniciais de cicatrização. Por sua vez adiponectina, interleucina 12, interferon α e interferon γ (MacLeod & Mansbridge, 2016) são liberados como fatores anti-cicatrizantes, importantes durante os estágios mais tardios de cicatrização. Além desses, o fator de necrose tumoral α também é utilizado, entretanto ele possui efeito variado dependendo da sua concentração (Ashcroft *et al.*, 2012; Lanial *et al.*, 2017).

Logo após uma lesão na pele, o estágio inicial de reparo ou estágio de homeostase é caracterizado pela prevenção da perda excessiva de sangue através da formação das redes de fibrina assim como por desencadear os eventos que culminam com a inflamação local, onde as células imunes residentes, neutrófilos e monócitos, são ativadas e iniciam a infiltração na ferida

para limpeza de patógenos e debris celular (Martin, 1997; Eming *et al.*, 2007; MacLeod & Mansbridge, 2016; Lanial *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017).

Os macrófagos têm diversas funções nos tecidos, dependendo do local e de outros fatores sistêmicos. Nas feridas, macrófagos existem ao longo de um espectro onde os macrófagos M1 “classicamente ativados” contribuem para inflamação tecidual e atividade bactericida, e os macrófagos M2 “alternativamente ativados” promovem redução da inflamação, secreção de fatores de crescimento e reparo tecidual (Martinez *et al.*, 2009; Kruidenier *et al.*, 2012; Kimbal *et al.*, 2017). Durante a cicatrização normal da ferida, os macrófagos recrutados inicialmente demonstram um fenótipo pró-inflamatório que elimina os detritos enquanto recruta células inflamatórias adicionais através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, iNOS e TNF α , além de exibirem altos níveis de produção de metaloproteinase de matriz e catepsinas (Figura 04).

À medida que a cicatrização da ferida progride, os macrófagos presentes no tecido da ferida tornam-se predominantemente anti-inflamatórios, estando associados a atividades pró-regenerativas através de diversos fatores como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e interleucina 10. Entre essas atividades destacam-se a angiogênese, remodelação da matriz extracelular, secreção de citocinas anti-inflamatórias e resolução de inflamação, que promovem o reparo tecidual (Ishii *et al.*, 2009; Dal-Secco *et al.*, 2015; Gallagher *et al.*, 2015; Kimbal *et al.*, 2017; Olingy *et al.*, 2017). Em feridas diabéticas, a troca fenotípica pró-inflamatória para anti-inflamatória macrofágica é prejudicada e contribui para a inflamação crônica e retarda a cicatrização de feridas. A etiologia desse comportamento divergente de macrófagos no diabetes é atualmente desconhecida, mas é provavelmente multifatorial (Loots *et al.*, 1998; Wetzler *et al.*, 2000; Gallagher *et al.*, 2015; Kimbal *et al.*, 2017).

Em sequência à fase pró-inflamatória, tem início a fase caracterizada por mediadores anti-inflamatórios e uma elevada proliferação de queratinócitos e fibroblastos, que migram na direção das bordas das feridas propiciando uma reepitelização apropriada (Eming *et al.*, 2007; MacLeod & Mansbridge, 2016; Yang *et al.*, 2017). Os queratinócitos, o principal tipo de célula da epiderme, iniciam a reepitelização através de sua hiperploriferação e migração sobre a rede de fibronectina da derme lesada para cobrir a superfície epitelial. Além de seus papéis bem caracterizados na reepitelização da ferida, os queratinócitos epidérmicos desempenham um papel importante na modificação do microambiente da ferida através da secreção de fatores extracelulares como fatores de crescimento, proteases extracelulares e proteínas associadas à

matriz extracelular (Gurtner *et al.*, 2008; Martin, 1997; Santoro & Gaudino, 2005; DiPersio *et al.*, 2016).

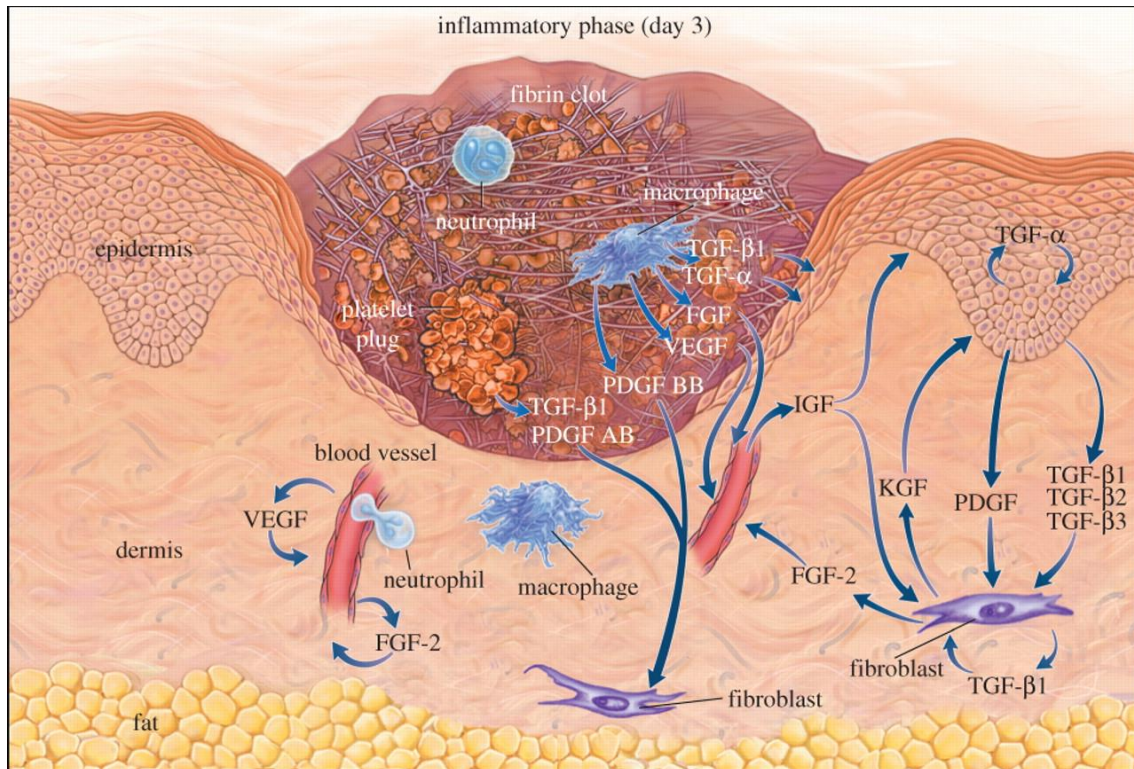


Figura 04: Esquema de uma ferida perto do final do estágio inflamatório e o início do estágio proliferativo ilustrando a interação entre as diferentes células e promotores envolvidos (Singer & Clark, 2005).

Na pele não ferida, os queratinócitos basais da epiderme estratificada aderem a uma membrana basal, que é uma matriz extracelular especializada em lâminas que consiste principalmente de colágeno tipo IV e colágeno tipo VII, separando a epiderme da matriz extracelular do tecido conectivo sub-adjacente da derme (Burgeson & Christiano, 1997). Além de manter a adesão epidérmica-dérmica, a membrana basal auxilia no controle da diferenciação epidérmica dos queratinócitos assim como na estratificação e no desenvolvimento do cabelo. Na pele ferida, os queratinócitos que estão proximais à lesão proliferam e migram ao longo da membrana extracelular provisória mutável, que é inicialmente composta de proteínas plasmáticas extravasadas como o fibrinogênio, fibronectina plasmática, vitronectina, sendo gradualmente transformada pela expressão local de fibronectina celular, colágeno tipo I e outras proteínas da matriz. A eventual remontagem de uma membrana basal intacta durante a reepitelização da ferida é essencial para restaurar a função de barreira e o suporte estrutural à neopiderme (DiPersio *et al.*, 2016).

A membrana extracelular é reestabelecida principalmente pela atuação dos fibroblastos que migram em direção ao local da lesão e proliferam, onde criam uma nova matriz extracelular rica em colágeno e fibronectina celular. Os fibroblastos especializados que possuem essa função são denominados miofibroblastos, assim conhecidos devido a expressarem uma proteína altamente contrátil, sendo fundamentais para gerar as forças adesivas e tensivas necessárias para o fechamento da lesão (Kapoor *et al.*, 2008). Durante a reparação tecidual os miofibroblastos desaparecem da ferida, a persistência dessas células na ferida caracterizam doenças fibroproliferativas, afetando tanto a pele como órgãos internos e que geralmente resultam na falência de órgãos e morte. Ambas as migrações, dos queratinócitos assim como dos fibroblastos, são dependentes da atividade do fator de crescimento transformador β (Kapoor *et al.*, 2008; MacLeod *et al.*, 2013; Erickson *et al.*, 2016; MacLeod & Mansbridge, 2016; Kitano *et al.*, 2017; Moghadam *et al.*, 2017; Qiang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017).

Ainda, os macrófagos são a maior fonte de fator de crescimento transformador β no tecido sendo reparado. O recrutamento dessas células é estimulado por oxido nítrico, além disso o oxido nítrico modula a expressão de fator de crescimento transformador β , dessa forma é sugerido que sua atividade afete o processo cura de feridas. Assim, o oxido nítrico participa em eventos celulares e moleculares durante a cura de feridas, ou seja, vasodilatação, angiogênese, inflamação, fibrose tecidual e resposta imune. Diversos autores sugerem que a síntese de oxido nítrico é essencial para a cura de feridas, sendo sua produção mediada pela oxido nítrico sintetase induzível que é regulada independente das elevações intracelulares de cálcio (Kitano *et al.*, 2017).

As integrinas são os principais receptores da superfície celular para adesão epidérmica tanto à membrana basal na pele não lesada quanto à matriz extracelular provisória na pele ferida (Hynes, 2002). As integrinas controlam uma grande variedade de funções dos queratinócitos durante a cicatrização normal das feridas, incluindo migração, proliferação, sobrevivência, regeneração da membrana basal e indução parácrina da angiogênese (Figura 05). As interações de queratinócitos mediadas por integrinas com sua membrana extracelular adjacente são dinâmicas e bidirecionais durante a cicatrização de feridas, e a expressão ou função anormal das integrinas em patologias de feridas pode contribuir para cicatrização exuberante em cicatrizes hipertróficas ou cicatrização diminuída em feridas crônicas (Koivisto *et al.*, 2014; DiPersio *et al.*, 2016).

Todas as integrinas são glicoproteínas heterodiméricas consistindo de uma subunidade α e a β . Oito diferentes subunidades β podem se ligar a cada uma das outras em combinações

limitadas com 18 subunidades α para formar 24 integrinas distintas com especificidades de ligação diferentes, embora muitas vezes sobrepostas (Hynes, 2002). Ambas as subunidades α e β consistem em um grande domínio extracelular, um domínio transmembrana de passagem única e um domínio citoplasmático relativamente curto (20 a 70 aminoácidos; a exceção é o domínio citoplasmático da subunidade $\beta 4$ com mais de 1000 aminoácidos).

Além de unir ligantes da matriz extracelular através de seus domínios extracelulares, muitas integrinas são simultaneamente ligadas ao citoesqueleto de actina via proteínas de suporte como a talina e a vinculina, que se ligam aos seus domínios citoplasmáticos, mediando assim uma ligação transmembrana física entre a matriz extracelular e o citoesqueleto que se manifesta como aderências focais (Liu *et al.*, 2000; Hynes, 2002; Delon & Brown, 2007; Iwamoto & Calderwood, 2015; DiPersio *et al.*, 2016).

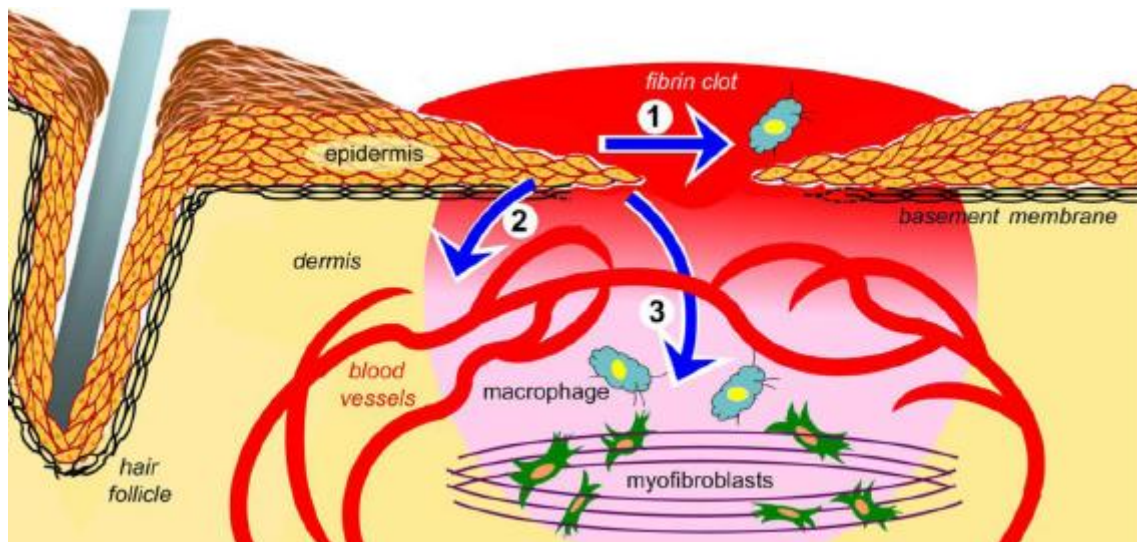


Figura 05: Ilustração demonstrando as funções que possivelmente são exercidas através das integrinas dos queratinócitos. (1) indicando a reepitelização mediada pela proliferação de queratinócitos, remodelamento da matriz extracelular e migração. (2) sinalização parácrina da epiderme para células endoteliais vasculares promotoras da angiogênese. (3) sinalização parácrina da epiderme para outras células presentes na ferida, incluindo células inflamatórias (células azuis) e fibroblastos/miofibroblastos que promovem a contração da ferida (células verdes). A ferida está indicada pelo gradiente vermelho-rosa (Adaptado de DiPersio *et al.*, 2016).

Angiogênese é a formação de novo vasos sanguíneos derivados de vasos pré-existentes. Possui uma função crucial durante a regeneração tecidual devido a proporcionar o transporte de todos os fatores necessários para a formação e reestruturação do novo tecido. Durante esse evento, as células endoteliais se diferenciam e se soltam dos capilares adjacentes, proliferam e migram de maneira direcionada, formando um túbulo alinhado e alongado. Esse novos túbulos

maturam e são reforçados através do recrutamento de células de suporte periendoteliais. Mais tarde, durante a fase de remodelação tecidual, a vasculatura regride para restaurar a densidade normal do vaso, prevenindo a hiperóxia tecidual (Szpaderska *et al.*, 2005; Wilgus *et al.*, 2008; van der Veer *et al.*, 2011; Mogili *et al.*, 2012; O’Leary *et al.*, 2015).

O controle da densidade dos vasos sanguíneos envolve a proliferação, migração e apoptose de células endoteliais, que podem ser reguladas pela acessibilidade de fatores de crescimento angiogênico, como fator básico de crescimento de fibroblastos 2, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento endotelial vascular. É importante ressaltar que muitos fatores de crescimento pró-angiogênicos são fornecidos às células endoteliais por outras células da ferida, incluindo neutrófilos, plaquetas e queratinócitos, representando vias de comunicação intercelular que controlam a angiogênese da ferida. Além disso, defeitos nessas vias podem contribuir para anormalidades vasculares associadas a feridas crônicas (Nissen *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 2005; Eming *et al.*, 2007; Johnson & DiPietro, 2013; O’Leary *et al.*, 2015; DiPersio *et al.*, 2016).

Entretanto, sabe-se que a adição do Fator de Crescimento Endotelial Vascular em feridas promove a formação de cicatrizes hiperfibróticas, sendo os níveis desse fator de crescimento reduzidos em lesões fetais sem cicatrizes assim como na cicatrização oral. A angiogênese ocorre e persiste em cicatrizes hipertróficas durante até doze semanas de pós-operatório e em cicatrizes queloides (van der Veer *et al.*, 2011; Mogili *et al.*, 2012; Johnson & DiPietro, 2013; Eming *et al.*, 2014; Johnson & Wilgus, 2014; Martinez *et al.*, 2015; O’Leary *et al.*, 2015; DiPersio *et al.*, 2016).

Durante a última fase da reepitelização ou fase de remodelamento, os tecidos recém gerados passam por alterações e remodelamento para recuperarem sua função e estrutura. Ao longo destes estágios, a matriz extracelular sofre alterações contínuas e temporalmente reguladas na composição e estrutura que fornecem sinais regulatórios críticos para uma variedade de células da ferida para garantir a cura adequada. É importante ressaltar que anormalidades nas propriedades mecânicas e químicas da matriz extracelular contribuem para patologias de feridas, como feridas crônicas ou cicatrizes hipertróficas (Eming *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2013; Kenny & Connelly, 2015; DiPersio *et al.*, 2016; MacLeod & Mansbridge, 2016; Yang *et al.*, 2017).

O processo de cicatrização de feridas pode ser retardado devido a diferentes agentes, como infecção bacteriana ou uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) no local da lesão, ameaçando células vivas. Feridas na pele são predispostas a infecção e

requerem o imediato reestabelecimento da barreira física e antimicrobiana, peptídeos antimicrobianos e proteínas como catestatina β defensinas, catelicidinas são fatores chave dessa barreira (Buchau *et al.*, 2007; Radek *et al.*, 2008; MacLeod *et al.*, 2013; Takeo, Lee & Ito, 2015; Sangbum *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017). Defeitos no reparo de feridas constituem um severo problema de saúde que afeta frequentemente pacientes idosos, com diabetes ou imunossuprimidos, assim como pacientes em tratamento quimioterápico ou radioterápico. Tais indivíduos costumam desenvolver úlceras dolorosas que não cicatrizam, sendo uma das complicações severas dessas úlceras as transformações malignas e desenvolvimento de câncer do tecido fibrótico (Qiang *et al.*, 2017).

Existe um progresso significativo em relação no desenvolvimento de terapêuticas para fechamento de feridas. Os medicamentos comerciais incluem Regranex® (Bercaplermina associado ao fator de crescimento recombinante derivado de plaquetas; Johnson & Johnson), produtos à base de prata como o Silvadene® (King Pharmaceuticals) e géis para curativos (Senet, 2004; Walker & Parsons, 2014; Bodnar, 2015). O processo fisiológico de cicatrização de feridas é de natureza multifatorial. A diminuição da resposta imune, a secreção de fatores angiogênicos ou o direcionamento de um único constituinte celular oferece sucesso limitado (Pereira & Bartolo, 2016). Assim, uma abordagem multidirecionada capaz de modular as interdependências de vários componentes da regeneração tecidual é necessária para a eficácia clínica (Moghadam *et al.*, 2017).

1.2- Peptídeos ricos em Prolina e Arginina

Proteínas possuem um papel fundamental em todos os processos biológicos, sendo o equilíbrio finamente regulado entre a síntese e degradação fator decisivo na homeostase celular. O peptídeo natural da família das cateiclinas PR-39 (RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPP) é um peptídeo natural rico em prolina e arginina secretado por macrófagos, tendo sido isolado inicialmente do intestino de porcos devido a sua atividade antibacteriana, é encontrado no exudado de feridas de diversos mamíferos assim como na borda de lesões geradas por infarto do miocárdio. Além disso, foi demonstrada sua capacidade de inibir a atividade catalítica do proteassoma 20S. (Agerberth *et al.*, 1991; Gallo *et al.*, 1994; Anbanandam *et al.*, 2008).

Ao contrário de outros inibidores, ele se liga a subunidade não proteolítica $\alpha 7$ do proteassoma 20S realizando uma inibição alostérica (Gao *et al.*, 2000; Huang & Chen, 2009).

O primeiro modelo de alosteria, Monod–Wyman–Changeux, foi apresentado a cerca de cinquenta anos atrás (Monod *et al.*, 1965). Essa forma específica de interações ocorre através de eventos que podem ser tanto covalentes como não covalentes, através da ligação de íons ou outras moléculas maiores (Sinha & Nussinov, 2001; Strickland *et al.*, 2008; Nussinov & Tsai, 2013). Assim, ligantes alostérico deveriam ser considerados atraentes para o desenvolvimentos de novos compostos biologicamente ativos, uma vez que enzimas possuem teoricamente mais sítios de ligação alostérica do que sítios ortostéricos, uma vez que estes são os responsáveis diretos por sua atividade catalítica.

Dessa forma, os efeitos de inibição alostérica podem ser mais versáteis do que o bloqueio direto do sítio ortostérico catalítico e completa inativação da proteína alvo. Além disso, sítios alostérico tendem a ser mais específicos uma vez que os sítios ortostéricos catalíticos de uma enzima tentem a serem compartilhados por todas as enzimas de uma mesma família, fazendo que drogas com inibição alostérica se tornem mais específicas (Nussinov & Tsai, 2013). Apesar dessas vantagens, drogas com inibição alostérica são pouco utilizadas, esse problema é parcialmente atribuído a compreensão inadequada das intrincadas atividades que esse tipo de inibição pode gerar a nível celular e molecular (Gaczynska & Osmulski, 2014).

No caso do PR-39, é teorizado que sua inibição alostérica ocorra através de interações eletrostáticas específicas devido a elevada concentração de cargas positivas em sua sequência. Ainda, foi demonstrado por estudos de microscopia eletrônica a alteração da estrutura de barril do proteassoma 20S após a interação com esse peptídeo, confirmando a alteração de sua estrutura nativa. Uma vez que a inibição completa desse importante complexo de degradação proteica gera o acúmulo de diversos substratos tóxicos capazes de desencadear a apoptose celular, a inibição alostérica se torna vantajosa uma vez que não inibe de maneira tão significativa sua atividade (Gaczynska *et al.*, 2003; Scocchi *et al.*, 2011).

O proteassoma é um complexo proteolítico envolvido em múltiplos processo celulares incluindo o controle da qualidade de proteínas, regulação da transcrição, divisão celular, regulação do *turnover* proteico, transdução de sinal, apoptose, entre outros. Esse complexo possui uma porção central denominada proteassoma 20S, responsável pela atividade catalítica. Em eucariotos, o proteassoma 20S possui uma massa de aproximadamente 700kD, sendo composto por dois anéis heptaméricos internos de subunidades β e dois anéis heptaméricos externos α . A atividade catalítica caspase-like, tripsina-like e quimotripsina-like são atribuídas respectivamente às subunidades β 1, β 2 e β 5 (Figura 06) (Dahlmann, 2007; Anbanandam *et al.*, 2008; Finley, 2009; Zhao *et al.*, 2017).

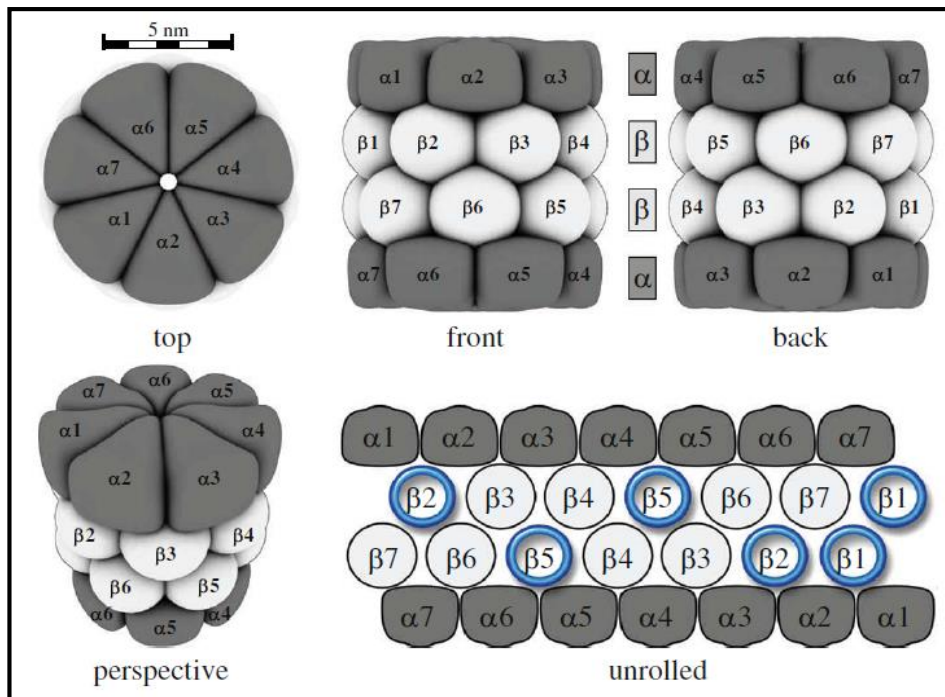


Figura 06: Estrutura do proteassoma 20S em eucariotos exemplificando a conformação heptamérica das subunidades α e β , destacando-se as subunidades catalíticas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$, responsáveis pelas atividades proteolíticas semelhantes às de caspase, tripsina e quimotripsina, respectivamente (Jung *et al.*, 2009).

Assim, devido a inibição do proteassoma através de interação alostérica (Figura 07), diferentes autores demonstram efeitos do peptídeo PR-39 que são parcialmente associados a essa capacidade inibitória, dentre eles os melhor documentados são os que envolvem sua capacidade anti-inflamatória, através da inibição da degradação de fatores $\text{I}\kappa\text{B}$, e angiogênica pela inibição da degradação de $\text{HIF-1}\alpha$ (Gao *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Bao *et al.*, 2001; Gariboldi *et al.*, 2010; Seeber *et al.*, 2010; Spirina *et al.*, 2012).

De maneira mais detalhada, a atividade anti-inflamatória é associada ao Fator Nuclear kappa B (NF κ B), responsável pela regulação de diferentes genes que codificam moléculas de adesão celular, receptores de superfície, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (Figura 08) (Pando & Verma, 2000). Na ausência de estímulo este fator encontra-se em forma de complexo disperso no citoplasma, formado através das subunidades p50, p65 e por seu inibidor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Após o estímulo celular a estresse ou citocinas, ocorre a dupla fosforilação do inibidor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ através da enzima $\text{I}\kappa\text{B}$ -quinase, o inibidor é então reconhecido por uma E3 ligase levando a sua degradação através da via ubiquitina-proteassoma. O fator NF κ B na ausência do inibidor se transloca ao núcleo se ligando a regiões promotoras de seus genes alvo (Wu, 2002).

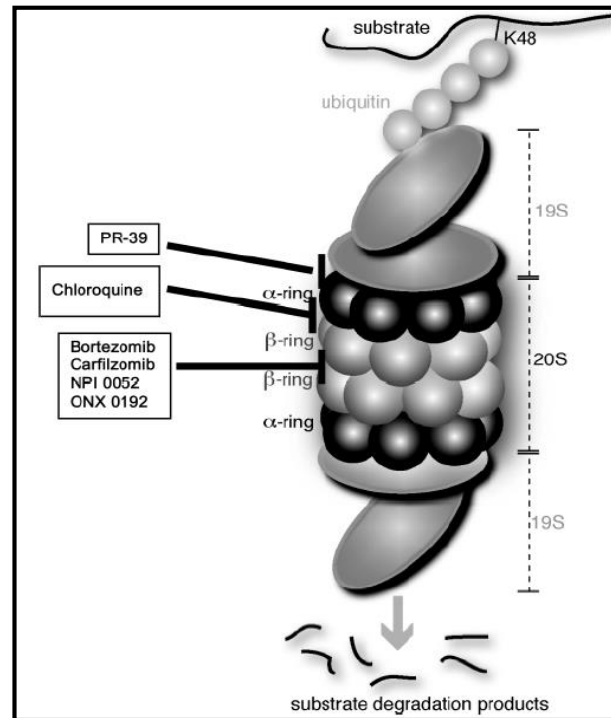


Figura 07: Diferentes sítios de ligação de inibidores do proteassoma. O inibidor reversível bortezomib e os inibidores irreversíveis carfilzomib, ONX 0192 e NPI 0052 (salinosporide A) se ligam diretamente à subunidade proteolítica β . A cloroquina interage com a interface entre as subunidades α e β . O peptídeo PR-39 liga-se às subunidades α , o que dificulta a interação de partículas regulatórias como o 19S (Ruschak *et al.*, 2011).

Na presença de inibição do proteassoma, a expressão de diferentes genes como das moléculas de adesão celular VCAM-1 (Molécula de Adesão Vascular Celular-1) e ICAM-1 (Molécula de Adesão Intercelular-1) encontram-se reduzidas. Assim, através da redução da adesão leucocitária a luz do endotélio vascular, com conseqüente diminuição de sua migração para os tecidos, segure-se que a diminuição dos danos inflamatórios relacionados a presença do PR-39 ocorra por essa via (Gao *et al.*, 2000; Gariboldi *et al.*, 2010; Seeber *et al.*, 2010; Spirina *et al.*, 2012).

Assim como sua atividade anti-inflamatória, a atividade angiogênica do PR-39 também é atribuída a diminuição da degradação proteica do sistema ubiquitina-proteassoma. Dessa forma, existem mais de uma via através da qual essa inibição poderia realizar a ativação angiogênica. Dentre essas vias, de acordo com Chan & Gallo, 1998, a inibição da degradação de HIF-1 α , que está associado a regulação de genes como do VEGF e seu receptor FLT1, e de acordo com Volk e colaboradores, 1999, sobre a expressão de receptores do fator FGF, como o FGFR-1.

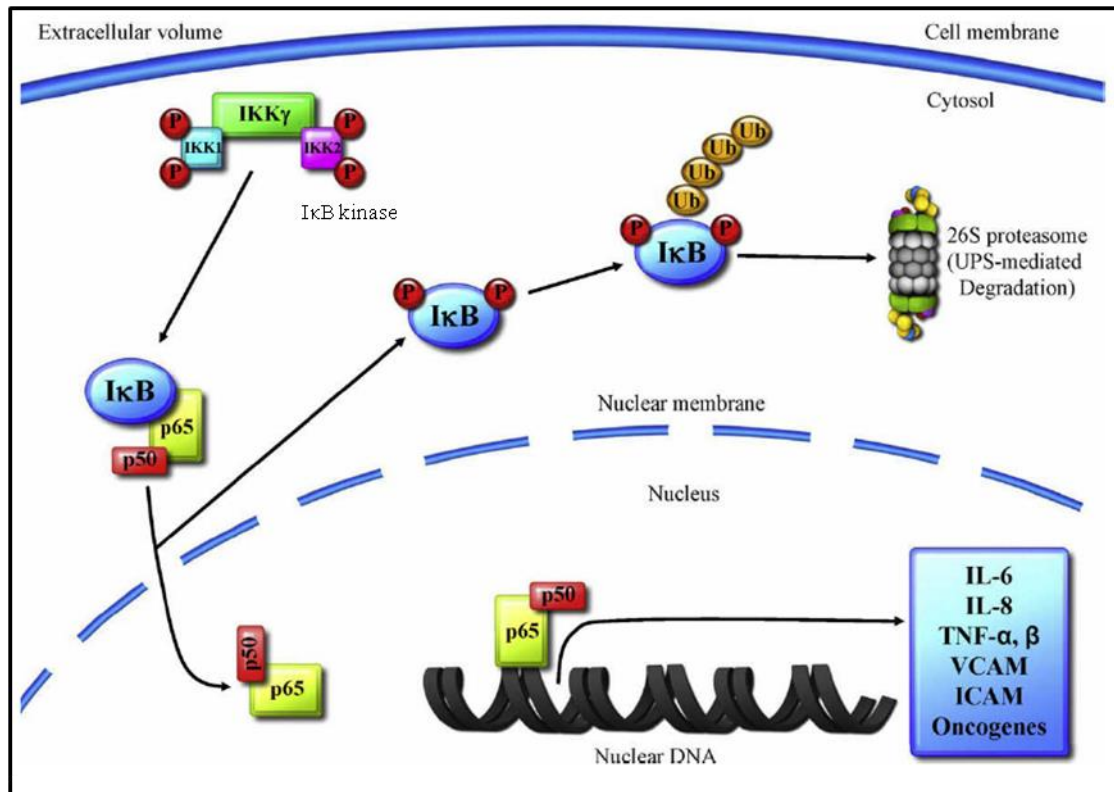


Figura 08: Regulação do fator de transcrição NFκB pelo proteassoma. O inibidor IκB é duplamente fosforilado e degradado pelo proteassoma 26S, o que libera o fator NFκB, formado pelas subunidades p50 e p65, que dispara uma cascata de transcrição de diversos genes (VCAM: *Vascular Cell Adhesion Molecule*; ICAM: *Intercellular Adhesion Molecule*) (adaptado Jung *et al.*, 2009).

Ainda, a atividade inibitória do PR-39 sobre o proteassoma eleva a expressão de sindecanas dos tipos 1 e 4 em modelos *in vitro* e *in vivo*. O aumento da expressão de sindecanas do tipo 1 é positivamente relacionada a velocidade de reepitelização durante a cicatrização e interações da adesão leucocitária. Por sua vez, o aumento da expressão de sindecanas do tipo 4 foi associada a atividade angiogênica durante a cicatrização, formação da adesão celular e regeneração muscular. Sendo a expressão dos diferentes tipos sindecanas estritamente interligado, é sugerido que essa inibição possa influenciar a expressão de sindecanas dos tipos 2 e 3, exercendo atividade sobre a angiogênese via modulação de sindecanas do tipo 2, associadas a expressão do VEGF (Gallo *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000; Tkachenko *et al.*, 2005).

Dessa forma, devido as diferentes possibilidades terapêuticas apresentadas pelo PR-39, diversos autores realizaram estudos focados na estrutura desse peptídeo com o objetivo de determinar a região responsável pela interação e inibição do proteassoma 20S, chegando a uma estrutura contendo os onze primeiros aminoácidos da região amino-terminal do PR-39 denominada PR-11, que possui a mesma capacidade de inibição do proteassoma 20S. Ainda,

foi determinado que para a atividade inibitória é necessária a presença de dois dos três resíduos carregados positivamente na região amino-terminal (arginina ou lisina) assim como resíduos hidrofóbicos na região carboxiterminal (alanina, valina, leucina, isoleucina e glicina, cisteína, fenilalanina e parcialmente triptofano e tirosina). Esses estudos também demonstram atividades de inibição superiores as apresentadas pelo PR-11 por outros análogos estruturais (Gaczynska *et al.*, 2003; Anbanandam *et al.*, 2008).

2. Justificativa

2- JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de tratamentos que exploram a complexa rede de processos envolvidos na cicatrização de feridas é complicada e possui sucesso limitado. Sabe-se que os compostos naturais interagem com numerosos alvos moleculares (Koeberle & Werz, 2014; Rodrigues *et al.*, 2016). Além disso, suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias têm atraído muitos laboratórios para usar várias formas de compostos naturais no tratamento de feridas (Tundis *et al.*, 2010; Tsala *et al.*, 2013; Moghadam *et al.*, 2017). Assim, a atividade dos análogos sintéticos do peptídeo natural PR-39, que apresentam diferentes atividades moleculares envolvidas em processos diversos como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e angiogênica, torna-se um atrativo alvo para a busca de novos compostos com elevada ação cicatrizante (Gaczynska *et al.*, 2003; Anbanandam *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2017).

3. Objetivos

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Analisar a atividade cicatrizante de peptídeos sintéticos análogos ao PR-39 assim como seu provável mecanismo de internalização celular.

3.2- Objetivos específicos

Sintetizar os peptídeos análogos ao PR-39, confirmar sua pureza assim como sua estrutura.

Sintetizar o peptídeo de internalização, confirmar sua pureza assim como sua estrutura.

Avaliar a atividade cicatrizantes dos peptídeos sintéticos PR-11, F-12 e C8C15 em modelo de excisão cutânea em *Mus musculus*.

Realizar ensaio em cultura de fibroblastos primária de *Rattus norvegicus* para avaliação do possível mecanismo de internalização dos peptídeos sintéticos análogos ao PR-39.

4. Materiais e Métodos

4- MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos utilizando animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) sob os protocolos CEUA 009/2013 e 080/2016.

Os peptídeos sintéticos utilizados nos testes de cicatrização (tabela 01) foram sintetizados no Laboratório de Enzimologia e Proteômica da Universidade Federal de Ouro Preto utilizando a metodologia descrita a seguir.

Peptídeo	Sequência
PR11	RRRPRPPYLPR
F12	RRRPRPPYLPRF
C8C15	RRRPRPPCLPRWRPCG
INTER	GCGKRK
PR-11-fluo	RRRPRPPYLPR-fluo
INTER-fluo	CGKRK-fluo

Tabela 01: Lista dos peptídeos utilizados no presente estudo e suas respectivas sequências de aminoácidos (a carboxifluoresceína foi abreviada como “fluo”).

4.1- Síntese de peptídeos em fase sólida

A síntese foi realizada de acordo com o protocolo de síntese em fase sólida, proposto por Merrifield (1965) modificado. Assim, utilizou-se aminoácidos derivatizados, protegidos em sua porção amino pelo grupo Fmoc. No caso de presença de cadeia lateral reativa, esta é igualmente protegida por um grupo adaptado à natureza da cadeia lateral que será clivado na última etapa da síntese pelo Ácido Trifluoro Acético (TFA). Foi utilizado um suporte sólido insolúvel para o acoplamento dos aminoácidos na forma da resina *Rink Amide Resin HL* (Merck, Alemanha) a 0,78 mmol/g, partindo-se de um rendimento máximo de 40 μ Moles de peptídeo por síntese.

4.1.1- Ativação da resina

A síntese foi iniciada através da pesagem e transferência de 40 μ Moles de resina (52 mg) para um tubo de síntese contendo 3 mL de Dimetilformamida (DMF), o tubo permaneceu sob agitação constante por três horas à 37°C. Foram realizadas três adições de 3 mL de 4-metilpiperidina 20% em DMF, sob agitação constante a 37°C, durante 20 minutos, para a liberação do grupamento Fmoc da resina. A resina foi lavada por três vezes alternadamente com metanol e DMF, 3 mL de solvente por lavagem, eliminando os resquícios de substâncias reativas presentes no tubo de síntese. Todas as lavagens realizadas tiveram o auxílio de uma bomba de vácuo.

4.1.2- Ativação e adição dos aminoácidos a serem acoplados

Os aminoácidos assim como os outros reagentes auxiliares foram adicionados em concentrações quatro vezes superiores (160 μ Moles) à quantidade de resina para favorecer o acoplamento. Estes aminoácidos formam uma ligação peptídica, através de seu grupamento carboxila ao grupamento amino da resina. Para o acoplamento, a cada aminoácido adicionado, acrescentou-se 2 mL de DMF, 25 μ L de Diisopropilcabodiimida (DIPC) e 23 mg de *oxyma pure* [*ethyl 2-cyano-2-(hydroxyimino)acetate*] aos tubos de síntese, sob agitação constante durante 2 horas à 37°C.

Após o acoplamento, a resina foi lavada três vezes com metanol e DMF, 2 mL de solvente por lavagem para eliminação dos resquícios de substâncias reativas, e submetida a acetilação preventiva, através da adição de 50 μ L de uma solução 1:1 de DIPC e anidrido acético em 1 mL de DMF, sob agitação à 37°C por 30 minutos. Ao final desta etapa, a resina foi novamente lavada com metanol e DMF três vezes alternadamente. A liberação do grupo Fmoc do aminoácido acoplado permitiu para a desproteção de seu grupamento amino terminal, como descrito anteriormente. A adição de carboxifluoresceína foi realizada com o mesmo procedimento realizado para adição de aminoácidos.

4.1.3- Clivagem do peptídeo

Após a finalização dos ciclos de acoplamento e eliminação do grupamento Fmoc do último aminoácido acoplado, a resina foi lavada por quatro vezes durante cinco minutos com 3

mL de diclorometano, garantindo que nenhum outro reagente estivesse presente no interior do tubo de síntese no momento da desproteção das cadeias laterais dos aminoácidos reativos e do desacoplamento da sequência peptídica da resina. Para a desproteção e desassociação dos peptídeos da resina, foram utilizados 5 mL de uma solução de clivagem contendo 95% de TFA, sob agitação constante por quatro horas. Após a clivagem e transferência da solução contendo os peptídeos para tubos de ensaio, foi realizada a precipitação por éter etílico *over night* em repouso à 4°C.

Após a precipitação, os peptídeos foram centrifugados a 1.500g por 5 minutos, novamente lavados e centrifugados a 1.500g por 5 minutos para a completa eliminação da presença do TFA. O precipitado foi então coletado para liofilização após ressuspensão em água ultra pura.

4.1.4- Purificação dos peptídeos por cromatografia em fase reversa por sistema HPLC

Foi realizada a purificação dos peptídeos sintetizados através de cromatografia em fase reversa por sistema HPLC da Shimadzu® acoplado a uma coluna de C18 (250 mm x 4,6mm) (Shim-pack CLD-ODS (M)-Shimadzu®), equilibrada com uma solução de água ultra pura e TFA 0,1%. Utilizou-se como perfil de eluição um gradiente de acetonitrila com TFA 0,1% de 20 a 60% em 30 minutos com fluxo de 1mL/min. Acompanhado através de um espectrofotômetro Shimadzu® UV-1601 PC duplo feixe a. Os peptídeos purificados foram submetidos a espectrometria de massa para sua identificação e caracterização. A concentração dos peptídeos foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar a 280 nm dos aminoácidos tirosina a $1280 \text{ M}^{-1}/\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$, triptofano a $5700 \text{ M}^{-1}/\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ e cisteína a $125 \text{ M}^{-1}/\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$.

4.1.5- Caracterização dos peptídeos por espectrometria de massas Q-exactive, Thermo Scientific®

Os peptídeos purificados foram analisados em espectrômetro de massas Q-exactive, Thermo Scientific® com uma calibração prévia utilizando trifluoroacetato de sódio, nos parâmetros de voltagem capilar de 2-3kV no modo positivo de ionização, com uma resolução de 70.000 e com tempo de injeção de 100ms e janela de detecção de 300-2000 m/z. A predição

das massas moleculares dos peptídeos foi realizada com a utilização da ferramenta *ExPASy – Compute PI/Mw tool* (disponível em http://web.expasy.org/compute_pi/).

4.2- Tratamento de feridas geradas através de excisão cutânea em *Mus musculus* swiss com peptídeos sintéticos análogos ao PR-39

Os animais utilizados, com aproximadamente 3 semanas de vida, foram anestesiados com xilazina/quetamina na proporção 25+5 mg/Kg associado ao analgésico Buprenorfina 2,5 mg/Kg. Após a confirmação da ação anestésica, a pele na região dorsal dos animais foi excisionada com a utilização de uma agulha de biópsia de 6 mm em quatro pontos. Os animais permaneceram em observação até acordarem. De maneira a diminuir o desconforto dos animais foi utilizado o analgésico Buprenorfina a 2,5mg/Kg a cada 12 horas.

O tratamento com os análogos PR-11, F-12 e C8C15, assim como o controle negativo com solução salina fosfatada e controle positivo com Bephanol®, foi realizado a cada 12 horas com produtos estéreis. Inicialmente, de maneira a reduzir o número necessário de animais, foi realizado o teste com n=8 para as concentrações de 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M e 10^{-3} M utilizando os análogos do PR-39 e o controle negativo no mesmo animal, totalizando 32 animais. Afim de minimizar qualquer influência devido ao local da incisão os tratamentos foram realizados em locais diferentes em cada animal.

Após o ensaio inicial, foram selecionados os análogos PR-11 e F-12 nas concentrações de 10^{-4} M para o refinamento do ensaio. Assim, 32 animais (n=8) foram submetidos ao tratamento com os análogos selecionados assim como com controle negativo com solução salina fosfatada e controle positivo com Bephanol® a 10^{-4} M. Os animais foram eutanasiados em diferentes períodos, 3°, 7°, 10° e 14° dia de tratamento, de maneira a abranger todas as etapas da cicatrização para a coleta de material necessário para a realização de análise histológica. A análise histológica não foi realizada devido à ausência de colaboradores, entretanto todo o material coletado foi fixado e incluso em parafina para análise posterior.

Todo o processo de cicatrização foi registrado fotograficamente com auxílio de um microscópio digital Usb Blutech® acoplado a um computador ASUS com sistema operacional Windows 8.0. A eutanásia dos animais ocorreu pela administração de xilazina/quetamina 80+22 mg/Kg.

4.2.1- Avaliação do tratamento de feridas geradas através de excisão cutânea em *Mus musculus* com peptídeos sintéticos análogos ao PR-39

As análises realizadas foram embasadas nas imagens capturadas durante os tratamentos. Foi realizada o análise quantitativa do fechamento da ferida através do programa Image J®. A área foi medida por três pessoas a cega para os dias 0, 3, 7, 10 e 14. As áreas determinadas foram utilizadas para a quantificação da área relativa de ferida fechada em cada tratamento. Além disso, foi realizada uma avaliação semiquantitativa em uma escala de 0 a 10 para a determinação do fechamento da ferida em relação a profundidade assim como da presença de exudado indicativo de infecção. Os parâmetros utilizados na determinação da profundidade da ferida foram de 0 para feridas com a superfície cicatrizadas à 10 em feridas com a mesma profundidade aparente a do dia 0. Em relação a presença de exudado indicativo de infecção foi atribuído o valor 0 na total ausência do mesmo até a nota 10 para feridas totalmente cobertas pelo exudado. Os valores para o dia 14 de tratamento foram omitidos nos gráficos por não apresentarem dados relevantes.

4.3- Produção de cultura de fibroblastos primária de *Rattus novergicus wistar*

Foi realizada a cultura primária de fibroblastos oriundos do pulmão de *Rattus novergicus wistar* de acordo com protocolo proposto por Harford, 2006, com modificações. Animais neonatos foram desinfectados e eutanasiados por decapitação para a coleta dos pulmões e a lavagem com tampão ADS (115 mM de NaCl; 20 mM de HEPES, 1 mM de Na₂HPO₄, 5 mM de D-glucose; 5 mM de KCl; 1,6 mM de MgSO₄) para remoção do excesso de sangue. Em sequência, o material coletado de cinco animais foi submetido a digestão enzimática com pancreatina 0,8 mg/mL em tampão ADS a 37°C durante 10 minutos sob agitação constante e a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de soro fetal bovino. Esse procedimento foi realizado quatro vezes em sequência com o mesmo material afim de coletar o maior número possível de células, sendo a primeira fração coletada descartada. Após a coleta, o sobrenadante foi centrifugado a 1500rpm durante 10 min. O precipitado foi coletado e ressuspendido em meio DEMEM, em sequência foi realizada sua distribuição em uma placa de 24 poços contendo o mesmo meio totalizando 1 mL por poço, sendo adicionado ao fundo do poço uma lamínula de vidro. No segundo dia foi realizada a troca do meio para remoção de

células mortos e não aderentes. O crescimento ocorreu até a confluência das células com a realização da troca do meio sempre que necessário.

4.3.1- Ensaio de internalização de peptídeos sintéticos análogos ao PR-39

Após a confluência das células de fibroblastos foi realizada a remoção do meio e a adição de meio contendo os peptídeos sintéticos com e sem a adição de carboxifluoresceína de acordo com o ensaio. Para realização da triagem (n=3 poços), apenas o peptídeo PR-11 marcado com carboxifluoresceína (PR-11-fluo) foi utilizado afim de diminuir o número total de animais. Assim, foram selecionadas 4 concentrações (10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M e 10^{-6} M) em 3 diferentes tempos (10 min, 30min e 60 min) para determinação das melhores condições de ensaio para os peptídeos. Dessa forma, foi determinado a utilização de uma concentração de 10^{-4} M e um tempo de 60 minutos de contato para os ensaios seguintes.

Os ensaios seguintes (n=6 poços), foram realizados como descrito acima utilizando o peptídeo sintético da sequência de internalização proposta por Breguez *et al.*, 2016, como competidor da internalização. O peptídeo sintético INTER marcado com carboxifluoresceína (INTER-fluo) a 10^{-4} M como controle assim como misturas em três diferentes concentrações de PR-11/INTER-fluo (10^{-4} M/ 10^{-4} M, 2×10^{-4} M/ 10^{-4} M e 5×10^{-4} M/ 10^{-4} M).

Após o término do ensaio, os poços contendo as células foram lavados com excesso de tampão PBS para remoção dos peptídeos marcados não internalizados e as células foram fixadas com solução de 20% de DMSO em Metanol a -20°C e armazenadas a 4°C até a análise. A solução fixadora foi trocada a cada doze horas durante quatro dias. -20°C para análise, as células foram submetidas a tratamento de reidratação gradativa com solução etanol/PBS.

4.3.2- Avaliação do ensaio de internalização de peptídeos sintéticos análogos ao PR-39

A avaliação será realizada em microscópio fluorescente B-G-U-UV Digilab®, sendo avaliada a intensidade de emissão de sinal por campo avaliado em relação a emissão do grupo controle.

4.4- Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPed Prism 7.03®. Foi realizado o teste ANOVA seguido de pós-teste de Turkey para comparação entre todos os valores obtidos adotando um valor de significância de $p \leq 0,05$.

5. Resultados e Discussão

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Afim de realizar o estudo foi necessário a síntese dos peptídeos PR-11, F-12, C8C15 e INTER como descrito anteriormente.

5.1- Síntese, purificação e confirmação da estrutura dos peptídeos

Como mencionado anteriormente, o peptídeo sintético PR-11 (Figura 09) é a menor porção ativa do peptídeo natural PR-39. Uma vez que esse possui atividades angiogênicas, anti-inflamatórias e sobre o proteassoma, essas atividades foram extrapoladas para o PR-11 e posteriormente confirmada por outros autores (Chan & Gallo, 1998; Volk *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2000; Gaczynska *et al.*, 2003; Freitas, 2013; Breguez *et al.*, 2016). Por sua vez, o peptídeo sintético F-12 (Figura 09) foi proposto pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Enzimologia e Proteômica liderado pelo professor Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade através de uma alteração conservativa na décima segunda posição da sequência, onde foi adicionado uma fenilalanina a porção C-terminal do PR-11 no lugar de uma prolina, original da sequência do PR-39, uma vez que a sequência N-terminal é essencial para manutenção da atividade inibitória do proteassoma.

Assim como o F-12, o C8C15 também foi proposto por esse grupo de pesquisa utilizando alterações menos conservativas, uma vez que os dois resíduos de cisteína foram adicionados na oitava e décima quinta posição da sequência, assim como foram realizadas a substituição de uma prolina na décima segunda posição por um resíduo de triptofano e de uma prolina na décima sexta posição por uma glicina. Essa última alteração ocorreu afim de aumentar o rendimento de síntese, uma vez que a cisteína é um aminoácido que ocupa um espaço relativamente grande, a adição desse resíduo de glicina estende o comprimento do braço ligante da resina e não altera de maneira impactante a atividade do peptídeo (Gaczynska *et al.*, 2003; Anbanandam *et al.*, 2008; Freitas, 2013; Breguez *et al.*, 2016).

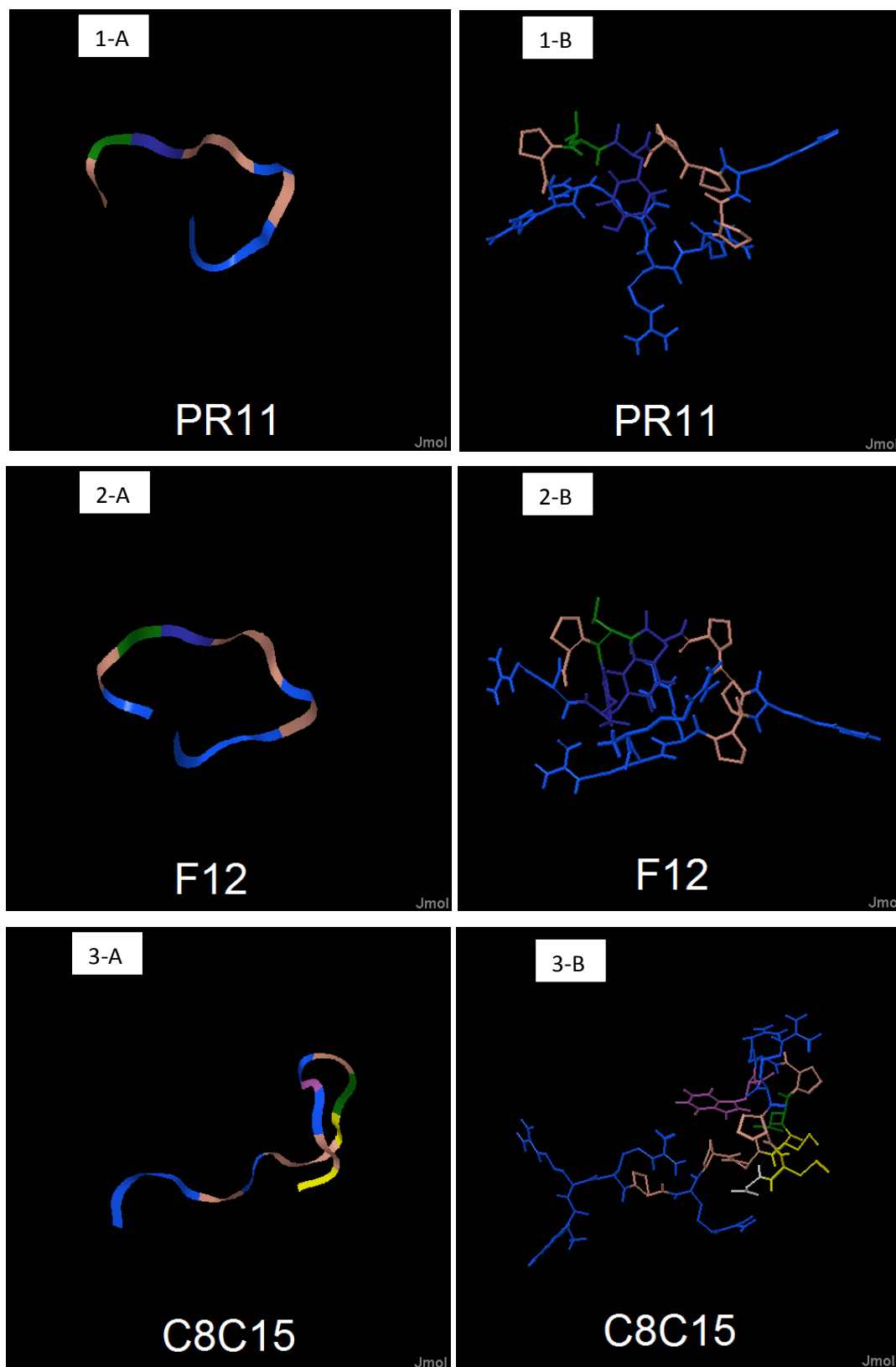


Figura 09: Estrutura 3D dos peptídeos sintetizados PR-11 (1), F-12 (2) e C8C15 nos formatos *Ribbons* (A) e *Wireframe* (B) (Modificado de Freitas, 2013).

Em estudos anteriores realizados por Freitas, 2013, foi demonstrado uma atividade inibitória sobre o proteassoma assim como uma atividade angiogênica do F-12 superiores as atividades apresentadas pelo PR-11, como mostram as Figuras 10 e 11. Por sua vez, o C8C15 apresenta uma atividade inibitória do proteassoma inferior a apresentada pelo PR-11, entretanto apresenta uma atividade angiogênica superior, fato atribuído a estrutura cíclica do peptídeo, que pode ter se tornado mais resistente a degradação. Assim, dentre as diversas modificações propostas, esses análogos foram selecionados para o estudo sobre atividade cicatrizante. Ainda, Breguez *et al.*, 2016, discute a possibilidade do mecanismo de internalização dessa classe de peptídeos estar associada ao mecanismo gC1qR, caracterizado pela internalização de peptídeos com a sequência CGKRR (peptídeo de internalização – INTER), similar a região N-terminal da sequência do PR-11.

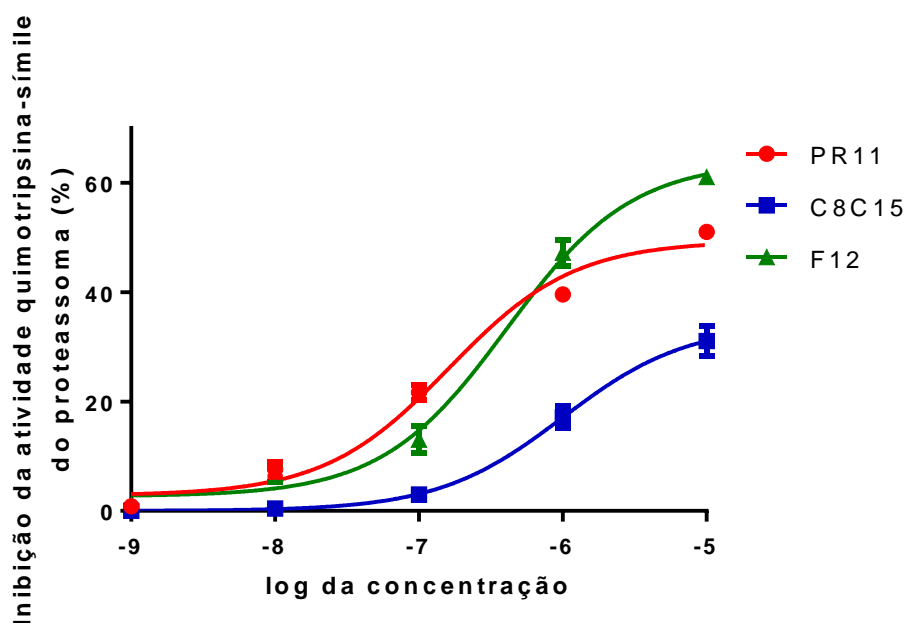


Figura 10: Atividade de inibição do proteassoma 20S pelos peptídeos sintéticos PR-11, F-12 e C8C15 (Modificado de Freitas, 2013).

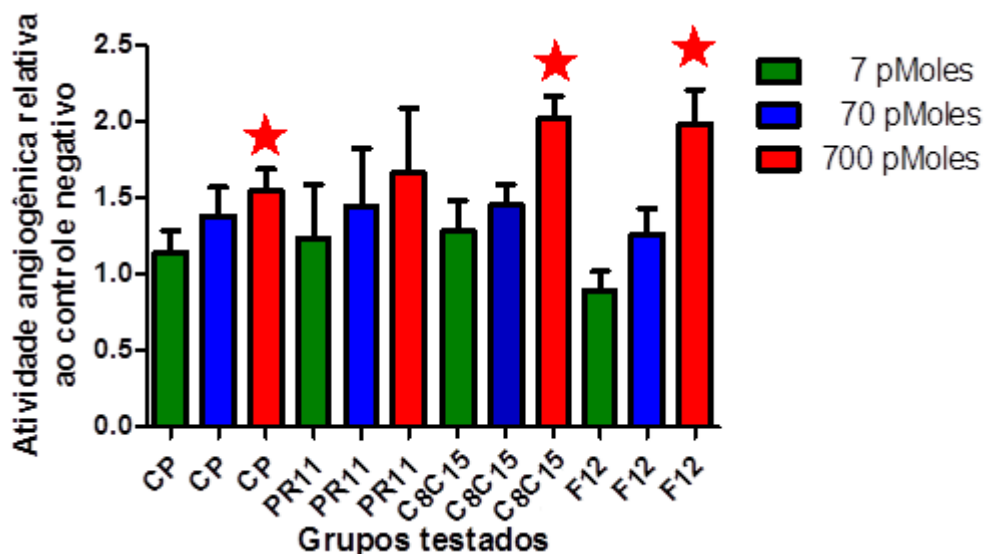


Figura 11: Atividade angiogênica dos peptídeos sintéticos PR-11, F-12, C8C15 e controle positivo com estradiol em relação ao controle negativo com salina. As estrelas destacem os grupos com atividade superior ao controle positivo com estradiol (Modificado de Freitas, 2013).

Dessa forma, os análogos PR-11, F-12 e C8C15 foram novamente sintetizados como descrito anteriormente de acordo com Merrifield, 1965, assim como o peptídeo INTER, sendo em seguida purificados em HPLC com uma coluna de C18 acoplada. Os perfis cromatográficos demonstram pureza satisfatória, caracterizada pela presença de um componente principal claramente destacado (setas) na figura 12. Por sua vez, a caracterização realizada em espectrômetro de massas Q-exactive foi capaz de confirmar o sucesso da síntese uma vez que as massas teóricas determinadas com a ferramenta *ExPASy – Compute PI/Mw tool* foram também verificadas após a síntese (Figura 13 e Tabela 2).

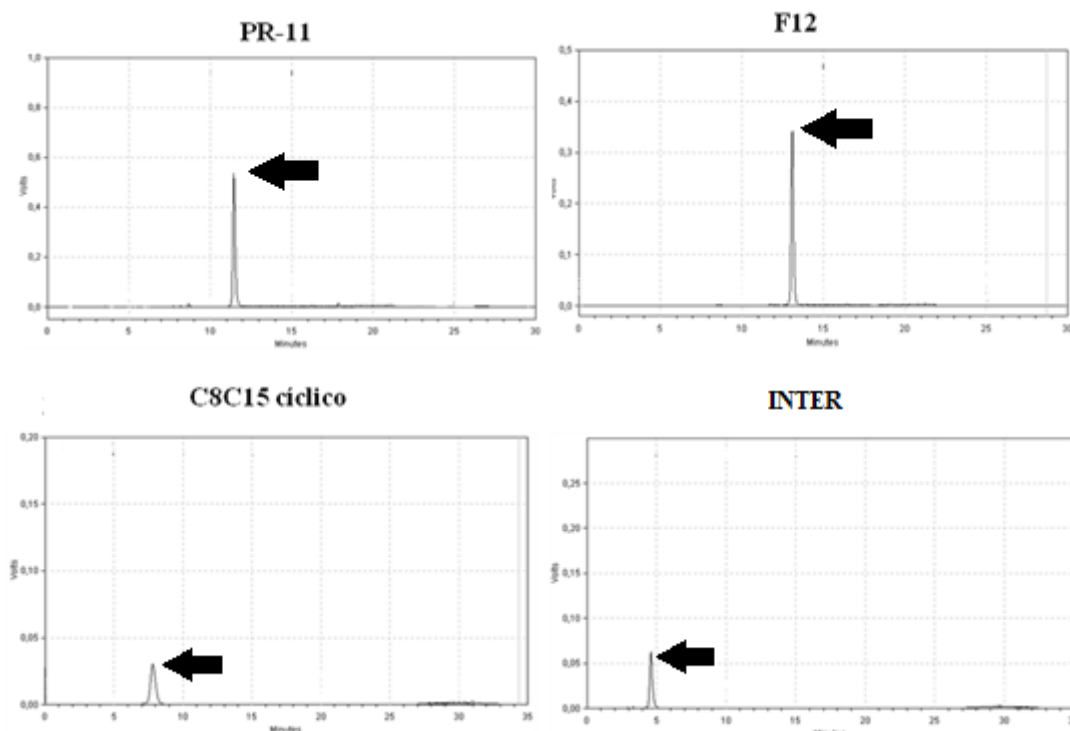


Figura 12: Perfil cromatográfico em sistema HPLC dos peptídeos PR-11, F-12, C8C15 e INTER. Foi utilizado gradiente de acetonitrila com TFA 0,1% de 20 a 60% em 30 minutos com fluxo de 1mL/min (fase estacionária: coluna C18 - 250 mm x 4,6mm - Shim-pack CLD-ODS). A seta indica o componente principal da eluição que foi utilizado para a caracterização em espectrômetro de massas.

Peptídeos	Sequência de aminoácidos	Massa teórica em u.m.a.
PR-11	RRRPRPPYLPR	1462
F-12	RRRPRPPYLPRF	1609
C8C15	RRRPRPPCLPRWRPCG	1999
INTER	GCGKRK	579

Tabela 02: Peptídeos sintéticos PR-11, F-12, C8C15 e INTER e suas respectivas sequências e massas teóricas obtidas pela ferramenta *ExPASy – Compute PI/Mw tool* em unidades de massa atômica (u.m.a).

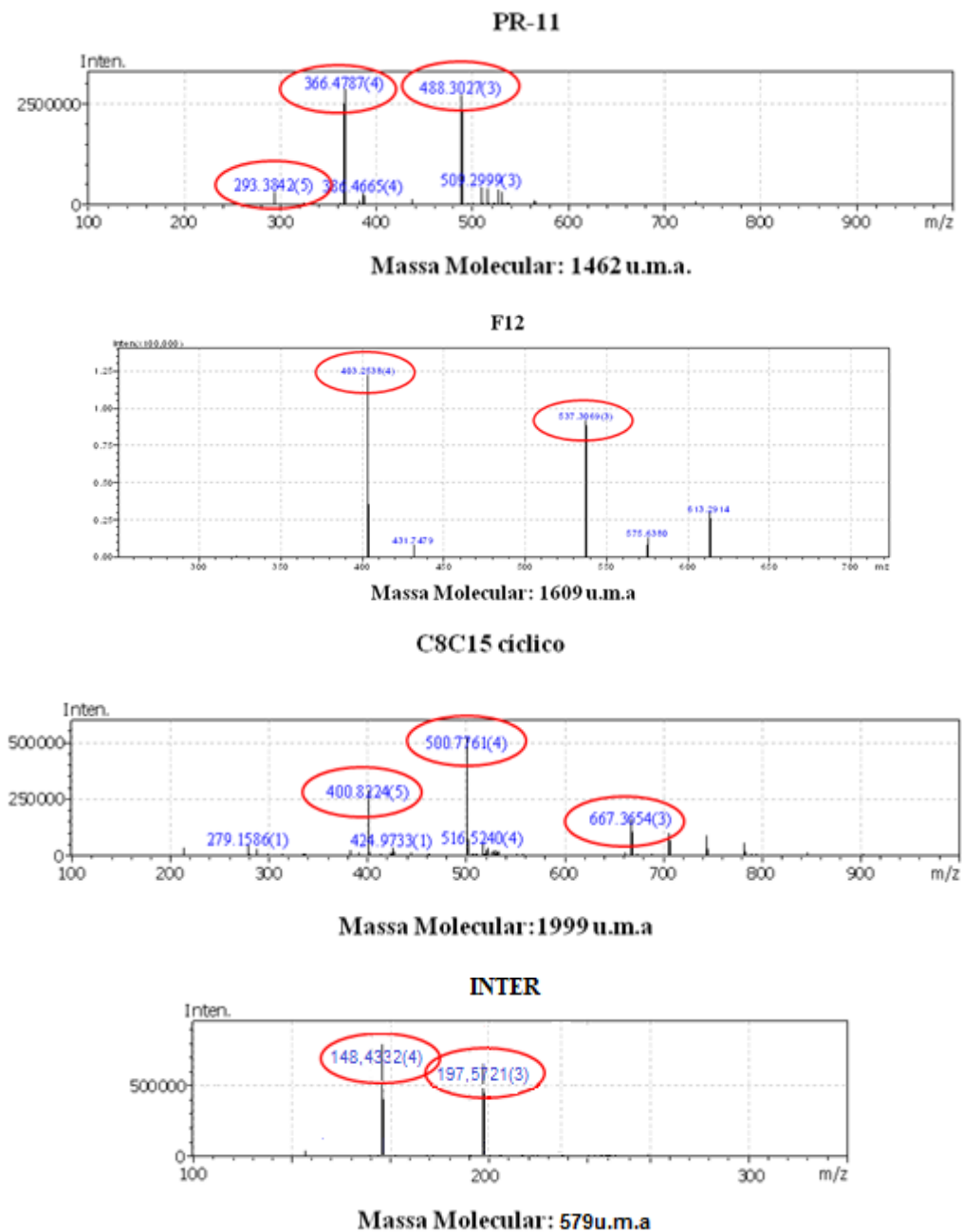


Figura 13: Espectro de massas obtido em espectrômetro Q-Exactive *electrospray* dos peptídeos PR-11, F-12, C8C15 e INTER. Os picos destacados apresentam a relação massa/carga (m/z) da massa molecular esperada. As massas teóricas foram indicadas abaixo dos espectros.

5.2- Análise da atividade cicatrizante dos análogos do PR-39 em modelo de excisão cutânea de *Mus musculus*

A ferida cutânea é resultante da alteração da integridade da pele por agentes físicos, químicos, bacterianos e virais, representando um problema de saúde pública em diversos países, sendo a cicatrização um processo essencial que contribui na manutenção da homeostase em

tecidos danificados. (Park *et al.*, 2010; Nascimento-Neto *et al.*, 2012). Esse processo é dividido em quatro fases principais constituídas pela hemostasia inicial, caracterizada pela formação de coágulo sanguíneo durante as primeiras horas após a ferida; fase inflamatória, concomitante a hemostasia, onde ocorre o recrutamento de células do sistema imune para combate a agentes infecciosos e remoção de células mortas, ocorrendo em casos normais durante aproximadamente três a sete dias; fase proliferativa, desencadeada normalmente em conjunto a fase inflamatória através da liberação fatores proliferativos é visualizada entre o terceiro e décimo quarto dia após a ferida, ocorrendo parcialmente concomitante a fase inflamatória, e a fase de remodelamento, onde a matriz extracelular, as fibras de colágeno e as células que se multiplicaram são reorganizadas para o reestabelecimento da função tecidual normal em um período que varia de alguns dias a vários meses após o final da fase proliferativa (Celli *et al.*, 2016; Erickson *et al.*, 2016; Laniat *et al.*, 2017; Qiang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017).

Durante a avaliação inicial, foram testadas diferentes concentrações de peptídeos afim de determinar qual a melhor concentração para as avaliações seguintes de forma a minimizar o número de animais necessários para a realização do experimento. Assim, foram selecionadas quatro concentrações, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M e 10^{-3} M. A aplicação dos peptídeos assim como do controle negativo com solução salina foi realizada com rotação de ponto (superior direito, superior esquerdo, inferior direito e inferior esquerdo) como mostrado na Figura 14, minimizando a possibilidade de interferência devido ao local de aplicação utilizando dois pontos iguais para cada aplicação.



Figura 14: Locais de excisão cutânea no dorso de *Mus musculus swiss*.

A análise do resultados da área da ferida (Figura 15), realizada com a ferramenta Image J®, demonstra aumento da velocidade cicatrizante para o PR-11 e F-12 no décimo dia na concentração de 10^{-5} M, e no sétimo e décimo dia nas concentrações de 10^{-4} M e 10^{-3} M. Por sua vez, o C8C15 apresentou uma melhora na velocidade cicatrizante apenas no décimo dia para as concentrações 10^{-4} M e 10^{-3} M, desencorajando a continuação da análise de sua capacidade cicatrizante. Uma vez que as concentrações de 10^{-4} M e 10^{-3} M não apresentam diferença estatística quanto a velocidade de cicatrização para os análogos PR-11 e F-12, a concentração de 10^{-4} M foi utilizada para a segunda fase de testes onde ocorreu a coleta de material para as análises histológicas.

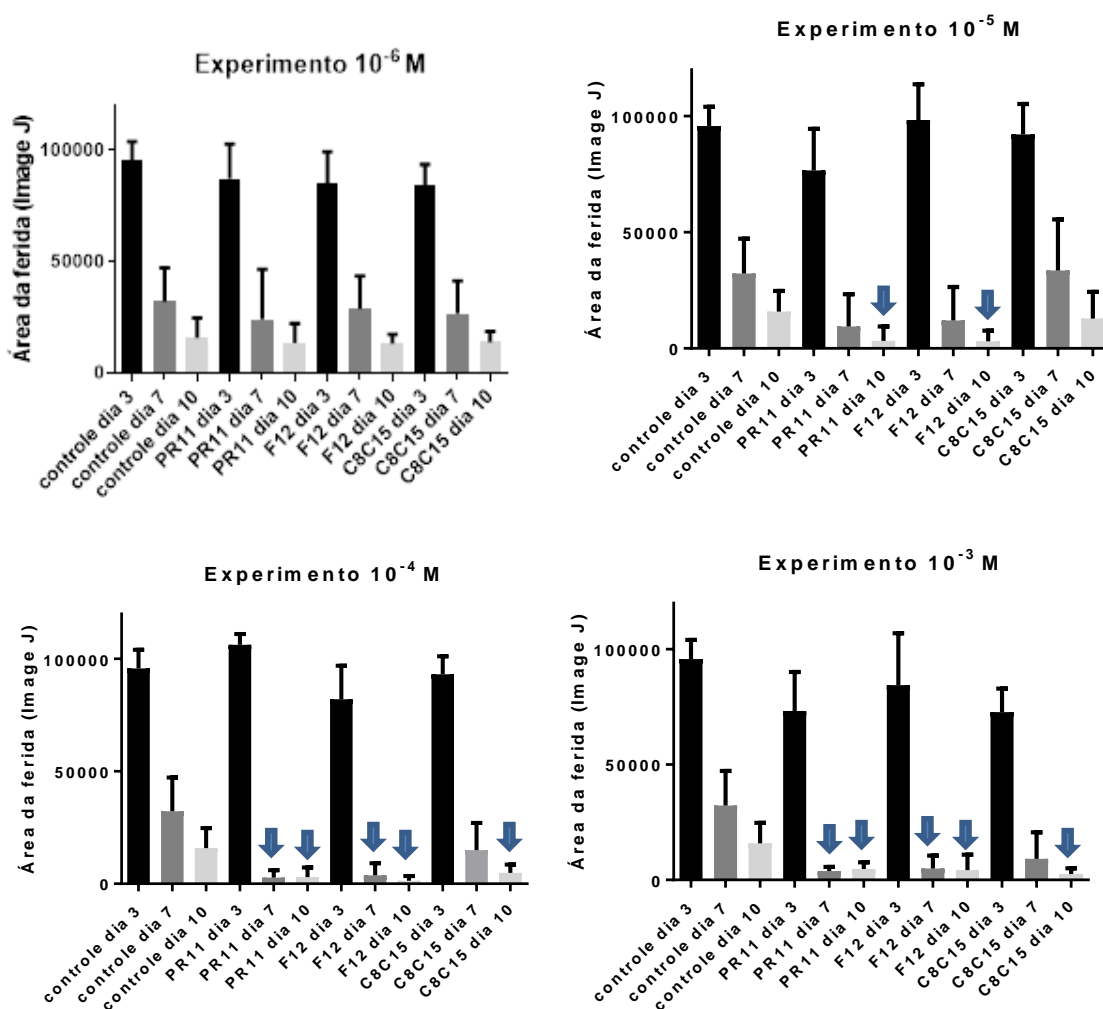


Figura 15: Análise da área da ferida do grupo controle negativo com salina e dos grupos tratados com os peptídeos sintéticos PR-11, F-12 e C8C15 nas concentrações de 10^{-5} M, 10^{-4} M e 10^{-3} M. As imagens dos dias 0, 3, 7, 10 e 14 foram capturadas com microscópio digital e analisadas com o programa Image J®. Os grupos com diferença estatística em relação ao controle negativo foi destacado com um seta azul.

Durante a segunda fase experimental, foi utilizado o Bepantol® 10^{-4} M, um cicatrizante clássico com dexpanthenol (pré-vitamina B5), como controle positivo. O controle negativo foi realizado com salina e os análogos PR-11 e F-12 na concentração de 10^{-4} M constituíram o teste. A análise da área da ferida demonstra atividade significativa no aumento da velocidade de fechamento da ferida a partir do sétimo dia para as feridas tratadas com os peptídeos PR-11 e F-12, como previsto de acordo com o experimento anterior. Por sua vez, o grupo controle positivo com Bepantol® apresenta aumento da velocidade de fechamento da ferida apenas no décimo dia de tratamento em relação ao controle negativo tanto na análise quantitativa da área da ferida quanto na análise semiquantitativa da profundidade da ferida (Figura 16 e Figura 17).

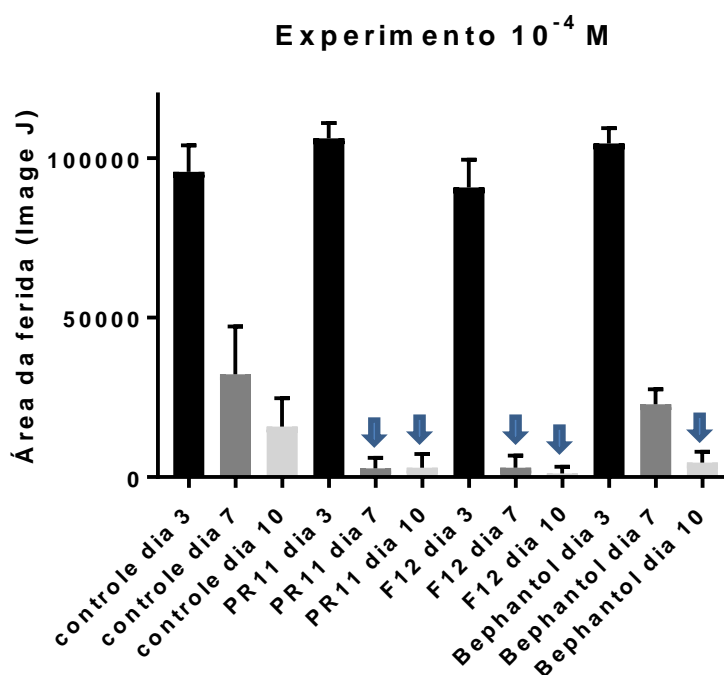


Figura 16: Análise da área da ferida do grupo controle negativo com salina e positivo com Bepantol® 10^{-4} M assim como dos grupos tratados com os peptídeos sintéticos PR-11 e F-12 na concentração de 10^{-4} M. As imagens dos dias 0, 3, 7, 10 e 14 foram capturadas com microscópio digital e analisadas com o programa Image J®. Os grupos com diferença estatística em relação ao controle negativo foi destacado com um seta.

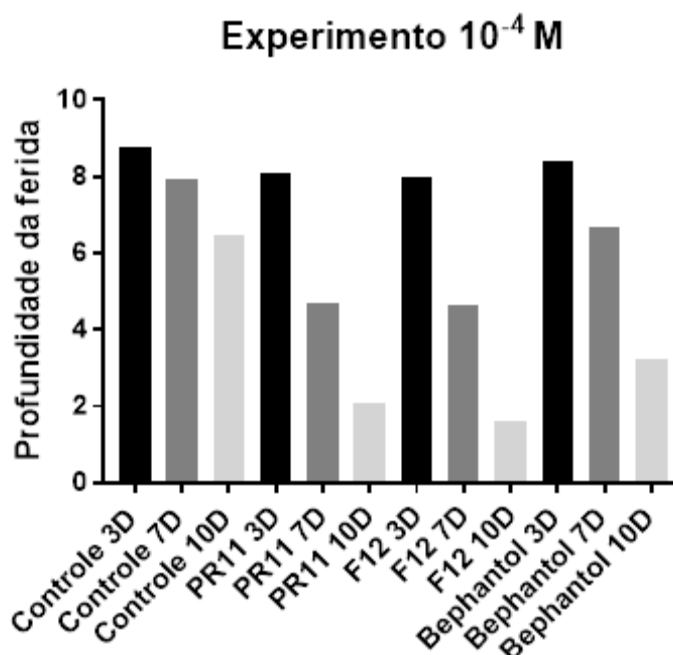


Figura 17: Análise semiquantitativa do fechamento relativo da ferida do grupo controle negativo com salina e positivo com Bephantol® 10^{-4} M assim como dos grupos tratados com os peptídeos sintéticos PR-11 e F-12 na concentração de 10^{-4} M. As imagens dos dias 0, 3, 7, 10 e 14 foram capturadas com microscópio digital e as análises realizadas por três pesquisadores distintos com imagens embaralhadas em uma classificação de 10 (ferida com maior profundidade) até 0 (ferida fechada) sendo a média dos valores utilizada para montagem do gráfico.

Devido ao envolvimento na expressão de fatores de crescimento e citocinas que coordenam os movimentos celulares e teciduais necessários ao reparo, a fase inflamatória é considerado o período mais importante da regulação da cicatrização. A quimiotaxia seguida de infiltração tecidual por neutrófilos e macrófagos no local da ferida para combater bactérias contaminantes assim como fagocitar debris celular no início da fase inflamatória resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, essas células são as fontes principais de diversas citocinas inflamatórias como a interleucina-1 β e de TNF- α , mediadores fundamentais durante o processo inflamatório cutâneo que promovem a ativação do fator nuclear κ B (NF κ B) e a produção de ROS em células inflamatórias (Meier *et al.*, 1989; Barbul, 1990; Lowry, 1993; Werner & R. Grose, 2003; Park *et al.*, 2010).

A inibição do proteassoma pelo PR-39 e seus análogos sintéticos leva a diminuição da ativação de NF κ B, um fator de transcrição que atua como uma proteína reguladora da transcrição de muitos mediadores inflamatórios, incluindo a ciclooxigenase-2 (COX-2), uma enzima limitadora da velocidade na biossíntese de prostaglandinas durante a inflamação e resposta imune presente em várias doenças inflamatórias crônicas (Park *et al.*, 2010). Além disso, a inibição de NF κ B também diminui a expressão de VCAM-1 (Molécula de Adesão

Celular Vascular 1) e ICAM-1 (Molécula de Adesão Intracelular 1), o que limita ainda mais a resposta inflamatória. Além disso, foi demonstrado que o PR-39 diminui a produção de radicais superóxidos através da ligação e inibição da NADPH oxidase (Shi *et al.*, 1996). Ainda, caracterizada a afinidade do PR-11 por diversas proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo como a catalase, peroxirredoxina-6 e isoformas da glutationa-6 transferase, ampliando ainda mais as propriedades anti-inflamatórias dessa classe de peptídeos, o que pode ser vantajoso no tratamento de feridas (Breguez *et al.*, 2016).

Os peptídeos PR-39 e análogos são estimulantes da angiogênese *in vitro* e *in vivo*. Esse efeito é parcialmente associado a inibição da degradação proteossoma do fator HIF-1 α , responsável pela regulação da expressão de diversos genes relacionados a atividade angiogênica incluindo o VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular), seu receptor VEGFR-1 (Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular 1) e Conexina 43. Ainda, foi atribuída ao PR-11 a diminuição da expressão de hnRNP D (Ribonucleoproteína nuclear heterogênia D), que em macrófagos gera a diminuição de VEGF endógeno através de ligação a 3' UTR (região não traduzida) do mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) do VEGF, o que aumenta o espectro de atividade angiogênica por esses peptídeos (Li *et al.*, 2000; Bao *et al.*, 2001; Gaczynska *et al.*, 2003; Muinck *et al.*, 2007, Freitas, 2013; Breguez *et al.*, 2016). Assim, esses análogos atuam possivelmente tanto na fase inflamatória, quanto na fase proliferativa da cura de feridas.

O PR-39, uma molécula rica em resíduos de prolina e arginina possui um amplo espectro de ação contra bactérias, incluindo isolados clínicos de bactérias multirresistentes, sendo essa atividade associada a perturbação da estabilidade da membrana celular (Linde *et al.*, 2001; Ramanathan *et al.*, 2002; Boman *et al.*, 1993; Scocchi *et al.*, 2011). A análise semiquantitativa da presença de exudado demonstra uma diminuição significativa da infecção das feridas após o sétimo dia de tratamento com o PR-11 e F12 em relação ao controle negativo com salina, enquanto o controle positivo com Bephanol® após o décimo dia de tratamento (Figura 18).

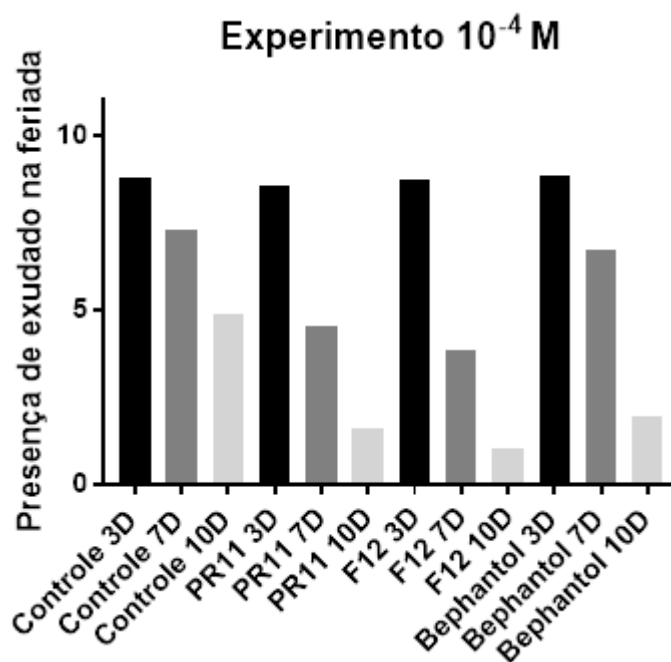


Figura 18: Análise semiquantitativa da presença de exudado indicativo de infecção da ferida do grupo controle negativo com salina e positivo com Bephantol® 10^{-4} M assim como dos grupos tratados com os peptídeos sintéticos PR-11 e F-12 na concentração de 10^{-4} M. As imagens dos dias 0, 3, 7, 10 e 14 foram capturadas com microscópio digital e as análises realizadas por três pesquisadores distintos com imagens embaralhadas em uma classificação de 10 (ferida totalmente coberta por exudado) até 0 (ferida sem presença de exudado) sendo a média dos valores utilizada para montagem do gráfico.

A compreensão dos processos envolvidos na cicatrização de feridas amplia o conhecimento da cicatrização, que define o conjunto de orientações para decisões terapêuticas assim como o desenvolvimento de produtos que fornecem soluções para o problema. Um processo de cicatrização tardia é considerado um problema complexo na medicina moderna, especialmente em relação a pacientes com diabetes e com outros distúrbios fisiológicos que exigem abordagens diferenciadas. Assim, a utilização de produtos naturais para melhorar e acelerar o processo de cicatrização tem sido amplamente utilizados, uma vez que a cicatrização tardia da pele é um importante fator econômico devido ao longo período que pacientes que sofrem de feridas crônicas ou úlceras passam em hospitais, assim como o seu gasto medicamentoso.

Apesar dos avanços no tratamento e manejo do trauma, as infecções continuam sendo uma das principais causas de mortalidade, morbidade e desordem econômica em milhões de pacientes com feridas em todo o mundo. Os desafios permanecem no combate aos microrganismos, mesmo quando há disponibilidade de antimicrobianos. Dessa forma, agentes que diminuem o tempo do processo de reparação tecidual assim como evitem infecções

bacterianas são desejados para contribuir para um processo de cicatrização mais rápido e eficaz (Diegelmann *et al.*, 2004; Ratner & Bryant, 2004; Obara *et al.*, 2005; Schultz *et al.*, 2005; Goldberg & Diegelmann, 2010; Schreml *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Nascimento-Neto *et al.*, 2012).

5.3- Análise do mecanismo de internalização do PR-11

Em seus estudos, Breguez *et al.*, 2016, determinou através de um experimento utilizando uma coluna de afinidade do peptídeo PR-11 a finalidade do mesmo pela proteína gC1qR, identificada anteriormente por Agemy *et al.*, 2013, como um ligante e transportador ativo do peptídeo carregado CGKRRK. Uma vez ligado a gC1qR, o complexo formado por esse peptídeo ligado a uma droga proapoptótica é internalizada para a mitocôndria, onde a droga é liberada (Agemy *et al.*, 2013). Foi reportado anteriormente que o PR-39 é facilmente internalizado em cultura de fibroblastos, possivelmente por um receptor ligante exposto na superfície celular (Chan & Gallo, 1998). Esses achados motivaram a busca pela confirmação da ação desse mecanismo proposto.

Para isso, culturas de fibroblastos do pulmão de *Rattus norvegicus* wistar neonatos foram realizadas para a realização de um ensaio de internalização conforme descrito anteriormente. Os ensaios iniciais demonstram que o PR-11-fluo é internalizado pelos fibroblastos, o que confirma a literatura. Assim, foi definido o tempo de exposição de 60 minutos em uma concentração de 10^{-4} M para os ensaios posteriores, uma vez que nessas condições as células apresentaram um ótima taxa de internalização com o mínimo de presença do sinal no espaço extracelular. O ensaio de internalização foi desenhado conforme descrito em materiais e métodos e deve ser realizado no mês de julho para a finalização do material a ser publicado.

6. Conclusões

6- CONCLUSÕES

A síntese em fase sólida obteve um resultado satisfatório em relação a pureza e rendimento apresentando picos únicos nos cromatogramas de todos os peptídeos sintetizados.

A avaliação do fechamento das feridas em modelo de excisão cutânea em *Mus musculus* swis apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo com salina para os peptídeos sintéticos PR-11 e F-12 nas concentrações de 10^{-5} M, 10^{-4} M e 10^{-3} M, a partir do sétimo dia de tratamento, para o C8C15 nas concentrações de 10^{-4} M e 10^{-3} M no décimo dia de tratamento e para o controle positivo com Bephanol a 10^{-4} M no décimo dia de tratamento. Esses resultados indicam uma capacidade dos análogos PR-11 e F-12 em acelerar o fechamento de feridas.

Os análogos PR-11 e F12 apresentaram uma presença inferior de exudado indicativo de infecção na concentração avaliada de 10^{-4} M a partir do sétimo dia e o controle positivo com Bephanol® 10^{-4} M apresentou essa atividade no décimo dia de tratamento. Esses resultados indicam a atividade antimicrobiana apresentada pelos análogos.

Com o somatório de resultados, a capacidade de aumento na velocidade de cicatrização da ferida assim como a diminuição da infecção das mesmas, torna os análogos PR-11 e F-12 ótimos candidatos a criação de formulação para utilização como cicatrizante.

7. Referências Bibliográficas

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agemy, L., Kotamraju, V.R.; Friedmann-Morvinski, D.; Sharma, S.; Sugahara, K.N.; Ruoslahti, E. (2013) **Proapoptotic peptide-mediated cancer therapy targeted to cell surface.** *Mol. Ther.* 21. 2195–2204.

Agerblom, B.; Lee, J.Y.; Bergman, T.; Carlquist, M.; Boman, E.G.; Mutt, V.; Jornvall, H. (1991) **Amino acid sequence of PR-39: Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides.** *Eur. J. Biochem.* 202, 849 -854.

Anbanandam, A.; Albarado, D.C.; Tirziu, D.C.; Simons, M.; Veeraraghavan, S. (2008) **Molecular basis for Proline- and Arginine-Rich Peptide inhibition of proteasome.** *J Mol Biol.* 384(1), 219–227.

Ashcroft, G.S.; Jeong, M.J.; Ashworth, J.J.; Hardman, M.; Jin, W.; Moutsopoulos, N.; *et al.* (2012) **Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing.** *Wound Repair Regen.* 20(1), 38-49.

Bao, J.; Sato, K.; Li, M.; Gao, Y.; Abid, R.; Aird, W.; Simons, M.; Post, M.J. (2001) **PR-39 and PR-11 peptides inhibit ischemia-reperfusion injury by blocking proteasome-mediated I κ B α degradation.** *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 281, 2612-2618.

Bauer, S.M.; Bauer, R.J.; Velazquez, O.C. (2005) **Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds.** *Vasc Endovascular Surg.* 39, 293–306.

Barbul, A. (1990) **Immune aspects of wound repair.** *Clinics in Plastic Surgery.* 17, no. 3, 433–442.

Buchau, A.S.; Hassan, M.; Kukova, G.; Lewerenz, V.; Kellermann, S.; Wurthner, J.U.; *et al.* (2007) **S100A15, an antimicrobial protein of the skin: regulation by E. coli through toll-like receptor 4.** *J Invest Dermatol.* 127, 2596–604.

- Bodnar, R.J. (2015) **Chemokine regulation of angiogenesis during wound healing.** *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 4, 641–650.
- Boman, H.G.; Agerberth, B.; Boman, A. (1993) **Mechanisms of action on Escherichia coli of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine.** *Infect. Immun.* 61, 2978–2984.
- Breguez, G.S.; Neves, L.X.; Silva, K.T.S.; Freitas, L.M.A.; Faria, G.O.; Isoldi, M.S.; Castro-Borges, W.; Andrade, M.H.G (2016) **Exposure of cultured fibroblasts to the peptide PR-11 for the identification of induced proteome alterations and discovery of novel potential ligands.** *Biochimica et Biophysica Acta 1864*. 1775–1786.
- Burgeson, R.E.; Christiano, A.M. (1997) **The dermal-epidermal junction.** *Curr Opin Cell Biol.* 9, 651–658.
- Celli, A.; Crumrine, D.; Meyer, J.M.; Mauro, T.M. (2016) **Endoplasmic reticulum calcium regulates epidermal barrier response and desmosomal structure.** *J Invest Dermatol.* 136, 1840–7.
- Chan, Y. R.; Gallo, R. L. (1998) **PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130 (Cas).** *J. Biol. Chem.* 273, 28978-28985.
- Chen, X.; Peng, L.H.; Li, N.; Li, Q.M.; Li, P.; Fung, K.P.; Leung, P.C.; Gao, J.Q. (2012) **The healing and anti-scar effects of astragaloside IV on the wound repair *in vitro* and *in vivo*.** *J. Ethnopharmacol.* 139, 721–727.
- Dahlmann, B. (2007) **Role of proteasomes in disease.** *BMC Biochemistry.* 8, 1471-91.
- Dal-Secco, D.; Wang, J.; Zeng, Z.; Kolaczowska, E.; Wong, C.H.; Petri, B.; Ransohoff, R.M.; Charo, I.F.; Jenne, C.N.; Kubes, P. (2015) **A dynamic spectrum of monocytes arising from the *in situ* reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury.** *The Journal of experimental medicine.* 212, 447–456.

Delon, I.; Brown, N.H. (2007) **Integrins and the actin cytoskeleton**. *Curr Opin Cell Biol.* 19, 43–50.

Diegelmann, R.F.; Evans, M.C. (2004) **Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing**. *Front Biosci.* 9, 283–289.

DiPersio, C.M.; Zheng, R.; Kenney, J.; Van De Water, L. (2016) **Integrin-mediated regulation of epidermal wound functions**. *Department Cell Tissue Res.* 365(3), 467–482.

Erickson, J.R.; Gearhart, M.D.; Honson, D.D.; Reid, T.A.; Gardner, M.K.; Moriarity, B.S.; Echeverri, K. (2016) **A novel role for SALL4 during scar-free wound healing in axolotl**. *Regenerative Medicine.* 1, 1601-6.

Eming, S.A.; Krieg, T.; Davidson, J.M. (2007) **Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms**. *J Invest Dermatol.* 127, 514–525.

Eming S.A.; Martin, P.; Tomic-Canic, M. (2014) **Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation**. *Science Translational Medicine.* 6:265–266.

Finley, D. (2009) **Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome**. *Annu Rev Biochem.* 78:477–513.

Freitas, L.M.A (2013) **atividade angiogênica de peptídeos ricos em prolina e arginina em membrana corioalantóica de *Gallus domesticus***. Dissertação de Mestrado UFOP – NUPEB/CBIOL.

Gaczynska, M.; Osmulski, P. A.; Gao, Y.; Post, M. J.; Simons, M. (2003) **Proline- and arginine-rich peptides constitute a novel class of allosteric inhibitors of proteasome activity**. *Biochemistry.* 42, 8663-8670.

Gaczynska, M.; Osmulski, P.A. (2014) **Harnessing Proteasome Dynamics and Allostery in Drug Design**. *Antioxidants & redox signaling.* 21, 17.

Gallagher, K.A.; Joshi, A.; Carson, W.F.; Schaller, M.; Allen, R.; Mukerjee, S.; *et al.* (2015) **Epigenetic changes in bone marrow progenitor cells influence the inflammatory phenotype and alter wound healing in type 2 diabetes.** *Diabetes.* 64(4):1420–30.

Gallo, R.L.; Ono, M.; Povsic, T.; Page, C.; Eriksson, E.; Klagsburn, M.; Bernfield, M. (1994) **Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 11035–11039.

Gao, Y.; Stewart-Lecker, S.; Post M.J.; Hietaranta, A.J.; Li, J.; Volk, R.; Li, M.; Sato, K.; Saluja, A.K.; Steer, M.L.; Goldberg, A.L.; Simons, M. (2000) **Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I κ B α degradation by a naturally occurring antibacterial peptide.** *J. Clin. Invest.* 106, 439–448.

Gariboldi, M.B.; Ravizza, R.; Monti, E. (2010) **The IGFR1 inhibitor NVP-AEW541 disrupts a pro-survival and proangiogenic IGFSTAT3-HIF-1 pathway in human glioblastoma cells.** *Biochem Pharmacol* 80(4), 455–462.

Goldberg, S.R.; Diegelmann, R.F. (2010) **Wound healing primer.** *Surg. Clin. N. Am.* 90, 1133–1146.

Gurtner, G.C; Werner, S.; Barrandon, Y.; Longaker, M.T. (2008) **Wound repair and regeneration.** *Nature.* 453:314–321.

Harford, J.B. (2006) **Preparation and Isolation of Cells.** *Current Protocols in Cell Biology.* 2.0.1-2.0.2

Hynes, R.O. (2002) **Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines.** *Cell.* 110:673–687.

Huang, L.; Chen, C.H. (2009) **Proteasome regulators: activators and inhibitors.** *Curr Med Chem.* 16(8): 931–939.

Ishii, M.; Wen, H.; Corsa, C.A.; Liu, T.; Coelho, A.L.; Allen, R.M.; et al. (2009) **Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype.** *Blood.* 114(15), 3244–54.

Iwamoto, D.V.; Calderwood, D.A. (2015) **Regulation of integrin-mediated adhesions.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 36, 41–47.

Johnson, A.; DiPietro, L.A. (2013) **Apoptosis and angiogenesis: an evolving mechanism for fibrosis.** *FASEB J.* 27, 3893–3901.

Johnson, K.E.; Wilgus, T.A. (2014) **Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair.** *Adv Wound Care.* 3, 647–661.

Jung, T.; Catalgol, B.; Grune, T. (2009) **The proteasomal system.** *Mol. Aspects. Med.* 30, 191-296.

Kapoor, M.; Shangxi, Liu.; Shi-wen, X.; Huh, K.; McCann, M.; Denton, C.P.; Woodgett, J.R.; Abraham, d.J.; Leask, A. (2008) **GSK-3 in mouse fibroblasts controls wound healing and fibrosis through an endothelin-1–dependent mechanism.** *J. Clinic. Investig.* 118(10).

Kenny, F.N.; Connelly, J.T. (2015) **Integrin-mediated adhesion and mechano-sensing in cutaneous wound healing.** *Cell Tissue Res.* 360, 571–582.

Kimball, A.S.; Joshi, A.D.; Boniakowski, A.E.; Schaller, M.; Chung, J.; Allen, R.; Bermick, J.; Carson, W.F.; Henke, P.K.; Maillard, I.; Kunkel, S.L.; Gallagher, K.A. (2017) **Notch Regulates Macrophage- Mediated Inflammation in Diabetic Wound Healing.** *Front. Immunol.* 8, 635.

Kitano, T.; Yamada, H.; Kida, M.; Okada, Y.; Saika, S.; Yoshida, M. (2017) **Impaired Healing of a Cutaneous Wound in an Inducible Nitric Oxide Synthase-Knockout Mouse.** *Dermatology Research and Practice.* 21, 840-851.

Koeberle, A.; Werz, O. (2014) **Multi-target approach for natural products in inflammation.** *Drug Discov Today.* 19, 1871–1882.

Koivisto, L.; Heino, J.; Hakkinen, L.; Larjava, H. (2014) **Integrins in Wound Healing**. *Adv. Wound Care*. 3, 762–783.

Kruidenier, L.; Chung, C.W.; Cheng, Z.; Liddle, J.; Che, K.; Joberty, G.; *et al.* (2012) **A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response**. *Nature* 488(7411), 404–8.

Kumar, V.; Abbas, A.; Aster, J. (2012) **Robbins Basic Pathology**. 9th Edition. *Saunders*.

Lania1, B.S.; Morari, J.; Souza, L.A.; Silva, M.N.; Almeida, A.R.; Veira-Damiani, G.; Alegre, S.M.; Cesar, C.L.; Velloso, L.A.; Cintra, M.L.; Maia, N.B.; *et al.* (2017) **Topical use and systemic action of green and roasted coffee oils and ground oils in a cutaneous incision model in rats (*Rattus norvegicus albinus*)**. *PLoS ONE*. 12(12).

Li, J.; Post, M.; Volk, R.; Gao, Y.; Li, M.; Metais, C.; Sato, K.; Tsai, J.; Aird, W.; Rosenberg, R. D.; Hampton, T. G.; Sellke, F.; Carmeliet, P.; Simons, M. (2000) **PR39, a peptide regulator of angiogenesis**. *Nat. Med.* 6, 49-55.

Linde, C.M.; Hoffner, S.E.; Refai, E.; Andersson, M. (2001) **In vitro activity of PR-39, a prolinearginine-rich peptide, against susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis***. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 575–580.

Liu, S.; Calderwood, D.A.; Ginsberg, M.H. (2000) **Integrin cytoplasmic domain-binding proteins**. *J Cell Sci.* 113, 3563–3571.

Loots, M.A.; Lamme, E.N.; Zeegelaar, J.; Mekkes, J.R.; Bos, J.D.; Middelkoop, E. (1998) **Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds**. *J. Invest. Dermatol.* 111(5), 850–7.

Lowry, S.F. (1993) **Cytokine mediators of immunity and inflammation**. *Archives of Surgery*. 128(11), 1235–1241.

MacLeod, A.S.; Hemmers, S.; Garijo, O.; Chabod, M.; Mowen, K.; Witherden, D.A.; *et al.* (2013) **Dendritic epidermal T cells regulate skin antimicrobial barrier function.** *J. Clin. Invest.* 123, 4364–74.

MacLeod, A.S.; Mansbridge, J.N. (2016) **The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds.** *Adv. Wound Care (New Rochelle).* 5(2), 65-78.

Martin, P. (1997) **Wound healing: Aiming for perfect skin regeneration.** *Science.* 276(5309), 75-81.

Martinez, F.O.; Helming, L.; Gordon, S. (2009) **Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective.** *Annu Rev Immunol.* 27, 451–83.

Martinez, C.E.; Smith, P.C.; Palma Alvarado, V.A. (2015) **The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update.** *Frontiers in Physiology.* 6, 290.

Maynard, J. (2015) **How Wounds Heal: The 4 Main Phases of Wound Healing.** *Ostomy and Wound Care Shield HealthCare.*

<http://www.shieldhealthcare.com/community/wound/2015/12/18/how-wounds-heal-the-4-main-phases-of-wound-healing/> acesso em 03/05/2018

McGee, H.M.; Schmidt, B.A.; Booth, C.J.; Yancopoulos, G.D.; Valenzuela, D.M.; Murphy, A.J.; *et al.* (2013) **IL-22 promotes fibroblast-mediated wound repair in the skin.** *J. Invest. Dermatol.* 133, 1321–9.

Meier, B.; Radeke, H.H.; Selle, S.; *et al.* (1989) **Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor- α .** *Biochemical Journal,* 263(2), 539–545.

Merrifield, R. B. (1965) **Solid-Phase Peptide Syntheses.** *Endeavour.* 24, 3-7.

Moghadam, S.E.; Ebrahimi, S.M.; Salehi, P.; Farimani, M.M.; Hamburger, M.; Jabbarzadeh, E. (2017) **Wound Healing Potential of Chlorogenic Acid and Myricetin-3-O- β -Rhamnoside Isolated from *Parrotia persica*. *Molecules*. 22(9).**

Mogili, N.S.; Krishnaswamy, V.R.; Jayaraman, M.; Rajaram, R.; Venkatraman, A.; Korrapati, P.S. (2012) **Altered angiogenic balance in keloids: A key to therapeutic intervention. *Transl. Res.: J. Lab. Clin. Med.* 159, 182–189.**

Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J.P. (2013) **On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12, 88–118.**

Muinck, E.D.; Nagy, N.; Tirziu, D.; Murakami, M.; Gurusamy, N.; Goswami, S.K.; Ghatpande, S.; Engelman, M.; Simons, R.M.; Das, D.K. (2007) **Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury by the angiogenic Masterswitch protein PR 39 gene therapy: the roles of HIF1alpha stabilization and FGFR1 signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 437–445.**

Nascimento, A.P.; Costa, A.M. (2006) **Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *Br. J. Nutr.* 96(6), 1069-77.**

Nascimento-Neto, L.G.; Carneiro, R.F.; Silva, S.R.; Silva, B.R.; Arruda, F.V.S.; Carneiro, V.A.; Nascimento, K.S.; Saker-Sampaio, S.; *et al.* (2012) **Characterization of Isoforms of the Lectin Isolated from the Red Algae *Bryothamnion seaforthii* and Its Pro-Healing Effect. *Mar. Drugs*. 10, 1936-1954.**

Nelson, A.M.; Loy, D.E.; Lawson, J.A.; Katseff, A.S.; Fitzgerald, G.A.; Garza, L.A. (2013) **Prostaglandin D2 inhibits wound-induced hair follicle neogenesis through the receptor, Gpr44. *J. Invest. Dermatol.* 133, 881–889.**

Nissen, N.N.; Polverini, P.J.; Koch, A.E.; Volin, M.V.; Gamelli, R.L.; DiPietro, L.A. (1998) **Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am. J. Pathol.* 152, 1445–1452.**

Nussinov, R.; Tsai, C.J. (2013) **Allostery in disease and in drug discovery.** *Cell.*153, 293–305.

Obara, K.; Ishihara, M.; Fujita, M.; Kanatani, Y.; Hattori, H.; Matsui, T.; Takase, B.; Ozeki, Y.; Nakamura, S.; Ishizuka, T.; *et al.* (2005) **Acceleration of wound healing in healing-impaired db/db mice with a photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2.** *Wound Repair. Regen.* 13, 390–397.

O’Leary, A.P.; Fox, J.M.; Pullar, C.E. (2015) **Beta-adrenoceptor Activation Reduces Both Dermal Microvascular Endothelial Cell Migration via a cAMP-dependent Mechanism and Wound Angiogenesis.** *J. Cell. Physiol.* 230, 356–365.

Olingy, C.E.; Cheryl, L.; Emeterio, S.; Ogle, M.E.; Krieger, J.R.; Bruce, A.C.; Pfau, D.D.; Jordan, B.T.; Peirce, S.M.; Botchwey, E.A. (2017) **Non-classical monocytes are biased progenitors of wound healing macrophages during soft tissue injury.** *Scientific Reports.* 7, 447.

Pando, M.P.; Verma, I.M. (2000) **Signal-dependent and -independent degradation of free and NF-kappa B-bound IkappaBalpha.** *J. Biol. Chem.* 275, 21278-21286.

Park, N.Y.; Valacchi, G.; Lim, Y. (2010) **Effect of Dietary Conjugated Linoleic Acid Supplementation on Early Inflammatory Responses during Cutaneous Wound Healing.** *Mediators of Inflammation.* (342328).

Pereira, R.F.; Bartolo, P.J. (2016) **Traditional therapies for skin wound healing.** *Adv. Wound Care.* 5, 208–229.

Qiang, L.; Sample, A.; Liu, H.; Wu, X.; He, Y.Y. (2017) **Epidermal SIRT1 regulates inflammation, cell migration, and wound healing.** *Scientific Reports.* 7, 14110.

Radek, K.A.; Lopez-Garcia, B.; Hupe, M.; Niesman, I.R.; Elias, P.M.; Taupenot, L.; *et al.* (2008) **The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury.** *J. Invest. Dermatol.* 128, 1525–34.

Ramanathan, B.; Davis, E.G.; Ross, C.R.; Blecha, F. (2002) **Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity.** *Microbes Infect.* 4, 361–372.

Ratner, B.D.; Bryant, S.J. (2004) **Biomaterials: Where we have been and where we are going.** *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 6, 41–75.

Richardson, R.; Slanchev, K.; Kraus, C.; Knyphausen, P.; Eming, S.; Hammerschmidt, M. (2013) **Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound-healing research.** *J. Invest. Dermatol.* 133, 1655–1665.

Rodrigues, T.; Reker, D.; Schneider, P.; Schneider, G. (2016) **Counting on natural products for drug design.** *Nat. Chem.* 8, 531–541.

Ruschak, A.M.; Slassi, M.; Kay, L.E.; Schimmer, A.D. (2011) **Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance.** *J Natl. Cancer Inst.* 103, 1007-1017.

Sangbum, P.; Gonzalez, D.G.; Guirao, B.; Boucher, J.D.; Cockburn, K.; Marsh, E.D.; Mesa, K.R.; Brown, S.; Rompolas, P.; Haberman, A.M.; Bellaïche, Y.; Greco, V. (2017) **Tissue-scale coordination of cellular behavior promotes epidermal wound repair in live mice.** *Nat. Cell Biol.* 19(2), 155–163.

Santoro, M.M.; Gaudino, G. (2005) **Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing.** *Exp. Cell Res.* 304, 274–286.

Schreml, S.; Szeimies, R.M.; Prantl, L.; Landthaler, M.; Babilas, P. (2010) **Wound healing in the 21st century.** *J. Am. Acad. Dermatol.* 63, 866–881.

Schultz, G.; Mozingo, D.; Romanelli, M.; Claxton, K. (2005) **Wound healing and TIME: new concepts and scientific applications.** *Wound Rep. Reg.* 13, S1–S11.

Scocchi, M.; Tossi, A.; Gennaro, R. (2011) **Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action.** *Cell. Mol. Life. Sci.* 68, 2317-2330.

Seeber, L.M.; Zweemer, R.P.; Verheijen, R.H.; van Diest, P.J. (2010) **Hypoxia inducible factor-1 as a therapeutic target in endometrial cancer management.** *Obstet. Gynecol. Int.* 580971–580979.

Seifert, A.W.; Kiama, S.G.; Seifert, M.G.; Goheen, J.R.; Palmer, T.M.; Maden, M. (2012) **Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*).** *Nature.* 489, 561–565.

Senet P. (2004) **Becaplermin gel (regranex gel).** *Ann. Dermatol. Venereol.* 131, 351–358.

Shi, J.; Ross, C.R.; Leto, T.L.; Blecha, F. PR-39, (1996) **A proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 6014–6018.

Singer, A.J.; Clark, R.A. (1999) **Cutaneous wound healing.** *N. Engl. J. Med.* 341, 738–746.

Sinha, N.; Nussinov, R. (2001) **Point mutations and sequence variability in proteins: redistributions of preexisting populations.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3139–3144.

Spirina, L.V.; Yunusova, N.V.; Kondakova, I.V.; Kolomiets, L.A.; Koval, V.D.; Chernyshova, A.L.; Shpileva, O.V. (2012) **Association of growth factors, HIF-1 and NF- κ B expression with proteasomes in endometrial cancer.** *Mol. Biol. Rep.* 39, 8655–8662.

Strickland, D.; Moffat, K.; Sosnick, T.R. (2008) **Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 10709–10714.

Szpaderska, A.M.; Walsh, C.G.; Steinberg, M.J.; DiPietro, L.A. (2005) **Distinct patterns of angiogenesis in oral and skin wounds.** *J. Dent. Res.* 84, 309–314.

Takeo, M.; Lee, W.; Ito, M. (2015) **Wound Healing and Skin Regeneration.** *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, a023267.

Tkachenko, E.; Rhodes, J.M.; Simons, M. (2005) **Syndecans: New Kids on the Signaling Block.** *Circ. Res.* 96, 488-500.

Tsala, D.E.; Amadou, D.; Habtemariam, S. (2013) **Natural wound healing and bioactive natural products.** *Phytopharmacology.* 4, 532–560.

Tundis, R.; Loizzo, M.; Menichini, F. (2010) **Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: An update.** *Mini Ver. Med. Chem.* 10, 315–331.

van der Veer, W.M.; Niessen, F.B.; Ferreira, J.A.; Zwiers, P.J.; de Jong, E.H.; Middelkoop, E.; Molema, G. (2011) **Time course of the angiogenic response during normotrophic and hypertrophic scar formation in humans.** *Wound Repair Regen.* 19, 292–301.

Volk, R.; Schwartz, J.J.; Li, J.; Rosenberg, R.D.; Simons, M. (1999) **The role of syndecan cytoplasmic domain in basic fibroblast growth factor-dependent signal transduction.** *J. Biol. Chem.* 274, 24417-24424.

Walker, M.; Parsons, D. (2014) **The biological fate of silver ions following the use of silver-containing wound care products—A review.** *Int. Wound J.* 11, 496–504

Wang, Z.; Wang, Y.; Farhangfar, F.; Zimmer, M.; Zhang, Y. (2012) **Enhanced keratinocyte proliferation and migration in co-culture with fibroblasts.** *PLoS ONE.* 7, e40951.

Werner, S.; Grose, R. (2003) **Regulation of wound healing by growth factors and cytokines.** *Physiological Reviews.* 83(3), 835–870.

Wetzler, C.; Kampfer, H.; Stallmeyer, B.; Pfeilschifter, J.; Frank, S. (2000) **Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macro-phages during the late phase of repair.** *J Invest Dermatol.* 115(2), 245–53.

Wilgus, T.A.; Ferreira, A.M.; Oberyshyn, T.M.; Bergdall, V.K.; Dipietro, L.A. (2008) **Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor.** *Lab. Invest.* 88, 579–590.

Wong, P.; Coulombe, P.A. (2003) **Loss of keratin 6 (K6) proteins reveals a function for intermediate filaments during wound repair.** *J. Cell Biol.* 163, 327–37.

Wu, J. (2002) **On the role of proteasomes in cell biology and proteasome inhibition as a novel frontier in the development of immunosuppressants.** *Am. J. Transplant.* 2, 904-912.

Yang, B.; Suwanpradid, J.; Sanchez-Lagunes, R.; Choi, H.W.; Hoang, P.; Wang, D.; Abraham, S.N.; MacLeod, A.S. (2017) **IL-27 Facilitates Skin Wound Healing through Induction of Epidermal Proliferation and Host Defense.** *J. Invest. Dermatol.* 137(5), 1166–1175.

Zhou, K.; Muroyama, A.; Underwood, J.; Lylek, R.; Ray, S.; Soderling, S.H.; *et al.* (2013) **Actin-related protein2/3 complex regulates tight junctions and terminal differentiation to promote epidermal barrier formation.** *Proc. Natl. Acad. Sciences U.S.A.* 110, E3820–9.

Zhao, C.; Chen, X.; Yang, C.; Zang, D.; Lan, X.; Liao, S.; Zhang, P.; Wu1, J.; *et al.* (2017) **Repurposing an antidandruff agent to treating cancer: zinc pyrithione inhibits tumor growth via targeting proteasome-associated deubiquitinases.** *Oncotarget.* 8(8), 13942-13956.