UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ESTRUTURA E FUNÇÃO DE MASTOPARANOS DOS VENENOS DE VESPAS

Bibiana Monson de Souza

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular).

Dez - 2006

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Mario Sergio Palma** pela dedicada orientação, confiança, empenho e esforço para que este trabalho pudesse ser realizado e principalmente, pela grande amizade.

Aos Prof. **Dr.João Ruggiero Neto** e à amiga **Márcia Perez dos Santos Cabrera** pelas sugestões e ensaios de Dicroísmo Circular.

Ao Prof. Dr. **Osmar Norberto de Souza** pelos ensinamentos em Dinâmica Molecular.

Á Profa. Dra. **Maria Alice Höfling** e **Thalita Rocha** pela contribuição científica.

Ao Prof. Dr. **Fernando Carlos Pagnocca** por ceder os microrganismos utilizados neste trabalho.

Aos Professores e funcionários do Centro de Estudos de Insetos Sociais (C.E.I.S.) e da UNESP.

Ao Sr. Relator deste projeto junto à FAPESP, pelas sugestões e críticas para que este trabalho crescesse e amadurecesse. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

Ao meu companheiro **Dudu**, por todo carinho, amor, compreensão, incentivos, broncas, sorrisos... enfim, por você existir em minha vida.

Aos meus pais **Mauro** e **Carolina**, pelo grande apoio, estímulo, dedicação e amor. Agradeço também pela compreensão aos momentos em que não pude estar fisicamente com vocês.

Aos meus irmãos, **Pai Gustavo** (o Gu), **Paula** e **Marina**, por vocês existirem, pelo companheirismo, amizade e por todos os momentos de felicidade que me proporcionam.

Aos meus avós, **Romeu** e **Tina**, por todo o carinho sempre presente.

À minha nova família, **Sr. Geraldo**, **D. Penha**, **Rafa**, **Lê**, **Marta**, **Ana**, **Ênia**, **Crêmes**, **Elisa** e **Ligo** por todo carinho e alegria.

Aos amigos do LBEZ, **Lucy**, **Keity**, **Maurício**, **Paulo**, **Nicoli**, **Daniel**, **Fernanda**, **Alessandra**, **Nathalia**, **Lílian**, **Roberta**, **Beto**, **Meire**, **Luiz**, **Taty**, pela colaboração, companheirismo e pelos momentos de descontração.

Aos amigos **Marília**, **Thalita**, **Bruna**, **Kleber**, **Andrigo** e **Maria Fernanda**, **Zé Ricardo**, **Leandro** e **Anita**, por todos os momentos de alegria e companherismo.

À grande companheirinha e amiga **Gabi**.

Aos eternos companheiros **Pai Benedito**, **Vovó Margarida**, **Itajupira**, **Juraci**, **Zé do Coco**, **Juvenal**, **Joãozinho**, **Rosinha**, **Sete** e **D. Violeta**, pela dedicação, carinho, conselhos e ajuda.

E a **Deus**, que me deu a oportunidade de realizar este trabalho junto a todos vocês.

Obrigada!

ÍNDICE

1. RESUMO..... 1
2. ABSTRACT..... 3
3. INTRODUÇÃO..... 5
4. REVISÃO DA LITERATURA..... 8
41. Farmacologia e composição geral do veneno de Hymenopteras..... 8
4.2. Bioquímica e farmacologia do veneno de vespas..... 10
4.2.1. Cininas..... 12
4.2.2. Ves-CPs..... 14
4.2.3. Mastoparanos..... 15
4.2.4. Peptídeos antibióticos..... 20
4.2.5. Neurotoxinas..... 23
4.3. Mecanismos de interação peptídeo-membrana..... 24
4.4. Estudos estruturais de peptídeos biologicamente ativos..... 28
5. OBJETIVOS..... 33
6. MATERIAIS E MÉTODOS..... 34
6.1. Síntese manual de peptídeos em fase sólida..... 34
6.2. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)..... 36
6.3. Espectrometria de massas ESI..... 37
6.4. Seqüênciamento por Química Degradativa de Edman..... 37
6.5. Dicroísmo circular..... 38
6.6. Preparo dos lipossomos..... 40
6.7. Modelagem molecular por homologia..... 41
6.8. Métodos de validação dos modelos estruturais..... 41
6.8.1. Procheck..... 42
6.8.2. Diagrama de Ramachandran..... 42
6.8.3. *G-factor*..... 44
6.8.4. RMSD..... 45
6.9. Dinâmica molecular..... 46
6.10. Troca isotópica H/D..... 51
6.11. Atividade hemolítica..... 53
6.11.1. Obtenção dos eritrócitos..... 53
6.11.2. Ensaio de hemólise..... 54

6.12. Degranulação de mastócitos..... 54
6.12.1. Preparo das soluções..... 54
6.12.2. Isolamento dos mastócitos..... 55
6.12.3. Ensaio de degranulação de mastócitos..... 56
6.13. Prova de sensibilidade bacteriana (Antibiograma)..... 57
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 59
7.1. Síntese, purificação e controle de qualidade dos peptídeos..... 59
7.2. Estudos estruturais..... 64
7.3. Modelagem e estudos de Dinâmica Molecular..... 81
7.4. Estudos de troca H/D dos complexos proteolipossomos..... 107
7.5. Ensaios de atividades biológicas..... 120
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 126
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 135

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Modelos de interação do peptídeo Alameticina com membranas de fosfolipídeos de acordo com Yang et al. (2001)..... 26

2. Ilustração do modelo barril, sugerido para a penetração de peptídeos nas membranas, segundo Oren & Shai (1998)..... 27

3. Esquema da formação do poro toroidal transiente segundo Matsuzaki (1998)..... 28

4. Sobreposição a) das 20 estruturas finais calculadas do EMP-AF-NH_2; b) das 35 estruturas finais calculadas do EMP-AF-COOH em presença de 30:70 (v/v) solução de TFE/água (Sforça et al., 2004)..... 30

5. Diagrama de Ramanchandran..... 44

6. Exemplo de definição do sistema de simulação..... 48

7. Perfil cromatográfico sob fase reversa do peptídeo Protonectarina-MP, sob condições isocráticas de Acetonitrila 53% (v/v) [contendo TFA 0,1% (V/V)] em coluna Nucleosil C18 (10 x 250 mm) e fluxo de 2 Ml/min..... 59

8. Perfil cromatográfico sob fase reversa do peptídeo Parapolybia-MP, sob condições isocráticas de Acetonitrila 58% (v/v) [contendo TFA 0,1% (V/V)] em coluna Nucleosil C18 (10 x 250 mm) e fluxo de 2 mL/min..... 60

9. Perfil cromatográfico sob fase reversa do peptídeo Apoica-MP, sob condições isocráticas de Acetonitrila 60% (v/v) [contendo TFA 0,1% (V/V)] em coluna Nucleosil C18 (10 x 250 mm) e fluxo de 2 mL/min..... 60

10. Perfil cromatográfico sob fase reversa do peptídeo Asn2-Polybia-MP I, sob condições isocráticas de Acetonitrila 60% (v/v) [contendo TFA 0,1% (V/V)] em coluna Nucleosil C18 (10 x 250 mm) e fluxo de 2 mL/min..... 61

11. Perfil cromatográfico sob fase reversa do peptídeo MK-578, sob condições isocráticas de Acetonitrila 48% (v/v) [contendo TFA 0,1% (V/V)] em coluna Nucleosil C18 (10 x 250 mm) e fluxo de 2 mL/min..... 61

12. Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, do peptídeo Protonectarina-MP..... 62

13. Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, do peptídeo Parapolybia-MP..... 62

14. Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, do peptídeo Apoica-MP..... 63

15. Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, do peptídeo Asn2-Polybia-MP I..... 63

16. Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, do peptídeo MK-578..... 63

17. Esquema de uma micela de SDS em água..... 65

18. Espectros de dicroísmo circular de estruturas secundárias "puras"..... 66

19. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP, obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165μM e 8mM e solução de TFE 40%..... 67

20. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Parabolybia-MP, obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165μM e 8mM e solução de TFE 40%..... 68

21. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Apoica-MP, obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165μM e 8mM e solução de TFE 40%..... 68

22. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Asn2-Polybia-MP I, obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165μM e 8mM e solução de TFE 40%..... 69

23. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo MK-578, obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165μM e 8mM e solução de TFE 40%..... 70

24. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP, obtidos em tampão Tris-borato (pH 7,5), suspensão de vesículas zwitteriônicas (PC) e vesículas aniônicas (PC/PG-7030)..... 71

25. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Parapolybia-MP, obtidos em tampão Tris-borato (pH 7,5), suspensão de vesículas zwitteriônicas (PC) e vesículas aniônicas (PC/PG-7030)..... 71

26. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Apoica-MP, obtidos em tampão Tris-borato (pH 7,5), suspensão de vesículas zwitteriônicas (PC) e vesículas aniônicas (PC/PG-7030)..... 71

27. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Asn2-Polybia-MP I, obtidos em tampão Tris-borato (pH 7,5), suspensão de vesículas zwitteriônicas (PC) e vesículas aniônicas (PC/PG-7030)..... 71

28. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo MK-578, obtidos em tampão Tris-borato (pH 7,5), suspensão de vesículas zwitteriônicas (PC) e vesículas aniônicas (PC/PG-7030)..... 71

29. Espectros de CD da poli-L-Lisina (A) contendo 0% de estrutura randômica e variando as porcentagens de hélice-α e folha-β; e (B) contendo 20% de estrutura randômica e variando as porcentagens de hélice-α e folha-β..... 78

30. Esquema mostrando a distribuição anfifílica ("*helical wheel*") dos peptídeos..... 80

31. Modelo das estruturas tridimensionais dos mastoparanos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578 gerados à partir do programa MolMol (Koradi et al., 1996), sendo os esqueletos carbônicos mostrados no formato "*ribbon*"..... 82

32. Diagrama de Ramachandran do modelo gerado para o peptídeo Protonectarina-MP..... 84

33. Diagrama de Ramachandran do modelo gerado para o peptídeo Parapolybia-MP..... 84

34. Diagrama de Ramachandran do modelo gerado para o peptídeo Apoica-MP..... 85

35. Diagrama de Ramachandran do modelo gerado para o peptídeo Asn2-Polybia-MP I.... 85

36. Diagrama de Ramachandran do modelo gerado para o peptídeo MK-578..... 86

37. Valores de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Protonectarina-MP..... 88

38. Valores de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Parapolybia-MP..... 89

39. Valores de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Apoica-MP..... 89

40. Valores de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Asn2-Polybia-MP I..... 89

41. Valores de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano MK-578..... 89

42. Gráfico de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Protonectarina-MP com as conformações estruturais nos seguintes picossegundos A) 1; B) 3946; C) 5800; D) 7389; e E) 9199..... 91

43. Padrões de estrutura secundária por resíduo de aminoácido, ao longo da dinâmica do peptídeo Protonectarina-MP..... 92

44. Gráfico de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Parapolybia-MP com as conformações estruturais nos picossegundos A) 1; B) 1248; C) 4479; D) 6639; e E) 8709..... 93

45. Padrões de estrutura secundária por resíduo de aminoácido, ao longo da dinâmica do peptídeo Parapolybia-MP..... 94

46. Gráfico de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Apoica-MP com as conformações estruturais nos picossegundos A) 1; B) 1899; C) 4127; D) 5720; E) 7486; e F) 9264..... 95

47. Padrões de estrutura secundária por resíduo de aminoácido, ao longo da dinâmica do peptídeo Apoica-MP..... 96

48. Gráfico de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Asn2-Polybia-MP I com as conformações estruturais nos picossegundos A) 1; B) 1276; C) 4048; e D) 7454..... 97

49. Padrões de estrutura secundária por resíduo de aminoácido, ao longo da dinâmica do peptídeo Asn2-Polybia-MP I..... 98

50. Gráfico de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano MK-578 com as conformações estruturais nos picossegundos A) 1; B) 827; C) 3514; D) 8535; e E) 9836..... 99

51. Padrões de estrutura secundária por resíduo de aminoácido, ao longo da dinâmica do peptídeo MK-578..... 99

52. Dez estados conformacionais dos esqueletos carbônicos (*backbone*) ocorridos durante 3 ns de simulação por dinâmica molecular dos cinco peptídeos..... 100

53. Espectros de CD do peptídeo EMP-AF com o lado C-terminal (A) amidado (EMP-AF-NH_2) e (B) caboxi-livre (EMP-AF-COO^-) em solução aquosa, em presença de TFE 15% (v/v) e TFE 40% (v/v). Sforça et al. (2004)..... 102

54. Visão do esqueleto carbônico (*backbone*) com as cadeias laterais dos resíduos de Lisina (em amarelo)..... 104

55. Representações das superfícies moleculares dos cinco peptídeos mostrando a distribuição superficial de cargas, com faces predominantemente hidrofóbicas (A) e predominantemente hidrofílicas (B)..... 106

56. Espetro de massas ESI do peptídeo Apoica-MP em presença de vesículas composta de fosfatidilcolina (PC)..... 109

57. A) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP em presença de vesículas de fosfatidilcolina; B) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP em presença de vesículas de fosfatidilcolina e 40 % (v/v) de D_2O.... 111

58. A) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Parapolybia-MP em presença de vesículas de fosfatidilcolina; B) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Parapolybia-MP em presença de vesículas de fosfatidilcolina e 40 % (v/v) de D_2O..... 112

59. A) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Apoica-MP em presença de vesículas de fosfatidilcolina; B) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Apoica-MP em presença de vesículas de fosfatidilcolina e 40 % (v/v) de D_2O..... 114

60. A) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Asn2-Polybia-MP I em presença de vesículas de fosfatidilcolina; B) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Asn2-Polybia-MP I em presença de vesículas de fosfatidilcolina e 40 % (v/v) de D_2O..... 115

61. A) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo MK-578 em presença de vesículas de fosfatidilcolina; B) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo MK-578 em presença de vesículas de fosfatidilcolina e 40 % (v/v) de D_2O..... 116

62. Esquema de ancoragem em membrana fosfolipídica dos peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578, construídos á partir dos dados de troca H/D e Espectrometria de Massas Seqüencial..... 117

63. Atividade hemolítica dos peptídeos Protonectarina-MP (preto), Parapolybia-MP (azul escuro), Apoica-MP (azul claro), Asn2-Polybia-MP I (laranja), MK-578 (verde) e Melitina (vermelho) em doze concentrações diferentes, variando de $9,4x10^{-8}$ M a $3,1x10^{-4}$ M..... 122

64. Atividade degranuladora de mastócitos peritoniais de ratos *Wistar* dos peptídeos Protonectarina-MP (preto), Parapolybia-MP (azul escuro), Apoica-MP (azul claro), Asn2-Polybia-MP I (laranja), MK-578 (verde) e HR-II (vermelho) em doze concentrações diferentes, variando de de $9,4x10^{-8}$ M a $3,1x10^{-4}$ M..... 123

65. Representação da distribuição do solvente na região do peptídeo Polybia-MPI (Costa, 2006)..... 129

66. Micrografia óptica do músculo tibial anterior de camundongo (Balb/c) após injeção intramuscular de 25μg/μl de mastoparano Apoica-MP (Rocha & Höfling, 2006)..... 130

67. Distribuição dos resíduos de Lysina (vermelho) e Asp8 (azul) do peptídeo Asn2-Polybia-MP I..... 133

ÍNDICE DE TABELAS

1. Seqüências primárias de alguns peptídeos quimotácticos..... 15

2. Seqüência primária de alguns mastoparanos extraídos do veneno de vespas sociais..... 16

3. Seqüência primária dos peptídeos em estudo..... 34

4. Etapas de cada ciclo da síntese de peptídeos..... 35

5. Concentração de Solvente B (Acetonitrila em presença de 0,1% de TFA) utilizado na purificação dos peptídeos sintéticos, por RP-HPLC em condições isocráticas..... 36

6. Tabela mostrando número total de átomos, número de moléculas de água e tamanho da caixa para os cinco peptídeos..... 48

7. Massas moleculares monoisotópicas calculadas e experimentais dos peptídeos sintetizados..... 64

8. Elipticidade molar em 222 nm e porcentagem de hélice-α dos peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578, em solução aquosa, em solução de SDS 165 μM e 8 mM e TFE 40% (v/v)..... 72

9. Elipticidade molar em 222 nm e fração de hélice-α dos peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578 em tampão Tris-borato (pH 7,5), em presença de vesículas sintéticas neutras (PC) e aniônicas (PC/PG-7030)..... 72

10. Porcentagens de hélice-α dos peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578 em diferentes solventes, calculadas à partir da elipticidade molar em 222 nm..... 73

11. Número de resíduos da seqüência primária, situados nas diferentes regiões do diagrama de Ramachandran..... 86

12. Valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em μg/μL, para os cinco peptídeos e para o padrão do experimento (Tetraciclina), frente à bactérias Gram+ e Gram-..... 124

ABREVIAÇÕES

AMBER	*Assisted Model Building with Energy Refinement*
Asn2-PMP-I	Asn2- Polybia-MP I
CD	Dicroísmo circular
CMC	Concentração micelar crítica
D_2O	Óxido de deutério
Da	Daltons
DSSP	*Dictionary of Protein Secundary Structure*
EMP-AF	Eumenine Mastoparano-AF
ESI-MS	Espectrometria de Massas com fonte de ionização do tipo Eletrospray
f_H	Fração de hélice-α
Fmoc	N-9-fluorenilmetoxicarbonil
G	Gramas
H/D	Hidrogênio/Deutério
HOBt	*N-hydroxybenzotriazoel.H_2O*
L/h	Litros por hora
kV	Kilovolts
M	Molar
MCD-Peptídeos	Peptídeos Degranuladores de Mastócitos
MCM	*mast cell medium*
MIC	Concentração inibitória mínima
Min	Minuto
mL	Mililitro
MS/MS	Espectrometria de massas seqüencial (*Tandem*)
m/z	Massa por carga
Nm	Nanômetros
Ns	Nanossegundos
PC	L-α-fosfatidilcolina
PC/PG-7030	Vesícula composta por 70% de PC e 30% de PG, mol/mol
Pdb	*Protein Data Bank format*
PG	L-α-fosfatidil-DL-glicerol
PLA_2	Fosfolipase A_2
PTH-aminoácido	*Phenylthiohydantoin aminoacid*
ps	Picossegundos
PyBOP	*Benzotriazole-l-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate*
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Desvios médios quadráticos (*root mean square deviations*)
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta performance sob fase reserva
RPM	Rotações por minuto
SANDER	*Simulated Annealing with NMR-Derived Energy Restrain*
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SH	Solução contendo p-nitrofenil-N-acetil-β-glucosaminidina em Citrato trissódico
TIP3P	Moléculas de água em modelo rígido
TFA	Ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TTC	Trifeniltetrazolium
u.m.a.	Unidade de massa atômica
V	Volts
v/v	Volume por volume
Ves-CPs	Peptídeos Quimiotácticos de Vespas
Å	Angstron
[Θ]	Elipticidade molar média
μM	Micromolar
μL	Microlitro
μg	Micrograma

1. RESUMO

Neste trabalho foram realizados estudos de caracterização estrutural e funcional de alguns peptídeos da classe dos mastoparanos de vespas, que apresentam diferentes padrões de anfipaticidade, em função das diferentes seqüências de aminoácidos que cada um possui. Os peptídeos estudados foram: Protonectarina-MP (INWKALLDAAKKVL-NH_2); Parapolybia-MP (INWKKMAATALKMI-NH_2); Apoica-MP (INWLKIAKKVAGML-NH_2); Asn2-Polybia-MP I (INWKKLLDAAKQIL-NH_2) e MK-578 (INWLKAKKVAGMIL-NH_2).

Os peptídeos foram manualmente sintetizados, utilizando-se estratégia Fmoc, e purificados através de técnicas de cromatografia líquida de alta performance. Após a obtenção do material sintético, foram realizadas análises de espectrometria de massas ESI-MS, para monitoração do controle de qualidade. A estrutura secundária foi investigada com o uso de espectroscopia de dicroísmo circular. Além disso, foram realizadas as modelagens moleculares e dinâmica dos peptídeos para análise de suas trajetórias.

Foram feitos ensaios para investigar a interação desses peptídeos com membranas fosfolipídicas sintéticas (lipossomos), sendo esta interação, monitorada por medidas de dicroísmo circular e de troca isotópica H/D combinada com espectrometria de massas. Além disto, foram realizados ensaios de atividades biológicas de cada um dos peptídeos, onde foram testadas as atividades de degranulação de mastócitos, hemólise e antibiose.

Os dados de Dicroísmo Circular revelaram que todos os peptídeos possuem a tendência de se estruturar em hélice-α quando em ambientes hidrofóbicos, ou em contato com membranas. Além disso, a presença de fosfolipídios ácidos nas membranas aumenta a interação eletrostática destas com peptídeos positivamente carregados.

Os estudos de dinâmica molecular em meio aquoso mostraram alta flexibilidade estrutural dos peptídeos e uma variedade de estados conformacionais, em que predominam conformações randômicas, sem, contudo deixar de apresentar alguma porção helicoidal. Além disso, foi mostrado que esses peptídeos possuem caráter anfifílico quando estruturados em hélice.

Os estudos de troca H/D combinada com espectrometria de massas revelaram que estes peptídeos interagem paralelamente à membrana composta de fosfatidilcolina, inserindo o lado C-terminal e mantendo a região N-terminal tangencial e paralela à mesma.

Outro fato importante é que esses peptídeos apresentaram atividade degranuladora de mastócitos. Devido à presença de baixa atividade hemolítica, acredita-se que a atividade degranuladora de mastócitos encontrada nesses peptídeos, seja decorrente da interação com receptores acoplados às proteínas-G da membrana dos mastócitos e não por lise celular.

De uma maneira geral, os resultados das atividades biológicas mostraram que os mastoparanos Asn2-Polybia-MP I, Parapolybia-MP e Protonectarina-MP possuem uma atividade hemolítica baixa e, atividade antibiótica elevada. Talvez esses peptídeos estejam interagindo de forma seletiva com as membranas bacterianas, constituindo assim, modelos promissores para o desenvolvimento de novos antibióticos.

2. ABSTRACT

The aim of the present investigation was to study the structure/activity relationship of a series of mastoparan-like peptides presenting different patterns of amphipathicit given by their distinct amino acid sequences. The peptides studied were: Protonectarina-MP (INWKALLDAAKKVL-NH_2); Parapolybia-MP (INWKKMAATALKMI-NH_2); Apoica-MP (INWLKIAKKVAGML-NH_2); Asn2-Polybia-MP I (INWKKLLDAAKQIL-NH_2) and MK-578 (INWLKAKKVAGMIL-NH_2).

The peptides were manually synthesized by using Fmoc strategy and purified under HPLC. The synthetic material homogeneity was analyzed by ESI mass spectrometry and Edman Degradation Chemistry. The secondary structure was investigated through circular dichroism (CD) spectroscopy. In addiction, the secondary structures were modeled and their structural trajectories observed through Molecular Dynamics.

The interaction of peptides with membranes was investigated through the combination of synthetic vesicles with H/D exchange and ESI-mass spectrometry. Some biological activities, like: mast cell degranulation, hemolysis and antibiosis were investigated for all the peptides.

The CD spectra revealed that the peptides in presence of hydrophobic environment or in presence of biological membranes have the tendency to form helix conformations. Highly organized structures were not observed in aqueous or buffer solutions, however, the peptides always presented some tendency to form helices. The mastoparans interacts strongly and preferentially with the charged PG headgroups. The positive charges of these peptides enable selective binding to bacterial membranes through electrostatic interactions.

The molecular dynamic studies of the peptides in water solvent revealed that all the peptides have high structural flexibility and many conformational states. Probably, these molecules assume different conformational states depending on the environment. In addition,

it has been shown that the helical conformation gives the amphipathic feature to these peptides.

The insertion and orientation of the mastoparan in the bilayer environment was investigated by H/D exchange, combined with mass spectrometry analysis. The orientation observed for the mastoparans helices was in-plane (parallel) with their C-terminal side inserted in the lipid layer.

The mast cell degranulation activity of these mastoparans, associated to their no hemolytic action, suggests that the degranulation activity was probably induced by G-protein receptor activation. In addition to this, the peptides Asn2-Polybia-MP I, Parapolybia-MP and Protonectarina-MP presented relatively potent antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

In summary, the biological activity results of the mastoparans Asn2-Polybia-MP I, Parapolybia-MP and Protonectarina-MP have shown poor hemolysis and potent antibacterial activities. Thus, the interaction of the mastoparans with the bacterial membrane seems to be relatively selective, making these peptides very attractive models for the development of novel antimicrobial agents for therapeutic applications.

3. INTRODUÇÃO

Os venenos de vespas sociais são ricos em peptídeos biologicamente ativos, responsáveis por dores prolongadas, edema, eritema, reações alérgicas e sistêmicas (Lorenzi, 2002). Normalmente, estes venenos contêm vários tipos de aminas biogênicas, peptídeos e proteínas (Nakajima et al., 1986).

Em geral, esses venenos possuem uma série de peptídeos policatiônicos que apresentam algumas atividades como: citólise, hemólise, degranulação de mastócitos, quimiotaxia de leucócitos e antibiose (Nakajima, 1986). Pesquisas realizadas por Konno et al. (2000) demonstraram a existência de peptídeos degranuladores de mastócitos nos venenos de vespas solitárias, também apresentando atividade antibiótica.

Okumura et al. (1981) mostraram que os mastoparanos interagem com membranas lipídicas naturais e artificiais. Essas perturbações nas membranas podem causar um aumento na permeabilidade dos canais iônicos, sendo esta, a causa primária do efeito de liberação de mediadores da ativação celular (Nakajima, 1986). A liberação de histamina induzida por mastoparanos parece ser mediada por interações destes peptídeos com proteínas G (Habermann, 1972; Ross & Higashijima, 1994).

Segundo Matsuzaki et al. (1996), as atividades biológicas apresentadas pelos mastoparanos podem ainda estar altamente relacionadas com a interação dos peptídeos com membranas biológicas assumindo uma conformação em hélice-α anfipática (Schwarz & Blochmann,1993), a qual pode causar perturbações nas membranas, levando a um aumento na permeabilidade, em alguns casos pela formação de poros (Danilenko et al., 1993; Mellor & Sansom, 1990).

A necessidade de se compreender o mecanismo de ação de peptídeos, como os mastoparanos, abriu um vasto campo para pesquisas sobre as estruturas secundárias e funções

desses compostos, tanto em meio solúvel, como associados às membranas-modelo, objetivando a produção de novas drogas (Ibrahim et al., 2000).

Muitos autores afirmam que a estrutura interfere fortemente na intensidade e/ou tipo de atividade biológica dos peptídeos biologicamente ativos. Sendo assim, uma das áreas de pesquisa de maior avanço na era pós-genômica é a determinação estrutural e funcional de biomoléculas. Suas estruturas devem ser determinadas, não somente para explicar suas atividades biológicas, mas também para desenvolver novas drogas e outros usos aplicados (Kyogoku et al., 2003). A modelagem de peptídeos que possuem regiões transmembranares deve contribuir para o conhecimento dos tipos de interações importantes para a compreensão do modo de ação de proteínas de membrana com as características descritas acima.

Neste trabalho foi proposto um estudo de caracterização estrutural e funcional de alguns representantes da classe dos mastoparanos, identificados principalmente em espécies da biodiversidade brasileira, que apresentam diferentes padrões de anfipaticidade, em função das diferentes distribuições de cargas apresentadas pelas mesmas.

Para isso, os peptídeos foram manualmente sintetizados utilizando-se estratégia Fmoc e purificados através de técnicas de cromatografia líquida de alta performance. Após a obtenção do material sintético, foram realizadas análises de espectrometria de massas ESI-MS, para monitoramento do controle de qualidade. As respectivas estruturas secundárias foram investigadas através do uso de espectroscopia de dicroísmo circular. A estrutura molecular e dinâmica molecular dos peptídeos foram investigadas através do uso de programas aplicativos específicos para análise de suas trajetórias.

Além disso, foram realizados ensaios de atividades biológicas de cada um dos peptídeos, onde foram testadas as atividades degranuladora de mastócitos, hemolítica e antibiótica. Foi investigada também a interação desses peptídeos com membranas fosfolipídicas sintéticas (lipossomos), sendo a interação monitorada por medidas de dicroísmo circular e de troca isotópica H/D dos complexos proteolipossomos. Todo esse conjunto de

técnicas e resultados obtidos foi utilizado numa tentativa de um entendimento do modo de ação desses peptídeos com relação à estrutura molecular dos mesmos, correspondente ao principal objetivo deste estudo.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Farmacologia e composição geral do veneno de Hymenoptera

A extraordinária dominância dos insetos e outros artrópodes nos continentes pode ser atribuída, pelo menos em parte, à imensa diversidade de mecanismos químicos de defesa (Whitman et al., 1990). Além das secreções glandulares de defesa, alguns artrópodes desenvolveram armas químicas defensivo-ofensivas sofisticadas. Neste aspecto, o aparecimento dos venenos e do aparelho de ferroar entre os insetos representa atributos evolucionários que contribuíram para a adaptação desses animais em diferentes ambientes terrestres (Whitman et al., 1990). Além disso, diferentes ordens de insetos desenvolveram suas armas biológicas, particularmente os Hymenoptera (abelhas, vespas e formigas), que desenvolveram em seu veneno e aparelho de ferroar de acordo com sua biologia e comportamento (Palma, 2006).

A ordem Hymenoptera é composta por aproximadamente 100.000 espécies de abelhas, vespas e formigas. Muitos membros pertencentes a esta ordem desenvolveram glândulas especializadas na produção de veneno e um aparelho de ferroar, os quais podem ser usados tanto na caça de presas quanto em sua própria defesa (Steen et al., 2005).

Os insetos da ordem Hymenoptera podem ser classificados em dois grupos, de acordo com sua história evolutiva: social e solitário. A maioria dos Hymenoptera solitários desenvolveu um veneno especializado, principalmente para causar paralisia das presas, permitindo assim, o desenvolvimento de suas larvas em suas próprias presas. Dentre outras atividades, alguns componentes desses venenos ainda podem causar paralisia parcial ou permanente nas presas, enquanto outros podem agir na prevenção de contaminações do alimento ou de infecção da progênie futura.

Por outro lado, o veneno dos Hymenoptera sociais possui componentes que estão relacionados principalmente ao comportamento de defesa desses animais, ou seja, na proteção de suas colônias contra o ataque de predadores. O principal efeito desses venenos são as reações inflamatórias e/ou imunológicas em suas vítimas. Entretanto, algumas vezes também é possível observar a ocorrência de efeitos sistêmicos, como por exemplo, deficiência respiratória podendo chegar até à morte (Castro, 2001).

Os acidentes com estes insetos podem produzir uma série de reações, variando desde uma vermelhidão local, até uma reação sistêmica e anafilaxia. Existe uma estimativa que de 0,8 a 5% da população mundial sofrem de reações sistêmicas generalizadas após sofrerem ferroadas de insetos pertencentes à ordem Hymenoptera. Além disso, de 20 a 50 pessoas morrem todos os anos nos Estados Unidos vítimas de reações sistêmicas após ferroadas de abelhas, vespas e formigas (Hoffman et al., 1983).

Durante os últimos anos, técnicas de caracterização e análise bioquímicas vêm proporcionando inúmeras informações a respeito dos agentes bioativos naturais. Em conseqüência à aplicação desses métodos na bioquímica de insetos, muitos tipos de feromônios, hormônios, substâncias de defesa e princípios ativos de venenos têm sido caracterizados (Nakajima, 1986).

As principais conseqüências de ferroadas de Hymenoptera, se resumem a dores prolongadas, edema, eritema, e em casos mais extremos, reações alérgicas e sistêmicas. As reações sistêmicas de maior importância médica são aquelas que afetam os sistemas respiratório e/ou circulatório. Em geral, são caracterizadas como reações cutâneas, vasculares ou respiratórias (Schmidt, 1986). As reações cutâneas que afetam somente a pele aparecem como urticária, angioedema, coceira, inchaço ou eritema. As reações vasculares envolvem o sistema circulatório, muitas vezes com queda de pressão sangüínea e aumento da permeabilidade vascular. Essas reações podem levar a inconsciência e desmaios. Já as reações respiratórias, consistem em inchaços ou aumento de fluídos no sistema respiratório. São

caracterizadas por dificuldade de respirar, espirros, contração da garganta ou pulmão, displasia e asma. Em pacientes hipersensíveis, podem ocorrer ainda, desordens gastrointestinais, cólicas, diarréia, náusea, vômito, incontinência, dor de cabeça, calafrio e febre (Schmidt, 1986).

4.2. Bioquímica e farmacologia do veneno de vespas

As pesquisas realizadas até o momento sobre a estrutura, atividade biológica e mecanismos de ação do veneno bruto e/ou toxinas isoladas do veneno de Hymenoptera, evidenciam a presença de efeitos importantes sob o ponto de vista médico, farmacológico e imunológico, desencadeados pelas toxinas de tais venenos (Oliveira, 2000).

Os venenos das Vespas são extremamente ricos, sendo constituídos por diferentes tipos de componentes com diversas atividades biológicas. Esses venenos vêm despertando grande interesse nos pesquisadores, principalmente nas áreas médica e farmacológica.

Em geral, causam dores prolongadas, edema e eritema locais, conseqüentes de um aumento na permeabilidade dos vasos sangüíneos da pele. A dor pode continuar por várias horas e a ardência por alguns dias. Além desta ação direta da ferroada da vespa, em muitos casos podem ser observadas reações alérgicas, e até mesmo anafiláticas, que muitas vezes, chegam a ser letais (Oliveira, 2000). Geralmente as reações anafiláticas severas acontecem quando as toxinas estimulam diretamente os mastócitos (Lorenzi, 2002).

O veneno também tem ação cinética em músculo liso isolado e reduz a pressão sangüínea quando injetado intravenosamente (Nakajima, 1986). Pode causar liberação de histamina a partir da degranulação de mastócitos, de leucócitos basófilos e catecolaminas de células adrenais. Também podem causar citólise, hemólise e quimiotaxia de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (Habermann, 1972; Edery et al., 1978).

A grande maioria das mortes causadas por ferroadas de vespas está diretamente relacionada ao desencadeamento de reações imunológicas, porém algumas se devem à toxicidade direta do veneno (Lorenzi, 2002). Os sintomas mais comuns são inchaço, edema, dor, urticária, ulceração, vasodilatação, aumento da permeabilidade dos vasos, tonturas, taquicardia e morte (Park, 2002).

Normalmente, estes venenos contêm vários tipos de aminas biogênicas, peptídeos e proteínas, incluindo algumas hidrolases (por exemplo, fosfolipases, proteases, hialuronidases, fosfatases e nucleotidases) (Nakajima et al., 1986). Além disso, o tamanho das moléculas e a presença de determinadas proteínas aumentam as propriedades antigênicas do veneno, sendo, desta forma, um potente ativador do sistema imune (Vetter & Visscher, 1998).

Os componentes de elevada massa molecular mais comumente encontrados incluem proteínas como fosfolipase A_1 e fosfolipase A_2, encontradas nos venenos de *Vespa basalis*, *Polybia paulista*, *Agelaia pallipes pallipes* e outras. Já foram isolados também, proteínas alérgenas que não apresentaram atividade enzimáticas do veneno de vespas, como é o caso do "Antígeno 5". Trata-se de uma proteína com peso molecular de 25 KDa, que não exibe qualquer atividade enzimática já testada para os venenos de vespas (King et al., 1978). Esta proteína foi descrita como sendo o componente com maior atividade alergênica dos venenos de vespas, sendo mais potente que as enzimas hialuronidase, fosfolipase (PLA) e fosfatase ácida.

Oliveira & Palma (1998) isolaram um grupo de toxinas do veneno de *Polybia paulista*, designadas por Polibiatoxinas (PbTx) com atividades de PLA_2 e hemolítica. Costa & Palma (2000), isolaram uma toxina chamada de Agelotoxina, a partir do veneno da vespa *Agelaia pallipes pallipes*, que apresentou atividade hemolítica cerca de 200 vezes mais potente que a PbTx de *P. paulista*, 740 vezes mais que a PLA_2 de *A. mellifera*, 570 vezes mais que a PLA_2 de *Naja nigricolis* e 1250 vezes mais potente que a cardiotoxina de *Naja naja atra*.

Freqüentemente, são encontradas aminas ativas como a serotonina, histamina, tiramina e catecolamina. Essas aminas são os componentes responsáveis pela produção de dor, e suas concentrações são altamente variáveis de acordo com a espécie. Também foram isoladas, isoladas do veneno de Hymenoptera, algumas poliaminas, incluindo putrescina, spermidina e spermina.

Em geral, os componentes peptídicos do veneno de Hymenoptera encontram-se dentro de um intervalo de massa molecular que varia de 1400 a 1700 Da, sendo que juntos chegam a constituir cerca de 60% do peso seco do veneno bruto, como no caso das abelhas (Dotimas et al., 1987). A maioria destas toxinas são peptídeos anfipáticos de cadeia linear policatiônica, com uma alta quantidade de hélice alfa compondo sua estrutura secundária. Esses peptídeos, geralmente causam lise celular, e em alguns casos, chegam a promover a liberação de ativadores/mediadores através da interação com receptores de proteínas-G. Além disso, alguns destes peptídeos podem ter características imunogênicas. Além desses peptídeos, os venenos dos Hymenoptera podem conter também algumas neurotoxinas que interagem com canais de Na^{+} e/ou Ca^{+2}, ou receptores nicotínicos de acetilcolina.

Os componentes peptídicos desses venenos estão classificados em três grupos principais: (1) **Cininas**, análogas à bradicinina, responsáveis por dores, contração da musculatura lisa e redução da pressão sangüínea (Pisano, 1968); (2) **Mastoparanos**, tetradecapeptídeos hidrofóbicos, que são degranuladores de mastócitos (Hirai et al., 1978); e (3) **Peptídeos quimiotácticos**, tridecapeptídeos hidrofóbicos, com atividade quimiotáctica (Toki et al., 1988).

4.2.1. Cininas

Jaques & Schachter (1954), identificaram um peptídeo no veneno de *Paravespula vulgaris*, que devido à sua similaridade com as propriedades farmacológicas da bradicinina de

mamíferos, recebeu o nome de **cinina de vespa**. Trata-se de um dos componentes responsáveis pelas dores após ferroadas de vespas (Jaques & Schachter, 1954). Em 1968, foi descrita a primeira estrutura de uma cinina de vespa. Trata-se da Polistescinina 3, um octadecapeptídeo isolado de uma mistura do aparelho de ferroar de *Polistes exclamamans*, *P. annularis* e *P. fuscatus*, no qual a seqüência primária da bradicinina estava contida na parte C-terminal da cadeia (Pisano, 1968).

Atualmente, muitas cininas de vespas têm sido isoladas e caracterizadas bioquimicamente. Estas cininas possuem parte de suas seqüências primárias homólogas às bradicininas, com algumas exceções, onde ocorre uma substituição dos resíduos de aminoácidos das posições três e seis na seqüência da bradicinina (Nakajima, 1986). Em algumas cininas do veneno de *Polistes*, a Serina da posição seis é substituída pela Treonina e, desta forma, elas apresentam uma grande homologia com a plasmacinina de tartarugas (Dunn e Parks, 1970). Em outras cininas de vespas, encontradas no veneno de vespas pertencentes ao gênero *Vespa*, a substituição da Prolina da posição três por hidroxiprolina tem sido encontrada, sendo desta forma, um análogo à bradicinina encontrada na pele do anfíbio *Heleophryne depressa* (Nakajima et al., 1979).

As propriedades farmacológicas das cininas de vespas sociais não foram completamente investigadas devido às baixas concentrações destes peptídeos em condições naturais. Suas principais propriedades foram resumidas por Edery et al. (1978) como sendo: quando injetado intravenosamente, as cininas de vespas causam hipertensão em ratos e hipotensão em galinhas; broncoconstrição em cobaias e contração em músculo liso isolado. Deste modo, as cininas mostraram propriedades farmacológicas similares às da bradicinina, calidinas (Lys-bradicinina) e Met-Lys-bradicininas isoladas de mamíferos (Pisano, 1970). Eno (1997) realizou um estudo farmacológico de indução de edema em pata de rato, causado pelo veneno de *Polistes fuscatus* e observou que as cininas estavam dentre os componentes envolvidos nesta ação. Pisano (1970) mostrou que a polistescinina-3 chega a ser entre duas e

vinte vezes mais potente que a bradicinina em muitos bioensaios. Além disso, Johnson & Erdös (1973) mostraram que $3x10^{-7}$ M desta cinina, causa liberação de histamina de mastócitos de ratos com uma potência dez vezes maior que a bradicinina nesta mesma concentração.

4.2.2. Ves-CPs

Os peptídeos quimiotácticos encontrados nos venenos de vespas são chamados de **Ves-CPs** ("*Vespid chemotactic peptides*"). Todos são tridecapeptídeos, com seqüências primárias semelhantes às dos mastoparanos, apresentando abundância de aminoácidos hidrofóbicos. Com poucas exceções, possuem conformação em hélice anfipática, na qual todos os resíduos hidrofóbicos estão localizados em uma mesma porção da molécula, enquanto que resíduos básicos como Arginina e lisina aparecem na porção oposta (Nakajima, 1986). A tabela 1 mostra a seqüência primária de alguns peptídeos quimiotácticos do veneno de Hymenoptera.

Foi isolado do veneno de uma pequena vespa da Nova Guiné, *Icaria sp.*, um peptídeo que não apresentou elevada atividade de liberação de histamina, o qual foi chamado **Icaria-CP** (Nakajima, 1986), cuja seqüência peptídica é: Ile-Val-Pro-Phe-Leu-Gly-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Leu-Thr-NH_2 (Nakajima et al., 1986). Esta propriedade do Icaria-CP pode ser devido à falta de resíduos de aminoácidos básicos em sua seqüência primária. Peptídeos hidrofóbicos como este, são conhecidos por causarem a quimiotaxia de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, em concentrações da ordem de 0,1 μM (Nakajima et al., 1986). Estes componentes quimiotácticos possuem a propriedade de promover alguma degranulação em mastócitos, embora sua seqüência primária se diferencie um pouco dos mastoparanos.

TABELA 1: Seqüências primárias de alguns peptídeos quimiotácticos*

NOME	SEQÜÊNCIA PRIMÁRIA	VESPA
Ves-CP-T	FLPILGKILGGLL-NH_2	*Vespa tropica*
Ves-CP-M	FLPILGKLLSGLL-NH_2	*Vespa mandarina*
Ves-CP-A	FLPMIAKLLGGLL-NH_2	*Vespa analis*
Ves-CP-X	FLPIIAKLLGGLL-NH_2	*Vespa xanthoptera*
Ves-CP-L	FLPIIAKLVSGLL-NH_2	*Paravespula lewisii*
Icaria-CP	IVPFLGPLLGLLT-NH_2	*Icaria sp.*
Crabrolina	FLPLILRKIVTAL-NH_2	*Vespa crabro*
HRII	FLPLILGKLVKGLL-NH_2	*Vespa orientalis*

* Nakajima, 1986.

A ligação dos Ves-CPs com as membranas lipídicas parece ser similar ao modo de ligação dos mastoparanos, devido às similaridades hidrofóbicas entre estas duas classes de compostos. Também é observado que os Ves-CPs e os mastoparanos são os compostos de maior abundancia no veneno de vespas, e que desempenham um importante papel no desencadeamento de processos inflamatórios provenientes de ferroadas de vespas (Nakajima, 1986).

Mendes et al. (2004b), isolaram um novo peptídeo do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*, chamado Protonectina (ILGTILGLLKGL-NH_2). Este peptídeo foi caracterizada como um potente agente quimiotáctico para leucócitos polimorfonucleados e não hemolítico, além disso, esse peptídeo possui elevada atividade antibiótica contra bactérias Gram+ e Gram-.

4.2.3. Mastoparanos

Os componentes mais abundantes do veneno das vespas são aqueles pertencentes à classe dos **mastoparanos**, cuja principal atividade biológica é a degranulação de mastócitos. Trata-se de peptídeos anfifílicos, com conformação em hélice-α, compostos de 10 a 14 resíduos de aminoácidos e sem nenhuma Cisteína em suas seqüências primárias (Nakajima et al., 1986).

São ricos em aminoácidos hidrofóbicos, como leucina, Isoleucina e Alanina, e também apresentam algumas lisinas em suas seqüências primárias, encontradas geralmente nas posições quatro, onze e doze da molécula. Normalmente possuem o resíduo C-terminal

amidado, com seqüência primária composta de resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos (Nakajima et al., 1986).

Normalmente, não é observada homologia entre os mastoparanos de Vespidae e MCD-peptídeos (peptídeos degranuladores de mastócitos) de abelhas. Na verdade, a seqüência primária dos mastoparanos assemelha-se muito à da bombinina, um peptídeo hemolítico isolado da pele do sapo *Bombina variegata* (Csordàs & Michl, 1970).

Na Tabela 2 está mostrada uma lista dos principais mastoparanos isolados de venenos de vespas, com as respectivas seqüências primárias. Destaca-se ainda a presença e posição dos resíduos de lisina (K) em negrito. Com relação à posição das lisinas, pode-se observar que existem três grupos de mastoparanos, apresentando quatro, três e dois resíduos deste aminoácido. Em cada um destes grupos há uma tendência a se distribuir os resíduos de lisina das porções terminais, para a região central da cadeia polipeptídica dos diferentes mastoparanos.

Tabela 2: Seqüência primária dos mastoparanos isolados do veneno de vespas

		SEQÜÊNCIA PRIMÁRIA														
ESPÉCIE	**PEPTÍDEO**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**
Vespa analis	Mastoparano A[1]	I	**K**	W	**K**	A	I	L	D	A	V	**K**	**K**	V	L	
Vespa basalis	Mastoparano B[2]	L	**K**	L	**K**	S	I	E	S	W	A	**K**	**K**	V	L	
Vespula lewisii	Mastoparano[1]	I	N	L	**K**	A	L	A	A	L	A	**K**	**K**	I	L	
Vespa mandarina	Mastoparano-M[1]	I	N	L	**K**	A	I	A	A	L	A	**K**	**K**	L	L	
Vespa tropica	Mastoparano-T[1]	I	N	L	**K**	A	I	A	A	F	A	**K**	**K**	I	L	
Vespa orientalis	HR-I[4]	I	N	L	**K**	A	L	A	A	L	V	**K**	**K**	V	L	
Vespa orientalis	Mastoparano-II[1]	I	N	L	**K**	A	L	L	A	V	A	**K**	**K**	I	L	
Vespa xanthoptera	Mastoparano-X[3]	I	N	W	**K**	G	I	A	A	M	A	**K**	**K**	L	L	
Vespa crabro	Mastoparano-C[1]	I	N	W	**K**	A	L	L	A	V	A	**K**	**K**	I	L	
Protonectarina sylveirae	Protonectarina-MP [1]	I	N	W	**K**	A	L	L	D	A	A	**K**	**K**	V	L	
Parapolybia indica	Parapolybia-MP[1]	I	N	W	**K**	**K**	M	A	A	T	A	L	**K**	M	I	
Polybia paulista	Polybia-MP I[6]	I	D	W	**K**	**K**	L	L	D	A	A	**K**	Q	I	L	
Anterhychium flvomarginatum micado	EMP-AF[7]	I	N	L	L	**K**	I	A	**K**	G	I	I	**K**	S	L	
Protopolybia sedula	P-13[1]	I	N	W	L	**K**	L	G	**K**	**K**	V	S	A	I	L	
Apoica pallens	Apoica-MP[1]	I	N	W	L	**K**	I	A	**K**	**K**	V	A	G	M	L	
Vespa orientalis	HR-II[4]	F	L	P	L	I	L	G	**K**	L	V	**K**	G	L	L	
Agelaia pallipes pallipes	App-5[5]	I	N	W	**K**	A	I	L	E	R	I	**K**	M	A		
Agelaia pallipes pallipes	App-7[5]	I	N	W	L	**K**	L	G	**K**	A	I	I	D	A		

[1]Nakajima et al., 1986; [2]Ho et al., 1994; [3]Hirai et al., 1979b; [4]Argiolas e Pisano, 1984; [5]Mendes et al., 2004b; [6]de Souza et al., 2004; [7]Konno et al., 2000.

Segundo Park et al. (1995), os mastoparanos apresentam várias atividades biológicas diferentes. Por exemplo, são potentes agentes promotores de exocitose de diversas células de mamíferos (Park et al., 1995): estimuladores da secreção de histamina de

mastócitos, (Nakajima, 1986); de serotonina a partir de plaquetas (Higashijima et al., 1988); e de prolactina à partir da pituitária anterior (Hirai et al., 1979a; Kuroda et al., 1980), mesmo em baixas concentrações (3 x 10^{-7} M). Segundo Pfeiffer et al. (1995), esses peptídeos podem facilitar a formação de poros em membranas; além disso, podem apresentar atividade hemolítica, como é o caso do mastoparano-X do veneno de *Vespa xanthoptera* (em concentração de 4 x 10^{-6} M) (Hirai et al., 1979b). Konno et al. (2000) isolaram do veneno da vespa solitária *Anterhynchium flavomarginatum micado*, um novo mastoparano (EMP-AF) que apresentou atividades como: degranulação de mastócitos peritoniais de ratos, hemólise significativa em eritrócitos humanos e efeitos neurotóxicos em músculo de lagosta.

De Souza et al. (2004) isolaram dois novos mastoparanos do veneno da vespa social *Polybia paulista* (INWLKLGKMVIDAL-NH_2; IDWLKLGKMVMDVL-NH_2), sendo que ambos apresentaram uma forte atividade hemolítica, degranuladora de mastócitos e quimiotáctica. Além disso, Mendes et al. (2004b), identificaram outro mastoparano isolado do veneno da vespa social *Agelaia pallipes pallipes*, o Agelaia-MP com atividade s degranuladora de mastócitos e hemolítica acentuadas, baixa atividade antibiótica e nenhuma atividade quimiotáctica.

O Mastoparano B, presente no veneno de *Vespa basalis*, participa das atividades hemolítica e de formação de edema, além de provocar falência cardiovascular devido a uma excessiva liberação de íons potássio eritrocitários, induzida pela toxina (Ho et al., 1994). Em outro trabalho, foi relatado envolvimento do mastoparano B, de proteases e da serotonina na atividade edematizante do veneno de *Vespa basalis* (Ho & Hwang, 1991).

Argiolas & Pisano (1984) relataram que os mastoparanos são também potentes ativadores das fosfolipases A_2 e C, causando um aumento na produção de ácido araquidônico. Peptídeos similares, como a crabrolina e os HR-I e II, foram isolados de *Vespa crabro* e *Vespa orientalis*, respectivamente (Nakajima et al., 1986). A crabrolina (Phe-Leu-Pro-Leu-Ile-Leu-Arg-Lys-Ile-Val-Thr-Ala-Leu-NH_2), e os mastoparanos HRI e HRII são

estimuladores da fosfolipase A_2 (PLA_2) e causam liberação de histamina de mastócitos peritoniais. Porém, o modo de ação de HRI e HRII difere do modo de ação dos mastoparanos clássicos (Argiolas & Pisano, 1984).

Mousli et al. (1992) demonstraram que a interação dos peptídeos com mastócitos pode causar um distúrbio na organização lipídica das membranas, seguida da ativação de proteínas G. Ainda segundo este autor, o primeiro contato parece estar relacionado com a presença de grupos positivos na molécula do peptídeo, que podem estar interagindo com sítios negativos (como exemplo: ácido siálico) presentes na membrana do mastócito. Após esta ligação, o peptídeo se liga à membrana e promove a ativação de proteínas G.

No caso da liberação de histamina, o efeito do mastoparano é acompanhado por um aumento na concentração de Ca^{2+} citoplasmático, que por sua vez induz um aumento de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP-3), um mensageiro secundário intracelular (Habermann, 1972). Essa liberação de histamina induzida pelo mastoparano parece ser mediada por interações deste peptídeo com uma subunidade de proteína G (Habermann, 1972). Segundo Ross & Higashijima (1994), esta ativação é causada por uma fosforilação, mediada pela conversão de GTP em GDP.

Os Mastoparanos apresentam-se de forma randômica quando em água, enquanto que em solução de metanol, ou em presença de vesículas, têm a tendência de formar hélice alfa, causando seu efeito através da interação com membranas plasmáticas, devido à sua anfipaticidade. De acordo com seu modo de ação, estes peptídeos podem ser classificados em dois grupos: 1- Aqueles que agem causando lise celular através da formação de poros em membranas (Argiolas & Pisano, 1983; Mendes et al., 2004b; Nakajima, 1986); e 2- Aqueles que agem pela interação com receptores de proteínas G, levando à ativação de mecanismos de degranulação e resultando em diferentes tipos de secreção, dependendo do tipo celular alvo (Higashijima et al., 1990; Mendes et al., 2005). Em qualquer situação o resultado final será a liberação de histamina de mastócitos, serotoninas de plaquetas, ou até mesmo de insulina de

células beta pancreáticas. Além disso, eles também podem agir como ativadores de Fosfolipase A (Argiolas & Pisano, 1983). Recentemente, também foi detectada atividade antibiótica destes peptídeos (Krishnakumari e Nagaraj, 1997; Mendes et al., 2004b).

Os receptores associados à proteína-G formam a maior família de receptores de superfície, encontrados em todos os eucariotos. Esses receptores mediam as respostas de uma enorme diversidade de moléculas sinalizadoras, como hormônios, neurotransmissores e mediadores locais. Dentre as moléculas sinalizadoras que os ativam, encontram-se proteínas, peptídeos e derivados de aminoácidos. Quando essas moléculas sinalizadoras se ligam aos receptores, estes sofrem uma mudança conformacional, que os torna capazes de ativar as proteínas de ligação a GTP (proteínas-G). Essas proteínas-G estão ligadas à face citoplasmática da membrana, onde atuam como moléculas transmissoras, acoplando funcionalmente os receptores a enzimas ou a canais iônicos na membrana (Alberts et al., 2004).

Segundo Ross & Higashijima (1994), esta ativação de proteínas-G é causada por fosforilação mediada pela conversão de GTP em GDP. Isso causa a dissociação em dois componentes ativos, uma subunidade α e um complexo $\beta\gamma$, podendo ambos regularem atividade de proteínas-alvo na membrana plasmática. O receptor permanece ativo enquanto o sinal externo estiver ligado a ele, podendo desta forma, catalisar a ativação de muitas moléculas de proteína G. Tanto a proteína-G_s (proteína-G estimulatória) como a G_i (proteína-G inibitória) são alvos para algumas toxinas bacterianas de importância médica. Em mamíferos, a produção de AMP cíclico é sinalizada principalmente por proteínas-G e íons Ca^{2+}. A prolongada elevação nos níveis de AMP cíclico em determinados tipos celulares pode provocar um efluxo de íons Cl^- e de água para fora da célula. Por outro lado, quando ativada a subunidade α da proteína-G_i, promove-se uma retenção de GDP e impede a regulação de suas proteínas-alvo (Alberts et al., 2004).

Experimentos realizados por Okumura et al. (1981) mostraram que os mastoparanos interagem com membranas lipídicas artificiais compostas de lecitina e colesterol, aumentando a permeabilidade iônica das mesmas e, deste modo, aumentando também a condutividade da membrana. Este aumento na permeabilidade dos canais iônicos pode ser a causa primária do efeito de liberação de mediadores pela ativação celular, uma vez que os mesmos requerem um aumento no influxo de íons Ca^{2+} para promover a exocitose (Nakajima, 1986).

Segundo Matsuzaki et al. (1996), as atividades biológicas apresentadas pelos mastoparanos estão altamente relacionadas com a interação dos peptídeos com membranas biológicas. Foi constatado que os peptídeos ao ligarem-se às membranas fosfolipídicas, assumem a conformação em hélice anfipática (Schwarz & Blochmann,1993), a qual causa perturbações nas bicamadas lipídicas levando a um aumento na permeabilidade das membranas (Danilenko et al., 1993), em alguns casos pela formação de canais iônicos (Mellor & Sansom, 1990).

4.2.4. Peptídeos antibióticos

A estrutura anfifílica tem sido encontrada em várias moléculas peptídicas biologicamente ativas. Em particular, esta estrutura anfifílica em α-hélice é considerada como sendo a unidade estrutural mais importante para a atividade antibiótica de muitos peptídeos, ocorrendo naturalmente com maior freqüência em peptídeos como a Melitina (Habermann, 1972), cecropina (Rees et al., 1997), magainina (Zasloff, 1987), dermaceptina (Mor et al., 1991; Mor & Nicolas, 1994), apidaecinas e drosocinas (Otvos Jr et al., 2000).

Essa estrutura anfifílica é encontrada com freqüência em peptídeos produzidos por fungos, insetos, anfíbios e mamíferos, com atividade antibiótica, antifúngica, anti-virótica, hemolítica e anti-tumoral (Lorenzi, 2002).

É conhecido que a natureza policatiônica e hidrofóbica dos peptídeos seja importante para a interação inicial entre os mesmos e a membrana plasmática das bactérias (Hancock et al., 1995; Wu & Hancock, 1999). Esta característica policatiônica da molécula e a conformação em hélice promovem um aumento na afinidade dos peptídeos pela membrana

citoplasmática de bactérias (Wieprecht et al., 1997). Segundo Hancock e Chapple (1999), a natureza anfifílica e catiônica desses peptídeos é fundamental para a interação inicial entre o peptídeo e as membranas de bactérias, principalmente daquelas Gram-negativas. Os sítios positivos do peptídeo interagem com cargas negativas da membrana externa e citoplasmática (Wu & Hancock, 1999). A característica anfifílica da molécula estaria contribuindo para a interação do peptídeo, primeiro com a membrana externa e depois com a membrana plasmática, podendo assim, causar distúrbios de permeabilidade nestas células (Hancock e Chapple, 1999).

Experimentos realizados por Park et al. (1995) mostraram que os mastoparanos (MP e MP-B) apresentam alta atividade antibiótica, porém algumas diferenças foram observadas nas especificidades antimicrobianas destas moléculas. Por exemplo, o MP-B apresentou pronunciada atividade antibiótica, tanto contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilies*, quanto para bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *Shigella sonnei*. Já o MP apresentou atividade acentuada apenas contra gram-positivos. Segundo os autores, isto é devido às características anfifílicas das moléculas peptídicas. Demonstrou-se ainda, que a introdução de aminoácidos básicos, como lisina, na parte hidrofóbica da molécula promove um aumento na atividade contra bactérias gram-negativas, acompanhada de uma drástica redução na atividade contra os Gram-positivos. Por outro lado, quando resíduos de lisina são incorporados na porção hidrofílica da seqüência peptídica observa-se uma diminuição no efeito antibacteriano destes peptídeos.

O eumenine mastoparano-AF (EMP-AF), foi isolado do veneno da vespa solitária *Anterhynchium flavomarginatum micado*, como sendo o principal componente peptídico do veneno desta vespa (Konno et al., 2000). Trata-se de um tetradecapeptídeo, rico em aminoácidos hidrofóbicos e básicos, com seqüência primária similar à dos mastoparanos. Além da estrutura primária semelhante à dos mastoparanos isolados do veneno de vespas

sociais, o EMP-AF possui ainda, atividades biológicas similares às dos mastoparanos clássicos (Konno et al., 2001).

Um outro peptídeo extraído do veneno de vespa solitária é o Anoplin, extraído do veneno de *Anoplius samariensis*. Trata-se de um peptídeo rico em aminoácidos hidrofóbicos e básicos, também com seqüência primária similar aos mastoparanos, principalmente ao Mastoparano-X e crabrolina, que são degranuladores de mastócitos, isolados do veneno de *Vespa xanthoptera* (Krishnakumari & Nagaraj, 1997) e *Vespa crabro* (Argiolas & Pisano, 1984), respectivamente.

Ensaios realizados com esses mastoparanos indicaram que a seqüência primária, estrutura e atividade biológica, como degranulação de mastócitos, são parecidas com aquelas apresentadas pelos peptídeos anfipáticos isolados dos venenos de Hymenoptera sociais, com atividade inflamatória.

Segundo trabalho realizado por Konno et al. (2000), o EMP-AF possui atividade hemolítica e inflamatória proporcional à do MP, extraído do veneno de vespa social, e atividade mais intensa que o Anoplin. Em um estudo realizado por Konno et al. (2001), foi constatada a atividade antibiótica do Anoplin contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, podendo ser considerado de grande importância no processo de preservação das presas desses animais, contra infecções.

Turilazzi et al. (2006) relataram a presença de dois peptídeos, parecidos com os mastoparanos de vespas, com atividade antibiótica, na cutícula de fêmeas adultas e larvas de *Polistes dominulus*, a Dominulina A (I N W K K I A E V G G K I L S S L-NH_2) e Dominulina B (I N W K K I A E I G K Q V L S A L-NH_2). Acredita-se que estes peptídeos sejam oriundos do veneno, que a vespa aplica em todo o ninho na forma de um *spray*, como proteção contra agentes patogênicos.

4.2.5. Neurotoxinas

Os componentes neurotóxicos estão presentes não somente nos venenos com características paralisantes, como é o caso das vespas solitárias, mas também podem ser encontrados nos venenos de vespas e abelhas sociais. As primeiras neurotoxinas isoladas foram encontradas nos venenos de *Vespa mandarinia*, *V. xanthoptra* e *V. analis insularis* (Kawai & Hori, 1976).

Uma das neurotoxinas mais bem estudadas é a Mandaratoxina (MDTX), isolada do veneno de *V. mandarinia* (Abe et al., 1982). Trata-se de um polipeptídeo, de aproximadamente 20 KDa, que não apresenta atividade hemolítica e enzimática. Por outro lado, quando injetada em músculo motor de lagosta, mostrou uma atividade bloqueadora irreversível do potencial excitatório pós-sináptico. Análise intracelular da fibra nervosa pré-sináptica mostrou que a MDTX atua bloqueando o potencial de ação, principalmente através da redução da corrente de sódio.

Uma nova neurotoxina foi isolada à partir do veneno de *Anopolis samariensis* (Yokota et al., 2001), chamada de beta-pompilidotoxina (β-PMTX). Segundo Sahara et al. (2000), esta neurotoxina diminui ou bloqueia as mudanças conformacionais necessárias para a rápida inativação dos canais de cálcio na superfície extracelular de membranas.

Pizzo et al. (2004) isolaram uma neurotoxina à partir do veneno da vespa *Agelaia vicina*, chamada AvTx 7. Esta neurotoxina com massa molecular de 1210 Da, estimula a liberação do glutamato na presença de bloqueadores de canais de cálcio e sódio, sugerindo que sua ação não seja mediada através desses canais. Por outro lado, a AvTx 7 potencia a liberação de glutamato na presença de tetraetilamonio e 4-aminopiridina. Desta forma, a AvTx 7 tem sido vista como uma ferramenta importante para os estudos mais aprofundados sobre os canais de potássio na liberação de glutamato.

4.3. Mecanismos de interação peptídeo-membrana

Utilizando-se análises de dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear, Higashijima e col. (1983) determinaram a estrutura secundária de mastoparanos em solução, e sob interação com os fosfolipídios. Foi observado que ao se ligarem às membranas fosfolipídicas, ocorre a formação da estrutura em hélice-α. A conformação em hélice-α de uma dada seqüência peptídica anfipática favorece a segregação das faces hidrofílicas e hidrofóbicas (Rex & Schwarz, 1998). Uma hélice-α anfifílica é definida como uma estrutura em hélice, na qual os resíduos de aminoácidos estão distribuídos na estrutura secundária com faces polar e apolar voltadas para direções opostas.

Hori e colaboradores (2001), utilizando experimentos de Ressonância Magnética Nuclear, constataram que os mastoparanos assumem dois estados de orientações diferentes: um com o eixo da hélice alinhado paralelamente à membrana de vesículas sintéticas, e um outro estado onde o eixo da hélice apresenta-se perpendicular à membrana.

Parente et al. (1990), propuseram um modelo teórico do mecanismo molecular envolvido na formação de poros, através da agregação de 8 a 12 monômeros de um peptídeo anfifílico (GALA), onde as moléculas se posicionam perpendicularmente através da membrana. Este evento é dependente do pH e torna-se rápido após a interação da primeira molécula com a membrana. Existem sistemas onde a formação de poros é reversível e de curta duração, onde a ativação dos poros somente é possível durante uma desestabilização momentânea das membranas, causada pela interação peptídeo-lipídio (Rex & Schwarz, 1998). Aparentemente, isto envolve também um movimento rápido do tipo “flip-flop” (Fattal et al., 1994).

Matsuzaki et al. (1995a; b) demonstraram a relação entre a ativação do poro e translocação (do peptídeo magainina) através da membrana. Rex & Schwarz (1998) demonstraram ainda que a taxa de formação de poros na membrana aumenta em proporção direta à concentração de peptídeos ligados à membrana. Além disso, a formação de poros

passa por dois estágios conformacionais monoméricos do peptídeo. Segundo Matsuzaki et al. (1996) o poro é formado por um arranjo ou agregado de moléculas peptídicas. A estrutura do poro foi modelada como um agregado de hélices estendidas na membrana, cuja superfície hidrofílica aparece orientada em direção à luz do poro (Mellor e Sansom, 1990). Uma cadeia composta de 14 resíduos de aminoácidos possui em média 21Å de comprimento, enquanto que a espessura da bicamada lipídica varia em torno de 30 Å. Um estudo utilizando ressonância magnética nuclear (Wakamatsu et al., 1992) revelou que os dois resíduos N-terminais do Mastoparano-X, quando ligado à membrana, não formam hélice-α, aumentando assim, o comprimento da cadeia polipeptídica. Esta afirmação foi confirmada por análises de dicroísmo circular (Schwarz & Blochmann, 1993), onde foi constatada formação de menos de 100% de hélice-α. Conseqüentemente, o poro parece ser composto por um pacote de moléculas em hélice-α parcialmente desenroladas e, além disso, pode ainda ocorrer casos onde a membrana sofre deformação após a agregação dos peptídeos (Matsuzaki et al., 1996).

Vários mecanismos foram propostos para descrever a interação de peptídeos com membranas lipídicas durante o processo de formação de poros, sendo os principais denominados "barril" e "carpete". No primeiro caso, modelo barril (Figura 1A), ocorre a formação de canais transmembrânicos, através da associação de hélices-α anfipáticas, sendo que a superfície hidrofóbica do peptídeo interage com a região hidrofóbica central da camada lipídica, enquanto que a superfície hidrofílica do peptídeo interage com a região hidrofílica da bicamada formando um poro aquoso (Yang et al., 2001). Um outro tipo de formação de poro na membrana seria o modelo toroidal (Figura 1B), onde monômeros de peptídeo ficariam embebidos na região das cabeças dos fosfolipídios.

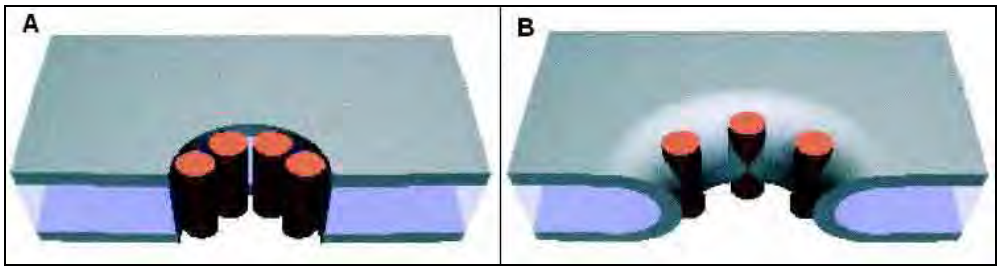

Figura 1: Modelos de interação do peptídeo Alameticina com membranas de fosfolipídios de acordo com Yang et al. (2001). A) modelo barril e B) modelo poro toroidal. A região cinza representa a região das cabeças dos fosfolipídios e os cilindros vermelhos representam as moléculas de peptídeo.

No modelo carpete, os peptídeos alinham-se paralelamente à superfície da bicamada como se fosse um carpete (Oren & Shai, 1998). Em altas concentrações locais de peptídeo, ocorre a penetração das moléculas peptídicas na bicamada, resultando na ruptura da mesma. Neste modelo de interação, peptídeos com conformação em hélice anfipática, ligam-se à membrana de forma que o eixo da hélice se posicione perpendicularmente à superfície, e os resíduos carregados da cadeia interagem com a parte polar dos lipídeos, promovendo a formação de um poro aquoso. Sendo assim, os peptídeos se ligam à superfície da membrana com suas regiões hidrofóbicas em contato com a membrana e as regiões hidrofílicas em contanto com o solvente (Figura 2B). Quando certa contração de monômeros é atingida, a membrana é rompida (Figura 2C). A formação desses poros provoca um aumento na permeabilidade da membrana podendo resultar numa eventual ruptura da mesma (Yang et al., 2001).

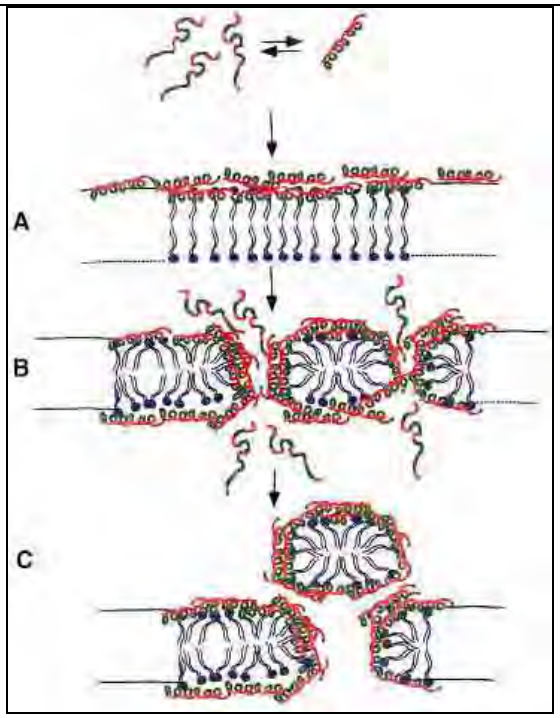

Figura 2: Ilustração do modelo carpete, sugerido para a penetração de peptídeos nas membranas, segundo Oren & Shai (1998). Neste modelo, A) os peptídeos se ligam a superfície da membrana; B) e quando uma certa contração de monômeros é atingida, a membrana é rompida.

Aparentemente, a translocação de peptídeos está relacionada com a formação de poros (Figura 3). Segundo Matsuzaki et al. (1995a; 1998), as moléculas de peptídeo primeiramente se alojam no lado externo da monocamada, formando interações de curta duração. No momento da sua desintegração, uma fração dos peptídeos troca de posição, indo para a camada interna. Uma diminuição na concentração de peptídeos na membrana externa reduz a taxa de formação de poros, conseqüentemente, o índice de translocação é inicialmente alto e diminui rapidamente. A rápida internalização dos peptídeos em um curto período de tempo explica a rápida liberação de histamina (Okano et al., 1985). A translocação de peptídeos positivamente carregados é favorecida por um potencial negativo interno da membrana (Matsuzaki et al., 1995c; Matsuzaki, 1998). Foi constatado ainda que o Mastoparano-X rapidamente randomiza os lipídios na membrana lipídica (Matsuzaki et al., 1996).

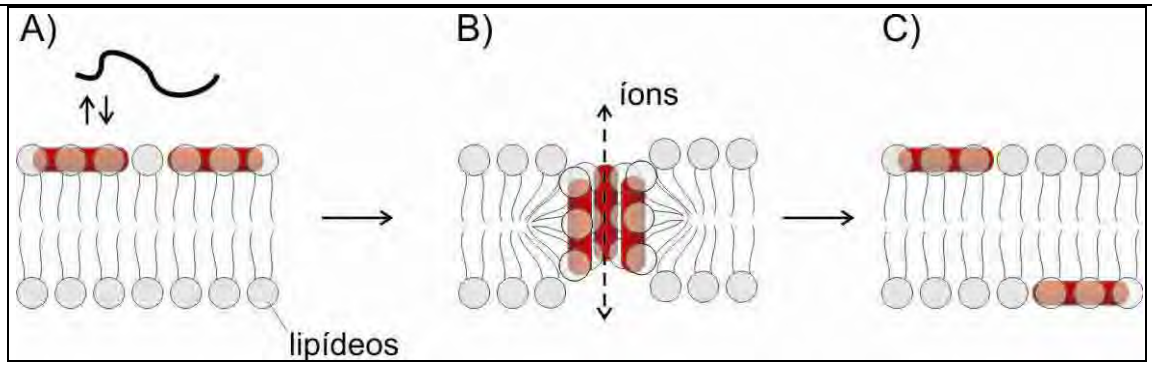

Figura 3: Esquema da formação do poro toroidal transiente segundo Matsuzaki (1998). Em A) estruturação e ligação do peptídeo à membrana; B) formação do poro; e C) translocação dos monômeros de peptídeo para o interior da bicamada e desestruturação do poro.

Peptídeos antibióticos são amplamente encontrados em plantas, insetos, anfíbios e mamíferos, apresentando um importante papel na defesa destes organismos (Bulet et al., 1999). Esses peptídeos antibióticos, incluindo as defensinas, são conhecidos por interagirem com membranas; além disso, tem sido freqüentemente proposto que a atividade antibiótica específica dos peptídeos, seja relacionada com essa interação (Ibrahim et al., 2000). Além disso, Friedrich et al. (2001), mostraram que a indolicidina, um peptídeo com atividade antibiótica isolado de neutrófilos bovinos, age intracelularmente, perturbando a síntese de algumas proteínas e RNAs, causando morte celular, mostrando porém, que os peptídeos antibióticos podem apresentar diferentes modos de ação.

4.4. Estudos estruturais de peptídeos biologicamente ativos

As estruturas em hélice-α anfifílica e estruturas β são comumente encontradas em peptídeos líticos e antimicrobianos, que agem perturbando a função de barreira das membranas. A estrutura do complexo lipídeo-peptídeo (proteolipossomo) é determinada por três interações principais: a interação hidrofóbica da face apolar da hélice com os lipídios; a interação polar do lado hidrofílico de diferentes hélices entre si; e a interação de resíduos hidrofóbicos dos peptídeos com solventes aquosos. Portanto, a magnitude relativa entre as faces hidrofílicas e hidrofóbicas de peptídeos, com conformação

em hélice-α deve influenciar nas diferenças entre as atividades hemolíticas e antimicrobiais encontradas (Kiyota et al., 1996).

Shai & Oren (1996) em um estudo utilizando análogos à pardaxina, um peptídeo catiônico isolado do peixe *Pardachirus marmoratus*, mostraram que a introdução de D-amino ácidos na cadeia polipeptídica, reduz drasticamente a porcentagem de hélice-α, o que por sua vez, reduz a atividade hemolítica dos análogos diasteroisômeros. Sendo assim, este peptídeo na sua forma natural provavelmente interaja com a membrana da bactéria como um detergente (modelo carpete), desestabilizando a membrana e, conseqüentemente, destruindo a célula.

A análise da troca hidrogênio/deutério (H/D), entre o hidrogênio da amida de cada ligação peptídica e o deutério adicionado ao meio na forma de D_2O, tem sido amplamente utilizada como fonte de informações estruturais e dinâmicas de muitas moléculas. Demmers et al. (2000) descreveram um método de estudo para a determinação da posição exata de peptídeos longos que interagem com membranas lipídicas, através da combinação de reações de deuteração e análises por espectrometria de massas. Neste método foram utilizados peptídeos com conformação hélice-α (WALP16 e $WALP16_{+10}$) e lipossomos artificiais (DMPC), onde foram determinadas as taxas de deuteração parcial, apresentadas pelas moléculas de peptídeos associados às membranas artificiais (**proteolipossomos**), correspondentes às partes da molécula que se posicionam na face externa das membranas, e conseqüentemente interagem com o meio externo. Esta técnica pode ser utilizada para se investigar o mecanismo de ação de polipeptídeos transmembranares na formação de estruturas supramoleculares, tais como poros e/ou canais.

Santos-Cabrera et al. (2004), através da combinação de técnicas de dicroísmo circular e lipossomos, caracterizaram a estrutura do EMP-AF, um mastoparano isolado do veneno da vespa solitária *Anterhynchium flavomarginatum micado*. Foi constatado que trata-se de um peptídeo capaz de permeabilizar lipossomos aniônicos e, em menor extensão,

lipossomos neutros, sendo que esta habilidade parece estar correlacionada com a porcentagem de hélice-α assumida pelo peptídeo quando em contato com essas membranas. Konno e col. (2000) realizaram um estudo do EMP-AF onde foram testadas as diferenças entre a atividade deste peptídeo em sua forma natural e um análogo onde o NH_2 foi retirado do C-terminal (EMP-AF-COO^-). Observou-se que o EMP-AF-NH_2 possui atividade degranuladora de mastócitos 50% mais potente que o análogo EMP-AF-COO^-, na concentração de 10^{-5}M. Além disso, a atividade hemolítica do análogo com C-terminal livre foi completamente perdida. Sforça et al. (2004) demonstraram através de estudos da estrutura secundária, por RMN e Dinâmica Molecular, que além da esperada redução na carga positiva do EMP-AF-COO^- devido à perda do NH_2, a presença do grupo carboxi-livre no lado C-terminal introduz uma instabilidade local capaz de desestabilizar não somente o padrão de ligações de hidrogênio que garantem a estrutura da hélice, mas toda a cadeia peptídica (Figura 4B). De fato, o padrão de hélice anfipática apresentada pelo EMP-AF-NH_2 (Figura 4A) é perdido no análogo carboxi-livre e tanto o lado N-terminal quanto o C-terminal neste análogo mostram-se com altas flutuações durante a simulação.

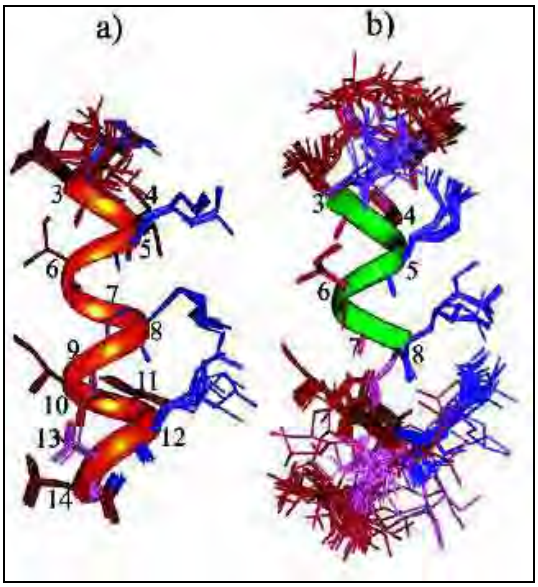

Figura 4: Sobreposição a) das 20 estruturas finais calculadas do EMP-AF-NH_2; b) das 35 estruturas finais calculadas do EMP-AF-COOH em presença de 30:70 (v/v) solução de TFE/água (Sforça et al., 2004).

Estudos utilizando simulação por Dinâmica Molecular dos mastoparanos em misturas de TFE-água, mostraram que o EMP-AF-COO^- sofre desestruturação da conformação helicoidal e perda de anfipaticidade, devido à atração eletrostática entre a carga negativa do grupo carboxila e os grupos catiônicos das cadeias laterais de alguns resíduos (Costa, 2006), sendo esta provavelmente a principal causa da perda de atividade do análogo com C-terminal ácido.

As atividades hemolítica e antimicrobiana são dependentes ou diretamente influenciadas pelo tamanho, estrutura e composição em aminoácidos da cadeia polipeptídica (Lee et al., 2003). Por exemplo, entre os peptídeos contendo resíduos apolares (Leu e Ala) e básicos (Lys e Arg) numa razão 3:1, com extensão variando entre 4 a 16 resíduos, foi observada atividade antibiótica para um peptídeo com 12 resíduos de aminoácido (Lee et al., 1986). Um resultado similar também tem mostrado uma potente atividade antimicrobiana para peptídeos com cadeias contendo de 14 a 15 resíduos pertencentes a um grupo rico em Leu e Lys (na razão 1:1) com 8 a 22 resíduos de aminoácidos (Blondelle & Houghten, 1992). Segundo Kiyota et al. (1996), o tamanho da cadeia, composição em aminoácidos e o posicionamento de resíduos apolares carregados positivamente ao longo da cadeia, são importantes para as atividades antibiótica e hemolítica.

Li et al. (2000) relataram que existem diferenças na atividade antibiótica apresentada por D e L-enantiômeros do mastoparano-M, isolado do veneno de *Vespa mandarina*. Além disso, os D-enantiômeros, apresentam resistência à enzimas líticas, como a papaína e quimotripsina, o que provavelmente está envolvido com o fato desta forma apresentar atividade antibiótica mais elevada em relação à forma natural.

Konno et al. (2001) caracterizaram à partir do veneno de *Anoplius samariensis*, um peptídeo altamente degranulador de mastócitos e com atividade antibiótica de amplo espectro, chamado Anoplin. Resultados de análises de dicroísmo circular revelaram que, na presença de lipossomos e meio com elevada força iônica, o Anoplin também interage

com a superfície celular de bactérias provocando distúrbios no potencial de membrana e na permeabilidade. Provavelmente, este distúrbio ocorra através da formação de canais ou poros na membrana, por um mecanismo similar àquele apresentado por peptídeos líticos.

Em um estudo recente, Santos-Cabrera (2006) observou que existem diferenças quanto à estruturação em hélice-α de mastoparanos, de acordo tanto com a composição em aminoácidos, quanto do meio no qual eles estão inseridos. Além disso, para esses peptídeos, as interações hidrofóbicas determinam a elipticidade, sendo esta modulada pelas interações eletrostáticas proporcionadas pela polaridade do meio. A elipticidade também é influenciada pela relação peptídeo/lipídeo, sugerindo que a afinidade entre eles também afeta a transição conformacional. Além disso, foi observado que peptídeos em suas formas amidadas (C-terminal amidado) apresentam maior teor helicoidal, que seus análogos carboxilados, sinalizando a influência do macrodipolo da hélice. Os peptídeos mais eficientes na permeabilização de vesículas e na atividade antimicrobiana são aqueles que apresentam hidrofobicidade média negativa, ou pouco positiva. A seletividade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas parece estar relacionada ao momento hidrofóbico desses peptídeos (Santos-Cabrera, 2006).

5. OBJETIVOS

Neste trabalho foi proposta a realização um estudo estrutural e funcional de peptídeos mastoparanos encontrados nos venenos de vespas sociais e solitárias.

O principal objetivo deste projeto foi realizar um estudo da estrutura secundária destes mastoparanos que possibilitasse estabelecer uma relação entre a estrutura molecular e as atividades biológicas, permitindo uma compreensão do modo de ação destes peptídeos, ao nível de interação com membranas lipídicas.

Desta forma, utilizando-se de técnicas de análise estrutural, como dicroísmo circular, modelagem e dinâmica molecular, juntamente com a técnica de troca H/D combinada com espectrometria de massas, procurou-se estabelecer uma correlação entre as estruturas dos peptídeos, interações dos mesmos com membranas (sintéticas e naturais) e suas atividades biológicas, com intuito de contribuir para o entendimento das bases moleculares envolvidas nas funções desses peptídeos.

Sob o ponto de vista de formação de recursos humanos, este trabalho contribuiu para o treinamento, ao nível de doutorado, em técnicas de espectrometria de massas, dicroísmo circular, síntese de peptídeos, troca isotópica H/D, modelagem molecular por homologia, dinâmica molecular e análise das atividades biológicas. Além disto, este estudo certamente ofereceu ainda grandes possibilidades de qualificação de especialistas em biologia estrutural, principalmente voltados para estudos da relação existente entre estrutura e função de peptídeos.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Síntese manual de peptídeos em fase sólida

A síntese dos peptídeos lineares foi realizada através do método manual em fase sólida (Merrifield, 1986), utilizando-se química N-9-fluorenilmetoxicarbonil, também conhecida como estratégia Fmoc. Foram sintetizados os seguintes peptídeos (ver Tabela 3):

TABELA 3: Seqüência primária dos peptídeos em estudo.

PEPTÍDEOS	Seqüências primárias														
Protonectarina-MP	I	N	W	K	A	L	L	D	A	A	K	K	V	L	$-NH_2$
Parapolybia-MP	I	N	W	K	K	M	A	A	T	A	L	K	M	I	$-NH_2$
Apoica-MP	I	N	W	L	K	I	A	K	K	V	A	G	M	L	$-NH_2$
Asn2-Polybia-MP I	I	N	W	K	K	L	L	D	A	A	K	Q	I	L	$-NH_2$
MK-578	I	N	W	L	K	A	K	K	V	A	G	M	I	L	$-NH_2$

O peptídeo MK-578 foi desenhado com homologia à classe dos mastoparanos naturais, introduzindo-se resíduos de lisina nas posições 5, 7 e 8, para que se pudesse obter um melhor esclarecimento sobre a presença de resíduos catiônicos mais ao centro da cadeia em relação à atividade biológica apresentada. No peptídeo Polybia-MP I o segundo resíduo da cadeia, que no peptídeo natural é um resíduo de Ácido Aspático (Asp), foi substituído por um resíduo de Asparagina (Ans2) com intuito de manter o mesmo resíduo em todas as seqüências e também para que não houvesse a possibilidade do Asp neutralizar a carga de alguma Lys nesta região da cadeia, sendo desta forma, nomeado Asn2-Polybia-MP I. Deve-se observar que os peptídeos foram sintetizados na forma amidada.

Os peptídeos foram sintetizados utilizando-se 100 mg de resina NovaSyn TGR, com grau de substituição de 0,2 mmole/g. Em cada ciclo da síntese foi adicionado Fmoc-aminoácido-OH (NOVABIOCHEM), contendo N-Hidroxibenzotriazol hidratado ($HOBt.H_2O$) (NOVABIOCHEM) e N-Metilmorfolina (NMM) (ALDRICH) como agentes ativadores dos aminoácidos e Hexafluorofosfato Benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfato (PyBOP)

(NOVABIOCHEM) como agente acoplante, por um período de 30 min. Após cada ciclo de acoplamento foram realizadas cinco lavagens da resina com N-N-Dimetilformamida (DMF, SYNTH) e em seguida realizada a desproteção utilizando Piperidina (FLUKA) 30% em DMF.

A tabela abaixo (Tabela 4) mostra um resumo das etapas realizadas na síntese dos peptídeos, correspondente a um ciclo da síntese:

TABELA 4: Etapas de cada ciclo da síntese dos peptídeos.

ETAPA	REAGENTE	Nº DE REPETIÇÕES	TEMPO
Desproteção	Piperidina/DMF (30:70)	2	4 min
Lavagem da resina	DMF	5	45 seg
Ativação do aminoácido	HOBt.H_2O [0,5 mmol/mL DMF]	1	3 min
Acoplamento	105 mg PyBOP/acoplamento NMM 1 mmol/mL DMF	1	30 min
Lavagem da resina	DMF	5	45 seg

Todas as reações foram realizadas sob agitação mecânica em capela de segurança. Após a acoplagem do último resido de aminoácido, a resina foi lavada com metanol (MALLINCKRODT) e seca em liofilizador (HETO, modelo MLW – LGA 05).

Após a secagem, foi feita a clivagem entre o peptídeo e a resina utilizando-se uma solução de ácido trifluoroacético (TFA) 82,5% (v/v) (MALLINCKRODT), Anisol 5% (v/v) (SIGMA), Etanoditiol 2,5% (v/v) (ALDRICH), Fenol 5% (m/v) e água ultrapurificada 5% (v/v), durante 2 horas sob agitação mecânica.

Esta solução de TFA-Anisol-Etanoditiol-Fenol-Peptídeo foi filtrada para retirada da resina e centrifugada em uma centrifuga refrigerada (EPPENDORF, modelo 5810R) por 15 minutos a 3000 rpm na presença de éter etílico (SYNTH), para promover a sedimentação do peptídeo e uma primeira etapa de retirada de solventes e sub-produtos da síntese. O material sedimentado foi então re-suspendido em água bidestilada (destilador MARCONI, modelo MA 078) e ultrapurificada (purificador NANOpure BARNSTEAD, modelo D4754) para então ser

purificado através de cromatografia líquida (ver item 6.2). O controle de qualidade foi feito através de espectrometria de massas ESI-MS e de seqüênciamento por Química Degradativa de Edman em um seqüenciador automático (SHIMADZU, modelo PPSQ-21A). O rendimento da síntese foi de aproximadamente 25% para todos os peptídeos.

6.2. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

A purificação dos peptídeos provenientes da síntese manual foi feita através de cromatografia líquida de alta performance sob fase reversa (RP-HPLC, Reversed-phase High Performance Liquid chromatrography) utilizado um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-10AD, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo SPD-10A, constituído por duas bombas LC-10AD (bombas A e B), com injetor Rheodyne modelo 7725i com "*loop*" de 0,5 mL, um sistema controlador Shimadzu (modelo CBM-10A) e coluna semipreparativa C-18 10x250 mm (SHISEIDO). Para a fase móvel, foram utilizados dois solventes, *A* (acetonitrila 100% (MALLINCKRODT) contendo 0,1% TFA (v/v)) e *B* (água, contendo 0,1% TFA (v/v)). O fluxo do solvente para todos os peptídeos foi de 2mL/min.

Para cada peptídeo foi utilizada uma condição cromatográfica específica conforme tabela abaixo:

TABELA 5: Concentração de Solvente B (Acetonitrila em presença de 0,1% de TFA) utilizada na purificação dos peptídeos sintéticos, por RP-HPLC em condições isocráticas.

PEPTÍDEOS	% Solvente B
Protonectarina-MP	53
Parapolybia-MP	58
Apoica-MP	60
Asn2-Polybia-MP I	60
MK-578	48

6.3. Espectrometria de massas ESI

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um Espectrômetro de Massas do tipo triploquadrupolo, modelo QUATTRO II (MICROMASS). O espectrômetro de massas foi equipado com probe padrão, do tipo electrospray (ESI), auxiliado por uma microbomba de infusão (KD Scientific). O software MassLynx (MICROMASS) foi utilizado para controle de aquisição de dados. Durante todos os experimentos a temperatura do cone foi mantida a 80ºC e a voltagem na agulha a 3,55 kV, aplicando-se um fluxo de gás secante (nitrogênio) de 200 L/h e um fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) de 20 L/h. O espectrômetro de massas foi calibrado com os picos do envelope de íons-fragmentos da mioglobina de coração bovino, produzidos por aplicação de potencial de 40 V no cone de amostra. A detecção no espectrômetro de massa foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 3000, em 10 segundos, com uma resolução de aproximadamente 3000; o sistema de aquisição de dados foi operado em modo contínuo.

Para a confirmação das massas moleculares dos peptídeos sintéticos foram utilizadas soluções de cada um dos peptídeos na concentração de 1 μg/μL contendo 0,1% de ácido fórmico (MALLINCKRODT).

6.4. Seqüênciamento por Química Degradativa de Edman

Os peptídeos sintetizados e purificados foram submetidos ao seqüênciamento primário através da técnica de Química Degradativa de Edman, para confirmação das seqüências primárias. Foram colocadas amostras contendo 50 μg de peptídeo no seqüenciador.

Estes experimentos foram realizados em um seqüênciador automático de fase gasosa PPSQ-21A (SHIMADZU), onde os resíduos de aminoácidos foram identificados na forma de PTH-aminoácidos formados a partir de uma seqüência de reações químicas.

A reação de degradação de Edman ocorre no lado N-terminal da cadeia peptídica liberando um resíduo por ciclo reativo. Os resíduos (PTH-aminoácidos) foram identificados através de um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) calibrado com padrões de PTH-aminoácidos (WAKO CHEM.), equipado com uma bomba modelo LC-10AS (SHIMADZU) e um detector de luz ultravioleta, modelo SPD-10A, acoplados ao próprio seqüenciador. O controle do sistema e aquisição dos dados foram realizados através do software PPSQ-20 Data Processing e CLASS LC-10A (SHIMADZU).

6.5. Dicroísmo circular

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados em um espectropolarímetro Jasco (modelo 710), junto ao Departamento de Física, do IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto/SP, sob coordenação do Prof. Dr. João Ruggiero Neto.

Os espectros de dicroísmo circular dos mastoparanos foram coletados na região de UV distante, no intervalo de comprimento de onda de 190 a 260 nm, à 25ºC. A velocidade de varredura foi de 20 nm/min, utilizando-se uma largura de banda de 1,0 nm, sensibilidade de 20 a 50 miligraus, tempo de resposta de 1 s e 0,1 nm de resolução. Os espectros finais foram obtidos a partir da média de 9 acumulações utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico de 0,5 cm.

As amostras foram solubilizadas em água. Os espectros de CD foram obtidos para as soluções de peptídeo adicionadas a diferentes concentrações de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE / MERCK), dodecil sulfato de sódio (SDS / SIGMA) e lipossomos zwitteriônicos e aniônicos,

constituídos pelos fosfolipídios PC (L-α-fosfatidilcolina / SIGMA) e PG (L-α-fosfatidil-DL-glicerol / SIGMA).

Nos ensaios realizados em presença de TFE, foi preparada uma solução contendo 40% (v/v) de TFE em água e 20 μM de peptídeo. Os peptídeos foram analisados em duas concentrações de SDS, 165 μM (abaixo da Concentração Micelar Crítica, CMC) e 8 mM (acima da CMC), em água, contendo 20 μM de peptídeo. A montagem dos lipossomos está descrita a seguir no item 6.6.

Fazendo-se a correção da linha de base, a elipticidade observada, θ (miligraus), foi convertida em elipticidade molar média, [Θ] (graus cm^2/dmol), usando a relação:

$$[\Theta] = \frac{100\theta}{Lcn}$$

onde "*l*" é o caminho óptico da cubeta em centímetros , "*c*" é a concentração do peptídeo em milimolar e "*n*" é o número de resíduos do peptídeo.

Assumindo-se um modelo de dois estados, proposto por Rohl e Baldwin (Rohl & Baldwin, 1998), a elipticidade residual observada a 222nm (Θ_{222}^{obs} em graus cm^2/dmol resíduo) foi convertida em porcentagem de hélice-α (f_H) usando a seguinte equação:

$$f_H = \frac{\Theta_{222}^{obs} - \Theta_{222}^{C}}{\Theta_{222}^{H} - \Theta_{222}^{C}}$$

onde Θ_{222}^{C} = +640 graus cm^2/dmol resíduo (Rohl e Baldwin, 1998) corresponde a elipticidade em 100% de *random coil* (conformação aleatória). Θ_{222}^{H} (graus cm^2/dmol resíduo) (Rohl e Baldwin, 1998) corresponde a elipticidade residual para uma estrutura 100% helicoidal, e é dada por:

$$\Theta_{222}^{H} = -42000\,(1 - (x/n))$$

onde "*n*" é o número de resíduos de aminoácidos e x=3, para peptídeos carboxiamidados, ou x=4, para peptídeos não-carboxiamidados.

6.6. Preparo dos Lipossomos

Os lipossomos foram preparados pela técnica de evaporação de fase reversa, segundo metodologia descrita por Szoka & Papahadlopoulos (1978). Esta técnica permite a manipulação da composição fosfolipídica da bicamada artificial através da espécie e da razão dos fosfolipídios.

Para a preparação de vesículas neutras foi utilizada uma solução contendo L-α-fosfatidilcolina (PC) (SIGMA) de ovo (tipo XVI-E ~99% TLC) em clorofórmio (PA / MERCK). Esta solução foi seca em fluxo de nitrogênio (N_2) através de uma secagem rotativa, para promover a aderência do filme de fosfolipídio no tubo de ensaio. Após a secagem, os tubos foram levados para um dessecador a vácuo, por 15 horas para a retirada de traços de solvente.

O filme de PC foi re-suspendido em tampão Tris (5 mM)/borato, pH 7,5 contendo EDTA de modo que a concentração final de PC fosse 10 Mm. Essa suspensão foi levada a um sonicador equipado com transdutor de titânio (Virtis-475 / VIRSONIC) em banho de gelo, sob atmosfera de N_2 por 55 minutos e, após esse tempo, transferida para um tubo *Eppendorf* e centrifugada a 14000 rpm, por 5 minutos, para promover a retirada de resíduos de titânio metálico.

As vesículas constituídas de fosfatidilcolina/fosfatidilglicerol (PC/PG-7030) (SIGMA), na concentração de 70 % de PC e 30 % de PG, foram preparadas utilizando-se a mesma metodologia para o preparo das vesículas de PC. O fosfolipídio utilizado foi o L-α-fosfatidil-dL-glicerol-sódio de ovo (~99% TLC) (SIGMA).

6.7. Modelagem molecular por homologia

Para a modelagem das estruturas tridimensionais foi utilizado o programa MODELLER (Sali & Blundell, 1993). Este programa aborda a modelagem comparativa satisfazendo restrições espaciais. Os procedimentos para modelagem iniciam-se com o alinhamento da seqüência de aminoácidos a ser modelada (*alvo*), com uma ou várias seqüências primárias de proteínas e peptídeos, com estruturas tridimensionais conhecidas (*moldes* ou *templates*), obedecendo ao critério de maior identidade para a seleção. Este alinhamento é utilizado como informação de entrada *(input)* para o programa. O arquivo de saída *(output)* é um modelo tridimensional da seqüência alvo, contendo todos os átomos da cadeia principal e das cadeias laterais. As coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica do Mastoparano-X (código de acesso PDB: 1A13) (Kusunoki et al., 1998), resolvida a 2,0 Å de resolução, foi utilizada como modelo inicial (*molde*) para remodelagem dos mastoparanos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP e Asn2-Polybia-MP I, pois estes apresentaram identidade de 57,15%, 57,15% e 50%, respectivamente. Para os mastoparanos Apoica-MP e MK-578 foi utilizado como modelo inicial o mastoparano EMP-AF, pois apresentaram 57,14% e 43,71% de identidade, respectivamente. As coordenadas tridimensionais do EMP-AF não foram ainda depositadas no *PDB* (*Protein Data Bank*) sendo, desta forma, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr. (Departamento de Biologia, PUC-Porto Alegre-RS) e pelo Prof. Dr. Valmir Fadel, Departamento de Física, IBILCE, UNESP – São José do Rio Preto-SP. Um total de 1000 modelos foram gerados para cada um dos peptídeos, e o modelo final foi selecionado baseando-se na sua qualidade estereoquímica.

6.8. Métodos de avaliação dos modelos estruturais

6.8.1. Procheck

O Procheck (Laskowski et al., 1994) analisa a geometria global da estrutura ou cada resíduo individualmente, utilizando para isso parâmetros estereoquímicos derivados de estruturas de alta resolução ou bem refinadas (Morris et al., 1992), que constituem sua base de dados. Trata-se de um pacote popular de programas para verificação da qualidade da estrutura 3D de proteínas e peptídeos.

Os parâmetros estereoquímicos usados são aqueles descritos em detalhe em Morris et al. (1992). As verificações também fazem uso do comprimento e ângulo de ligação ideal, derivados de uma análise detalhada de estruturas de pequenas moléculas no Cambridge Structural Database (CSD) (Engh & Huber, 1991). Estes parâmetros utilizados como informações estereoquímicas checados pelo Procheck são: ligações covalentes, planaridade de grupos planares (aromáticos, ligações peptídicas, etc.), ângulos diédricos, quiralidade, interações não covalentes, ligações de hidrogênio da cadeia principal e pontes dissulfeto.

O Procheck requer como entrada um arquivo das coordenadas atômicas da estrutura do peptídeo a ser avaliado no formato "pdb" e produz representações coloridas facilmente interpretadas, descrevendo uma estrutura, e também comparando duas estruturas relacionadas. Além disso, mostra uma lista detalhada de resíduo por resíduo, fornecendo uma avaliação da qualidade total da estrutura, em comparação às estruturas bem-refinadas de mesma definição. Dentre as varias análises fornecidas pelo Procheck, utilizou-se o Diagrama de Ramachandran e o *G-factor*.

6.8.2. Diagrama de Ramachandran

G. N. Ramachandran descreveu as conformações possíveis para os aminoácidos em uma cadeia polipeptídica. A conformação da cadeia peptídica é simplesmente descrita pelos valores dos ângulos diedros na estrutura principal da seqüência peptídica (ângulo descrito pelo nitrogênio e carbono alfa ($N\text{-}C_\alpha$) e o ângulo descrito pelo carbono alfa e carbono

(C_α-C). Esses ângulos são denominados ângulos de torção ϕ e φ, respectivamente (Gibas & Jambeck, 2001). Em princípio, ϕ e φ podem ter qualquer valor entre -180º e +180º, porém muitos valores de ϕ e φ são proibidos pelas interferências estéricas entre átomos pertencentes ao mesmo esqueleto polipeptídico e pelas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. A conformação na qual ϕ e φ são ambos iguais a 0°, é proibida por esta razão, sendo esta convenção meramente usada como ponto de referência para descrever os ângulos de rotação.

A cadeia não é livre para girar ao redor do terceiro tipo de ligação na estrutura principal da cadeia peptídica. A ligação peptídica é uma ligação parcialmente dupla e portanto, quimicamente restrita a ser planar; sendo assim, os valores de ϕ e φ para cada aminoácido fornecem uma descrição completa da estrutura da cadeia principal do peptídeo.

G. N. Ramachandran usou modelos de pequenos peptídeos para variar sistematicamente os ângulos de torção ϕ e φ com o objetivo de encontrar conformações estáveis. Para cada conformação, a estrutura foi examinada para verificar a proximidade existente dos contatos entre os átomos. Os átomos foram tratados como esferas duras, com as dimensões que correspondem a seus raios de Van der Waals. Conseqüentemente, os ângulos de torção ϕ e φ que fazem com que as esferas colidam, correspondem à conformação estereoquimicamente não permitida (região não permitida) para a cadeia principal de um polipeptídio (Ramachandran et al.*;* 1963).

O diagrama de Ramachandran (Ramachandran et al., 1963; Ramakrishnan & Ramachandran, 1965) indica a distribuição dos ângulos Φ e ψ dos resíduos pertencentes a uma determinada estrutura. Seus indicadores de qualidade baseiam-se na análise de pelo menos 118 estruturas de 2,0 Å de resolução. Segundo Ramachandran et al. (1963), uma estrutura de boa qualidade deve ter 90% ou mais de seus resíduos nas regiões mais favoráveis. Na figura 5, as áreas em branco correspondem a regiões onde existem os choques estereoquímicos na proteína. Estas regiões não permitidas estereoquimicamente valem para

todos os aminoácidos exceto a glicina (Gly) que é a única que não tem cadeia lateral e pode adotar os ângulos de torção ϕ e φ em todos os quadrantes do diagrama de Ramachandran.

As regiões vermelhas correspondem à conformação onde não há nenhum choque estereoquímico, ou seja, são as regiões permitidas e aonde se encontram as hélices-α e folhas-β. As áreas em amarelo mostram as regiões limites onde um raio ligeiramente mais curto de van der Waals é usado no cálculo. Isto faz com que se tenha uma região adicional que corresponda às hélices esquerda e direita.

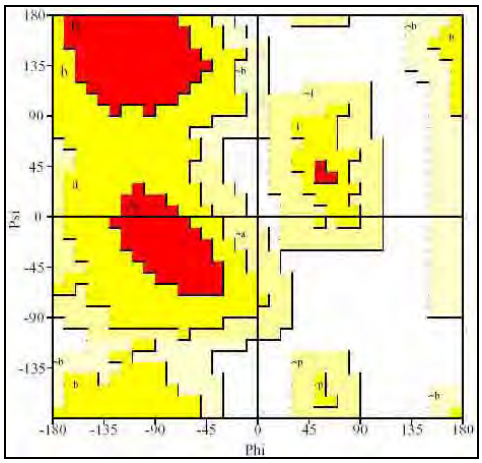

Figura 5: Diagrama de Ramachandran. Em vermelho, região preferencialmente permitida; amarelo, região favoravelmente permitida; amarelo claro, região adicionalmente permitida; e branco, região não permitida.

6.8.3. *G-factor*

O *G-factor* fornece uma medida do desvio de uma dada propriedade estereoquímica (ângulos de torção e geometria covalente), baseado nas distribuições observadas nos parâmetros estereoquímicos em sua base de dados e uma medida da normalidade da estrutura como um todo.

O cálculo do *G-factor* global envolve os diversos *G-factors* para toda a estrutura, num único número. O *G-factor* global é a melhor medida da qualidade estereoquímica total de uma molécula. Por exemplo, os resíduos que caem nas regiões não permitidas do diagrama de

Ramachandran terão um G-factor baixo (ou muito negativo). O valor de *G-factor* baixo sugere que algo pode estar errado com a geometria total da estrutura avaliada.

6.8.4. RMSD – *Root Mean Square Deviations*

O RMSD pode ser calculado de duas maneiras: (i) uma função de todos os átomos de uma proteína (Engh e Huber, 1991) e (ii) uma função de algum subconjunto dos átomos, como a estrutura principal da proteína ou posições de C_α (Kabash e Sander, 1983). O parâmetro mais comum que expressa a diferença entre duas estruturas protéicas é o RMSD, ou desvio médio quadrático, em posições atômicas entre as duas estruturas.

Quando o RMSD é calculado como uma função de todos os átomos de uma proteína, podemos adotar a definição de que o RMSD serve para analisar a medida da variação da posição de cada átomo de uma estrutura com relação a um vetor aceito, sendo denominado RMSD da geometria ideal (Kearsley, 1989). O RMSD da geometria ideal utiliza como parâmetros o comprimento e ângulo de ligação ideais, derivados de uma análise detalhada (Engh e Huber, 1991) de estruturas de pequenas moléculas no Cambridge Structural Database (CSD).

Quando o RMSD é calculado como uma função de algum subconjunto dos átomos, é comum a utilização de um subconjunto de átomos de uma seqüência peptídica, como por exemplo, os átomos da cadeia principal (C_α - C_α).

Uma vez que as estruturas de peptídeos são geralmente descritas em coordenadas atômicas cartesianas, e surgem como uma orientação incorporada em relação ao espaço, o RMSD é uma função da distância entre os átomos em uma estrutura e os mesmos átomos em outra estrutura.

6.9. Dinâmica Molecular

O estudo do comportamento dinâmico dos peptídeos em solução ao longo do tempo foi realizado através de cálculos de dinâmica molecular. Os cálculos de dinâmica e a análise da trajetória foram realizados utilizando-se o pacote de programas AMBER (Pearlman et al., 1995), versão 7 (Case et al., 2002), instalados em plataforma Linux. Esses experimentos foram iniciados junto ao Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biossistemas (LABIO), da Faculdade de Informática da PUC-RS, Porto Alegre-RS, em colaboração com o Prof. Dr. Osmar Norberto de Souza e continuados em uma estação de trabalho destinada a esta finalidade, montada a partir deste trabalho, no Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica / C.E.I.S. (IBRC-UNESP, Rio Claro-SP).

O AMBER (*Assisted Model Building with Energy Refinement*) é um conjunto de programas para a simulação de biomoléculas por dinâmica molecular. O principal módulo do AMBER é o SANDER (*Simulated Annealing with NMR-Derived Energy Restrain*) que realiza as minimizações de energia, simulações por dinâmica molecular e refinamentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Esse módulo utiliza o processo de gradientes conjugados para a minimização de energia por mecânica molecular, geralmente após alguns passos do método de *steepest-descendent*, para corrigir energias iniciais muito desfavoráveis. O pacote AMBER possui ainda uma série de programas desenvolvidos para a análise das trajetórias geradas pelas simulações.

Algumas etapas devem ser seguidas para a realização da simulação por Dinâmica Molecular. A primeira delas é a obtenção das coordenadas tridimensionais dos átomos que compõem a molécula a ser analisada e do solvente utilizado, quando for o caso. Desta forma, é possível calcular as novas posições e velocidades, e gerar uma trajetória em função de um determinado período de tempo. É necessário estabelecer uma temperatura (e/ou pressão) desejada e levar o sistema a esta temperatura (e/ou pressão). Somente após o sistema estar

equilibrado nas condições iniciais desejadas é que as propriedades dinâmicas do sistema podem ser calculadas (Schroeder, 2004).

A estrutura inicial da biomolécula a ser analisada pode ser obtida a partir da estrutura tridimensional determinada através da cristalografia por difração de raios X ou por Ressonância Magnética Nuclear, sendo estas, técnicas experimentais, ou ainda, através de um modelo gerado por estudos de modelagem molecular. Esta molécula é então colocada em um meio de simulação, que pode ser vácuo, meio contínuo ou de solvente explicito e, se necessários, são adicionados contra-íons para garantir a neutralidade do sistema. Esse sistema é então relaxado com uma minimização de energia para corrigir possíveis tensões e interações indesejáveis que existam na conformação inicial. Uma vez estabelecidas essas coordenadas iniciais de simulação, podem então serem feitos os cálculos da dinâmica molecular.

As estruturas iniciais obtidas por modelagem molecular, usando-se o MODELLER, foram imersas em uma caixa triclínica preenchida com solvente, sob condições periódicas de contorno. O solvente utilizado nos experimentos de trajetória foi água TIP3P (Jorgensen et al., 1983), sendo que cada molécula de peptídeo foi envolta por todos os lados por uma camada de solvatação de 10 Å de moléculas de água. Norberto de Souza & Ornstein (1999), demonstraram anteriormente que uma camada de 10 Å em volta de uma molécula de proteína é suficiente para a consideração do sistema de simulação como uma solução diluída.

Os parâmetros da macromolécula, com todos os átomos explicitamente considerados (modelo atomístico, ou *all-atom model*) e moléculas de água TIP3P foram obtidos da biblioteca parm94.dat do AMBER 7.

O modelo de água TIP3P é um modelo rígido, com uma distância O-H e ângulo H-O-H fixos em 0,9572 Å e 104,52 Å, respectivamente, com carga -0,834 para o Oxigênio e 0,417 para cada um dos Hidrogênios, e parâmetros de Lennard-Jonnes $\varepsilon = 76{,}54$ e $\sigma = 3{,}15$.

A preparação dos sistemas de simulação, assim como os cálculos e análises das trajetórias foram feitos em um computador Dell Pentium IV, de 1 GHz com 512 MB de

memória RAM e 80 GB de disco rígido e em um computador Intel Pentium IV, de 3,2GHz, com 1GB de memória RAM e 120 GB de disco rígido.

Cada peptídeo foi inicialmente solvatado em um sistema cúbico, adicionando-se solvente (moléculas de água do tipo TIP3P) em caixas retangulares até uma distância de 10Å em todas as direções da molécula de peptídeo (Figura 6). A tabela abaixo mostra a quantidade de átomos do sistema, o número de moléculas de água e o tamanho de cada uma das caixas construídas para os peptídeos.

Tabela 6: Tabela mostrando número total de átomos, número de moléculas de água e tamanho da caixa para os cinco peptídeos. Estes parâmetros foram utilizados para a simulação da trajetória.

PEPTÍDEOS	Tamanho da caixa (x/y/z) em Å	Nº total de átomos	Nº de moléculas de água (TIP3P)
Protonectarina-MP	44,67 / 42,11 / 39,79	5356	1720
Parapolybia-MP	47,68 / 42,11 / 42,04	6089	1964
Apoica-MP	39,54 / 45,08 / 50,12	6473	2076
Asn2-Polybia-MP I	40,17 / 38,72 / 44,31	4784	1526
MK-578	44,53 / 41,62 / 50,12	6810	2204

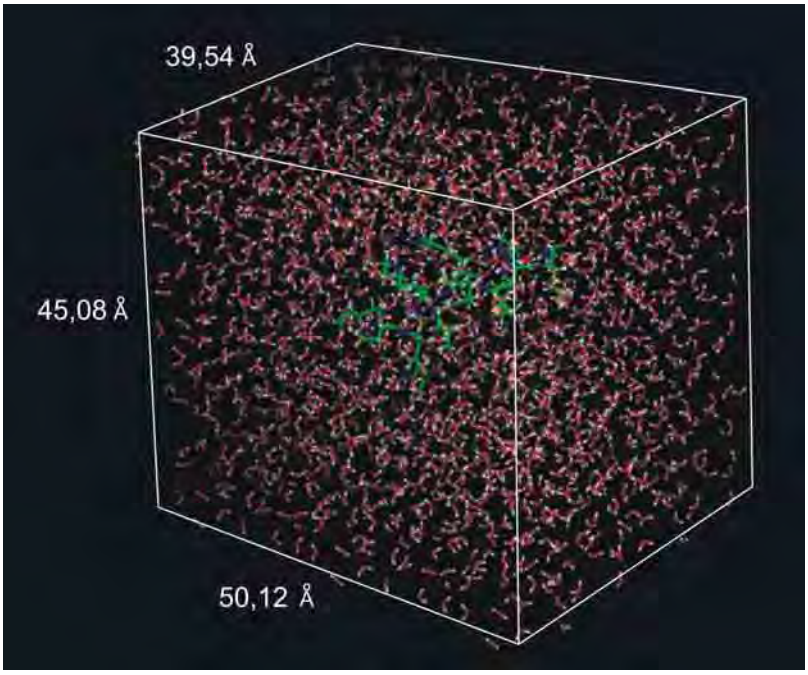

Figura 6: Exemplo de definição do sistema de simulação: ao centro (em verde e azul) uma molécula do peptídeo Apoica-MP solvatada por moléculas de água (em vermelho e branco), numa caixa de dimensões 39,54x45,08x50,12 Å. Esse sistema foi replicado periodicamente em todas as direções. Figura construída com o PyMol (DeLano Scientific LLC, San Carlos, California).

Nas simulações de biomoléculas de tamanho finito alguns cuidados devem ser observados em relação ao meio de simulação (van Gunsteren et al., 1995). As primeiras simulações de biomoléculas foram realizadas no vácuo, entretanto, nestas condições de contorno da biomolécula, podem ocorrer distorções na superfície do sistema, que tende a se deformar para minimizar a área superficial (van Gunsteren & Mark, 1992). O efeito causado pelo vácuo pode ser reduzido pela solvatação da macromolécula por uma camada de moléculas de água. Neste caso, existem ainda efeitos de distorção do sistema na superfície água-vácuo. Estes efeitos podem ser minimizados através do uso de uma camada extra onde o movimento dos átomos é restrito, diminuindo assim, a influência do vácuo nessas moléculas de água (van Gunsteren & Mark,.1992).

Um método bastante adequado para a minimização dos efeitos em um sistema finito, é a utilização de condições periódicas de contorno, onde os átomos são inseridos em uma caixa cúbica preenchida com o meio (ou solvente) de simulação e esta caixa é tratada como se estivesse rodeada por caixas idênticas por todos os lados. O meio em que os sistemas são solvatados tem grande influência em sua estrutura, dinâmica e termodinâmica.

Nas interações calculadas, são considerados somente os vizinhos (ou imagens) mais próximos. Assim, um átomo *x* da caixa central só interage com um átomo *y* (ou imagem do átomo *y*) dentro de certo raio de interação permitido. Trata-se de um método computacionalmente mais caro, mas tem sido amplamente empregado por ser uma representação mais real dos sistemas biológicos.

Nestas condições periódicas de contorno e explicitas do solvente, a biomolécula é colocada em uma caixa retangular cheia de moléculas de solvente, de forma que a mesma esteja fora de alcance de suas próprias imagens das caixas vizinhas (Smith et al., 1993). A caixa é replicada em todas as direções, porém os cálculos são realizados somente para a caixa central. Desta forma, quando uma molécula de solvente deixa a caixa por um lado, imediatamente entra novamente pelo lado oposto, com a mesma velocidade impedindo que

ocorram variações no número de átomos durante toda a simulação (van Gunsteren & Berendsen, 1990).

Foi feita uma etapa de relaxação das interações desfavoráveis entre a molécula do peptídeo e as moléculas do solvente. A relaxação foi realizada através de 200 passos de minimização de energia, com o algoritmo *steepest descent*, sem restrição (*constrains*) dos movimentos do peptídeo e do solvente, para remoção de contatos de van der Waals muito próximos. Os arquivos de entrada utilizados para a minimização de energia dos sistemas foram preparados como mostram os exemplos abaixo:

```
# Minimization. NTF=NTC=2
 &cntrl  imin=1,
        ntpr=10,
        ntf=2,dielc=1.0, igb=0, scnb=2.0, scee=1.2,
        ibelly=0, ntr=0, cut=9.0,
        ntc=2, tol=0.00001,
        maxcyc=200, ncyc=100, ntmin=1, dx0=0.01, dxm=0.5, drms=0.0001,
 &end
 &ewald
        a=40, b=46, c=51,
 &end

#Minimizing Solvent (pep + WAT) only
#
#cp apoi_WAT.crd ref.crd
~/AMBER7/exe/sander -O  -i mini_00.in -o mini_00.out \
-p ../apoi_WAT.top -e mdene -c ../apoi_WAT.crd -r mini_00.rst \
-ref ref.crd -x mdcrd -v mdvel  -inf dna.mdinfo
rm -f ref.crd
```

As simulações para os cinco peptídeos foram realizadas em um *ensemble* isobárico-isotérmico (NTP), a 298,16 K (25 ºC) e 1 atm de pressão, utilizando o programa SANDER do pacote AMBER 7. Os arquivos de topologia e coordenadas da molécula modelada foram preparados com o programa Leap do pacote do AMBER 7.

As interações eletrostáticas entre átomos não-ligados foram avaliadas pelo método PME (*Particle-mesh Ewald*) (Essmann et al., 1995), que utilizou uma malha de aproximadamente 1Å para a interpolação do somatório no espaço direto. As interações de Lennard-Jones foram avaliadas utilizando uma distância máxima de 9Å.

As simulações foram realizadas durante 10 ns, utilizando os seguintes parâmetros no arquivo de entrada:

```
# 1000 ps NTP. NTF+NTC=2. Heating from 10-298.16K.NPSCAL=1
 &cntrl  imin=0, ntx=1, irest=0, ntrx=1,
        ntxo=1, ntpr=50,
        ntwr=250, iwrap=0, ntwx=500, ntwe=0,
        ioutfm=0, ntwprt=0,
        ntf=2, ntb=2, dielc=1.0, igb=0, scnb=2.0, scee=1.2,
        ibelly=0, ntr=0, cut=9.0,
        nstlim=500000, nscm=0, t=0.0, dt=0.002,
        temp0=298.16, tempi=10.0, ig=555333, heat=0.0001, ntt=1,
        dtemp=10.0, tautp=1.0, vlimit=10.0,
        ntp=1, pres0=1.0, comp=44.6, taup=2.0, npscal=1,
        ntc=2, tol=0.00001,
  &end
  &ewald
         a=40, b=46, c=51,
  &end
```

A análise das trajetórias geradas foram feitas com auxílio do programa Ptraj do pacote AMBER 7. As análises para definição das estruturas secundárias a partir das coordenadas tridimensionais foram realizadas através do programas DSSP (*Dictionary of Protein Secundary Structure*) (Kabsch & Sander, 1983). A partir do relatório emitido após análise pelo DSSP, pode-se obter diversas informações a respeito da estrutura secundária da molécula. O relatório mostra características da estrutura secundária, características geométricas, exposição ao solvente a partir de um arquivo de *input* no formato pdb (*Protein Data Bank format*), ou seja, arquivo das coordenadas tridimensionais da molécula. É importante ressaltar que o programa não prediz a estrutura da molécula, apenas fornece informações topológicas a respeito da estrutura em questão.

6.10. Troca isotópica H/D

As análises de trocas H/D dos complexos proteolipossomos foram realizadas através da associação de cada peptídeo a lipossomos em suspensão.

Para a preparação de vesículas foi utilizada uma solução contendo fosfatidilcolina (PC) em clorofórmio (PA / MERCK). Esta solução foi seca em fluxo de nitrogênio (N_2) através de uma secagem rotativa, para promover a aderência do filme de fosfolipídio no tubo de ensaio. Após a secagem, os tubos foram levados para um liofilizador por 12 horas, para a retirada de traços de solvente.

O filme de PC foi re-suspendido em água ultrapura através de agitação mecânica por 2,5 min, de modo que a concentração final de PC fosse 10 mM. Essa suspensão foi levada a um sonicador equipado com transdutor de titânio (Virtis-475 / VIRSONIC), em banho de gelo por 10 minutos, numa potência aproximada de 44W. Após esse tempo, a suspensão foi transferida para um tubo *Eppendorf* e centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, para promover a retirada de resíduos de titânio metálico.

Foram obtidos espectros MS e MS/MS controles, adicionando-se os peptídeos às suspensões de lipossomos em ausência de deuteração. Para essas análises, as amostras foram preparadas imediatamente antes da introdução das mesmas no espectrômetro de massas, sendo os componentes adicionados na seguinte ordem: suspensão de lipossomos 3 mM; peptídeo na concentração de $6{,}25 \times 10^{-2}$ μg/μL; e 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Além disso, cada peptídeo na forma solúvel foi totalmente deuterado (condição na qual todos os hidrogênios trocáveis foram substituídos por deutério), através da incubação do mesmo em D_2O 90% (v/v) em água. Os espectros MS/MS dos peptídeos totalmente deuterados também foram utilizados como medidas de referência, necessárias aos cálculos de deuteração e ajuste das melhores condições para a etapa seguinte. Foram feitas incubações em diferentes porcentagens de D_2O, até que fosse determinada a concentração final de D_2O onde somente os deutérios das ligações peptídicas (menos susceptíveis às destrocas rápidas) permanecessem nos sítios de troca, garantindo assim, a "marcação" de apenas 1 deutério por ligação peptídica.

A troca H/D foi feita através da adição de 40% (v/v) de óxido de deutério (D_2O 99%, CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES) às amostras preparadas conforme

descrito acima para os espectros controle. Os parâmetros analíticos utilizados para aquisição dos espectros foram os mesmos utilizados para os outros dados de massas, descritos no item 6.3 acima.

6.11. Atividade hemolítica

Os experimentos de atividade hemolítica foram realizados com base na metodologia utilizada por de Souza et al. (2005).

6.11.1 Obtenção dos eritrócitos

Foram adicionados cerca de 500 μL de sangue extraído da cauda de ratos Wistar fêmeas em 50 mL de solução salina (NaCl 0,85%, $CaCl_2$ 10 mM) sob leve agitação, em agitador magnético (MA-089 MARCONI). Esta suspensção de eritrócitos foi mantida por 15 minutos sob agitação leve para evitar coagulação.

A suspensão de eritrócitos foi centrifugada em centrífuga clínica (Z-200A HERMLE) a 3000 rpm durante 15 minutos. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 10 mL de solução salina, para lavagem dos eritrócitos. Repetiu-se esta operação por mais duas vezes.

O sobrenadante da última centrifugação foi descartado e o concentrado de hemácias obtido ao final das centrifugações foi considerado como sendo 100% de células. Foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 1%, diluindo-se a suspensão concentrada descrita acima, com solução salina isotônica. Essa suspensão a 1% foi utilizada nos ensaios de atividade hemolítica.

6.11.2. Ensaio de hemólise

Foi montada uma bateria de ensaios em microplaca (COSTAR), onde cada orifício continha diferentes concentrações de cada peptídeo, dissolvidas em 10 μL de solução salina. A cada poço foram adicionados 90 μL da suspensão de eritrócitos perfazendo um volume final de 100 μL. Foram testadas concentrações de peptídeo variando de $3x10^{-4}$ a $5x10^{-1}$ μg/μL, em triplicata. Para o controle de 0% de hemólise foram adicionados 10 μL de solução salina e 90 μL da suspensão de eritrócitos e, para o controle de 100% de hemólise, foram adicionados apenas 10 μL de solução salina acrescida de 1% (v/v) de Triton X-100 (t-Octilfenoxipoli-etoxietanol, SIGMA), em 90 μL de suspensão de eritrócitos.

A placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas sob leve agitação. Após este período de incubação, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm, em uma centrífuga Compacta Avanti 30 (BECKMAN). Com o sobrenadante, montou-se uma nova placa para realização das leituras de absorbância, que foi realizada em uma leitora de placas (Biotrak II – AMERSHAM BIOSCIENCE), com filtro de 540 nm.

6.12. Degranulação de Mastócitos

Os testes de degranulação de mastócitos foram feitos segundo metodologia de Hide et al. (1993) com algumas modificações. Foram testados os cinco peptídeos nas concentrações variando de $3x10^{-4}$ a $5x10^{-1}$ μg/μL em triplicata e utilizou-se o peptídeo HR-II como peptídeo padrão para degranulação (Tuichibaev et al., 1988), também nas mesmas concentrações.

6.12.1. Preparo das soluções

Foram preparadas as seguintes soluções para a realização dos testes de degranulação de mastócitos:

Solução MCM-1 (*mast cell medium*)

Para 100 mL de solução MCM-1, foram colocados 0,877 g de NaCl (MERCK), 0,028 g de KCl (MERCK), 0,043 g de NaH_2PO_4 (SYNTH), 0,048 g de KH_2PO_4 (SYNTH), 0,10 g de glicose (SYNTH), 0,10 g de BSA (SIGMA), 90 μL de $CaCl_2$ (1M) (VETEC) e 100 mL água bidestilada.

Solução MCM-2

Para a solução MCM-2 utilizou-se 100 mL de MCM-1 e 50 μL de Liquemine (Heparina Sódica 5000 UI/0, 25 mL ROCHE).

Solução SH

Dissolveu-se 0,588 g de Citrato trissódico (MERCK) em 10 mL de água bidestilada. O pH foi ajustado para 4,5 com solução de HCl (1M) (SYNTH). A 10 mL desta solução de citrato trissódico (pH 4,5), foram adicionados 0,0034 g de p-nitrofenil-N-acetil-β-glucosaminidina (SIGMA).

6.12.2. Isolamento dos mastócitos

Os ratos foram anestesiados com éter e em seguida decapitados para retirada do sangue. Foi feito um corte longitudinal no abdômen para expor a cavidade peritonial. Os órgãos foram afastados e fez-se a lavagem desta cavidade com 20 mL de solução MCM-2, para se extrair o fluído contendo os mastócitos em suspensão. Este fluído foi coletado com auxílio de uma seringa e armazenado em banho de gelo. Repetiu-se este procedimento por três vezes.

O fluído peritonial foi centrifugado à velocidade de 100 g por 5 min, a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado, o sedimento de células foi ressuspendido em 2 mL de MCM-1 e centrifugado novamente sob as mesmas condições. O sobrenadante foi novamente retirado e ressuspendido em 2 mL de MCM-1. Esta suspensão de células foi utilizada para o ensaio de degranulação de mastócitos.

Foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer com auxílio de uma solução corante 0,05% (v/v) de cristal violeta em HCl (3,6N). Ajustou-se a concentração para $4,5 \times 10^5$ células/mL.

6.12.3. Ensaio de degranulação de mastócitos

Preparou-se microplacas (COSTAR) colocando-se 90 μL da suspensão de mastócitos e 10 μL das soluções com diferentes concentrações de cada peptídeo. Para o valor de referência "zero%" de degranulação foram adicionados 10 μL de água bidestilada e 90 μL da suspensão de mastócitos, para que a diluição do fluído peritonial fosse a mesma em toda a placa. Para o valor de referência "100%" de degranulação adicionou-se 10 μL de água bidestilada contendo 1% (v/v) de Triton X-100 e 90 μL da suspensão de mastócitos.

Esta microplaca foi incubada por 15 min a 37 ºC em banho-maria para que houvesse o extravasamento do conteúdo dos grânulos dos mastócitos. Passado esse tempo, o conteúdo de cada orifício foi centrifugado a 1000 rpm por 5 min, sendo o sobrenadante removido e utilizado na seqüência das análises.

Com os sobrenadantes, montou-se uma nova placa, com cada orifício contendo 50 μL de sobrenadante e 50 μL de SH. Esta placa foi incubada por 6 horas, a 37 ºC.

Após a incubação, descartou-se 50 μL de cada orifício e acrescentou-se 150 μL de solução Tris 0,2 M (SIGMA) a cada um deles. A medida de degranulação foi feita através da

leitura de absorbância a 405 nm, em leitora de placas (Biotrak II – AMERSHAM BIOSCIENCE).

6.13. Prova de sensibilidade bacteriana (Antibiograma)

Os testes para verificação de atividade antimicrobiana dos peptídeos foram realizados através da determinação da concentração inibitório mínima (MIC). Os experimentos foram montados em micro-placas de 96 canais e a visualização dos resultados foi feita utilizando-se o cromóforo cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) (MALLINCKRODT), segundo metodologia descrita por Coyle et al. (2003) e Meletiadis et al. (2000).

Os peptídeos foram testados contra os seguintes microrganismos: *Bacilus subtilis* (CCT 2576), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), obtidos no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais – C.E.I.S. (IBRC/UNESP). Foram utilizados: meio de cultivo Müller-Hinton (DIFCO), meio de cultivo Müller-Hinton Broth (DIFCO) para manutenção e cultivo desses microrganismos. Toda a manipulação dos microrganismos foi feita em câmara de fluxo laminar vertical (PACHANE) e todo material utilizado no cultivo foi esterilizado em autoclave vertical AV30 (PHOENIX), por 20 minutos à 121 ºC e 1 atm.

Para a realização do experimento, os inóculos foram preparados em solução salina (NaCl 0,9%) à partir de colônias novas (colônias de 18 horas). A concentração desses inóculos foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland. Foram adicionados 200 μL de inóculo em 20 mL de meio Müller-Hinton líquido, sendo essa suspensão utilizada para a montagem das micro-placas.

Em cada orifício da placa foram colocados 10 μL de solução de peptídeo (diluído em água esterilizada em diferentes concentrações), 10 μL da suspensão de inóculo e 80 μL de meio Müller-Hinton líquido.

Para o valor de referência zero, foram colocados 80 μL de meio Müller-Hinton líquido, 10 μL de água bidestilada esterilizada e 10 μL de salina. Para o valor de referência 100%, foram colocados 10 μL de água e 10 μL da suspensão de inóculo e 80 μL de meio Müller-Hinton líquido. Foi montada uma placa para cada espécie de microrganismo mencionado acima. As placas foram incubadas em estufa de cultura a 34 ºC, por 18 horas. Após este período, acrescentou-se a cada orifício 10 μL de TTC 0,5% (m/v) em água. As leituras foram realizadas após 3 horas de re-incubação das placas em estufa a 34 ºC.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Síntese, purificação e controle de qualidade dos peptídeos.

Os peptídeos obtidos à partir da síntese foram purificados em HPLC. A Figura 7 mostra o cromatograma de purificação do peptídeo **Protonectarina-MP** realizado em condições isocráticas, de 53% (v/v) de acetonitrila [contendo TFA 0,1% (v/v)]. Como pode ser observado, o pico referente ao peptídeo Protonectarina-MP apresentou tempo de retenção de 25,16 minutos. Essas condições de purificação foram repetidas inúmeras vezes para a amostra sintética, até obtenção de uma quantidade de amostra suficiente para a realização das análises propostas neste projeto.

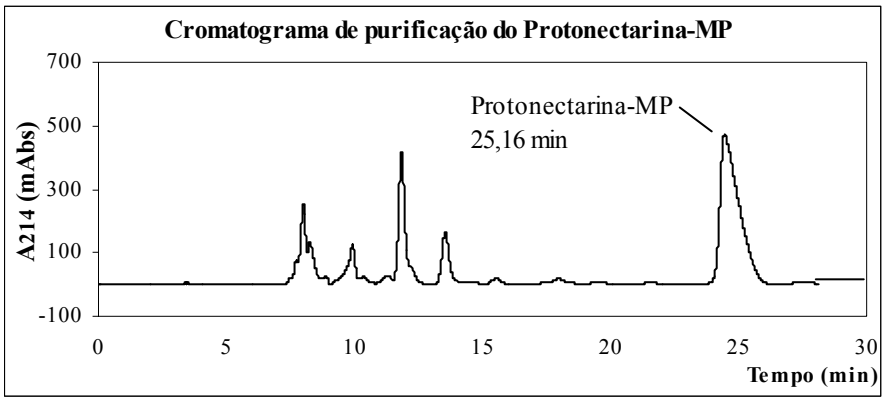

Figura 7: Perfil cromatográfico sob fase reversa do peptídeo Protonectarina-MP, sob condições isocráticas de Acetonitrila 53% (v/v) [contendo TFA 0,1% (V/V)], em coluna Nucleosil C18 (10 x 250 mm) e fluxo de 2 mL/min.

Para a purificação do peptídeo **Parapolybia-MP**, foi utilizada fase móvel em condições isocráticas, constituída por acetonitrila 58% (v/v) [contendo TFA 0,1% (v/v)], durante 30 minutos. A fração correspondente ao peptídeo Parapolybia-MP apresentou um tempo de retenção de 14,92 minutos (Figura 8).

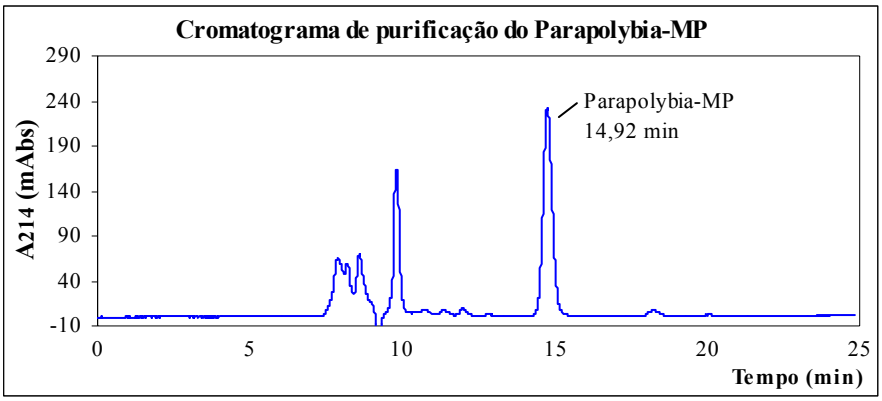

Figura 8: Perfil cromatográfico sob fase reversa do peptídeo Parapolybia-MP, sob condições isocráticas de Acetonitrila 58% (v/v) [contendo TFA 0,1% (V/V)], em coluna Nucleosil C18 (10 x 250 mm) e fluxo de 2 mL/min.

Para os mastoparanos **Apoica-MP** e **Asn2-Polybia-MP I**, a purificação foi realizada sob condições isocráticas com acetonitrila 60% (v/v) [contendo TFA 0,1% (v/v)], sendo o fluxo do solvente de 2 mL/min. As Figuras 9 e 10 mostram os resultados da purificação obtidos para os dois peptídeos, respectivamente. O peptídeo sintético Apoica-MP apresentou tempo de retenção de 14,29 min., como mostra o pico assinalado na Figura 9, enquanto que o peptídeo Asn2-Polybia-MP I teve tempo de retenção de 15,71 min. (pico identificado na Figura 10).

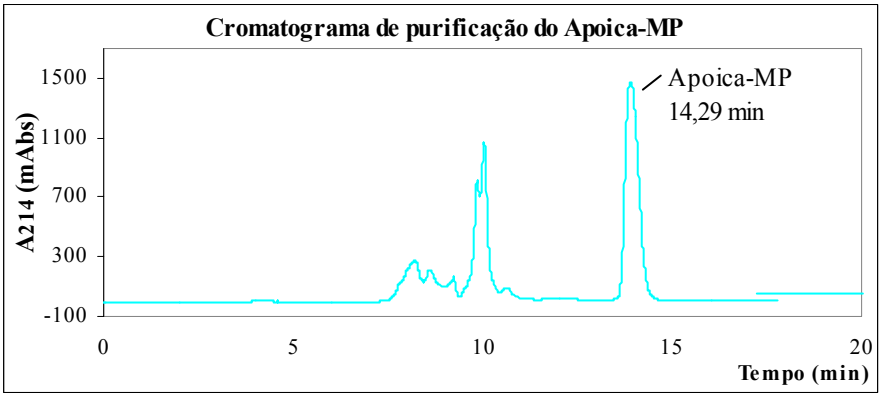

Figura 9: Perfil cromatográfico sob fase reversa do peptídeo Apoica-MP, sob condições isocráticas de Acetonitrila 60% (v/v) [contendo TFA 0,1% (V/V)], em coluna Nucleosil C18 (10 x 250 mm) e fluxo de 2 mL/min.

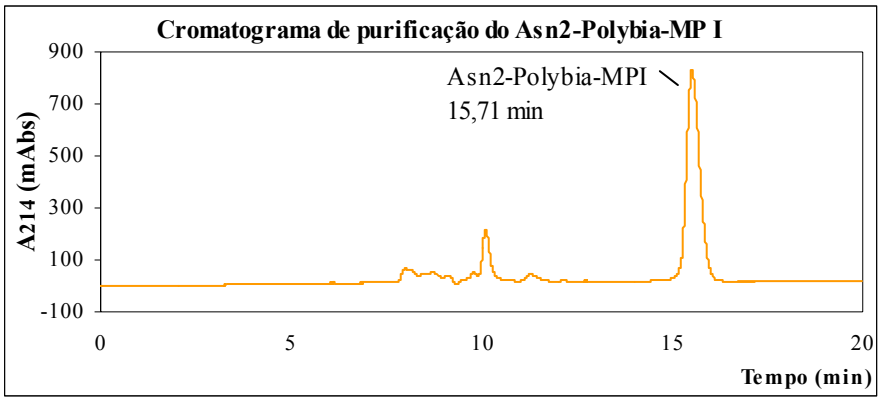

Figura 10: Perfil cromatográfico sob fase reversa do peptídeo Asn2-Polybia-MP I, sob condições isocráticas de Acetonitrila 60% (v/v) [contendo TFA 0,1% (V/V)], em coluna Nucleosil C18 (10 x 250 mm) e fluxo de 2 mL/min.

O cromatograma de purificação do peptídeo **MK-578** (Figura 11) mostra que a amostra sintética deste peptídeo apresentou um tempo de retenção de 13,36 minutos em um cromatograma realizado sob eluição isocrática de 48% (v/v) de acetonitrila [contendo TFA 0,1% (v/v)].

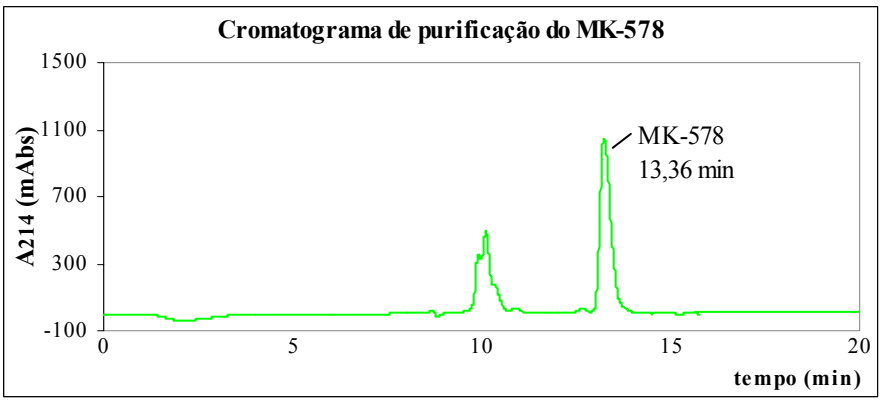

Figura 11: Perfil cromatográfico sob fase reversa do peptídeo MK-578, sob condições isocráticas de Acetonitrila 48% (v/v) [contendo TFA 0,1% (V/V)] em coluna Nucleosil C18 (10 x 250 mm) e fluxo de 2 mL/min.

Após o término da purificação de todos os peptídeos, foram feitas as análises de espectrometria de massas. Esses experimentos foram realizados tanto para a confirmação das massas corretas, quanto para verificação da pureza de cada amostra após a cromatografia (Figuras 12, 13, 14, 15 e 16).

A Figura 12 mostra o espectro de massas obtido para a amostra referente ao peptídeo Protonectarina-MP. Utilizando-se o software MassLynx, para cálculo da massa

molecular teórica da seqüência peptídica do Protonectarina-MP, encontrou-se um valor de 1580,89 Da, confirmando o valor previsto. Na Tabela 7 (a seguir) podemos fazer uma comparação das massas monoisotópicas calculadas e experimentais dos cinco peptídeos sintetizados.

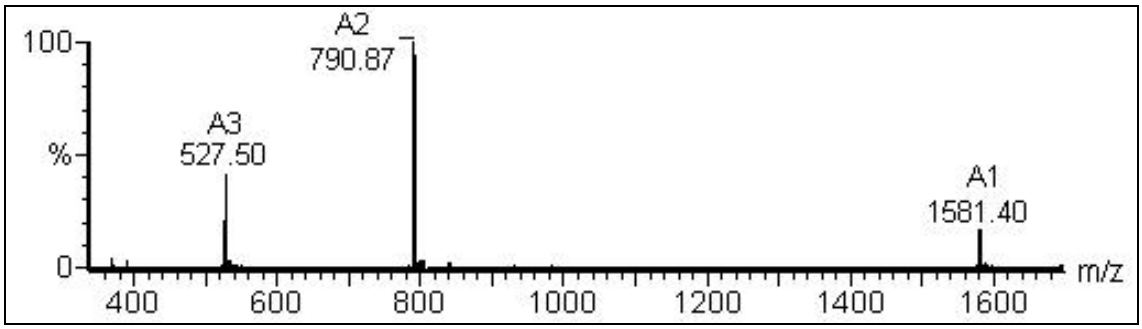

Figura 12: Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, do peptídeo Protonectarina-MP.

As Figuras 13, 14, 15 e 16 são referentes aos espectros de massas dos peptídeos sintéticos Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578, respectivamente. Para o peptídeo Parapolybia-MP, foi obtido um valor de m/z 1617,98, correspondente ao valor de massa molecular na forma protonada $[M+H^+]$. Desta forma, pode-se concluir que a massa molecular obtida experimentalmente para o peptídeo sintético é 1616,98 Da.

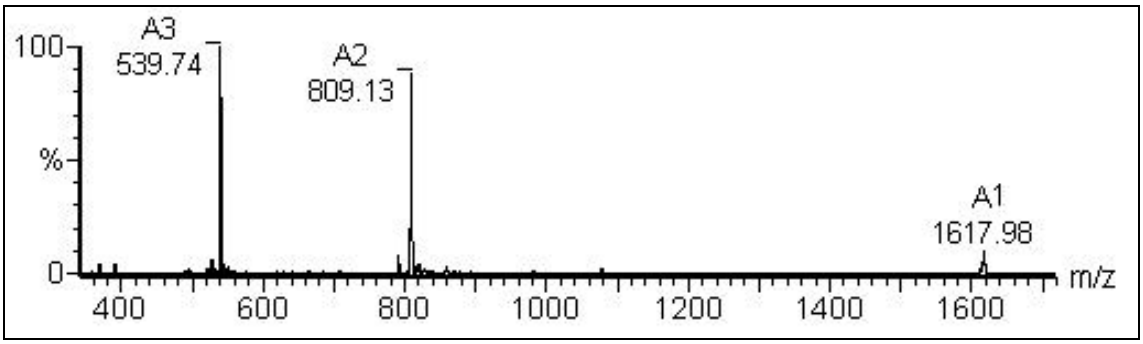

Figura 13: Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, do peptídeo Parapolybia-MP.

Na Figura 14, observa-se que o peptídeo analisado apresentou relação m/z 1583,32 na forma $[M+H]^+$, que leva a concluir que o mesmo possui massa molecular 1582,32 Da. Semelhantemente, obteve-se para os peptídeos Asn2-Polybia-MP I e MK-578 massas

moleculares de 1652,27 Da e 1582,39 Da, respectivamente, confirmando os valores esperados de massas para esses peptídeos, sugerindo que a síntese foi correta para os mesmos.

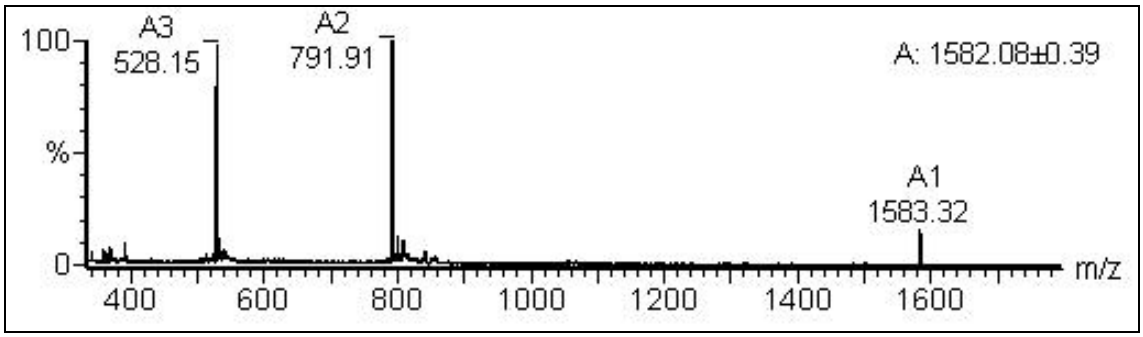

Figura 14: Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, do peptídeo Apoica-MP.

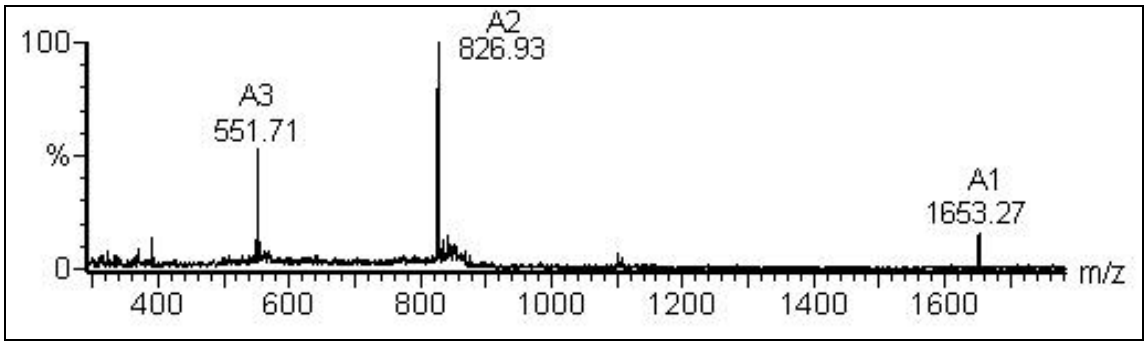

Figura 15: Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, do peptídeo Asn2-Polybia-MP I.

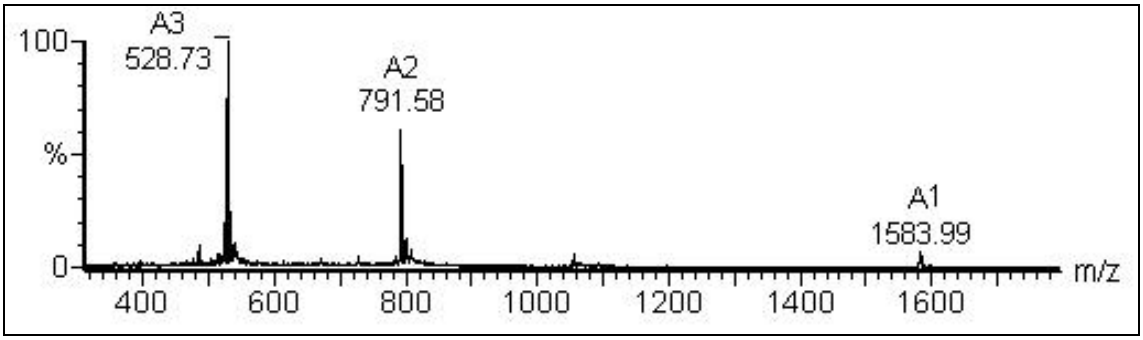

Figura 16 Espectro de massas ESI-MS, no modo positivo, do MK-578.

Na Tabela 7 pode-se fazer uma comparação das massas monoisotópicas calculadas e aquelas obtidas experimentalmente para os cinco peptídeos sintetizados. Os desvios nos valores de massas experimentais e calculadas são inferiores a 1 u.m.a, sendo que essas

pequenas diferenças decimais são referentes ao erro experimental e resolução do equipamento, os quais se encontram dentro das condições analíticas permitidas.

Tabela 7: Massas moleculares monoisotópicas calculadas e experimentais dos peptídeos sintetizados.

PEPTÍDEOS	Massa Calculada (Da)	Massa Experimental (Da)
Protonectarina-MP	1580,96	1580,40
Parapolybia-MP	1616,98	1616,98
Apoica-MP	1582,94	1582,32
Asn2-Polybia-MP I	1652,04	1652,27
MK-578	1582,94	1582,99

A partir desta tabela, podemos concluir que todos os peptídeos foram corretamente sintetizados, pois as massas moleculares das amostras sintetizadas são correspondentes às massas moleculares das seqüências dos cinco mastoparanos. A confirmação da seqüência correta dos peptídeos também foi realizada através do seqüênciamento por Química Degradativa de Edman de todas as amostras purificadas.

Após a análise dos resultados obtidos pelo seqüênciamento automático dos peptídeos por Química Degradativa de Edman, foi concluído que todos os peptídeos foram corretamente sintetizados. Essas amostras foram então utilizadas para todos os experimentos subseqüentes propostos neste estudo.

7.2. Estudos estruturais

As análises de dicroísmo circular fornecem informações que refletem tanto as características estruturais, quanto as mudanças conformacionais de interação de peptídeos com membranas. Desta forma, para um entendimento dessas mudanças e interações, as análises de dicroísmos circular de moléculas biológicas são realizadas em diferentes ambientes, simulando-se os meios naturais onde essas moléculas possam estar atuando.

Os surfactantes têm uma tendência, dependente da concentração, de formar espontaneamente aglomerados em grupos moleculares. Esses grupos de moléculas em forma de esfera, em torno de quatro nanômetros de diâmetro, são chamados de **micelas**. A concentração mínima na qual as micelas se formam é denominada de **Concentração Micelar Crítica** ou **CMC**. Desta forma, as análises de dicroísmo circular foram feitas em solução de SDS, em concentrações acima e baixo da CMC, para que fosse possível observar o comportamento estrutural dos peptídeos em ambiente com presença e ausência dessas micelas.

O SDS é um surfactante, sendo que acima da CMC, suas moléculas passam a se agregar sob a forma de micelas. Essas micelas possuem um interior hidrofóbico e uma camada externa hidrofílica negativa (Figura 17), simulando desta forma, um ambiente de membranas biológicas.

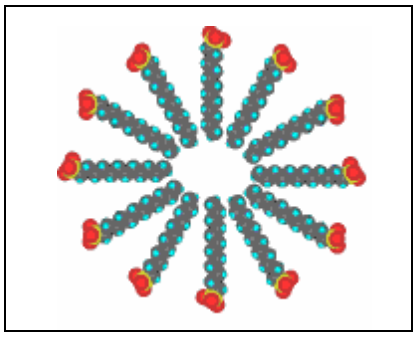

Figura 17: Esquema de uma micela de SDS em água. Em vermelho, as cabeças carregadas negativamente; e em cinza/azul as caudas hidrofóbicas. Fonte: Http://mrsec.wisc.edu/Edetc/nanolab/micelle/text.htm

Foram descritos espectros padrões de dicroísmo circular para as estruturas secundárias "puras", ou seja, totalmente hélice-α, 100% de folha-β e estruturas aleatórias, como mostra a Figura 18. Estes espectros foram obtidos a partir de solução de poli-L-Lisina, que sob temperaturas e valores de pH diferentes, assume as três conformações (Greenfield e Fasman, 1969). Além disso, adição de um detergente aniônico, como o SDS, que geralmente funciona como um poderoso agente estruturador em pequenos peptídeos, e usualmente induz

a formação de hélices-α, causa mudanças no espectro de dicroísmo circular. Freqüentemente, em pequenos peptídeos esses detergentes induzem a formação de hélice-α e, conseqüentemente, também causa alterações no espectro de dicroísmo circular (Grottesi et al., 1998).

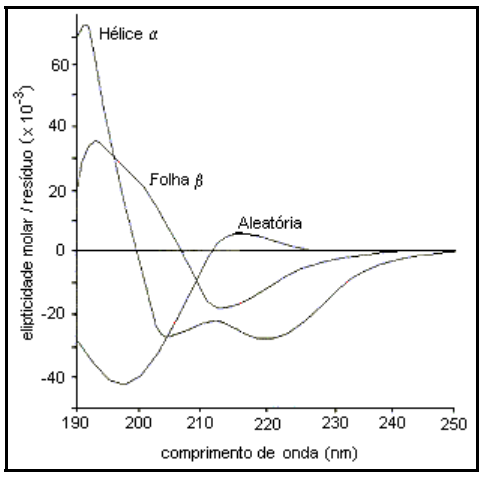

Figura 18: Espectros de dicroísmo circular de estruturas secundárias "puras" (modificado de Greenfield & Fasman, 1969).

A partir dos espectros de dicroísmo circular de proteínas e peptídeos é possível determinar a porcentagem de cada estrutura secundária na molécula, porém, não é possível determinar quais resíduos de aminoácidos estão envolvidos na formação das estruturas. Geralmente, para as moléculas que apresentam estruturas em hélice-α, são observadas duas bandas negativas em 222 nm e 208 nm, com magnitudes aproximadas, além de uma banda positiva em 190 nm.

Para as conformações em folha-β, é observada caracteristicamente uma região negativa à 216 nm e uma positiva próxima de 195 nm. Já a caracterização espectroscópica das estruturas aleatórias apresenta um forte sinal negativo um pouco abaixo de 200 nm, uma faixa positiva em 218 nm e uma negativa bem fraca em 235 nm (Roger & Nordén, 1997).

Para o início dos estudos de caracterização estrutural dos cinco mastoparanos foram feitas análises de dicroísmo circular sob diferentes condições. Todas as amostras foram

analisadas na concentração de 20 μM, variando-se somente o solvente: água, SDS 165μM (abaixo da concentração micelar crítica – CMC), SDS 8 mM (acima da CMC) e TFE 40% (v/v). Numa segunda etapa foram feitas análises em presença de vesículas zwitteriônicas e aniônicas.

A Figura 19 mostra os espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP. Em meio contendo SDS abaixo e acima da CMC, e em presença de TFE 40% (v/v), foi observado um sinal positivo em 190 nm e bandas negativas próximas a 208 nm e 222 nm, caracterizando, assim, a existência de conformação em hélice-α nesses meios. A curva dicróica deste peptídeo em água mostra que nesta condição a molécula comporta-se de maneira aleatória, sem estrutura secundária definida.

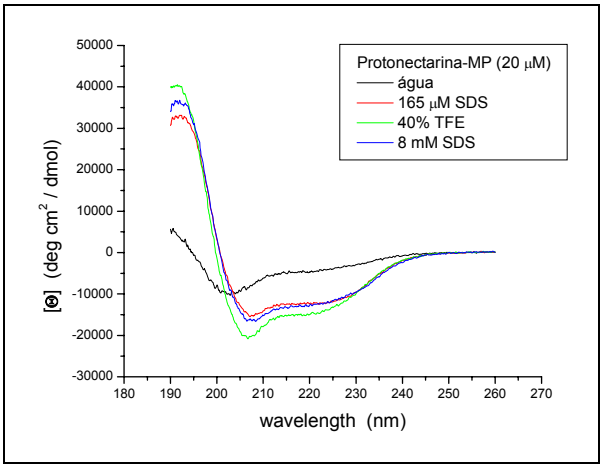

Figura 19: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP, obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165 μM e 8 mM e solução de TFE 40%.

Os espectros de dicroísmo circular do peptídeo Parapolybia-MP (Figura 20) mostram bandas positivas em 190 nm em solução contendo SDS acima da CMC e TFE 40% (v/v). Porém, quando em solução de SDS abaixo da CMC, observa-se um pequeno deslocamento dos sinais positivos para a direita, próximos de 195 nm. Em solução aquosa, observa-se uma banda negativa próximo de 200 nm. Em presença de SDS abaixo da CMC (165 μM), foram observados sinais negativos nas regiões de 208 nm e 225 nm, porém esses

sinais são menos intensos quando comparados com os sinais obtidos nas soluções de SDS acima da CMC e TFE 40% (v/v).

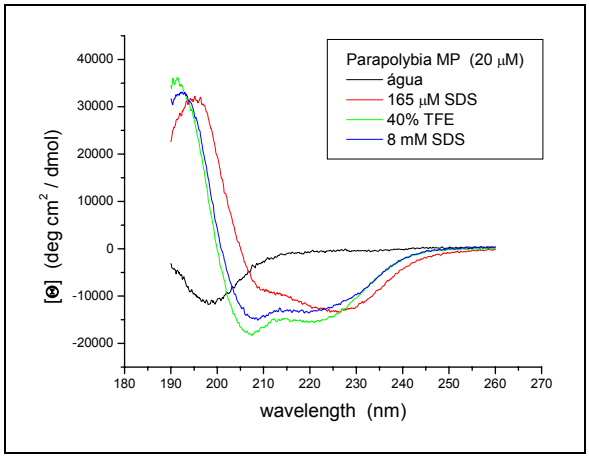

Figura 20: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Parabolybia-MP, obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165 μM e 8 mM e solução de TFE 40%.

Para o mastoparano Apoica-MP, observam-se bandas negativas na região do 208 nm e 222 nm e uma banda positiva na região de 190 nm para os tratamentos com SDS acima e abaixo da CMC e com TFE 40% (v/v). Em meio aquoso, detectou-se um sinal negativo próximo da região de 200 nm (Figura 21).

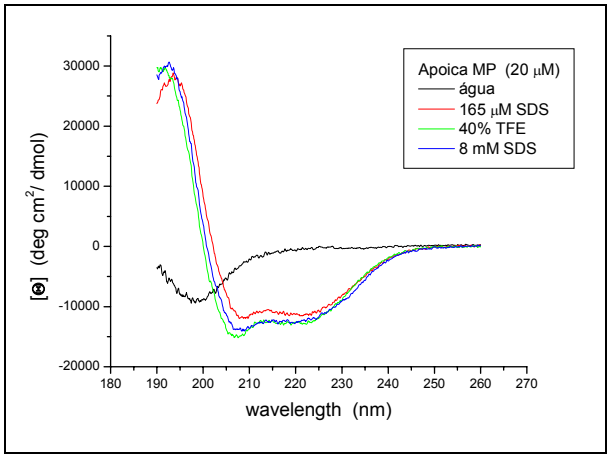

Figura 21: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Apoica-MP, obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165 μM e 8 mM e solução de TFE 40%.

Na Figura 22 são apresentados os espectros de dicroísmo circular do Asn2-Polybia-MP I em diferentes condições. Foi observada uma banda positiva próxima de 190 nm e bandas negativas na região de 208 nm e 222 nm, nas preparações em que Asn2-Polybia-MP I foi analisado em presença de SDS, tanto abaixo quanto acima da CMC e TFE 40% (v/v).

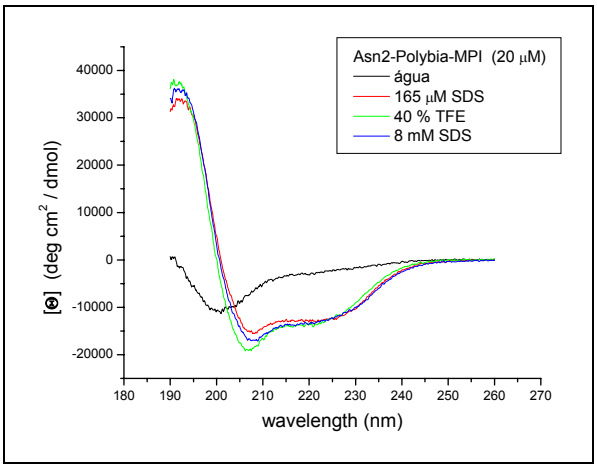

Figura 22: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Asn2-Polybia-MP I, obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165 μM e 8 mM e solução de TFE 40%.

Os espectros de dicroísmo circular do peptídeo MK-578 apresentaram sinais positivos em 190 nm e sinais negativos em 208 nm e 222 nm, quando em presença de SDS 8 mM e TFE 40% (v/v) (Figura 23). Em presença de SDS na concentração de 165 μM, observou-se um sinal negativo mais próximo de 210 nm e 222nm não tão intenso quanto em presença de SDS 8 mM e TFE 40%, sendo que o sinal positivo foi mais intenso próximo de 195 nm. O espectro de dicroísmo circular deste peptídeo em água mostrou uma banda negativa próximo de 200 nm, sendo que em 218 nm e 230 nm o sinal foi bem próximo de zero (Figura 23).

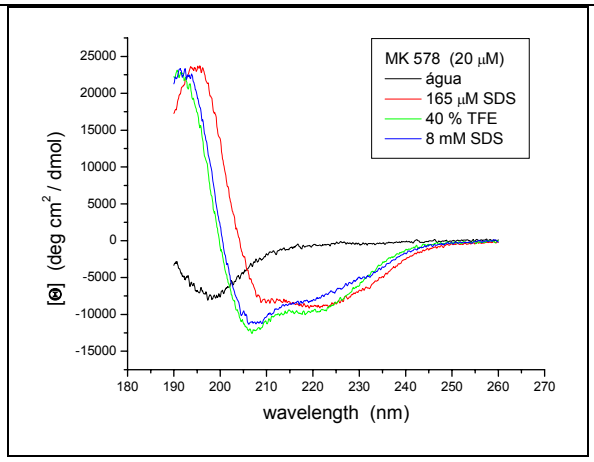

Figura 23: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo MK-578, obtidos em solução aquosa, solução de SDS 165 μM e 8 mM e solução de TFE 40%.

Como já visto anteriormente, as técnicas de espectroscopia, como dicroísmo circular, podem ser utilizadas para elucidar informações a respeito da estrutura secundária de proteínas e peptídeos, pois permitem estimar quantidades de hélice-α, folha-β e estruturas desordenadas (aleatórias ou randômicas), adotadas pelas moléculas. Essas estruturas são utilizadas nos estudos de propriedades de sistemas biológicos que envolvem membranas, por mimetizarem sua organização estrutural, permitindo assim o estudo das interações dessas moléculas com as membranas biológicas. A manipulação da composição fosfolipídica e a adição de componentes naturais facilitam o direcionamento e escolha dos métodos experimentais do estudo a ser realizado (Lorenzi, 2002). Os lipossomos têm sido usados em estudos de proteínas de membranas, transporte de substâncias e de interação de toxinas de membrana (Lasic, 1988).

Foram realizados experimentos em presença de vesículas contendo diferentes composições de fosfolipídios, para uma verificação do tipo de estrutura que estes peptídeos adquirem quando em contato com membranas.

Nas Figuras 24, 25, 26, 27 e 28 estão representados o espectros de CD obtidos para os peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-

578, respectivamente, em tampão Tris-borato (pH 7,5) e em presença de vesículas neutras (PC) e carregadas (PC/PG-7030). Todos os peptídeos foram manipulados na concentração de 20 μM.

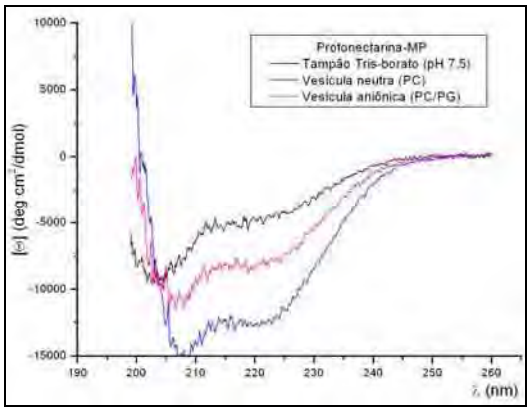

Figura 24: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP, obtidos em tampão Tris-borato (pH 7,5), suspensão de vesículas de PC e vesículas de PC/PG-7030.

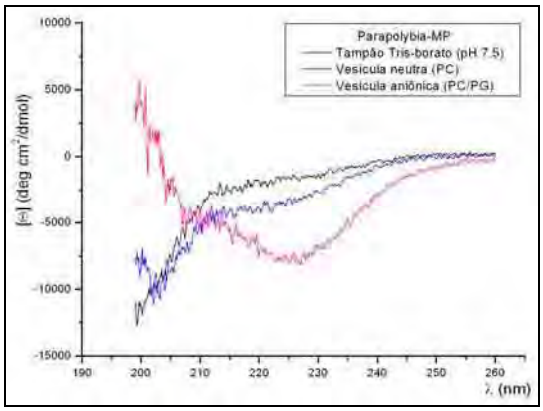

Figura 25: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Parapolybia-MP, obtidos em tampão Tris-borato (pH 7,5), suspensão de vesículas de PC e vesículas de PC/PG-7030.

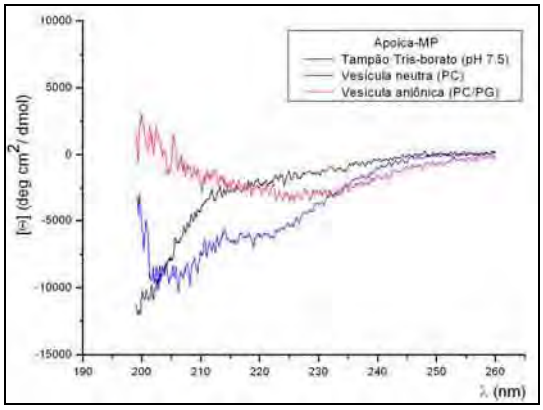

Figura 26: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Apoica-MP, obtidos em tampão Tris-borato (pH 7,5), suspensão de vesículas de PC e vesículas de PC/PG-7030.

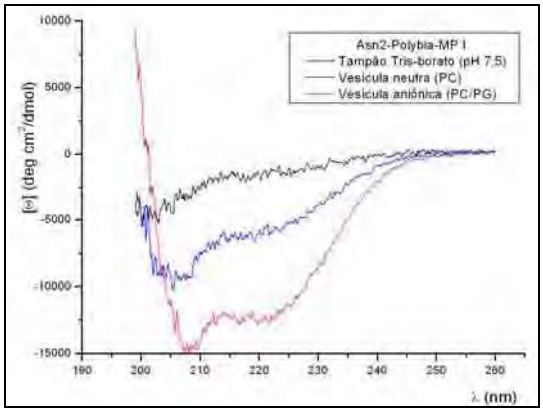

Figura 27: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Asn2-Polybia-MP I, obtidos em tampão Tris-borato (pH 7,5), suspensão de vesículas de PC e vesículas de PC/PG-7030.

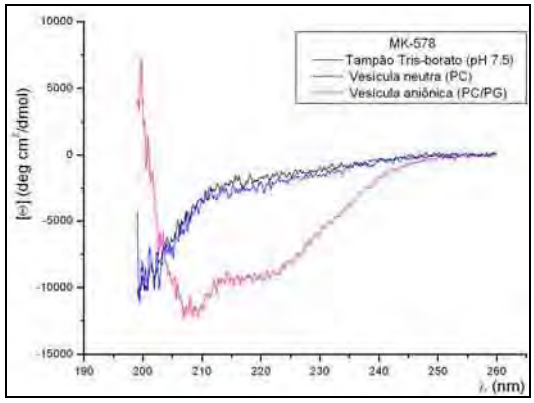

Figura 28: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo MK-578, obtidos em tampão Tris-borato (pH 7,5), suspensão de vesículas de PC e vesículas de PC/PG-7030.

As Tabelas 8 e 9 mostram os resultados obtidos após os cálculos de elipticidade molar em 222 nm e fração de hélice-α, calculadas segundo equações mostradas no item 6.5 (Materiais e Métodos).

Tabela 8 Elipticidade molar em 222 nm e fração de hélice-α dos peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578, em solução aquosa, em solução de SDS 165 μM e 8 mM e TFE 40% (v/v).

	Água		**165 μM SDS**		**40 % TFE**		**8 mM SDS**	
	$[\Theta]_{222}$	f_H	$[\Theta]_{222}$	f_H	$[\Theta]_{222}$	f_H	$[\Theta]_{222}$	f_H
Protonectarina-MP	-4330,96	0,1263	-12261,5	0,3867	-14594,6	0,4633	-12383,8	0,3907
Parapolybia-MP	-567,480	0,003	-12616,5	0,3984	-15209,1	0,4835	-12997,5	0,4109
Apoica-MP	-394,547	0,003	-11332,5	0,3562	-12846,4	0,4059	-12273,9	0,3871
Asn2-Polybia-MP I	-2635,10	0,071	-12865,1	0,4065	-13488,1	0,4270	-13051,0	0,4126
MK-578	-606,515	0,004	-8885,29	0,2758	-9417,02	0,2933	-7554,56	0,2322

$[\Theta]_{222}$ = elipticidade molar em 222 nm e f_H = fração de hélice-α

Tabela 9: Elipticidade molar em 222 nm e fração de hélice-α dos peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578 em tampão Tris-borato (pH 7,5), em presença de vesículas sintéticas neutras (PC) e aniônicas (PC/PG-7030).

	Tampão Tris-borato (pH 7,5)		**Vesículas neutras (PC)**		**Vesículas aniônicas (PC/PG-7030)**	
	$[\Theta]_{222}$	f_H	$[\Theta]_{222}$	f_H	$[\Theta]_{222}$	f_H
Protonectarina-MP	-4673,08	0,1375	-7978,61	0,2460	-12455,53	0,3930
Parapolybia-MP	-1926,64	0,0473	-3781,53	0,1082	-7484,89	0,2298
Apoica-MP	-1947,32	0,0482	-6075,73	0,1835	-2689,86	0,0724
Asn2-Polybia-MP I	-1294,33	0,0265	-5747,45	0,1728	-12389,01	0,3909
MK-578	-1568,75	0,0355	-2098,14	0,0529	-8977,61	0,2788

$[\Theta]_{222}$ = elipticidade molar em 222 nm e f_H = fração de hélice-α

A Tabela 10 mostra uma comparação entre os peptídeos quanto à porcentagem de hélice-α assumida pelos mesmos nas diferentes condições testadas. Além disso, é mostrada uma coluna com a posição ocupada pelas cargas positivas na seqüência primária de cada peptídeo.

Tabela 10: Porcentagens de hélice-α dos peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578 em diferentes solventes, calculadas a partir da elipticidade molar em 222 nm (Tabelas 9 e 10).

	% de hélice-α (165 μM SDS)	% de hélice-α (8 mM SDS)	% de hélice-α TFE 40% (v/v)	% de hélice-α Tampão*	% de hélice-α PC	% de hélice-α PC/PG-7030	Posição das cargas +
Asn2-Polybia-MP I	40,65	41,26	42,65	2,65	17,28	39,09	4 / 5 / 11
Parapolybia-MP	39,84	41,09	48,35	4,73	10,82	22,98	4 / 5 / 12
Protonectarina-MP	38,67	39,07	46,33	13,75	24,60	39,30	4 / 11 / 12
Apoica-MP	35,62	38,71	40,59	4,82	18,35	7,24	5 / 8 / 9
MK-578	27,58	23,2	29,33	3,55	5,29	27,88	5 / 7 / 8

*Tampão Tris-borato (pH 7,5).

A partir destes resultados, foi possível concluir que os cinco peptídeos formam hélice-α, em pelo menos partes de suas moléculas, principalmente quando em presença de SDS e TFE; entretanto possuem pouca ou nenhuma tendência de formar hélice-α em água ou tampão Tris-borato (pH 7,5). Em presença de SDS abaixo da CMC, foi observada uma formação de 38,67% hélice-α para o peptídeo Protonectarina-MP, 39,84% para Parapolybia-MP, 35,62% para o Apoica-MP, 40,65% para o Asn2-Polybia-MP I e 27,58% para o MK-578. Quando se aumentou essa concentração de SDS, elevando-a acima da CMC (8 mM), observa-se um leve aumento na fração de hélice-α, com exceção do peptídeo MK-578. Além disso, os maiores valores de conformação em hélice-α foram obtidos nos tratamentos com TFE 40% (v/v) para todos os peptídeos.

Em presença de vesículas zwitteriônicas (PC) não foram observadas elevadas porcentagens de hélice-α. O valor mais alto observado foi para o peptídeo Protonectarina-MP, com 24,6%, seguido dos peptídeos, Apoica-MP (18,35%), Asn2-Polybia-MP I (17,28%) e Parapolybia-MP (10,82%). Neste ambiente, o peptídeo MK-578 praticamente não se estrutura em hélice-α, apresentando apenas 5,29% desse tipo de estrutura, provavelmente permanecendo em conformação randômica.

Em presença de vesículas aniônicas (PC/PG-7030), quatro dentre os cinco peptídeos apresentaram uma porcentagem de hélice-α mais elevada em comparação com a situação em que estes peptídeos foram incubados em presença de vesículas neutras, sendo

39,30% de hélice-α para o peptídeo Protonectarina-MP, 39,09% para o Asn2-Polybia-MP I, 22,98% para Parapolybia-MP, 27,88% para o MK-578 e de apenas 7,24% para o Apoica-MP. Neste caso, o peptídeo Apoica-MP apresentou um drástica diminuição na porcentagem de hélice-α.

É possível observar que existe uma tendência de aumentar a quantidade de hélice-α para os peptídeos com as cargas positivas localizadas próximas às extremidades das cadeias (Asn2-Polybia-MP I, Parapolybia-MP e Protonectarina-MP) nas diferentes condições. Por outro lado, quando as cargas positivas foram deslocadas para a região central das moléculas dos peptídeos (Apoica-MP e MK-578) observou-se uma redução na porcentagem de hélice-α dos mesmos.

Muitos autores vêm descrevendo as interações dos mastoparanos com membranas biológicas (Matsuzaki et al., 1995a; Matsuzaki et al., 1995b; Matsuzaki et al., 1995c; Oren & Shai, 1998; Matsuzaki, 1999; Huang, 2000; Hori et al., 2001; Kol et al., 2001; Ladokhin & White, 2001). Provavelmente, os peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578 devem interagir com membranas biológicas e as cargas positivas distribuídas pela seqüência primária dos mesmos, podem estar fortemente relacionadas com a característica anfifílica de suas moléculas. O que foi possível notar é que a presença destas cargas positivas próximas às extremidades dos peptídeos favorecem a formação de hélice-α na maioria das condições ensaiadas.

Santos Cabrera et al. (2004), utilizando análises de dicroísmo circular, constataram que o peptídeo EMP-AF (*Eumenine mastoparan-AF*), encontrado no veneno da vespa solitária *Anterhynchium flavomarginatum micado*, adota uma conformação em hélice-α quando colocado em solução contendo TFE ou SDS. Foi constatado ainda, que este peptídeo é capaz de permeabilizar lipossomos aniônicos e, em menor intensidade, lipossomos neutros. Além disso, a habilidade de permeabilizar membranas parece estar associada à quantidade de hélice-α assumida pelo peptídeo.

Vários autores, utilizando-se de técnicas de dicroísmo circular e ressonância magnética nuclear, revelaram que peptídeos da classe dos mastoparanos, quando em solução aquosa, apresentam uma estrutura secundária aleatória ou desordenada (Sforça et al., 2004; Lindberg et al., 2001; Chuang et al., 1996).

Em estudo realizado por Sforça et al. (2004), o EMP-AF foi sintetizado em sua forma de ocorrência natural, ou seja, com o resíduo C-terminal amidado (EMP-AF-NH_2) e em outra forma com o resíduo C-terminal na forma ácido livre (EMP-AF-COO^-). Foi constatado que o EMP-AF-COO^- sofre uma perturbação estrutural onde ocorre uma redução na porcentagem de hélice-α, tanto na extremidade C-terminal quanto no N-terminal. Conseqüentemente, acaba promovendo uma diminuição na interação com as superfícies de membranas sintéticas. Além disso, foi constatada uma redução na atividade biológica, sendo esta redução devido não apenas à diminuição na quantidade de cargas positivas da molécula (perda da amida), comumente descrito por outros autores, mas também devido à essa perturbação estrutural na hélice-α anfipática que acaba alterando sua habilidade de perturbar membranas.

Segundo Chuang et al. (1996), o Mastoparano-B adota uma estrutura em hélice-α anfipática na presença de TFE, sendo que os componentes positivamente carregados, como o grupo amino do resíduo N-terminal e três resíduos de Lisina presentes na seqüência primária, ficam localizados em uma das faces da hélice, enquanto que resíduos hidrofóbicos ocupam a outra face da hélice. Esta estrutura é considerada de grande importância para a ação biológica destes compostos (Konno et al., 2000; Katsu et al., 1990; Nakajima, et al., 1986).

A Melitina, peptídeo extraído do veneno de *Apis mellifera*, possui atividade hemolítica, sendo que esta atividade parece estar fortemente relacionada às interações com membranas (Katsu et al., 1988). Em outro trabalho Katsu e col. (1990) constataram que, devido a algumas semelhanças estruturais de certos mastoparanos com a Melitina, os mesmos atuam sobre biomembranas através de mecanismos similares.

Tem-se levantado a hipótese de que peptídeos carregados positivamente ligam-se a componentes da membrana carregados negativamente (o que inclui fosfolipídios), facilitando assim, a permeabilização das membranas pelos peptídeos (Tossi et al., 2000). Aparentemente, este processo parece ocorrer através de interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, dirigidas pelo caráter anfifílico dos peptídeos, provocando a formação de canais iônicos ou poros que atravessam a membrana, ou ainda interagindo de forma paralela às membranas (Lorenzi, 2002).

Os espectros de dicroísmo circular dos peptídeos Protonectarina-MP (Figuras 19 e 24), Parapolybia-MP (Figuras 20 e 25), Apoica-MP (Figuras 21 e 26), Asn2-Polybia-MP I (Figuras 22 e 27) e MK-578 (Figuras 23 e 28) indicam que os cinco peptídeos adotam uma estrutura aleatória, tanto em água quanto em tampão Tris-borato (pH 7,5). Isto foi comprovado pelo fato de que todos os espectros de CD dos peptídeos nesses meios, apresentaram um sinal negativo um pouco abaixo de 200 nm e sinais próximos de zero nas bandas de 218 nm e 230 nm. Foi observada grande semelhança destas curvas com aquelas obtidas para o padrão de estruturas aleatórias (ver Figura 18). Desta forma, concluiu-se que esses peptídeos, quando em solução aquosa ou em solução tampão (Tris-borato, pH 7,5), não adotam estrutura em hélice-α ou folha-β, permanecendo assim, em conformação aleatória.

Solventes orgânicos como metanol, etanol, acetonitrila e trifluoroetanol induzem estruturas em hélice-α nos peptídeos que possuem a tendência em formar hélice-α (Zhong & Johnson, 1992). Entretanto, o mesmo peptídeo pode ser induzido a formar uma estrutura em folha-β em outros ambientes, assim como ocorre em soluções hidrofóbicas não micelares de SDS (Waterhous & Johnson, 1994).

Quando em presença de SDS e TFE, foram observados sinais negativos próximos de 208 nm e 222 nm, e sinais positivos próximos de 190 nm para todos os peptídeos em questão, sendo que as curvas dicróicas obtidas (Figuras 19, 20, 21, 22 e 23) são semelhantes à

curva padrão para estrutura em hélice-α (Figura 18). Conseqüentemente, concluiu-se que estes peptídeos formam hélice-α quando em meios hidrofóbicos.

Os peptídeos Parapolybia-MP e Apoica-MP apresentam baixas porcentagens de hélice-α em presença de ambos os tipos de vesículas (neutras e aniônicas) (Tabela 10). Em solução de SDS abaixo da CMC (165 μM), o peptídeo Parapolybia-MP apresentou um espectro de CD (Figura 20) com alguma variação em relação aos espectros dos outros peptídeos. Neste caso, a curva dicróica sofre uma leve tendência para o padrão de folhas-β.

Já foram encontrados vários outros exemplos de peptídeos onde ocorrem espectros distintos em função da concentração de SDS (Santos Cabrera, comunicação pessoal; dados ainda não publicados). Nesta concentração abaixo da CMC, as moléculas de SDS encontram-se dispersas na solução, sem formação de micelas, ou seja, de maneira desordenada. Neste caso, a interação entre as moléculas de peptídeo podem estar formando estruturas complexadas, parecidas com estruturas em folha-β (ou intermediárias) pelo "ensanduichamento" de duas moléculas de peptídeo lado a lado com o SDS, ou ainda, algum dobramento parcial característico de estrutura randômica. Na figura 20 a curva em vermelho, obtida durante a análise de CD do peptídeo Parapolybia-MP em presença de SDS 165 μM, é possível observar um deslocamento do maior vale de 208nm (típico de hélice-α) em direção a 222 nm, caracterizando assim uma estrutura com porções em folha-β e/ou porções em estrutura randômica.

Exemplos de conformações dependentes do ambientes já foram descritos para pequenos peptídeos, como no trabalho de Waterhous & Johnson (1994). Foi observada a presença de conformação em hélice-α em solventes orgânicos, enquanto que folha-β foi observado em solução de SDS não micelar.

Na Figura 29 estão representados os espectros de CD de um peptídeo rico em Lisinas (poli-L-Lisina), mostrando mudanças conformacionais de 100% de hélice-α para

100% de folha-β (Figura 29A) e do mesmo composto com a mudança de hélice-α para folha-β, mantendo 20% da cadeia em estrutura randômica (Figura 29B).

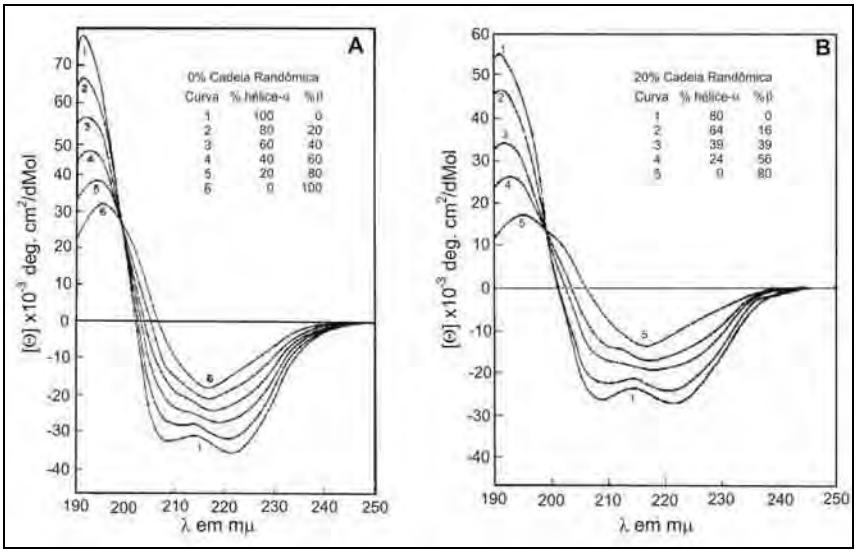

Figura 29: Espectros de CD da poli-L-Lisina (A) contendo 0% de estrutura randômica e variando as porcentagens de hélice-α e folha-β; e (B) contendo 20% de estrutura randômica e variando as porcentagens de hélice-α e folha-β Waterhous & Johnson (1994).

É possível observar grande semelhança no espectro do peptídeo Parapolybia-MP em presença de SDS 165μM, com a curva dicróica número 3 de ambos os gráficos da figura 29, levando à conclusão de que provavelmente esteja ocorrendo a formação de estrutura em folha-β pelo menos em parte da seqüência peptídica deste peptídeo.

Ao contrário do peptídeo Parapolybia-MP, o peptídeo Protonectarina-MP apresentou os maiores valores de porcentagem de hélice-α em presença de vesículas aniônicas, indicando talvez uma maior possibilidade de interação com membranas bacterianas.

No caso do peptídeo Apoica-MP, os resultados obtidos levaram à conclusão de que este peptídeo, por apresentar porcentagens de hélice-α tão baixas em presença de ambos os tipos de vesículas e pelos espectros de CD obtidos nestas condições serem semelhantes à curva padrão de estrutura randômica (Figura 29), não esteja formando hélice-α, como seria esperado em presença de vesículas.

Além das propriedades estruturais dos peptídeos, a diferença em composição das membranas celulares é uma característica importante para a atividade seletiva de formação de poros, quando se considera a interação peptídeo-membrana (Moerman et al., 2002). A face externa das membranas bacterianas contém fosfolipídios carregados negativamente, enquanto que a maioria dos fosfolipídios aniônicos presentes nas membranas de células de mamíferos é seqüestrada para a face citoplasmática da membrana celular (Epand & Vogel, 1999). Estas observações sugerem que peptídeos policatiônicos devem interagir fortemente com membranas bacterianas, facilitado pelas interações eletrostáticas entre as cargas opostas dos peptídeos e das membranas das bactérias (Moerman et al., 2002). Além disso, o colesterol presente nas membranas eucarióticas, representando cerca de 25% do peso total dependendo do tipo celular (Nelson & Cox, 2000), tem uma atividade protetora contra os peptídeos formadores de poros (Matsuzaki et al., 1995a).

A Figura 30, mostra uma representação anfifílica (*helical well*) dos peptídeos (A) Protonectarina-MP, (B) Parapolybia-MP, (C) Apoica-MP, (D) Asn2-Polybia-MP I e (E) MK-578. Nesta representação é possível observar que, com exceção do peptídeo MK-578, todos apresentam faces hidrofílica e hidrofóbica bem definidas. Os resíduos hidrofílicos (em esferas verdes) ou carregados positivamente (em esferas vermelhas), com índice hidropático negativo aparecem numa mesma face, separada pela linha pontilhada. No caso do peptídeo MK-578 (Figura 30E), essa face hidrofílica não fica bem definida, sendo possível observar a interpolação de resíduos hidrofóbicos entre os hidrofílicos. Já nos outros quatro peptídeos, observou-se sempre a presença de três ou quatro resíduos com características hidrofílicas orientados no mesmo lado desta face, e de seis a oito resíduos hidrofóbicos consecutivos constituindo a outra face. Além disso, as faces mais bem definidas aparecem para o peptídeo Apoica-MP, com oito resíduos hidrofóbicos e cinco resíduos hidrofílicos intercalados por apenas um hidrofóbico.

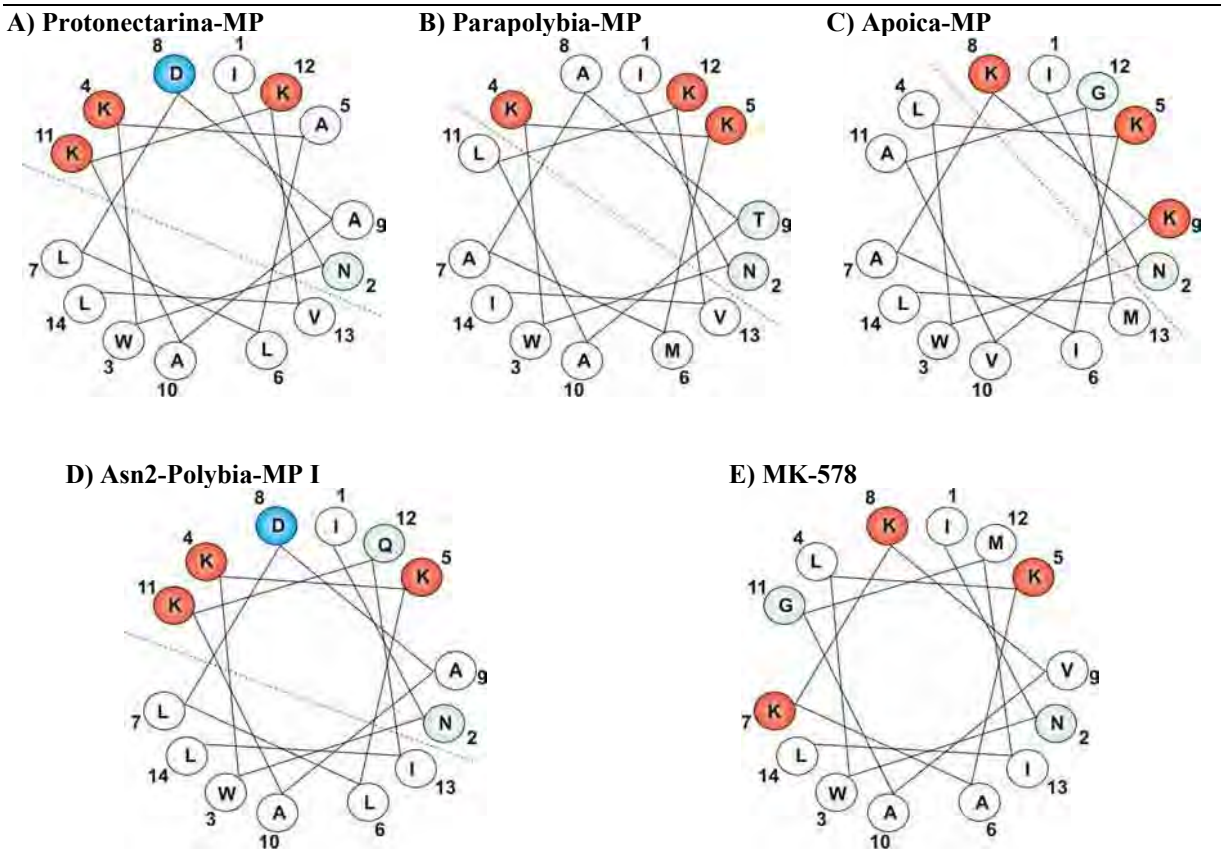

Figura 30: Esquema mostrando a distribuição anfifílica ("*helical wheel*") dos peptídeos (**A**) Protonectarina-MP; (**B**) Parapolybia-MP; (**C**) Apoica-MP; (**D**) Asn2-Polybia-MP I; e (**E**) MK-578. Em **vermelho**: resíduos positivamente carregados; **azul**: negativamente carregados; **verde**: hidrofílicos; e **branco**: hidrofóbicos.

Tais representações se baseiam em modelos hipotéticos ideais, sugerindo que, com exceção do peptídeo MK-578, todos os outros quatro peptídeos possuem estrutura anfipática, sendo esta uma característica de grande importância em suas atividades biológicas específicas. Entretanto, em situações reais, existem várias interações possíveis entre o esqueleto de carbono-α e/ou das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido dos peptídeos, com o meio, que pode por sua vez afetar fortemente estas estruturas secundárias.

A estrutura anfifílica de peptídeos constitui um importante quesito na adsorção, inserção e translocação desses peptídeos às membranas (Matsuzaki, 1999). Alguns mastoparanos parecem ser capazes de passar rapidamente através das membranas celulares e interagir com proteínas citoplasmáticas (Hori et al., 2001). Em vesículas sintéticas e membranas planares sintéticas já foi relatada formação de poros e alteração da permeabilidade dessas membranas (Katsu et al., 1900; Danilenko et al., 1993; Mellor & Sansom, 1990). Entretanto, não existem informações detalhadas sobre a flexibilidade conformacional e

orientação da hélice dos mastoparanos em bicamadas lipídicas mistas, assim como dos aspectos dinâmicos da penetração nas membranas (Hori et al., 2001).

Muitas vezes, informações estruturais, energéticas e dinâmicas, em nível atômico, de biomoléculas de grande mobilidade não podem ser elucidadas através de técnicas experimentais, como espectroscopia e ressonância (van Gunsteren & Mark, 1992). Nestes casos, uma alternativa é a utilização de métodos teóricos que possibilitem uma investigação detalhada dos aspectos moleculares em questão. Se o método teórico utilizado for suficientemente adequado para predizer as propriedades de sistemas biológicos, eles passam a ser viáveis nos estudos das propriedades moleculares com certa resolução espacial, energética e temporal que não poderia ser alcançada experimentalmente (van Gunsteren & Mark, 1992).

Desta forma, neste estudo optou-se pela utilização dos métodos de Modelagem e simulação por Dinâmica Molecular, com intuito de verificar possíveis mudanças conformacionais dos mastoparanos em meio aquoso que pudessem ser correlacionadas com as atividades biológicas apresentadas por esses peptídeos.

7.3. Modelagem e estudos de Dinâmica Molecular

Foram construídos modelos estruturais baseados em homologia, usando o programa MODELLER (Sali & Blundell, 1993).

Os peptídeos Apoica-MP e MK-578 apresentaram alta identidade (57,14% e 43,71%, respectivamente) com o peptídeo EMP-AF (Konno et al., 2000), cujas coordenadas atômicas foram usadas como modelo inicial. As coordenadas atômicas do EMP-AF não foram ainda depositadas no *Protein Data Bank* (PDB), porém foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr. (Departamento de Biologia, PUC-Porto Alegre-RS) e

Prof. Dr. Valmir Fadel (Departamento de Física, IBILCE, UNESP – São José do Rio Preto-SP), que têm colaborado com o nosso grupo neste tipo de investigação.

Os peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP e Asn2-Polybia-MP I apresentam 57,15%, 57,15% e 50% de identidade com o Mastoparano-X (Kusunoki et al., 1998), respectivamente. A estrutura tridimensional do Mastoparano-X foi resolvida por RMN e suas coordenadas atômicas (código de acesso no PDB: 1A13) foram obtidas a partir da página de acesso do PDB na Internet (http://www.rcsb.org/pdb) e utilizadas como modelo inicial (molde) para gerar os modelos dos três peptídeos acima.

De maneira geral, os cinco modelos gerados tendem a formar grandes porções de hélice-α. Todos os modelos gerados foram validados através de análise da estrutura secundária pelo programa Procheck (Laskowski et al., 1993), onde foram observados principalmente os diagramas de Ramachandran e os valores do fator G (*G factor*). O *G-factor* é uma medida que informa o quanto é incomum ou não permitido o modelo que foi gerado. Valores de *G-factor* abaixo de -0,5 implicam em modelos incomuns e abaixo de -1,0 modelos altamente incomuns.

As imagens dos modelos obtidos foram geradas à partir do programa MolMol (Koradi et al., 1996) e estão mostradas na Figura 31.

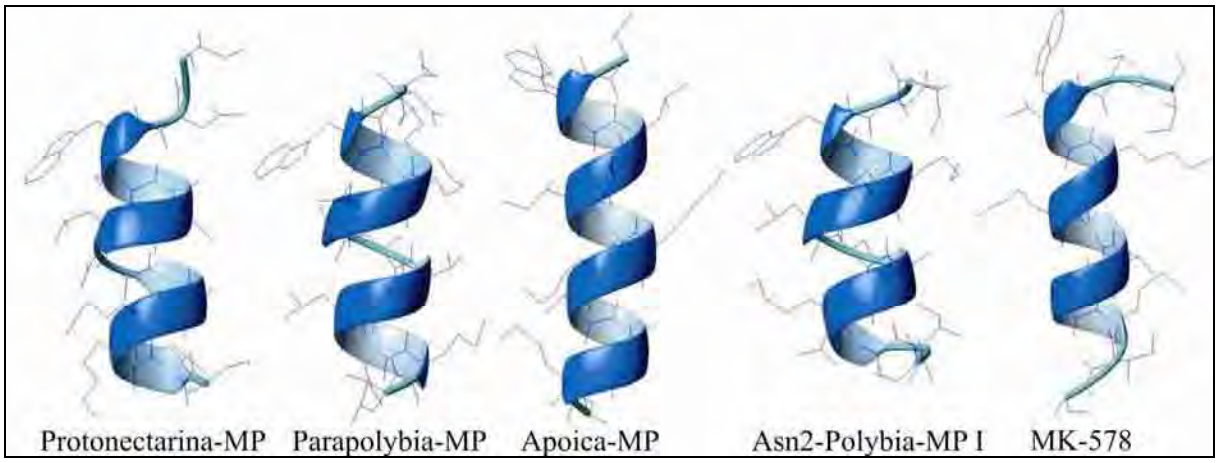

Figura 31: Modelo das estruturas tridimensionais dos mastoparanos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578 gerados à partir do programa MolMol (Koradi et al., 1996), sendo os esqueletos carbônicos mostrados no formato "*ribbon*".

Se forem consideradas as características estruturais dos peptídeos, podemos dividi-los em dois grupos, o primeiro apresentando uma interrupção na estrutura em hélice, e o segundo grupo, sendo constituído pelos peptídeos que apresentam uma hélice contínua. Como mostra a Figura 31, os peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP e Asn2-Polybia-MP I, são pertencente a esse primeiro grupo, além disso, é interessante notar que nestes três casos, as cadeias laterais dos resíduos de Triptofanos (que se localizam aparecem na posição 3 da cadeia em ambos os peptídeos) aparecem voltados para baixo, aumentando assim, a hidrofobicidade no ambiente mais próximo à região central da cadeia peptídica. Os peptídeos Apoica-MP e MK-578, podem ser incluídos no segundo grupo, onde não ocorre essa interrupção na hélice, proporcionando a esses peptídeos estruturas mais rígidas. Além disso, é possível observar que a cadeia lateral do resíduo de Triptofano dessa conformação aparece voltada para cima (mais próximo da região N-terminal).

Para cada peptídeo foram gerados 1000 modelos, sendo todos eles analisados estereoquimicamente. Foram gerados diagramas de Ramachandran para cada um deles, sendo que foram escolhidos os modelos que apresentaram 100% dos resíduos dentro da região preferencialmente permitida e com valor de *G-factor* igual à zero.

O diagrama de Ramachandran do peptídeo Protonectarina-MP (Figura 32) mostra que todos os resíduos de aminoácidos do modelo aparecem nas regiões preferencialmente permitidas do gráfico, sendo onze resíduos na região de hélice-α de mão direita (região A, em vermelho, da figura) e um resíduo na região de hélice de mão esquerda (região L, em vermelho, da figura).

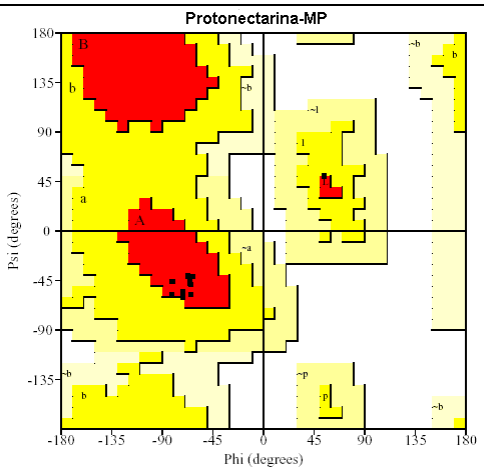

Figura 32: Diagrama de Ramachandran do modelo gerado para o peptídeo Protonectarina-MP.

No diagrama de Ramachandran do peptídeo Parapolybia-MP é possível observar que a maioria dos resíduos encontra-se dentro da região de hélice-α (região A) e apenas um resíduo na região de folha-β. Além disso, 100% dos resíduos encontram-se em regiões permitidas do gráfico (Figura 33).

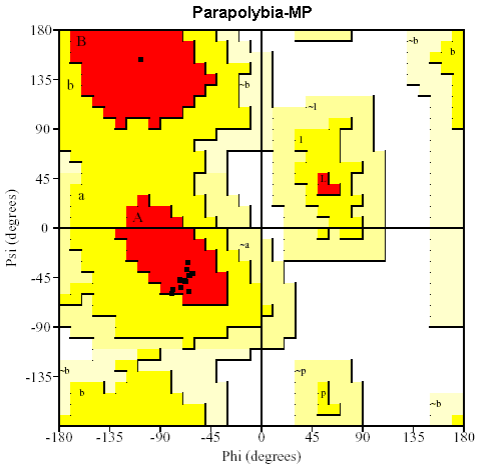

Figura 33: Diagrama de Ramachandran do modelo gerado para o peptídeo Parapolybia-MP.

Na Figura 34 está mostrado o diagrama de Ramachandran do peptídeo Apoica-MP, onde é possível observar que 100% dos resíduos encontram-se nas regiões preferencialmente permitidas, sendo que, neste caso todos os resíduos estão situados na região de hélice-α de mão direita.

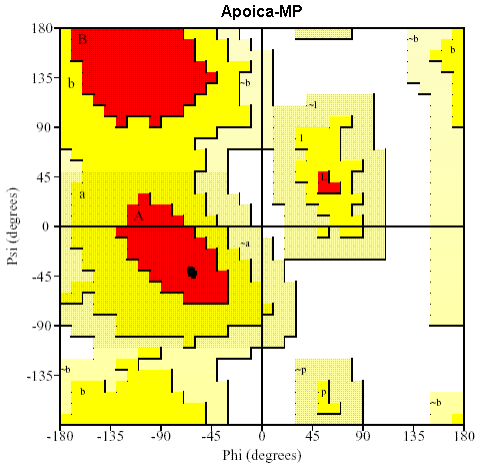

Figura 34: Diagrama de Ramachandran do modelo gerado para o peptídeo Apoica-MP.

O diagrama de Ramachandran do peptídeo Asn2-Polybia-MP I (Figura 35) mostra que apenas um resíduo encontra-se na região de formação de folhas-β, além disso, 100% dos resíduos estão nas regiões preferencialmente permitidas do gráfico.

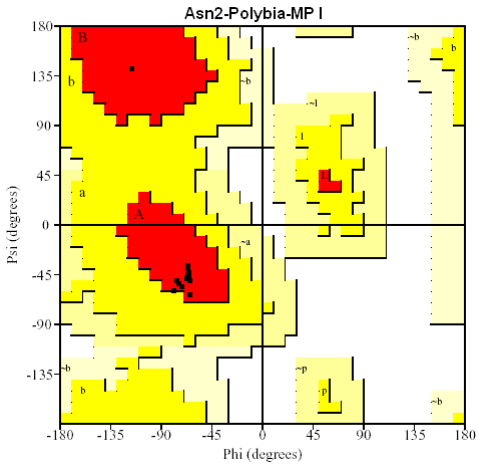

Figura 35: Diagrama de Ramachandran do modelo gerado para o peptídeo Asn2-Polybia-MP I.

O diagrama de Ramachandran gerado para o modelo do mastoparano MK-578 (Figura 36) apresentou 100% dos resíduos dentro das regiões preferencialmente permitidas, sendo que, neste caso dois resíduos estão situados na região de folha-β e todos os demais na região de formação de hélice-α de mão direita.

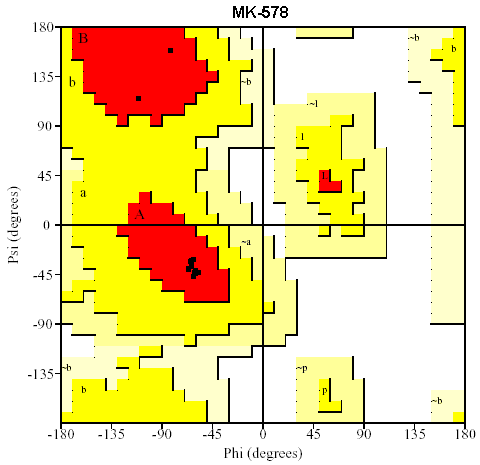

Figura 36: Diagrama de Ramachandran do modelo gerado para o peptídeo MK-578.

A partir dos resultados gerados pela análise da estrutura secundária realizada pelo programa Procheck, foi montada a Tabela 11, onde podemos observar um resumo do número de resíduos encontrados em cada região específica do diagrama de Ramachandran.

Tabela 11: Número de resíduos da seqüência primária situados nas diferentes regiões do diagrama de Ramachandran.

	REGIÕES DO DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN					
PEPTÍDEOS	PP (vermelho) Hélice-α mão direita	PP (vermelho) Hélice-α mão esquerda	PP (vermelho) Folha β	FP (amarelo escuro)	AP (amarelo claro)	NP (branco)
Protonectarina-MP	11	1	-	-	-	-
Parapolybia-MP	11	-	1	-	-	-
Apoica-MP	11	-	-	-	-	-
Asn2-Polybia-MP I	12	-	-	-	-	-
MK-578	9	-	2	-	-	-

PP: região preferencialmente permitida; FP: região favoravelmente permitida; AP: região adicionalmente permitida; NP: região não permitida (exceção aos resíduos de Glicina).

A partir dos dados observados nesta tabela pode-se concluir que todos os modelos gerados são estereoquimicamente possíveis, sendo que nenhum resíduo foi encontrado fora das regiões preferencialmente permitidas. Os resíduos que estão faltando para totalizar os quatorze resíduos de aminoácido que constituem as cinco seqüências, são aqueles pertencentes ao aminoterminal, carboxiterminal e resíduos de Glicina, que não são

considerados nesta tabela por terem liberdade de se localizarem em qualquer região do diagrama de Ramachandran.

Após a validação dos modelos gerados, é possível iniciar os estudos de dinâmica molecular. Para a realização destes estudos, são necessários modelos hipotéticos ou experimentais, tanto da molécula em questão, quanto do solvente em que ela será mergulhada e analisada. Neste estudo, foram utilizados os modelos gerados pelo Modeller (Sali & Blundell, 1993), os quais foram imersos em uma caixa contendo moléculas de água, sendo esse sistema aplicado ao pacote de programas de simulação por Dinâmica Molecular Amber 7 (Pearlman et al., 1995).

Foram realizadas simulações por Dinâmica Molecular do sistema contendo uma molécula de peptídeo solvatada por moléculas de água (moléculas de água do tipo TIP3P, Jorgensen et al., 1983), com intuito de verificar possíveis modificações estruturais decorrentes de interações do peptídeo com moléculas de solvente. Todas essas simulações foram feitas com consideração explicita do solvente, em condições normais de temperatura e pressão (CNTP), em um *ensemble* isobárico-isotérmico (NTP), durante 10 ns.

O acompanhamento de uma simulação por dinâmica molecular pode ser realizado pelo monitoramento de diferentes parâmetros como: energia total do sistema, energias potencial e cinética, temperatura, pressão, volume, distância e/ou ângulo entre os átomos ou entre dois domínios, área acessível ao solvente, ângulos diedros de resíduos importantes, alterações na estrutura secundária, interações entre um ligante e uma proteína, etc, dependendo das propriedades do sistema que se deseja observar ou entender (Schroeder, 2004).

Nos estudos de trajetória dos cinco peptídeos foram observados os movimentos estruturais durante 10 ns de simulação. Para tal, os diferentes sistemas foram monitorados em relação a seus desvios médios quadráticos (RMSD – *root mean square deviations*) das posições atômicas dos átomos que compões o esqueleto carbônico ("*back bone*").

Os valores de RMSD calculados durante todas as trajetórias podem fornecer informações sobre as mudanças conformacionais que ocorrem nestes sistemas ao longo de suas trajetórias. Assim, as estruturas instantâneas geradas nas simulações são sobrepostas a uma estrutura de referência. Geralmente é utilizada como estrutura de referência ou um modelo gerado à partir de cálculos de modelagem molecular, tanto *ab-initio* quanto por homologia.

Neste trabalho, a dinâmica foi realizada através de estruturas de referência iniciais. Os modelos utilizados foram os gerados através de cálculos de modelagem por homologia a partir do programa Modeller (Sali & Blundell, 1993) (Figura 31) e o desvio em relação a esta referência foi calculado como forma de comparação entre as estruturas assumidas, durante toda a trajetória de simulação.

O acompanhamento do RMSD dos sistemas ao longo das trajetórias em função do tempo foi o principal parâmetro utilizado para avaliação da estabilidade das simulações. Esses valores foram calculados através do programas Ptraj do pacote AMBER 7 (Pearlman et al., 1995), sendo os valores de RMSD obtidos através da comparação dos esqueletos carbônicos ("*backbone*") da estrutura modelo ("*template*") em relação às estruturas obtidas para cada unidade de tempo de simulação (ps) das trajetórias. As figuras a seguir mostram os valores de RMSD para os peptídeos Protonectarina-MP (Figura 37), Parapolybia-MP (Figura 38), Apoica-MP (Figura 39), Asn2-Polybia-MP I (Figura 40) e MK-578 (Figura 41) durante as respectivas trajetórias de simulação.

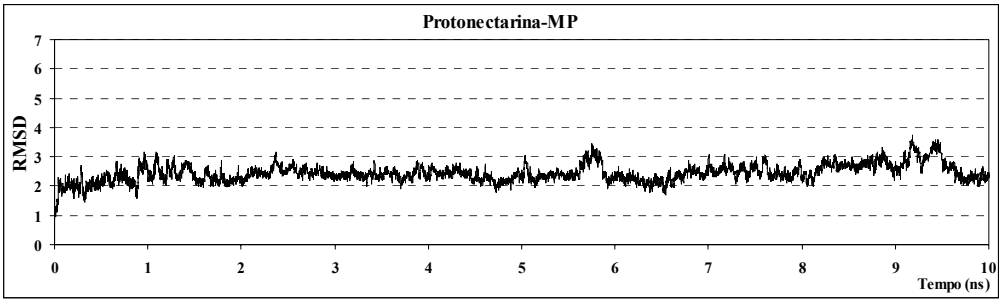

Figura 37: Valores de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Protonectarina-MP.

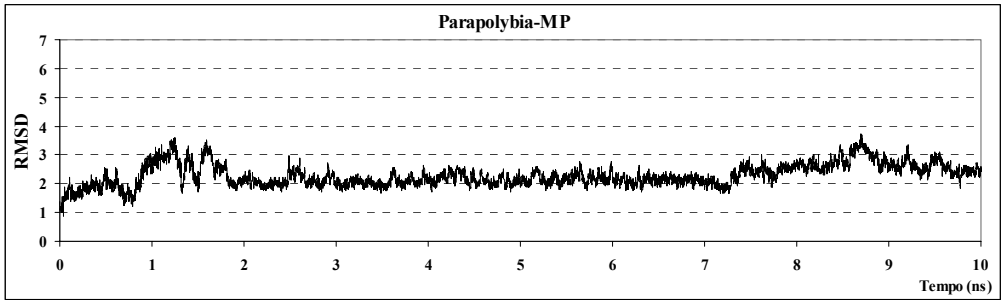

Figura 38: Valores de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Parapolybia-MP.

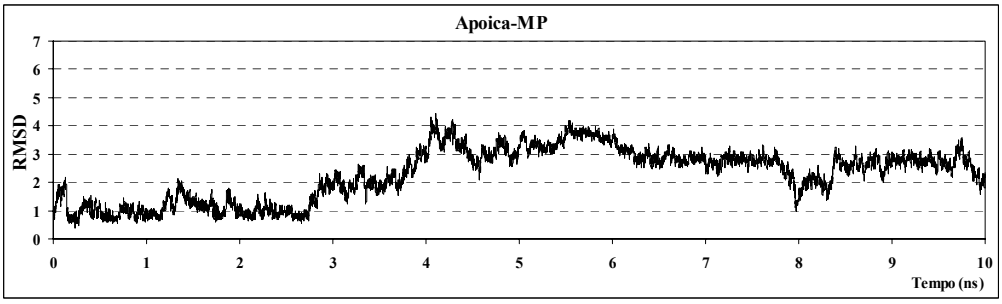

Figura 39: Valores de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Apoica-MP.

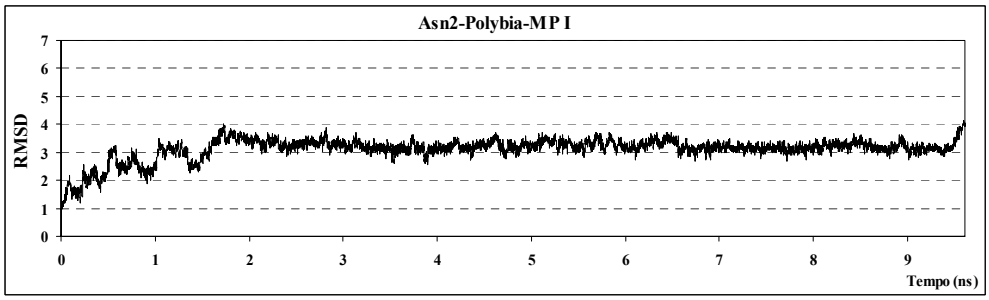

Figura 40: Valores de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Asn2-Polybia-MP I.

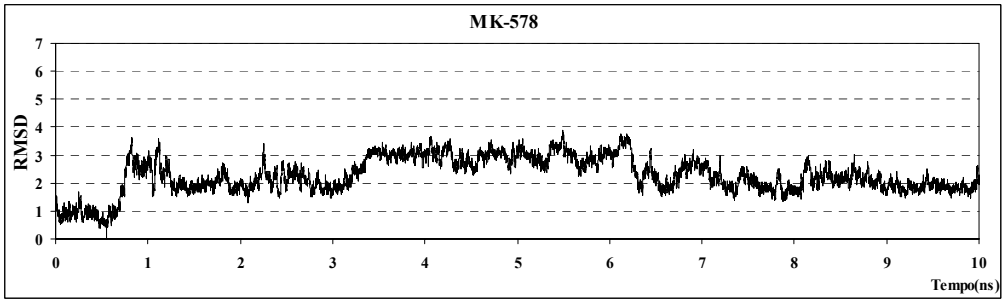

Figura 41: Valores de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano MK-578.

Ao observar estes gráficos de RMSD dos cinco peptídeos, é possível afirmar que ocorrem grandes mudanças conformacionais ao longo do tempo de simulação. Nas trajetórias simuladas para os peptídeos Apioca-MP (Figura 39) e MK-578 (Figura 41) não é possível observar períodos de maior estabilidade, onde geralmente as moléculas convergem para uma estrutura mais estável, durante os 10 ns de simulação. Por outro lado, os peptídeos Protonectarina-MP (Figura 37), Parapolybia-MP (Figura 38) e Asn2-Polybia-MP I (Figura 40) apresentam alguns períodos de convergência nos gráficos de RMSD, onde ocorrem variações de baixa amplitude nos valores obtidos. Coincidentemente, os três peptídeos que apresentaram conformação em hélice interrompida (ou seja, dois segmentos de hélice compondo a estrutura), são aqueles que também apresentam certa tendência de convergência para estruturas mais estáveis ao longo dos 10 ns de simulação (Protonectarina-MP, Parapolybia-MP e Asn2-Polybia-MP I).

É importante ressaltar que a determinação da fase de equilíbrio depende de vários fatores e dos parâmetros que se deseja observar. Portanto, não existe um tempo padrão de observação para que o equilíbrio se estabeleça, já que diferentes parâmetros se estabilizam em diferentes tempos.

Quando se analisa o gráfico de RMSD do peptídeo Protonetarina-MP (Figura 37), observa-se que existem alguns períodos onde ocorre certa estabilidade conformacional. O modelo gerado para este peptídeo através do Modeller, foi analisado pelo programa DSSP (*Dictionary of Protein Secundary Structure*) (Kabasch & Sander, 1983), através do qual foi possível determinar que esta estrutura possui cerca de 71% de seus resíduos envolvidos na formação de hélice do tipo α. Porém, o resíduo Asp8 forma uma torção, dividindo a hélice em dois segmentos, um envolvendo os resíduos de 3 a 7 e o outro de 9 a 13. Essa torção é ainda observada no início da simulação, sendo que próximo dos 3 ns da trajetória essa torção é perdida, e o resíduo Asp8 acaba fazendo parte da hélice, que torna-se um único segmento, com por exemplo aos 3,946 ns (Figura 42B) e 7,389 ns (Figura 42D), mostrados na figura

abaixo. Além disso, observa-se que nos períodos de maior estabilidade da estrutura a hélice encontra-se sem interrupção. Ao contrário, os picos observados ao longo do gráfico, como por exemplo, a 5,800 ns (Figura 42C) e 9,199 ns (Figura 42E), a interrupção da hélice, através de estrutura em *turn*, volta a acontecer. No final da simulação, após os 9,600 ns, a interrupção da hélice volta a se desfazer.

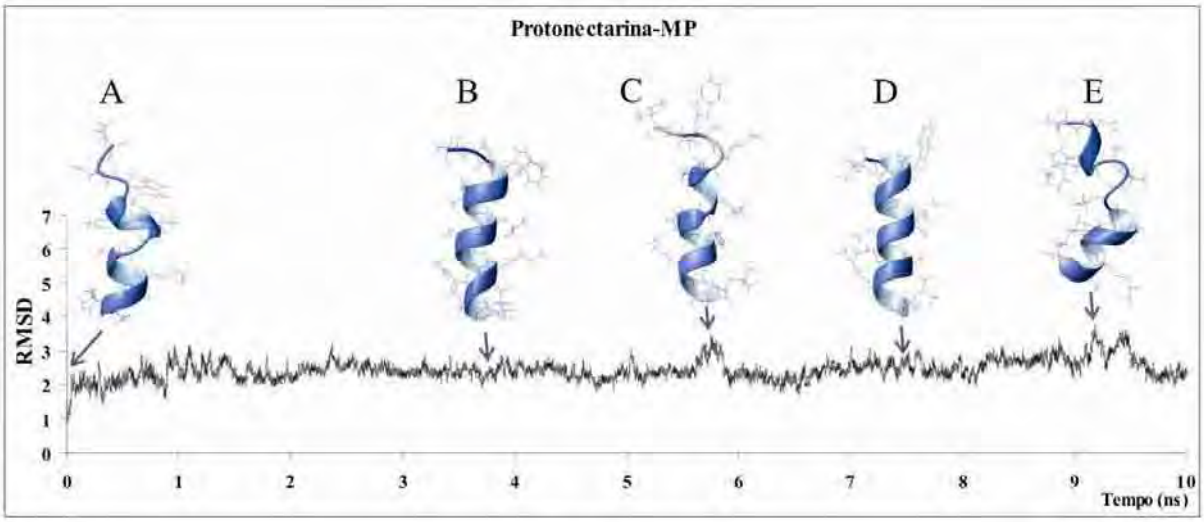

Figura 42: Gráfico de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Protonectarina-MP com as conformações estruturais nos seguintes picossegundos A) 1; B) 3946; C) 5800; D) 7389; e E) 9199.

Apesar de ocorrerem grandes variações estruturais durante toda a trajetória de simulação, observa-se que o peptídeo mantém como principal estrutura secundária, a hélice, sendo preferencialmente do tipo α. Por outro lado, também são observados outros tipos de estrutura ao longo da simulação, conforme observado aos 5,800 ns (Figura 42C), sendo esta uma hélice do tipo 3_{10} formada pelos resíduos de Lys4 a Leu7.

A torção da hélice do tipo 3_{10} é para a direita, assim como ocorre na hélice-α. Os resíduos de aminoácidos se unem formando um ângulo de 120º entre si, desta forma, cada passo da hélice é composto por 3 resíduos de aminoácidos. Além disso, a estabilização da hélice ocorre através da formação de uma ligação de hidrogênio entre o grupo N-H de um resíduo de aminoácido com o grupo C=O do resíduo de aminoácido três posições à frente, esta repetição $i + 3 \rightarrow i$ mantida por ligação de hidrogênio, define a hélice-3_{10} (Pauling et al.,

1951). Consequentemente, a hélice fica com um diâmetro menor e um passo de hélice mais longo, em relação à hélice-α.

Outro aspecto interessante, é que em todo momento da simulação a porção C-terminal da cadeia peptídica se mantém em continuidade com a hélice, muitas vezes em conformação *turn*, mas sempre mantendo a continuidade. Provavelmente a ligação de hidrogênio formada entre a amida e a Lys11 deva dar uma maior estabilidade nesta região da molécula ajudando a manter esta conformação, como pode ser observado nas figuras 42A até 42E.

A figura 43, a seguir, traz a representação dos padrões de estrutura secundária que ocorrem para o peptídeo Protonectarina-MP durante os 10 ns de simulação. Em azul estão representados os resíduos em hélice-α. É possível observar que a estrutura predominante nessa simulação é em hélice-α, sendo que o lado N-terminal permanece em estrutura randomizada, envolvendo os resíduos Ile1 e Ans2 durante quase todo o tempo, sendo que próximo aos 7000 ps ocorre a participação do Ans2 na formação de um *turn* (em amarelo) ou da própria hélice-α.

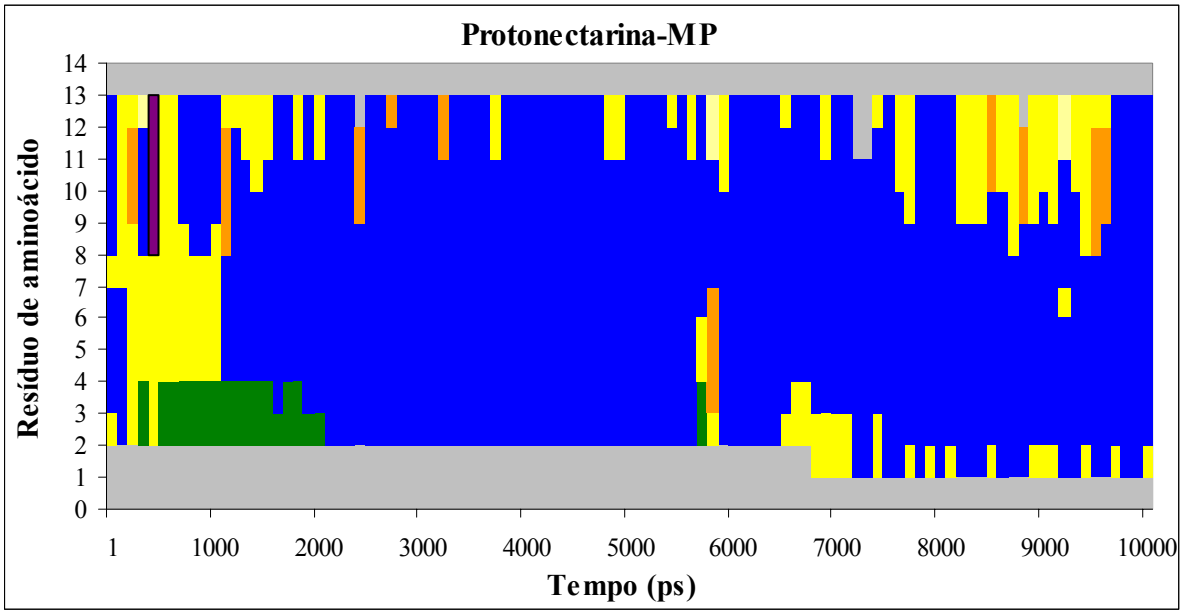

Figura 43: Padrões de estrutura secundária por resíduo de aminoácido, ao longo da dinâmica do peptídeo Protonectarina-MP. Em cinza (●), resíduos em conformação aleatória ("*coil*"); em verde (●), resíduos em curvas ("*bend*"); em amarelo (●), resíduos em voltas ("*turn*"); em laranja (●), resíduos em hélice 3_{10}; em azul (●), resíduos em hélice-α; em roxo (●), resíduos em hélice-5.

O gráfico de RMSD do peptídeo Parapolybia-MP (Figura 44) mostra um longo período de estabilidade, entre 1,892 ns e 7,287 ns. Durante este período, a hélice é contínua e existe a formação somente de hélice-α. Após esse período, ocorrem grandes variações estruturais, caracterizando momentos de instabilidade da molécula. A partir de aproximadamente 7,300 ns, a hélice formada é do tipo 3_{10} e a região N-terminal sofre uma grande torção (Figura 44E).

A estrutura representada em 8,709 ns (Figura 44E) representa um ápice do valor de RMSD, onde ocorre uma das maiores variações em relação ao *template* utilizado, porém, toda essa região é composta por modelos contendo a região N-terminal com grandes torções, mostrando que este peptídeo possui alta mobilidade. Além disso, cálculos realizados através do software Deep View / Swiss-PdbViewer v3.7 (Guex & Peitsch, 1997) da formação de ligações de hidrogênio mostraram que nessa região o C-terminal amidado ocorre a perda da formação da ligação de hidrogênio, entre a amida e o resíduo Leu11 em 4,479 ns (Figura 44C) e Ala10 e Met13 em 8,709 ns (Figura 44E), o que pode estar promovendo certa instabilidade nessa porção da molécula. Desta forma, após a perda das ligações de hidrogênio, é possível observar um reflexo tanto no próprio C-terminal quanto na porção N-terminal.

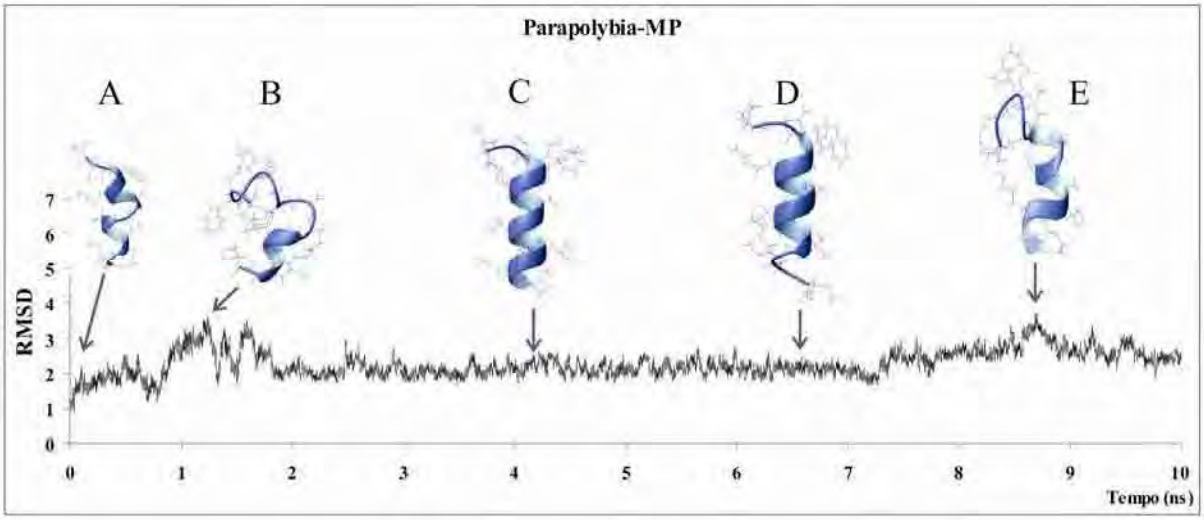

Figura 44: Gráfico de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Parapolybia-MP com as conformações estruturais nos picossegundos A) 1; B) 1248; C) 4479; D) 6639; e E) 8709.

A figura 45 mostra o diagrama que define os padrões de estruturas secundárias assumidas pelo peptídeo Parapolybia-MP ao longo da trajetória de simulação. Nestas condições, observa-se que este peptídeo possui como estrutura predominante a conformação em hélice-α, com exceção do início da simulação, onde aparecem conformações com interrupção da hélice e conformações contendo hélice 3_{10}. Após os 2000 ps observa-se certa convergência para a hélice-α, que se mantém quase até o fim do tempo de simulação. Por volta de 7000 ps o lado N-terminal, envolvendo os resíduos Trp3, Lys4 e Lys5, sofre uma torção e passa a se estruturar em forma de "*turn*". É interessante notar que essas mudanças acompanham a curva de RMSD (Figura 38), mostrando algumas regiões de estabilidade coincidindo com a estabilização da hélice.

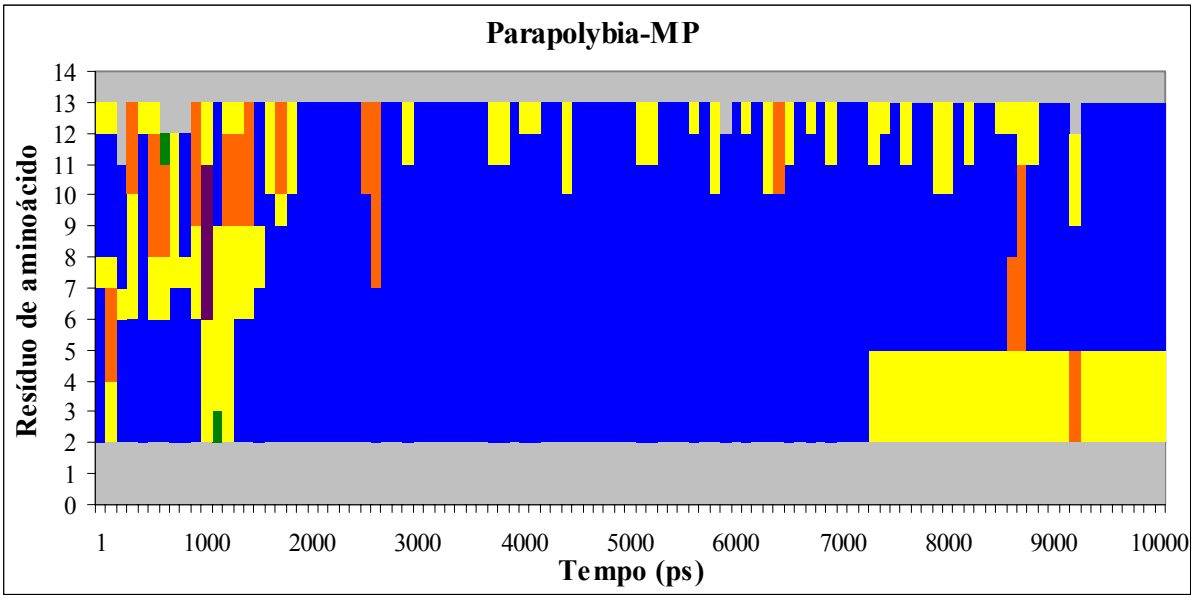

Figura 45: Padrões de estrutura secundária por resíduo de aminoácido, ao longo da dinâmica do peptídeo Parapolybia-MP. Em cinza (●), resíduos em conformação aleatória ("*coil*"); em verde (●), resíduos em curvas ("*bend*"); em amarelo (●), resíduos em voltas ("*turn*"); em laranja (●), resíduos em hélice 3_{10}; em azul (●), resíduos em hélice-α; em roxo (●), resíduos em hélice-5.

A trajetória de simulação do peptídeo Apoica-MP (Figura 46) não apresentou grandes períodos de estabilidade. As variações ocorrem desde o início da simulação, ficam mais intensas por volta dos 4 ns, tornam-se um pouco estáveis entre 6,5 ns a 7,8 ns e voltam a sofrer variações estruturais. Apesar disso, um fato interessante é que durante toda a trajetória

o peptídeo Apoica-MP possui resíduos formando hélice-α, sendo que ela não é perdida em nenhum momento. Algumas aberturas da hélice-α acorrem nas extremidades da cadeia, como pode ser observado na figura 46C e 46D tanto o C-terminal quanto o N-terminal ficam com torções em *turn*. Porém, o C-terminal volta a se estruturar em hélice, provavelmente devido a presença da amida do resíduo C-terminal, que por sua vez ajuda na manutenção da estrutura nesses peptídeos (Sforça et al., 2004).

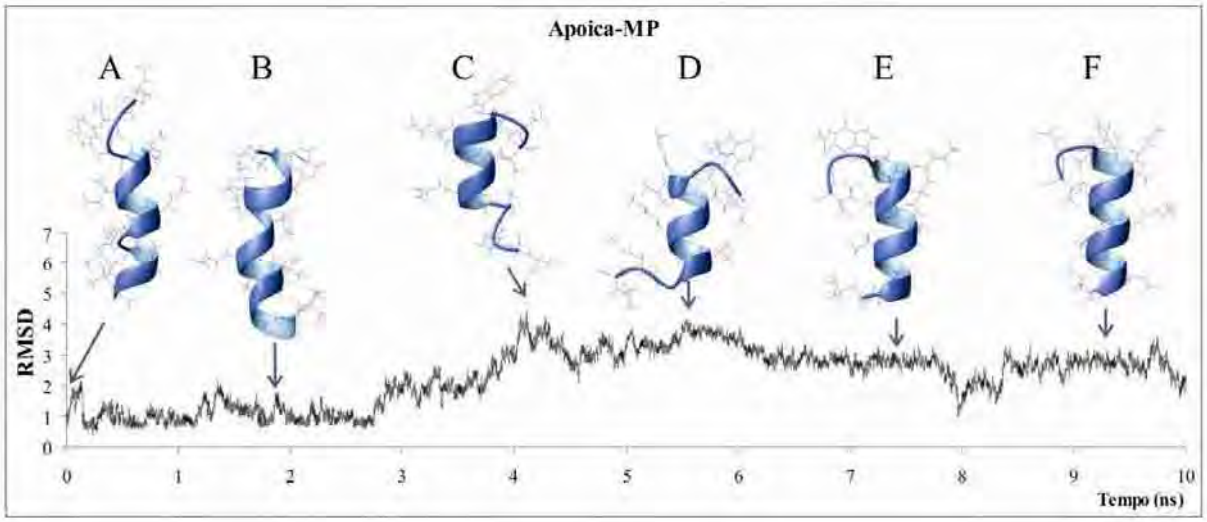

Figura 46: Gráfico de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Apoica-MP com as conformações estruturais nos picossegundos A) 1; B) 1899; C) 4127; D) 5720; E) 7486; e F) 9264.

A figura 47 representa o histograma da conformação estrutural do peptídeo Apoica-MP. Ocorre a formação preferencial de hélice-α, sendo que essa hélice se mostra estável, principalmente entre os resíduos Lys4 e Val10, durante praticamente todo o período de simulação. Além disso, é possível observar que as duas extremidades, C- e N-terminal, ora apresentam estrutura aleatória (cinza), ora em "*turn*" (amarelo).

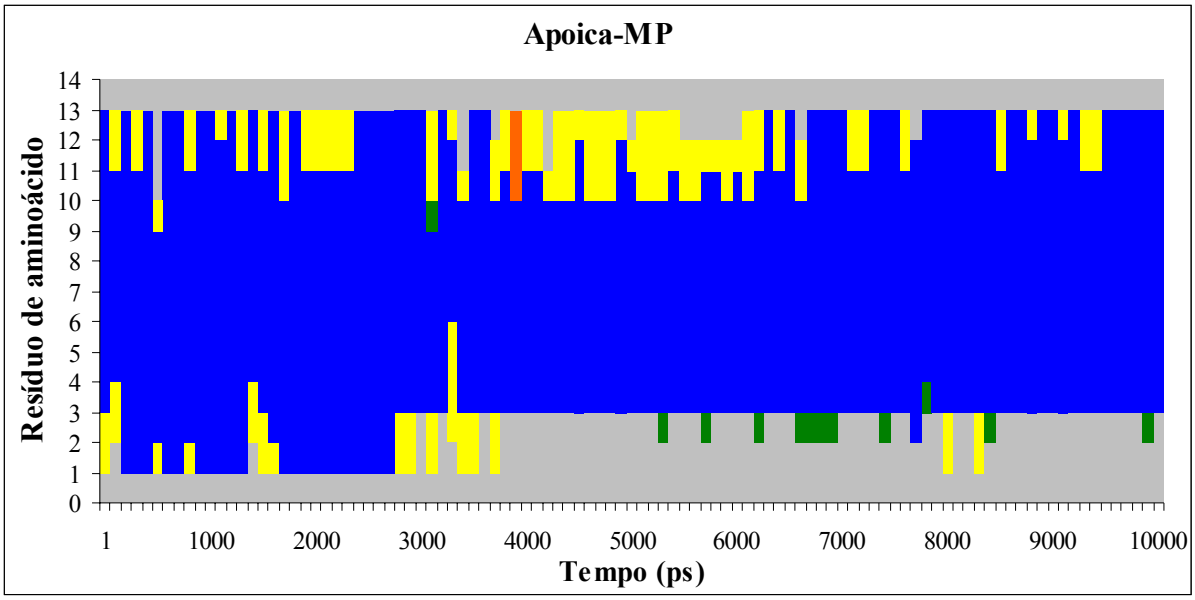

Figura 47: Padrões de estrutura secundária por resíduo de aminoácido, ao longo da dinâmica do peptídeo Apoica-MP. Em cinza (●), resíduos em conformação aleatória ("*coil*"); em verde (●), resíduos em curvas ("*bend*"); em amarelo (●), resíduos em voltas ("*turn*"); em laranja (●), resíduos em hélice 3_{10}; em azul (●), resíduos em hélice-α.

A simulação por Dinâmica Molecular do peptídeo Asn2-Polybia-MP I apresentou uma trajetória com valores de RMSD com as menores variações ao longo do período de simulação dentre os cinco peptídeos analisados nesse trabalho (Figura 48). Durante este período de estabilidade que começa por volta de 1,700 ns podemos observar dois patamares, um entre ~1,700 ns até ~6,500 ns, em que os valores de RMSD ficam em torno de 3,27 Å, e outro entre ~6,500 ns até ~9,500 ns, onde os valores de RMSD sofrem uma ligeira diminuição, ficando com média de 3,17 Å. Durante todo esse período de estabilidade a molécula assume uma estrutura helicoidal, sendo a hélice dividida em dois segmentos separados por um *turn* (Figura 48C e 48D).

Nem sempre a amida do C-terminal desse peptídeo está mantendo a hélice nessa porção, onde é possível observar voltas ou *turns* nessa região. Além disso, o Triptofano nesse caso encontra-se quase sempre em uma posição tendendo ao paralelo em relação ao esqueleto carbônico da molécula.

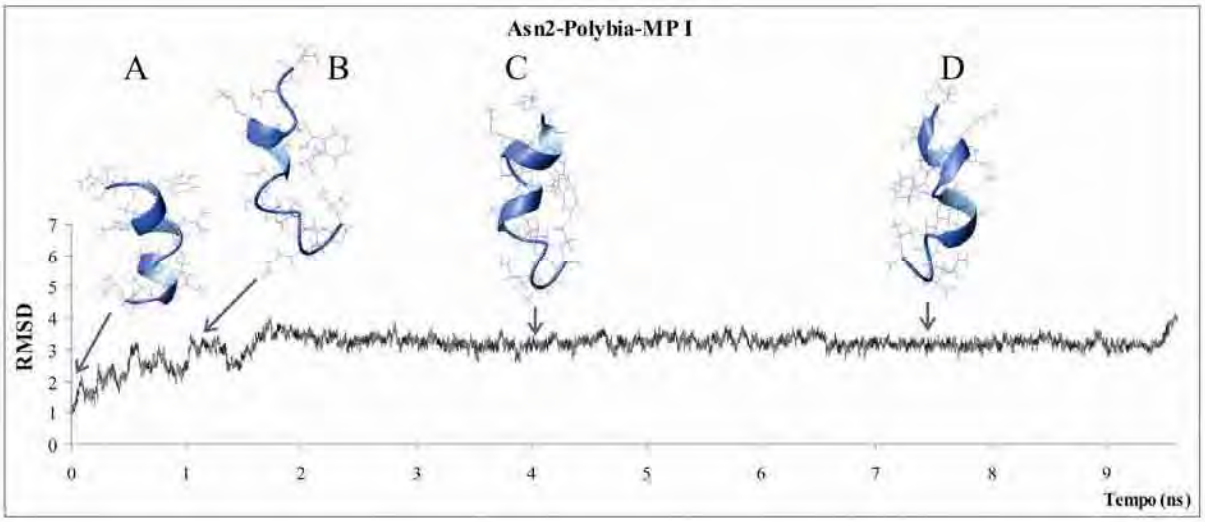

Figura 48: Gráfico de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano Asn2-Polybia-MP I com as conformações estruturais nos picossegundos A) 1; B) 1276; C) 4048; e D) 7454.

Diferentemente das outras simulações, o peptídeo Asn2-Polybia-MP I não apresentou como estrutura preferencial a hélice-α. Em análise ao esquema abaixo (Figura 49) observa-se que a estrutura principal oscila entre voltas ("*turn"*) (em amarelo) ou hélice 3_{10} (em laranja). Examinando-se a estrutura destas conformações, observa-se que elas apresentam-se em formato de hélice (Figuras 48C e 48D), porém não são pertencentes ao grupo das estruturas em hélice-α. O maior período de estabilidade observado no gráfico de RMSD desse peptídeo (Figura 48) corresponde a uma estrutura formada por parte da molécula (resíduos 2 a 6) em hélice-α, parte (de 7 a 10) em hélice 3_{10} e o restante (C- e N-terminal) em voltas ("*turn*").

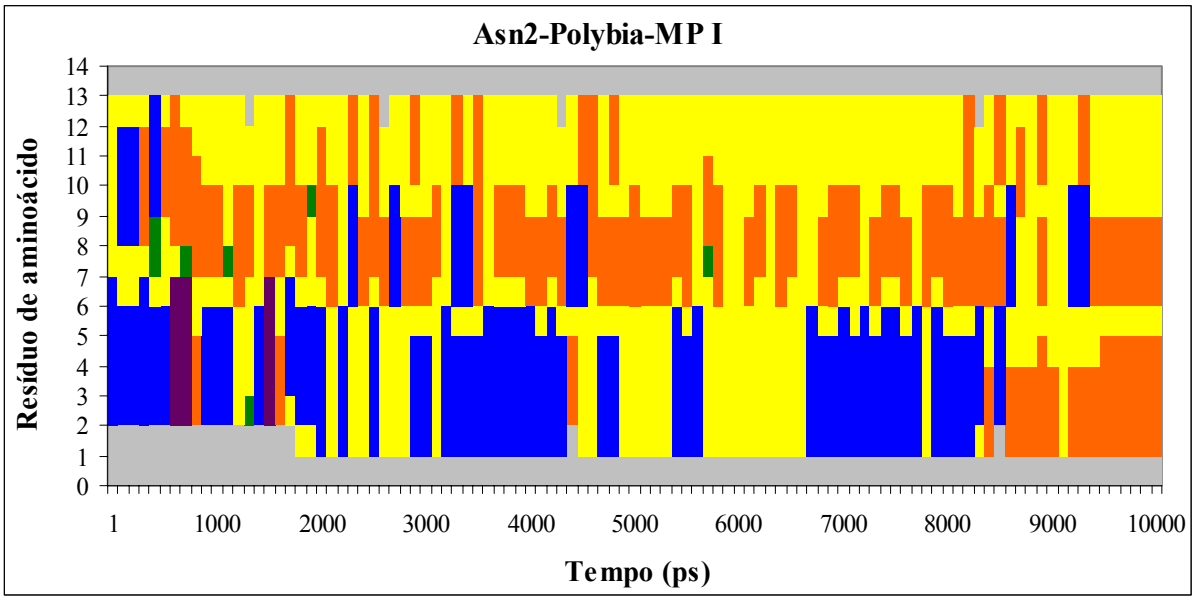

Figura 49: Padrões de estrutura secundária por resíduo de aminoácido, ao longo da dinâmica do peptídeo Asn2-Polybia-MP I. Em cinza (●), resíduos em conformação aleatória ("*coil*"); em verde (●), resíduos em curvas ("*bend*"); em amarelo (●), resíduos em voltas ("*turn*"); em laranja (●), resíduos em hélice 3_{10}; em azul (●), resíduos em hélice-α.

Outro peptídeo que apresentou poucos períodos de estabilidade foi o MK-578, como é possível observar no gráfico de RMSD da trajetória de simulação (Figura 50). Na figura abaixo foram representados alguns momentos, tanto de maior variação estrutural (Figura 50B), quanto pequenos períodos de estabilidade estrutural (Figura 50C; 50E). Em muitos momentos, a estrutura adotada por esta molécula é composta de parte em hélice-α, parte em hélice 3_{10} e parte em *turn*. Como por exemplo, no caso da estrutura representada na figura 50C o lado N-terminal encontra-se em hélice-α, formada por 8 resíduos de aminoácidos, seguida de um *turn* e uma porção em hélice 3_{10} formada por 3 resíduos.

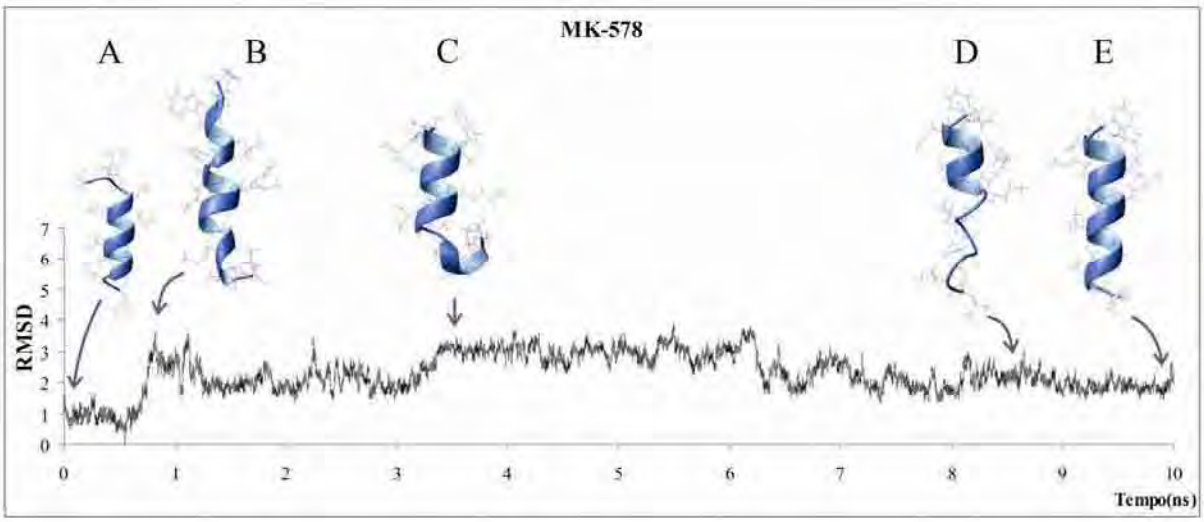

Figura 50: Gráfico de RMSD do esqueleto peptídico (*backbone*) em função do tempo para a trajetória do mastoparano MK-578 com as conformações estruturais nos picossegundos A) 1; B) 827; C) 3514; D) 8535; e E) 9836.

Apesar de ocorrerem grandes variações estruturais, observadas através dos valores de RMSD, durante a simulação por Dinâmica Molecular do peptídeo MK-578, a estrutura predominante é hélice-α, como é possível observar no diagrama a seguir (Figura 51). Na região entre 3000 ps e 6000 ps, onde é possível observar um platô elevado na curva de RMSD, ocorre uma maior variação no comprimento da hélice-α, ocorrendo a formação de voltas ("*turn*") na região do C-terminal a partir do nono resíduo.

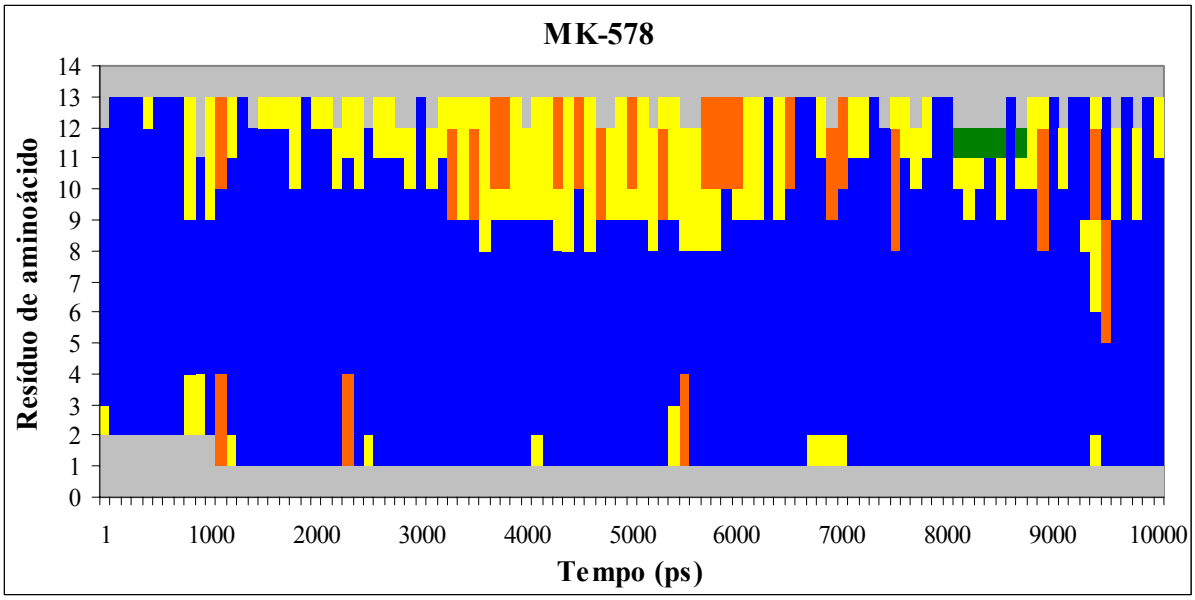

Figura 51: Padrões de estrutura secundária por resíduo de aminoácido, ao longo da dinâmica do peptídeo MK-578. Em cinza (●), resíduos em conformação aleatória ("*coil*"); em verde (●), resíduos em curvas ("*bend*"); em amarelo (●), resíduos em voltas ("*turn*"); em laranja (●), resíduos em hélice 3_{10}; em azul (●), resíduos em hélice-α.

A Figura 52 traz uma amostragem de modificações ocorridas nas estruturas secundárias dos mastoparanos Apoica-MP (A), MK-578 (B), Parapolybia-MP (C), Asn2-Polybia-MP I (D) e Protonectarina-MP (E), em função do tempo de simulação. Os modelos mostrados foram constituídos pela sobreposição de dez estados conformacionais de cada peptídeo, observados durante a trajetória, gerados a partir do programa Swiss-PDBViewer (Guex & Peitsch, 1997), que apresentaram maiores valores de RMSD em relação ao modelo inicial.

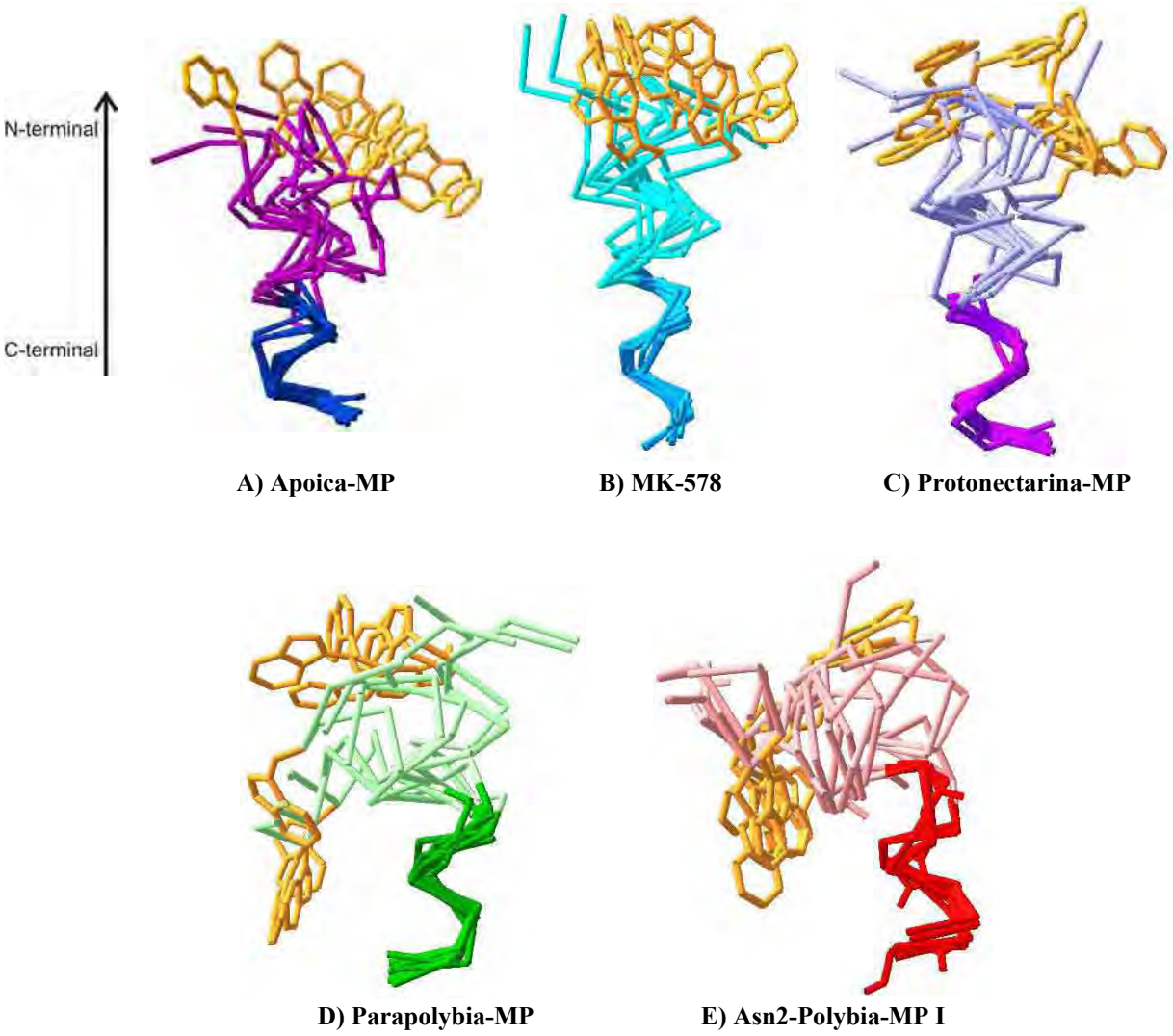

Figura 52: Dez estados conformacionais dos esqueletos carbônicos (*backbone*) ocorridos durante 10 ns de simulação por dinâmica molecular dos cinco peptídeos.

Nesta representação também é possível observar a tendência da cadeia lateral do resíduo de Triptofano de se orientar em direção ao resíduo N-terminal dos peptídeos Apoica-MP (Figura 52A), MK-578 (Figura 52B) e Protonectarina-MP (Figura 52C).

Entretanto, nos outros peptídeos, Parapolybia-MP (Figura 52D) e Asn2-Polybia-MP I (Figura 52E), a cadeia lateral do Triptofano muitas vezes orienta-se voltada para o centro da molécula. Além disso, é possível observar um dobramento mais acentuado da hélice, coincidente à região onde na maior parte do tempo de simulação ocorre interrupção na hélice. Aparentemente, essas duas estruturas (Figura 52D e 52E) possuem uma maior mobilidade, dado à flexibilidade provavelmente proveniente desta interrupção na estrutura em hélice (como já observado na figura 31).

As simulações de dinâmica molecular para os cinco peptídeos, mostradas na Figura 52, sugerem que a região C-terminal de todos os peptídeos seja mais estável que a região N-terminal, uma vez que essa região apresentou menor variação estrutural em relação ao modelo inicial. Deve-se enfatizar que os cinco peptídeos possuem o resíduo C-terminal amidado e que Sforça et al. (2004) demonstraram que este atributo é responsável pela estabilização da região C-terminal dos mastoparanos. Segundo esses mesmos autores, a grande maioria dos peptídeos biologicamente ativos que interagem com membranas é composta por até 60 resíduos de aminoácidos, possuem carga líquida positiva, são hidrofóbicos e possuem estruturas anfipáticas em hélice-α.

Foi relatada a perda de atividade biológica em mastoparanos apresentando C-terminal na forma ácida (Nakajima et al., 1987; Kuchler et al., 1989; Santos-Cabrera et al., 2004). Além disso, formas nativas que não apresentam o C-terminal amidado, quando amidados sinteticamente exibem atividades biológicas mais potentes em relação à forma nativa (ácida) (Sandvik & Dockray, 1999; Ali et al. 2001; Mor & Nicolas, 1994). Consequentemente, a redução no potencial inflamatório a antibiótico dos peptídeos não

amidados é também atribuído à uma redução na carga líquida positiva ou à redução na estrutura em hélice, conseqüentes da falta da amida no lado C-terminal.

A figura 53 mostra os gráficos de CD gerados para o peptídeo EMP-AF-NH_2 (Figura 48A) e EMP-AF-COO^- (Figura 48B) em solução de TFE (Sforça et al., 2004). Nota-se claramente uma diminuição na intensidade das bandas negativas nas regiões de 208nm e 222 nm no espectro de CD do EMP-AF na forma não amidada, além disso, não apresenta o pico em 195 nm, característico de hélice-α. Segundo os autores, a ausência da amida no C-terminal provoca uma redução na carga líquida positiva e certa instabilidade molecular, atingindo não somente o local da formação da ligação de hidrogênio proporcionada pelo NH_2, mas a estrutura secundária do peptídeo como um todo.

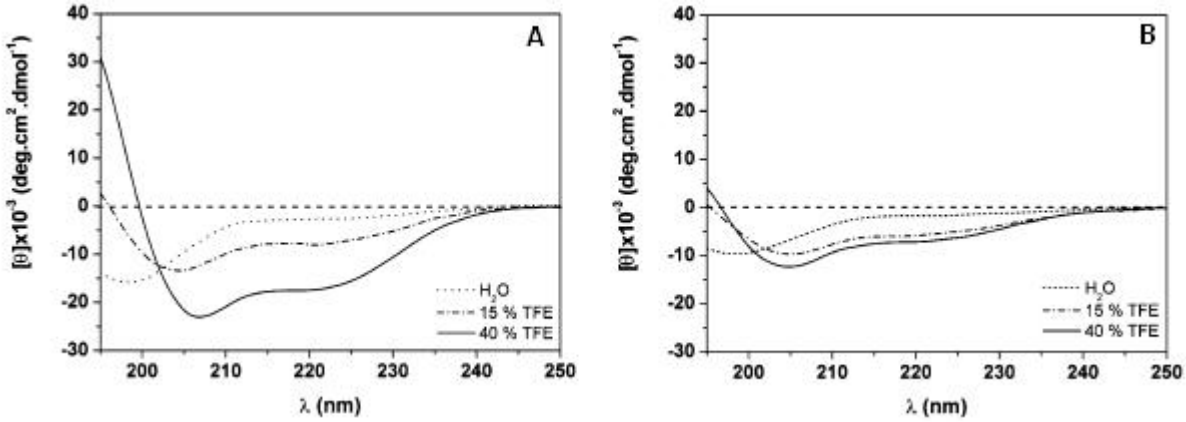

Figura 53: Espectros de CD do peptídeo EMP-AF com o lado C-terminal (A) amidado (EMP-AF-NH_2) e (B) caboxi-livre (EMP-AF-COO^-) em solução aquosa, em presença de TFE 15% (v/v) e TFE 40% (v/v). Sforça et al. (2004).

A grande maioria dos peptídeos pertencentes à classe dos Mastoparanos possui o resíduo C-terminal amidado (-NH_2), assim como acontece para os peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578, todos pertencentes a esta classe de peptídeos. Acredita-se, que a presença da amida no C-terminal esteja não somente colaborando para a formação da hélice, mas também estabilizando a estrutura secundária adotada por essas moléculas.

Neste estudo foram utilizados os peptídeos EMP-AF e Mastoparano-X como molde ("*template*") para gerar os modelos dos cinco peptídeos, através da modelagem por

homologia. Esses *templates* são provenientes de análise de RMN, sendo a estrutura gerada para esses peptídeos em solução de TFE, ou seja, em um ambiente hidrofóbico indutor de hélice. Desta forma, como a modelagem utilizada foi baseada num modelo pré-existente, espera-se que os modelos gerados para os peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578, tenham estruturas moleculares próximas dos moldes e também próximas das estruturas adotadas pelos mesmos em solução de TFE.

As análises de dicroísmo circular desses peptídeos em TFE mostraram a ocorrência de ~47% de hélice-α para o peptídeo Protonectarina-MP, ~48% para o Parapolybia-MP, ~41% para o peptídeo Apoica-MP, ~43% para o Asn2-Polybia-MP I e ~30% para o MK-578. Quando são comparados esses valores com a quantidade de hélice encontrada para os modelos gerados por modelagem molecular, é possível observar que os valores experimentais são inferiores àqueles obtidos por modelagem. Assim, por exemplo, para o peptídeo Apoica-MP, 12 resíduos de aminoácidos fazem parte da hélice perfazendo um total de 83% de hélice na estrutura do modelo gerado, enquanto que para os outros quatro peptídeos, 10 resíduos da seqüências primária estão em conformação de hélice (sendo 71% da conformação estrutural em hélice). Desta forma, conclui-se que os modelos provenientes da modelagem por homologia, apesar de serem estereoquimicamente possíveis, não condizem completamente com os resultados experimentais obtidos por Dicroísmo Circular obtidos para esses peptídeos em solução. Porém, a dinâmica molecular pode trazer uma visão mais realista das movimentações e estados conformacionais mais prováveis que possam ocorrer para essas moléculas ao longo do tempo.

Logo no início da simulação por dinâmica molecular foi observada a ocorrência de valores elevados de RMSD (apresentados nos gráficos dos valores de RMSD em função do tempo) e também, certa diminuição na porcentagem de hélice-α dessas estruturas. Os modelos iniciais utilizados nestas simulações possuem alto teor de hélice, desta forma, é possível observar qual o comportamento das hélices ao longo da trajetória, sendo que o esperado é

certa desestruturação da hélice, uma vez que a simulação foi realizada com os peptídeos imersos em água, solvente onde os mesmos apresentam tendência à conformação randômica (aleatória), observado nos experimento de dicroísmo circular.

As simulações por Dinâmica Molecular revelaram grandes variações nos valores de RMSD, porém também revelam que predominam as conformações em hélice, que de maneira geral indicam percentuais de hélice muito maiores que os valores experimentais obtidos por dicroísmo circular (Tabela 10).

Um outro tipo de representação foi construído para se tentar observar a anfipaticidade dessas estruturas ao longo do tempo de simulação. Na Figura 54, foram sobrepostos 10 estados conformacionais diferentes de cada peptídeo, observados durante a simulação por dinâmica molecular. Foi montada uma visão do eixo longitudinal de N- para C-terminal visto de cima, somente com as cadeias laterais dos três resíduos de Lisina presentes em cada seqüência peptídica. Além disso, foram assinalados os ângulos formados pela região que os resíduos de Lisina ocupam em torno da hélice.

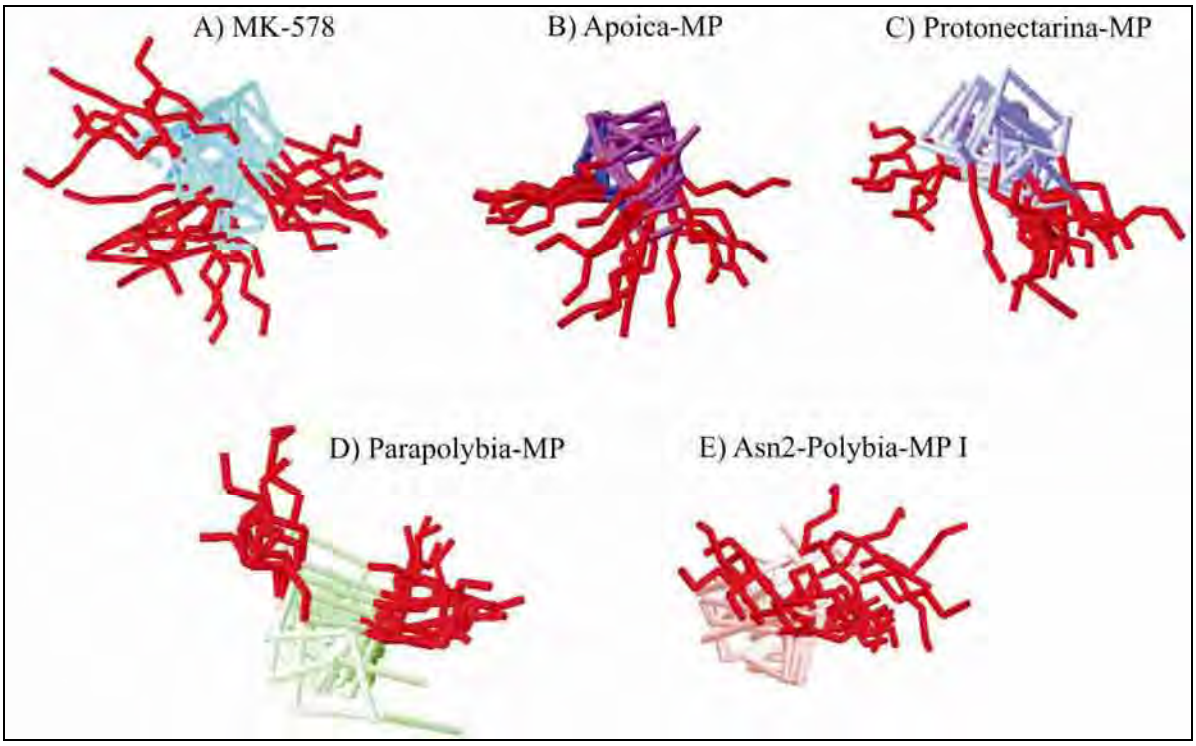

Figura 54: Visão do esqueleto carbônico (*backbone*) com as cadeias laterais dos resíduos de Lisina (em vermelho). As imagens mostram dez estados conformacionais de cada peptídeo numa representação do eixo longitudinal de N- para C-terminal. Os ângulos assinalados indicam as regiões hidrofílicas ao longo da hélice.

A partir deste esquema é possível observar uma divisão entre as regiões hidrofílicas e hidrofóbica da hélice, marcada através dos ângulos. É possível observar claramente a distribuição anfifílica das cadeias para os peptídeos Apoica-MP, Protonectarina-MP, Parapolybia-MP e Asn2-Polybia-MP I. A área ocupada pelas cadeias laterais das Lisinas fornece uma característica hidrofílica para uma face da molécula, enquanto que a outra face apresenta os resíduos hidrofóbicos (não mostrados no esquema da Figura 54). Da mesma forma, é possível observar essa formação anfipática na representação *helical wheel* (Figura 30).

O peptídeo Apoica-MP (Figura 54B) e Protonectarina-MP (Figura 54C) apresentam a face hidrofílica aparentemente sem interrupções. Por outro lado, é possível observar que as cadeias laterais das Lisinas do peptídeo Parapolybia-MP formam duas regiões distintas bem definidas. No peptídeo Asn2-Polybia-MP I (Figura 54E) observa-se também esta formação interrompida, porém com uma definição um pouco inferior à do Parapolybia-MP (Figura 54D).

Deve-se enfatizar que estas representações se referem aos estados conformacionais momentâneos na escala de tempo, sugerindo que o peptídeo Asn2-Polybia-MP I tenha uma conformação anfifílica clássica em determinados momentos e que, além disso, em outros momentos apresente uma conformação com a face hidrofílica maior que a face hidrofóbica.

O peptídeo MK-578 apresenta um quebra no padrão anfifílico, sendo possível observar numa visão dinâmica, que as cadeias laterais dos resíduos de Lisina ocupam quase que toda a volta da molécula, interrompendo desta forma a formação anfifílica. Além disso, na representação *helical wheel* não foi possível a observação de uma face hidrofílica e outra hidrofóbica.

A Figura 55 mostra uma representação em densidade superficial de cargas obtida para os modelos estáticos, onde os resíduos hidrofóbicos foram representados em branco, os

resíduos hidrofílicos em azul claro, os carregados positivamente em azul escuro e os carregados negativamente em vermelho.

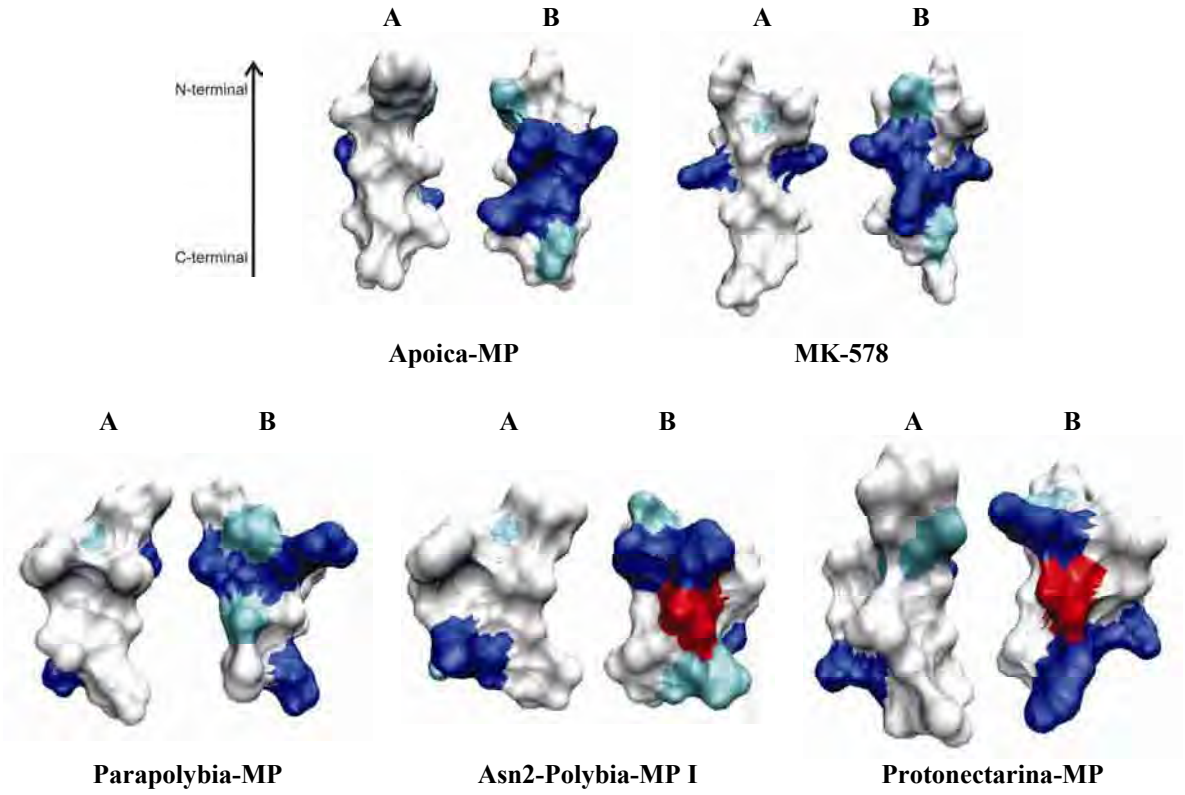

Figura 55: Representações das superfícies moleculares dos cinco peptídeos mostrando a distribuição superficial de cargas, com faces predominantemente hidrofóbicas (A) e predominantemente hidrofílicas (B). As regiões representadas em **azul escuro** mostram as superfícies carregadas positivamente, em **vermelho** as regiões carregadas negativamente, em **azul claro** os resíduos hidrofílicos e em **branco** resíduos hidrofóbicos.

Na figura 55 é possível observar a formação das faces predominantemente hidrofóbicas (A) e predominantemente hidrofílicas (B) para os peptídeos Apoica-MP e Parapolybia-MP. Os peptídeos Protonectarina-MP e Asn2-Polybia-MP I também apresentam a face hidrofóbica, com predominância de resíduos hidrofóbicos (em branco). Porém existe certa influência de uma carga positiva nessa face da molécula, proveniente da Lys11 (em azul escuro) em ambos os peptídeos, ainda assim, é possível distinguir uma grande região da molécula com características hidrofóbicas.

Nas representações das superfícies moleculares A e B do peptídeo MK-578 (Figura 55) com as respectivas distribuições superficiais de carga mostradas, nota-se a

presença das cargas positivas (representadas em azul escuro) em todas as faces, quebrando desta forma o caráter anfifílico da molécula. Provavelmente, as Lisinas nas posições 5, 8 e 9 sejam o limite mais central admissível para que se possa observar a formação da estrutura anfifílica, como ocorre no peptídeo Apoica-MP, pois o peptídeo MK-578 possui os resíduos de Lisina nas posições 5, 7 e 8 e, neste caso, é quebrada a formação das faces predominantemente hidrofílica e hidrofóbica bem definidas.

Quando se compara os modelos estáticos da figura 55 com os modelos dinâmicos representados na figura 54, observa-se que as superfícies hidrofóbicas são algumas vezes invadidas pelas cadeias laterais dos resíduos de Lisina, no caso dos peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Ans2-Polybia-MP I e MK-578, criando superfícies alternadas hidrofílica/hidrofóbica. Por outro lado, a superfície hidrofóbica é mantida contínua em relação à superfície hidrofílica para o peptídeo Apoica-MP, numa proporção de superfícies quase ideal (em torno de 180º para cada uma).

Atividades biológicas presentes em peptídeos, como degranulação de mastócitos, atividades enzimáticas como catálise de fosfolipase A2, ativação de proteínas G, que envolvem direta ou indiretamente a interação com membranas, tornam esses peptídeos alvos interessantes nos estudos de afinidade por membranas e nas investigações sobre o modo de ação desses componentes (Hellmann & Shwarz, 1998). Desta forma, tornam-se necessários estudos que contribuam para o entendimento desses processos. Neste trabalho foi proposta a realização de técnicas de Espectrometria de massas combinada com troca H/D, para tentar ter um melhor entendimento de como esses processos podem estar ocorrendo.

7.4. Estudos de troca H/D dos complexos proteolipossomos

Os ensaios de troca H/D foram baseados na metodologia inicialmente descrita para peptídeos longos, que podem atravessar membranas, por Demmers et al. (2000), sendo modificada para peptídeos policatiônicos e curtos. Através desta técnica é possível detectar um posicionamento preciso de peptídeos inseridos em membranas fosfolipídicas, combinando a troca Hidrogênio/Deutério e Espectrometria de Massas.

A troca H/D atualmente possui aplicações diversas, que incluem análises de cinética de mudanças conformacionais, RMN e Espectrometria de Massas. Através da Espectrometria de Massas Seqüenciais (*Tandem*) é possível a determinação exata de regiões das seqüências peptídicas, que se posicionam na face externa das membranas nos complexos proteolipossomos.

Primeiramente, foram realizados ensaios dos peptídeos em presença de óxido de deutério (D_2O) para a determinação da concentração de D_2O necessária para que ocorressem as trocas H/D, porém que permanecessem localizadas somente nas amidas das ligações peptídicas, após as destrocas rápidas, que ocorrem naturalmente nas posições mais acessíveis ao solvente do meio (geralmente nos grupos amina/amida dos resíduos N- e C-terminais e nas cadeias laterais). Sendo assim, foi otimizada a concentração de D_2O, para permitir um aumento de 13 u.m.a. na massa molecular de cada peptídeo, em ausência de vesículas.

Como exemplo, a figura 56 mostra o espectro de massas MS do peptídeo Apoica-MP em presença de vesículas de PC. Nesta análise foi possível detectar a presença de monômeros e dímeros de PC. No *insert* A, uma das setas indica o íon molecular do monômero, de m/z 760,4 ($[M+H]^+$) e o íon carga 2+ do Apoica-MP de m/z 792,0 ($[M+2H]^{2+}$); no *insert* B, aparecem os íons moleculares do dímero de PC (m/z 1520,4 ($[2M+H]^+$)) e do peptídeo (1583,0 ($[M+H]^+$)).

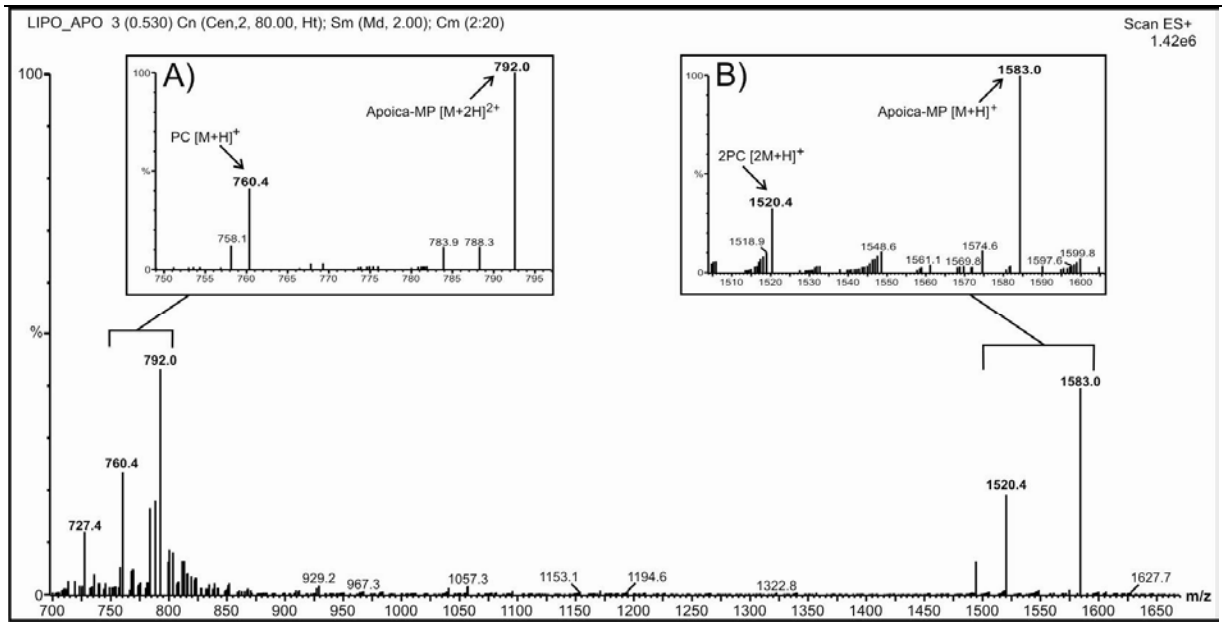

Figura 56: Espetro de massas ESI do peptídeo Apoica-MP no modo positivo, em presença de vesículas compostas de fosfatidilcolina (PC). Em A), as setas indicam o íon molecular da PC m/z 760,4 ($[M+H]^+$) e o íon de carga 2+ do peptídeo Apoica-MP de m/z 792,0 ($[M+2H]^{2+}$); e em B), as setas indicam o dímero de PC de m/z 1520,4 ($[2M+H]^+$) e o íon molecular do Apoica-MP de m/z 1583,0 ($[M+H]^+$).

Foram feitos os ensaios dos peptídeos em presença de vesículas de PC, com e sem meio deuterado. Como esses peptídeos possuem atividade hemolítica, foram todos ensaiados em uma concentração abaixo da concentração hemolítica, para que fosse possível a minimização dos efeitos líticos (que poderiam levar a uma troca H/D generalizada das ligações peptídicas), permanecendo assim, somente os efeitos de interação com as membranas.

Os espectros obtidos estão mostrados nas figuras 57 a 61. Em todos os espectros MS/MS obtidos, foi detectada a presença de íons do tipo "*b*", característico de fragmentação da ligação peptídica, sendo que em nenhum deles aparece o íon fragmento b_1.

O espectro de massas MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (Figura 57A) na forma de proteolipossomos, mostra uma boa fragmentação das ligações peptídicas, onde foi possível detectar 12 íons da série "*b*". O íon selecionado para a fragmentação foi o de m/z 1580,9, que corresponde ao íon molecular do peptídeo Protonectarina-MP, na forma monoprotonada $[M+H]^+$. Os íons fragmentos foram numerados de 2 a 13, conforme mostrado na figura 57A, onde foram assinalados os valore das perdas de um fragmento para o outro,

correspondentes aos valores de massa dos resíduos de aminoácidos. Os valores de m/z obtidos foram: 227,1 (b_2); 413,2 (b_3); 541,4 (b_4); 612,5 (b_5); 725,8 (b_6); 838,9 (b_7); 954,1 (b_8); 1025,3 (b_9); 1096,4 (b_{10}); 1224,7 (b_{11}); 1352,8 (b_{12}); 1451,9 (b_{13}). O íon b_1 não foi detectado, provavelmente por ser uma fragmentação não favorável ou muito pouco favorável, resultando na não formação do íon correspondente.

No espectro de massas deste mesmo peptídeo (Figura 57B) em presença de 40% de D_2O, foi selecionado para fragmentação o íon de m/z 1580,9, na forma $[M+H]^+$, o que representa um acréscimo de 7 unidades de massas em relação ao íon molecular não deuterado deste peptídeo, correspondendo à troca de 7 hidrogênios por deutérios. No espectro de massas, os resíduos que apresentaram acréscimo de uma unidade de massa, foram assinalados com asteríscos. Neste caso, também foi detectada toda a série de valores de m/z, correspondentes aos íons "*b*": 228,0 (b_2); 415,1 (b_3); 544,2 (b_4); 616,5 (b_5); 730,8 (b_6); 844,9 (b_7); 959,9 (b_8); 1031,1 (b_9); 1102,1 (b_{10}); 1231,3 (b_{11}); 1359,5 (b_{12}); 1458,6 (b_{13}). O primeiro íon marcado (b_2) possui m/z 228,0, sendo correspondente à somatória dos dois primeiros resíduos de aminoácido (Ile1 e Asn2) acrescido de 1 u.m.a., devido à protonação deste fragmento. Neste caso, como ocorre a perda do íon b_1, não é possível determinar a posição exata do deutério. A diferença de valores de m/z entre os íon b_2 e b_3 foi de 187,1, indicando que o resíduo de Triptofano sofreu o acréscimo de uma unidade de massa, quando comparado com os valores equivalentes do espectro do proteolipossomo em meio não deuterado. O mesmo ocorre para os resíduos de Lys4, Ala5, Leu6, Leu7 e Lys11, que também foram "marcados" pelo deutério, sugerindo que estes resíduos encontram-se ou tangencialmente posicionados à face externa da membrana do lipossomo, ou totalmente expostos para fora da mesma, conforme esquematizado na figura 62. Os outros resíduos Asp8, Ala9, Ala10, Lys12, Val13 e Leu14, não foram "marcados" pelo deutério, portanto, provavelmente estão interagindo de alguma maneira com uma região mais interna da membrana, não permitindo assim a "marcação" dos mesmos pelo deutério. Isso pode ocorrer mesmo que tal interação

aconteça com o resíduo em questão ligeiramente mergulhado no meio hidrofóbico, logo abaixo das cabeças polares dos fosfolipídios.

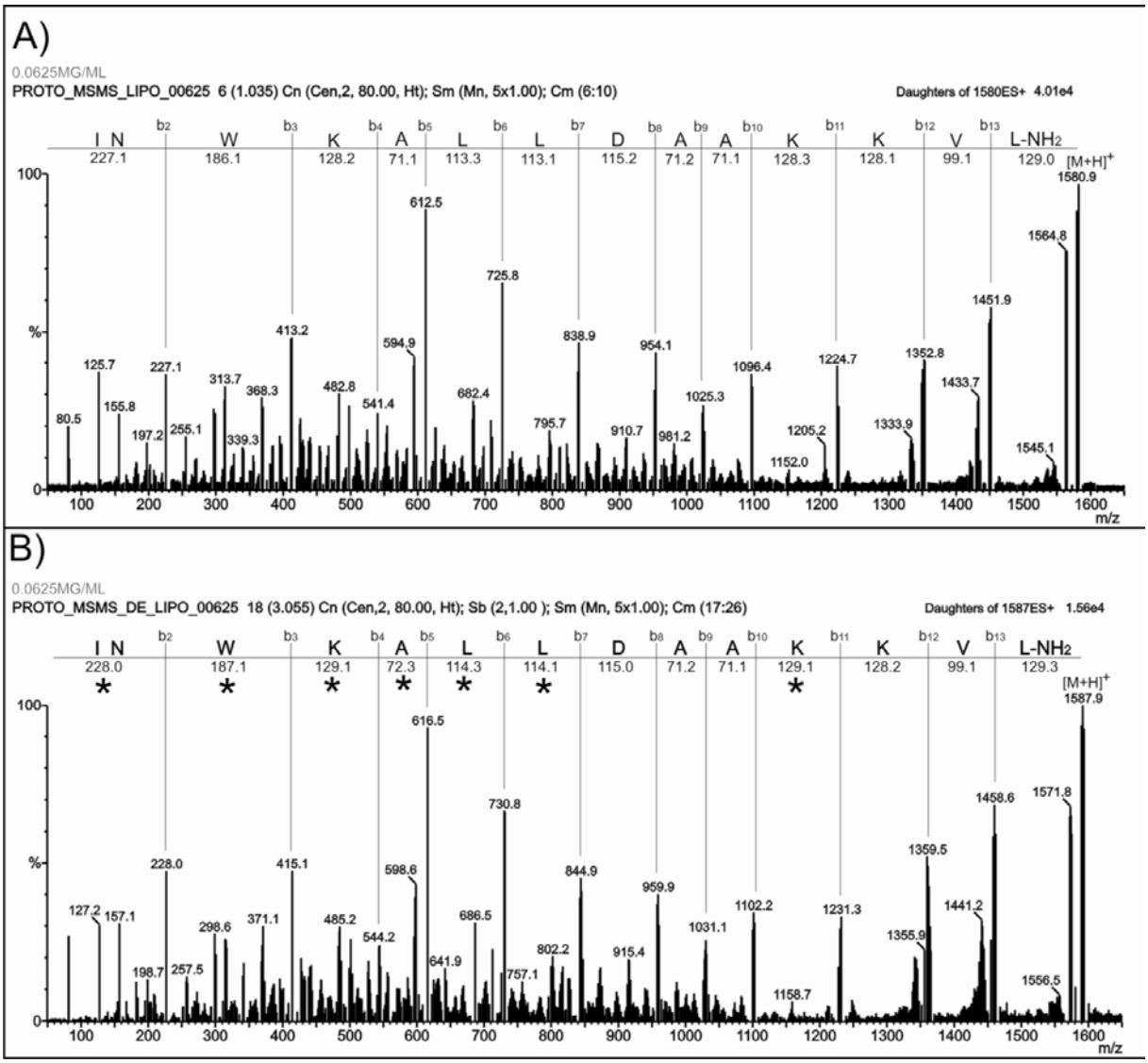

Figura 57: A) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP em presença de vesículas de PC; **B)** Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP em presença de vesículas de PC e 40% (v/v) de D_2O.

O espectro de massas do peptídeo Parapolybia-MP na forma de proteolipossomos foi obtido através da fragmentação do íon de m/z 1616,3, na forma $[M+H]^+$ (Figura 58A), o qual resultou na formação dos íons fragmentos de m/z: 226,9 (b_2); 412,9 (b_3); 540,9 (b_4); 669,1 (b_5); 800,2 (b_6); 871,2 (b_7); 942,3 (b_8); 1043,5 (b_9); 1114,5 (b_{10}); 1227,7 (b_{11}); 1356,0 (b_{12}); 1487,2 (b_{13}). Para a obtenção do espectro de massas com as marcações de deutério, preparou-se a suspensão de proteolipossomo em presença de 40% (v/v) de D_2O. O íon

selecionado para fragmentação foi o de m/z 1625,3, na forma $[M+H]^+$, que sofreu um acréscimo de 9 u.m.a. em relação à amostra não deuterada (Figura 58B). As diferenças entre os picos onde foram observados acréscimos de 1 u.m.a. em relação ao valores de m/z dos íons fragmentos dos resíduos de aminoácido dos proteolipossomos não deuterados, foram assinadas com asteríscos, indicando sítios de deuteração. Os íons fragmentos obtidos foram os de m/z: 228,3 (b_2); 415,3 (b_3); 544,4 (b_4); 673,4 (b_5); 804,7 (b_6); 876,9 (b_7); 949,0 (b_8); 1051,2 (b_9); 1122,2 (b_{10}); 1236,1 (b_{11}); 1365,0 (b_{12}); 1496,1 (b_{13}), conforme assinalados no espectro mostrado na figura 58B.

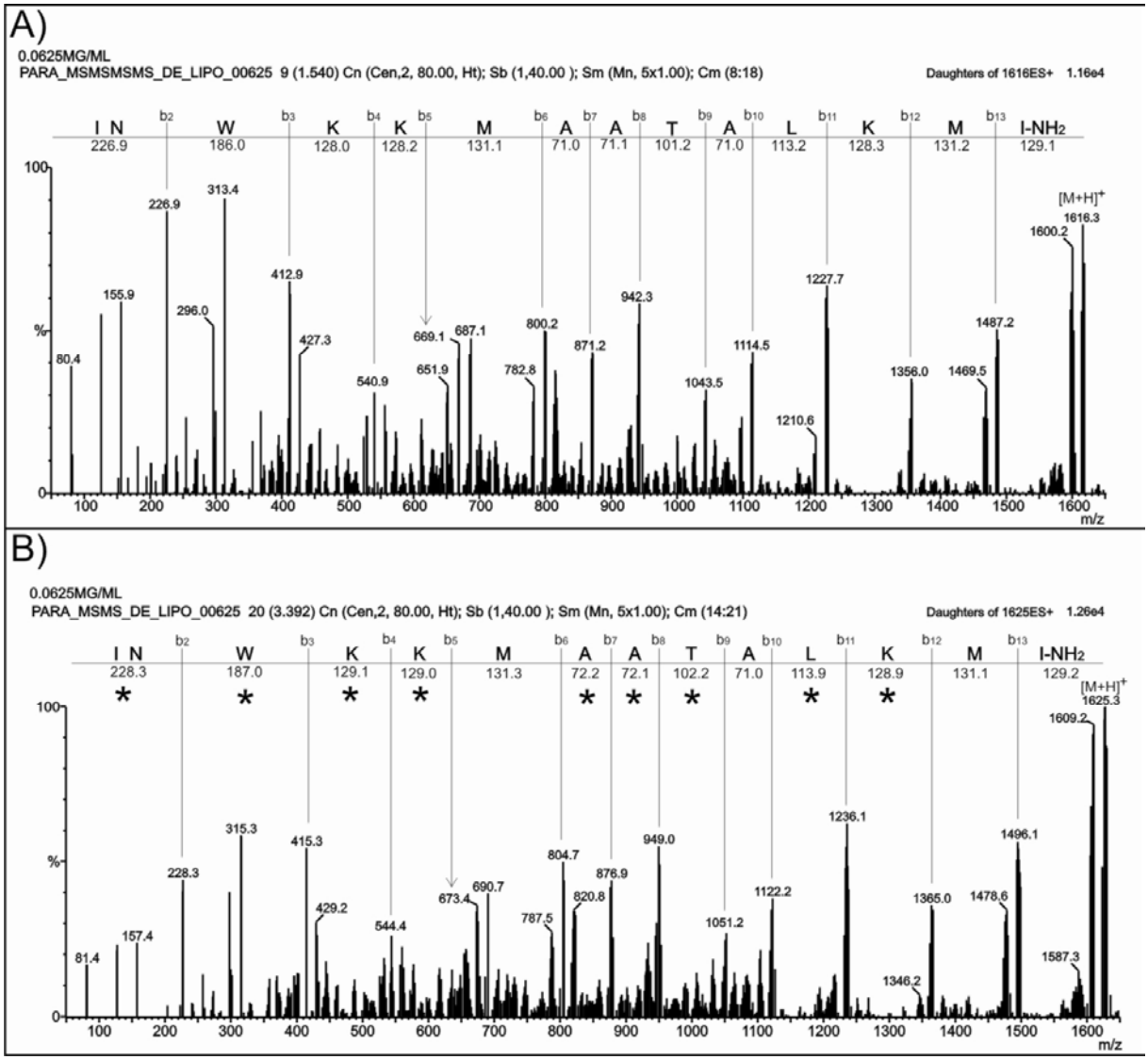

Figura 58: A) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Parapolybia-MP em presença de vesículas de PC; **B)** Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Parapolybia-MP em presença de vesículas de PC e 40% (v/v) de D_2O.

Para obtenção do espectro de massas MS/MS do peptídeo Apoica-MP foi selecionado o íon de m/z 1582,8, na forma $[M+H]^+$ (Figura 59A). Neste caso também foram detectados íons da série "*b*", com exceção somente do íon b_1. Os íons fragmentos obtidos foram: 227,1 (b_2); 413,3 (b_3); 526,5 (b_4); 654,5 (b_5); 767,6 (b_6); 838,6 (b_7); 966,9 (b_8); 1095,1 (b_9); 1194,3 (b_{10}); 1265,5 (b_{11}); 1322,5 (b_{12}); 1453,7 (b_{13}). A deuteração do complexo proteolipossomo do peptídeo Apoica-MP, revelou um acréscimo de 7 u.m.a., o que corresponde à introdução de 7 deutérios na seqüência deste peptídeo. O íon selecionado para fragmentação foi o de m/z 1589,9, na forma $[M+H]^+$, cujos íons fragmentos gerados foram aqueles de m/z: 229,1 (b_2); 416,6 (b_3); 530,7 (b_4); 659,8 (b_5); 772,9 (b_6); 844,3 (b_7); 973,3 (b_8); 1102,3 (b_9); 1201,3 (b_{10}); 1272,5 (b_{11}); 1329,6 (b_{12}); 1460,8 (b_{13}) (Figura 59B). Foi observado acréscimo de 1 unidade de massa nos resíduos Ile1, Asn2, Trp3, Leu4, Lys5, Lys8 e Lys9, sendo estes resíduos assinalados com asteríscos. Os outros resíduos da seqüência, não mostraram acréscimos em suas massas, mostrando que não sofreram "marcação" pelo deutério.

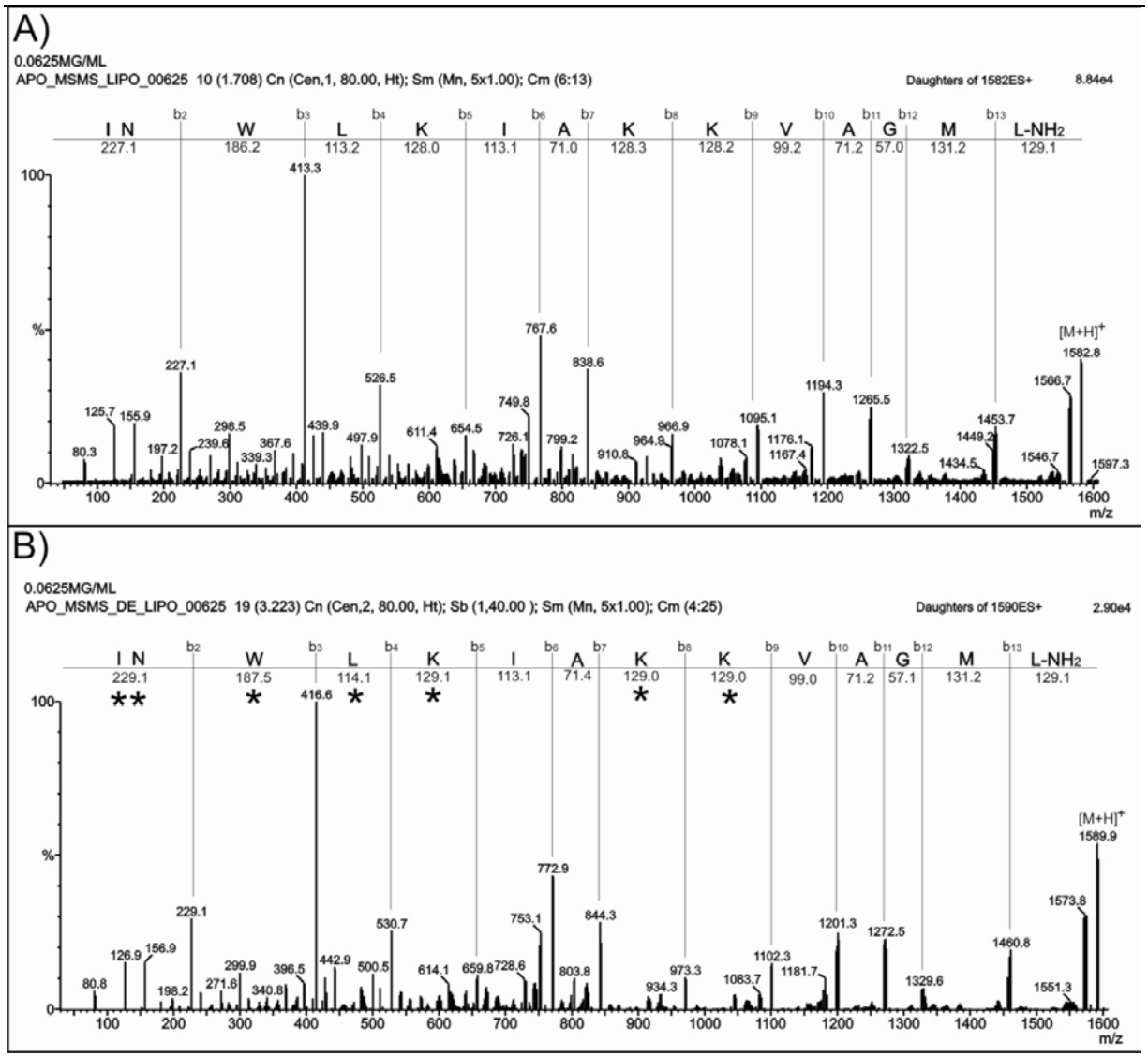

Figura 59: A) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Apoica-MP em presença de vesículas de PC; **B)** Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Apoica-MP em presença de vesículas de PC e 40% (v/v) de D_2O.

As figuras 60A e 60B mostram os espectros de massas dos complexos proteolipossomos do peptídeo Asn2-Polybia-MP I, em ausência e presença de meio deuterado, respectivamente. No primeiro espectro, foi selecionado o íon molecular de m/z 1652,5, na forma $[M+H]^+$, e sua fragmentação gerou íons da série "*b*", com os seguintes valores de m/z: 227,5 (b_2); 413,8 (b_3); 541,9 (b_4); 670,1 (b_5); 783,3 (b_6); 896,4 (b_7); 1011,5 (b_8); 1082,5 (b_9); 1153,5 (b_{10}); 1281,7 (b_{11}); 1409,9 (b_{12}); 1523,0 (b_{13}) (Figura 59A). Após a deuteração foi selecionado o íon de m/z 1661,6, na forma $[M+H]^+$, que gerou os seguintes íons fragmentos de m/z: 229,3 (b_2); 416,4 (b_3); 545,7 (b_4); 673,9 (b_5); 788,2 (b_6); 902,3 (b_7); 1017,4 (b_8); 1089,5 (b_9); 1161,7 (b_{10}); 1290,8 (b_{11}); 1419,1 (b_{12}); 1532,4 (b_{13}). Os resíduos

que apresentaram um acréscimo de 1 u.m.a. em suas massas foram Ile1, Asn2, Trp3, Lys4, Leu6, Leu7, Ala9, Ala10 e Lys11, os quais foram assinalados com asteríscos (Figura 60B).

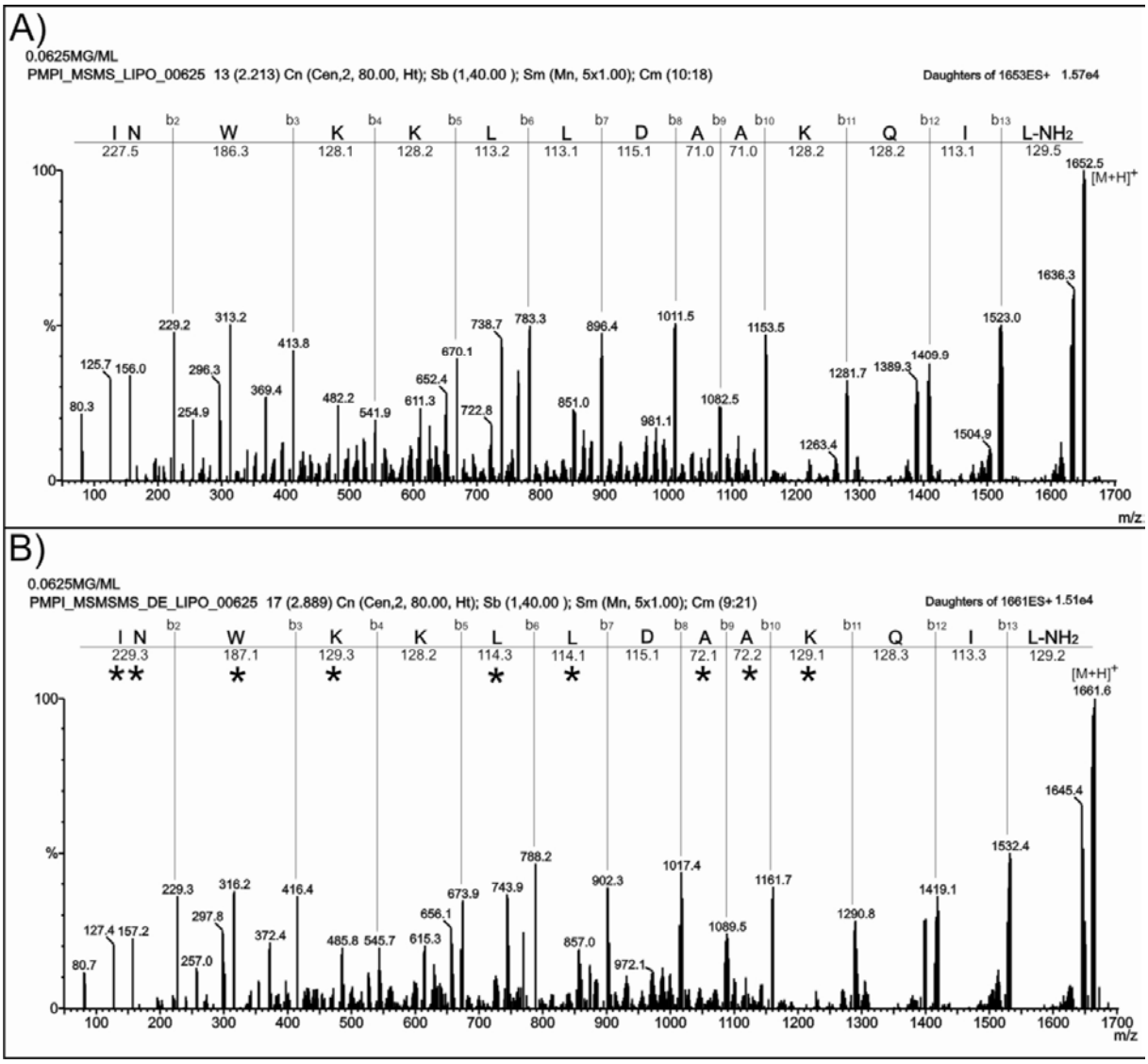

Figura 60: A) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo Asn2-Polybia-MP I em presença de vesículas de PC; **B)** Espectro de Massas MS/MS do Asn2-Polybia-MP I em presença de vesículas de PC e 40% (v/v) de D_2O.

O espectro de massas do peptídeo MK-578 sem deuteração, foi obtido através da fragmentação do íon molecular de m/z 1582,6, na forma $[M+H]^+$, cujos íons fragmentos obtidos foram os de m/z: 227,3 (b_2); 413,4 (b_3); 526,5 (b_4); 654,7 (b_5); 725,7 (b_6); 853,7 (b_7); 981,8 (b_8); 1080,9 (b_9); 1152,0 (b_{10}); 1209,1 (b_{11}); 1340,3 (b_{12}); 1453,4 (b_{13}) (Figura 61A). Em presença de meio deuterado foi observado acréscimo de 1 unidade de massa nos resíduos Ile1, Ans2, Leu4, Lys5, Ala6, Lys8, Val9, e Ile13, sendo selecionado para fragmentação o íon molecular de m/z 1591,6, na forma $[M+H]^+$. Os íons fragmentos gerados foram os de m/z:

229,0 (b_2); 415,3 (b_3); 529,3 (b_4); 658,6 (b_5); 730,6 (b_6); 858,8 (b_7); 988,1 (b_8); 1088,2 (b_9); 1159,5 (b_{10}); 1216,7 (b_{11}); 1348,1 (b_{12}); 1462,4 (b_{13}) (Figura 61B).

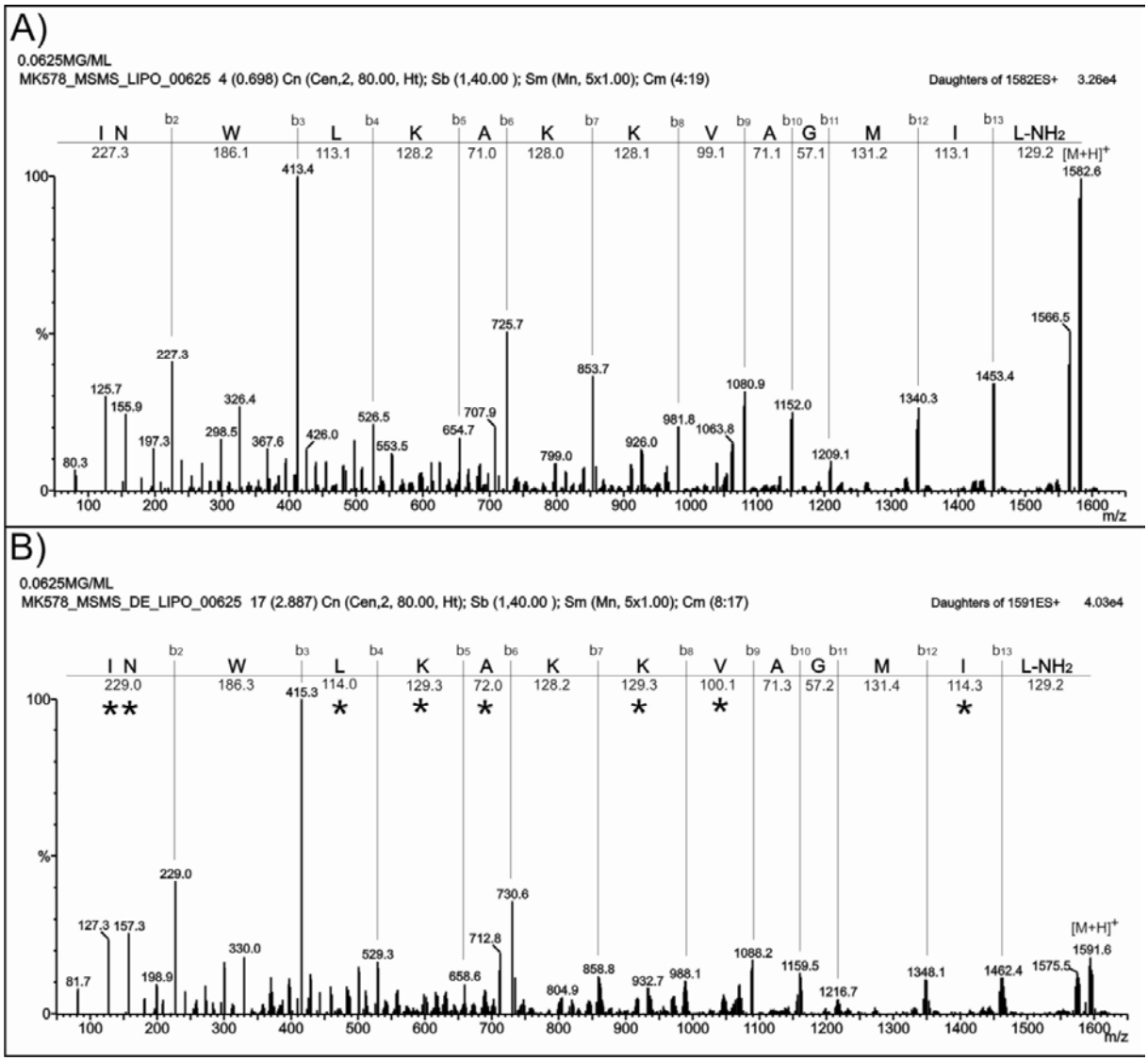

Figura 61: A) Espectro de Massas MS/MS do peptídeo MK-578 em presença de vesículas de fosfatidilcolina; **B)** Espectro de Massas MS/MS do peptídeo MK-578 em presença de vesículas de fosfatidilcolina e 40 % (v/v) de D_2O.

Para uma melhor visualização dos resultados obtidos, à partir dos ensaios de troca H/D sofrida pelos peptídeos após deuteração dos complexos proteolipossomos, foi montado um esquema ilustrativo (Figura 62), mostrando de forma esquemática quais regiões de cada seqüência primária estariam interagindo com o interior da membrana do fosfolipídio (impedidas de serem deuteradas), e quais regiões estariam mais para fora da membrana

(acessíveis ao solvente), resultando na deuteração dos resíduos que compões esta região das moléculas de peptídeo.

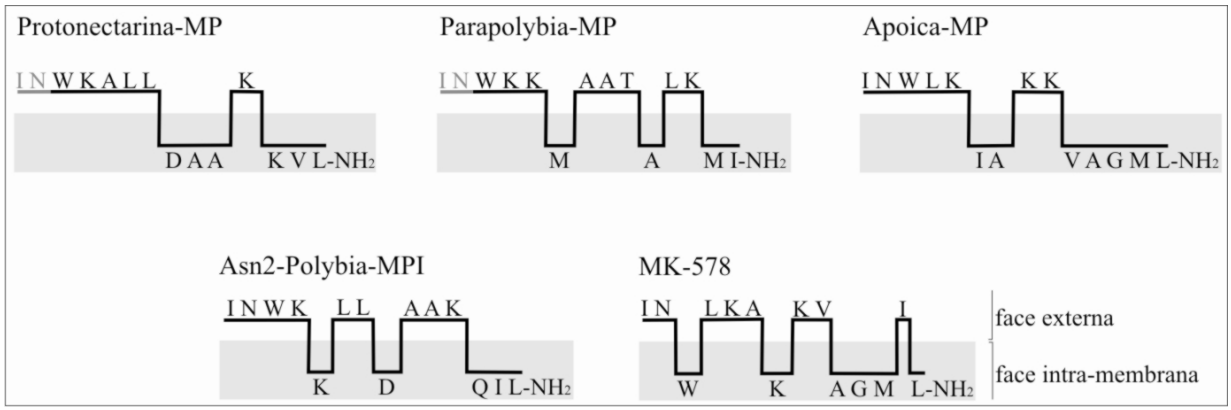

Figura 62: Esquema de ancoragem em membrana fosfolipídica dos peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578, construídos á partir dos dados de troca H/D e Espectrometria de Ma0ssas Seqüencial. A região em cinza corresponde à membrana das vesículas de PC.

Nesta representação, os resíduos posicionados acima da região cinza, representam os resíduos que sofreram deuteração estando, portanto, no lado externo da vesícula de lipossomo. Por outro lado, os resíduos posicionados abaixo desta região representam aqueles que não sofreram deuteração. É importante ressaltar que esta região cinza representa apenas um limite de interação, não indicando que as porções abaixo da mesma estejam inseridas na luz do lipossomo.

No caso dos peptídeos Protonectarina-MP e Parapolybia-MP, o íon b_2, que representa a perda do segmento N-terminal IN, cuja somatória das massas é igual a 227,12 Da, sofre o acréscimo de apenas 1 u.m.a. quando deuterados. Neste caso, como não existe a presença do íon b_1, não é possível determinar a posição exata do deutério, que nestes dois casos pode estar tanto no resíduo Ile1, quanto no Asn2. Em conseqüência, os dois resíduos do N-terminal desses dois peptídeos foram representados em cinza, pois não foi possível fazer esta determinação. Nos demais casos, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578, ocorre o acréscimo de 2 u.m.a., sendo então atribuído, 1 deutério para cada resíduo correspondente ao íon b_2 (Ile1+Asn2). Nestes três últimos casos, os resíduos foram representados em preto, estando todos para o lado externo da membrana da vesícula.

Observa-se que nos cinco casos a porção C-terminal é amidada ($-NH_2$). É possível observar que esta região se insere na membrana, sendo este, talvez o primeiro evento que ocorre na interação destas moléculas com membranas biológicas. Porém, a região C-terminal do peptídeo MK-578, sofre uma interrupção na internalização na região C-terminal, onde o resíduo Ile13 permanece no lado externo da membrana.

Se fizermos uma comparação desses dados com os resultados mostrados na figura 52, observa-se que existe uma convergência entre os peptídeos Parapolybia-MP e Asn2-Polybia-MP I. Esses dois peptídeos apresentam o dobramento mais acentuado da cadeia principal, com o resíduo de Triptofano aproximando-se da região central da molécula (como mostrado na figura 52). Além disso, esses dois peptídeos "enterram" duas regiões centrais nas membranas das vesículas, como pode ser observado na figura 62. Sendo assim, esse maior dobramento deve ser o responsável por esse fato, promovendo o interpolamento da molécula no interior e exterior da membrana. Outro aspecto é que esses dois peptídeos apresentam a região hidrofílica varrida pelas cadeias das Lisinas interrompida, como foi mostrado na figura 54. Talvez essa interrupção permita que ocorra essa inserção na membrana como mostrada no esquema de ancoragem (Figura 62) para esses dois peptídeos.

Muitos trabalhos têm sido escritos mostrando que os mastoparanos possuem a capacidade de interagir com receptores do complexo de proteínas G transmembrânicas, presentes nas células de mamíferos. Segundo Jones & Howl (2004), para acessar algumas proteínas G e outros alvos intracelulares, os mastoparanos devem ter a capacidade de translocar através da membrana celular. Além disso, evidências biofísicas indicam que o caráter anfipático dos mastoparanos é o principal determinante de suas atividades. Em solução aquosa, a estrutura dos mastoparanos é desordenada, porém adotam uma conformação em hélice-α em presença de membranas lipídicas ou na interação com as subunidades protéicas G_i/G_o (Sukumar & Higashijima, 1992). Mais recentemente, duas orientações conformacionais distintas em membranas lipídicas de peptídeos da classe dos mastoparanos foram observadas,

onde 90% das moléculas apresentaram-se distribuídas tangencialmente à membrana e os outros 10% inseridos na parte transmembrânica (Hori et al., 2001).

A estrutura anfipática dos peptídeos é conhecida como sendo um importante fator para a adsorção, inserção e translocamento dessas moléculas às membranas lipídicas (Matsuzaki, 1999). Além disso, muitos outros peptídeos funcionais formam estruturas em hélice em ambientes de membrana, os quais podem se alinhar tanto paralelamente, quanto perpendicularmente à superfície da membrana (Blondelle et al., 1999). Alguns mastoparanos parecem ser capazes de ultrapassar rapidamente através das membranas celulares e interagir com proteínas citoplasmáticas (Hori et al., 2001). Tem sido investigado também, que o potencial negativo da face interna da membrana das células deva ser a principal força responsável por esta translocação de peptídeos catiônicos (Matsuzaki et al., 1995c; Matsuzaki, 1998). Além disso, tem sido mostrado que em modelos de membranas sintéticas, os mastoparanos também são capazes de permeabilizar membranas e formar canais iônicos (Katsu et al., 1990). Por exemplo, um movimento transmembrânico de íons e lipídeos foi induzido por peptídeos análogos ao Mastoparano-X em vesículas constituídas por lipídeos negativamente carregados e zwitteriônicas (Matsuzaki, 1996). A localização dos peptídeos nas bicamadas lipídicas tem sido investigada por alguns pesquisadores através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de complexos proteolipossomos, entretanto, não existem ainda informações detalhadas sobre a flexibilidade conformacional, orientação da hélice e aspectos dinâmicos da penetração desses peptídeos nas membranas (Hori et al., 2001).

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de troca H/D, é possível inferir que provavelmente os mastoparanos interajam com os fosfolipídios das vesículas, preferencialmente através da região C-terminal. Alguns trabalhos já publicados mostraram que a região C-terminal é essencial na atividade biológica destes peptídeos. Sforça e col. (2004) mostraram que o mastoparano EMP-AF perde intensamente sua atividade biológica quando é removida a amida do lado C-terminal. Além disso, dados de dinâmica molecular

mostraram que essa região da molécula torna-se altamente instável quando a amida está ausente. Todos esses resultados corroboram para um indício de que essa amidação do C-terminal seja realmente fundamental para a atividade desses peptídeos, sendo que provavelmente, seja ela a responsável pelo primeiro contanto com as membranas biológicas. Além disso, é possível que abaixo de uma concentração lítica, ocorra ainda a internalização desses peptídeos nas células, sendo que a organização estrutural da membrana volta a se restabelecer. O modelo descrito por Matsuzaki (1998) mostra a formação de um poro toroidal transiente, através de uma interação de peptídeos anfipáticos com a membrana, a formação do poro e a re-estruturação da membrana, sendo que neste evento algumas moléculas de peptídeo permanecem na face externa da membrana e outras acabam internalizando a célula (Figura 3).

Para um melhor entendimento dos eventos de interação com membranas e ativação de receptores transmembrânicos, é necessária a realização de testes de atividades biológicas que indiquem um caminho no entendimento do modo de ação desses peptídeos. Neste trabalho foram realizados ensaios de atividade de biológica onde foram testados hemólise, degranulação de mastócitos e antibiose, que combinados podem fornecer pistas do modo de ação destes peptídeos em questão.

7.5. Ensaios de atividades biológicas

Foram realizados os testes de atividade biológica para os cinco mastoparanos. As atividades investigadas foram degranulação de mastócitos, hemólise e antibiose. Os peptídeos foram testados em várias concentrações diferentes, variando de 10^{-8} M a 10^{-4} M.

O primeiro teste realizado foi o de atividade hemolítica. Para este ensaio, foi utilizado como padrão de hemólise o peptídeo Melitina (Katsu et al., 1988). Um dos peptídeos mais estudados a respeito de interações peptídeo-membrana é a Melitina, sendo este um dos

componentes mais abundantes do veneno da abelha *Apis mellifera*. Este peptídeo foi descrito como sendo hemolítico, constituído por 26 resíduos de aminoácidos e com estrutura anfipática (Pérez-Payá et al., 1997). Além disso, foi observado que o mesmo é capaz de assumir várias conformações e estados de agregação diferentes, em soluções aquosas de diferentes composições (Pérez-Payá et al., 1995).

Os resultados dos ensaios de hemólise foram expressos em porcentagem, sendo estes valores obtidos através da comparação com um controle de 100% feito pela incubação dos eritrócitos em solução de Triton X-100 (1%, v/v). A Figura 63 mostra as curvas de atividade hemolítica em função da concentração para os cinco peptídeos sintéticos e para o padrão de hemólise utilizado.

O peptídeo Protonectarina-MP e o Asn2-Polybia-MP I provocaram, respectivamente, hemólise em 61,3% e 74,4% dos eritrócitos na concentração de $3,9x10^{-5}$ M, além disso, causam 100% de hemólise à partir de $7,9x10^{-5}$M. O peptídeo Parapolybia-MP apresentou uma atividade mais baixa, sendo que na concentração de $3,9x10^{-5}$ M causa hemólise em aproximadamente 46% das células e só atinge 100% de hemólise à partir de $1,5x10^{-4}$M. O peptídeo Apoica-MP provoca cerca de 50% de hemólise na concentração de $9,4x10^{-6}$M e 100% à partir de $1,9x10^{-5}$M. Já o MK-578 apresentou atividade hemolítica extremamente baixa, sendo que na concentração mais elevada ($3,1x10^{-4}$M), causa apenas 30% de hemólise.

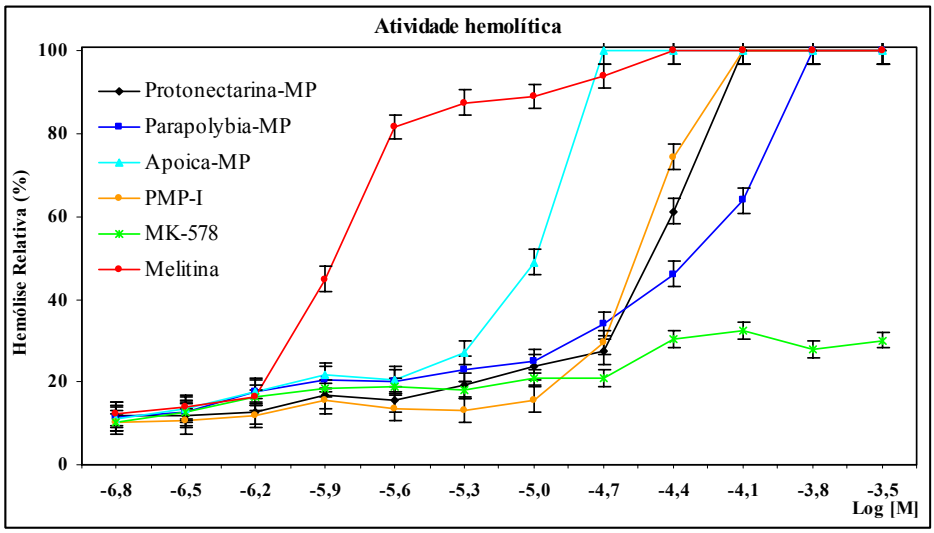

Figura 63: Atividade hemolítica dos peptídeos Protonectarina-MP (preto), Parapolybia-MP (azul escuro), Apoica-MP (azul claro), Asn2-Polybia-MP I (laranja), MK-578 (verde) e Melitina (vermelho) em doze concentrações diferentes, variando de $9{,}4x10^{-8}$ M a $3{,}1x10^{-4}$ M. O teste foi realizado utilizando-se eritrócitos de ratos *Wistar*.

Os testes de atividade hemolítica mostraram que o peptídeo com atividade mais intensa dentre os cinco foi o Apoica-MP, seguido dos peptídeos Asn2-Polybia-MP I, Protonectarina-MP e Parapolybia-MP. O peptídeo MK-578 apresenta a menor atividade hemolítica dentre todos os peptídeos ensaiados, podendo ser considerado um peptídeo não hemolítico. O peptídeo padrão Melitina, considerado altamente hemolítico (Katsu et al., 1988), atingiu 50% de hemólise na concentração de $9x10^{-7}$ M. Desta forma, quando se compara os valores de hemólise dos mastoparanos testados com o da Melitina, conclui-se que eles possuem atividade hemolítica de baixa a moderada.

O ensaio de degranulação de mastócitos foi realizado utilizando-se mastócitos peritoniais de ratos *Wistar*. As amostras foram ensaiadas em diferentes concentrações, variando de $1{,}9x10^{-7}$M a $3{,}1x10^{-4}$M. Os resultados foram expressos em porcentagem de degranulação. O padrão utilizado para este ensaio foi o peptídeo HR-II, um peptídeo com 14 resíduos de aminoácidos, da classe dos mastoparanos, isolado do veneno da vespa *Vespa orientalis*, que causa degranulação de mastócitos e, consequentemente, inicia a liberação de histamina (Tuichibaev et al., 1988).

A Figura 64 representa a atividade de degranulação de mastócitos peritoniais em função das concentrações de cada um dos peptídeos. Os resultados obtidos mostraram que dentre todos os peptídeos ensaiados, os peptídeos Apoica-MP e Asn2-Polybia-MP I, apresentam atividade de degranulação mais intensa, atingindo 26,4% e 23,4%, respectivamente, na concentração de $7{,}91 \times 10^{-5}$M. Nesta mesma concentração, os outros peptídeos apresentaram atividade degranuladora inferior a 12%, inclusive o peptídeo padrão HR-II. O mastoparano MK-578 apresentou valores inferiores a 3,6% inclusive na concentração mais alta de $3{,}16 \times 10^{-4}$M.

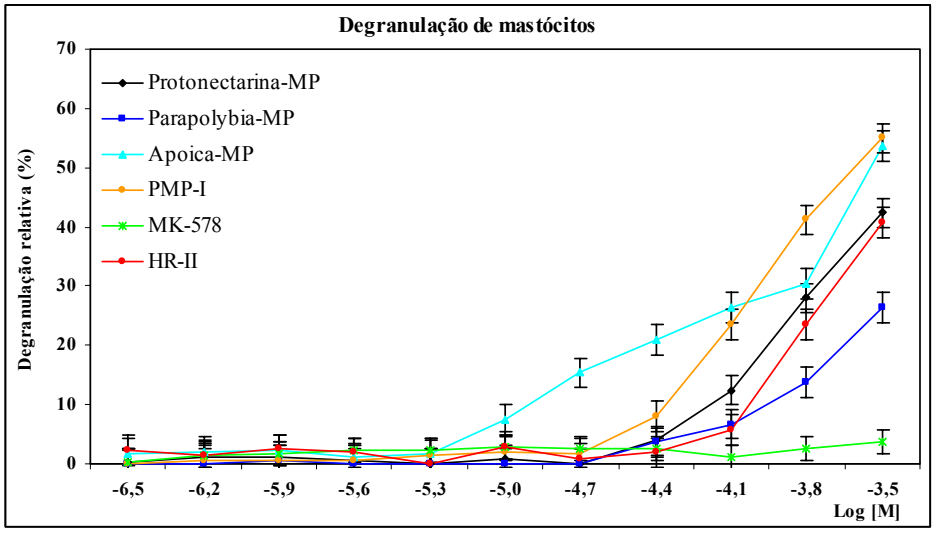

Figura 64: Atividade degranuladora de mastócitos peritoniais de ratos *Wistar* dos peptídeos Protonectarina-MP (preto), Parapolybia-MP (azul escuro), Apoica-MP (azul claro), Asn2-Polybia-MP I (laranja), MK-578 (verde) e HR-II (vermelho) em doze concentrações diferentes, variando de $9{,}4 \times 10^{-8}$ M a $3{,}1 \times 10^{-4}$ M.

Neste ensaio também foi observada atividade mais elevada para o peptídeo Apoica-MP, seguido dos peptídeos Asn2-Polybia-MP I, Protonectarina-MP, Parapolybia-MP e MK-578. Um fato interessante que ocorreu, é que os peptídeos Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e Protonectarina-MP apresentaram atividade mais intensa que o padrão durante toda a curva de degranulação. Por outro lado, o peptídeo Parapolybia-MP apresentou valores um pouco abaixo do padrão, atingindo 26,33% de degranulação na concentração mais alta testada. Além disso, o peptídeo MK-578 mostrou valores muito baixos, sendo considerado não

degranulador de mastócitos. É possível concluir que estes peptídeos, exceto o MK-578, possuem atividade degranuladora de mastócitos relativamente elevada.

A tabela 12 mostra os resultados obtidos nos ensaios de atividade antibiótica realizado para os cinco peptídeos sintéticos, em comparação a outros peptídeos de venenos de vespas, descritos em literatura, sendo os resultados expressos em μg/mL.

Tabela 12: Valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em μg/μL, para os cinco peptídeos e para o padrão do experimento (Tetraciclina), frente à bactérias Gram+ e Gram-.

	Valores de MIC (μg/mL)			
	Gram -		**Gram +**	
PEPTÍDEOS	***E. coli***	***P. aeruginosa***	***S. aureus***	***B. subtilis***
Protonectarina-MP	15,60	93,75	3,90	3,90
Parapolybia-MP	3,90	15,60	2,92	7,81
Apoica-MP	3,90	5,85	1,95	2,92
Asn2-Polybia-MP I	5,80	46,80	7,81	4,88
MK-578	23,41	125,00	42,87	11,70
Tetraciclina	**15,60**	**93,75**	**2,43**	**15,60**
Anoplin[1]	50,00	20,00	5,00	20,00
Crabrolina[2]	150,00	-	-	75,00
EMP-AF[3]	50,00	20,00	5,00	-
Mastoparano-M[4]	12,50	12,50	6,25	-

[1]Konno et al. (2001); [2]Krishnakumari & Nagaraj (1997); [3]Konno et al. (2000); [4]Li et al. (2000).

Os valores de MIC observados para os cinco peptídeos indicam que, com exceção do peptídeo MK-578, todos apresentam uma atividade antibiótica relativamente alta, tanto para bactérias Gram+, quanto para bactérias Gram-. O peptídeo Protonectarina-MP apresentou valor de MIC inferior ao padrão (Tetraciclina) somente contra *B. subtilis*, enquanto que para os outros microrganismos, os valores foram iguais ou superiores. Já os peptídeos Parapolybia-MP e Asn2-Polybia-MP I, apresentaram-se mais potentes que a droga padrão para as bactérias Gram- e para o *B. subtilis*. O peptídeo Apoica-MP foi o único que apresentou valores de MIC inferiores ao padrão Tetraciclina em todos os casos, sendo portanto mais potente.

Ao fazer-se uma comparação entre os peptídeos citados da literatura e os aqui testados, observa-se que de maneira geral, os peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP,

Asn2-Polybia-MP I e principalmente o Apoica-MP podem ser considerados promissores modelos estruturais para o desenvolvimento de antibióticos, pois apresentam valores de MIC inferiores à maioria daqueles observados para seus equivalentes da literatura.

A partir dos resultados dos ensaios de atividade biológica obtidos, nota-se que o peptídeo Apoica-MP é mais ativo dentre os cinco mastoparanos testados neste estudo. Existem atualmente inúmeros trabalhos relatando a correlação entre a estrutura em hélice, a anfifilicidade e a presença de cargas positivas com a atividade biológica de peptídeos naturais. O peptídeo Apoica-MP possui grande tendência em formar estrutura em hélice e também uma anfifilicidade bem definida como pôde ser observado nos estudos de estrutura secundária apresentados anteriormente. Provavelmente, essa atividade biológica mais intensa seja decorrente desse conjunto de características estereoquímicas apresentadas pelo Apoica-MP. Por outro lado, apesar do peptídeo MK-578 também apresentar uma hélice contínua, assim como o Apoica-MP, uma menor porcentagem de sua estrutura encontra-se na forma de hélice quando comparado com o mesmo. Além disso, ocorre uma quebra no caráter anfifílico desta molécula devido ao posicionamento dos resíduos de Lisina mais centralmente à cadeia peptídica. Essa quebra na anfifilicidade provavelmente seja a grande responsável pela ausência de atividade biológica encontrada para o peptídeo MK-578.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram realizados experimentos para analisar as características estruturais dos mastoparanos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP, Apoica-MP, Asn2-Polybia-MP I e MK-578. As técnicas utilizadas envolveram análises de dicroísmo circular em diferentes meios, espectrometria de massas, modelagem molecular e dinâmica molecular.

As análises de dicroísmo circular mostraram que esses peptídeos possuem seqüências de aminoácidos que favorecem a formação de estruturas em hélice-α, quando colocados em meios anisotrópicos que mimetizam membranas celulares, como soluções contendo SDS e vesículas sintéticas (PC e PC/PG-7030). Em presença de vesículas zwitteriônicas (PC), os peptídeos apresentaram valores de porcentagem de formação de hélice-α relativamente baixos, quando comparados com os valores de porcentagem obtidos para os peptídeos em meio contendo TFE e SDS. Por outro lado, em presença de vesículas aniônicas (PC/PG-7030) quatro dentre os cinco peptídeos apresentaram uma porcentagem de hélice-α mais elevada, em comparação à situação em que estes peptídeos foram incubados em presença de vesículas neutras.

Segundo Fujita et al. (1994), peptídeos policatiônicos e curtos com conformação helicoidal, como mastoparanos, provavelmente interagem de forma paralela à superfície de membranas compostas por PC, podendo formar agregados. Dados obtidos por Matsuzaki et al (1996) em estudos de fluorescência, corroboram essa hipótese. Desta forma, os estados conformacionais menos organizados encontrados para os peptídeos em presença desse tipo de membrana, levam à conclusão de que provavelmente, esses peptídeos também interajam paralelamente à membrana de PC, não chegando a internalizarem completamente na região hidrofóbica da bicamada lipídica, o que provavelmente, induziria um maior teor de hélice-α nessas moléculas.

A presença de fosfolipídios ácidos, como fosfatidilglicerol (PG), aumenta a interação eletrostática de peptídeos positivamente carregados com as membranas fosfolipídicas, além disso, parece permitir uma penetração mais profunda do peptídeo (de Kroon et al., 1991). O relato da maior estruturação desses peptídeos em presença de vesículas PC/PG-7030 talvez seja um indicativo da existência de uma atividade seletiva, favorecida por interações eletrostáticas entre as cargas positivas do peptídeo e negativas da membrana. Sabe-se que a membrana celular de mamíferos possui carga líquida neutra, enquanto que a membrana das bactérias possui um elevado teor de PG, conferindo assim, carga líquida negativa à estas membranas. Os resultados das atividades biológicas mostraram que os mastoparanos Asn2-Polybia-MP I, Parapolybia-MP e Protonectarina-MP possuem uma atividade hemolítica relativamente baixa (em relação ao padrão Melitina) e, por outro lado, uma atividade antibiótica efetiva. Desta forma, podemos levantar a hipótese de que esses peptídeos estariam agindo de forma seletiva, atuando de modo mais eficaz contra as membranas das bactérias, constituindo assim, modelos promissores para o desenvolvimento de novos antibióticos.

Para tentar entender o modo de ação desses peptídeos, optou-se por realizar uma análise comparativa entre a estrutura tridimensional, dinâmica molecular e atividade biológica de cada um desses peptídeos. A modelagem molecular foi realizada com intuito de se obter um modelo inicial para as simulações por dinâmica molecular. Esses modelos podem ser construídos através de algoritmos que utilizam dados estereoquímicos das moléculas, juntamente com informações comparativas, obtidas a partir de um modelo tridimensional (*template*). A escolha de um bom *template*, que deve ser baseado em dados de similaridade e identidade, constitui uma das etapas mais importantes nesse processo, uma vez que o modelo gerado será um reflexo dos *templates* fornecidos ao programa de modelagem.

Neste estudo, os peptídeos Apoica-MP e MK-578 foram modelados utilizando-se como *template* o peptídeo EMP-AF. Os peptídeos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP e

Asn2-Polybia-MP I, por sua vez foram modelados utilizando o Mastoparano-X como *template*.

As análises estruturais de validação das estruturas geradas mostraram que todos os modelos gerados são estereoquimicamente possíveis, porém com características distintas entre si, o que permitiu dividi-los em dois grupos: um grupo cuja hélice formada apresenta uma interrupção (*turn*), e o outro grupo cuja hélice é contínua. Os peptídeos Parapolybia-MP e Asn2-Polybia-MP I, que encaixam-se dentro do primeiro grupo, possuem as cadeias laterais dos resíduos de Triptofanos localizados de forma a aumentar a hidrofobicidade na região central da cadeia peptídica destes peptídeos. Os peptídeos Apoica-MP e MK-578, que encaixam-se no segundo grupo, parecem possuir estruturas mais rígidas devido à não interrupção da hélice. Além disso, é possível observar que a cadeia lateral do resíduo de Triptofano dessas conformações, aparece voltada para cima (mais próximo da região N-terminal).

Existem trabalhos que descrevendo a preferência dos resíduos de triptofano pela região de interface hidrofílica/hidrofóbica das membranas (Strandberg et al., 2002; de Planque et al., 2002). Porém, os ensaios de interação com membrana (PC), através da técnica de espectrometria de massas combinada com a troca H/D, revelaram que, ao contrário do que se esperava, esses peptídeos apresentam os resíduos de Triptofano posicionados do lado de fora da membrana. Um estudo realizado por Santos-Cabrera (2006), utilizando técnicas de extravasamento de vesículas monitoradas por fluorescência, mostrou que provavelmente o resíduo de Triptofano do peptídeo Polybia-MP I não insere sua cadeia lateral na membrana. Esses dois resultados convergem para um novo modelo de interação com membranas, em que esse peptídeo provavelmente insere a região C-terminal na membrana, onde não existe a presença de resíduos de Triptofanos.

Além disso, essa interação parece não ser muito profunda em relação à membrana, mas sim, próxima à região das cabeças dos fosfolipídios. Um estudo de características

conformacionais por Dinâmica Molecular realizado por Costa (2006), mostrou que a presença do resíduo Asp8 (carregado negativamente) e Gln12 (hidrofílico) no Polybia-MP I permite a interação de moléculas de água com a região central de sua cadeia principal, mesmo quando colocado em meio contendo TFE (Figura 65). Ainda assim, a estrutura helicoidal é mantida devido a um equilíbrio eletrostático entre os grupos carregados e polares (Costa, 2006) presentes em sua seqüência de aminoácidos. Desta forma, acredita-se que estes peptídeos estejam interagindo na interface entre a região das cabeças dos fosfolipídios (hidrofílica) e a região das caudas (hidrofóbica). Os mastoparanos Protonectarina-MP, Parapolybia-MP e Apoica-MP apresentaram também uma interação com a membrana da vesícula de PC, semelhante ao descrito para o Asn2-Polybia-MP I nos ensaios de troca H/D combinada com Espectrometria de Massas.

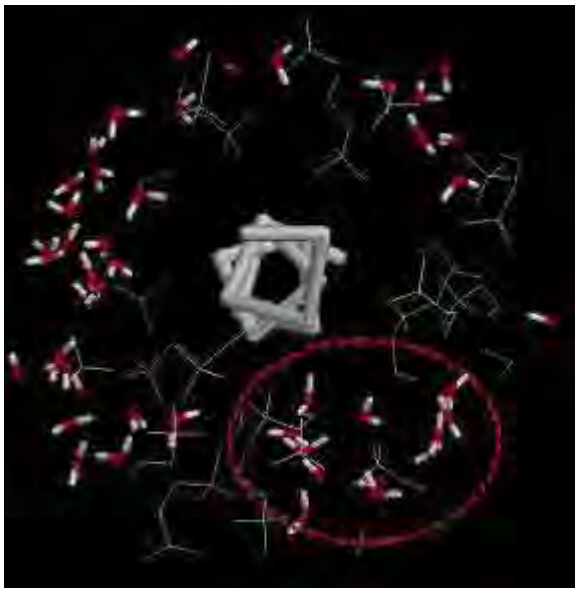

Figura 65: Representação da distribuição do solvente na região do peptídeo Polybia-MPI. Em cinza (ao centro) está mostrada a cadeia principal do peptídeo em plano ortogonal ao eixo da hélice; os bastões brancos e finos representam as moléculas de TFE; os bastões vermelhos e brancos representam as moléculas de água. A região circulada pelo tracejado vermelho mostra as moléculas de água que se mantiveram na região do resíduo Asp8 (Costa, 2006).

Estudos realizados por Rocha & Cruz-Höfling (2006, comunicação pessoal) (Figura 66) verificaram que a ação do mastoparano Apoica-MP, altera a permeabilidade da membrana da fibra muscular (sarcolema), bem como as membranas das mitocôndrias. Além disso, é possível observar hipercontração dos miofilamentos, causando um desarranjo no

interior da célula. Outro aspecto interessante é que, mesmo no músculo onde foi aplicado o peptídeo, observa-se a presença de miofibrilas intactas. Tais resultados sugerem que, de alguma maneira, peptídeos desta natureza (mastoparanos) internalizam-se na célula, neste caso na fibra muscular, provocando alterações internas, porém, sem aparentemente destruir a membrana celular.

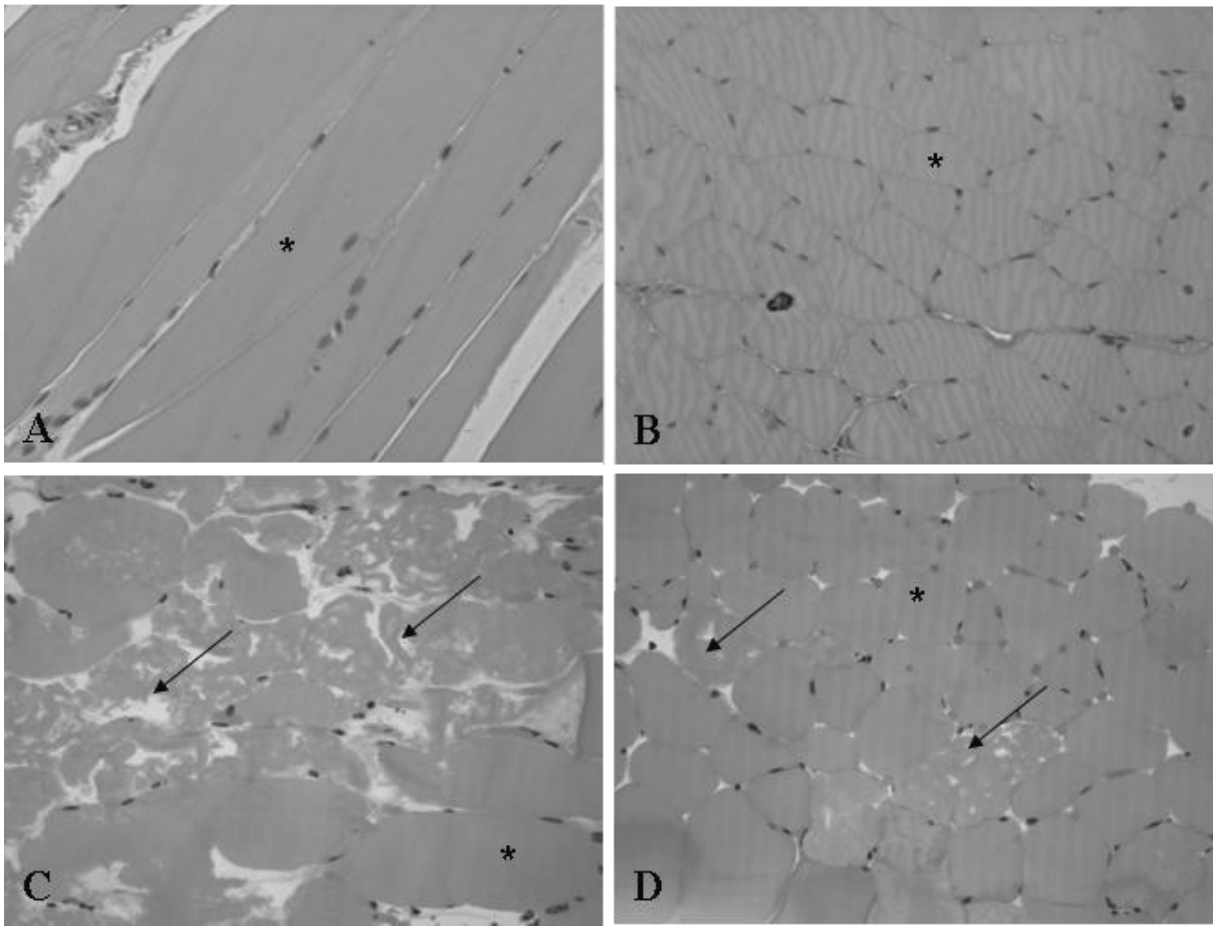

Figura 66: Micrografica óptica de músculo tibial anterior de camundongo (Balb/c) após injeção intramuscular de 25μg/μl do mastoparano Apoica-MP. Notar as alterações internas, como hipercontração dos miofilamentos (setas), em C e D, quando comparadas às fibras tratadas apenas com solução salina 0,9%, em A e B. Os asteriscos (*) indicam fibras intactas (Rocha & Höfling, 2006).

O fato dos peptídeos interagirem com a membrana da maneira proposta neste trabalho através dos estudos de troca H/D, somados aos resultados sobre o efeito dos mesmos na morfologia de células musculares, sugerem que em algum momento tais peptídeos estejam se internalizando às membranas, talvez através de eventos de *flip-flop*. Em outros estudos já foram observados eventos de *flip-flop*; Hellmann & Schwarz (1998) relataram que o

Mastoparano-X tem a capacidade de se internalizar à membrana de vesículas sintéticas de PC, também através desse mecanismo. A translocação dos peptídeos através da membrana, segundo Matsuzaki et al. (1996), está relacionada com a formação de poros transientes. Primeiramente, as moléculas do peptídeo "residem" na face externa da membrana e promovem um evento de formação de poros de curta duração, e no momento da desintegração dos poros, uma fração dos peptídeos aleatoriamente transloca-se para a camada interna da membrana. Como conseqüência, a redução da concentração de peptídeos na face externa da membrana, reduz a taxa de formação de poros devido à natureza cooperativa da formação destas estruturas. Além disso, a taxa de translocação inicial é alta e reduz-se rapidamente. Segundo Danilenko et al. (1993), peptídeos com essas características (com tempo curto de formação de poros) poderiam entrar nas células sem causar mudanças efetivas na permeabilidade das mesmas. A translocação de peptídeos catiônicos através das membranas pode ser facilitada por um potencial negativo da face interna das membranas (Matsuzaki et al., 1995c). Desta forma, acredita-se que o peptídeo Apoica-MP, internaliza-se à célula de mamíferos, sem destruir a membrana celular, sendo esse mecanismo facilitado pela atração das cargas positivas do peptídeo com as cargas negativas da face interna da membrana.

Outro fato importante é que, com exceção ao MK-578, todos os demais peptídeos estudados neste trabalho, apresentaram atividade degranuladora de mastócitos. A degranulação pode ocorrer por dois mecanismos: (i) interação com receptores de membrana, neste caso, interação com proteínas-G, (ii) ou ainda através da lise da membrana celular e dos grânulos dos mastócitos. A constatação da interação com a superfície da membrana das vesículas pelos mastoparanos em questão, juntamente com a baixa atividade hemolítica e o aparecimento de atividade degranuladora de mastócitos, indicam que provavelmente estes peptídeos estejam agindo nos mastócitos, através da ativação das proteínas-G presentes nas membranas dos mastócitos. Este tipo de interação é dependente do reconhecimento de uma

conformação específica dos peptídeos pelos receptores acoplados às proteínas-G (Mendes et al., 2005).

Os estudos de Dinâmica Molecular mostraram que os mastoparanos apresentam grande diversidade conformacional durante a trajetória de simulação em meio aquoso. Esta característica sugere a necessidade de um possível ajuste conformacional, que permita a formação de dobras na estrutura helicoidal, permitindo assim uma acomodação necessária à interação deles com as membranas conforme proposto neste estudo, sem contudo, perderem a conformação helicoidal por completo.

Tentou-se ainda, fazer uma correlação entre o posicionamento das Lisinas ao longo da cadeia peptídica com a atividade biológica desses peptídeos. O peptídeo Apoica-MP, que possui os resíduos Lys5, Lys8 e Lys9, possui atividade biológica mais potente em relação aos outros peptídeos. Este posicionamento das Lisinas é um dos mais centrais ao longo da cadeia; por outro lado, o Asn2-Polybia-MP I apresentou-se como segundo peptídeo mais ativo dentre os cinco estudados, sendo que ele possui os resíduos de Lisinas posicionados mais próximo das extremidades da cadeia. Consequentemente, não se observa uma correlação a respeito do posicionamento mais central ou mais externo destes resíduos na cadeia peptídica. Desta forma, a presença de resíduos de Lisina nestes peptídeos deva ser analisado sob outro aspecto: talvez, esses resíduos estejam contribuindo efetivamente na ancoragem dos peptídeos à membrana, favorecendo a interação com a interface hidrofílico-hidrofóbica existente entre as cabeças dos fosfolipídios e as caudas dos mesmos. Segundo Deber & Li (1995), a hidrofobicidade facilita a entrada, concentração e orientação desses peptídeos nas membranas lipídicas.

Provavelmente, a orientação tridimensional, e não o posicionamento linear, das cadeias laterais das Lisinas seja um fator determinante na atividade biológica dos peptídeos, pois influencia fortemente na anfipaticidade da molécula, dependendo do meio. Por exemplo, o peptídeo Apoica-MP possui os resíduos de Lisina localizados nas posições 5, 8 e 9, sendo

que dois deles encontram-se mais próximos ao C-terminal. A sobreposição de alguns estados conformacionais adotados por esse peptídeo durante a simulação por Dinâmica Molecular (Figura 54B), mostra que a posição das cadeias laterais das Lisinas permite o estabelecimento de uma face polar e outra face completamente apolar. Uma conformação parecida ocorre com o peptídeo Protonectarina-MP, que também possui duas de suas Lisinas dispostas mais próximas à região C-terminal (posições 11 e 12 da seqüência peptídica).

Por outro lado, quando esses resíduos encontram-se mais concentrados próximos à região N-terminal, como no caso do Asn2-Polybia-MP I e Parapolybia-MP, pode ocorrer certa interrupção da área varrida pelas cadeias laterais destes resíduos, formando assim pequenas regiões hidrofílicas, alternadas com pequenas regiões hidrofóbicas (ver figura 65). Além disso, em uma representação dos estados conformacionais do Asn2-Polybia-MP I (Figura 67) observa-se uma convergência das pontas das cadeias laterais dos resíduos de Lys para o centro da cadeia peptídica, em direção á carga negativa da cadeia lateral do resíduo de Asp8, quando o peptídeo está em meio aquoso, podendo, desta forma, ocorrer um balanço entre as cargas positivas e negativas das cadeias laterais desses resíduos.

Figura 67: Distribuição dos resíduos de Lysina (vermelho) e Asp8 (azul) do peptídeo Asn2-Polybia-MP I.

Provavelmente esse peptídeo possui uma mobilidade estrutural que permite um ajuste da conformação de acordo com o meio em que está interagindo. Estudos de Dinâmica Molecular deste peptídeo em meio contendo micelas, vesículas neutras e vesículas carregadas certamente poderia contribuir para um melhor entendimento dessas interações eletrostáticas que ajudam na interação com membranas.

Os peptídeos Asn2-Polybia-MP I, Parapolybia-MP e Protonectarina-MP além de serem antibióticos, possuem uma atividade hemolítica relativamente baixa. Desta forma, esses peptídeos tornam-se potenciais alvos no desenvolvimento de novos antibióticos. Fica aberto a partir do presente trabalho, um importante campo de estudos para o desenvolvimento de peptídeos antibióticos de uso terapêutico .

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T.; .KAWAI, N.; NIWA, A. Purification and properties of a presynaptically acting neurotoxin, mandaratoxin, from hornet (*Vespa mandarinia*). Washington, **Biochemistry**, v.21, n.7, p.1693-7, 1982.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biolobia Molecular da Célula**. 4.ed. Porto Alegre, Artmed Editora, 2004. p.852-6.

ALI, M. F.; SOTO, A. M.; KNOOP, F. C.; CONLON, J. M. Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (*Pipidae*). Amsterdam, **Biochim. Biophys. Acta**, v.1550, p.81-9, 2001.

ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from venom of the european hornet, *Vespa crabro*. Washington, **J. Biol. Chem.**, v.259, n.16, p.10106-11, 1984.

BLONDELLE, S. E.; HOUGHTEN, R. A. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. Washington, **Biochemistry**, v.31, n.50, p.12688-94, 1992.

BLONDELLE, S. E.; LOHNER, K.; AGUILAR, M. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. Amsterdam, **Biochim. Biophys. Acta**, v.1462, p.89-108, 1999.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J. L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. New York, **Dev. Comp. Immunol.**, v.23, n.4-5, p.329-44, 1999.

CASE, D. A.; PEARLMAN, D. A.; CALDWELL, J. W.; CHEATHAM III, T. E.; WANG, W. S.; ROSS, W. S.; SIMMERLING, C. L.; DARDEN, T. A.; MERZ, K. M.; STANTON, R. V.; CHENG, A. L.; VINCENT, J. J.; CROWLEY, M.; TSUI, V.; GOHLKE, H.; RADMER, R. J.; DUAN, Y.; PITERA, J.; MASSOVA, I.; SEIBEL., G. L.; SINGH, U. C.; WEINER, P. K.; KOLLMAN, P. A. **AMBER 7**, 2002. University of California, San Francisco.

CASTRO, F. F. M. **Reações alérgicas por venenos de Hymenoptera:** experiência de 20 anos.São Paulo, 2001. 132p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica. Disciplina de Alergia e Imunologia. Universidade de São Paulo.

CHUANG, C. C.; HUANG, W. C.; YU, H. M.; WANG, K. T.; WU, S. H. Conformation of *Vespa basalis* mastoparan-B in trifluoroethanol-containing aqueous solution. Amsterdam, **Biochim. Biophys. Acta**, v.1292, n.1, p.1-8, 1996.

COYLE, B.; KAVANAGH, K.; MCCANN, M.; DEVEREUX, M.; GERAGHTY, M. Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. London, **Biometals**, v.16, p.321–9, 2003.

COSTA, H.; PALMA, M. S. Agelotoxin: a phospholipase A_2 from the venom of the neotropical social wasp cassununga (*Agelaia pallipes pallipes*) (Hymenoptera - Vespidae). Elmsford, **Toxicon**, v.38, p.1367-79, 2000.

COSTA, S. T. B. **Estudos conformacionais por dinâmica molecular de peptídeos antimicrobianos da família dos mastoparanos em mistura de TFE-água.** São José do Rio Preto, 2006. 133p. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

CSORDÀS, A.; MICHL, H. Isolation and structure of a hemolytic polypeptide from the defensive secretion of European Bombina species. Wien, **Monatsh. Chem.**, v.101, p.182-9, 1970.

DANILENKO, M.; WORLAND, P.; CARLSON, B.; SAUSVILLE, E. A.; SHARONI, Y. Selective effects of mastoparan analogs: separation of G-protein-directed and membrane perturbing activities. Orlando, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.196, n.3, p.1296-302, 1993.

DEBER, C. M.; LI, S. Peptides in membranes: helicity and hydrophobicity. New York, **Biopolymers**, v.37, p.295-318, 1995.

DEMMERS, J. A. A.; HAVERKAMP, J.; HECK, A. J. R.; KOEPPE, R. E.; KILLIAN, J. A. Electrospray ionization mass spectrometry as a tool to analyze hydrogen/deuterium exchange kinetics of transmembrane peptides in lipid bilayers. Washington, **PNAS**, v.97, p.3189-94, 2000.

de KROON, A. I. P. M.; de GIER, J.; KRUIJFF, B. The effect of a membrane potential on the interaction of mastoparan X, a mitochondrial presequence, and several regulatory peptides with phospholipid vesicles. Amsterdam, **Biochim. Biophys. Acta**, v.1068, p.111-24, 1991.

de PLANQUE, M. R. R.; BOOTS, J. P.; RIJKERS, D. T. S.; LISKAMP, R. M. J.; GREATHOUSE, D. V.; KILLIAN, J. A. The effects of hydrophobic mismatch between phosphatidilcholine bilayers and transmembrane α-helical peptides depend on the nature of interfacially exposed aromatic and charged residues. Washington, **Biochemistry**, v.41, p.8396-404, 2002.

de SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; MENDES, M. A.; PALMA, M. S. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. New Jersey, **Rap. Commun. Mass Spectrom.**, v.18, p.1095-1102, 2004.

de SOUZA, B. M.; MENDES, M. A.; SANTOS, L. D.; MARQUES, M. R.; CÉSAR, L. M.; ALMEIDA, R. N. A.; PAGNOCCA, F. C.; KONNO, K.; PALMA, M. S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. New York, **Peptides**, v.26, p.2157-64, 2005.

DOTIMAS, E.M.; HAMID, K.R.; HIDER, R.C.; RAGNARSSON, U. Isolation and structure analysis of bee venom mast cell degranulating peptide. Amsterdam, **Biochim. Biophys. Acta.**, v.911, n.3, p.285-93, 1987.

DUNN, R. S.; PARKS, A. M. A new plasmakinin in the turtle *Pseudemys elegans*. Basel, **Experientia**, v.26, p.1220-1, 1970.

EDERY, H.; ISHAY, J.; GITTER, S.; JOSHUA, H. Venoms of Vespidae. In: BETTINI, S. (Ed.) **Arthropod venoms**. New York, Springer-Verlag, 1978. p.691-771.

ENGH, R. A.; HUBER, R. Accurate bond and angle parameters for x-ray protein-structure refinement. Copenhagen, **Acta Crystallographica-Section A**, v.47, p.392-400, 1991.

EPAND, R. M.; VOGEL, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. Amsterdam, **Biochim. Biophys. Acta**, v.1462, p.11-28, 1999.

ESSMANN, U.; PERERA, L.; BERKOWITZ, M. L. A smooth particle mesh Ewald method. New York, **J. Chem. Phys.**, v.103, n.19, p.8577-93, 1995.

FATTAL, E.; NIR, S.; PARENTE, R. A.; SZOKA Jr, F. C. Pore-forming peptides induce rapid phospholipid flip-flop in membranes. Washington, **Biochemistry**, v.33, n.21, p,6721-31, 1994.

FRIEDRICH, C. L.; ROZEK, A.; PATRZYKAT, A.; HANCOCK, R. E. W. Structure and mechanism of action of an Indolicidin peptide derivative with improved activity against Gram-positive bacteria. Washington, **J. Biol. Chem.**, v.276, n.26, p.24015-22, 2001.

FUJITA, K.; KIMURA, S.; IMANISHI, Y. Self-assembly of mastoparan-x derivative having fluorescence probe in lipid bilayer-membrane. Amsterdam, **Biochim.Biophys. Acta-Biomembranes**, v.1195, n.1, p.157-63, 1994.

GIBAS, C.; JAMBECK, P. **Desenvolvendo bioinformática.** Rio de Janeiro, Ed. Campus, 2001. p.179-80.

GREENFIELD, N.; FASMAN, G. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. Washington, **Biochemistry**, v.8, n.10, p.4108-16, 1969.

GROTTESI, A.; SETTE, M.; PALAMARA, T.; ROTILIO, G.; GARACI, E.; PACI, M. The conformation of peptide thymosin alpha 1 in solution and in a membrane-like environment by circular dichroism and NMR spectroscopy: a possible model for its interaction with the lymphocyte membrane. New York, **Peptides**, v.19, n.10, p.1731-8, 1998.

GUEX, N.; PEITSCH, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Weinheim, **Electrophoresis**, n.18, p.2714-23, 1997.

HABERLAND, M. E.; REYNOLDS, J. A. Interaction of l-a-palmitoyl lysophosphatidylcholine with the AI polypeptide of high density lipoprotein. Washington, **J. Biol. Chem.**, v.250, p.6636-9, 1975.

HABERMANN, E. Bee and wasp venoms. Washington, **Science**, v.117, p.314-22, 1972.

HANCOCK, R. E. W.; FALLA, T.; BROWN, M. H. Cationic bactericidal peptides. London, **Adv. Microb. Physiol**., v.37, p.135-75, 1995.

HANCOCK, R. E. W.; CHAPPLE, D. S. Peptide antibiotics. Bethesda, **Antimi. Agents Chemother.**, v.43, n.6, p.1317-23, 1999.

HELLMANN, N.; SCHWARZ, G. Peptide-liposome association. A critical examination with mastoparano-X. Amsterdam, **Biochim. Biophys. Acta**, v.1369, p.267-77, 1998.

HIDE, I.; BENNET, J. P.; PIZZEY, A.; BOONEN, G.; SAGI, D. B.; GOMPERTS, B. D.; TATHAM, P. E. R. Degranulation of individual mast cell in response to Ca^{2+} and guarine nucleotides: an all-or-none event. New York, **J. Cell Biol.**, v.123, n.3, p.585-93, 1993.

HIGASHIJIMA, T.; WAKAMATSU, K.; TAKEMITSU, M.; FUJINO, M.; NAKAJIMA, T.; MIYAZAWA, T. Conformational change of mastoparan from wasp venom on binding with phospholipid membrane. Amsterdam, **FEBS Lett**, v.152, n.2, p.227-30, 1983.

HIGASHIJIMA, T.; UZU, S.; NAKAJIMA, T.; ROSS, E. M. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). Washington, **J. Biol. Chem.**, v. 263, p.6491-4, 1988.

HIGASHIJIMA, T.; BURNIER, J.; ROSS, E. M. Regulation of G_i and G_0 by mastoparan related peptides and hydrophilic amines. Washington, **J. Biol. Chem.**, v.265, p.14176-86, 1990.

HIRAI, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T. A new mast cell degranulationg peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. In: SHIBA, S. (Ed.) **Peptide Chemistry**. Osaka, Protein Research Foundation, 1978. p.155-60.

HIRAI, Y.; KUWADA, M.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T. A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*).Tokyo, **Chem. Pharm. Bull.**, v.27, n.8, p.1945-6, 1979a.

HIRAI, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T.; FUJINO, M.; KITADA, C. A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. Tokyo, **Chem. Pharm. Bull.**, v.27, n.8, p.1942-4, 1979b.

HO, C. L.; HWANG, L. L. Letal edema induced by the black-bellied Hornet (*Vespa basalis*) venom and its components. Elmsford, **Toxicon**, v.29, p.1031-42, 1991.

HO, C. L.; HWANG, L. L.; LIN, Y.L.; CHEN, C. T.; YU, H. M.; WANG, K. T. Cardiovascular effects of mastoparan B and its structural requirements. Amsterdam, **Eur. J. Pharmacol.**, v.259, p.259-64, 1994.

HOFFMAN, D. R.; WOOD, C. L.; HUDSON, P. Demonstration of IgE and IgG antibodies against venoms in the blood of victims of fatal sting anaphylaxis. Saint Louis, **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.71, p.193-6, 1983.

HORI, Y.; DEMURA, M.; IWADATE, M.; ULRICH, A. S.; NIIDOME, T.; AOYAGI, H.; ASAKURA, T. Interaction of mastoparan with membranes studied by ^{1}H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state ^{2}H-NMR and ^{15}N-NMR spectroscopy in oriented lipid bilayers. Berlin, **Eur. J. Biochem.**, v.268, p.3029, 2001.

HUANG, H. W. Action of antimicrobial peptides: two state model. Washington, **Biochemistry**, v.39, n.29, p.8347-52, 2000.

IBRAHIM, H. R.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. Amsterdam, **Biochim. Bioph. Acta**, v.1523, p.196-205, 2000.

JAQUES, R.; SCHACHTER, M. The presence of histamine, 5-hydroxytryptamine and a potent slow contracting substrate in wasp venom. London, **Br. J. Pharmacol.**, v.9, p.53-7, 1954.

JOHNSON, A. R.; ERDÖS, E. G. Release of histamine from mast cells by vasoactive peptides. New York, **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.142, p.1252-6, 1973.

JONES, S.; HOWL, J. Charge delocalization and the design of novel mastoparano analogues: enhanced cytotoxicity and secretory efficacy of [Lys^5, Lys^8, Aib^{10}]MP. Amsterdam, **Regulatory Peptides**, v.121, p.121-8, 2004.

JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J. D.; IMPEY, R. W.; KLEIN, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. New York, **J. Chem. Phys**., v.79, p. 926-35, 1983.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. New York, **Biopolymers**, v.22, p.2577-637, 1983.

KATSU, T.; NINOMIYA, C.; KUROKO, M.; KOBAYASHI, H.; HIROTA, T.; FUJITA, Y. Action mechanism of amphipathic peptides gramicidin S and melittin on erythrocyte membrane. Amsterdam, **Biochim Biophys Acta**, v.939, n.1, p.57-63, 1988.

KATSU, T.; SANCHIKA, K.; TAKAHASHI, M.; KISHIMOTO, Y.; FUJITA, Y.; YOSHITOMI, H.; WAKI, M.; SHIMOHIGASHI, Y. Interaction of wasp venom mastoparan with biomembranes. Amsterdam, **Biochim Biophys Acta**, v.1027, n.2, p.185-90, 1990.

KAWAI, N.; HORI, S. Effect of hornet venom on crustacean neuromuscular junctions. In: OHSAKA, A., HAYASHI, K., SAWAI, Y. (Eds.) **Animal, plant and microbial toxins***,* v.2, p.309-18, 1976.

KEARSLEY, S. K. On the orthogonal transformation used for structural comparisons. Copenhagen, **Acta Crystallographica Section A**, v.45, p.208-10, 1989.

KING, T. P.; SOBOTKA, A. K.; ALAGON, A.; KOCHOUMIAN, L.; LICHTENSTEIN, L.M. Protein allergens of white-faced hornet, yellow hornet and yellow jacket venoms. Washington, **Biochemistry**, v.17, p.5165-77, 1978.

KIYOTA, T.; LEE, S.; SUGIHARA, G. Design and synthesis of amphiphilic alpha-helical model peptides with systematically varied hydrophobic-hydrophilic balance and their interaction with lipid- and bio-membranes. Washington, **Biochemistry**, v.35, n.40, p.13196-204, 1996.

KOL, M. A.; de KROON, A. I. P. M.; RIJKERS, D. T. S.; KILLIAN, J. A.; KRUIJFF, B. Membrane-spanning peptides induce phospholipid flop: a model for phospholipid translocation across the inner membrane of *E. coli*. Washington, **Biochemistry**, v.40, p.10500-6, 2001.

KONNO, K.; HISADA, M.; NAOKI, H.; ITAGAKI, Y.; KAWAI, N.; MIWA, A.; YASUHARA, T.; MORIMOTO, Y.; NAKATA, Y. Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulation peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). Elmsford, **Toxicon**, v.38, p.1505-15, 2000.

KONNO, K.; HISADA, M.; FONTANA, R.; LORENZI, C. C. B.; NAOKI, H.; ITAGAKI, Y.; MIWA, A.; KAWAI, N.; NAKATA, Y.; YASUHARA, T.; RUGGIERO NETO, J.; AZEVEDO, W. F.; PALMA, M. S.; NAKAJIMA, T. Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. Amsterdam, **Bioch. Biophy. Acta**, v.1550, p.70-80, 2001.

KORADI, R.; BILLETER, M.; WÜTHRICH, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. Guildford, **J. Mol. Graph.**, v.14, p.51-5, 1996.

KRISHNAKUMARI, V.; NAGARAJ, R. Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs. Copenhagen, **J. Pep. Res.**, v.50, p.88-93, 1997.

KUCHLER, K.; KREIL, G.; SURES, I. The genes for the frog skin peptides GLa, xenopsin, levitide and caerulein contain a homologous export exon encoding a signal sequence and part of an amphiphilic peptide. Berlin, **Eur. J. Biochem.**, v.179, p.281-5, 1989.

KUSUNOKI, H.; WAKAMATSU, K.; SATO, K.; MIYAZAWA, T.; KOHNO, T. G protein-bound conformation of mastoparan-X: heteronuclear multidimensional transferred nuclear overhauser effect analysis of peptide uniformly enriched with 13C and 15N. Washington, **Biochemistry**, v.37, n.14, p.4782-90, 1988.

KURODA, Y.; YOSHIOKA, M.; KUMAKURA, K.; KOBAYASHI, K.; NAKAJIMA, T. Effects of peptides on the release of catecholamines and adenine nucleotides from cultured adrenal chromaffin cells. Tokyo, **Proc. Jpn. Acad.**, v.56, p.660-4, 1980.

KYOGOKU, Y.; FUJIYOSHI, Y.; SHIMADA, I.; NAKAMURA, H.; TSUKIHARA, T.; AKUTSU, H.; ODAHARA, T.; OKADA, T.; NOMURA, N. Structural genomics of membrane proteins. Washington, **Acc. Chem. Res.**, v.36, n.3, p.199-206, 2003.

LADOKHIN, A. S.; WHITE, S. H. Protein chemistry at membrane interfaces: non-additivity of electrostatic and hydrophobic interactions**.** London, **J. Mol. Biol.**, v.309, p.543-52, 2001.

LASIC, D. D. The mechanism of vesicle formation. London, **Biochem. J.**, v.256, n.1, p.1-11, 1988.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. Copenhagen, **J. Appl. Cryst.**, v.26, p.283-91, 1993.

LEE, S.; MIHARA, H.; AOYAGI, H.; KATO, T.; IZUMIYA, N.; YAMASAKI, N. Relationship between antimicrobial activity and amphiphilic property of basic model peptides. Amsterdam, **Biochim. Biophys. Acta**, v.862, n.1, p.211-9, 1986.

LEE, K. H.; SHIN, S. Y.; HONG, J. E.; YANG, S. T.; KIM, J. I.; HAHM, K. S.; KIM Y. Solution structure of termite-derived antimicrobial peptide, spinigerin, as determined in SDS micelle by NMR spectroscopy. Orlando, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.309, n.3, p.591-7, 2003.

LI, M. L.; LIAO, R. W.; QIU, J. W.; WANG, Z. J.; WU, T. M. Antimicrobial activity of synthetic all-D mastoparan M. Washington, **Antimicrobial Agents**, v.13, p.203-8, 2000.

LINDBERG, M.; JARVET, J.; LANGEL, Ü.; GRÄSLUND, A. Secondary structure and positon of the cell-penetrating peptide transportation in SDS micelles as determined by NMR. Washington, **Biochemistry**, v.40, n.10, p.3141-9, 2001.

LORENZI, C. C. B. **Estudo estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias.** São José do Rio Preto, 2002. 115p. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

MATSUZAKI, K.; MURASE, O.; MIYAJIMA, K. Kinetics of pore formation by an antimicrobial peptide, magainin 2, in phospholipid bilayers. Washington, **Biochemistry**, v.34, n.39, p.12553-9, 1995a.

MATSUZAKI, K.; MURASE, O.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore. Washington, **Biochemistry**, v.34, n.19, p.6521-6, 1995b.

MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K.; FUJII, N.; MIYAJIMA, K. Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. Washington, **Biochemistry**, v.34, n.10, p.3423-9, 1995c.

MATSUZAKI, K.; YONEYAMA, S.; MURASE, O.; MIYAJIMA, K. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. Washington, **Biochemistry**, v.35, p.8450-6, 1996.

MATSUZAKI, K.; SUGISHITA, K.; ISHIBE, N.; UEHA, M.; NAKATA, S.; MIYAJIMA, K.; EPAND, R. M. Relationship of Membrane Curvature to the Formation of Pores by Magainin 2. Washington, **Biochemistry**, v.37, p.11856-63, 1998.

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. Amsterdam, **Biochim. Biophys. Acta**, v.1462, p.1-10, 1999.

MELETIADIS, J.; MEIS, J.G.M.; MOUTON, J.W.; DONNELLY, J.P.; VERWEIJ, P.E. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium bromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. Washington, **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.2949-54, 2000.

MELLOR, I. R.; SANSOM, M. S. Ion-channel properties of mastoparan, a 14-residue peptide from wasp venom, and of MP3, a 12-residue analogue. London, **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol.**, v.239, n.1296, p.383-400, 1990.

MENDES, M. A.; de SOUZA, B. M.; SANTOS, L. D.; PALMA, M. S. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes pallipes* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. New Jersey, **Rap. Commun. Mass Spectrom.**, v.18, n.6, p.636-42, 2004a.

MENDES, M.A.; de SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; PALMA, M. S. Structural and biological characterization of two novel peptides from the venom of the neotropical social wasp *Agelaia pallipes pallipes*. Elmsford, **Toxicon**, v.44, n.1, p.67-74, 2004b.

MENDES, M.A.; de SOUZA, B. M.; PALMA, M. S. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Saussure). Elmsford, **Toxicon**, v.45, p.101-6, 2005.

MERRIFIELD, B. Solid-Phase synthesis. Washington: **Science**, v.232, p.341-7, 1986.

MOERMAN, L.; BOSTEELS, S.; NOPPE, W.; WILLEMS, J.; CLYNEN, E.; SCHOOFS, L.; THEVISSEN, K.; TYTGAT, J.; van ELDERE, J.; van der WALT, J.; VERDONCK, F. Antibacterial and antifungal properties of α-helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. Berlin, **Eur. J. Biochem.**, v.269, p.4799-4810, 2002.

MOR, A.; NGUYEN, V. H.; DELFOUR, A.; MIGLIORE-SAMOUR, D.; NICOLAS, P. Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaceptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. Washington, **Biochemistry**, v.30, p.8824-30, p.1991.

MOR, A.; NICOLAS, P. J. The NH2-terminal R-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. Washington, **J. Biol. Chem.**, v.269, p.1934-9, 1994.

MORRIS, A. L.; MACARTHUR, M. W.; HUTCHINSON, E. G.; THORNTON, J. M. Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins**, v.12, p.345-64, 1992.

MOUSLI, M.; HUGLI, T. E.; LANDRY, Y.; BRONNER, C. A mecanism of action for anaphylatoxin C3a stimulation of mast cell. Baltimore, **J. Immunol.**, n.8, v.148, p.2456-61, 1992.

NAKAJIMA, T.; UZU, S.; WAKAMATSU, K.; SAITO, K.; MIYAZAWA, T.; YASUHARA, T.; TSUKAMOTO, Y.; FUJINO, M. Amphiphilic peptides in wasp venom. New York, **Biopolymers**, v.25, p.115-21, 1986.

NAKAJIMA, Y.; QU, X.-M.; NATORI, S. Interaction between liposomes and sarcotoxin IA, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). Washington, **J. Biol. Chem.**, v.262, p.1665-9, 1987.

NAKAJIMA, T. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In: PIEK, T. (Ed.) **Venoms of the Hymenoptera***:* biochemical, pharmacological and behavioural aspects. London, Academic Press Inc. Ltd., 1986. p.309-27.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3.ed. New York, Worth Publishers, 2000, p.390.

NORBERTO DE SOUZA, O.; ORNSTEIN, R. L. Molecular dynamics simulations of a protein-protein dimer: particle-mesh Ewald electrostatic model yields far superior results to stardard cutoff model. New York, **J. Biomol. Struct. Dyn.**, v.16, n.6, p.1205-18, 1999.

OKANO, Y.; TAKAGI, H.; TOHMATSU, T.; NAKASHIMA, S.; KURODA, Y.; SAITO, K.; NOZAWA, Y. A wasp venom mastoparan-induced polyphosphoinositide breakdown in rat peritoneal mast cells. Amsterdam, **FEBS Lett.**, v.188, n.2, p.363-6, 1985.

OKUMURA, K.; INUI, K.; HIRAI, Y.; NAKAJIMA, T. The effect of mastoparan of ion movement in black lipid membrane. Tokyo, **Biomed. Res.**, v.2, p.450-2, 1981.

OLIVEIRA, M. R.; PALMA, M. S. Polybitoxins: a group of phospholipases A_2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*). Elmsford, **Toxicon**, v.36, p.189-99, 1998.

OLIVEIRA, M. R. **Fracionamento e caracterização bioquímica da peçonha da vespa social *Polybia Paulista***. Rio claro, 2000. 100p. Dissertação (Mestrado em Biológica Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. New York, **Biopolymers**, v.47, n.6, p.451-63, 1998.

OTVOS Jr, L.; BOKONYI, K.; VARGA, I.; OTVOS, B.; HOFFMANN, R.; ERTL, H. C. J.; WADE, J. D.; McMANUS, A. M.; CRAIK, D. J.; BULET, P. Insect peptides with improved protease-resistance protect mice against bacterial infection. New York, **Protein Science**, v.9, n.4, p.742-9, 2000.

PALMA, M. S. Insect venom peptides. In: KASTIN, A. J. **Handbook of biologically active peptides.** 1.ed. Oxford, Academic Press, 2006. p.389-96.

PARENTE, R. A.; NIR, S.; SZOKA Jr., C. Mechanism of leakage of phospholipids vesicle contents induced by the peptide GALA. Washington, **Biochemistry**, v.29, n.37, p.8720-8, 1990.

PARK, N. G.; YAMATO, Y.; LEE, S.; SUGIHARA, G. Interaction of mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospsolipid bilayers and its antimicrobial activity. New York, **Biopolymers**, v.36, p.793-801, 1995.

PARK, R. Bee and Hymenoptera Stings. **eMedicine***,* v.3, n.1, 2002 (www.emedicine.com).

PAULING, L.; COREY, R. B.; BRANSON, H. R. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. Washington, **PNAS,** v.37, p.205-11, 1951.

PEARLMAN, D. A.; CASE, D. A.; CALDWELL, J. W.; ROSS, W. S.; CHEATHAM III, T. E.; DeBOLT, S.; FERGUSON, D.; SEIBEL, G.; KOLLMAN, P. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to stimulate the structural and energetic properties of molecules. Amsterdam, **Comp. Phys. Commun.**, v.91, p.1-41, 1995.

PÉREZ-PAYÁ, E.; HOUGHTEN, R. A.; BLONDELLE, S. E. The role of amphipathicity in the folding, aelf-association and biological activity of multiple subunit small proteins. Washington, **J. Biol. Chem.**, v.270, p.1048-56, 1995.

PÉREZ-PAYÁ, E.; DUFOURCQ, J.; BRACO, L.; ABAD, C. Structural characterization of the natural membrane-bound state of melittin: a fluorescence study of a dansylated analogue. Amsterdam, **Biochim. Biophys. Acta**, v.1329, p.223-36, 1997.

PFEIFFER, D.; GUDZ, T. I.; NOVGORODOV, S. A.; ERDAHL, W. L. The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition. Washington, **J. Biol. Chem.**, v.270, n.9, p.4923-32, 1995.

PISANO, J. J. Vasoactive peptides in venoms. Bethesda, **Fed. Am. Soc. Exp. Biol.**, v.27, p.58-62, 1968.

PISANO, J. J. Kinins in non-mamalian origin. Berlin, **Hand. Exp. Pharmacol.**, v. 25, p.589-96, 1970.

PIZZO, A. B.; BELEBONI, R. O.; ANDRÉIA C. K; FONTANA, A. C. K.; RIBEIRO, A. M.; MIRANDA, A.; COUTINHO-NETTO, J.; DOS SANTOS, W. F. Characterization of the actions of AvTx 7 isolated from *Agelaia vicina* (Hymenoptera: Vespidae) wasp venom on synaptosomal glutamate uptake and release. New York, **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v.18, n.2, p.61-8, 2004.

RAMACHANDRAN, G. N. Protein structure and crystallography. Washington, **Science**, v.141, n.357, p.288-91, 1963.

RAMAKRISHNAN, C.; RAMACHAN, G. N. Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations .2. Allowed conformations for a pair of peptide units. New York, **Biophysical Journal**, v.5, n.6, p.909-33, 1965.

REES, J. A.; MONIATTE, M.; BULET, P. Novel antibacterial peptides isolated from a European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea). Oxford, **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v.27, n.5, p.413-22, 1997.

REX, S.; SCHWARZ, G. Quantitative studies on the melittin-induced leakage mechanism of lipid vesicles. Washington, **Biochemistry**, v.37, n.8, p.2336-45, 1998.

ROCHA, T.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Laboratório de Ultraestrutura Celular: Ação de Venenos em Sistemas Biológicos, Departamento de Histologia & Embriologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil. 2006.

ROGER, A.; NORDÉN, B. **Circular dichroism and linear dichroism**. Oxford, Oxford University Press, 1997. 150p.

ROHL, C. A.; BALDWIN, R. L. Deciphering rules of helix stability in peptides. New York, **Methods Enzymol.**, v.295, p.1-26, 1998.

ROSS, E. M.; HIGASHIJIMA, T. Regulation of G-protein activation by mastoparans and other cationic peptides. New York, **Methods in Enzymol.**, v.237, p.26-37, 1994.

SALLI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. London, **J. Mol. Biol.**, v.234, n.3, p.779-815, 1993.

SANDVIK, A. K.; DOCKRAY, G. J. Biological activity of carboxy-terminal gastrin analogs. Amsterdam, **Eur. J. Pharmacol.**, v.364, 199-203, 1999.

SANTOS-CABRERA, M. P. D.; de SOUZA, B. M.; FONTANA, R.; KONNO, K.; PALMA, M. S.; de AZEVEDO JR, W. F.; NETO J. R. Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. Copenhagen, **J. Pep. Res.**, v.64, n.3, p.95-103, 2004.

SANTOS-CABRERA, M. P. D. **Estudo da estrutura e atividade lítica de peptídeos antimicrobianos de vespas**. São José do Rio Preto, 2006. 89p. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

SCHMIDT, J. O. Allergy to Hymenoptera venoms. In: PIEK, T. (Ed.) **Venoms of the Hymenoptera:** biochemical, pharmacological and behavioral aspects. London, Academic Press Inc. Ltd., 1986. p.509-46

SCHWRZ, G.; BLOCHMANN, U. Association of the wasp venom peptide mastoparan with electrically neutral lipid vesicles. Amsterdam, **FEBS Letters**, v.318, n.2, p.172-6, 1993.

SCHROEDER, E. K. **Efeito das mutações I16T, T21V, I47T E S94A na afinidade da enzima 2-trans-Enoil-ACP (CoA) redutase de *Mycobacterium tuberculosis* pelo cofator NADH:** Estudos por simulação pela dinâmica molecular e *docking* molecular. Porto Alegre, 2004. 203p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia, Universidade do Rio Grande do Sul.

SFORÇA, M. L.; OYAMA, S. Jr.; CANDURI, F.; LORENZI, C. C. B.; PERTINHEZ, T. A.; KONNO, K.; SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; RUGGIERO NETO, J.; AZEVEDO Jr, W. F.; SPISNI, A. How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the eumenine solitary wasp. Washington, **Biochemistry**, v.43, p.5608-17, 2004.

SAHARA Y.; GOTOH, M.; KONNO, K.; MIWA, A.; TSUBOKAWA, H.; ROBINSON, H.P.; KAWAIN. A new class of neurotoxin from wasp venom slows inactivation of sodium current. Oxford, **Eur. J. Neurosci**., v.12, n.6, p.1961-70, 2000.

SHAI, Y.; OREN, Z. Diastereomers of cytolysins, a novel class of potent antibacterial peptides. Washington, **J. Biol. Chem.**, v.271, p.7305-8, 1996.

SMITH, P. E.; PETTIT, B. M.; KARPLUS, M. Stochastic dynamic simulation of the alanine dipeptide using a solvent-modified potential energy surface. Ithaca, **J. Phys. Chem.**, v.97, p.6907-13, 1993.

STEEN, C. J.; JANNIGER, C. K.; SCHUTZER, S. E.; SCHWARTZ, R. A. Insect sting reactions to bees, wasps, and ants. Philadelphia, **Int. J. Dermatol.**, v.44, p.91-4, 2005.

STRANDBERG, E.; MOREIN, S.; RIJKERS, D. T. S.; LISKAMP, R. M. J.; van der WEL, P. C. A.; KILLIAN, J. A. Lipid dependence of membrane anchoring properties and snorkeling behavior of aromatic and charged residues in transmembrane peptides. Washington, **Biochemistry**, v.41, p.7190-8, 2002.

SUKUMAR, M.; HIGASHIJIMA, T. G protein-bound conformation of mastoparan-X, a receptor-mimetic peptide. Washington, **J. Biol. Chem.**, v.267, p.21421-4, 1992.

SZOKA, F.; PAPAHADJOPOULOS, D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Washington, **PNAS**, v.75, n.9, p.4194-8, 1978.

TOKI, T.; YASUHARA, T.; NAKAJIMA, T. Isolation and sequential analysis of peptides on the venom sac of *Parapolybia indica*. Tokyo, **J. Saint. Zool.**, v.39, n.2, p.105-11, 1988.

TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, α-helical antimicrobial peptides. New York, **Biopolymers**, v.55, p.4-30, 2000.

TUICHIBAEV, M. U.; AKHMEDOVA, N. U.; KAZAKOV, I.; KORNEEV, A. S.; GAGEL'GANS, A. I. Low molecular weight peptides from the venom of the giant hornet *Vespa orientalis*: structure and function. Moskva, **Biokhimiia**, v. 53, n.2, p.219-26, 1988.

van GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications and perspectives in chemistry. Weinheim, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.29, p.992-1023, 1990.

van GUNSTEREN, W. F.; MARK, A. E. On the interpretation of biochemical data by molecular dynamics computer simulation. Berlin, **Eur. J. Biochem.**, v.204, p.947-61, 1992.

van GUNSTEREN, W. F.; HÜNENBERGER, P. H.; MARK, A. E.; SMITH, P. E.; TIRONI, I. G. Computer simulation of protein motion. Amsterdam, **Comp. Phys. Commun.**, v.91, p.305-19, 1995.

VETTER, R. S., VISSCHER, P. K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. Philadelphia: **Int. J. Dermatol.**, v.37, p.481-96, 1998.

ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of precursor. Washington, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p.5449-54, 1987.

ZHONG, L.; JOHNSON, W. C., JR. Environment affects amino acid preference for secondary structure. Washington, **PNAS**, v.89, p.4462-5, 1992.

WATERHOUS, D. V.; JOHSON, W. C., JR. Importance of environment in determining secondary structure in proteins. Washington, **Biochemistry**, v.33, p.2121-8, 1994.

WAKAMATSU, K.; OKADA, A.; MIYAZAWA, T.; OHYA, M.; HIGASHIJIMA, T. Membrane-bound conformation of mastoparan-X, a G-protein-activating peptide. Washington, **Biochemistry**, v.31, n.24, p.5654-60, 1992.

WHITMAN, D. W.; BLUM, M. B.; ALSOP, D. W. Allomones: chemicals for defense. In: EVANS, D. L.; SMITH, J. (Eds.) **Insect defenses**. New York, State University of New York Academic Press, 1990. p.289-351.

WIEPRECHT, T.; DATHE, E.; KRAUSE, E.; BEYERMANN, M.; MOLLOY, W. L.; MacDONALD, D. L.; BIERNET, M. Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. Amsterdam, **FEBS Lett**., v.417, p.135-40, 1997.

WU, M.; HANCOCK, R. E. W. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmatic membrane. Washington, **J. Biol. Chem.**, v.274, p.29-35, 1999.

YANG, L.; HARROUN, T. A.; WEISS, T. M.; DING, L.; HUANG, W. Barrel-stave modelor toroidal model? A case study on melittin pores. New York, **Biophysical Journal**, v.81, n.3, p.1475-85, 2001.

YOKOTA, H.; TSUBOKAWA, H.; MIYAWAKI, T.; KONNO, K.; NAKAYAMA, H.; MASUZAWA, T.; KAWAI, N. Modulation of synaptic transmission in hippocampal CA1 neurons by a novel neurotoxin (beta-pompilidotoxin) derived from wasp venom. Chichester, **Neurosci. Res.**, v.41, n.4, p.365-71, 2001.