

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 20/05/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Taisa Giordano Viegas

Efeito do pH e da composição lipídica na interação do peptídeo antimicrobiano MP1 e seu análogo H-MP1 com membranas modelo

São José do Rio Preto
2019

Taisa Giordano Viegas

Efeito do pH e da composição lipídica na interação do peptídeo antimicrobiano MP1 e seu análogo H-MP1 com membranas modelo

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq- Processo 167069/2014-4

Orientador: Prof. Dr. João Ruggiero Neto

São José do Rio Preto
2019

V656e Viegas, Taisa Giordano
Efeito do pH e da composição lipídica na interação do peptídeo antimicrobiano MP1 e seu análogo H-MP1 com membranas modelo / Taisa Giordano Viegas. -- São José do Rio Preto, 2019
109 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: João Ruggiero Neto

1. Biofísica. 2. Antibióticos peptídicos. 3. Lipossomas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Taisa Giordano Viegas

Efeito do pH e da composição lipídica na interação do peptídeo antimicrobiano
MP1 e seu análogo H-MP1 com membranas modelo

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq– Processo 167069/2014-4

Comissão Examinadora

Prof. Dr. João Ruggiero Neto
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araujo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Marcia Perez dos Santos Cabreira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Mario Sergio Palma
UNESP – Câmpus de Rio Claro

Prof^a. Dr^a. Rosangela Itri
USP – Campus São Paulo

São José do Rio Preto
20 de maio de 2019

Agradecimento

Agradeço à minha família pelo amor, confiança e apoio, sem o qual certamente eu não teria conseguido chegar até aqui! Em especial, aos meus pais Mariza e José Milton, que sempre me motivaram e me mostraram o quanto era importante estudar.

Ao meu irmão Rafael, meu primeiro professor e maior incentivador na carreira científica.

Ao Matheus, pelo seu companheirismo, por toda a sua capacidade de compreensão, amor e por sua confiança em mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Ruggiero Neto, pela oportunidade, orientação, paciência, disponibilidade e seus ricos ensinamentos desde a iniciação científica.

Aos companheiros do laboratório Dayane e Kenneth, pela companhia e toda ajuda.

A todos os amigos que ganhei no Departamento de Física, que vivenciaram momentos de estudo, de tensão, de cafés e muitas risadas no decorrer desta jornada. Em especial cito, representando todos, Josimar, Natália, Tiba, Jesus, Goiás, Manu, Thiago, Rafaela, Paulo, Ingrid, Fernando, Guilherme e Gabriela.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, por partilharem seus conhecimentos.

Aos técnicos de laboratório por todo apoio, em especial ao Barbosa que sempre me socorreu.

A todos os funcionários da UNESP que, com seus trabalhos cotidianos, tornaram possível a produção do presente trabalho.

Aos professores da banca, Dr. Alexandre Suman de Araujo, Dr^a. Marcia Perez dos Santos Cabreira, Dr. Mario Sergio Palma e Dr^a. Rosangela Itri.

Ao Prof. Dr. Lucas Fugikawa e Guilherme Rodrigues pelo sistema de injeção acoplado ao microscópio.

À CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Peptídeos líticos com propriedades antimicrobianas são catiônicos e atuam na membrana celular desestabilizando o empacotamento lipídico levando a célula à lise. Polybia-MP1 ou MP1 (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂) é um potente bactericida, não hemolítico e não citotóxico que também inibe a proliferação de células de câncer. Ambas as atividades, bactericida e inibitória, envolvem lipídios aniônicos e pH do ambiente diferente do fisiológico. O potencial eletrostático e o pH da solução podem modular a carga do peptídeo com presença simultânea de resíduos ácidos e básicos. Neste trabalho investigamos o efeito da modulação de carga na afinidade e na eficiência lítica em vesículas lipídicas. Para esta tarefa a eficiência do MP1 em vesículas lipídicas foi comparada com a do análogo H-MP1 em que as histidinas substituíram as lisinas. Dicroísmo circular, fluorimetria, potencial zeta e microscopia óptica foram usados para investigar a ação desses peptídeos em vesículas unilamelares grandes e gigantes (LUVs e GUVs) de diferentes composições lipídicas com o pH da solução fixado em 5,5, 6,5 e 7,4. A carga do MP1 foi menos sensível ao potencial da vesícula e ao pH da solução, enquanto a carga do H-MP1 foi fortemente modulada, sendo maior em solução ácida, mas ainda menor que MP1. A modulação da carga do H-MP1 conferiu maior afinidade e desempenho lítico em solução ácida, enquanto MP1 foi melhor em pH neutro. MP1 apresentou maior atividade de permeação nas vesículas lipídicas nos três pHs investigados em comparação ao H-MP1. O vazamento induzido em GUV única foi caracterizado por um tempo de retardo da ordem de minutos seguido pela liberação do conteúdo da GUV em alguns segundos. O tempo de retardo e a permeabilidade são dependentes do pH e da concentração de peptídeo. Os resultados confirmam que a inserção desses peptídeos na fase lipídica perturba o empacotamento de lipídios, levando à formação de poros.

PALAVRAS-CHAVE: Peptídeos antimicrobianos, vesículas lipídicas, método de GUV única.

ABSTRACT

Lytic peptides with antimicrobial properties are cationic and act on the lipid cell membrane, destabilizing the lipid-packing leading to the cell lysis. Polybia-MP1 or MP1 (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂) is a potent bactericide, non-hemolytic, and non-cytotoxic that inhibits cancer cell proliferation. Both the bactericide and the inhibitory activities involve anionic lipids and milieu pH different from the physiological one. The electrostatic potential and the solution pH can potentially modulate the net charge of a peptide with the simultaneous presence of acidic and basic residues. This thesis investigated the effect of this charge modulation on the affinity and on the lytic efficiency in anionic vesicles. For this task, the affinity to and leakage efficiency in anionic vesicles of MP1 was compared with those of its analog H-MP1 in which histidines substituted the lysines. Circular dichroism, fluorimetry, zeta potential, and optical microscopes were used to investigate the action of these peptides in anionic large and giant unilamellar vesicles (LUVs and GUVs) of different compositions and the solution pH fixed at 5.5, 6.5 and 7.4. MP1 net charge was less sensitive to the vesicle potential and solution pH, while HMP1 charge was strongly modulated being larger at acidic solution but still smaller than MP1. The HMP1 charge modulation imparted higher affinity and lytic performance at acidic solution while MP1 was better at neutral pH. MP1 showed higher permeating activity in lipid vesicles in the three pH investigated in comparison to H-MP1. The leakage induced in single GUVs was characterized by a lag-time of an order of minutes followed by the release of GUV content in a few seconds. The lag-time and permeability were dependent on the pH and peptide concentration. The results support that the insertion of these peptides into the lipid phase disturbs the lipid-packing leading to pore formation.

KEYWORD: *Antimicrobial peptides, lipid vesicles, single GUV method.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Seção transversal da membrana com proteínas inseridas na bicamada fosfolipídica proposto por Singer e Nicholson. Ampliado a estrutura de um fosfolipídio genérico que compõe a membrana. Imagem modificada de <https://openstax.org/details/books/biology>.....20
- Figura 2 - Esquema representativo de membranas de bactérias Gram-positivas e Gram-Negativas. Modificado de <http://www.sigmaaldrich.com>.....21
- Figura 3 - Exemplos de mudanças nos aspectos físicos das membranas devido às variedades de lipídios. Modificada de (HOLTHUIS; MENON, 2014).....22
- Figura 4 - Diagrama esquemático do princípio de uma medida usando uma suspensão de LUVs. Modificado de (YAMAZAKI, 2008).....23
- Figura 5 - Diagrama esquemático do princípio do método de GUV única. Modificado de (YAMAZAKI, 2008).....24
- Figura 6 - Representação dos mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos. Adaptado de (PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012).....26
- Figura 7 - Estruturas dos fosfolipídios utilizados. Figura adaptada de <http://avantilipids.com>.29
- Figura 8: Imagem de um extrusor. Figura adaptada de www.avantilipids.com.....30
- Figura 9 - Experimento de DLS. (A) Representação de produção de perfis de interferência decorrente do espalhamento de luz coerente por partículas em suspensão. (B) Intensidade detectada em função do tempo devido ao deslocamento das partículas. (C) Gráfico da curva de auto correlação de intensidade espalhada em função do tempo. Figura adaptada de (DIALETACHI, 2017).....31
- Figura 10 - Configuração do feixe duplo. Modificado de (ELGHRAOUI; LO; DIEGO, 2010).33
- Figura 11 - Luz polarizada circularmente sentido horário. (A) Os vetores campo elétricos de feixes polarizados ortogonalmente 90° fora de fase. (B) Os componentes x e y são mostrados nos pontos ao longo do eixo z rotulados 1 a 4, com seus respectivos vetores resultantes. (C) As somas vetoriais em (B) foram projetadas em um plano normal ao sentido z, demonstrando que a ponta do vetor elétrico segue um caminho circular quando visto ao longo da direção de propagação. (D) A luz polarizada circularmente representada, mostrando o vetor elétrico como uma função da posição ao longo da direção de propagação. Note que a ponta do vetor elétrico forma uma hélice destra. Figura adaptada de (FASMAN, 1996).....34
- Figura 12 - (A) Componentes circularmente polarizadas E_H (no sentido horário em vermelho) e E_A (no sentido anti-horário em azul) com magnitudes diferentes que resultam em uma luz

elípticamente polarizada (elipse em verde). (B) Elipticidade, tangente obtida pela razão entre o menor e do maior eixo da elipse. Adaptado de (VERLY, 2010).....	35
Figura 13 - Espectros de dicroísmo circular característicos para peptídeos estruturados. Adaptado de (ALVES, 2012).....	36
Figura 14 - Diagrama de Jablonski representando os processos de excitação e emissão eletrônica. No lado esquerdo do diagrama estão os estados de singleto (esses estados mantêm os estados de rotação combinados + ½ e -½ dos elétrons). S ₀ é o estado fundamental. S ₁ e S ₂ são estados singulares excitados. À direita do diagrama estão os estados de tripleto em que um elétron, impulsionado para um novo orbital também sofreu uma reversão subsequente na rotação, de modo que um par de elétrons esteja paralelo. Figura adaptada de (LICHTMAN; CONCHELLO, 2005).....	39
Figura 15 - Esquema de vazamento de vesículas com um marcador que apresenta autossupressão. Adaptado de (NASCIMENTO; DO, 2014).....	41
Figura 16 - Esquema do método para induzir interação de substâncias com uma única vesícula gigante. Modificada de (TAMBA; YAMAZAKI, 2005).....	43
Figura 17 - Microscópio invertido Olympus IX71.....	44
Figura 18 - A luz do condensador passa pela fenda e ilumina amostra. Subsequentemente, a luz é desviada para as partes opacas ou transparentes do modulador, produzindo uma impressão de imagem tridimensional, semelhante a um relevo. Modificado de https://www.leicamicrosystems.com	44
Figura 19 - Esquema e componentes de um microscópio invertido de fluorescência. Adaptado de https://www.olympuslifescience.com	46
Figura 20 - Espectros de dicroísmo circular, elipticidade molar em função do comprimento de onda, (A) dos peptídeos H-MP1 (símbolos preenchidos) e MP1 (símbolos abertos) a 10µM, em tampão pH 7,4 (preto), 6,4 (azul) e 5,5 (cinza); (B) H-MP1 na presença de vesículas de POPC:POPG e (C) MP1 na presença de vesículas de POPC:POPG. As concentrações de vesículas apresentadas são 50µM (vermelha), 100 µM(verde) e 300 µM (rosa) em pH 5,5.....	52
Figura 21 - Espectros de dicroísmo circular dos peptídeos na presença 300µM de LUVs de 7POPC: 3POPG em tampão pH 7,4 (azul), 6,5 (verde) e 5,5 (vermelha) (A) 10 µM H-MP1 e (B) 10 µM MP1.....	54
Figura 22 - Isotermas de adsorção: elipticidade molar normalizada em 222 nm em função da concentração de lipídios; a linha sólida é obtida pelo ajuste da equação não linear Equação 12), para o peptídeo (A) 10 µM de H-MP1 e (B) 10 µM de MP1 nos pHs 5,5 (triângulo), 6,5 (círculos) e 7,4 (quadrados).....	54

- Figura 23 - (A) Constante de partição K_p ($10^3 M^{-1}$) em função do pH da solução, obtidas por titulações com vesículas de 7POPC:3POPG. (B) Fração de hélice induzida nos peptídeos pela interação com as LUVs de POPC:POPG na razão $[P]/[L]= 0,02$ e fração máxima de hélice obtida a partir dos valores do ajuste dos dados experimentais.....55
- Figura 24 - Potencial zeta (mV) em função do pH. Valores obtidos por medidas de potencial zeta de 50 μM de LUV formada por POPC:POPG e das vesículas na presença e 5 μM de H-MP1 e MP1.....56
- Figura 25- Gráficos de Stern-Volmer dos peptídeos MP1(5 μM) e H-MP1(5 μM). Supressão da fluorescência do triptofano por acrilamida em tampão e na presença de 500 μM de LUVs compostas por POPC:POPG. As linhas contínuas são os melhores ajustes obtidos com a equação de Stern-Volmer para supressão estática. (A) pH 7,4 e (B) pH 5,5.....57
- Figura 26 - Cinética de vazamento de calceína de 50 μM de LUVs compostas por POPC:POPG com adição do de 2,5 μM de MP1 e H-MP1 em pH 7,4 e 5,5.....59
- Figura 27 - (A) Curvas de dose-resposta da atividade lítica de H-MP1 (símbolos preenchidos) e MP1(símbolos abertos) em pH 5,5, 6,5 e 7,4 na presença de 100 μM de vesículas à 25 °C depois de 10 min de interação com os peptídeos; (B) Valores de concentração de peptídeo necessária para que ocorra o vazamento de 50% do conteúdo da LUV (EC_{50}).....60
- Figura 28 - Efluxo de calceína de uma única vesícula gigante de 7POPC: 3POPG induzido por 10 μM de H-MP1 em pH 7,4., 6,5 e 5,5. (A) Imagem de contraste de fase antes de iniciar a adição do peptídeo, (B) Imagem de fluorescência do marcador rodamina-PE antes da adição do peptídeo, (C) Imagens de fluorescência da GUV obtidas ao longo do tempo, após o início da injeção de H-MP1, (D) Membrana marcada por rodamina-PE depois da perda total de fluorescência no interior da GUV e (E) Imagem de contraste de fase após perda total de fluorescência no interior da GUV. A barra de escala de 20 μm61
- Figura 29 - Efluxo de calceína de uma única vesícula gigante de 7POPC: 3POPG induzido por 10 μM de MP1 em pH 7,4 e 5,5. (A) Imagem de contraste de fase antes de iniciar a adição do peptídeo, (B) Imagem de fluorescência do marcador rodamina-PE antes da adição do peptídeo, (C) Imagens de fluorescência da GUV obtidas ao longo do tempo após o início da injeção do peptídeo MP1, (D) Membrana marcada por rodamina-PE depois da perda total de fluorescência no interior da GUV e (E) Imagem de contraste de fase após perda total de fluorescência no interior da GUV. A barra de escala de 20 μm62
- Figura 30 - Curso temporal da alteração da concentração de calceína encapsulada obtido pelas medidas de intensidade de fluorescência do GUVs de POPC:POPG (estrela) e da GUV ao interagir com 10 μM de H-MP1 nos pHs 5,5 (triângulo), 6,5 (círculos) e 7,4(quadrados).....63
- Figura 31 - (A) Sequência temporal das imagens de contraste de fase de uma GUV única composta por 7POPC: 3POPG durante a injeção de 4 μM de H-MP1 no pH 5,5. A barra azul na primeira imagem corresponde a 20 μm . (B) Nível de cinza em função da distância calculado através do equador das imagens correspondentes em (A) pelo software IMAGEJ.....64

Figura 32 - Tempo de retardo em função da concentração de peptídeo injetado próximo à vesícula (A) H-MP1 e (B) MP1 nos pHs 5,5 (triângulos), 6,5 (círculos) e 7,4 (quadrados). Os valores de tempos são valores médios calculados em um conjunto de pelo menos 15GUVs...65

Figura 33 - Histogramas de vazamento de GUV. Histogramas de vazamentos fracionários para 20 GUVs independentes de POPC:POPG após 50s do início da injeção de 10 μ M(A) de MP1 e (B) de H-MP1 em pH 7,4 (barras pretas) e pH 5,5 (barras cinzas). As GUVs individuais estão ordenadas da esquerda para a direita do menor para a maior % de vazamento.....66

Figura 34 - Dependência log-linear da concentração de calceína no interior da GUV em função do tempo contabilizado após o tempo de retardo: $-R/3\ln(c) (10^{-6})$ vs t (s), induzido por 10 μ M de MP1 (símbolos abertos) e 10 μ M de H-MP1 (símbolos fechados) em GUVs de 7POPC: 3POPG nos pHs 7,4 (quadrados), 6,5 (círculos) e 5,5 (triângulos).....66

Figura 35- Permeabilidade média induzida em função da concentração de MP1 calculada a partir da análise das imagens de GUVs independentes de POPC:POPG em pH 7,4 gravadas por microscopia de fluorescência (no mínimo 15 GUVs) e microscopia de contraste de fase (no mínimo 8GUVs).....67

Figura 36 - Permeabilidade media induzida em função da concentração de peptídeo nos pHs7,4, 6,5 e 5,5 obtida das imagens de microscopia das GUV de POPC:POPG sob fluxo constante de (A) H-MP1 e (B) MP1. Valores médios calculados para um conjunto de no mínimo 15 GUVs.68

Figura 37 - Imagens em sequência temporal da interação do MP1 com GUVs compostas de 7POPC: 3POPG em pH 7,4. A primeira sequência de cada figura é obtida pela visualização da vesícula por microscopia de fluorescência. Nesse caso, a primeira e a última imagem dessa sequência são obtidas antes e após a interação do peptídeo, respectivamente. A segunda sequência é obtida pela visualização por microscopia de contraste de fase. (A) É possível observar o aparecimento de um macro poro na membrana, seguido de diminuição do raio da GUV concomitante com o vazamento do corante encapsulado. (B) Além da perda do corante encapsulado, a vesícula apresenta regiões mais densas na sua membrana e (C) explosão da vesícula acompanhada da formação de massa amorfa provavelmente de fosfolipídios e peptídeos..... 68

Figura 38 - Porcentagem de modificações observadas nas GUVs durante a interação entre os peptídeos 10 μ M de H-MP1 e 10 μ M de MP1 com vesículas de POPC:POPG em pH 7,4 e 5,5.Porcentagem de GUVs que sofreram a ruptura na bicamada lipídica está representada na cor branca, GUVs tiveram o conteúdo interno vazado sem modificações visíveis na bicamada lipídicas representadas de cinza claras, GUVs que durante o vazamento apresentaram regiões mais escuras na bicamada (domínios) em cinza escura e vesículas que tiveram redução do raio durante o vazamento em azul claro.....70

Figura 39 - Porcentagem de modificações observadas nas GUVs durante a interação entre os peptídeos 6 μ M de H-MP1 e 6 μ M de MP1 com vesículas de POPC:POPG em pH 7,4 e 5,5. Porcentagem de GUVs que sofreram a ruptura na bicamada lipídica está representada na cor

branca, GUVs tiveram o conteúdo interno vazado sem modificações visíveis na bicamada lipídica representadas de cinza clara, GUVs que durante o vazamento apresentaram regiões mais escuras na bicamada (domínios) em cinza escura, GUVs que tiveram redução do raio durante o vazamento em azul claro e GUVs onde nenhuma modificação foi observada durante o período do experimento representadas na cor amarelo.....71

Figura 40 - Espectro de dicroísmo circular, elipticidade molar versus comprimento de onda para os peptídeos H-MP1 (símbolos preenchidos) e MP1 (símbolos abertos) a 10 μ M, em tampão (preto) e após o equilíbrio, com LUVs de POPC:POPS a 50 μ M (vermelha), 100 μ M (azul) e 300 μ M (verde) em pH 5,5.....72

Figura 41 - Espectro de dicroísmo circular de 10 μ M H-MP1 (símbolos preenchidas) e 10 μ M MP1 (símbolos vazios) após 3 min da interação com 300 μ M de LUVs composta por (A) POPC:POPS; (B) POPC:POPS:POPE e (C) POPC:POPE em tampão pH 7,4 (preto), 6,5 (azul) e 5,5 (cinza).....73

Figura 42 - (A) Isotermas de adsorção: elipticidade molar normalizada em 222 nm em função da concentração de lipídios. A linha contínua foi obtida pelo ajuste da equação não linear. (A), (B) e (C) 10 μ M H-MP1; (D), (E) e (F) 10 μ M MP1. As LUVs são compostas por POPC:POPS, POPC:POPS:POPE e POPC:POPE nos pHs 7,4 (quadrado), 6,5 (círculo) e 5,5 (triângulo)....74

Figura 43 - Constante de partição ($10^3 M^{-1}$) em função do pH, obtidas pelo ajuste dos dados de CD das titulações dos peptídeos (A) H-MP1 e (B) MP1 com vesículas de POPC:POPS (cinza), POPC:POPS:POPE (cinza claro) e POPC:POPE (branco).....74

Figura 44 - Fração helicoidal dos peptídeos (A), (B) e (C) H-MP1 e (D), (E) e (F) MP1 em função do pH, na presença de LUVs compostas por POPC:POPS, POPC:POPS:POPE e POPC:POPE. As frações helicoidais calculadas a partir dos dados experimentais de dicroísmo circular no máximo (saturação) em 500 μ M de lipídios ($[P]/[L]=0,02$) e fração de hélice máxima, calculada pelos parâmetros obtidos das isotermas de Langmuir.....75

Figura 45 - Potencial zeta (ξ) de vesículas lipídicas na presença de 5 μ M de MP1 (barras listradas) e 5 μ M de H-MP1 (barras cinzas escuro) em função do pH do meio. Vesículas compostas por (A) 9POPC:1POPE, (B) 8POPC:2POPS e (C) 7POPC:2POPS:1POPE.....76

Figura 46 - Gráficos de Stern-Volmer dos peptídeos H-MP1 (A e B) e MP1 (C e D). Supressão da fluorescência do triptofano por acrilamida em tampão e na presença de LUVs compostas por POPC:POPS (triângulos), POPC:POPE (triângulo invertido) e POPC:POPS:POPE (círculo). As linhas contínuas são os melhores ajustes obtidos com as equações de Stern-Volmer para supressão estática nos pHs (A e C) pH 7,4 e (B e D) pH 5,5.....78

Figura 47 - (A) Curvas de dose-resposta da atividade lítica de H-MP1 (símbolos preenchidos) e MP1 (símbolos abertos) em pH 5,5 e 7,4 na presença de 100 μ M de LUVs de POPC:POPS à 25 °C, depois de 10 min; (B) Valores de concentração de peptídeo necessária para que ocorra o vazamento de 50% do conteúdo encapsulado na LUV (EC_{50}).....80

Figura 48 - Efluxo de calceína de uma única vesícula gigante de 8POPC: 2POPS induzido por 10 μ M de H-MP1 em pH 5,5. (A) Imagem de contraste de fase antes de iniciar a adição do peptídeo, (B) Imagem de fluorescência do marcador rodamina-PE antes da adição do peptídeo, (C) Imagens de fluorescência da GUV obtidas ao longo do tempo após o início da injeção de H-MP1, (D) Membrana marcada por rodamina-PE depois da total perda de fluorescência no interior da GUV, (E) Imagem de contraste de fase após total perda de fluorescência no interior da GUV e (F) Imagens de contraste de fase de outra GUV independente da primeira, obtidas ao longo do tempo após o início da injeção de H-MP1. A barra de escala de 20 μ m.....81

Figura 49 - Tempo de retardo médio em função da concentração de peptídeo. Experimentos realizado com a injeção de H-MP1 (símbolos preenchidos) e MP1 (símbolos abertos) nas GUVs compostas por (A) POPC:POPS, (B) POPC:POPS:POPE e (C) POPC:POPE, nos pHs 7,4 (quadrado) e 5,5 (triângulo).....82

Figura 50 - Interação de GUVs de POPC:POPS (8:2) nos pHs 7,4 (quadrados), 6,5 (círculos) e 5,5 (triângulos). Concentração de H-MP1 10 μ M. (A) Concentração de calceína no interior da GUV em função do tempo, calculada pela Eq. (Equação 17), durante a injeção de H-MP1. (B) Dependência log-linear da concentração de calceína no interior da GUV em função do tempo: $-R/3\ln(c) (10^{-6})$ vs t (s) induzido por MP1 (símbolos abertos) e H-MP1 (símbolos fechados).83

Figura 51 - Histogramas de vazamento de GUV. Histogramas de vazamentos de GUVs individuais após 50 segundos do início da injeção de 10 μ M de MP1 (A) e 10 μ M de H-MP1 (B) nos pHs 5,5 (barras cinzas) e 7,4 (barras pretas). GUVs individuais estão ordenadas da esquerda para a direita do menor para a maior % de vazamento. As composições lipídicas são (A1) e (B1) POPC:POPS, (A2) e (B2) POPC:POPS:POPE e (A3) POPC:POPE.....84

Figura 52 - Permeabilidade media induzida por H-MP1 (A), (B) e (C) e MP1 (D), (E) e (F) nos pHs 7,4 (quadrado preto) e 5,5 (triângulo cinza) obtida a partir dos dados de GUV compostas por POPC:POPS, POPC:POPS:POPE e POPC:POPE.....85

Figura 53 - Porcentagem de modificações observadas nas GUVs durante a interação entre os peptídeos 10 μ M de H-MP1 e 10 μ M de MP1 com vesículas de POPC:POPS em pH 7,4 e 5,5. Porcentagem de GUVs que sofreram a ruptura na bicamada lipídica está representada na cor branca, GUVs tiveram o conteúdo interno vazado sem modificações visíveis na bicamada lipídicas representadas de cinza claras, GUVs que durante o vazamento apresentaram regiões mais escuras na bicamada (domínios) em cinza escura, GUVs que aumentaram o raio durante a observação e GUVs que tiveram redução do raio durante o vazamento em azul-claro86

Figura 54 - Porcentagem de modificações observadas nas GUVs durante a interação entre os peptídeos 10 μ M de H-MP1 e 10 μ M de MP1 com vesículas de POPC:POPS:POPE em pH 7,4 e 5,5. Porcentagem de GUVs que sofreram a ruptura na bicamada lipídica está representada na cor branca, GUVs tiveram o conteúdo interno vazado sem modificações visíveis na bicamadas lipídicas representadas de cinza claras e GUVs que durante o vazamento apresentaram regiões mais escuras na bicamada (domínios) em cinza escura.....87

Figura 55 - Porcentagem de modificações observadas nas GUVs durante a interação entre os peptídeos 10 μ M de H-MP1 e 10 μ M de MP1 com vesículas de POPC:POPE em pH 7,4 e 5,5. Porcentagem de GUVs que sofreram a ruptura na bicamada lipídica está representada na cor branca, GUVs tiveram o conteúdo interno vazado sem modificações visíveis na bicamadas lipídicas representadas de cinza claras e GUVs onde nenhuma modificação foi observada durante o período do experimento representadas na cor amarelo.....88

Figura 56 - Fração de GUVs de 8POPC:2POPS intactas obtidas dos histogramas para 10 μ M MP1 (símbolo aberto) e 10 μ M HMP1 (símbolo fechado) em pH 5,5. A linha contínua representa um ajuste numérico.....94

Figura 57 - Intensidade da fluorescência no interior da GUV normalizada em escala logarítmica em função do tempo.....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Raios hidrodinâmicos (nm) medidos por DLS de 50 μ M de LUVs nas composições 7POPC:3POPG, 8POPC:2POPS, 9POPC:1POPE e 7POPC:2POPS:1POPE nos pHs 5,5 e 7,4.....	49
Tabela 2- Potencial zeta (ξ) e Potencial de superfície (Ψ_0) das LUVs, calculados a partir dos resultados experimentais de potencial zeta usando camada de cisalhamento de 2Å da superfície. Os desvios padrão foram obtidos a partir de, pelo menos, três medições.....	50
Tabela 3- Frações de protonação do ácido aspártico, histidina e N terminal, calculados pela Equação 22 com os respectivos potenciais de superfícies. Carga efetiva dos peptídeos (z_{ef}) H-MP1 e MP1 em.....	51
Tabela 4- Raio hidrodinâmico medido por DLS de 50 μ M de LUVs compostas por POPC:POPG e 50 μ M de LUVs após 3 min na presença de 5 μ M de MP1 e H-MP1.....	57
Tabela 5- Constantes de supressão de Stern-Volmer para 5 μ M de MP1 e H-MP1 em solução 150mM de NaCl e relação entre as constantes de Stern-Volmer na presença de 500 μ M de LUVs compostas por POPC:POPG e em solução K_{SVL}/K_{SVS}	58
Tabela 6- Raio hidrodinâmico (nm) medidos de 50 μ M LUVs compostas por 9POPC:1POPE, 8POPC:2POPS e 7POPC:2POPS:1POPE na presença de 5 μ M de MP1 e de H-MP1 em solução 150mM NaF nos pHs 5,5 e 7,4.....	77
Tabela 7- Relação entre as constantes de supressão de Stern-Volmer de 5 μ M dos peptídeos MP1 e H-MP1 em solução 150mM de NaCl, pH 5,5 e 7,4 (K_{SVS}) e na presença de 500 μ M de LUVs em diferentes composições (K_{SVL}).....	79
Tabela 8- Constante cinética de formação de poro k_p (s^{-1}) induzidas pelos peptídeos MP1 e HMP1 em GUVs em pH 7,4 e 5,5. Valores médios calculados em conjunto de no mínimo 15 GUVs.....	95
Tabela 9 - Constantes de vazamento iniciais e finais obtidas pelos ajustes dos gráficos de $\ln(I/I_0)$ em função para as diversas composições de bicamada lipídica com 10 μ M de peptídeo nos pHs 5,5 e 7,4.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	Dicroísmo Circular
GUVs	Vesículas unilamelares gigantes
K_{leak}	Constante de vazamento
K_p	Constante de partição
K_p	Constante de formação de poros
K_{sv}	Constante de Stern-Volmer
LUVs	Vesículas unilamelares grandes
MLVs	Vesículas multilamelares
P_m	Permeabilidade média
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-fosfatidilcolina
POPE	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-fosfatidilglicerol
POPS	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina
Rhod-PE	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil)
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
Trp	Triptofano

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.2 Desenvolvimento teórico	19
1.2.1 Membranas biológicas	19
1.2.2 Peptídeos	24
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Materiais	29
3.2 Métodos	30
3.2.1 Preparação de vesículas grandes (LUVs)	30
3.2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	30
3.2.3 Potencial Zeta	32
3.2.4 Dicroísmo Circular (CD)	34
3.2.5 Espectroscopia de fluorescência	38
3.2.5.1 Supressão do triptofano por acrilamida	40
3.2.5.2 Vazamento de vesículas por fluorimetria	41
3.2.6 Preparação e observação de vesículas gigantes (GUVs)	42
3.2.7 Atividade lítica dos peptídeos em vesículas únicas (GUVs)	42
3.2.8 Microscopia óptica	43
3.2.8.1 Microscopia de contraste de fase	44
3.2.8.2 Microscopia de fluorescência	45
3.2.9 Análises das imagens das GUVs	46
4. RESULTADOS	49
4.1 Caracterização dos sistemas	49
4.2 Interação entre os peptídeos e membranas formadas por POPC:POPG (7:3)	52
4.2.1 Espectroscopia de Dicroísmo circular (CD)	52
4.2.2 Medidas de tamanho e potencial zeta	55
4.2.3 Supressão da emissão de fluorescência do triptofano por acrilamida	57
4.2.4 Atividade Lítica	58
4.2.4.1 Vazamento de LUVs seguido por fluorimetria	59
4.2.4.2 Vazamento observado por microscopia óptica	61
4.3 Interação entre os peptídeos e membranas de diferentes composições	72
4.3.1 Espectroscopia de Dicroísmo circular (CD)	72
4.3.2 Potencial zeta	76
4.3.3 Supressão da emissão de fluorescência do triptofano por acrilamida	77

4.3.4 Atividade litica	79
4.3.4.1 Vazamento de LUVs seguida por Fluorimetria.....	79
4.3.4.2 Vazamento de GUV observado por microscopia óptica	81
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS	103

CAPÍTULO 1

1. Introdução

O uso indiscriminado de antibióticos na medicina, na produção de alimentos para animais e na pecuária, aumenta a pressão seletiva e, também, a oportunidade de a bactéria ser exposta aos mesmos, facilitando a criação de mecanismos resistentes (MALIK *et al.*, 2016). Essa resistência antimicrobiana tornou-se o principal problema de saúde pública no mundo, afetando todos os países, desenvolvidos ou não (O'NEILL, 2016). Por isso, a busca por novos antibióticos e meios de controlar o impacto das bactérias resistentes constituem um grande desafio para a ciência.

Substâncias que possuem atividade antimicrobiana dirigida à membrana da bactéria têm atraído muita atenção uma vez que estas substâncias agem induzindo o vazamento do conteúdo interno das células bacterianas, matando-as rapidamente, enquanto antibióticos convencionais atuam no interior das células no processo de tradução proteica e nas etapas de replicação e transcrição (GIULIANI; PIRRI; NICOLETTO, 2007). Neste sentido, a resistência a essa classe de substâncias antimicrobianas é bastante reduzida, pois os microrganismos necessitam reestruturar completamente a membrana plasmática para impedir a ação dessas moléculas (HANCOCK; LEHRER, 1998; CESPEDES, 2009).

Os peptídeos antimicrobianos são encontrados no sistema imune de muitos organismos como insetos, anfíbios, pássaros, peixes, mamíferos, plantas e bactérias (WANG *et al.*, 2009). Por possuírem caráter catiônico estes peptídeos são seletivos a membranas aniônicas, como a superfície das membranas de bactérias, e possuem atividade lítica atribuída à desestruturação da bicamada lipídica independente de receptores químicos, o que evita que os organismos adquiram resistência, atribuindo a eles um grande potencial farmacológico (WIMLEY, 2010).

Além da atividade antimicrobiana desses peptídeos, um número crescente de estudos relata um amplo espectro de atividade citotóxica contra células cancerosas (MADER; HOSKIN, 2006; GASPAR; SALOMÉ VEIGA; CASTANHO, 2013). Ainda como uma das principais causas de morte, o câncer que é provocado pelo crescimento e disseminação de células anormais de forma descontrolada afeta milhões de pessoas. Portanto, muitos esforços têm sido dedicados na criação de novas terapias que sejam menos prejudiciais para os pacientes que os métodos hoje disponíveis, como cirurgia e quimioterapia, que têm uma taxa de sucesso relativamente baixa, assim como apresentam risco de recorrência (HARRIS *et al.*, 2011).

Assim como as membranas das bactérias, a membrana da célula cancerosa possui densidade de carga negativa, levando à hipótese de que os peptídeos antimicrobianos compartilham os mesmos princípios moleculares para a seletividade e atividade nessas células (GASPAR; SALOMÉ VEIGA; CASTANHO, 2013). Entretanto, além das características do peptídeo e lipídio, há a necessidade de uma compreensão abrangente da atividade devido aos efeitos dos fatores ambientais, como pH, força iônica, efeitos de íons específicos, etc para facilitar o desenvolvimento e aplicação desses peptídeos como terapias de drogas bem sucedidas (WALKENHORST *et al.*, 2013). Por outro lado, a caracterização desses peptídeos não é apenas interessante por causa de seu potencial uso farmacêutico, mas a análise de suas propriedades estruturais e funcionais como função do pH também permite obter um conhecimento mais geral dos mecanismos de formação de canais e atividade antibiótica (VOGT; BECHINGER, 1999a).

Nesse trabalho foi avaliada a interação do peptídeo Polybia MP1 (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂) ou simplesmente MP1, com vesículas lipídicas. O peptídeo MP1 pertence à família dos mastoparanos foi extraído do veneno da vespa nativa *Polybia paulista* (SOUZA *et al.*, 2005). Estudos anteriores mostram que ele possui atividade bactericida de amplo espectro contra bactérias Gram positivas e Gram negativas não sendo hemolítico nem citotóxico (SOUZA *et al.*, 2005). O MP1 também apresenta um efeito inibitório seletivo a proliferação das células de câncer de bexiga e próstata (WANG *et al.*, 2008), contra células leucêmicas multirresistentes (WANG *et al.*, 2009) e apresenta citotoxicidade contra linfócitos T leucêmicos, sendo seletivo ao reconhecer essas células em comparação com linfócitos saudáveis (CABRERA *et al.*, 2012). Um estudo recente mostrou que a composição lipídica pode afetar a permeação da membrana devido à ação do MP1. A presença dos lipídios PS e PE na composição da membrana influenciam na velocidade da cinética de permeação e conseqüentemente na afinidade desses peptídeos por células tumorais (LEITE *et al.*, 2015).

Estudos em simulação de dinâmica molecular do MP1 em TFE sugerem um importante papel do resíduo ácido e das posições relativas dos resíduos ácidos e básicos ao longo da sequência que auxilia no balanço das cargas, dando origem a um conjunto de pontes de hidrogênio intracadeia que estabiliza a conformação helicoidal, auxiliando no balanço entre carga e hidrofobicidade (CABRERA *et al.*, 2008).

Na expectativa de obter um peptídeo que responda a pequenas variações de pH foi sintetizado um análogo do MP1 no qual as três lisinas foram substituídas por histidinas, denominado H-MP1 (IDWHLLDAAHQIL-NH₂). Esta modificação resultou em um peptídeo com pI teórico de aproximadamente 6,8, enquanto o MP1 tem pI teórico próximo de 9,8.

Levando a um peptídeo sensível a variações do pH próximos ao pH fisiológico devido a protonação das cadeias laterais dos resíduos de histidina.

A estratégia de trocar os resíduos de lisina por histidina já vem sendo utilizada com a finalidade de aumentar a seletividade à ação desses peptídeos em ambientes ácidos (VOGT; BECHINGER, 1999; MAKOVITZKI; SHAI, 2005; MAKOVITZKI; FINK; SHAI, 2009). Estudos apontam que a vizinhança das células de tumores sólidos exibem pH mais baixo do que o encontrado nas células saudáveis em consequência da precária função vascular dos tumores, que não suprime as necessidades nutricionais e de oxigenação da rápida proliferação de células cancerígenas, desenvolvendo assim condições anaeróbicas que levam a produção de ácido láctico (MAKOVITZKI; FINK; SHAI, 2009). Devido a essa modificação causada no pH do meio próximo às células tumorais em relação às saudáveis, foi observado em estudos com peptídeos ricos em histidinas uma diminuição da toxicidade desses peptídeos as células saudáveis devido à sensibilidade adquirida à mudança de pH (MAKOVITZKI; FINK; SHAI, 2009).

Além disso, foi observado que os resíduos de histidina em posições estratégicas resultam em peptídeos antimicrobianos com atividade dependente do pH que podem torná-los ativos a pH baixo e relativamente inativo a pH neutro, podendo ser modelos úteis para o desenvolvimento de peptídeos destinados a funcionar em ambientes como o lúmen gástrico, vagina, ou focos dentários carcinogênicos de mamíferos (MAHMOUD *et al.*, 1995; VAN HOUTE; LOPMAN; KENT, 1996; LEE *et al.*, 1997). A falta relativa de atividade de peptídeos ricos em histidina a um pH neutro pode revelar-se especialmente vantajosa limitando a sua atividade a tais locais.

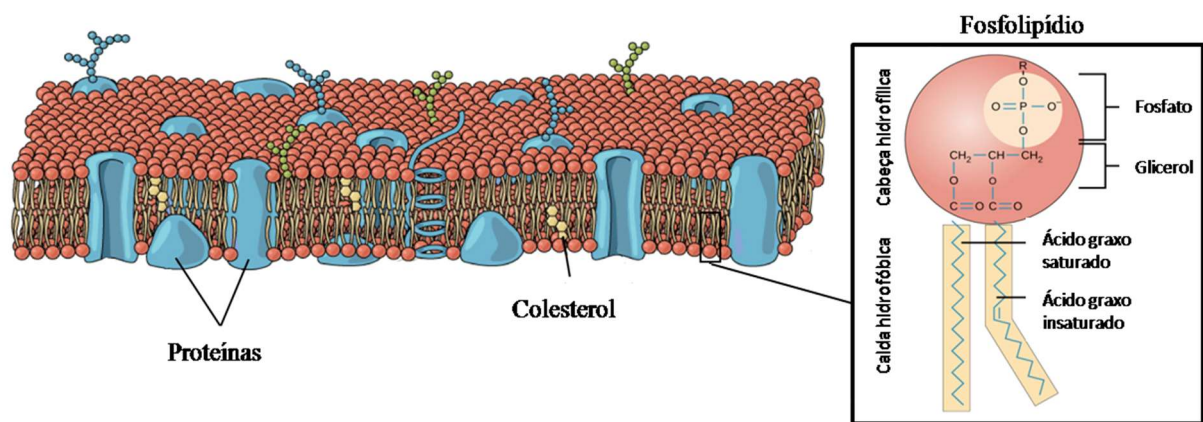
Nesse trabalho foi avaliada a interação dos peptídeos MP1 e H-MP1 com vesículas aniônicas formadas por POPC:POPG (7:3) mimetizando membranas bacterianas e POPC:POPE (9:1), POPC:POPS (8:2) e POPC:POPS:POPE(7:2:1) mimetizando células tumorais, e como esses peptídeos respondem ao pH do meio sendo este fixado nos valores de 5,5; 6,5 e 7,4. Estes sistemas foram investigados por meio de técnicas de espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular, potencial zeta/eletrocínético e microscopias de contraste de fase e de fluorescência, com o uso apropriado de LUVs e GUVs.

1.2 Desenvolvimento teórico

1.2.1 Membranas biológicas

A membrana é uma barreira física que circunda a célula com permeabilidade seletiva para o transporte de moléculas permitindo a troca de partículas entre os compartimentos extra e intracelular garantindo que as respectivas composições e osmolaridade sejam precisamente reguladas. Os elementos que compõe estruturalmente as membranas celulares são basicamente os lipídios e as proteínas (WATSON, 1971).

Figura 1: Seção transversal da membrana com proteínas inseridas na bicamada fosfolipídica proposto por Singer e Nicholson. Ampliado a estrutura de um fosfolipídio genérico que compõe a membrana. Imagem modificada de www.openstax.org/books/biology.



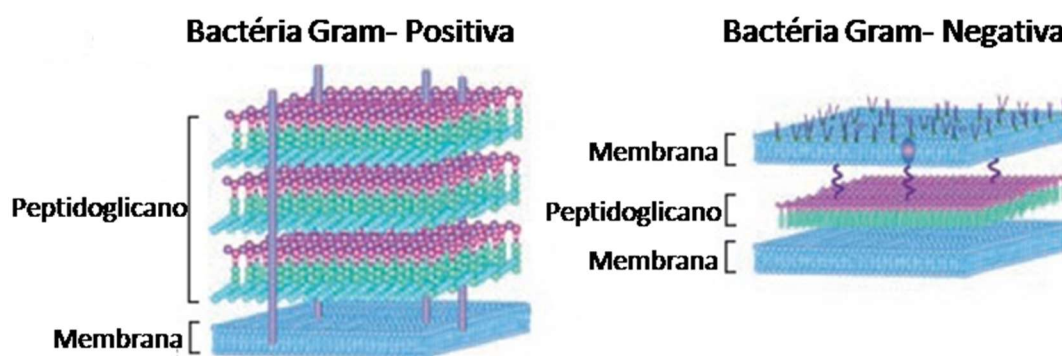
Os lipídios são moléculas anfipáticas formadas basicamente por uma parte hidrofílica (cabeça polar) e a outra parte hidrofóbica composta de ácidos graxos não polares (caudas) (NELSON; COX, 2011). Os principais tipos de lipídios encontrados em membranas biológicas são: os fosfolipídios, glicolipídios e esteróis. Dentre estes lipídios os mais abundantes são fosfolipídios, os quais consistem de duas cadeias de ácidos graxos ligadas ao glicerol e um grupo fosfato (

Figura 1). Os fosfolipídios contendo glicerol são referidos como glicerofosfolipídios. Um exemplo de um glicerofosfolipídeo comumente encontrado em membranas biológicas é a fosfatidilcolina (PC), que tem uma molécula de colina ligada ao grupo fosfato (WATSON, 1971).

O modelo de membrana celular aceito é conhecido como modelo do mosaico fluido, proposto em 1972 por Singer e Nicholson (SINGER; NICOLSON, 1972). Neste modelo, há um mosaico de moléculas de proteínas, que desempenham inúmeros papéis para o funcionamento das células, mergulhadas total ou parcialmente em uma bicamada lipídica fluida de modo que os grupos hidrofílicos dos lipídios estão voltados para face aquosa, Figura 1.

Diversos tipos de lipídios com grupos polares e porções hidrofóbicas distintas são encontrados na composição das membranas. Em células de mamíferos, a monocamada externa da membrana plasmática contém predominantemente PC e esfingomielina, enquanto fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletalona (PE) são encontrados na monocamada interna. Mudanças nessas composições lipídicas afetam as características biofísicas destas estruturas bem como o seu microambiente e podem ser um indicativo de doenças. Durante a morte celular programada (apoptose), o PS é exposto na camada externa pela ação de uma enzima tipo flípase (WATSON, 1971). Esta exposição altera a carga da membrana plasmática, uma vez que o PS apresenta carga negativa, como visto em células de câncer de leucemia, bexiga e próstata (ZWAAL; COMFURIUS; BEVERS, 2005).

Figura 2 - Esquema representativo de membranas de bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas. Modificado de www.sigmaaldrich.com.

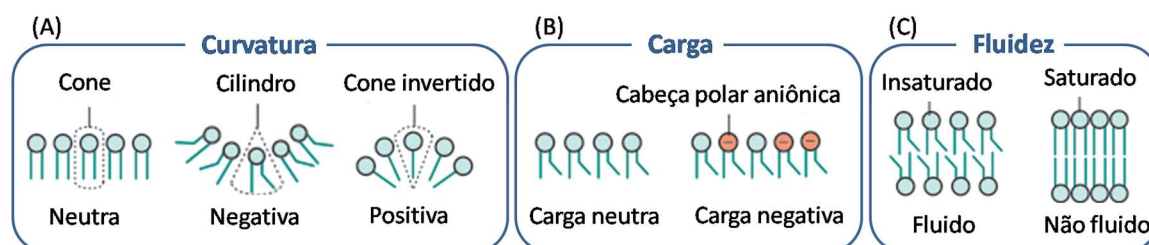


As membranas das células eucarióticas e as membranas bacterianas possuem funções similares, mas composições diferentes em relação aos fosfolipídios e outros componentes. Em geral as membranas bacterianas são compostas por lipídios aniônicos como fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) e fosfatidilserina (PS) (CRONAN, 2003), porém essas membranas bacterianas são altamente complexas, o que resulta na divisão das bactérias em duas classes distintas: bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (

Figura 2). As Gram-negativas possuem duas membranas separadas por uma camada de peptidoglicano, que confere rigidez a membrana, e a membrana externa coberta por lipossacarídeos (LPS) ancorados (KABANOV; PROKHORENKO, 2010). As bactérias Gram-positivas, por sua vez, contêm apenas uma membrana coberta por uma camada de peptidoglicano e ácido teicóico (NAVARRE; SCHNEEWIND, 1999).

As propriedades biofísicas das membranas relacionam-se com a sua composição lipídica, uma vez que os lipídios se diferenciam em comprimento, grau e posição de insaturação e composição das cabeças polares, que acarretam em variações de tamanho e carga. Estes aspectos têm papel importante na modulação de fluidez, densidade de carga superficial e tensões de curvatura da membrana. Por exemplo, os lipídios de PC podem ser representados como forma de cilindro devido ao tamanho da cabeça e os volumes das caudas, no entanto nos lipídios de PE, a seção transversal do grupo de cabeça é menor do que a seção transversal das caudas e apresenta uma forma de cone que favorece a formação de curvatura negativa (Figura 3A). Outros lipídios geram diferenças na densidade superficial de carga da membrana relacionada aos grupos de cabeça polar, como no caso do PS de caráter aniônico e o PC de caráter zwitteriônico (Figura 3B), que podem mediar interações com proteínas associadas. Além destes, existem lipídios com diferenças nas temperaturas de transição de fase devido à variedade de insaturação e comprimento das caudas hidrofóbicas, que determinam a espessura e ordenação da região hidrofóbica afetando empacotamento dos lipídios levando as membranas a serem mais ou menos fluidas (Figura 3C).

Figura 3 - Exemplos de mudanças nos aspectos físicos das membranas devido às variedades de lipídios. Modificada de (HOLTHUIS; MENON, 2014).

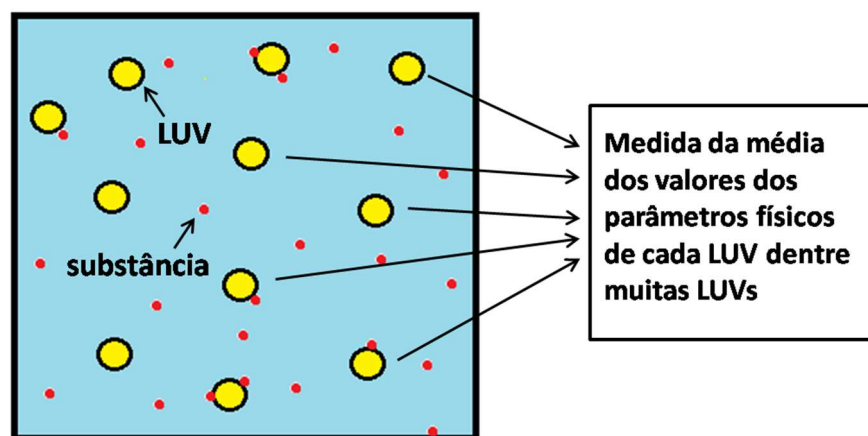


A complexidade das membranas biológicas frente a sua composição lipídica, proteica e glicoproteica dificulta a realização de estudos que visem investigar a interação de compostos ativos com as mesmas. Desta maneira, a utilização de sistemas modelo que mimetizem a composição das membranas de interesse com modelos de interesse é uma prática comum nos últimos anos (SIONTOROU *et al.*, 2017). O modelo mais simplificado de uma célula é denominado lipossomo/vesícula (WATSON, 1971). O termo vesícula é usado para designar um tipo particular de compartimento, que possui no seu interior um pequeno volume aquoso e limitado por uma ou algumas camadas finas também chamadas de membranas, compostas por moléculas anfifílicas. As vesículas que tem as membranas constituídas por fosfolipídios são chamadas de vesículas lipídicas (WALDE *et al.*, 2010).

As vesículas lipídicas podem ser classificadas segundo seu tamanho e número de lamelas. As vesículas multilamelares ou MLV (“multilamellar vesicles”) é o nome dado para vesículas que são constituídas por várias bicamadas lipídicas, aproximadamente concêntricas, com diâmetro variável entre 400 e 3500nm. A partir das MLVs podem-se obter as vesículas unilamelares, constituídas por uma única bicamada lipídica, as quais são divididas segundo seus tamanhos: as pequenas ou SUV (“small unilamellar vesicles”), com diâmetro entre 20 e 50nm, as grandes ou LUV (“large unilamellar vesicles”), de diâmetro superior a 100nm, e as gigantes ou GUV (“giant unilamellar vesicles”), com dimensões superiores a 1µm, podendo chegar às dezenas de micrometros (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007).

A maioria dos estudos biofísicos sobre a estrutura e função das membranas tem sido realizada com medidas dos parâmetros físicos das vesículas, como tamanho, formato e intensidade de fluorescência de LUVs, SUVs e MLVs em suspensão, mas por se tratar de medidas de muitas vesículas ao mesmo tempo, muita informação pode ser perdida. Por exemplo, quando se quer investigar a interação de membranas com alguma substância, pode ser que a substância induza mudanças nas propriedades físicas das vesículas, como variação do tamanho, formato e intensidade de fluorescência, além de fusão e fissão da membrana. Porém, essas mudanças não necessariamente ocorrem simultaneamente em todas as vesículas da solução, então o que se obtém usando um sistema de vesículas em suspensão é uma média de vários tipos de estágios dessas mudanças (Figura 4).

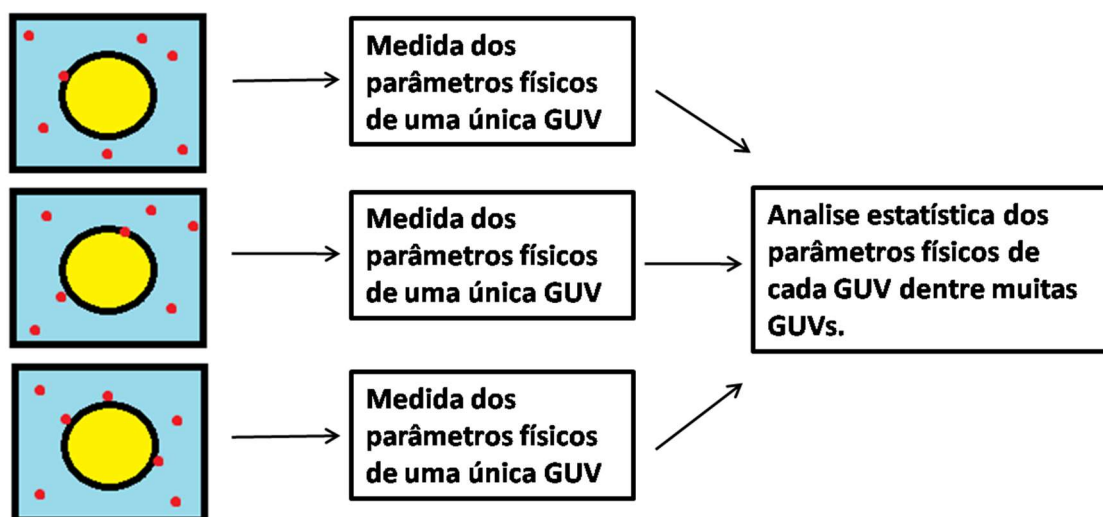
Figura 4 - Diagrama esquemático do princípio de uma medida usando uma suspensão de LUVs. Modificado de (YAMAZAKI, 2008).



Devido ao seu tamanho, o estudo usando GUVs possui vantagens sobre o uso de LUVs e SUVs quando se quer investigar propriedades físicas da membrana, como elasticidade e

modificações estruturais, pois essas vesículas podem ser observadas em tempo real por meio da técnica de microscopia óptica.

Figura 5 - Diagrama esquemático do princípio do método de GUV única. Modificado de (YAMAZAKI, 2008).



No método chamado “O método de GUV única”, apresentado por Yamazaki (YAMAZAKI, 2008) são observadas as propriedades físicas e estruturais de uma única vesícula em função do tempo e a partir de diversas análises, pode-se realizar uma estatística dos parâmetros físicos obtidos de uma única GUV dentre muitas outras, como esquematizado na Figura 5. Desse modo, é possível obter novas informações sobre estrutura e função das membranas lipídicas, assim como informações da interação de diferentes substâncias com as membranas em tempo real. Enquanto em uma suspensão de vesículas são necessários diferentes experimentos para obter essas informações.

1.2.2 Peptídeos

Peptídeos são pequenas moléculas compostas por uma sequência de resíduos de aminoácidos ligados covalentemente por meio de ligações peptídicas entre um grupo carboxila de um resíduo a um grupo amino do resíduo seguinte. De modo geral, são encontrados em peptídeos e proteínas vinte diferentes aminoácidos que diferem quanto a suas cadeias laterais com diferentes estruturas, tamanhos, cargas elétricas e hidrofobicidades.

Dentre os peptídeos, existem alguns que são considerados bioativos, pois podem apresentar atividade antimicrobiana, antifúngica, anticâncer sendo ou não hemolíticos (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006). Apesar de terem sido observadas uma enorme variedade de sequências e estruturas, esses peptídeos bioativos apresentam características comuns a todos, tais como, possuírem cadeias curtas, com até 45 resíduos de aminoácidos, carga líquida positiva devido ao excesso de resíduos básicos e conter cerca de 50% de aminoácidos hidrofóbicos (HANCOCK; LEHRER, 1998).

Devido às características dos resíduos que compõem esses peptídeos a adsorção às membranas se deve a um balanço entre interações de origem eletrostáticas e hidrofóbicas que agem em conjunto (LADOKHIN, A S; WHITE, 1999). A primeira interação entre o peptídeo e a bicamada lipídica a ser estabelecida é a eletrostática de relativamente longo alcance, que ocorre devido à atração entre os resíduos de aminoácidos catiônicos e os grupos fosfato negativamente carregados da membrana alvo. No segundo passo os peptídeos desestruturados em solução são transferidos à interface entre a solução e a membrana, seguido de uma mudança conformacional dependente do balanço hidrofílico e hidrofóbico devido à sequência de aminoácidos do peptídeo e composição dos fosfolipídios da membrana (LI *et al.*, 2012). Dentre essas estruturas secundárias, a predominante é a helicoidal, devido aos aminoácidos que compõem os peptídeos, que em sua maioria são ricos em resíduos básicos e não polares. Estes tendem a se auto organizarem por uma face polar voltada para a superfície aquosa enquanto a outra face formada por resíduos não polares se volta à bicamada, favorecendo sua estabilidade estrutural (OREN; SHAI, 1998).

A presença do peptídeo catiônico na membrana induz mudanças nos grupos mais expostos, como as cabeças polares de caráter aniônicos, que evolui para a bicamada como um todo, influenciando na distribuição de cargas, na tensão de curvatura, na fluidez da membrana e no empacotamento lipídico (BOZELLI *et al.*, 2012). Os peptídeos vão se acumulando na membrana externa até atingir uma concentração crítica que se dá quando a tensão na superfície se torna grande ao ponto de causar uma deformação, provocando a imersão dos peptídeos na bicamada. A permeabilização da membrana pelos peptídeos é descrita por modelos conhecidos como poro barril, poro toroidal e tapete, representados na Figura 6.

Figura 6 - Representação dos mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos. Adaptado de (PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012).



O mecanismo chamado Poro Barril, é obtido com os peptídeos inseridos na membrana provocando uma separação lateral dos fosfolípidios e formando um canal todo revestidos por eles. Assim os peptídeos interagem lateralmente uns com os outros estabilizando a bicamada lipídica. Nesta estrutura, os resíduos apolares interagem com a porção hidrofóbica dos fosfolípidios e os resíduos polares permanecem em contato com o solvente. Para que esse tipo de poro ocorra os peptídeos precisam ter comprimento apropriado para atravessar a membrana e formar estrutura helicoidal anfipática (PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012). No modelo denominado poro toroidal os peptídeos interagem com as cabeças polares dos fosfolípidios da membrana formando um complexo que resulta na formação de um poro devido à indução da curvatura positiva na membrana, ou seja, se liga de maneira que as cadeias apolares não entrem em contato com o peptídeo, mantendo-se interiorizados na bicamada. Diferente do boro barril, esse tipo de poro é estabilizado por uma mistura de lipídios e peptídeos, não sendo necessárias características específicas dos peptídeos para a sua formação (LI *et al.*, 2012). No modelo carpete os peptídeos se acumulam adsorvidos na membrana lipídica, paralelos a região de interface, formando uma extensa camada. Quando a concentração de peptídeos alcança um valor crítico a membrana pode ser permeada por um desbalanço de massa, micelização ou ruptura (LI *et al.*, 2012).

Dentre as características biofísicas dos peptídeos que influenciam sua atividade estão a carga líquida e a hidrofobicidade média. A carga líquida tem importância fundamental na interação inicial entre os peptídeos e as membranas devido a atração eletrostática entre eles, porém o excesso de cargas positivas pode afetar a estruturação e reduzir a atividade devido a uma repulsão eletrostática intra-cadeia e entre peptídeo-lipídio (TOSSI *et al.*, 1994). Para uma molécula com alta hidrofobicidade não é favorável permanecer em um meio polar, portanto o aumento de resíduos hidrofóbicos na sequência pode potencializar a interação entre os peptídeos e a parte polar das bicamadas, podendo levar a uma interação com membranas que não sejam do interesse biológico. Portanto, a estratégia para conseguir melhorar a atividade desses peptídeos se inicia com o desenho de peptídeos análogos, modificando suas sequências de aminoácidos original, e alterando assim o número de aminoácidos que compõe sua estrutura primária, a carga total, a hidrofobicidade e anfipacidade, em busca de melhor entendimento sobre quais alterações favorecem ou prejudicam a atividade e seletividade ao alvo específico (PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012).

Vários peptídeos bioativos foram desenvolvidos com sucesso para aplicações farmacêuticas e comerciais. Como o caso da Daptomicina, aprovada em 2003, para tratar infecções da pele, comercializada sob o nome CUBIN[®] (ISLAM; SAFDER, 2008). Outro exemplo é peptídeo glucagon similar humano (GLP-1) usado para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2, comercializado como Victoza[®] (FOSGERAU; HOFFMANN, 2014). Enquanto vários peptídeos chegaram aos testes clínicos, por exemplo, o P-113, um derivado da histatina, um peptídeo salivar humano, está em fase de testes I / II para tratar a candidíase oral que afeta pacientes imunocomprometidos. Um análogo de indolicidina, o MBI-549, está em ensaios de Fase II para o tratamento de infecções por acne. O pexiganan, derivado da magainina, está sendo desenvolvido para o tratamento de úlceras em pacientes diabéticos, com ensaios clínicos de Fase III (REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004; KANG *et al.*, 2014).

CAPÍTULO 6

6. Conclusões

Este trabalho investigou a interação entre o peptídeo MP1 e seu análogo H-MP1 com diferentes membranas lipídicas modelo e pHs. Através dos resultados das medidas espectroscópicas podemos concluir que os peptídeos interagem com as membranas lipídicas mistas compostas por fosfolipídios contendo cabeça polar de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina e fosfatidiletalona, tal que, a intensidade de sua interação é dependente do peptídeo, do pH do meio e do lipídio. Isto é, nossos resultados de CD e fluorescência nos deram suporte para concluir que os peptídeos passam de uma conformação desordenada em solução aquosa para uma conformação helicoidal quando interage com a membrana lipídica. Esta transição quantificada pela constante de partição indicou que os valores das constantes de partição do MP1 em pH 5,5 é maior em vesículas contendo POPS enquanto que em pH 7,4 foi maior para as que contém POPG. A afinidade do análogo é maior as vesículas com POPG na composição nos dois pHs.

Após a partição, os resíduos de triptofano dos peptídeos interagem com o interior hidrofóbico da membrana lipídica, como evidenciado pelos resultados dos experimentos de supressão deste resíduo por acrilamida. A inserção dos resíduos de triptofano e de outros não polares é mais profunda em todos os casos para o peptídeo MP1. A partição e inserção dos peptídeos na fase hidrofóbica da membrana gera estresse elástico na monocamada externa resultando em instabilidade, que é seguida pela abertura de poros ou defeitos que aliviam o estresse e iniciam o vazamento do conteúdo interno da vesícula. O vazamento de calceína induzido pelos peptídeos em uma suspensão de LUVs mostraram forte dependência da composição da membrana e pH. A maior eficiência lítica observada para o H-MP1 na composição 7POPC:3POPG em pH 5,5. Já na composição 8POPC:2POPS o MP1 foi mais eficiente em ambos os pHs em relação ao análogo.

O estudo do vazamento da vesícula pela técnica de GUV única ofereceu novas informações sobre as interações dos peptídeos MP1 e H-MP1 na membrana. Esses experimentos indicaram que ambos os peptídeos formam poros nas membranas. Os valores de constante de formação de poros (k_p) obtidos com $0,10 \mu\text{M}$ de MP1 foram maiores para as vesículas com fosfatidilserina, enquanto que para o análogo H-MP1 na mesma concentração, esta constante foi maior nas vesículas de POPC:POPG em pH 5,5. Os valores de k_p nas vesículas de

zwitteriônicas são menores que nas vesículas aniônicas, indicando que a interação eletrostática é um fator importante na partição e consequente formação de poros nas bicamadas lipídicas.

Com os valores de constante cinética de vazamento foi observada a existência de dois estágios de permeação induzidos pelos dois peptídeos. O primeiro estágio ocorre com a abertura dos poros e o segundo com a diminuição do tamanho do poro, o que leva a menores valores de constante de vazamento. Os valores de permeabilidade média (P_m) deram informações sobre a taxa de liberação de calceína induzida pelos peptídeos. Os valores de P_m das membranas apresentam dependência com a concentração do peptídeo, sendo encontradas permeabilidades maiores nas situações com maiores concentrações de peptídeo. Na composição de POPC:POPG a permeabilidade obtida para o H-MP1 em pH ácido é maior do que em pH neutro, e aproximadamente igual a permeabilidade induzida pelo MP1. Com o lipídio aniônico POPS as permeabilidades médias são consideravelmente maiores com a injeção de MP1 do que com o análogo H-MP1. A adição de POPE na membrana (POPC:POPS:POPE), resultou em ligeiro aumento de k_p e para o MP1 em pH neutro enquanto que para o análogo houve um decréscimo desta constante nos dois pHs.

Além da perda do conteúdo interno das GUVs, foram visualizados em alguns casos, modificações estruturais na bicamada. As maiores porcentagens de vesículas que sofreram ruptura da membrana ocorrem devido a dois fatores: um grande excesso de peptídeo ligado as vesículas e devido a presença do lipídio POPE que possui geometria com tendência em formar curvatura negativa.

Portanto, pode-se concluir que a partição do análogo H-MP1 em bicamadas lipídicas modulam a carga dos resíduos de histidinas que constituem a sequência primária do peptídeo e portanto essa substituição fez com que o peptídeo fosse seletivo tanto em relação ao pH como a composição lipídica da membrana, sendo mais efetivo na interação com membranas de POPC:POPG em pH ácido. O MP1, por sua vez, manteve sua eficiência nas vesículas de POPC:POPS indicando que além da componente eletrostática outros fatores são importantes para a interação, entretanto o MP1 é menos sensível a variação do pH do que o análogo.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. F. S. *Estudo estrutural por ¹H-rmn de peptídeos bioativos isolados da secreção cutânea de *Hypsiboas Albopunctatus* e *Leptodactylus Labyrinthicus**. 2012. Universidade Federal do Goiás, 2012.
- ARCHILHA, N. L. Interação entre um peptídeo antimicrobiano e vesículas de fosfolipídeos. p. 87, 2009.
- ARMSTRONG, K. M.; BALDWIN, R L. Charged histidine affects alpha-helix stability at all positions in the helix by interacting with the backbone charges. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 23, p. 11337–11340, 1993.
- AROURI, A. ; DATHE, M. ; BLUME, A. Peptide induced demixing in PG/PE lipid mixtures: A mechanism for the specificity of antimicrobial peptides towards bacterial membranes? *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1788, n. 3, p. 650–659, 2009.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. de; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 167–179, 2007.
- BECHINGER, B. Towards membrane protein design: pH-sensitive topology of histidine-containing polypeptides. *Journal of molecular biology*, v. 263, n. 5, p. 768–775, 1996.
- BOZELLI, J. C. *et al.* Effect of head Group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritripticin to lipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 165, n. 4, p. 365–373, 2012.
- BURCH, C. R.; STOCK, J. P. P. Phase-contrast microscopy. *Journal of Scientific Instruments*, v. 19, n. 5, p. 71, 1942.
- CAAVEIRO, J. M. M. *et al.* Interaction of wheat a-thionin with large unilamellar vesicles. *Protein Science*, v. 7, n. 12, p. 2567–2577, 1998.
- CESPEDES, G.Y. F. *Sínteses e Estudos Estrutura/Função de um Peptídeo Extraído da Rã *Hypsiboas albopunctat* e Análogos*. 2009. 94 f. Universidade Estadual Paulista, 2009.
- CRONAN, J. E. Bacterial Membrane Lipids: Where Do We Stand? *Annual Review of Microbiology*, v. 57, n. 1, p. 203–224, 2003.
- DIMOVA, R. *et al.* A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *Journal of Physics: Condensed Matter*, v. 18, n. 28, p. S1151–S1176, 2006.
- DOMINGUES, T. M.; RISKE, K. A.; MIRANDA, A.. Revealing the lytic mechanism of the antimicrobial peptide gomesin by observing giant unilamellar vesicles. *Langmuir*, v. 26, n. 13, p. 11077–11084, 2010.

DOS SANTOS CABRERA, M. P. *et al.* New insight into the mechanism of action of wasp mastoparan peptides: Lytic activity and clustering observed with giant vesicles. *Langmuir*, v. 27, n. 17, p. 10805–10813, 2011.

DOS SANTOS CABRERA, M. P. *et al.* Influence of the bilayer composition on the binding and membrane disrupting effect of polybia-MP1, an antimicrobial mastoparan peptide with leukemic T-lymphocyte cell selectivity. *Biochemistry*, v. 51, n. 24, p. 4898–4908, 2012.

DOS SANTOS CABRERA, M. P. *et al.* Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. *European Biophysics Journal*, v. 37, n. 6, p. 879–891, 2008.

EDGCOMB, S. P; MURPHY, K. P. Variability in the pKa of Histidine Side-Chains Correlates With Burial Within Proteins. v. 6, n. July 2001, p. 1–6, 2002.

EFTINK, C. A.; GHIRON, M. R. Fluorescence Quenching of Indole and Model Micelle Systems. v. 80, n. 5, 1976.

EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A. Fluorescence Quenching of Indole And Model Micelle Systems. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 80, n. 5, p. 113–122, 1976.

ELGHRAOUI, A.; LO, Y. H.; DIEGO, S. Laser Doppler Velocimetry. 2010.

DIALETACHI, E. L. G. *Espalhamento dinâmico de luz em sistemas coloidais diluídos*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FASMAN, G. D. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. 1 st editi ed. Waltham, Massachusetts: Springer Science+Business Media, LLC, 1996.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, v. 20, n. 1, 2014.

GASPAR, D.; SALOMÉ VEIGA, A.; CASTANHO, M. A. R. B. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, n. OCT, p. 1–16, 2013.

GIULIANI, A.; PIRRI, G.; NICOLETTO, S Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, v. 2, n. 1, p. 1-33, 2007.

HANCOCK, R. E. W.; LEHRER, R. Cationic peptides: A new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 2, p. 82–88, 1998.

HARRIS, F. *et al.* On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells. *Medicinal Research Reviews*, v. 10, n. 7, p. 3067–3071, 2011.

HENDERSON, A. N. *Influence of Histidine Residues , pH and Charge Interactions on Membrane-Spanning Peptides*. 2017. University of Arkansas, 2017.

HOFFMAN, R; GROSS, L. Modulation Contrast Microscope. *Applied Optics*, v. 14, n. 5, p. 1169–76, 1975.

HOLTHUIS, J. CM; MENON, A. K. Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature*, v. 510, n. 7503, p. 48, 2014.

HUNTER, Robert J. *Zeta Potential in Colloid Science : Principles and Applications*. [S.l.]: London : Academic press, 1981.

ISLAM, M. Z.; ALAM, J. M.; TAMBA, Y., KARAL, M. A. S AND YAMAZAKI, M. The single GUV method for revealing the functions of antimicrobial, pore-forming toxin, and cell-penetrating peptides or proteins. *Royal Society of Chemistry*, 2014.

ISLAM, A.; SAFDER, I. Antimicrobial peptides : Therapeutic potential as an alternative to conventional antibiotics. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences (JIPBS)*, 2008.

ITO, Amando Siuti; BERNARD, Mariana; PAZIN, Wallace Moreira. *Fluorescencia e aplicações em biofísica*. 1. ed. [S.l.]: Livraria da física, 2016.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E.W. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

JING, W. *et al.* Headgroup structure and fatty acid chain length of the acidic phospholipids modulate the interaction of membrane mimetic vesicles with the antimicrobial peptide protegrin-1. *Journal of Peptide Science*, v. 11, n. 11, p. 735–743, 2005.

KABANOV, D S; PROKHORENKO, I R. Structural analysis of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. *Biochemistry. Biokhimiia*, v. 75, n. 4, p. 383–404, 2010.

KANG, S. *et al.* Antimicrobial peptides: Therapeutic potentials. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 12, n. 12, p. 1477–1486, 2014.

KRITTANAI, C.; JOHNSON, W. C. Correcting the circular dichroism spectra of peptides for contributions of absorbing side chains. *Analytical Biochemistry*, v. 253, n. 1, p. 57–64, 1997.

LADOKHIN, A S; WHITE, S H. Folding of amphipathic alpha-helices on membranes: Energetics of helix formation by melittin. *Journal of Molecular Biology*, v. 285, n. 4, p. 1363–1369, 1999.

LADOKHIN, A. S; JAYASINGHE, S.; WHITE, S. H. How to Measure and Analyze Tryptophan Fluorescence in Membranes Properly , and Why Bother ? *Analytical biochemistry*, v. 285, n. 2, p. 235-245, 2000.

LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2^o ed. [S.l.]: Springer Science+Business Media, LLC, 1999.

LEE, I H *et al.* Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavansins . These include : Effects of pH and Salinity on the Antimicrobial Properties of Clavansins. *Microbiology*, v. 65, n. 7, p. 2898–2903, 1997.

LEITE, N. B. *et al.* PE and PS Lipids Synergistically Enhance Membrane Poration by a

Peptide with Anticancer Properties. *Biophysical Journal*, v. 109, n. 5, p. 936–947, 2015.

LI, Y. *et al.* Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, v. 37, n. 2, p. 207–215, 2012.

LICHTMAN, J. W; CONCHELLO, J. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, v. 2, n. 12, p. 910–919, 2005.

LUND, M.; JONSSON, Bo. Charge regulation in biomolecular solution. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 3, p. 265–281, 2013.

LUO, P.; BALDWIN, R. L. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: A framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry*, v. 36, n. 27, p. 8413–8421, 1997.

MADER, J. S; HOSKIN, D. W. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 15, n. 8, p. 933–946, 2006.

MAHMOUD, E. A. *et al.* Antichlamydial activity of vaginal secretion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 172, n. 4, p. 1268–1272, 1995.

MAKOVITZKI, A; FINK, A; SHAI, Y. Suppression of human solid tumor growth in mice by intratumor and systemic inoculation of histidine-rich and pH-dependent host defense-like lytic peptides. *Cancer Research*, v. 69, n. 8, p. 3458–3463, 2009.

MAKOVITZKI, Arik; SHAI, Yechiel. pH-dependent antifungal lipopeptides and their plausible mode of action. *Biochemistry*, v. 44, n. 28, p. 9775–9784, 2005.

MALIK, E *et al.* pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins , Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. *Pharmaceuticals*, v. 9, p. 1–35, 2016.

MANZINI, M. C. *et al.* Peptide:Lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1838, n. 7, p. 1985–1999, 2014.

MARTFELD, A. N.; GREATHOUSE, D. V.; KOEPPE, R. E. Ionization properties of histidine residues in the lipid bilayer membrane environment. *Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 36, p. 19146–19156, 2016.

MERTINS, Omar *et al.* Physical damage on giant vesicles membrane as a result of methylene blue photoirradiation. *Biophysical journal*, v. 106, n. 1, p. 162–171, 2014.

MATSUZAKI, K. *et al.* Relationship of Membrane Curvature to the Formation of Pores by Magainin 2. *Biochemistry*, v. 37, n. 34, p. 11856–11863, 1998.

MATSUZAKI, K. *et al.* Translocation of a Channel-Forming Antimicrobial Peptide, Magainin 2, Across Lipid Bilayers by Forming a Pore. *Biochemistry*, v. 34, n. 19, p. 6521–6526, 1995.

MONETTE, M.; LAFLEUR, M. Modulation of Melittin-Induced Lysis by Surface Charge

Density of Membranes. *Biophysical Journal*, v. 68, p. 187–195, 1995.

NASCIMENTO, J. M. Do. *Estudo da interação de peptídeos multifuncionais com modelos de biomembranas*. 2014. 149 f. Universidade Federal do Pernambuco, 2014.

NAVARRE, W W; SCHNEEWIND, O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, v. 63, n. 1, p. 174–229, 1999.

O'NEILL, Jim. More in Singapore popping vitamins, supplements. *Straits Times*, n. May, 2018.

Open Stax Biology. Disponível em: <<https://openstax.org/>>.

OREN, Ziv; SHAI, Yechiel. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science*, v. 47, n. 6, p. 451–463, 1998.

PALGUNACHARI, N; SEGREST, J. P; ANANTHARAMAIAHS, G M. Interactions of Synthetic Peptide Analogs of the Class A Amphipathic Helix with Lipids. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 10, p. 7185–7191, 1994.

PASUPULETI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; MALMSTEN, M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 32, n. 2, p. 143–171, 2012.

PLESNIAK, Leigh A. *et al.* Characterization of a buried neutral histidine residue in *Bacillus circulans* xylanase: NMR assignments, pH titration, and hydrogen exchange. *Protein Science*, v. 5, n. 11, p. 2319–2328, 1996.

REDDY, K. V.R.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: Premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 24, n. 6, p. 536–547, 2004.

SANTOS, N. C; PRIETO, M; CASTANHO, M. A. R. B. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes : an emphasis on optical spectroscopic methods. v. 1612, n. 0005, p. 123–135, 2003.

SEELIG, J.*et al.* Electrostatic and Nonpolar Peptide-Membrane Interactions. Lipid Binding and Functional Properties of Somatostatin Analogues of Charge $z = +1$ to $z = +3$. *Biochemistry*, v. 32, n. 37, p. 9714–9721, 1993.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, v. 175, n. 4023, p. 720–731, 1972.

SIONTOROU, C. G. *et al.* Artificial lipid membranes: Past, present, and future. *Membranes*, v. 7, n. 3, p. 1–24, 2017.

SOUZA, B. M. *et al.* Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*, v. 26, n. 11, p. 2157–2164, 2005.

TAMBA, Y. *et al.* Kinetic pathway of antimicrobial peptide magainin 2-induced pore formation in lipid membranes. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, n. 37, p. 12018–12026, 2010.

TAMBA, Y.; YAMAZAKI, M. Magainin 2-induced pore formation in the lipid membranes depends on its concentration in the membrane interface. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 113, n. 14, p. 4846–4852, 2009.

TAMBA, Y.; YAMAZAKI, M. Single giant unilamellar vesicle method reveals effect of antimicrobial peptide magainin 2 on membrane permeability. *Biochemistry*, v. 44, n. 48, p. 15823–15833, 2005.

THURLKILL, R. L. *et al.* pK values of the ionizable groups of proteins. *Protein Science*, n. 15, p. 1214–1218, 2006.

TISHMACK, P. A. *et al.* Use of ¹H NMR spectroscopy and computer simulations to analyze histidine pK(a) changes in a protein tyrosine phosphatase: Experimental and theoretical determination of electrostatic properties in a small protein. *Biochemistry*, v. 36, n. 39, p. 11984–11994, 1997.

TOSSI, A. *et al.* Identification and characterization of a primary antibacterial domain in CAP18, a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Letters*, v. 339, n. 1–2, p. 108–112, 1994.

TSUI, F. C.; OJCIUS, D. M.; HUBBELL, W. L. The intrinsic pK_a values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host bilayers. *Biophysical journal*, v. 49, n. 2, p. 459–468, 1986.

VAN HOUTE, J.; LOPMAN, J.; KENT, R. The Final pH of Bacteria Comprising the Predominant Flora on Sound and Carious Human Root and Enamel Surfaces. *Journal of Dental Research*, v. 75, n. 4, p. 1008–1014, 1996.

VERLY, R. M. *Peptídeos Antimicrobianos : Síntese , Ensaios Biológicos , Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos*. 2010. 182 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

VOGT, T C B; BECHINGER, B. The Interaction of Histidine-Containing Amphipathic Helical Peptide Antitoxics with Lipid Bilayers. *J. Biol. Chem.*, v. 274, n. 41, p. 29115–29121, 1999.

WALDE, P *et al.* Giant Vesicles: Preparations and Applications. *ChemBioChem*, v. 11, n. 7, p. 848–865, 2010.

WALKENHORST, W. F. *et al.* PH dependence of microbe sterilization by cationic antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 7, p. 3312–3320, 2013.

WANG, K. *et al.* Antitumor effects, cell selectivity and structure–activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. *Peptides*, v. 29, n. 6, p. 963–968, 2008.

WANG, K. *et al.* Novel mode of action of polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells. *Cancer Letters*, v. 278, n. 1, p. 65–72, 2009.

WATSON, H. Biological Membranes. *Essays in Biochemistry*, v. 59, n. 6, p. 43–70, 2015.

WHITE, Stephen H; WIMLEY, William C. Membrane Protein Folding and Stability: Physical Principles. *Annu. Rev. Biophys*, v. 28, p. 319–365, 1999.

WIMLEY, W. C. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *Acs Chemical Biology*, v. 5, n. 10, p. 905–917, 2010.

YAMAZAKI, M. Chapter 5 The Single Guv Method to Reveal Elementary Processes of Leakage of Internal Contents from Liposomes Induced by Antimicrobial Substances. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, v. 7, n. 08, p. 121–142, 2008.

YANG, L. *et al.* Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. v. 81, p. 1475–1485, 2001.

ZWAAL, R. F.A.; COMFURIUS, P.; BEVERS, E. M. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 62, n. 9, p. 971–988, 2005.