



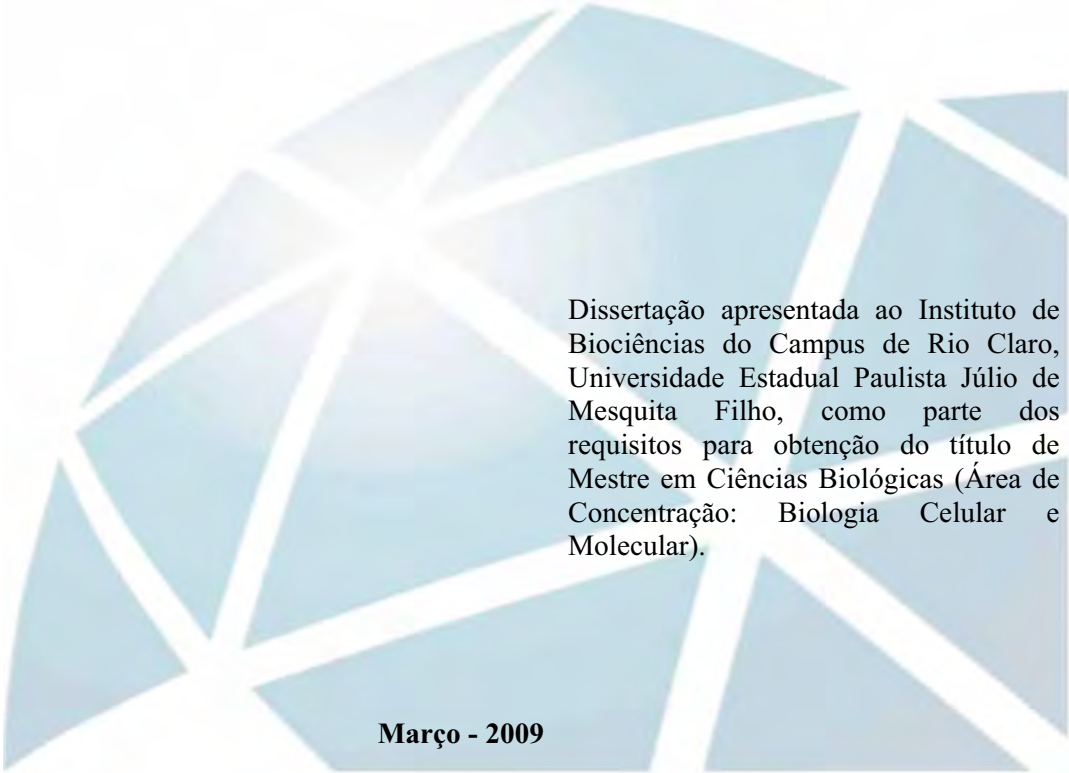
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



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

**PROSPECÇÃO DAS INTERAÇÕES MASTOPARANO-
MEMBRANA EM PROTEOLIPOSSOMOS COMO MODELO
PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE NOVOS
AGENTES ANTIMICROBIANOS**

ALESSANDRA VASO RODRIGUES DA SILVA



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

Março - 2009

ALESSANDRA VASO RODRIGUES DA SILVA

**PROSPECÇÃO DAS INTERAÇÕES MASTOPARANO-
MEMBRANA EM PROTEOLIPOSSOMOS COMO MODELO
PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE NOVOS
AGENTES ANTIMICROBIANOS**

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Co-Orientador: Prof. Dr João Ruggiero Neto

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

**RIO CLARO
2009**

*Dedico aos meus pais este
trabalho e toda a minha vida*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer todas as pessoas que foram importantes para a realização deste trabalho e que, felizmente fazem parte da minha vida.

Ao *Prof. Dr. Mario Sergio Palma*, por ter sido um orientador tão dedicado, que acreditou em mim e sempre me ajudou com seus ensinamentos, conselhos e histórias; enfim, Palmas para você.

A *Dra. Bibiana M. De Souza*, popularmente conhecida como Bibi, que foi fundamental para a concretização deste trabalho, tendo muita paciência para me ensinar e auxilia nos experimentos e até deu os puxões de orelha quando necessário. Obrigado por ter sido minha co-orientadora e amiga.

Ao *Prof. Dr. João Ruggiero Neto*, a *Dra. Márcia Perez dos Santos Cabrera* e a aluna de mestrado *Laiana* pelos ensaios e sugestões de dicroísmo circular e fluorimetria.

A *Dra. Helen Andrade Arcuri* pela amizade e ensinamentos de modelagem molecular e pelas aventuras na dinâmica molecular.

A todos os meus amigos do *LBEZ* pela colaboração, amizade, momentos de descontração, terapias em grupo e por fingirem demência!!! Ao *Daniel e Nicole*, o casal que literalmente sempre estava ao meu lado esquerdo me ajudando e conversando comigo. As meninas, *Lucy, Keity, Naty, Vivi, Anally, Lilian, Roberta, Tatão* (Torrada), *Meire, Vanessa* (nossa Globeleza) e *Fernanda* (nossa Lady). Aos “coponheiros” *Luiz* (Jamanta), *Dom* (Abana Jesus!!!), *Paulo* (nosso Senhor) e *Beto* (com seu pen-drive e chapeuzinho azul).

A todos os colegas do *Centro de Estudos de Insetos Sociais* (C.E.I.S.).

A todas as gurias da *Rep. Bicho Preguiça*, eternas coponheiras da pegada, os meninos da *Rep. Til*, verdadeiros lixos de vizinhos.

Aos meus amigos safaaados, *Cutai, Pedrão, Gê, Gordão, Cesão, Dedã, Giga e Thunder*.

As minhas amigas danaaadas, *Giane* (torrada Cicarelli), *Ita*, *Lú*, *Dafny*, *Marina* (Gordona), *Natália* (*Nataca*, maior tacadora de todos os tempos) e *Jocketa*, “coponheira” de casa que me ensinou italiano (Jocketone).

A *Dali* (Daloka, Pandona, Dalícia), “coponheira” de república, sala de aula e mestrado pelas conversas, bares, almoços, conselhos, etc.

Ao *Glauco* (Glauber, Glaucóól, Cóól), meu melhor amigo, lindo, “coponheiro”, que sempre esteve ao meu lado me incentivando e dando todo apoio.

A toda a minha Família: meus avós, *Rosa e Euclides*; os tios, *Nilson* (Sukita) e *Valdir* (Guru); as tias, *Teresa e Suely* e meus primos, *Arthur*, *Fábio*, *Flávio*, *Laine e Carol*.

A *Beth*, minha super mãe linda que sempre esteve ao meu lado. Ao *Alcindo*, meu super pai lindo “foguinho” que me deu todo apoio do mundo. Ao *Adriano* (Tato), meu irmão cachaceiro que eu admiro muito e, quando crescer, quero ser igual a ele. Amo muito vocês!!!

A *Deus e Nossa Senhora* que sempre me acompanham.

Á *FAPESP* pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a estrutura, função e mecanismo de ação do peptídeo antibacteriano Protonectarina-MP (isolado de veneno da vespa social *Protonectarina sylveirae*) tendo seu resíduo C-terminal nas formas ácida (-OH) e amidada (-NH₂). Os peptídeos foram sintetizados, utilizando-se a estratégia Fmoc, purificados por cromatografia líquida de alta performance. O monitoramento do material sintético foi feito por espectrometria de massas ESI-MS e por seqüenciamento através de Química Degradativa de Edman. A estrutura secundária foi investigada pelo uso de espectroscopia de dicroísmo circular e modelagem molecular. Atividade lítica (extravasamento) e interação do resíduo de triptofano em vesículas foram investigadas pelo uso de espectrômetro de fluorescência.

Foram realizados ensaios sobre as interações desses peptídeos em meio de vesículas zwitteriônicas e aniônica, formando complexos proteolipossomos que foram submetidos à troca isotópica H/D monitorada por espectrometria de massas ESI-MS e MS/MS. Além disso, foram realizados ensaios biológicos de atividade hemolítica, de desgranulação de mastócito, de liberação da enzima citoplasmática Lactato Desidrogenase e de atividade antimicrobianas.

Os dados de CD revelam uma tendência dos peptídeos se estruturarem em hélice- α em ambiente hidrofóbico e em ambiente de membranas. Porém, o mesmo não pode ser observado em meio aquoso. Os modelos obtidos para ambos os peptídeos por modelagem molecular mostram uma estruturação em hélice- α anfipática.

Nos ensaios de atividade lítica em vesículas, os peptídeos apresentaram um processo com cooperatividade positiva, com curvas de dose-resposta que mostram uma dependência sigmoideal com a concentração do peptídeo. Os resultados da fluorescência do triptofanos mostram um deslocamento da emissão para a região de onda do azul para o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂), o que não foi observado para o seu análogo, revelando uma maior interação do peptídeo com o C-terminal amidado em membranas, que seu análogo com o resíduo C-terminal na forma ácida..

Os resultados da troca H/D revelam que os peptídeos interagem em paralelo com a superfície da membrana, não chegando a se internalizar completamente na camada lipídica, e aparentemente não apresentam a formação de poros; no entanto, movimentam-se continuamente nesta superfície. Porém, o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) apresentou uma maior movimentação se comparado ao peptídeo Protonectarina-MP (-OH), criando perturbações, que podem, de alguma maneira, despermeabilizar a membrana. O uso da

estratégia de se monitorar as trocas H/D por espectrometria de massas, em proteoliposomos, revelou ainda que o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) interage mais intensamente com as membranas que o Proteoneectarina-MP (-OH). Além disso, ambos os peptídeos têm potencial para interagir tanto com membranas zwitteriônicas, como aniônicas.

Nos ensaios biológicos, observou-se que o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) causa desgranulação de mastócitos, com extravasamento da enzima citoplasmática Lactato Desidrogenase; e nas células de eritrócitos causa liberação de hemoglobina, e que essas atividades são decorrentes da interação desse peptídeo com a membrana celular, diferentemente do observado para o peptídeo Protonectarina-MP (-OH) , que apresentou atividade biológica reduzida. Além disso, atividade antimicrobiana foi reduzida para o peptídeo com o C-terminal carboxilado.

De uma maneira geral, o modo de ação do peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂) é ocasionado pela movimentação de entrada e saída de seus resíduos na membrana, provocando um desarranjo estrutural na organização dos fosfolipídios que, conseqüentemente, leva a um extravasamento do conteúdo citoplasmático. O peptídeo Protonectarina-MP (-OH) apresenta uma menor interação e movimentação na membrana, o que condiz com a sua falta de atividade biológica.

Palavras chaves: Peptídeo antimicrobiano; Troca isotópica H/D; Espectrometria de massas; Interação peptídeo-membrana; Atividade biológica.

ABSTRACT

In the present work was studied the structure, function and mechanism of action of the antibacterial peptide Protonectarina-MP (isolated from venom of social wasp *Protonectarina sylveirae*) with its carboxyamidation (-NH₂) and carboxyl-free (-OH) C-terminal forms. The peptides were manually synthesized on-solid phase by using Fmoc strategy and purified under HPLC. The homogeneity of the synthetic material was analyzed by ESI mass spectrometry and Edman Degradation Chemistry. The secondary structure was investigated through circular dichroism (CD) spectroscopy and molecular modeling. Lytic activity and peptides interaction with the membranes was also investigated through tryptophan emission, by fluorescence spectrometry.

The interaction of peptides with zwitterionic and anionic vesicles was investigated through the combination of H/D exchange and ESI-mass spectrometry. Some biological activities, like: mast cell degranulation, release of cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase, hemolysis and antibiosis were investigated for both peptides.

The CD spectra revealed that the peptides in hydrophobic environments or in presence of biological membranes have the tendency to form helix conformations; however, organized structures were not observed in aqueous or buffer solutions. The models obtained by molecular modeling show that both peptides form an amphipathic α -helix.

The peptides presented a positive cooperative process in the lytic activity of vesicles, with dose-response curves presenting a sigmoidal dependence with the peptide concentration. The results of the fluorescence of tryptophans showed a shift of the emission wavelength to the blue region of the peptide Protonectarina-MP (-NH₂), which was not observed for its analogue presenting the C-terminal residue in free acid form. This is indicating a greater interaction of the amidated peptide in membranes, when compared to the peptide in its acidic form.

The H/D exchange combined with mass spectrometry analysis revealed that the peptides interacted both with zwitterionic and anionic vesicles, oriented in parallel in relation to the vesicle surface; apparently they never became fully internalized the lipid layer, and do not presented the formation of pores. However, they move continuously on the surface of lipid. The peptide presenting carboxyamidation of its C-terminal residue seems to interact more intensely than its acidic analogue; the intense movement of this peptide on the membrane surface must generate some structural disturbances, which destabilize and despermeabilize partially the membranes.

In the biological activities, was observed that the peptide Protonectarina-MP (-NH₂) cause degranulation of mast cells, with leakage of cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase; and in erythrocytes cause the releasing of hemoglobin. These results are suggesting that these activities may result from the direct interaction of this peptide with the cell membrane. The peptide Protonectarina-MP (-OH) presented reduced biological activities. Furthermore, antimicrobial activity was reduced to the carboxyl-free peptide.

In summary, the peptide Protonectarina-MP (-NH₂) through its intense movement on the surface of the membrane, may generate strong structural disturbance in the membranes and, consequently, leads to a leakage of cytoplasmic contents. The peptide Protonectarina-MP (-OH) had a lower interaction and movements in the surface of the membranes, which is in agreement with its lack of biological activity.

Keywords: Anti-microbial peptide; H/D exchange; Mass spectrometry; Peptide-membrane interaction; Biological activities.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
1. Ilustração do modelo carpete, sugerido por Oren e Shai (1998).	11
2. Esquema das possíveis vias de interação de peptídeos antimicrobianos com lipídios (esquema adaptado de Sengupta et al. 2008).	13
3. Parte de uma cadeia polipeptídica com os graus de torção dos ângulos diedros φ e ϕ .	25
4. Diagrama de Ramachandran.	26
5. Perfil cromatográfico sob fase reversa do Protonectarina-MP (-NH ₂), usando o isocrático de 40% acetonitrila, em coluna C-18 (10x250mm) a um fluxo de 2 mL/min. Foi coletado o pico eluído no tempo de 25,16 minutos.	33
6. Perfil cromatográfico sob fase reversa do Protonectarina-MP (-OH), usando o isocrático de 38% de acetonitrila, em coluna C-18 (10x250mm) a um fluxo de 2 mL/min. Foi coletado o pico eluído no tempo de 21,12 minutos.	34
7. Espectro da massa ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂).	34
8. Espectro da massa ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH)..	35
9. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP(-NH ₂) obtidos em solução de água, solução de SDS 165 μ M e 8mM e solução de TFE 40% (v/v).	37
10. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) obtidos em solução de água, solução de SDS 165 μ M e 8mM e solução de TFE 40% (v/v).	38
11. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂) obtidos em tampão Tris-borato 5mM, suspensão de vesículas de PC, PC/Chol, PC/PG e PC/CL.	39
12. Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) obtidos em tampão Tris-borato 5mM, suspensão de vesículas de PC, PC/Chol, PC/PG e PC/CL.	39
13. Diagrama de Ramachandran do peptídeo Protonectarina-MP(-NH ₂).	43
14. Diagrama de Ramachandran do Protonectarina-MP (-OH).	43
15. Imagens da conformação estrutural em ribbon do peptídeo Protonectarina-MP(-NH ₂) (A) e do peptídeo Protonectarina-MP(-OH) (B).	46
16. Imagens da superfície do peptídeo Protonectarina-MP(-NH ₂) (A e B) e do peptídeo Protonectarina-MP(-OH) (C e D).	47
17. Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂) em presença de vesícula de PC.	50
18. Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC.	51
19. Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP(-NH ₂) em presença de vesícula de PC na ausência de D ₂ O (A), e na presença de D ₂ O 40% (v/v).	53
20. Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP(-OH) em presença de vesícula de PC na ausência de D ₂ O (A), e na presença de D ₂ O 40% (v/v).	56
21. Esquema da interação do peptídeo Protonectarina-MP(-NH ₂) (A) e Protonectarina-MP (-OH)	

(B) com a membrana de PC ao longo do tempo, construídos através dos dados da troca isotópica H/D e espectrometria de massas seqüenciais.	59
22. Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂) em presença de vesícula de PC/Chol (80:20).	60
23. Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC/Chol (80:20).	61
24. Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂) em presença de vesícula de PC/Chol na ausência de D ₂ O (A) e na presença de D ₂ O 40% (v/v).	62
25. Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC/Chol na ausência de D ₂ O (A) e na presença de D ₂ O 40% (v/v).	64
26. Esquema da interação do peptídeo Protonectarina-MP(-NH ₂) (A) e Protonectarina-MP (-OH) (B) com a membrana de PC/Chol ao longo do tempo, construídos através dos dados da troca isotópica H/D e espectrometria de massas seqüencial.	66
27. (A) Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂) em presença de vesícula de PC/PG (70:30). Em (B), mostra-se a região onde se encontra o íon molecular de PG, que foi aumentada para facilitar a visualização.	67
28. Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂) em presença de vesícula de PC/PG na ausência de D ₂ O (A) e na presença de D ₂ O 40% (v/v).	68
29. (A) Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC/PG (70:30). Em (B), mostra-se a região onde se encontra o íon molecular de PG, que foi aumentada para facilitar a visualização.	69
30. Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC/PG na ausência de D ₂ O (A) e na presença de D ₂ O 40% (v/v).	71
31. Esquema da interação do peptídeo Protonectarina-MP(-NH ₂) (A) e Protonectarina-MP (-OH) (B) com a membrana de PC/PG ao longo do tempo, construídos através dos dados da troca isotópica H/D e espectrometria de massas seqüencial.	73
32. (A) Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂) em presença de vesícula de PC/CL (90:10). Em (B), mostra-se a região onde se encontra o íon molecular de CL, que foi aumentada para facilitar a visualização.	75
33. Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂) em presença de vesícula de PC/CL na ausência de D ₂ O (A) e na presença de D ₂ O 40% (v/v).	76
34. (A) Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC/CL (90:10). Em (B), mostra-se a região onde se encontra o íon molecular de CL, que foi aumentada para facilitar a visualização.	78
35. Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC/CL na ausência de D ₂ O (A) e na presença de D ₂ O 40% (v/v).	79
36. Esquema da interação do peptídeo Protonectarina-MP(-NH ₂) (A) e Protonectarina-MP (-OH) (B) com a membrana de PC/CL ao longo do tempo, construídos através dos dados da troca isotópica H/D e espectrometria de massas seqüencial.	81
37. Parâmetros de fluorescência do triptofano que quando excitado em λ de 280 nm, apresenta emissão de λ_{max} de 351 nm (espectro ilustrativo adaptado de Ladokhin et al. (2000)).	84
38. Intensidade de fluorescência do Trp no peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂) em tampão de	

tris/HCl (●) e em vesícula de PC (o).	86
39. Intensidade de fluorescência do Trp no peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂) em tampão de tris/HCl (●) e em vesícula de PCPG (70:30) (o).	86
40. Intensidade de fluorescência do Trp no peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em tampão de tris/HCl (●) e em vesícula de PC (o).	87
41. Intensidade de fluorescência do Trp no peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em tampão de tris/HCl (●) e em vesícula de PCPG (70:30) (o).	87
42. Curvas de dose-resposta em vesículas zwitteriônicas de PC. O percentual de vazamento do peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂) está apresentado para os tempos de contato de (■) 5 e (●) 10 minutos. O percentual de vazamento do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) está apresentado para os tempos de contato de (■) 5 e (●) 10 minutos.	90
43. Curvas de dose-resposta em vesículas aniônicas de PC/PG (70:30). O percentual de vazamento do peptídeo Protonectarina-MP (-NH ₂) está apresentado para os tempos de contato de (■) 5 e (●) 10 minutos. O percentual de vazamento do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) está apresentado para os tempos de contato de (■) 5 e (●) 10 minutos.	91
44. Atividade hemolítica dos peptídeos Protonectarina-MP (-OH) (azul), Protonectarina-MP(-NH ₂) (vermelho) e Melitina (verde) em dez diferentes concentrações, variando de $6,1 \times 10^{-7}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M.	94
45. Figura 45: Atividade desgranuladora de mastócitos peritoniais de ratos Wistar dos peptídeos Protonectarina-MP (-OH) (azul), Protonectarina-MP (-NH ₂) (vermelho) e HR-II (verde) em doze diferentes concentrações, variando de $1,5 \times 10^{-7}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M.	95
46. Figura 46: Atividade de LDH dos peptídeos Protonectarina-MP(-OH) (azul), Protonectarina-MP (-NH ₂) (vermelho) e HR-II (verde) em cinco concentrações diferentes, variando de $1,2 \times 10^{-6}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M.	96

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
1. Elipticidade molar em 222nm e fração de hélice- α dos peptídeos Protonectarina-MP (-OH) e Protonectarina-MP (-NH ₂), em solução de SDS 165 μ M e 8mM, TFE 40% (v/v) e solução aquosa.	40
2. Elipticidade molar em 222nm e fração de hélice- α dos peptídeos Protonectarina-MP (-OH) e Protonectarina-MP (-NH ₂) em tampão Tris-borato, em presença de vesículas sintéticas neutras (PC e PC/Chol-80/20) e aniônicas (PC/PG-70/30 e PC/CL-90-10).	40
3. Porcentagem de hélice- α do peptídeo Protonectarina-MP na forma ácida e básica em diferentes solventes, calculadas a partir da elipticidade molar em 222nm.	40
4. Análise da qualidade estereoquímica para os modelos do Protonectarina-MP (-NH ₂) e do Protonectarina-MP (-OH).	44
5. Valores determinados para o “Fator de Movimentação de Deutério” (SF), para cada experimento de troca H/D realizado para os peptídeos Protonectarina-MP (-NH ₂) e Proteonectarina-MP (-OH) em presença de proteolipossomos	84
6. Os valores de n encontrados na equação de Hill para os peptídeos Protonectarina-MP (-NH ₂) e Protonectarina-MP (-OH) nas vesículas de PC e PC/PG (70:30) nos tempos de 5 e 10 minutos.	93
7. Valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em μ g/mL, para os peptídeos e para o padrão do experimento (Oxitetraciclina), frente à bactérias Gram+ e Gram-.	97

ABREVIACÕES

Å	Angstrom	Protonectarina-MP(-NH₂)	Protonectarina-MP com o C-terminal amidado
atm	Atmosfera	Protonectarina-MP(-OH)	Protonectarina-MP com o C-terminal carboxilado
°C	Graus Celsius	PS	Fosfatidilserina
CD	Dicroísmo circular	PyBOP	Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium Hexa-fluorophosphate
CF	Carboxifluoresceína	rpm	Rotações por minuto
Chol	Colesterol	s	Segundos
CL	Cardiolipina	SDS	Dodecilsulfato de sódio
CMC	Concentração micelar crítica	SM	Esfingomielina
D₂O	Óxido de deutério	TFA	Ácido trifluoroacético
EMP	Eumenine Mastoparano-AF	TFE	2,2,2-trifluoroetanol
ESI-MS	Espectometria de Massas com fonte de ionização do tipo Eletrospray	u.m.a.	Unidade de massa atômica
h	horas	v/v	Volume por volume
H/D	Hidrogênio/Deutério	W	Wats
HOBt	<i>N-hydroxybenzotriazole.H₂O</i>	% V_{max}	% vazamento máximo
kV	Kilovolts	µg	Micrograma
L/h	Litros por hora	µL	Micro litro
LPS	Lipopolissacarídeo	µM	Micromolar
LUVs	Vesículas unilamelares grandes	Δλ_{max}	variação no comprimento de onda máxima
M	Molar		
MIC	Concentração inibitória mínima		
mL	mililitro		
mM	milimolar		
mmol	milimol		
MP-X	Mastoparano X		
mV	miliVolt		
P/L	Razão molar entre as concentrações de peptídeo e lipídeo		
PC	L-α-fosfatidilcolina		
pdb	<i>Protein Data Bank format</i>		
PE	Fosfatidiletanolamina		
PG	L-α-fosfatidil-DL-glicerol		

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Venenos de Hymenoptera	3
2.1.1 Mastoparanos	4
2.2 Peptídeos Antimicrobianos	5
2.3 Estrutura e composição das membranas	8
2.4 Mecanismos de interação peptídeo-membrana	9
2.5 Aplicações terapêuticas	14
3 OBJETIVO	15
4 MÉTODOS	16
4.1 Síntese manual de peptídeos em fase sólida	16
4.2. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	16
4.3 Espectrometria de massas ESI	17
4.3.1 Espectrometria de massas (MS)	17
4.3.2 Espectrometria de massas seqüenciais (MS/MS)	17
4.4 Sequenciamento por Química Degradativa de Edman	18
4.5 Preparo dos Lipossomos	18
4.6 Determinação do tamanho de vesículas	19
4.7 Dicroísmo Circular	20
4.8 Reação de deuteração	21
4.8.1 Preparação dos proteolipossomos	21
4.8.2 Troca Hidrogênio/Deutério no peptídeo livre e em complexo de proteolipossomo	21
4.9 Experimentos de vazamento de vesículas por fluorimetria	22
4.10 Emissão de fluorescência do triptofano	22
4.11 Modelagem Molecular por homologia	23
4.11.1 Métodos de avaliação dos modelos estruturais	24
4.11.1.1 Diagrama de Ramachandran	25
4.11.1.2 G-factor	27
4.12 Ensaio de Atividade Biológica	27
4.12.1 Desgranulação de Mastócitos	27
4.12.1.1 Isolamento de Mastócitos	28
4.12.1.2 Ensaio de Desgranulação de Mastócitos	28
4.12.2 Atividade da Desidrogenase Láctica	29
4.12.3 Atividade Hemolítica	30
4.12.4 Atividade Antimicrobiana	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES PARCIAIS	33
5.1 Síntese, purificação e controle de qualidade dos peptídeos	33
5.2 Controle de qualidade dos lipossomos	35

5.3 Estudos Estruturais	35
5.3.1 Análises de Dicroísmo Circular	35
5.3.2 Modelagem Molecular por homologia	42
5.3.3 Troca Isotópica Hidrogênio/Deutério	48
5.3.3.1 Troca H/D em vesículas zwitteriônica	50
5.3.3.1.1 Troca H/D em complexos proteolipossomos de fosfatidilcolina	50
5.3.3.1.2 Troca H/D em complexos proteolipossomos de fosfatidilcolina/colesterol	59
5.3.3.2 Troca H/D em vesículas aniônicas	66
5.3.3.2.1 Troca H/D em complexos proteolipossomos de fosfatidilcolina/fosfatidilglicerol	66
5.3.3.2.2 Troca H/D em complexos proteolipossomos de fosfatidilcolina/cardiolipina	74
5.3.3.3. Validação dos modelos de interação peptídeo-membrana propostos	82
5.3.4 Emissão de fluorescência do triptofano	84
5.3.5 Experimentos de vazamento de vesículas por fluorimetria	89
5.4 Ensaio de Atividade Biológica	93
5.4.1 Atividade hemolítica	93
5.4.2 Ensaio de desgranulação de mastócitos	94
5.4.3 Medida da liberação da enzima lactato desidrogenase do citoplasma de mastócitos	95
5.4.4 Atividade Antimicrobiana	97
6 CONCLUSÕES	99
7 REFERÊNCIAS	104

1. INTRODUÇÃO

Os venenos das vespas sociais são ricos em peptídeos policatiônicos biologicamente ativos, responsáveis por intensos processos inflamatórios. A classe dos mastoparanos são os componentes peptídicos mais abundantes encontrados nos venenos das vespas da família Vespidae, e a sua principal atividade biológica são a desgranulação de mastócitos. Recentemente, pesquisas realizadas demonstraram que esses peptídeos mastoparanos também apresentam atividade antibiótica (De SOUZA, 2006; KONNO et al., 2000).

O principal argumento a favor dos peptídeos antimicrobianos é a reduzida possibilidade de uma bactéria desenvolver resistência a este tipo de molécula; isso está relacionado com seu principal alvo, a membrana celular, pois um microrganismo teria que mudar significativamente a composição e/ou organização de seus fosfolipídios ao nível da membrana plasmática para tornar-se resistente a antibióticos peptídicos. Uma outra possibilidade de desenvolver resistência seria a destruição seletiva dos peptídeos por proteases microbianas específicas (ZASLOFF, 2002).

Segundo Pfeiffer et al. (1995), as atividades biológicas apresentadas pelos mastoparanos podem estar relacionadas com interação desses peptídeos com membranas biológicas, assumindo uma conformação em hélice- α anfipática, que pode causar perturbações nas membranas, que leva a um aumento da permeabilidade, facilitando a formação de poros.

As necessidades de se compreender os mecanismos de interação desses peptídeos com membranas (naturais e/ou sintéticas) têm atraído a atenção dos pesquisadores, com isso, surgiu um vasto campo para pesquisas sobre as estruturas secundárias e funções desses peptídeos, objetivando o desenvolvimento de “sistemas-modelos” que sirvam de inspiração para ao desenho de novas drogas antibacterianas (IBRAHIM et al., 2000).

Portanto, neste trabalho foi proposto o estudo da interação do peptídeo mastoparano Protonectarina-MP, presente no veneno da vespa social *Protonectarina sylveirae*, com membranas lipídicas sintéticas/artificiais. Esse peptídeo apresenta baixa atividade hemolítica e potente atividade antibiótica, tanto contra bactérias Gram-positivas, como Gram-negativas. Logo, esse peptídeo apresenta uma interessante atividade biológica, pois é pouco ativo contra células animais, mas apresenta uma grande atividade antimicrobiana. Assim, esse peptídeo constitui-se num modelo molecular interessante para o estudo da interação polipeptídeo-membrana, por ser pequeno (14 resíduos de aminoácidos), apresentar molécula linear, fácil de sintetizar e ainda ser muito ativo contra bactérias.

Como em estudos anteriores foi demonstrada a importância do C-terminal amidado para estruturação de peptídeos mastoparanos (SFORÇA et al., 2004), e como a estrutura secundária interfere profundamente na intensidade e/ou tipo de atividade biológica dos peptídeos biologicamente ativos. Para a realização do trabalho, o peptídeo Protonectarina-MP foi manualmente sintetizado na sua forma natural, apresentando o resíduo C-terminal amidado (-NH₂), e na sua forma modificada, apresentando o resíduo C-terminal ácido (-OH), individualmente. Assim, além do estudo da interação de mastoparano-membrana, foi possível estudar a variação estrutural que o C-terminal provoca sobre a estrutura secundária de peptídeos antibióticos ao interagir com membranas.

Após a purificação através de técnicas de cromatografia líquida de alta performance, foi realizado o monitoramento da qualidade do material sintético purificado através das análises de espectrometria de massas ESI-MS e seqüenciamento por Química Degradativa de Edman.

Posteriormente, foram realizados estudos das interações dos peptídeos policatiônicos Protonectarina-MP (-NH₂) e de seu análogo Protonectarina-MP (-OH) com membranas fosfolipídicas sintéticas (lipossomo) monitorados por medidas de dicroísmo circular (CD), troca isotópica H/D em complexo proteolipossomo acoplada à espectrometria de massas, medidas do vazamento de fluorescência de vesículas na presença dos peptídeos e a interação do resíduo triptofano com vesículas, analisados por espectroscopia de fluorescência. A estrutura secundária dos peptídeos também foi investigada por modelagem molecular por homologia.

Além disso, foram realizados ensaios biológicos de desgranulação de mastócito, medida da liberação da enzima lactato desidrogenase do citoplasma de mastócitos, atividade hemolítica e atividade antimicrobiana.

Todo esse conjunto de técnicas e resultados obtidos foram utilizados com o intuito de compreender e correlacionar a estrutura, função e modo de ação desses peptídeos com as membranas biológicas. Com isso, obteve-se uma maior compreensão do mecanismo de ação de peptídeos mastoparanos com membranas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Venenos de Hymenoptera

A ordem Hymenoptera é uma das maiores ordens de insetos, sendo composta por 200.000 espécies de abelhas, vespas e formigas (VETTER; VISSCHER, 1998). Estes insetos são classificados em dois grupos, baseados no comportamento evolutivo que pode ser social ou solitário. Baseado na biologia e comportamento desses insetos, o veneno e o aparelho de ferroar sofreram alterações ao longo dos tempos evoluindo para melhor adaptação dessas espécies (PALMA, 2006).

Por um lado, os venenos dos Hymenopteras solitários são utilizados para a caça, causando paralisia permanente ou temporária em suas presas, e por outro lado, para a proteção e defesa de suas colônias contra ataques de predadores que, geralmente não são fatais, causando principalmente efeitos inflamatórios e/ou imunológicos nas vítimas de suas ferroadas (PALMA, 2006).

Esses venenos são constituídos por uma mistura complexa de proteínas, peptídeos e compostos de baixas massas moleculares. As proteínas são responsáveis por causar lesões nos tecidos e freqüentemente são imunogênicas e estão relacionadas com as reações alérgicas ocasionadas pelas ferroadas desses insetos (ESHER et al., 2001; YEE et al., 1997, SANTOS et al., 2007), encontrado dentre os principais alérgenos: a fosfolipase A₂ (OLIVEIRA; PALMA, 1998; HOFFMAN, 2006, SANTOS et al., 2007); a hialuronidase (CASTRO et al., 1994) e o Antígeno 5 (HOFFMAN, 2006).

Os peptídeos são os componentes mais abundantes nos venenos das vespas sociais e abelhas, sendo os responsáveis por dores prolongadas, edema, eritema, reações alérgicas e sistêmicas (PALMA, 2006). Geralmente, causam lise celular, hemólise, antibiose, podendo também interagir com mediadores celulares. Além dessas atividades, os venenos também podem apresentar efeitos neurotóxicos.

Os venenos das vespas sociais contem uma série de peptídeos policatiônicos anfipáticos que apresentam uma série de ações farmacológicas multifuncionais, o que geralmente contribui para a ocorrência de intensos processos inflamatórios.

2.1.1 Mastoparanos

O componente peptídico mais abundante dos venenos de vespas da família Vespidae são os pertencentes à classe dos mastoparanos, cuja principal atividade biológica é a desgranulação de mastócitos. Sua classe foi assim denominada devido ao seu primeiro alvo celular identificado, os mastócitos, que juntamente com os basófilos são responsáveis pelas reações alérgicas (IVANOVA et al., 2001). Eles se diferenciam dos peptídeos encontrados nos venenos de abelhas, que apresentam atividades semelhantes, por não apresentarem resíduos de cisteína em suas seqüências primárias (NAKAJIMA et al., 1986).

Os mastoparanos são tetradecapeptídeos amidados que apresentam diversas atividades biológicas diferentes, como por exemplo: estimuladores da secreção de histamina à partir de mastócitos; de serotonina à partir de plaquetas (NAKAJIMA, 1986); insulina à partir de células pancreáticas- β (PALMA, 2006); além de serem potentes agentes promotores de exocitose de diversas células de mamíferos (YOKOKAWA et al., 1989).

Esses peptídeos são pequenos (10 a 14 resíduos de aminoácidos), catiônicos, biologicamente ativos, ricos em aminoácidos hidrofóbicos, como leucina, isoleucina e alanina. Moléculas isoladas de espécies de regiões de clima frio apresentam tipicamente resíduos de lisina nas posições 4, 11 e 12 (NAKAJIMA, 1986), mas as seqüências de novos peptídeos isolados de espécies de vespas das regiões tropicais mostram uma distribuição diferente dos resíduos de lisinas (MENDES et al., 2004; De SOUZA et al., 2004). Eles têm o resíduo C-terminal amidado e podem apresentar diferentes padrões de conformação anfipática, em função das diferentes distribuições de cargas apresentadas pelos mesmos. Suas atividades hemolíticas e antimicrobianas são dependentes ou diretamente influenciadas pelo tamanho, hidrofobicidade, ângulo polar, anfipaticidade, estrutura e composição da cadeia polipeptídica formada pelos aminoácidos (COSTA, 2006).

De acordo com seu modo de ação, esses peptídeos podem ser classificados em dois grupos: aqueles que agem através da lise celular devido à formação de poros na membrana celular; e aqueles que agem pela interação com os receptores acoplados às proteínas-G, ativando os mecanismos de desgranulação (exocitose), resultando em muitos diferentes tipos de secreções, dependendo do tipo de célula alvo (PALMA, 2006).

Em geral, sua estrutura se apresenta predominantemente na forma de “coil” quando em solução aquosa, a despeito de ainda conservar alguma estrutura secundária em hélice- α (De SOUZA; 2006); enquanto que em solução de metanol, TFE ou em presença de

vesículas lipídicas apresentam uma tendência de assumir uma configuração ordenada em forma de hélice- α ; esse efeito é causado pela interação com a membrana plasmática devido à sua anfipaticidade (PALMA, 2006). A anfipaticidade reflete a tendência que uma seqüência possui para formar domínios hidrofílicos/hidrofóbicos bem estruturados, em faces opostas.

Segundo Pfeiffer e colaboradores (1995), esses peptídeos da classe dos mastoparanos podem causar perturbações nas membranas, levando a um aumento da permeabilidade, facilitando a formação de poros; além disso, podem apresentar atividade hemolítica, como é o caso do MP-X do veneno de vespa *Xanthoptera* SP, em concentração de 4×10^{-6} M (HIRAI et al., 1979).

Recentemente, têm sido descrito atividades antimicrobianas para estes peptídeos. Por exemplo, experimentos realizados com MP-X demonstraram aumento na permeabilidade da célula, conduzindo a um desequilíbrio dos eletrólitos intracelulares e à morte da mesma. Isto está relacionado com o fato das membranas citoplasmáticas dos mamíferos geralmente serem compostas por fosfolipídios zwitteriônicos, ou seja, apresentam carga líquida zero; no entanto, muitas bactérias patogênicas têm membranas celulares altamente eletronegativas (aniônicas).

Como os mastoparanos são policatiônicos, há uma atração eletrostática entre eles e as superfícies microbianas carregadas negativamente, facilitando sua inserção na face hidrofóbica da membrana (MATSUZAKI et al, 1999). Nestas inserções iniciais dos peptídeos ocorre a mudança conformacional, nas intermediações da membrana (YEAMAN; YOUNT, 2003). Durante sua inserção, os mastoparanos podem adotar dois estados de orientação diferente: um com o eixo da hélice em paralelo à membrana; e outro com o eixo em perpendicular à membrana (HORI et. al., 2001).

Sato e Feix (2006) demonstraram que peptídeos antibióticos lineares, catiônicos e que adotam uma conformação estrutural em hélice- α , interagem com membranas sintético-artificiais, intercalando-se entre os lipídios justamente abaixo da cadeia de glicerol dos fosfolipídios, numa localização que requer a expansão da camada superficial externa da vesícula de fosfolipídios; essa expansão é uma característica importante nos estágios adiantados de interação entre estes peptídeos antimicrobianos e as membranas.

2.2 Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos têm sido isolados e caracterizado de organismos dos mais variados reinos e filos, desde procariontes até seres humanos (YEAMAN; YOUNT,

2003). Estes apresentam atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, e o potencial farmacológico central de aplicação para estes peptídeos é o grau cuja ele diferencia ou pode ser engenheirado para diferenciar entre um alvo microbial e uma célula animal normal. Neste sentido, as diferenças existentes entre células de mamíferos e células microbianas são de fundamental importância.

São necessárias quatro características para os peptídeos antimicrobianos serem eficazes contra os patógenos. A primeira é a seletividade da toxicidade, com os peptídeos sendo capaz de discriminar entre células hospedeiras e microbianas. A segunda, matar rapidamente, pois o ciclo de vida de bactérias é curto, sendo de 20 minutos no caso da *Escherichia coli*. A terceira é amplo espectro de atividade antimicrobiano, com um peptídeo sendo eficiente contra muitas espécies de microorganismos. E por ultimo, deve apresentar um mecanismo de ação que a bactéria não possa facilmente desenvolver mecanismos de resistência (MATSUZAKI, 1999).

A estrutura tridimensional e a composição dos aminoácidos básicos acabam dividindo os peptídeos antimicrobianos em três famílias: (1) peptídeos em hélice- α lineares alguns como cecropinas, magaininas, melitinas, dermaceptina, apidaecinas e drosocinas, que adotam a estrutura randômica em solução aquosa, porém, em solventes orgânicos e em contato com membranas celulares adotam uma conformação em hélice- α ; (2) alguns peptídeos em folha- β como as defensinas, que contem resíduos de cisteína formando pontes de dissulfeto: (3) peptídeos ricos em aminoácidos específicos como prolina, glicina, triptofano, arginina ou histidina, com a maioria deles adotando extensas estruturas de hélice- α . Apesar dessas diferenças estruturais, muitos desses peptídeos antimicrobianos acabam agindo na membrana celular (OREN; SHAI, 1998).

A hélice- α anfipática é estrutura mais comumente encontrada nos peptídeos antimicrobianos, sendo ideal para interagir com membranas biológicas igualmente anfipáticas, possibilitando a interação entre os grupos catiônicos destes peptídeos e os grupos aniônicos dos fosfolipídios, facilitando sua inserção na face hidrofóbica da bicamada. Em estudos realizados com o peptídeo EMP-AF, um mastoparano isolado do veneno da vespa solitária *Anterhynchium flavomarginatum micado*, demonstrou-se a capacidade deste peptídeo em interagir e permeabilizar lipossomos aniônicos e, em menor extensão, lipossomos neutros, sendo que esta habilidade está correlacionada com a porcentagem de hélice- α anfipática assumida pelo peptídeo quando em contato com membranas (Dos SANTOS-CABRERA et al., 2004). Essa estrutura anfifílica também é encontrada com frequência em peptídeos

produzidos por fungos, insetos, anfíbios e mamíferos, com atividade antibiótica, antifúngica, antiviral, hemolítica e antitumoral (LORENZI, 2002).

Modificações pós-traducionais que incluem processos proteolíticos, alguns casos de glicosilação e amidação do C-terminal são comumente encontrados nos peptídeos antimicrobianos (ZASLLOF, 2002). Konno et al. (2000) realizou estudos com o peptídeo EMP-AF com o seu C-terminal amidado (EMP-AF-NH₂) e também com o seu C-terminal ácido (EMP-AF-COO⁻), demonstrando que este peptídeo na forma amidada possui uma atividade degranuladora 50% mais potente que a forma com o C-terminal ácido, na concentração de 10⁻⁵ M. Sforça et al. (2004) através de estudos da estrutura secundária deste mesmo peptídeo e de sua forma análoga, por RMN e Dinâmica Molecular, que além da esperada redução da carga positiva do EMP-AF-COO⁻ devida à perda do NH₂, a presença do grupo carboxi-livre no lado C-terminal acabou ocasionando 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. Assim, o padrão de hélice anfipática apresentado pelo EMP-AF-NH₂ é perdido no análogo, juntamente com a atividade biológica. Portanto, modificações pós-traducionais, em especial a amidação do C-terminal acaba sendo importante para a estruturação da hélice, que facilita a interação desse peptídeo com membranas, e, conseqüentemente, influencia na atividade biológica.

Devido à sua estrutura anfipática, um único peptídeo pode colocar-se entre as cabeças dos fosfolípidios da região da bicamada lipídica (interface) (MATSUZAKI et al., 1998; YANG et al., 2001). Como também, com o aumento da concentração do peptídeo para acima de um valor limite, as moléculas peptídicas podem permanecer na interface ou posteriormente mudar para dentro da região transmembrana, onde suas agregações formam poros transmembranares com nanômetros de diâmetro que levam a morte celular (MATSUZAKI et al., 1998; YANG et al., 2001). A presença de colesterol na membrana alvo em geral reduz a atividade antimicrobiana por conferir uma maior estabilização dos lipídios (ZASLLOF, 2002).

A ligação eletrostática preferencial dos peptídeos antimicrobianos na interface aniônica explica parcialmente a seletividade desses peptídeos para membranas aniônicas. No entanto, nem todos os peptídeos aniônicos são seletivos em interfaces aniônicas, dependendo também da sua composição de aminoácidos e do alvo membranar de diferente composição lipídica. Por exemplo, a atividade de magaininas e tachyplesinas são altamente sensíveis à composição da membrana alvo (MATSUZAKI, 1999).

Peptídeos antimicrobianos modificados vêm sendo desenhados e estudados para maximizar suas ações. Alguns estudos mostram que a carga positiva e anfifilicidade são necessárias para atividade da Magainina, com resíduos hidrofóbicos sendo essenciais para atividade antimicrobiana, porém, o aumento excessivo da hidrofobicidade aumenta a afinidade por membranas zwitteriônicas e, conseqüentemente, a atividade hemolítica. Além disso, aumento no número de cargas positivas aumenta as propriedades antimicrobianas, mas um aumento muito elevado também torna o peptídeo hemolítico. Portanto, varia muito para peptídeos diferentes, ainda que dentro do mesmo tipo estrutural, a otimização de alguns resíduos para a máxima atividade antimicrobiana e mínima citotoxicidade (KHANDELIA et al., 2008).

2.3 Estrutura e composição das membranas

A arquitetura fundamental de todas as biomembranas é conferida pelo arranjo da bicamada lipídica. Os lipídios de membrana mais abundantes são os fosfolipídios. Estes têm um grupamento polar (cabeça polar) e duas caudas de hidrocarbonetos de características hidrofóbica. A diferença de comprimento e insaturação da cauda de ácido graxos são importantes, pois influem na habilidade das moléculas de fosfolipídios de empacotarem-se, afetando, por isto, a fluidez da membrana (ALBERTS et al., 2004).

A natureza anfipática das moléculas de fosfolipídios é responsável pela formação espontânea da bicamada lipídica num ambiente aquoso, agregando suas caudas hidrofóbicas para o interior e expondo as suas cabeças hidrofílicas para a água, favorecendo a formação de um arranjo energeticamente mais favorável. O empacotamento e curvatura espontânea são influenciados pelo formato da molécula de fosfolipídio. Moléculas que apresentam uma cabeça polar maior que a área transversal apolar, assemelhando-se a cones invertidos (como é o caso dos sabões, detergentes como o dodecilsulfato de sódio (SDS) e lisofosfolipídios), tendem a formar estruturas com alto raio de curvatura, originando soluções micelares. Moléculas que apresentam formas de cones, como fosfatidiletanolamina (PE), colesterol (Chol) e cardiolipina (CL), tendem a se estruturar com raio de curvatura negativo, formando micelas invertidas. Já as moléculas cilíndricas, como fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), esfingomiéline (SM), acabam formando estruturas em bicamada (LASIC, 1998).

As diferenças entre as membranas celulares estão relacionadas à sua composição lipídica. Assim, em células eucarióticas, as membranas externas são formadas predominantemente por fosfolipídios zwitteriônicos como fosfatidilcolina (PC),

fosfatidiletanolamina (PE) e esfingomiéline (SM), assim como os esteróis, colesterol e ergosterol, que são raramente encontrados em membranas de procarióticos (YEAMAN; YOUNT, 2003). Dentre os fosfolipídios zwitteriônicos, o PC e PE estão presentes na maioria das membranas celulares. Porém, devido as suas propriedades físicas que formam vesículas e estruturas bem definidas em solução, o PC tem sido preferencialmente utilizado nos principais estudos in vitro (DOWHAN, 1997). Os esteróis, colesterol e ergosterol são geralmente neutros e afetam as propriedades de permeabilidade da dupla camada lipídica. Como exemplo, as moléculas de colesterol aumentam as propriedades de “barreira de permeabilidade”, reduzindo a mobilidade dos fosfolipídios, tornando a bicamada menos sujeita a deformações, o que diminui a permeabilidade da bicamada a pequenas moléculas hidrossolúveis.

Em contraste, a membrana externa das células procarióticas tende a apresentar um predomínio de fosfolipídios eletronegativos, com altas proporções de fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) e fosfatidilserina (PS), que também são largamente encontrados na membrana mitocondrial de células eucarióticas (DOWHAN, 1997). Porém, esses fosfolipídios aniônicos dificilmente estão presentes na face externa das membranas de mamíferos (YEAMAN; YOUNT, 2003). Essa diferença de composição acaba sendo um dos fatores que contribui para a seletividade dos peptídeos antimicrobianos.

A composição de lipídios das duas monocamadas das membranas apresenta uma assimetria impressionante. Por exemplo, em eritrócitos, a face externa é neutra e a face interna é composta por fosfolipídios carregados negativamente, característica importante para a manutenção das atividades celulares. Neste caso, uma simples translocação de fosfolipídios aniônicos para a face externa serve como sinalizador para apoptose celular (ALBERTS et al., 2004).

Essa distribuição assimétrica de cargas e gradiente eletroquímico através da membrana criam um potencial transmembranar. Em células de mamíferos, a diferença de potencial da membrana está na faixa de -90 a -110 mV; já em células bacterianas, varia na faixa de -130 a -150 mV. A diferença de potencial encontrado entre membranas de mamíferos e bactérias inclui-se entre os indicadores da toxicidade seletiva (HANCOCK, 1997).

2.4 Mecanismos de interação peptídeo-membrana

Os peptídeos associam-se a membranas através de diferentes mecanismos, que podem levar a formação de agregados e até mesmo poros, levando à desestabilização da membrana e rompimento, conduzindo finalmente à perda da integridade da membrana,

levando à morte celular (SATO; FEIX, 2006). Porém, o mecanismo envolvido na formação de poros ou ruptura da bicamada lipídica ainda não está claramente elucidado.

Conforme estudos realizados por Papo e Shai (2003), antes de exercerem sua atividade, os peptídeos interagem primeiramente com a superfície externa da membrana, principalmente com lipopolissacarídeos (LPS), peptídeoglicanas (em células bacterianas), na camada de glicocálice e/ou proteínas da superfície das células de mamíferos. Somente então, os peptídeos ligam-se e interagem com a membrana citoplasmática. Este estudo demonstra que os peptídeos que agem preferencialmente em bactérias, o fazem por interagirem eficientemente com os fosfolipídios aniônicos, enquanto que os peptídeos que lisam as células de mamíferos ligam-se eficientemente com membranas compostas por fosfolipídios zwitteriônicos. Com isso, torna-se cada vez mais evidente que a atividade seletiva destes peptídeos depende de uma série de parâmetros físico-químicos dos próprios peptídeos, e também das células-alvo. Com respeito às propriedades do peptídeo, estes incluem o volume da molécula, de sua estrutura e de seu estado oligomérico, tanto em solução como nas membranas. A respeito do alvo membranar, estes incluem a estrutura, a espessura e a complexidade dos polissacarídeos hidrofílicos encontrados em sua camada exterior. Estes parâmetros afetam a habilidade dos peptídeos se difundirem através da barreira exterior da célula e alcançarem a membrana citoplasmática (PAPO; SHAI, 2003).

A ligação inicial é conduzida pela atração eletrostática e hidrofóbica, que agem em conjunto para promover as associações entre lipídios e peptídeos. Assim, grupos carregados positivamente encontrados nos resíduos de Lys e Arg acabam sendo os primeiros a interagirem com fosfolipídios negativos encontrados nas membranas (DEBER; LI, 1995). A susceptibilidade da bicamada também depende da concentração de peptídeo na superfície da membrana, que ao atingir um razão limite entre a concentração de peptídeo e lipídio (P/L), acaba provocando a imersão na bicamada lipídica, dependendo da sua composição (HUANG, 2000).

A composição fosfolipídica da membrana, sua fluidez, seu tamanho e sua carga influenciam na orientação, inserção e profundidade do peptídeo em relação à superfície da membrana (MATSUZAKI et al., 1994). Em princípio, é esperado que o peptídeo tenha um comprimento e estrutura secundária compatível com a espessura da membrana, a fim de atravessá-la. Essa barreira a ser transposta apresenta, em bactérias, uma espessura na ordem de 30 Å; sendo maior que o comprimento encontrado nos peptídeos antimicrobianos de cadeia curta, com 10 a 15 resíduos de aminoácidos. Assim, esses peptídeos são claramente mais curtos e provavelmente indicam a existência de outros mecanismos para superar a diferença

de comprimento. Porém, demonstrou-se que esses peptídeos em concentrações a baixo da hemolítica são capazes de reduzir a espessura da membrana, aumentando a sua área, num efeito de afinamento da membrana (CHEN et al., 2002).

Existem vários mecanismos propostos para descrever a interação de peptídeos com membranas lipídicas. O modelo de ação “carpete” foi primeiramente proposto para descrever o modo de ação da dermaseptina S e mais tarde foi usado para descrever o modo de ação de outros peptídeos antimicrobianos, alguns como os análogos naturais da dermaseptina e cecropinas (SHAI, 1999) (Fig. 1).

Neste mecanismo, uma grande quantidade de peptídeo abrange paralelamente a superfície da membrana, desorganizando a bicamada de modo semelhante a um detergente. A interação eletrostática dos peptídeos com as cabeças dos lipídios são cruciais e impõe uma deformação na bicamada que induz a permeação da camada lipídica (WU et al., 1999). Mesmo peptídeos que apresentam outros modelos de ação como a Melitina, em concentrações acima da crítica, podem levar a um acúmulo total de peptídeos na superfície da membrana, agindo como detergentes e provocando a desintegração da estrutura lipídica via o mecanismo de carpete, resultando na formação de agregações micelar (Fig. 2-D) (SENGUPTA et al., 2008).

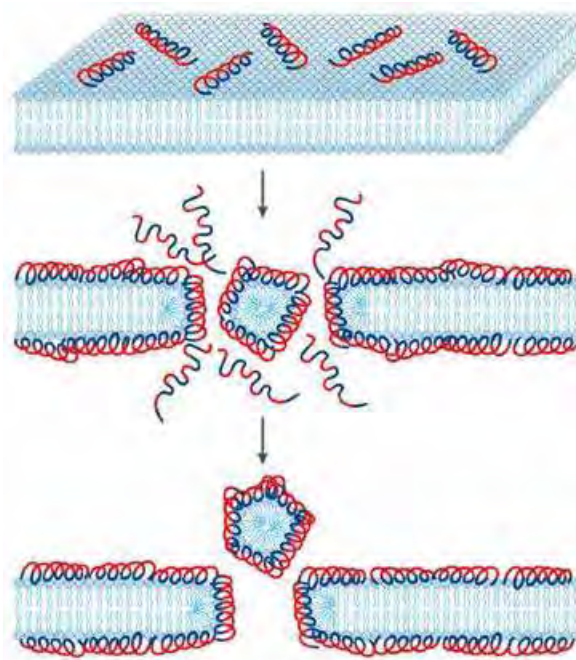


Figura 1: Ilustração do modelo carpete, sugerido por Oren e Shai (1998). Neste modelo, os peptídeos inicialmente ligam-se a superfície da membrana, e quando certa concentração de monômero é atingida, a membrana é rompida.

Um segundo tipo de interação entre peptídeos e superfície membrana é mostrado na figura 2-B, que ilustra a formação de poros ou canais através da membrana denominado de modelo “barril”. Esse mecanismo envolve três passos principais: (1) ligação dos monômeros na membrana, (2) inserção na membrana para a formação do poro e (3) recrutamento progressivo de monômeros adicionais para aumentar o poro (BECHINGER et al., 1999; SHAI, 1999).

Nesse modelo, os peptídeos através da associação de hélices- α anfipática forma canais transmembranares, revestindo completamente a superfície interna do poro, com a face hidrofóbica do peptídeo interagindo com a face interna apolar da camada lipídica, enquanto a sua face hidrofílica fica voltada para o canal aquoso do poro (YANG et al., 2001). Alamethicina é um peptídeo descoberto do fungo *Trichoderma viride* e é composto por 20 resíduos de aminoácido. Esse peptídeo forma poros do tipo barril e que são compostos por oito monômeros e apresentam o raio de cerca de 20Å, sendo que aproximadamente 11Å do raio corresponde ao diâmetro da hélice- α do peptídeo (HUANG, 2006).

Um dos mais bem estudados polipeptídios é o antibiótico gramicidina A, que também apresenta tipo de poro barril. Esse polipeptídeo é um pentadecapeptídeo que forma uma espiral aglomerado em meio hidrofóbico. Este se insere facilmente em membrana lipídica podendo forma um canal de dímeros ligados por hidrogênios localizados na região N-terminal. Como o dímero é mais curto que a espessura da membrana, acaba resultando em uma deformação dos lipídios perto do canal, diminuindo a espessura da membrana (ANDERSEN; KOEPPE, 2007). Porém, ainda são necessários mais trabalhos para avaliar em detalhes os efeitos da gramicidina A em lipídios próximos e distantes do canal (KHANDELIA et al., 2008).

Outros peptídeos, como melitina e magainina, induzem a formação de poros toroidal (Fig. 2-C). Este modelo foi inicialmente proposto com bases em observações da magainina 2. No caso das magaininas, a estrutura do poro é diferente do poro barril devido ao fato de que os lipídios são intercalados entre as hélices dos peptídeos. Isto pode ser devido às fortes interações entre resíduos de carga positiva do peptídeo com a cabeça dos grupos de fosfolipídios aniônicos (MATSUZAKI, 1999). É importante salientar que nesse modelo o peptídeo deve estar associado às cabeças dos fosfolipídios e não com a região das cadeias acílicas (HUANG, 2000).

Sengupta et al. (2008) mostrou uma significativa desordem na formação de poros toroidal por peptídeos antimicrobianos, denominados de poro toroidal desordenado (Fig. 2-

A). Na simulação por dinâmica molecular realizada com o peptídeo Melitina em presença da bicamada lipídica de dipalmitoilfosfatidilcolina, mostrou a formação espontânea de poros transmembranar acima da concentração crítica de P/L. Porém, diferente do modelo tradicional, eles mostraram que um ou dois peptídeos eram o suficiente para forrar o poro toroidal.

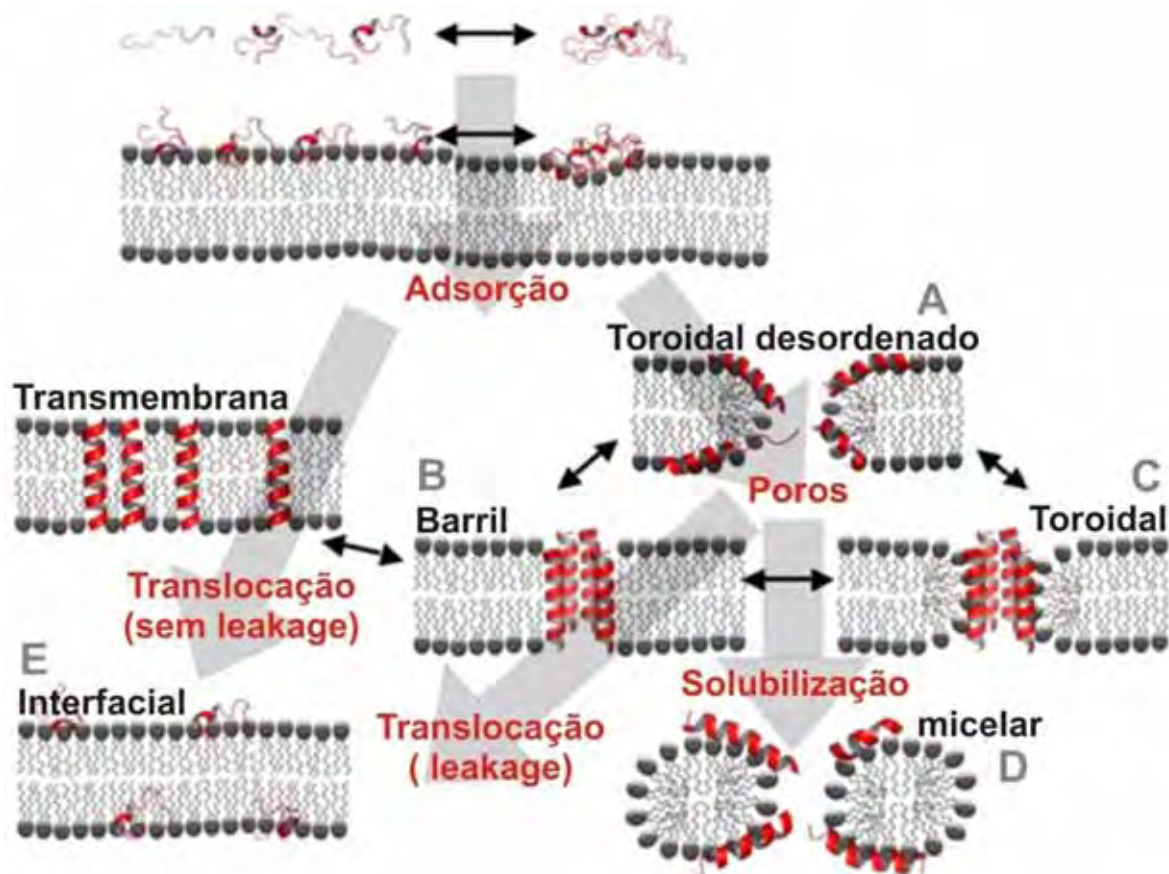


Figura 2: Esquema das possíveis vias de interação de peptídeos antimicrobianos com lipídios. Monômeros e pequenas agregações de peptídeos, em contato com a membrana, que acabam se ligando na interface (adsorção). Eventualmente os peptídeos distribuem-se equitativamente entre as duas camadas lipídicas. Isto pode ocorrer por duas vias de translocação diferentes. Na translocação sem “leakage” (vazamento), os peptídeos são capazes de cruzar a membrana sem a formação de poros. Em alguns casos, o estado intermediário transmembranar é termodinamicamente estável (por exemplo, peptídeos hidrofóbicos que adotam uma orientação transmembranar). A principal característica dos peptídeos antimicrobianos é a permeabilização da membrana seguindo a via translocação com “leakage”. Acima de certa razão peptídeo/lipídio, os peptídeos inserem na membrana formando poros. Uma variedade de estruturas de poros diferentes pode ser formada, incluindo os estados: “barril”; toroidal e toroidal desordenado. Estes estados separados devem ser interpretados em casos extremos, podendo ocorrer uma mistura de variedades desses modelos. O poro pode ser uma estrutura estável, mas também pode ser uma estrutura transiente. Neste caso, uma vez os peptídeos distribuídos nas monocamadas opostas, a formação do poro é reduzida, desativando o processo. Por outro lado, o acúmulo de certos peptídeos podem levar a desintegração da membrana como um detergente, resultando na formação de micelas (via solubilização). Observa-se que a estrutura secundária do peptídeo pode variar ao longo das várias vias. A configuração em random ou em hélice são meramente ilustrativas desses processos e não devem ser interpretadas literalmente (esquema adaptado de Sengupta et al. 2008).

Com o fechamento dos poros alguns peptídeos são transferidos para a camada interna da membrana, por mecanismo denominado de translocação (Fig. 2-E). Dessa forma, as

camadas interna e externa tornam-se contínuas e as moléculas de lipídios podem mover-se entre ambos os lados em um rápido “flip-flop”, pois a estrutura do poro é bastante instável. Conforme ocorre a redistribuição dos peptídeos entre as camadas lipídicas, a velocidade de formação do poro é reduzida. Este mecanismo foi proposto para os peptídeos magainina, melitina e mastoparano X (MATSUZAKI et al., 1996b; MATSUZAKI et al., 1997).

2.5 Aplicações terapêuticas

O crescente problema da resistência aos antibióticos convencionais e a necessidade de novos antibióticos tem estimulado o interesse no desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos na terapia humana (ZASLLOF, 2002). Estes peptídeos são alternativas promissoras para novos antibióticos com base na sua eficiência, segurança e enorme diversidade estrutural e funcional (PARISIEN et al., 2008).

Mais de 700 peptídeos antimicrobianos produzidos por plantas e animais foram identificados (STRAUS; HANCOCK, 2006). De longe, o peptídeo nisin é o de maior sucesso comercial sendo amplamente usado como conservante alimentar mundial sem substancial desenvolvimento de bactéria resistente (DELVES-BROUGHTON, 2005). Estudos laboratoriais e clínicos mostram que o aparecimento de resistência contra peptídeos antimicrobianos é menos provável do que o observado para os antibióticos convencionais, isso está relacionado ao seu principal alvo celular, a membrana plasmática, o que incentiva o seu uso terapêutico (ZASLLOF, 2002). No entanto, ainda existem muitos obstáculos para as aplicações terapêuticas desses peptídeos, especialmente devido à toxicidade e ao elevado custo para a produção e desenvolvimento de drogas (PARASIEN et al., 2008).

Neste sentido, estudos que possibilitam uma maior compreensão tanto da estrutura molecular desses peptídeos e sua interação com membranas, como de seu modo de ação, podem nos fornecer novas estratégias e modelos de ação para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas, particularmente dirigidas contra patógenos resistentes aos antibióticos convencionais. Assim, modelos de agentes farmacológicos podem ser descobertos na natureza, permitindo o desenvolvimento de novas drogas contra velhas e resistentes doenças infecciosas (YEAMAN; YOUNT, 2003).

3. OBJETIVO

O presente trabalho propôs a realização de um estudo estrutural e funcional do peptídeo policatiônico, Protonectarina-MP com o C-terminal nas formas ácida (-OH) e amidada (-NH₂).

O principal objetivo deste trabalho foi realizar um estudo da estrutura e função dos peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH), com intuito de estabelecer uma relação entre a estrutura molecular e as atividades biológicas, possibilitando uma compreensão do modo de ação desses peptídeos, ao nível de interações com membranas lipídicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 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 (estratégia Fmoc). Foi sintetizado o peptídeo **Protonectarina-MP** (INWKALLDAAKKVL-NH₂) e seu análogo com o resíduo C-terminal ácido (INWKALLDAAKKVL-OH).

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 HOBt (NOVABIOCHEM) como agente ativador dos aminoácidos e PyBOP (ALDRICH) como acoplador. Para as lavagens da resina e desproteção foi utilizado N-N-Dimetilformamida (SYNTH) e Piperidina (FLUKA), respectivamente.

Todas as reações acima foram realizadas sob agitação mecânica em capela. Após a acoplagem do último resíduo 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 ultra purificada 5% (v/v).

Esta solução de TFA-Anisol-Etanoditiol-Fenol-peptídeo foi centrifugada em uma centrífuga refrigerada (EPPENDORF, modelo 5810R) por 15 minutos a 1000 x g (3000 rpm) na presença de éter etílico (SYNTH) para promover a precipitação do peptídeo. O peptídeo foi ressuscitado em água bidestilada (destilador MARCONI, modelo MA 078) e ultra purificada (purificador NANOpure BARNSTEAD, modelo D4754). O controle de qualidade foi feito em espectrômetro de massas ESI-MS e seqüenciamento por Química Degradativa de Edman em um seqüenciador automático (SHIMADZU, modelo PPSQ-21A).

4.2. Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Para a purificação dos peptídeos provenientes da síntese manual, foi 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, 10x250mm, 5 µm (SHISEIDO). Para a fase móvel, foram utilizados dois solventes, A (água, contendo 0,1% TFA (v/v)) e B (acetonitrila 100% (MALLINCKRODT) contendo 0,1% TFA (v/v)).

4.3 Espectrometria de massas ESI

4.3.1 Espectrometria de massas (MS)

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um Espectrômetro de Massas ESI, do tipo triploquadrupolo modelo QUATTRO II (MICROMASS). O espectrômetro de massas ESI estava 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 80°C e a voltagem na agulha a 3,53 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 52 V no cone de amostra. A detecção no espectrômetro de massa foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 4000, em 10 segundos, com uma resolução de aproximadamente 3000; o sistema de aquisição de dados foi operado em modo contínuo (De SOUZA, 2006) .

4.3.2 Espectrometria de massas seqüenciais (MS/MS)

Para os experimentos de espectrometria de massas seqüenciais, o fluxo do probe ESI foi ajustado para 200 µL/h com auxílio da bomba de microinfusão. Foi utilizado Argônio como gás de colisão a uma pressão de $3 \cdot 10^{-3}$ mBar. Os íons fragmentos foram detectados por leituras a cada 4 segundos, com uma voltagem de 120 V no cone. Os íons produzidos através dos experimentos MS/MS foram acumulados durante 3 minutos, utilizando-se energia de colisão de 35 a 80 eV para os íons moleculares de carga +1 .

4.4 Seqüenciamento por Química Degradativa de Edman

Os peptídeos sintetizados e extensivamente purificados que apresentaram um único pico de massa molecular (m/z), em análises de espectrometria de massas, foram submetidos ao seqüenciamento primário através da técnica de Química Degradativa de Edman.

Estes experimentos foram realizados em um seqüenciador automático de fase gasosa PPSQ-21A (SHIMADZU), onde o peptídeo foi colocado numa membrana de PVDF, e os resíduos de aminoácidos foram identificados na forma de PTH-aminoácidos formados à 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.

4.5 Preparo dos Lipossomos

Os lipossomos foram preparados pela técnica de evaporação de fase reversa (SZOKA; PAPAHADJOPOULOS, 1978).

Para a montagem dos filmes foram preparadas soluções com diferentes composições de fosfolipídios dissolvidos em clorofórmio (Merck), nas seguintes proporções:

- PC → 100% fosfatidilcolina (PC)
- PC/PG → 70% PC e 30% fosfatidilglicerol (PG)
- PC/CL → 90% PC e 10% cardiopina (CL)
- PC/Chol → 80% PC e 20% colesterol (Chol)

Estas soluções foram secas em fluxo de nitrogênio (N_2) através de secagem rotativa, para promover a aderência do filme de fosfolipídios no tubo de ensaio. Após a secagem, os tubos foram levados para um dessecador por 12 horas para a retirada de traços de solvente.

Posteriormente, os filmes de PC, PC/PG, PC/CL e PC/Chol foram suspensos em água ultra pura, na concentração final de 3 mM, e mantidos sob agitação mecânica por 2,5 minutos. Após o período de agitação, a solução de fosfolípidios foi colocada em um extrusor (Avanti Mini-Extruder) equipado com membrana dupla de policarbonato de 200 nm. A suspensão de fosfolípidio foi gentilmente passada através das membranas num total de 11 vezes.

Para a preparação das vesículas utilizadas nos experimentos de vazamento de vesícula por fluorescência, os filmes de PC e PCPG foram suspensos pela adição de 750 μ L de solução do corante de fluorescente Carboxifluoresceína 25 mM, em tampão Tris/HCl 10mM contendo 1 mM de EDTA, em pH 7,5. A seguir, a suspensão foi agitada em vórtex por 2,5 minutos. Após o período de agitação, a solução foi submetida à 11 vezes de extrusão lenta em dupla membrana de policarbonato 200 nm. A suspensão foi mantida por 1 hora a 8° C, após esse período foi submetida à filtração em gel em coluna de Sephadex G 25 M, PD-10. Esta coluna foi lavada com 40 mL de solução NaOH 0,2 M, com 50 ml de água milli-Q, e previamente equilibrada com tampão Tris/HCl 10mM, 1mM de EDTA, 0,15M de NaCl em pH 7,5, que foi usada para eluir as vesículas. Foi coletado o globo excluído, com aspecto levemente turbido e de cor alaranjada, sem brilho fluorescente.

As suspensões de vesícula foram mantidas em refrigeração e utilizadas dentro de um período de no máximo 24 h. A concentração de fosfolípidios ou lipídeos em vesículas foi determinada pela análise de fósforo baseada na metodologia proposta por Rouser et al. (1970).

4.6 Determinação do tamanho de vesículas

As medidas de tamanho dos lipossomos foram realizadas nas dependências do Departamento de Física, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto/SP, sob supervisão do Prof. Dr. João Ruggiero Neto. O tamanho foi determinado por espalhamento de luz quase-elástico com auxílio do equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK), à 25°C, no modo "size", programado para realizar 3 medidas sucessivas da mesma amostra. Inicialmente uma alíquota da suspensão de vesícula foi diluída no mesmo tampão de preparação para atingir a concentração de 100 μ M; pois suspensões muito concentradas ou muito diluídas fogem aos parâmetros de controle de qualidade da medição pelo próprio equipamento. Foram determinados os valores de Z-average de cada análise, que correspondem ao diâmetro médio dos lipossomos.

4.7 Dicroísmo Circular

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados em um espectropolarímetro Jasco (modelo 710), junto ao Departamento de Física, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto/SP, sob supervisão 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 25°C. 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 seis acumulações utilizando-se cubetas de quartzo de caminho óptico de 0,5 cm. Foram feitas seis acumulações para cada análise.

As amostras foram solubilizadas em água. A partir dessas soluções foram feitas preparações contendo diferentes concentrações de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE / MERK), dodecil sulfato de sódio (SDS / SIGMA) e lipossomos zwitteriônicos e aniônicos, constituídos pelos fosfolipídios L- α -fosfatidilcolina (PC / SIGMA), fosfatidilglicerol (PG / SIGMA), cardioplipina (CL / SIGMA) e colesterol (Chol / SIGMA), sendo feitas leituras de dicroísmos para cada uma das preparações. A montagem desses lipossomos esta descrita anteriormente (item 4.5).

Fazendo-se a correção da linha de base, a elipticidade observada, θ (miligraus), foi convertida em elipticidade molar média, $[\Theta]$ (graus cm²/dmol), usando a relação:

$$[\Theta] = \frac{100 \theta}{L c n}$$

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 um modelo de dois estados, proposto por Rohl e Baldwin (1998), a elipticidade residual observada a 222nm (Θ_{222}^{obs} em graus cm²/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 $\Theta_{222}^C = -485$ graus cm²/dmol resíduo (ROHL; BALDWIN, 1998) corresponde a elipticidade em 100% de *random coil* (conformação aleatória). Θ_{222}^H (graus

cm²/dmol resíduo) (ROHL; BALDWIN, 1998) corresponde a elipicidade 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.

4.8 Reação de deuteração

4.8.1 Preparação dos proteolipossomos na ausência de óxido de deutério

Foram obtidos espectros MS e MS/MS controles, adicionando-se os peptídeos às suspensões de lipossomos em ausência de óxido de deutério. Para essas análises, as amostras foram preparadas imediatamente antes da introdução das mesmas no espectrômetro de massas. Utilizou-se para a preparação dos proteolipossomos uma alíquota de 23 µL de peptídeo em solução (1µg/µL) em água bidestilada que foi misturada em 30 µL de suspensão de lipossomo (3mM) em água e, então, a suspensão foi diluída com 36 µL de água bidestilada e 3 µL de ácido fórmico 88% (v/v).

4.8.2 Troca Hidrogênio/Deutério no peptídeo livre e em complexo de proteolipossomo

A troca H/D no peptídeo livre foi realizada em diferentes porcentagens de D₂O 99% (v/v) (CAMBRIDGE ISOTOPES LABORATORIES), até que fosse determinada a concentração de D₂O onde somente os deutérios das ligações peptídicas (menos susceptíveis às destrocas rápidas) permanecessem “marcados”, garantindo a incorporação de apenas 1 deutério por ligação peptídica. Utilizou-se para a preparação dos peptídeos livres uma alíquota de 23 µL de peptídeo em solução (1µg/µL) em água bidestilada, que foi diluída com 30 µL de água bidestilada e, então, foi adicionado 36 µL de D₂O 99% (v/v) e 3 µL de ácido fórmico 88% (v/v).

Para a troca H/D nos complexos de proteolipossomos na presença de óxido de deutério, as amostras foram preparadas através da incubação em diferentes tempos (1, 3, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos) de 23 µL de peptídeo em solução (1µg/µL) com 30 µL de lipossomo e, somente depois de transcorrido o tempo de incubação, adicionava-se 36 µL de D₂O 99%

(v/v) à suspensão de proteolipossomos. Essa troca H/D foi realizada durante 30 segundos e então interrompida ajustando-se o pH para 2,5 através da adição de 3 μL de ácido fórmico 88% e resfriamento a 0°C. Essa preparação foi então levada ao espectrômetro de massas sendo as condições de análise as mesmas descritas anteriormente no item 4.3.

As seqüências peptídicas foram manualmente assinaladas a partir do espectro de massas ESI-MS/MS. Os espectros dos peptídeos livres e dos proteolipossomos (na presença e ausência de D_2O) foram adquiridos continuamente por aproximadamente 3 min, por injeção direta. Levando-se em consideração o tempo de incubação e o tempo necessário para a aquisição dos dados, o primeiro ponto de tempo de cada medida de massas foi de 2 min e durou até os 3 min. Cada reação de troca H/D foi realizada três vezes para cada condição e os espectros de massas *in tandem* foram individualmente adquiridos para cada réplica do experimento.

4. 9 Experimentos de vazamento de vesículas por fluorimetria

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos no fluorímetro Hitachi F4500 (Spectronic Inc., Rochester, NY), junto ao Departamento de Química, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto/SP, sob supervisão do Prof. Dr. João Ruggiero Neto. As vesículas de PC e PC/PG (70:30) contendo em seu interior o corante fluorescente carboxifluoresceína (CF) foram monitoradas em 520 nm de emissão, com abertura de fenda de 0,5 nm. A amostra foi excitada em 490 nm, com abertura de fenda de 0,5nm e tensão na fotomultiplicadora de 700 V. Durante todo o experimento as amostras foram analisadas sob agitação magnética e na temperatura de banho em 24°C.

Uma alíquota fresca de suspensão de LUV foi pipetada em uma cubeta quartzo de 1 cm de caminho óptico, contendo solução de peptídeo em tampão Tris/HCl 10mM, 1mM EDTA e 150mM NaCl em pH 7,5, obtendo-se um volume final de 1200 μL . A quantidade de peptídeo variou de 0,5 μM a 45 μM , de acordo com a eficiência de permeabilização, e a quantidade de vesícula utilizada foi de 100 μM . O tempo de coleta foi de 20 minutos para o PCPG e de 30 minutos para o PC.

A porcentagem de fluorescência liberada foi determinada de acordo com o seguinte calculo (Dos SANTOS-CABRERA, 2006):

$$\% \text{ vazamento} = 100 \times (F - F_0) / (F_{100} - F_0),$$

onde, F é a intensidade observada de fluorescência. F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência de peptídeo, ou seja, com LUV intacto. F_{100} correspondem a intensidade de 100% de liberação de CF, determinado pela adição de 25 μL de solução 10% de Triton X-100. O F_{100} foi corrigido por um correspondente fator de diluição.

4.10 Emissão de fluorescência do triptofano

As medidas foram realizadas no mesmo fluorímetro utilizado para os experimentos de liberação de CF. O espectro de fluorescência de emissão do triptofano foi coletado utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1cm de caminho óptico, em banho de 24°C. O espectro de emissão foi coletado de 300 a 450 nm com excitação em 280 nm. A abertura da fenda de excitação e emissão foi fixada em 0.5nm. As amostras utilizadas para esse experimento foram as mesmas utilizadas para os ensaios de liberação de fluorescência. As mudanças no comprimento de onda na região do azul ($\Delta\lambda_{\text{max}}$) foram calculadas como as diferenças entre comprimento de onda máximo no espectro de emissão para o peptídeo adquirido em presença e ausência de vesícula. Os espectros foram montados e a fim de determinar os parâmetros das curvas espectrais com grande exatidão, os dados foram ajustados para distribuição de log-normal usando a equação a seguir (LADOKHIN et al., 2000):

$$\text{para } \lambda > \lambda_{\text{max}} - \frac{\rho\Gamma}{\rho^2 - 1},$$

$$I(\lambda) = I_0 \exp\left[\frac{\ln 2}{\ln^2 \rho} \ln^2\left(1 + \frac{(\lambda - \lambda_{\text{max}})(\rho^2 - 1)}{\rho\Gamma}\right)\right]$$

$$\text{e para } \lambda < \lambda_{\text{max}} - \frac{\rho\Gamma}{\rho^2 - 1}, \quad I(\lambda) = 0,$$

Onde, I_0 é a intensidade observada no comprimento de onda máximo; e Γ é a largura do espectro na metade da intensidade máxima ($I_0/2$). A assimetria da distribuição é descrita pelo parâmetro ρ , determinado pelo ajuste do mínimo quadrado não linear (NLLSQ). As análises dos dados e o NLLSQ foram determinados com o programa Origin 7.0.

4.11 Modelagem Molecular por homologia

A modelagem molecular baseia-se no conhecimento de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua seqüência de aminoácidos durante o processo evolutivo, e que pequenas mudanças na seqüência, geralmente resultam apenas em sutis modificações na estrutura tridimensional (NAYEEM et al., 2006). Assim, é possível modelar uma seqüência de aminoácidos, através do uso de uma seqüência homóloga, para qual exista uma estrutura tridimensional resolvida e disponível (HÖLTJE et al., 2003).

Para a construção do modelo estrutural dos peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) foi usada a modelagem molecular por homologia implementada no 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 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, com exceção dos hidrogênios. As coordenadas atômicas definidas por ressonância magnética nuclear (NMR) do peptídeo Mastoparano-X (código de acesso PDB: 2CZP) (TODOKORO et al., 2006), foi utilizado como modelo inicial (*molde*) para modelagem. O template utilizado foi de um peptídeo carboxiamidado, sendo que amidação no terminal-C foi tratado pelo programa como um ligante no peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂). O peptídeo Protonectarina-MP (-OH) foi modelado na ausência do ligante, ou seja, na ausência das coordenadas atômicas da molécula NH₂. Um total de 1000 modelos foram gerados para cada peptídeo pelo programa MODELLER8v2, e o modelo final foi selecionado baseando-se na sua qualidade estereoquímica.

4.11.1 Métodos de avaliação dos modelos estruturais

Para avaliar a qualidade estereoquímica dos modelos gerados foi usado o programa Procheck (LASKOWSKI et al., 1993), que 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.

Os parâmetros estereoquímicos 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 da proteína a ser avaliada no formato “pdb” e produz representações coloridas em PostScript facilmente interpretadas, descrevendo a estrutura de uma proteína, e também comparando duas estruturas de proteínas relacionadas, juntamente com uma lista detalhada de resíduo por resíduo, nos fornecendo uma avaliação da qualidade total da estrutura, em comparação às estruturas bem-refinadas de mesma definição, e destaca também as regiões que podem necessitar uma investigação mais detalhada.

Dentre as varias análises fornecidas pelo Procheck, utilizou-se o Diagrama de Ramachandran e o G-factor.

4.11.1.1 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 proteína (ângulo descrito pelo nitrogênio e carbono alfa N-C α e o ângulo descrito pelo carbono alfa e carbono C α -C) (Figura 3). Esses ângulos são denominados ângulos de torção ψ e ϕ , respectivamente. Em princípio, ψ e ϕ podem ter qualquer valor entre -180° e $+180^\circ$, porém muitos valores de ψ e ϕ são proibidos pelas interferências estéricas entre átomos pertencentes ao mesmo esqueleto polipeptídico e pelas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos.

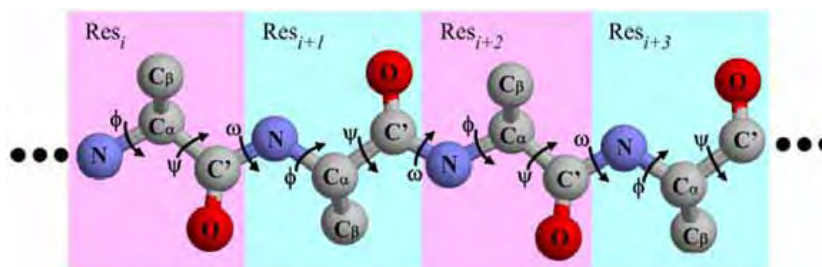


Figura 3: Parte de uma cadeia polipeptídica com os graus de torção dos ângulos diedros ψ e ϕ .

O esqueleto principal não é livre para girar ao redor do terceiro tipo de ligação na estrutura da proteína, a ligação peptídica, por ser uma ligação parcialmente dupla e, portanto quimicamente restrita a ser planar; sendo assim, os valores de ψ e ϕ para cada aminoácido fornecem uma descrição completa da estrutura da cadeia principal da proteína. Conseqüentemente, os ângulos de torção ψ e ϕ que fazem com que as esferas colidam correspondem à conformação estericamente não permitida (região não permitida) para a cadeia principal de um polipeptídeo (RAMACHANDRAN et al., 1963).

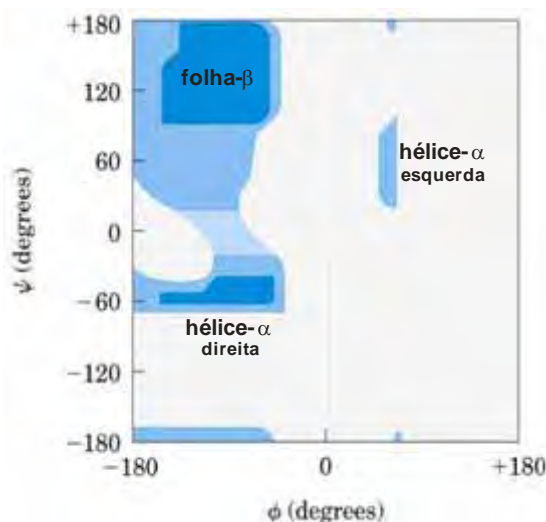


Figura 4: Diagrama de Ramachandran. A região permitida em azul escuro, a região adicionalmente permitida em azul claro e a não permitida em cinza.

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. Uma estrutura de boa qualidade deve ter 90% ou mais de seus resíduos nas regiões mais favoráveis (Figura 4). Na figura 4, as áreas em cinza correspondem a regiões onde existem os choques estereoquímicos na proteína. Estas regiões não permitidas 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 ψ e ϕ em todos os quadrantes do diagrama de Ramachandran. As regiões em azul escuro 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 azul claro 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.

4.11.1.2 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 envolve a média dos diversos G-factor dos ângulos de torção (Phi-psi; Chi1-chi2; Chi1; Chi3-chi4 e Omega) juntamente com a geometria covalente, fornecendo em um único número o G-factor para toda a estrutura.

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). Se uma proteína ou peptídeo tiver muitos resíduos com G-factor baixo sugere que algo pode estar errado com a geometria total da proteína avaliada e, conseqüentemente, o modelo gerado não está bom. Assim, o ideal é o G-factor estar acima de -0.5, os modelos que apresentarem entre -1.0 e -0,5 devem ser investigados.

4.12 Ensaio de Atividade Biológica

4.12.1 Desgranulação de Mastócitos

Apesar de algumas modificações, os testes de desgranulação de mastócitos foram realizados segundo a metodologia descrita por Hide et al. (1993). Foram testados a atividade biológica de desgranulação de mastócitos do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH). O ensaio de desgranulação de mastócitos utilizou-se mastócitos peritoneais de ratos *Wistar*. As amostras foram testadas em doze diferentes concentrações, variando de $1,5 \times 10^{-7}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M, diluídas na progressão geométrica de razão $\frac{1}{2}$. Foram preparadas as soluções MCM-1, MCM-2 e SH para a realização do experimento.

Para o preparo de 100 mL de solução MCM-1 (*mast cell medium*), foram colocados: 0,877g de NaCl (MERCK); 0,028g de KCl (MERCK); 0,043g de NaH₂PO₄ (SYNTH); 0,048g de KH₂PO₄ (SYNTH); 0,100g de Glicose (SYNTH); 0,100g de BSA (SIGMA); 90 µL de CaCl₂ 1M (VETEC) e 100 mL de água bidestilada.

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

A solução SH foi preparada através da dissolução de 0,588g de Citrato trissódico (MERCK) em 10 mL de água bidestilada. O pH foi ajustado para 4,5 com solução de HCl 1 M (SYNTH). Então, adicionou-se 0,0034g de p-nitrofenil-N-acetil- β -glucosaminidina.

4.12.1.1 Isolamento de Mastócitos

Os ratos *Wistar* macho com aproximadamente 30 dias foram anestesiados com éter e em seguida decapitados para a retirada do sangue. Foi feito um corte longitudinal no abdômen para expor a cavidade peritoneal. Os órgãos foram afastados e a cavidade peritoneal foi lavada com aproximadamente 10 mL de solução MCM-2 para extração do fluido contendo os mastócitos em suspensão. O fluido foi coletado com auxílio de uma pipeta e armazenado em banho de gelo. Repetiu-se este procedimento por três vezes.

O fluido coletado foi centrifugado por 5 min. à velocidade de 1000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 2 mL de MCM-1. Este procedimento foi realizado 2 vezes. A suspensão de células foi utilizada para o ensaio de desgranulação.

A contagem do número de células foi feita em câmara de Neubauer com auxílio de uma solução corante de 0,05% de cristal violeta em HCl (3,6N). Foram contados 10 quadrados e a média obtida foi multiplicado por 10^4 . No final, ajustou-se a concentração para $4,5 \times 10^5$ células/mL.

4.12.1.2 Ensaio de Desgranulação de Mastócitos

Foi preparada uma micro-placa colocando-se 10 μ L de peptídeo na concentração de 10 μ g/ μ L no primeiro poço e foi acrescentado 90 μ L MCM-1. Para fazer as diluições, retirou-se 50 μ L do primeiro poço e passou para o segundo que estava com 50 μ L de solução MCM-1. Esse processo foi realizado até o último poço e os últimos 50 μ L retirados foi descartado. Em seguida, foi acrescentado 50 μ L de solução MCM-2 contendo suspensão de mastócitos. Cada poço continha diferentes concentrações de peptídeo, que variaram de $1,5 \times 10^{-7}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M. Este procedimento foi realizado em triplicata com os peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂), Protonectarina-MP (-OH) e com o HR2, que foi usado como peptídeo padrão para desgranulação.

Para o valor de referência 0% de desgranulação foram adicionados 5 μ L de água bidestilada, 45 μ L de MCM-1 e 50 μ L de suspensão de mastócitos, e para o valor de referência 100% foram adicionados 5 μ L de água bidestilada contendo 1% (v/v) de Triton X-100, 45 μ L de MCM-1 e 50 μ L de suspensão de mastócitos.

Após a montagem da micro-placa, esta foi incubada em banho-maria por 15 minutos a 37°C. Após a incubação, cada poço foi centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm e os 50 μ L do sobrenadante foi colocado em uma nova placa e acrescentado 50 μ L da solução SH. Então, esta placa foi incubada por 6 h em estufa 37°C.

Após a incubação, 50 μ L de cada poço foram descartados e 150 μ L de solução Tris 0,2 M (SIGMA) foram adicionados. A medida de desgranulação foi feita através da leitura de absorbância a 405 nm, em leitora de placas (Biotrak II – AMERSHAM BIOSCIENCE).

4.12.2 Medida da liberação da enzima lactato desidrogenase do citoplasma de mastócitos

A atividade de lactato desidrogenase foi determinada a partir da solução em suspensão retirada da atividade de desgranulação, descrito no item 4.12.1. Os peptídeos Protonectarina-MP (-OH), Protonectarina-MP (-NH₂) e o peptídeo padrão HR2 tiveram suas atividades medidas em cinco diferentes concentrações, variando de $1,2 \times 10^{-6}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M.

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima presente somente no citoplasma celular e que catalisa a redução do piruvato por NADH, obtendo-se L-lactato e NAD⁺. Esta enzima serve para indicar a lise em células de mastócitos ocasionada por peptídeos tóxicos. A concentração catalítica é determinada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH. Para a sua determinação, foi utilizado o Kit UV LDH (BIOBRÁS DIAGNÓSTICOS) que é composto por um reagente A e um reagente B.

O reagente A é composto por Tampão Fosfato 50 mmol/L pH 7,5 e Piruvato 0,6 mmol/L. O reagente B é formado por NADH 0,18 mmol/L. O reagente de trabalho usado para o ensaio foi obtido através da mistura na proporção de 4 partes de reagente A para cada 1 parte do reagente B. Após o seu preparo, este foi pré aquecimento em banho-maria durante três minutos a 37°C.

Foi pipetado 20 μ L do sobrenadante descartado do ensaio de desgranulação de mastócitos em uma cubeta termostaticada a 37°C. Em seguida, foi acrescentado 1 mL do reagente preparado. Após 60 segundos, foram realizadas as medidas de absorbância a 340 nm, medido em espectrofotômetro. Depois de anotar a absorbância inicial (A₀), foram efetuados

novas leituras a cada minuto, durante 3 minutos (A_1 , A_2 e A_3). Usando as leituras das absorvâncias, foi calculada a variação média da absorvância por minuto ($\Delta A/\text{min}$) através da seguinte equação:

$$\Delta A/\text{min} = (A_0 - A_1) + (A_1 - A_2) + (A_2 - A_3)/3$$

A atividade da LDH na amostra foi calculada pela multiplicação do $\Delta A/\text{min}$ pelo fator (37°C) que apresenta o valor igual a 8095.

Para o valor de referência 0%, foram adicionadas água bidestilada e suspensão de mastócitos. Para o valor de referência 100%, foram adicionados água bidestilada contendo 1% (v/v) de Triton X-100 e suspensão de mastócitos.

4.12.3 Atividade Hemolítica

Os ensaios de atividade hemolítica foram feitos conforme a metodologia descrita por De Souza, 2006. Foram testados os peptídeos Protonectarina-MP ($-\text{NH}_2$) e Protonectarina-MP ($-\text{OH}$), variando a concentração de $6,1 \times 10^{-7}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M.. Devido a sua atividade hemolítica, o peptídeo Melitina foi usado como padrão.

Foram colocados 100 μL de sangue de ratos *Wistar* macho em um Becker contendo 50 mL de solução salina 0,9% (m/v) de NaCl (MERCK) e 10mM de CaCl_2 (VETEC) sob agitação durante 15 minutos.

Para a lavagem das células sanguínea, a solução salina contendo sangue foi centrifugada durante 15 minutos, a 25°C , em 3000rpm. O sobrenadante foi descartado, e as células foram resuspendidas em solução salina e novamente foi centrifugado a 25°C durante 15 minutos em 3000 rpm. Esse procedimento foi realizado duas vezes. Para a preparação da suspensão de eritrócitos 1% (v/v), foram adicionados 9,9 mL de solução salina em 100 μL de células lavadas.

Foram colocados em tubos de eppendorf 20 μL de peptídeo na concentração de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ com 180 μL de solução salina. As diluições foram feitas retirando-se 100 μL do primeiro eppendorf e colocando-o em um segundo eppendorf contendo 100 μL de solução salina. Esse procedimento foi realizado até o décimo eppendorf e os últimos 100 μL foram descartados. Em seguida, foi acrescentado 100 μL de suspensão de eritrócito em cada eppendorf. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada peptídeo. Em seguida, os eppendorfs foram incubados a 25°C durante 2 horas, em agitação.

Após a incubação, cada eppendorf foi centrifugado durante 5 minutos em 3000 rpm. O sobrenadante foi colocado em uma micro-placa e a medida de hemólise foi feita através da leitura de absorbância a 540 nm, em leitora de placas (Biotrak II – AMERSHAM BIOSCIENCE).

Para o valor de referência zero, foram colocados 20 µL de solução salina e 180 µL de suspensão de eritrócito. Para valor de referência 100% de hemólise, foram adicionados 20 µL de solução salina contendo 1% (v/v) de Triton X-100 (t-Octilfenoxipoli-etoxietanol, SIGMA) e 180 µL de suspensão de eritrócitos.

4.12.4 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) foram testadas e determinou-se as suas concentração mínima inibitória (MIC). O teste foi realizado segundo a metodologia descrita por Coyle et al. (2003) e Meletiadis et al. (2000). Os microorganismos usados foram: *S. aureus* (CCT 2580); *B. cereus* (ATCC 11778); *E. coli* (CCT 1457) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442), obtidos no Laboratório de Microbiologia do Centro de Insetos Sociais – CEIS (IBRC/UNESP). Toda a manipulação dos microorganismos foi feita em câmara de fluxo laminar vertical (PACHANE) e todo o material foi esterilizado em autoclave vertical A V30 (PHOENIX), por 20 minutos à 121°C e 1atm.

Para a realização do experimento, os inoculos foram preparado em solução salina de NaCl 0,9% a partir da suspensão de colônias de 18 horas cultivadas em meio de Müller-Hinton. A concentração foi acertada com o valor de 0,5 na escala McFarland, o equivalente a 1×10^4 células/mL. Foram adicionados 200 µL de inoculo em 20 mL de meio Müller-Hinton líquido, que foi utilizado para a montagem da micro-placa.

Em cada poço foi colocado 10 µL de solução de peptídeo em diferentes concentrações, variando a concentração de 0,24 a 500 µg/mL ($1,5 \times 10^{-7}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M), 10 µL de suspensão de inoculo e 80 µL de meio Müller-Hinton líquido. Para o valor zero, foram colocados 10 µL de água bidestilada no lugar do peptídeo e 10 µL de salina no lugar de suspensão de inoculo. Para o valor de 100% foram colocados 10 µL de água bidestilada no lugar do peptídeo.

A placa foi incubada em 37°C por 18 h e depois foram adicionados em cada poço 10 µL de cromóforo cloreto de trifeniltetrazolium 0,5% em água (MALLINCKRODT). Este cromóforo coloriu em vermelho os poços que não sofreram inibição. As leituras foram feitas

após 3 horas de re-incubação em estufa 37°C. Foi usado a Oxytetraciclina como controle do experimento.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese, purificação e controle de qualidade dos peptídeos

Os peptídeos **Protonectarina-MP** (INWKALLDAAKKVL-NH₂) e seu análogo com o resíduo C-terminal ácido (INWKALLDAAKKVL-OH), foram sintetizados através do método manual em fase sólida, utilizando-se química N-9-fluorenilmetoxicarbonil (estratégia Fmoc).

Os peptídeos obtidos à partir da síntese foram purificados em um sistema de Cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A figura 5 mostra o cromatograma de purificação do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) realizado em condições isocráticas de 40% de acetonitrila, contendo 0,1% de TFA (v/v). O pico do peptídeo foi eluído em 25,16 minutos, em coluna C-18 (10x250mm) a um fluxo de 2 mL/min. Os demais picos correspondem as impurezas provenientes da síntese.

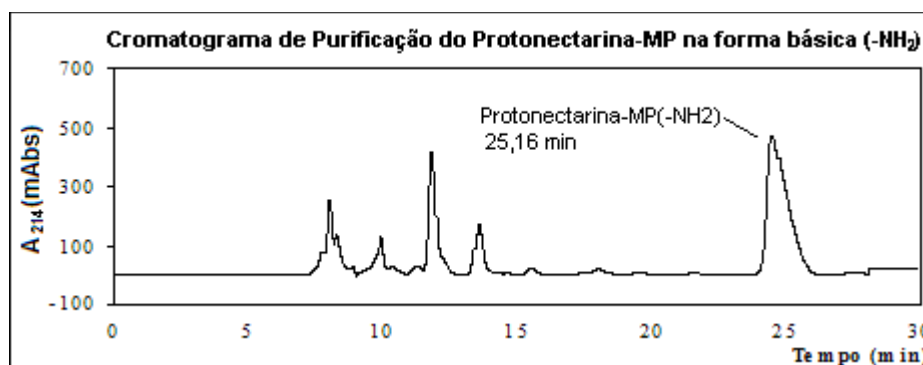


Figura 5: Perfil da cromatograma líquida de alta performance (HPLC) sob fase reversa da purificação do Protonectarina-MP (-NH₂), usando o gradiente isocrático de 40% acetonitrila, contendo 0,1% TFA (v/v), em coluna C-18 (10x250mm) a um fluxo de 2 mL/min.

A figura 6 mostra o cromatograma de purificação do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) realizado em condições isocráticas de 38% de acetonitrila, contendo 0,1% de TFA (v/v). O pico eluído em 21,12 minutos, em coluna C-18 (10x250mm) a um fluxo de 2 mL/min, corresponde ao peptídeo Protonectarina-MP (-OH).

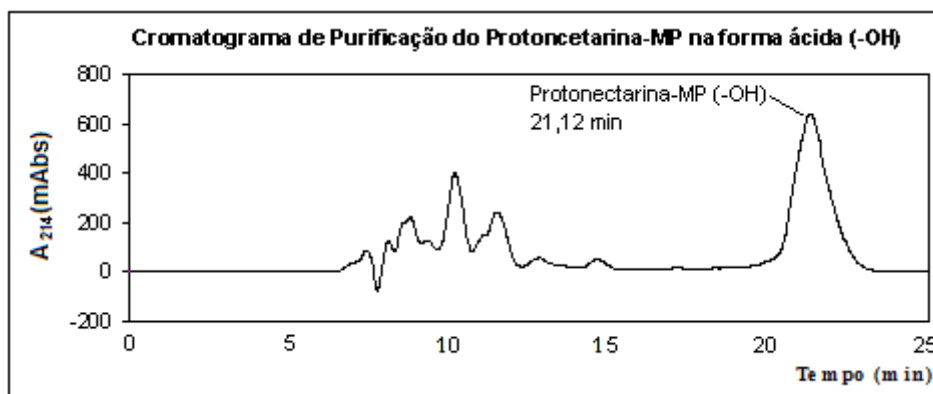


Figura 6: Perfil da cromatograma líquida de alta performance (HPLC) sob fase reversa da purificação do peptídeo Protonectarina-MP (-OH), usando o gradiente isocrático de 38% de acetonitrila, contendo 0,1% TFA (v/v), em coluna C-18 (10x250mm) a um fluxo de 2 mL/min.

Para o controle de qualidade e de pureza, foram obtidos os espectros de massas ESI-MS dos peptídeos purificados. A Figura 7 mostra o espectro ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂), onde se observam três picos de m/z 1582.53, 791.79 e 528.25, correspondentes às formas $[M + H]^+$, $[M + 2H]^{+2}$ e $[M + 3H]^{+3}$, respectivamente; enquanto que a Figura 8 mostra o espectro obtido para o peptídeo Protonectarina-MP (-OH), também com três picos de m/z 1583.50, 792.60 e 528.60, correspondentes às formas $[M + H]^+$, $[M + 2H]^{+2}$ e $[M + 3H]^{+3}$, respectivamente. Estes resultados confirmam a elevada pureza e a massa teórica 1581.55 Da e 1582.50 Da, esperada para a Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP(-OH), respectivamente.

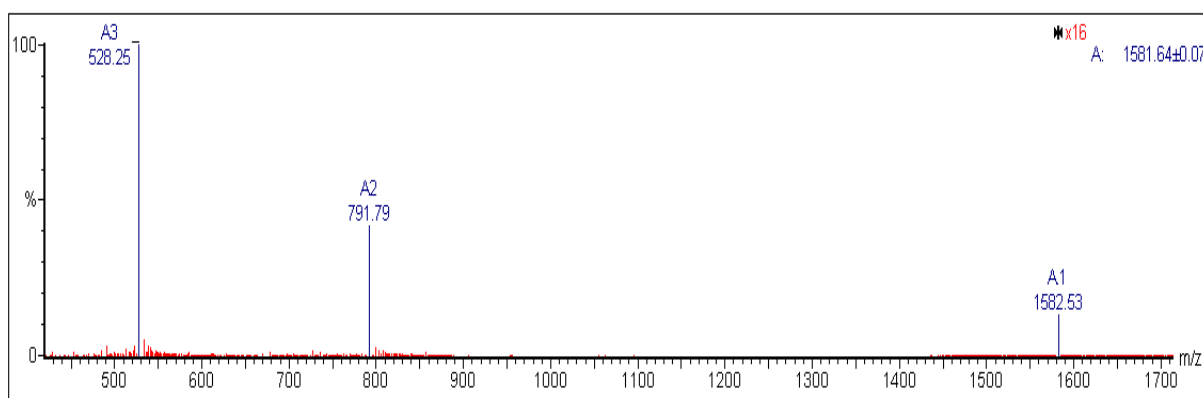


Fig. 7: Espectro da massa ESI-MS do peptídeo na forma básica.

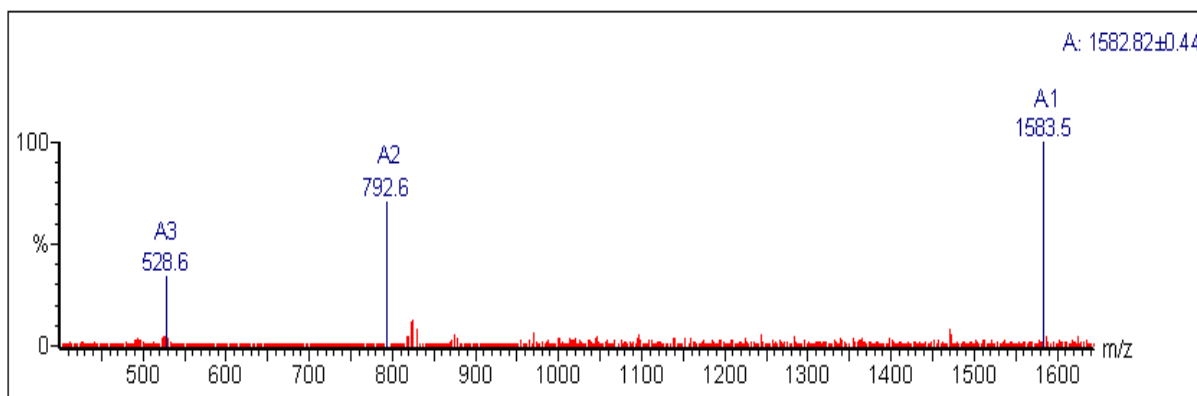


Fig. 8: Espectro da massa ESI-MS do peptídeo na forma ácida.

Os peptídeos sintetizados e extensivamente purificados que apresentaram um único pico de massa molecular (m/z), em análises de espectrometria de massas, foram submetidos ao seqüenciamento primário através da técnica de Química Degradativa de Edman. A seqüência obtida foi: INWKALLDAAKKVL. Entretanto, esse método não informa se o resíduo de aminoácido do C-terminal está na forma carboxil ou carboxilamidada. Para determinar o tipo de C-terminal fez-se o cruzamento dos dados obtidos pelo seqüenciamento por química degradativa de Edman e dos espectros de ESI-MS, o que confirmou a exatidão da síntese.

5.2 Controle de qualidade dos lipossomos

Para um controle de qualidade das vesículas produzidas, estas tiveram seu tamanho e homogeneidade medidas pelo equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK), por espalhamento de luz quase-elástico. A distribuição de tamanho pela intensidade revela uma única população homogênea de vesículas para cada composição de lipídeos, que apresentaram o diâmetro médio de $129,0 \pm 1$ nm, $125,7 \pm 0,6$ nm, $123,6 \pm 0,3$ nm e $127,3 \pm 0,8$ nm em PC, PC/Chol, PC/PG e PC/CL, respectivamente. Com isso, confirmou-se o sucesso na preparação das vesículas unilamelares grandes (LUVs) utilizadas nos experimentos.

5.3 Estudos Estruturais

5.3.1 Análises de Dicroísmo Circular

Análises de dicroísmo circular (CD) constituem uma importante fonte de informações tanto sobre a estrutura secundária de uma proteína ou peptídeo, como das mudanças conformacionais sofridas por estas moléculas. Assim, além de caracterizar a estrutura secundária de um peptídeo em diferentes meios, também é possível entender as mudanças conformacionais e interações de peptídeos com membranas, pois as análises podem ser realizadas em meios que mimetizam ambiente natural onde tais moléculas biológicas atuam.

Meios com surfactantes são muito utilizados na simulação de ambientes de membrana, para predição das estruturas secundárias de peptídeos. Isso se deve ao fato destes surfactantes formarem aglomerados (micelas) em soluções aquosas conforme a sua concentração, proporcionando ambientes hidrofílico / hidrofóbico. A concentração mínima na qual essas micelas se formam é denominado Concentração Micelar Crítica ou CMC. Desta forma, as análises de CD foram feitas em soluções de dodecilsulfato de sódio (SDS), em concentrações acima e abaixo da CMC, observando-se o comportamento dos peptídeos nestas condições.

Juntamente com o SDS, o trifluoretanol (TFE) também é muito utilizado na elucidação das estruturas secundárias de peptídeos, pois ele é um indutor e estabilizador de estruturas, devido a sua característica de mimetizar ambiente de membrana lipídica. Neste sentido, também foi analisado o comportamento estrutural dos peptídeos em solução aquosa de TFE (40% TFE: 60% H₂O).

A partir dos espectros de CD, foi calculada a porcentagem da cada tipo de estrutura secundária, no entanto, não é possível determinar quais são os resíduos envolvidos na formação da estrutura. Para a determinação da estrutura em hélice- α , são observadas duas bandas negativas em 222nm e 208nm, além de uma banda positiva em 190nm. Posteriormente, a elipicidade residual em 222nm foi convertida em fração de hélice, usando o método proposto por Rohl and Baldwin (1998).

Assim, ambos os peptídeos foram submetidos à análises de CD, na concentração de 20 μ M, variando-se somente o solvente utilizado. Os solventes foram: água; SDS 165 μ M (abaixo da CMC); SDS 8mM (acima da CMC); e TFE 40% (v/v).

A figura 9 mostra os espectros do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂); em meio de SDS acima e abaixo da CMC e em presença de TFE 40% (v/v), observa-se uma banda positiva em 190 nm e duas bandas negativas próxima a 208 nm e 222 nm, indicando a ocorrência de conformação em hélice- α desse peptídeo, em tais meios. Porém, a curva obtida

em água não mostra as bandas características de conformação em hélice, sugerindo que Protonectarina-MP-(NH₂) não apresenta qualquer organização de estrutura secundária nesta condição.

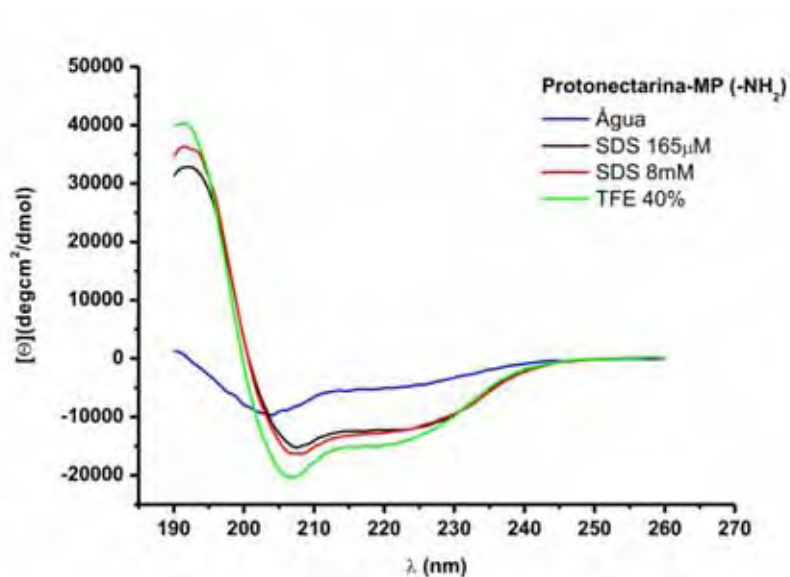


Figura 9: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂) obtidos em solução de água, solução de SDS 165 μM e 8 mM e solução de TFE 40% (v/v).

O espectro do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) (figura 10) mostra que em meio de SDS (acima e abaixo da CMC) e em TFE 40% (v/v), um sinal negativo em torno 208 nm e 222 nm, mas não tão intenso como no peptídeo Protonectarina-MP-(NH₂). Além disso, a curva formada em água apresentou uma banda negativa próxima 200 nm, indicando que Protonectarina-MP-(OH) também não apresenta qualquer organização de estrutura secundária em meio aquoso.

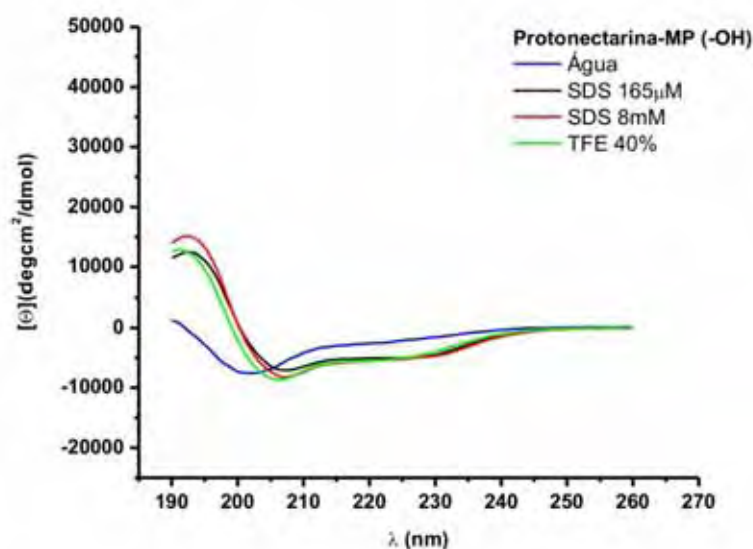


Figura 10: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) obtidos em solução de água, solução de SDS 165 μ M e 8mM e solução de TFE 40% (v/v).

A técnica de CD também permite o estudo das interações de peptídeos com membranas biológicas. Nesse sentido, tem-se utilizado lipossomos com diferentes composições, conforme o interesse de estudo. Assim, em uma segunda etapa deste trabalho, foi realizado análises de CD em presença de vesículas, com diferentes composições de fosfolípidios, com o intuito de verificar a estrutura secundária que o peptídeo irá adotar em presença de membranas.

Dessa forma, foram preparadas: vesículas neutras, que mimetizam membranas zwitteriônicas de células animais, com fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilcolina/colesterol (PC/Chol; 80/20); e vesículas carregadas negativamente, que mimetizam membranas bacterianas aniônicas, com fosfatilcolina/fosfatidilglicerol (PC/PG; 70/30) e fosfatidilcolina/cardioplipina (PC/CL; 90/10). Os peptídeos também foram manipulados na concentração de 20 μ M e todas as vesículas foram preparadas em tampão Tris-borato 5mM (contendo de EDTA 0,5 mM , pH 7,52).

A figura 11 mostra os espectros do Protonectarina-MP (-NH₂) em presença de diferentes vesículas. Em PC/PG, notam-se bandas negativas próxima a 208 nm e 222 nm, caracterizando hélice- α . Em PC/CL, PC e PC/Chol, observa-se uma banda negativa em torno de 205 nm e com menor intensidade.

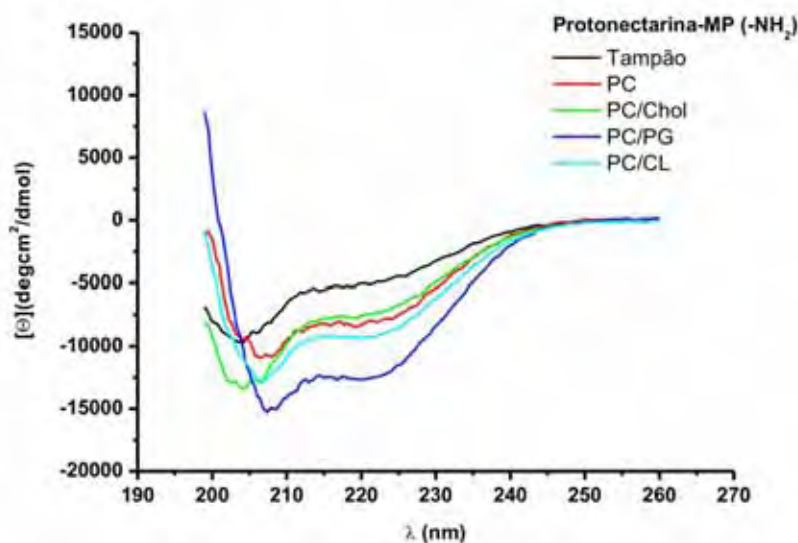


Figura 11: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) obtidos em tampão Tris-borato 5mM (pH 7,52), suspensão de vesículas de PC, PC/Chol, PC/PG e PC/CL.

Os espectros do Protonectarina-MP (-OH) em presença de diferentes vesículas (figura 12) mostra em PC/PG, uma banda negativa em 208 nm e 222nm, entretanto, com intensidade muito menor em relação ao Protonectarina-MP (-NH₂). Além disso, em presença de PC/CL, PC, PC/Chol e tampão Tris-borato, o peptídeo se comportou de maneira randômica.

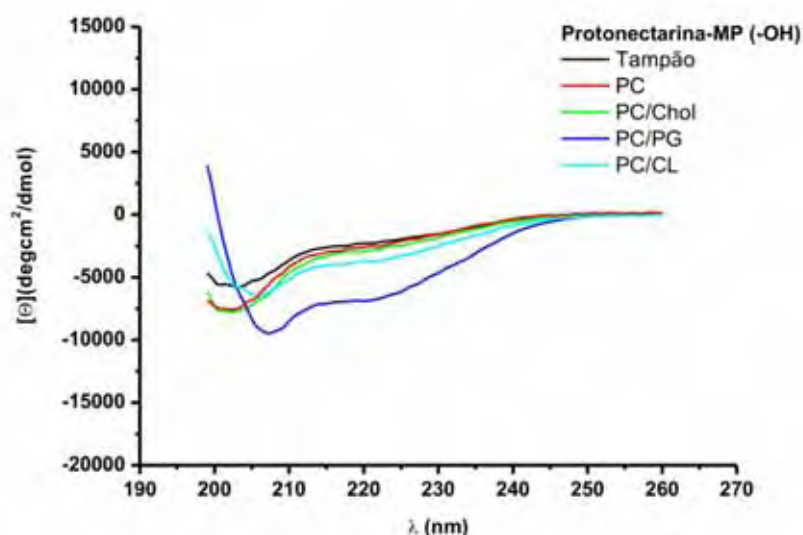


Figura 12: Espectros de dicroísmo circular do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) obtidos em tampão Tris-borato 5mM (pH 7,52), suspensão de vesículas de PC, PC/Chol, PC/PG e PC/CL.

Tabela 1: Elipticidade molar em 222nm e fração de hélice- α dos peptídeos Protonectarina-MP (-OH) e Protonectarina-MP (-NH₂), em solução de SDS 165 μ M e 8mM, TFE 40% (v/v) e solução aquosa.

	165 μ M SDS		8 mM SDS		40% TFE		Água	
	[Θ]222	fH	[Θ]222	fH	[Θ]222	fH	[Θ]222	fH
Protonectarina -MP (-OH)	-5054,19	0,16531	-5362,64	0,17647	-5425,42	0,17874	-2488,03	0,0724
Protonectarina-MP (-NH ₂)	-12198,8	0,38465	-12399,5	0,39124	-14527,9	0,46114	-4330,96	0,1263

Os cálculos de elipticidade molar em 222nm e fração de hélice foram feitos segundo as equações do método proposto por Rohl and Baldwin (1998), e os resultados obtidos são mostrados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 2: Elipticidade molar em 222nm e fração de hélice- α dos peptídeos Protonectarina-MP (-OH) e Protonectarina-MP (-NH₂) em tampão Tris-borato (pH 7,5), em presença de vesículas sintéticas neutras (PC e PC/Chol-80/20) e aniônicas (PC/PG-70/30 e PC/CL-90-10).

	Tampão Tris-Borato (pH 7,5)		Vesículas Neutras				Vesículas Aniônicas			
	[Θ]222	fH	PC		PC/Chol		PC/PG		PC/CL	
			[Θ]222	fH	[Θ]222	fH	[Θ]222	fH	[Θ]222	fH
Protonectarina MP (-OH)	-2191,8	0,0617	-2428,3	0,0703	-2762,1	0,0823	-6702,3	0,2249	-3689,4	0,1159
Protonectarina-MP (-NH ₂)	-4973,4	0,1473	-7978,6	0,2460	-7343,1	0,2252	-12455,5	0,3930	-9172,2	0,2852

A tabela 3 sumariza de forma comparativa a porcentagem de hélice- α assumida pelas duas formas do peptídeo Protonectarina-MP nas diferentes condições testadas. Observa-se que a porcentagem de hélice- α do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) sempre foi maior em relação ao Protonectarina-MP (-OH).

Tabela 3- Porcentagem de hélice- α do peptídeo Protonectarina-MP na forma ácida e básica em diferentes solventes, calculadas a partir da elipticidade molar em 222nm.

	% de Hélice- α	
	Protonectarina-MP (-OH)	Protonectarina-MP (-NH ₂)
SDS 165 μ M	16,53	38,46
SDS 8 mM	17,64	39,12
TFE 40%	17,87	46,11
Água	7,24	12,63
Tampão	6,17	14,73
PC	7,03	24,60
PC/Chol	8,23	22,52
PC/PG	22,49	39,30
PC/CL	11,59	28,52

Os resultados revelam que ambos os peptídeos apresentam uma maior fração de hélice- α nos meios de SDS e TFE, no entanto, possuem pouca tendência de formar hélice- α em solução aquosa e em tampão Tris-borato (pH 7,5). Protonectarina-MP (-OH) e Protonectarina-MP (-NH₂) apresentaram 16% e 38,46% de hélice- α , respectivamente, em SDS abaixo da CMC. Quando se aumentou a concentração de SDS para acima da CMC, observa-se um pequeno aumento na porcentagem de hélice- α , que passa a ser de 17,64% e 39,12% , para Protonectarina-MP (-OH) e Protonectarina-MP (-NH₂), respectivamente. Além disso, os maiores valores de hélice- α para ambos os peptídeos foram encontrados no meio de TFE 40% (v/v), com 17,87% no Protonectarina-MP (-OH) e 46,11% no Protonectarina-MP(-NH₂).

Os peptídeos formando proteolipossomos em presença de vesículas sintéticas neutras (PC e PC/Chol) apresentaram estrutura secundária com menor fração de hélice- α em relação aos proteolipossomos formado em presença de vesículas aniônicas.

Na presença de vesículas aniônicas, ambos os peptídeos apresentaram maior fração de hélice- α em PC/PG (22,49 % no Protonectarian-MP(-OH) e 39,30 % no Protonectarina-MP (-NH₂)) em relação à estrutura secundária observada em presença de vesículas de PC/CL (11,59% no Protonectarina-MP (-OH) e 28,52 % no Protonectarina-MP (-NH₂)). Isso provavelmente ocorreu pelo fato das vesículas serem compostas com proporções diferentes de fosfolipídios carregados negativamente, com as vesículas de PC/PG apresentando três vezes mais fosfolipídios negativos em relação a vesícula de PC/CL, como é observado nas membranas aniônicas de bactérias que são compostas por uma maior proporção de fosfatidilglicerol em relação a cardiolipina. Portanto, foi observada nas vesículas aniônicas uma maior estruturação secundária dos peptídeos conforme aumenta a quantidade de carga negativa nas vesículas.

As análises de dicroísmo circular revelaram que o peptídeo apresentando o resíduo C-terminal na forma amidada apresenta uma maior tendência de se estruturar em hélice- α , em relação ao peptídeo apresentando o resíduo C-terminal na forma ácida, independente do ambiente na qual se encontrava.

A redução da estrutura helicoidal para o peptídeo apresentando o resíduo C-terminal na forma ácida em relação à forma amidada já foi relatado previamente por Sforça et. al. (2004), para o peptídeo EMP-AF. Neste estudo, demonstrou-se com o uso de ressonância magnética nuclear que o peptídeo EMP-AF-OH apresentava um número de conformações helicoidais familiares na região N-terminal, enquanto que apresentava uma grande variedade

helicoidal na região C-terminal, indincando que o peptídeo possui certo grau de flexibilidade conformacional nessa região.

Para identificar o padrão através do qual uma hélices- α ideal se transforma ao longo do tempo por simulações computacionais, Sforça et al. (2004) analisaram as distâncias das ligações dos hidrogênios que definem a conformação em hélice- α na região do C-terminal. A presença do C-terminal amidado acabava estabilizando essa região devido a ligação de hidrogênio entre resíduos Ile¹¹ e Leu¹⁴-NH₂, enquanto que no peptídeo com o C-terminal ácido não existe a possibilidade de formação da ligação de hidrogênio entre a amida do C-terminal e a carbonila da Ile¹⁰, provocando uma desestabilização na região C-terminal. Porém, tal desestabilização não produz um desenovelamento da hélice naquela região. Em vez disso, ele fornece ao peptídeo a liberdade de adotar novos graus de conformação, que gera perturbações que dificulta a sua capacidade de interagir eficazmente com a superfície da membrana, o que reforça uma esperada redução das atividades biológicas do peptídeo.

5.3.2 Modelagem Molecular por homologia

As modelagens moleculares por homologia dos peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) foram realizadas através do programa MODELLER (SALI; BLUNDELL, 1993).

Como o peptídeo Protonectarina-MP apresentou 57,1% de identidade e 78,6% de similaridade com o peptídeo Mastoparano-X (MP-X), a estrutura tridimensional resolvida por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do MP-X foi utilizada como modelo inicial (template) para a geração dos modelos, e as suas coordenadas atômicas (código de acesso no PDB: 2CZP) (TODOKORO et al., 2006) foram obtidas com o acesso na página do Banco de Dados de Proteínas (PDB) na Internet (<http://www.rcsb.org/pdb>).

Para a validação dos modelos gerados foi utilizado o programa Procheck (LASKOWSKI et al., 1993), com o modelo final sendo escolhido conforme a qualidade estereoquímica observada no Diagrama de Ramachandran e nos valores do G-factor.

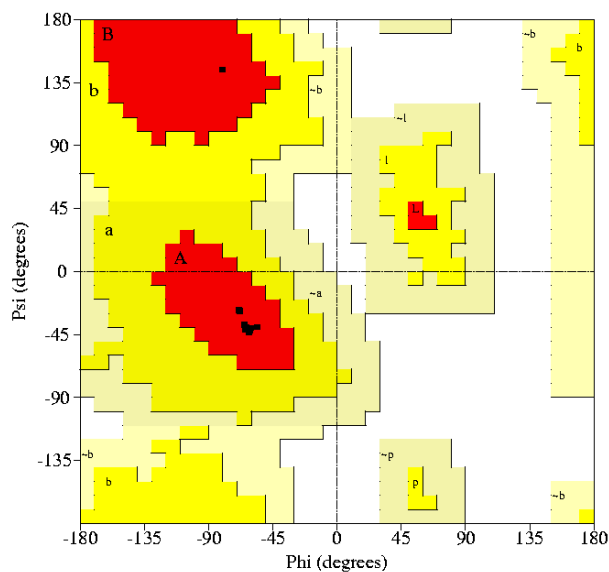


Figura 13: Diagrama de Ramachandran gerado pelo Procheck para o modelo para o peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂).

A análise do diagrama de Ramachandran para os modelos do Protonectarina-MP (-NH₂) (figura 13) e do Protonectarina-MP (-OH) (figura 14) indica que 100% dos resíduos estão localizados nas regiões mais favoráveis (tabela 4), com 11 resíduos localizados na região de hélice- α de mão direita e um resíduo localizado na região de folha- β . Como o template usado apresentava elevada porção em hélice- α , isso pode ter facilitado a formação de hélice em ambos os modelos. Os resíduos aminoterminal e carboxiterminal não são considerados, porque podem se localizar em qualquer região do diagrama.

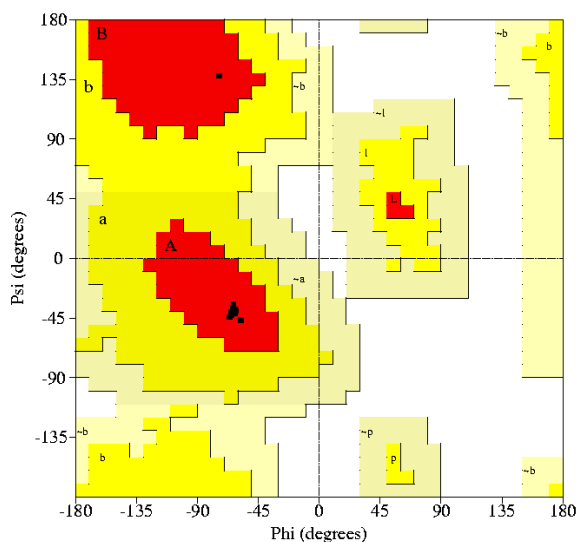


Figura 14: Diagrama de Ramachandran gerado pelo Procheck para o modelo do Protonectarina-MP (-OH).

O G-factor mostra o desvio de uma dada propriedade estereoquímica (ângulo de torção e geometria covalente). Quando aplicado a um dado resíduo, um valor baixo de G-factor indica que a propriedade correspondente apresenta uma baixa probabilidade de conformação. Por exemplo, resíduos localizados em regiões desfavoráveis do diagrama de Ramachandran apresentaram baixo (ou muito negativo) valor de G-factor. Então, se uma proteína ou peptídeo tiver muitos resíduos com G-factor baixo sugere algo errado com a sua geometria avaliada. O ideal é o G-factor estar acima de -0.5 e os valores entre -0.5 e -1.0 devem ser investigados. Como mostra a Tabela 4, a média dos valores de G-factor obtidos foi de 0.26 para o modelo do Protonectarina-MP(-NH₂) e de 0.37 para o Protonectarina-MP(-OH), apresentando uma boa qualidade estereoquímica.

Tabela 4 Análise da qualidade estereoquímica para os modelos do Protonectarina-MP (-NH₂) e do Protonectarina-MP (-OH).

Peptídeo	Região do Diagrama de Ramachandran				G-Factor		
	Mais Favorável (%)	Adicionalmente permitida (%)	Favoravelmente permitida (%)	Não permitida (%)	Ângulo de Torção	Geometria covalente	Média Total
Protonectarina-MP(-NH ₂)	100	0	0	0	0.52	- 0.09	0.26
Protonectarina-MP(-OH)	100	0	0	0	0.62	0.01	0.37

Através dos dados obtidos pela análise do Procheck (diagrama de Ramachandran e G-factor) pode-se inferir que ambos os modelos são possíveis estereoquimicamente. Após a validação dos modelos, as imagens dos modelos validados foram geradas pelo programa MolMol (KORADI et al., 1996) e VMD 1.8.6 (HUMPHREY et al., 1996).

Como mostra a figura 15, ambos os peptídeos apresentam uma estrutura secundária muito semelhante, obviamente por apresentarem a mesma seqüência de aminoácidos, e ter sido utilizado o mesmo template para a modelagem molecular de ambos. O peptídeo Protonectarina-MP (-OH) apresenta-se estruturado em hélice- α do resíduo Trp³ ao Val¹³, o que forma uma hélice- α um pouco mais extensa se comparado a estrutura secundária do Protonectarina-MP (-NH₂), que apresenta do resíduo Trp³ ao Lys¹² em hélice- α , com o resíduo Val¹³ em coil.

Além disso, notam-se sutis diferenças nos arranjos das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, como nos resíduos de lisina e aspartato. Por exemplo, o resíduo de Lys⁴ apresenta sua cadeia lateral em direção ao Asn² no peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂), enquanto no Protonectarina-MP(-OH), a cadeia lateral está na direção oposta, voltado para o resíduo Asp⁸. Assim, no peptídeo Protonectarina-MP(-OH), provavelmente a carga positiva

do resíduo Lys⁴ interage com a carga negativa do resíduo Asp⁸, porém, não ocorre o mesmo no peptídeo amidado pois a cadeia lateral do resíduo negativa Asp⁸ está em direção a cadeia lateral da Lys¹¹.

O peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) apresentou 21 ligações de hidrogênio e o seu análogo com C-terminal ácido apresentou 19 ligações, sendo interessante notar que duas ligações a mais que o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) apresenta estão localizadas na região C-terminal, com uma das ligações sendo com o resíduo Lys¹¹ e a outra com o resíduo Lys¹². Isso pode ser responsável pela maior estabilidade e estruturação do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) em relação ao seu análogo. Sforça et al. (2004) mostrou que a presença do C-terminal amidado acabava estabilizando essa região devido a ligação de hidrogênio entre resíduos Ile¹¹ e Leu¹⁴-NH₂. Porém, assim como o observado nos modelos, ausência da ligação do hidrogênio não provoca o desenovelamento da hélice naquela região, no entanto, pode conferir liberdade para o peptídeo adotar novos graus de conformação, sendo o suficiente para alterar sua atividade biológica.

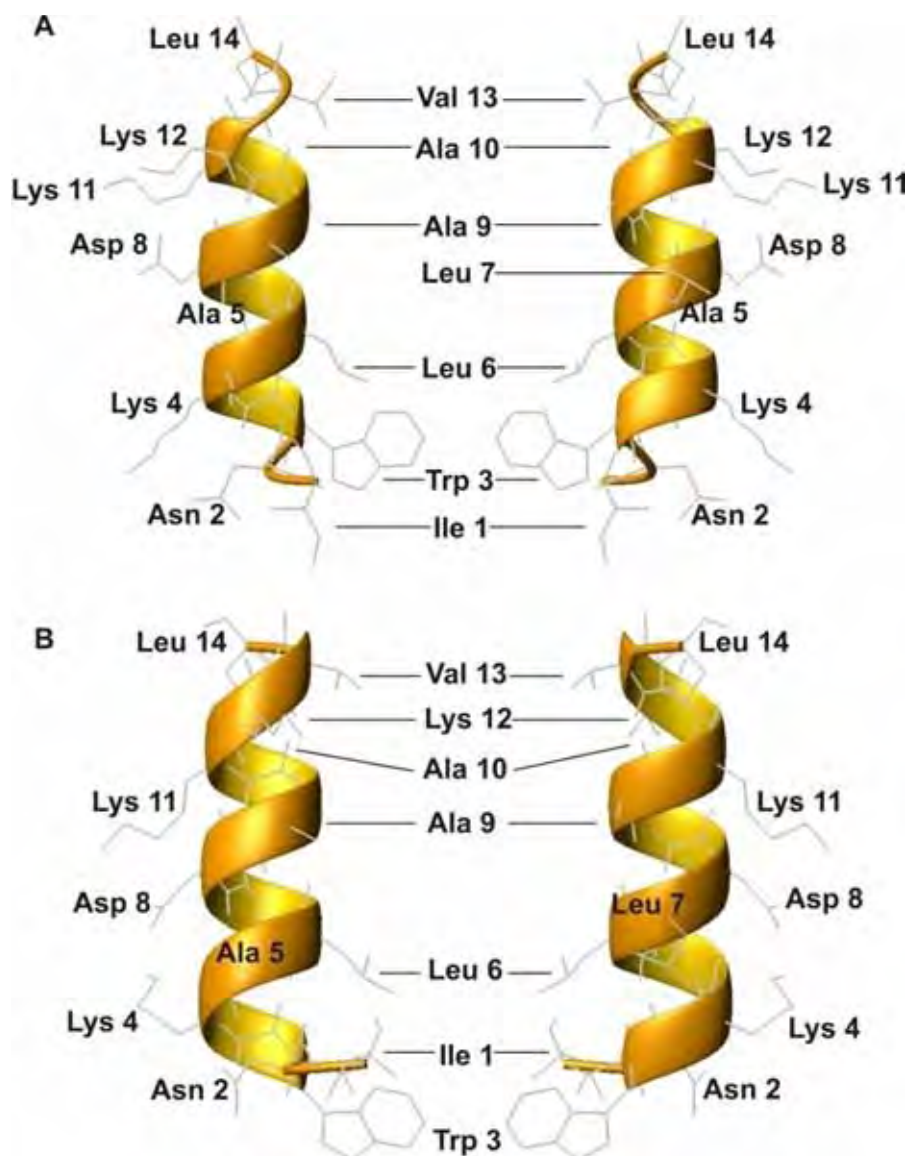


Figura 15: Imagens geradas pelo programa MolMol da conformação estrutural em ribbon do peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂) (A) e do peptídeo Protonectarina-MP(-OH) (B).

A figura 16 mostra a mesma estrutura em representação da densidade superficial de cargas. Os resíduos hidrofóbicos estão em branco, os hidrofílicos estão coloridos em verde, os de carga positiva em azul e os de carga negativa em vermelho. Observa-se que nos dois peptídeos os resíduos hidrofóbicos estão voltados em uma face oposta aos resíduos hidrofílicos, formando uma hélice- α anfipática. Essa estrutura é conhecida por promover a interação de peptídeos com membrana e já foi descrito e diversos peptídeos, como por exemplo, a Melitina.

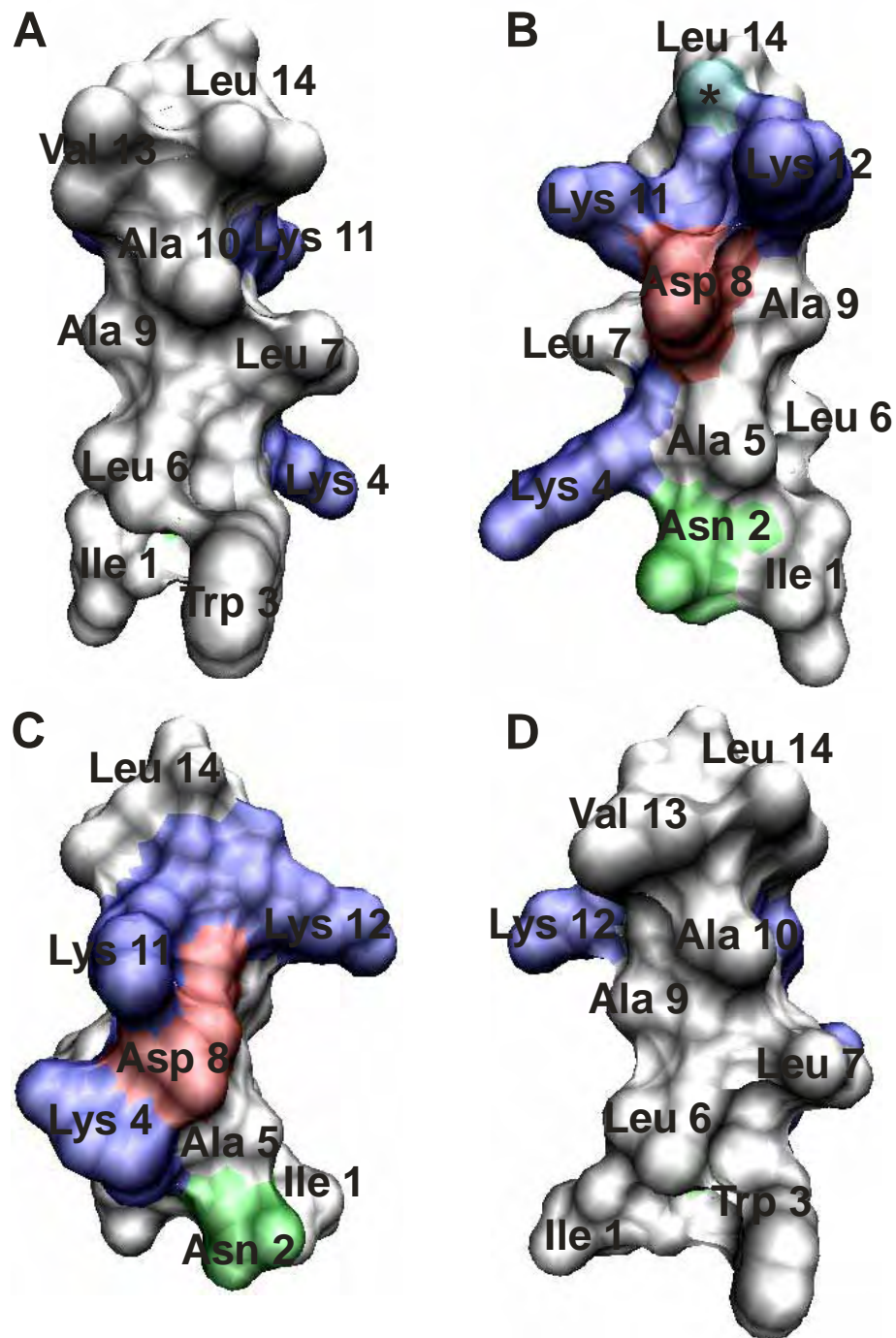


Figura 16: Imagens geradas pelo programa VMD 1.8.6 da superfície do peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂) (A e B) e do peptídeo Protonectarina-MP(-OH) (C e D). Os resíduos negativos estão em vermelho, os positivos estão em azul, os polares em verde, os apolares em branco. Em azul claro (*) encontra-se a região amidada do C-terminal do peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂) (B).

Apesar das sutis diferenças, ambos os modelos são muito parecidos, devido ao fato de que os modelos gerados foram construídos de um mesmo template, já que não existe nenhum template de peptídeo mastoparano resolvido sem a presença do C-terminal amidado depositado nos bancos de dados que pudesse ser usado para a modelagem do peptídeo

Protonectarina-MP (-OH). Além disso, a porcentagem de estruturação em hélice- α dos modelos foi muito maior do que o observado nos experimentos de dicroísmo circular. Isso provavelmente ocorreu porque o modelo usado como template, o peptídeo MP-X, teve sua estrutura resolvida em um solvente de membrana DPPC:DPPG (4:1) que induzia a sua estruturação em hélice- α .

Portanto, para uma maior compreensão dos modelos gerados seria interessante a realização de uma simulação por dinâmica molecular em meio aquoso e em TFE, pois assim seria possível verificar o comportamento dos peptídeos nesses diferentes meios e verificar se ocorreria uma perda ou não da estrutura em hélice ao longo do tempo e se essa perda seria igual para os dois peptídeos. Estas modelagens servem para visualizar melhor a característica de apresentar estrutura secundária em hélice- α destes peptídeos. Os valores experimentalmente obtidos por análises de CD mostram porcentagens de hélice- α muito menores que os modelos mostrados acima (Figura 15), uma vez que os mesmos estão sujeitos a inúmeras situações de interações como o meio, difíceis de simular. De qualquer maneira, é muito interessante observar os modelos representados na forma de superfícies (densidade superficial de cargas), onde se verifica claramente a grande concentração de resíduos de cadeias laterais ionizáveis (positivos e negativos) e também daqueles de natureza polar, numa única face da molécula de ambos os peptídeos, enquanto que na outra face predomina resíduos de cadeias laterais de natureza hidrofóbica. Isto corrobora a característica anfipática destes peptídeos.

5.3.3 Troca Isotópica Hidrogênio/Deutério

Com a finalidade de se ter modelos mais realísticos sobre a estrutura secundária destes peptídeos, quando de sua interação com diferentes tipos de membranas, principalmente de forma dinâmica, em função do tempo, estudou-se o posicionamento dos peptídeos em interação com sistemas membrano-miméticos, utilizando-se do monitoramento da troca isotópica H/D dos hidrogênios amida das ligações peptídicas, com o uso de espectrometria de massas ESI-MS.

Análises das trocas hidrogênio/deutério (H/D), entre o hidrogênio amida de cada ligação peptídica e o deutério adicionado ao meio na forma de D₂O, têm sido utilizadas como fontes de informações sobre a dinâmica conformacional de muitas moléculas. Demmers e colaboradores (2000) descreveram um método de estudo para a determinação do

posicionamento de peptídeos que interagem com membranas lipídicas, atravessando-as de lado a lado, através da combinação de reação de deuteração e análise por espectrometria de massas, em sistemas de protelipossomos. Neste método foram utilizados peptídeos com a conformação em hélice- α e lipossomos artificiais, onde foram determinadas as taxas de deuteração parcial, apresentadas pelas moléculas de peptídeos associados à membranas artificiais. Essa técnica também foi utilizada por De Souza e Palma (2008) para a investigação posicionamento de peptídeos mastoparanos em complexos de proteolipossomos.

Neste sentido, os ensaios de troca H/D foram baseados na metodologia descrita por De Souza e Palma (2008), na qual é possível detectar o posicionamento preciso de peptídeos inseridos em membranas sintéticas de fosfolipídios, através da troca isotópica H/D, monitorada por Espectrometria de Massas; o protocolo experimental foi adaptado para se ensaiar o efeito do tempo de incubação, na interação dos peptídeos com as membranas das vesículas.

Os ensaios com os peptídeos foram realizados em presença de vesículas de diferentes composições, na ausência e presença de óxido de deutério (D_2O), em diferentes tempos de incubação. Os peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) foram incubados na concentração de $1,5 \times 10^{-4}$ M em meio de suspensão de lipossomos (3mM de fosfolipídios). Esta concentração de peptídeo foi escolhida porque é o menor valor analiticamente confiável (testado experimentalmente) dentro de uma faixa de concentrações fisiológicas, para se obter espectros MS/MS confiáveis, com o uso do espectrômetro de massas Micromass, mod. QUATRO II, triplo quadrupolo.

As análises foram realizadas em meio de vesículas de fosfatidilcolina (PC), de fosfatidilcolina/colesterol (PC/Chol, 80/20) (mimetizando a membrana zwitteriônica de células de mamíferos), fosfatidilcolina/cardiolipina (PC/CL; 90/10), de fosfatidilcolina/fosfatidilglicerol (PC/PG, 70/30) (mimetizando membranas aniônicas de células bacterianas). A proporção de fosfolipídios carregados negativamente foi escolhida conforme a abundância encontrada desses lipídios nas membranas bacterianas (YEAMAN; YOUNT, 2003). Como a cardiolipina é encontrada nas membranas celulares em uma proporção menor que o fosfatidilglicerol, optou-se por preparar lipossomos aniônicos em proporções diferentes de fosfolipídios negativos.

Primeiramente, padronizou-se a concentração de óxido de deutério necessária para que ocorresse somente a deuteração dos hidrogênios amida, localizados nas ligações peptídicas, que em contato com o solvente deuterado, trocam rapidamente o hidrogênio pelo deutério, porém destrocam muito mais lentamente que os hidrogênios localizados nas cadeias

laterais e nos terminais-N e -C (amida e carboxila) (De SOUZA; PALMA, 2008). Assim, foi obtido um aumento de 13 u.m.a. na massa de ambos os peptídeos em suas formas solúveis, após a interrupção das trocas H/D por acidificação a pH 2,5 e reversão das trocas das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos do peptídeo (dados não mostrados).

Soluções de ambos os peptídeos, na forma solúvel e na forma de suspensões de proteolipossomos, foram incubadas nos tempos de 1, 3, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, a 25°C, pH 7,0, sendo então acrescentado D₂O 40% (v/v); a solução de peptídeo solúvel ou a suspensão de proteolipossomos foram analisadas por espectrometria de massas ESI-MS e MS/MS, pela rápida infusão destes meios, diretamente no sistema de injeção de amostras do espectrômetro de massas.

5.3.3.1 Troca H/D em vesículas zwitteriônica

5.3.3.1.1 Troca H/D em complexos proteolipossomos de fosfatidilcolina

Foi obtido o espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) na forma de complexo proteolipossomo com vesículas de PC na ausência de D₂O (Figuras 17 e 18). No espectro do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) foi observado a presença do monômero e do dímero de PC (m/z 760.7 [M+H]⁺ e m/z 1520.3 [2M+H]⁺, respectivamente) e o íon molecular do peptídeo de m/z 1581.9 [M+H]⁺ (Figura 17), enquanto que no espectro de massas MS/MS foi detectada uma série de picos correspondentes a íons-fragmento do tipo “-b” de m/z : 227.4 (b₂), 413.5 (b₃), 541.8 (b₄), 612.8 (b₅), 725.8 (b₆), 839.2 (b₇), 954.1 (b₈), 1025.4 (b₉), 1096.9 (b₁₀), 1225.1 (b₁₁), 1352.8 (b₁₂) e 1451.7 (b₁₃) (Figura 19-A). Estes íons são característicos da fragmentação do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂).

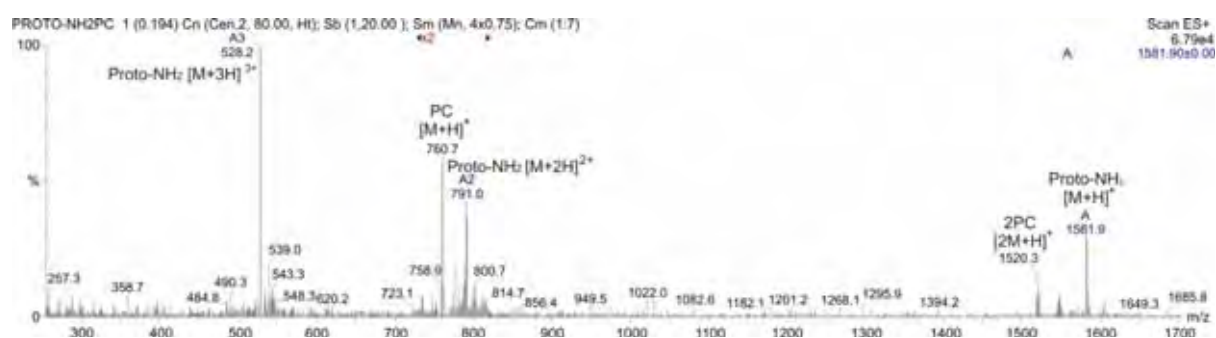


Figura 17: Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) em presença de vesícula de PC.

No espectro do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) na ausência de deutério foi observado a presença do monômero e do dímero de PC (m/z 760.8 $[M+H]^+$ e m/z 1520.8 $[2M+H]^+$, respectivamente) e o íon molecular do peptídeo de m/z 1583.4 $[M+H]^+$ (Figura 18), enquanto que no espectro de massas MS/MS foi detectada uma série de picos correspondentes a íons-fragmento do tipo “-b” de m/z : 228.0 (b_2), 413.9 (b_3), 541.8 (b_4), 612.9 (b_5), 726.0 (b_6), 838.9 (b_7), 954.0 (b_8), 1025.1 (b_9), 1096.0 (b_{10}), 1224.3 (b_{11}), 1352.3 (b_{12}) e 1451.3 (b_{13}) (Figura 20-A).

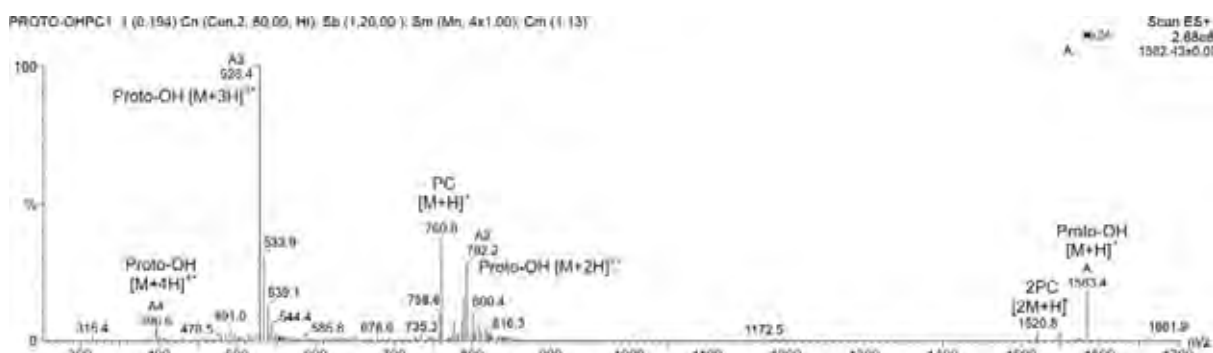
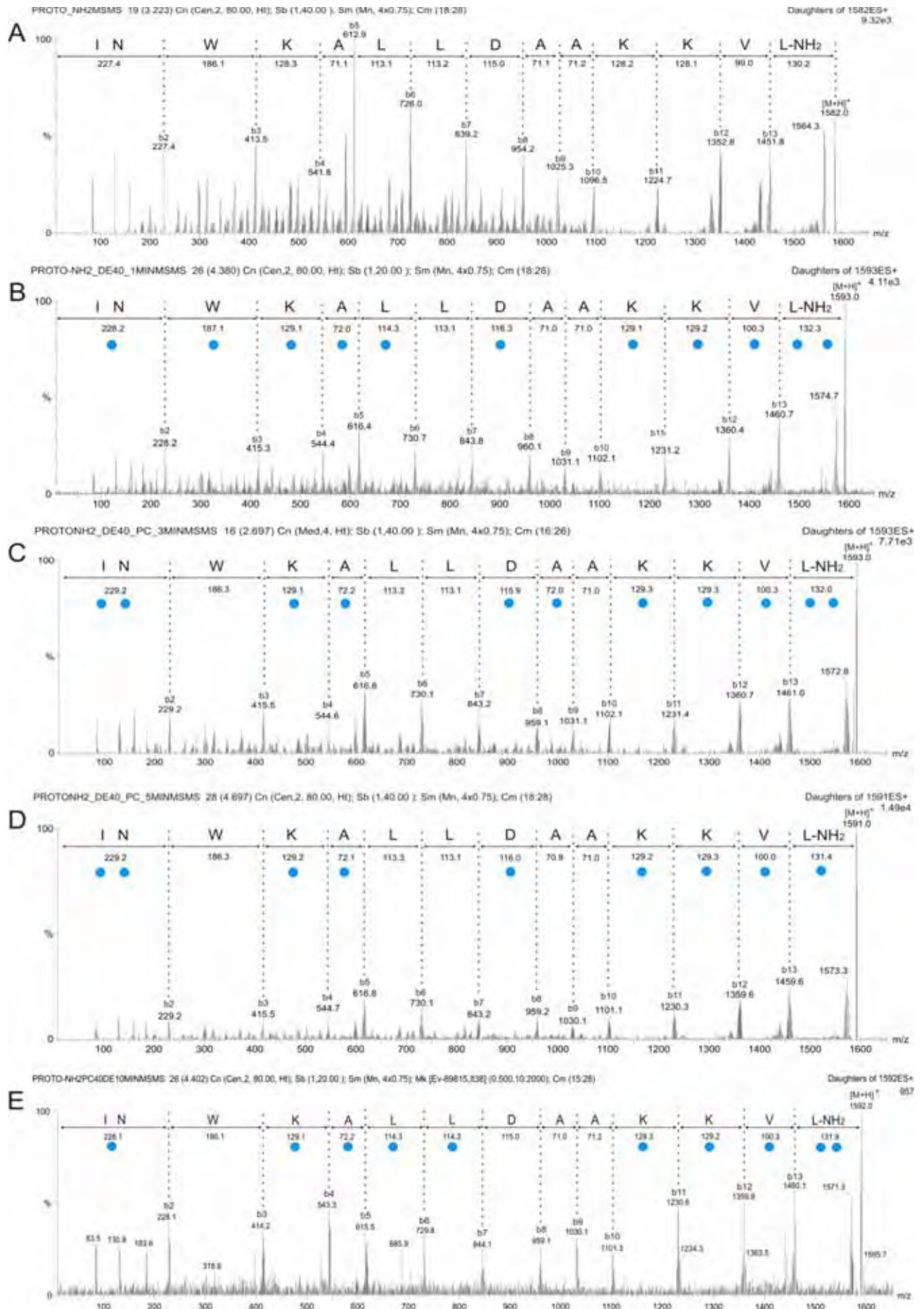


Figura 18: Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC.

Comparando-se os valores de m/z dos mesmos íons-fragmentos obtidos em ausência e em presença de deutério (a cada tempo de incubação), pode-se identificar as posições em que ocorreram a incorporação de deutério, devido ao aumento de 1 u.m.a nestas posições (Figura 19 e 20); os hidrogênios amida localizados no interior da vesícula não sofrem a troca H/D. Comparando-se os valores de m/z dos íons moleculares nas formas não deuterada (Figura 19A) e deuterada (Figura 19B a 19H) observados nos espectros ESI-MS/MS obtidos em cada diferente tempo de incubação, verifica-se que o nível de incorporação de deutério no peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) variou um pouco ao longo do tempo, com a incorporação de 11 deutérios nos tempos de 1, 3 e 60 minutos, 10 deutérios no tempo de 10 minutos, 12 deutérios no tempo de 15 minutos e 13 deutérios no tempo de 30 minutos. Estes resultados também podem ser observados nos espectros ESI-MS, adquiridos antes de cada análise de ESI-MS/MS; entretanto, por razões de simplificar a apresentação dos dados, tais espectros não foram mostrados isoladamente.

Uma análise geral de todos os espectros MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) na forma de proteolipossomo com vesículas de PC (Figura 19) revelou que a localização das trocas isotópicas ao longo da seqüência do peptídeo varia conforme o tempo. Assim, os resíduos Trp³, Leu⁶, Leu⁷, Asp⁸, Ala⁹ e Ala¹⁰ em alguns tempos estão deuterados, e em outros tempos não. Desta maneira, em alguns momentos durante o período de incubação,

alguns destes resíduos estão interagindo com uma região mais interna da membrana, e em outros momentos, estes mesmo resíduos estão expostos para fora da membrana, realizando então a troca H/D. No entanto, também foi observado que os resíduos Ile¹, Asn², Lys⁴, Ala⁵, Lys¹¹, Lys¹², Val¹³ e Leu-NH₂ permanecem deuterados durante todo o experimento, indicando que tais resíduos se posicionam para fora da membrana, em contato com o meio deuterado durante os 60 minutos de incubação.



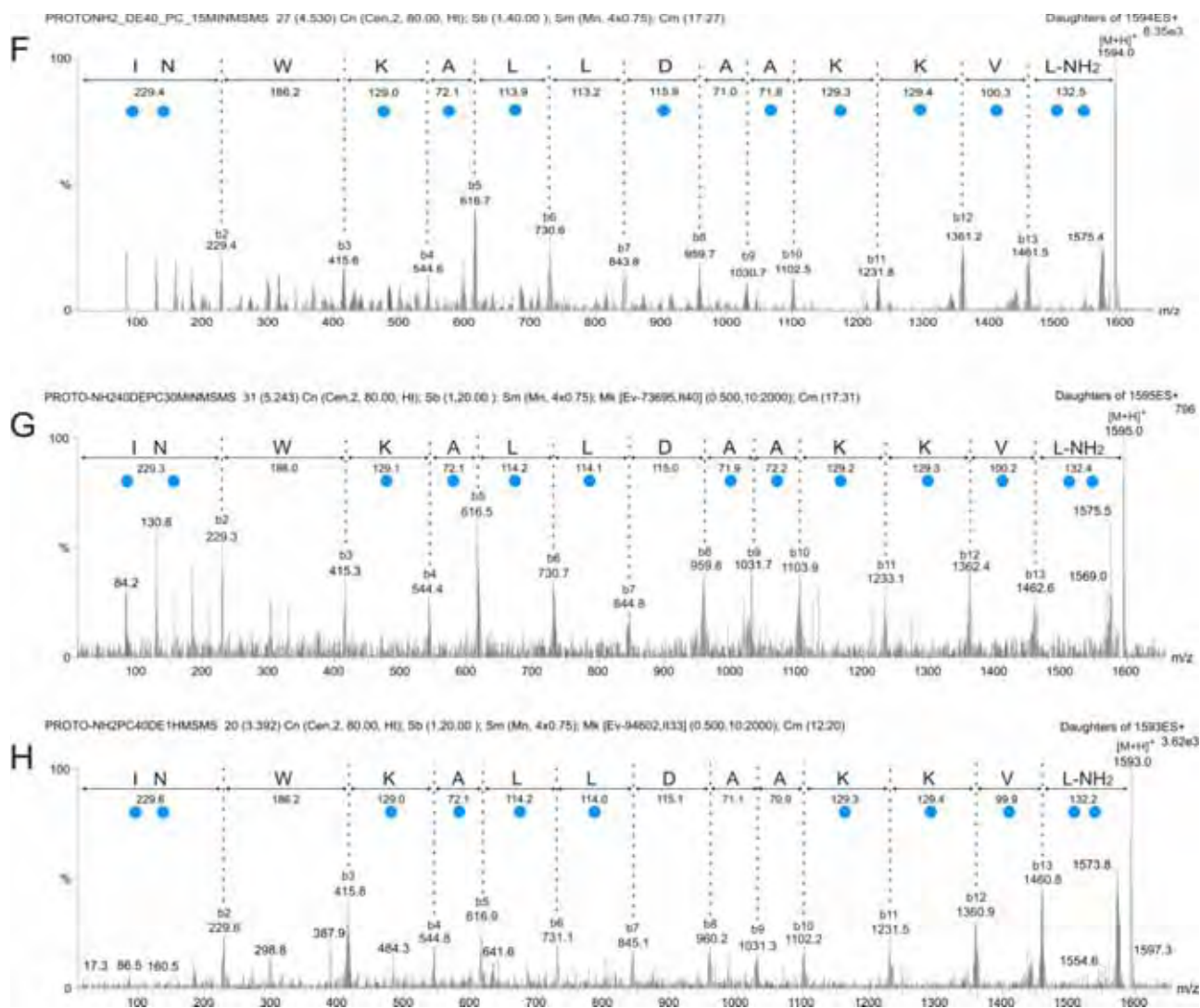
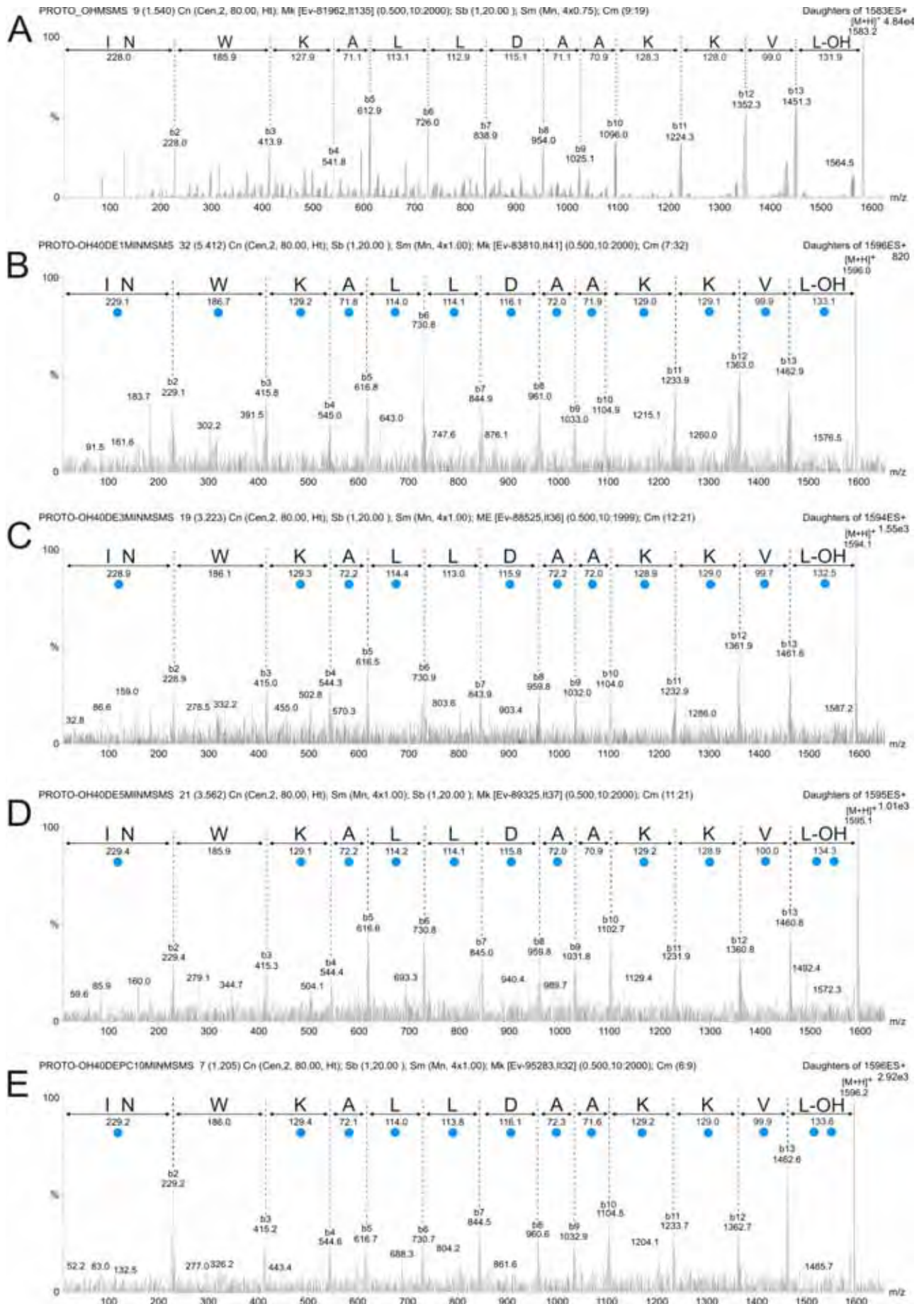


Figura 19: Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂) em presença de vesícula de PC na ausência de D₂O (A), e na presença de D₂O 40% (v/v), nos tempos de incubação de 1 minuto (B), de 3 minutos (C), de 5 minutos (D), de 10 minutos (E) de 15 minutos (F), de 30 minutos (G) e de 60 minutos (H). O círculo em azul representa incorporação de um deutério.

Comparando-se os valores de m/z dos íons moleculares nas formas não deuterada (Figura 20A) e deuterada (Figura 20B a 20H) observados nos espectros ESI-MS/MS obtidos em cada diferente tempo de incubação, verifica-se que o nível de incorporação de deutério no peptídeo Protonectarina-MP (-OH) também sofreu variações numéricas reduzidas ao longo do tempo, com a incorporação de 13 deutérios nos tempos de 1, 10 e 15 minutos, 11 deutérios nos tempos de 3 e 30 minutos e 12 deutérios nos tempos de 5 e 60 minutos.

A figura 20 mostra os espectros MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH). As trocas isotópicas ao longo da seqüência do peptídeo Protonectarina-MP (-OH), variaram menos ao longo do tempo se comparadas ao seu análogo Protonectarina-MP (-NH₂). Assim, os resíduos Trp³, Leu⁶, Leu⁷, Asp⁸ e Ala¹⁰ em alguns tempos estão deuterados, e em outros

tempos não, ou seja, ora interagem com a membrana e ora não. Os demais resíduos de aminoácidos permaneceram deuterados durante todos os tempos analisados, indicando que tais resíduos permanecem posicionados para fora da membrana, na presença de meio deuterado, durante os 60 minutos de incubação.



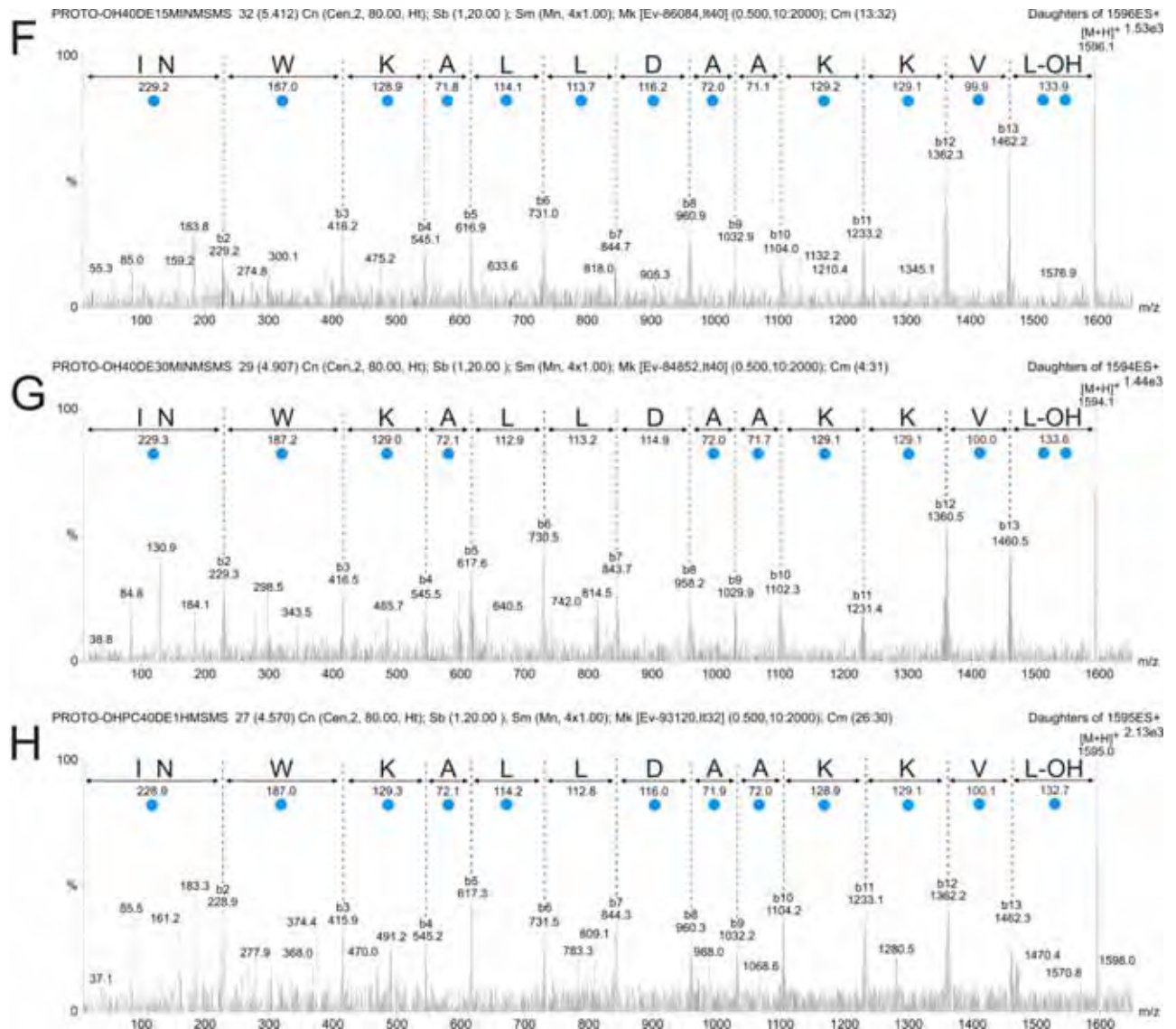


Figura 20: Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP(-OH) em presença de vesícula de PC na ausência de D₂O (A), e na presença de D₂O 40% (v/v), nos tempos de incubação de 1 minuto (B), de 3 minutos (C), de 5 minutos (D), de 10 minutos (E) de 15 minutos (F), de 30 minutos (G) e de 60 minutos (H). O círculo em azul representa incorporação de um deutério.

Para facilitar a visualização dos resultados obtidos, foi montado um esquema ilustrativo (Figura 21), mostrando a dinâmica de movimentação dos resíduos de aminoácidos do Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) interagindo com o lipossomo de PC. Os resíduos localizados acima da região amarela representam os resíduos de aminoácido que sofreram incorporação de deutério, estando localizados na face externa da vesícula. Já os resíduos localizados na região amarela, estão interagindo com a face hidrofóbica da vesícula e, portanto, não sofreram deuteração.

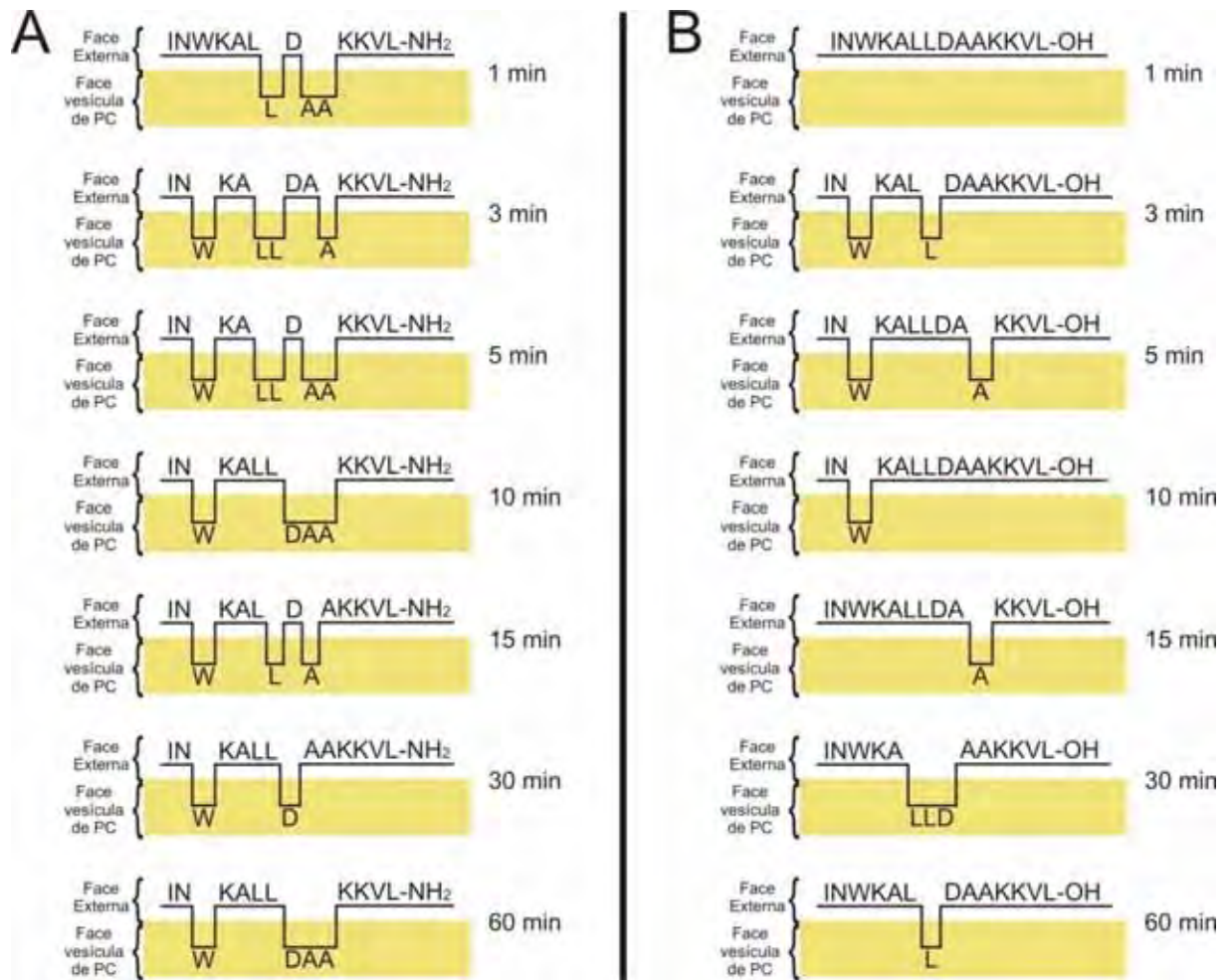


Figura 21: Esquema da interação do peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂) (A) e Protonectarina-MP (-OH) (B) com a membrana de PC ao longo do tempo, construídos através dos dados da troca isotópica H/D e espectrometria de massas seqüenciais.

Assim, analisando-se a figura 21 parece que os peptídeos interagem com a membrana de PC, posicionando-se paralelamente à superfície da mesma, mantendo sempre as regiões N- e C-terminais orientadas para fora da membrana, enquanto os resíduos mais internos à seqüência tendem a se movimentar, ora para fora, ora para o interior da membrana. Ao comparar o esquema de interação do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) (Fig. 21-A) com o Protonectarina-MP (-OH) (Fig. 21-B) observa-se que o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) apresenta uma maior interação com vesícula, tendo um maior número de resíduos de aminoácido interagindo de maneira dinâmica com a região hidrofóbica da vesícula. Já o peptídeo Protonectarina-MP (-OH) interage muito pouco, com uma menor movimentação de seus resíduos de aminoácidos.

Considerando-se a semelhança, ainda que grosseiramente aproximada, entre a natureza da membrana de PC e das membranas de células animais testados (mastócitos e

eritrócitos de ratos), e que não se observou agregação de peptídeos na superfície da vesícula de PC, formando poros, pode-se especular que provavelmente a movimentação do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) na superfície das membranas deve gerar uma perturbação estrutural suficientemente forte para desestabilizar e despermeabilizar parcialmente a membrana plasmática de mastócitos e eritrócitos. Isto poderia explicar que na concentração ensaiada do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) (1,5 x 10⁻⁴ M), obteve-se experimentalmente ~50% de hemólise, ~70% de desgranulação de mastócitos e liberação de ~90% do conteúdo de LDH do citoplasma dos mastócitos de ratos. Na mesma concentração não se observou qualquer atividade para o peptídeo Protonectarina-MP (-OH), que mostrou interagir pouco a membrana neutra de vesículas de PC.

5.3.3.1.2 Troca H/D em complexos proteolipossomos de fosfatidilcolina/colesterol

O espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) na forma de complexo proteolipossomo com PC/Chol foram obtidos na ausência de deutério. A figura 22 mostra o espectro obtido para o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂), no qual se observa o íon molecular do PC de m/z 760.6 [M+H]⁺, do dímero de PC com m/z 1520,3 [2M + H]⁺, do Colesterol de m/z 387.5 [M+H]⁺ e o íon molecular do peptídeo correspondente ao íon de m/z 1582.3 na forma [M+H]⁺; foram ainda observados os íons de m/z 791,7, 528,2 e 396,4, correspondentes aos íons moleculares do peptídeo com cargas +2, +3 +4, respectivamente. No espectro de massas MS/MS deste peptídeo foi detectado uma série de picos característicos da fragmentação do peptídeo correspondentes a íons-fragmento do tipo “-b” de m/z: 227.8 (b₂), 413.7 (b₃), 541.6 (b₄), 612.7 (b₅), 725.8 (b₆), 838.9 (b₇), 953.8 (b₈), 1024.7 (b₉), 1095.5 (b₁₀), 1223.6(b₁₁), 1351.8(b₁₂) e 1450.7 (b₁₃) (Figura 24A).

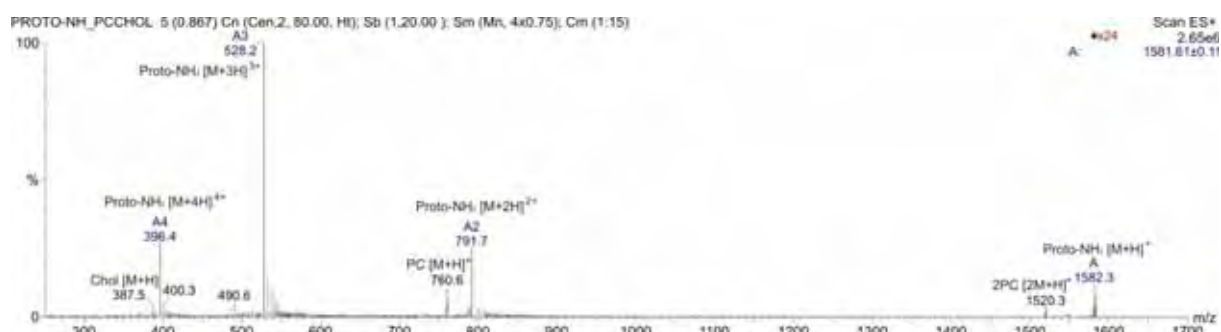


Figura 22: Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) em presença de vesícula de PC/Chol (80:20).

Para o peptídeo Protonectarina-MP (-OH) na ausência de deutério, além do íon molecular de PC e Colesterol, foi encontrado o íon molecular do peptídeo de m/z 1583.3 $[M+H]^+$ (Figura 23). No espectro de massas MS/MS foi detectada uma série de picos característicos da fragmentação do peptídeo, correspondentes a íons-fragmento do tipo “-b” de m/z : 227.7 (b_2), 413.6 (b_3), 541.5 (b_4), 612.6 (b_5), 725.7 (b_6), 838.8 (b_7), 953.7 (b_8), 1024.6 (b_9), 1096.1 (b_{10}), 1223.8 (b_{11}), 1352.0 (b_{12}) e 1451.0 (b_{13}) (Figura 25A).

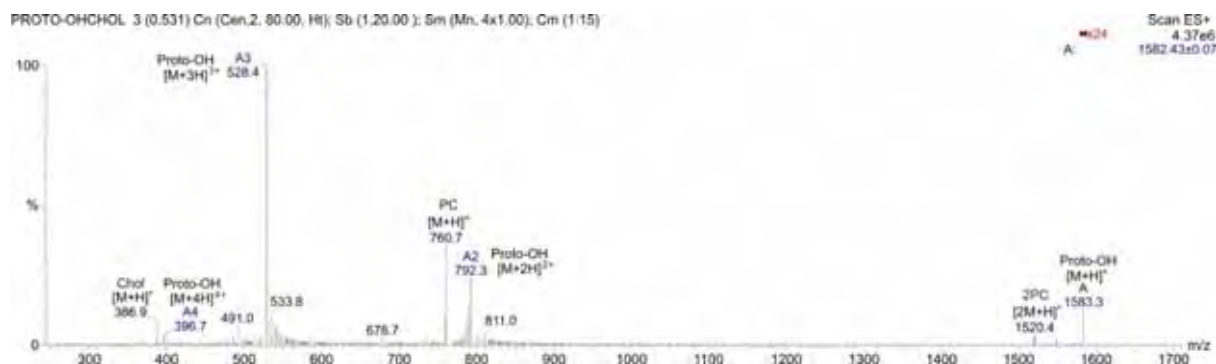
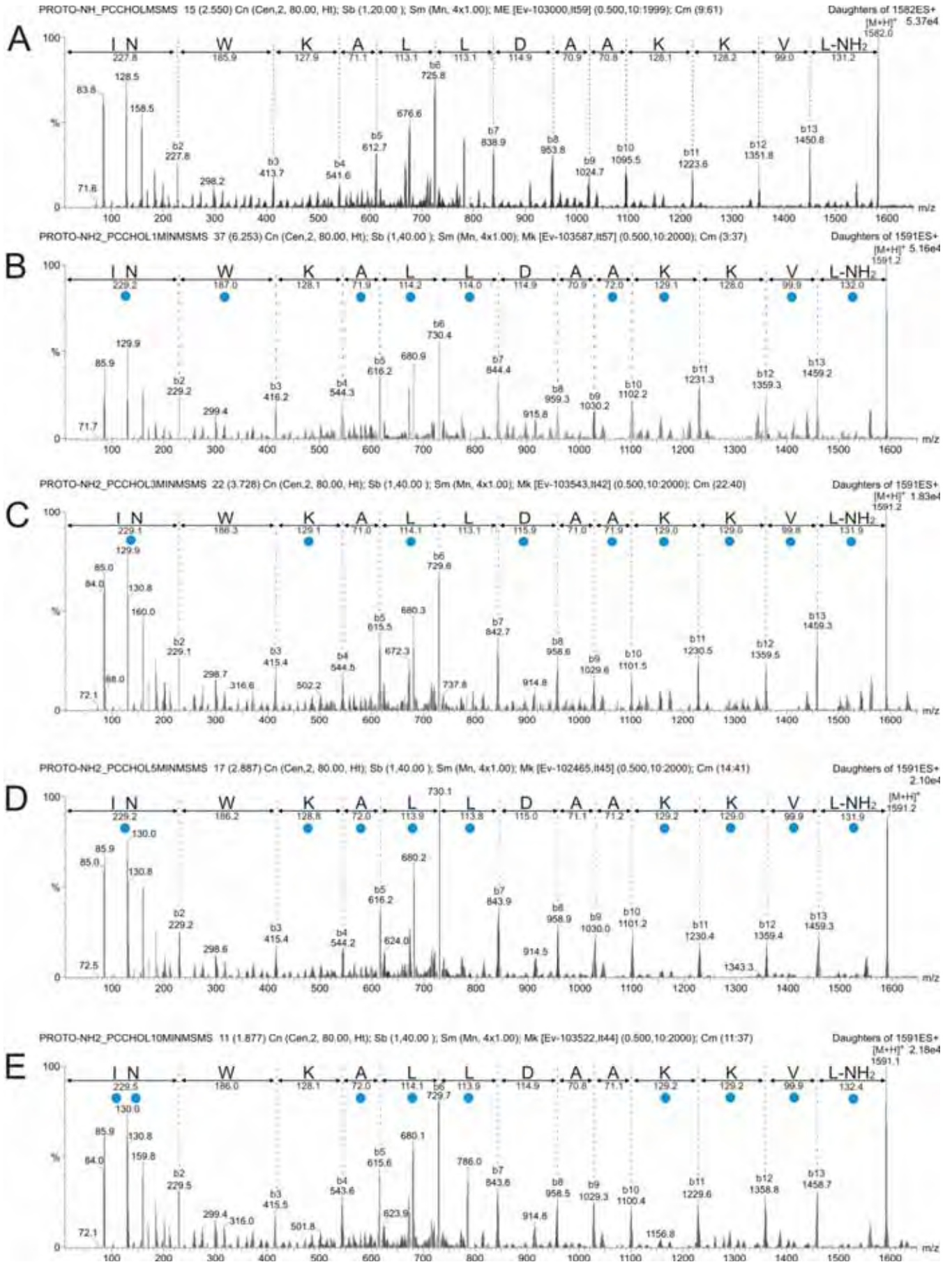


Figura 23: Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC/Chol (80:20).

Comparando-se os valores de m/z dos íons moleculares nas formas não deuterada (Figura 24A) e deuterada (Figura 24B a 24H) observados nos espectros ESI-MS/MS obtidos em cada diferente tempo de incubação, verifica-se que o nível de incorporação de deutério no peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) diminuiu ligeiramente ao longo do tempo, com a incorporação de 9 deutérios nos tempos de 1, 3, 5 e 10 minutos e 8 deutérios nos tempos de 15, 30 e 60 minutos (Figuras 24). A análise dos espectros MS/MS (Figura 24) revelou que a localização das trocas isotópicas varia ao longo do tempo nos resíduos Trp³, Lys⁴, Ala⁵, Leu⁷, Asp⁸, Ala⁹, Ala¹⁰ e Lys¹²; sendo que em alguns tempos estes resíduos de aminoácidos estão deuterados, e em outros tempos não. Assim, em determinados momentos alguns destes resíduos estão interagindo com a região mais interna da vesícula, e em outros momentos estes mesmos resíduos estão expostos para fora da vesícula. No entanto, também foi observado que os resíduos Ile¹, Asn², Leu⁶, Lys¹¹, Val¹³ e Leu¹⁴-NH₂ permanecem deuterados durante todo o experimento, indicando que tais resíduos permanecem posicionados para fora da membrana durante os 60 minutos de incubação.



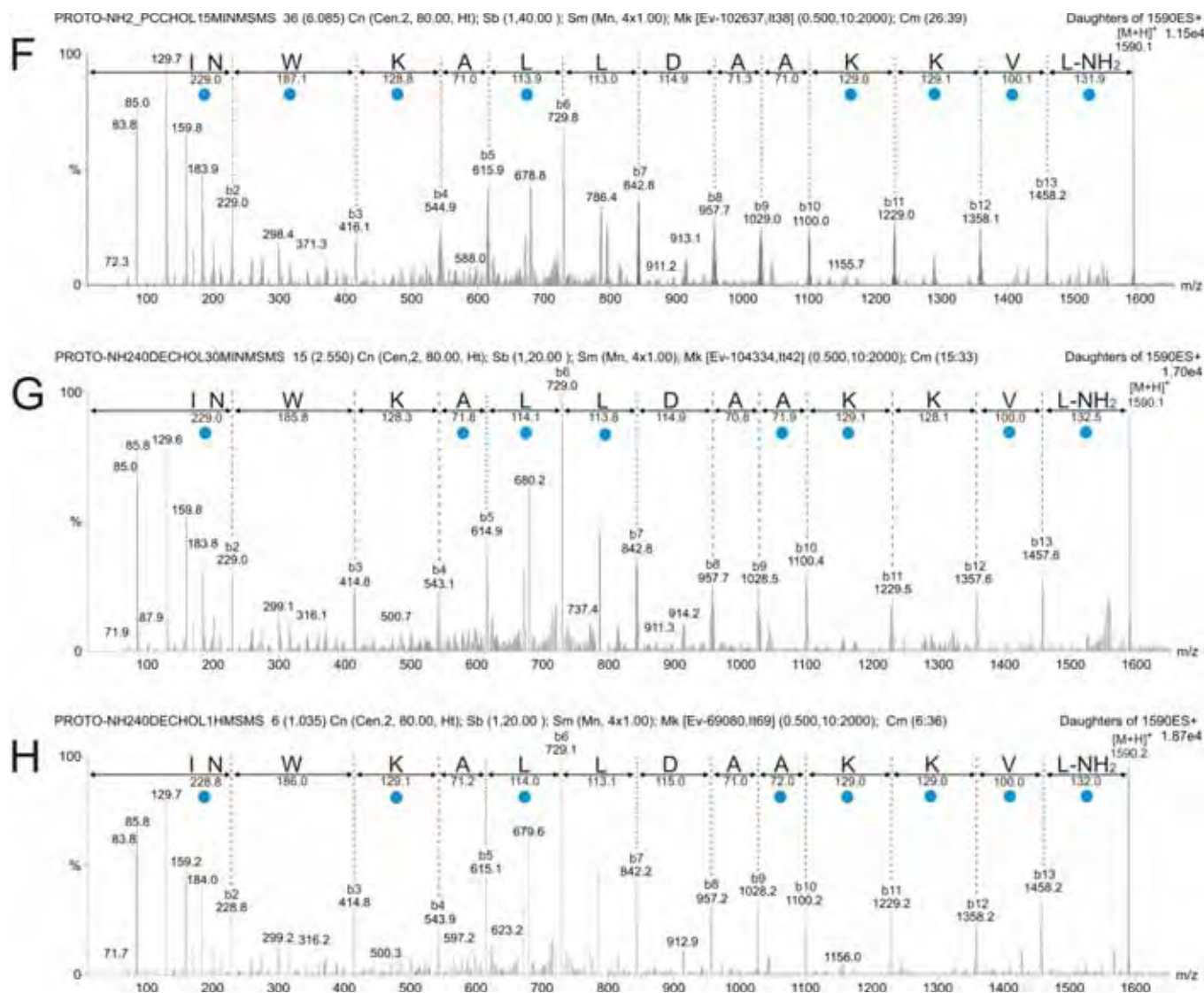
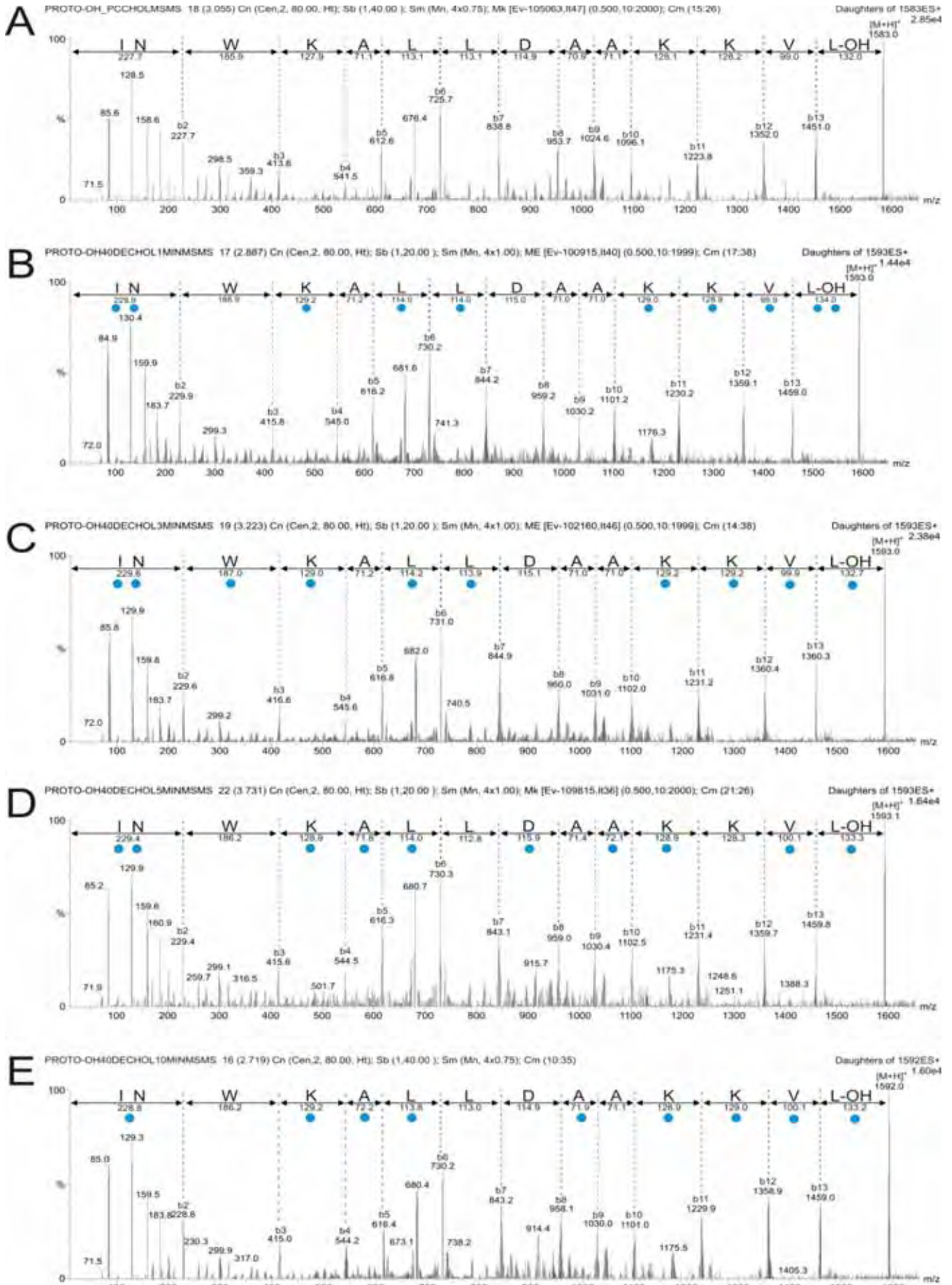


Figura 24: Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) em presença de vesícula de PC/Chol na ausência de D₂O (A) e na presença de D₂O 40% (v/v), nos tempos de incubação de 1 minuto (B), de 3 minutos (C), de 5 minutos (D), de 10 minutos (E) de 15 minutos (F), de 30 minutos (G) e de 60 minutos (H). O círculo em azul representa incorporação de um deutério.

Comparando-se os valores de m/z dos íons moleculares nas formas não deuterada (Figura 25A) e deuterada (Figura 25B a 25H) observados nos espectros ESI-MS/MS obtidos em cada diferente tempo de incubação, verifica-se que o nível de incorporação de deutério no peptídeo Protonectarina-MP (-OH) foi de 10 deutérios nos tempos de 1, 3, 5, 15 e 30 minutos e 9 deutérios nos tempos de 10 e 60 minutos (Figura 25). Os espectros MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) também apresentaram uma variação da localização das trocas isotópicas ao longo do tempo (figura 25), com os resíduos Trp³, Ala⁵, Leu⁶, Leu⁷, Asp⁸, Ala⁹, Ala¹⁰ e Lys¹² em alguns tempos estão deuterados, e em outros tempos não. Já os resíduos Ile¹, Asn², Lys⁴, Lys¹¹, Val¹³ e Leu¹⁴ permanecem deuterados durante todo o experimento.



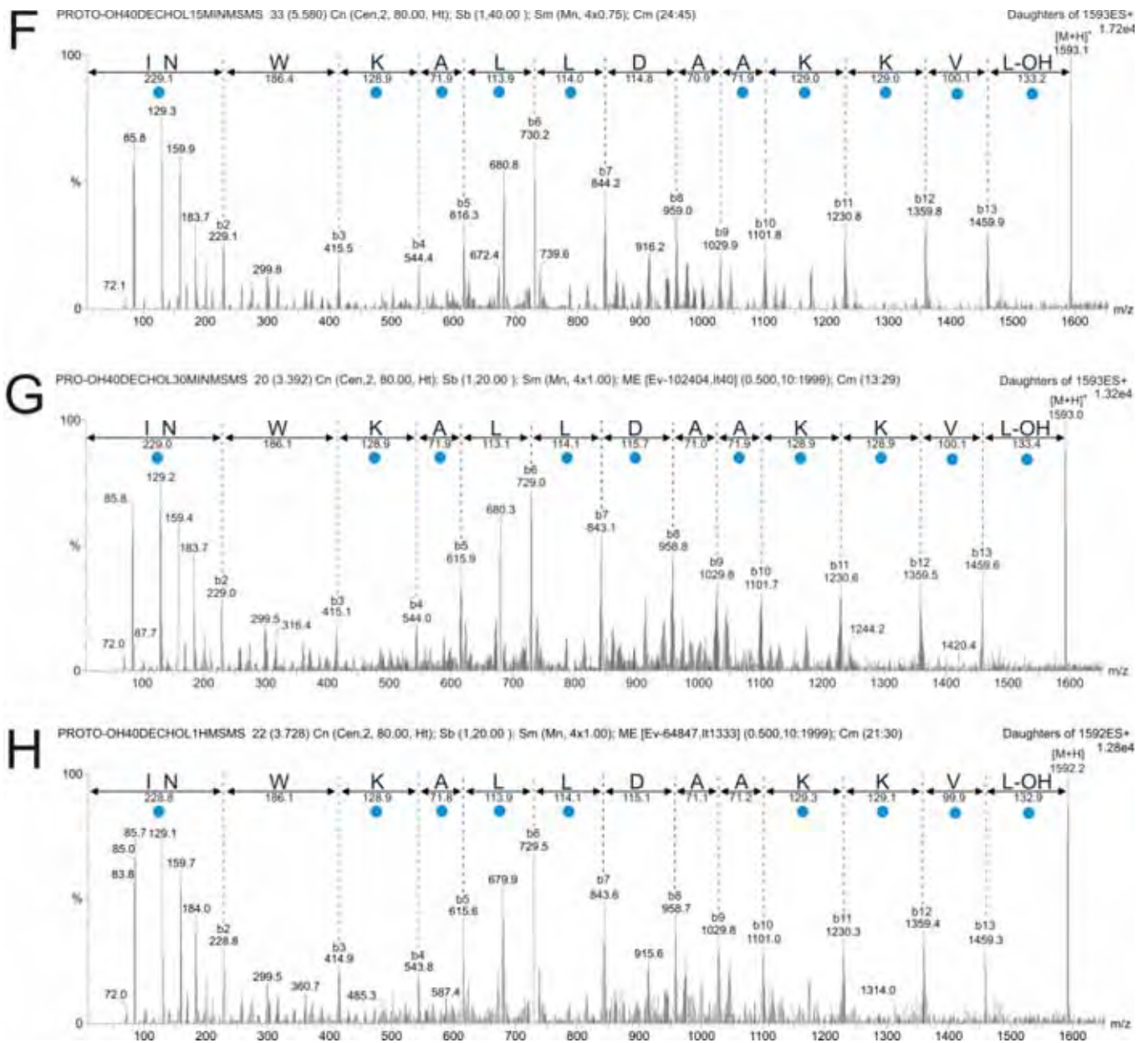


Figura 25: Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC/Chol na ausência de D₂O (A) e na presença de D₂O 40% (v/v), nos tempos de incubação de 1 minuto (B), de 3 minutos (C), de 5 minutos (D), de 10 minutos (E) de 15 minutos (F), de 30 minutos (G) e de 60 minutos (H). O círculo em azul representa incorporação de um deutério.

A partir dos resultados, foi construída a figura 26, que mostra a dinâmica de movimentação dos resíduos de aminoácidos do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) ao interagir com o lipossomo de PC/Chol.

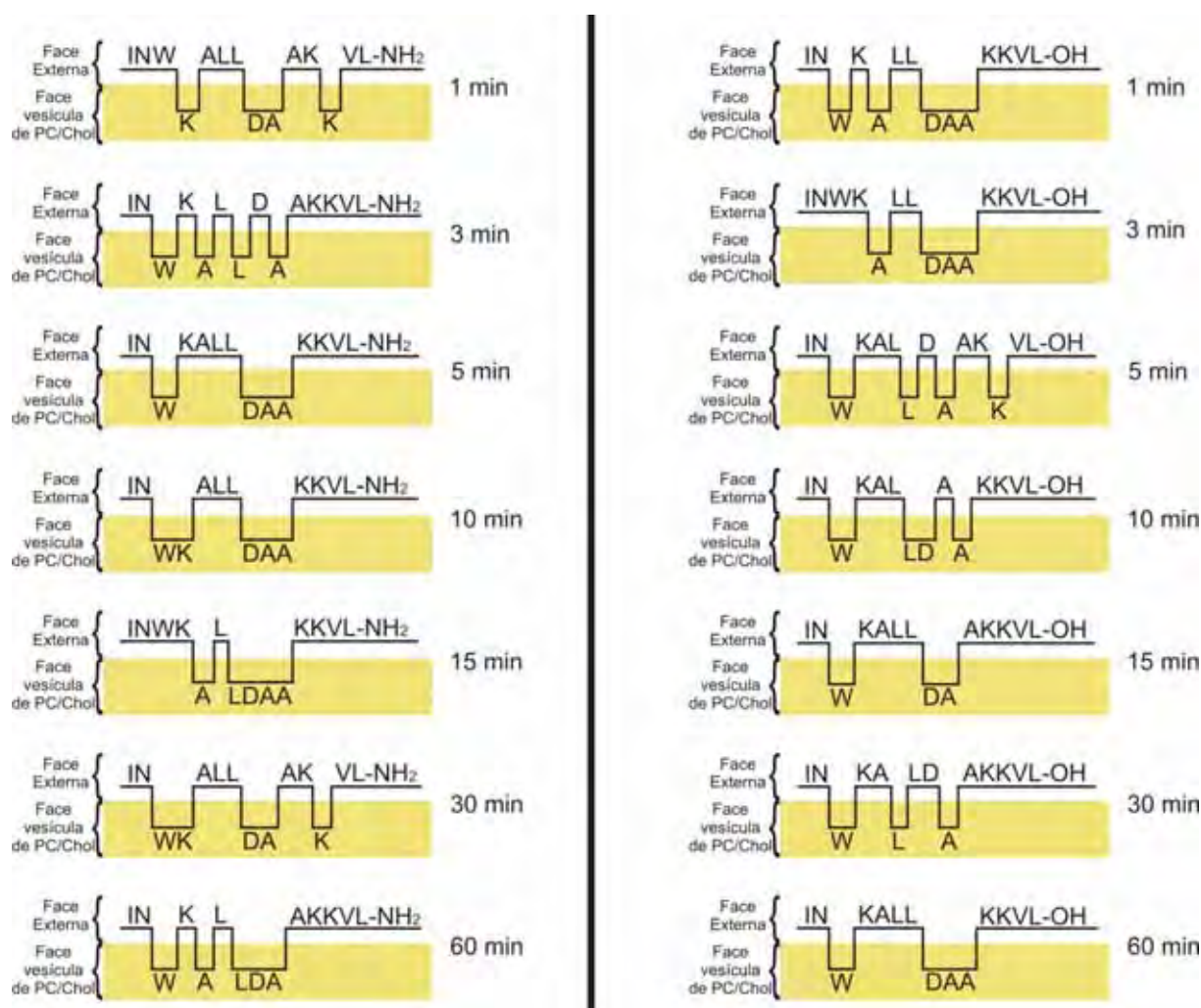


Figura 26: Esquema da interação do peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂) (A) e Protonectarina-MP (-OH) (B) com a membrana de PC/Chol ao longo do tempo, construídos através dos dados da troca isotópica H/D e espectrometria de massas seqüencial.

Analisando-se a figura 26, observa-se que provavelmente os peptídeos interagem com a membrana de PC/Chol, posicionando-se paralelamente à superfície da mesma, de maneira similar àquela observada em vesículas de PC. Além disso, as regiões N-terminal e C-terminal dos dois peptídeos estão orientadas para fora da membrana. A interação do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) com a membrana da vesícula de PC/Chol é muito semelhante àquela já analisada na Figura 21A. Entretanto, para o peptídeo Protonectarina-MP (-OH) verifica-se que é maior o número de resíduos de aminoácidos posicionados no interior da membrana da vesícula de PC/Chol em relação à interação observada em vesículas de PC. Neste último caso, após 60 minutos de incubação à 25°C observa-se 4 resíduos de aminoácidos interagindo com a vesícula de PC/Chol (Figura 26B), enquanto que somente 1 resíduo foi observado interagindo com a membrana da vesícula de PC (Figura 21B). Apesar de conferir uma maior estabilidade em membranas, a presença do colesterol provavelmente

promoveu uma maior hidrofobicidade no interior da membrana, aumentando a interação do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) com a vesícula de PC/Chol. O resultado final foi de que esta condição tornou a interação de ambos os peptídeos muito semelhantes, quando comparados entre si.

Em vesículas de PC/Chol, também não foi observada a agregação de peptídeos na superfície da membrana e nem a formação de poros. Portanto, a movimentação dos peptídeos na superfície da vesícula, deve gerar uma perturbação estrutural suficientemente grande para desestabilizar e despermeabilizar parcialmente a membrana de PC/Chol. Estes resultados são de mesma natureza que aqueles observados para a interação de ambos os peptídeos com as membranas de vesículas de PC, porém com uma interação maior do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) com a membrana no caso das vesículas de PC/Chol.

5.3.3.2 Troca H/D em vesículas aniônicas

5.3.3.2.1 Troca H/D em complexos proteolipossomos de fosfatidilcolina/fosfatidilglicerol

Foram obtidos para os espectros ESI-MS para os peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) na forma de complexo proteolipossomo com PC/PG, na ausência de deutério. O peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) apresentou o íon molecular m/z 1582.5 [M+H]⁺ (Figura 27); além disso, foram observados os íons moleculares do peptídeo com cargas +2, +3 e +4, que correspondem aos íons de m/z 791,9, 528,1 e 396,4, respectivamente. Também foi encontrado o íon molecular do PC e de seu dímero, que apresentaram, respectivamente, m/z 760.8 [M+H]⁺ e 1520,3 [2M + H]⁺ (Figura 27). A figura 27B mostra detalhadamente a região do íon molecular de PG que apresentou o m/z 771.9 [M+H]⁺.

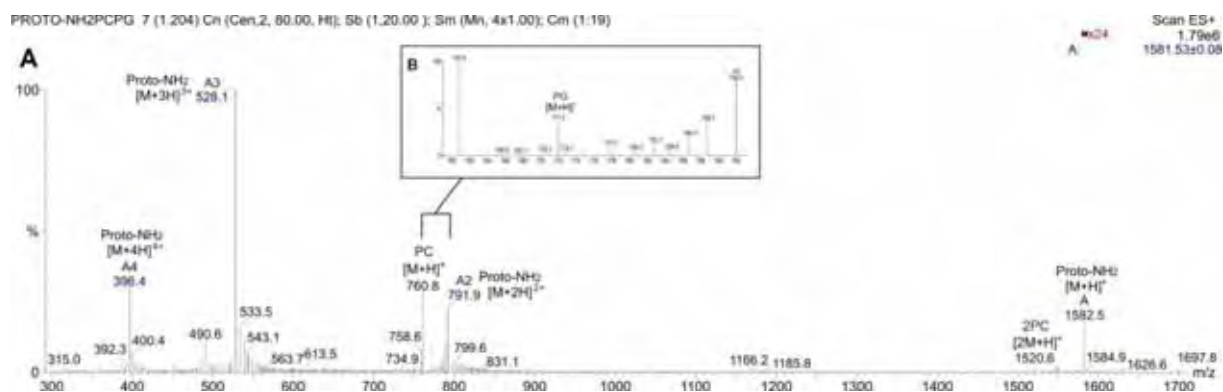
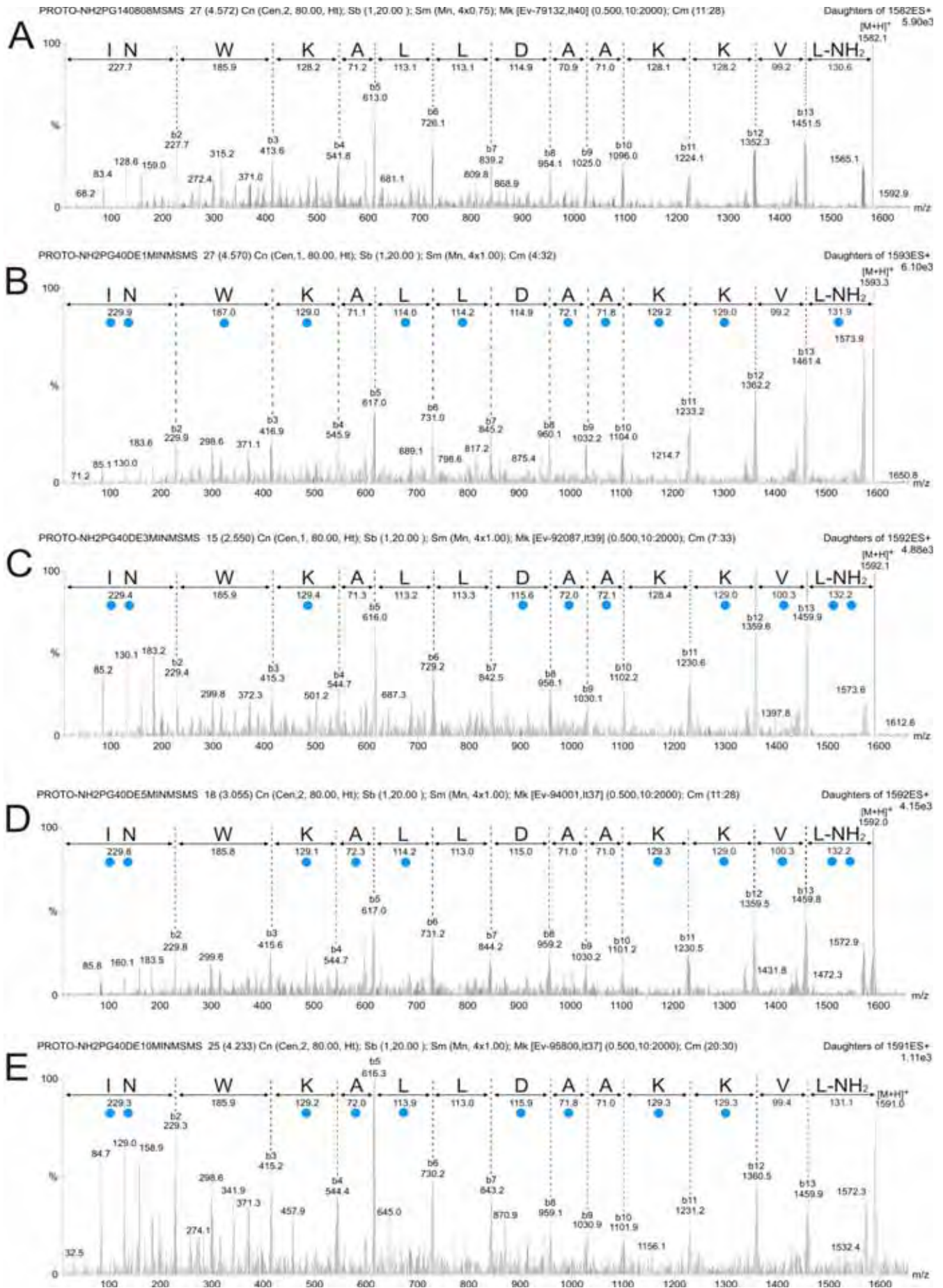


Figura 27: (A) Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) em presença de vesícula de PC/PG (70:30). Em (B), mostra-se a região onde se encontra o íon molecular de PG, que foi aumentada para facilitar a visualização.

Comparando-se os valores de m/z dos íons moleculares nas formas não deuterada (Figura 28A) e deuterada (Figura 28B a 28H), observados nos espectros ESI-MS/MS obtidos em cada diferente tempo de incubação, verifica-se que o nível de incorporação de deutério no peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) foi de 11 deutérios no tempo de 1 minutos, 10 deutério nos tempos de 3, 5 e 30 minutos e 9 deutérios nos tempos de 10, 15 e 60 minutos.

No espectro de massas MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) formando proteolipossomos com vesículas de PC/PG, em ausência de deutério, foi detectada uma série de picos característicos da fragmentação do tipo “-b” de m/z : 227.7 (b_2), 413.6 (b_3), 541.8 (b_4), 613.0 (b_5), 726.1 (b_6), 839.2 (b_7), 954.1 (b_8), 1025.0 (b_9), 1096.0 (b_{10}), 1224.1 (b_{11}), 1352.3 (b_{12}) e 1451.5 (b_{13}) (Figura 28A). A análise dos espectros MS/MS revelou que a localização das trocas isotópicas varia muito ao longo do tempo (figura 28), com todos os resíduos da seqüência primária, incluindo os resíduos localizados na região N-terminal e C-terminal, em alguns tempos estão deuterados, e em outros tempos não. Assim, em determinados momentos alguns destes resíduos estão interagindo com a região mais interna da vesícula, e em outros momentos estes mesmo resíduos estão expostos para fora da vesícula.



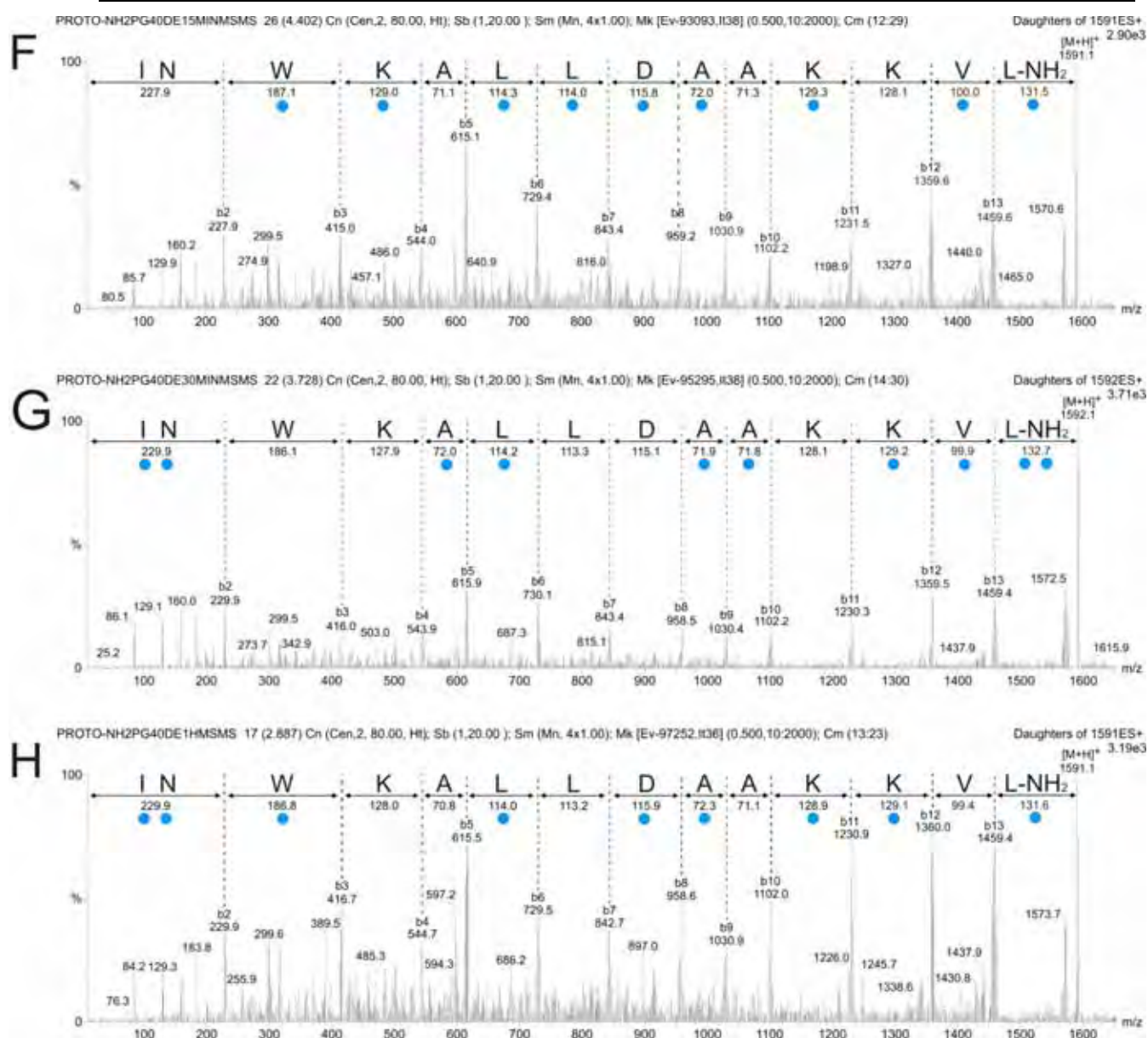


Figura 28: Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) em presença de vesícula de PC/PG na ausência de D₂O (A) e na presença de D₂O 40% (v/v), nos tempos de incubação de 1 minuto (B), de 3 minutos (C), de 5 minutos (D), de 10 minutos (E) de 15 minutos (F), de 30 minutos (G) e de 60 minutos (H). O círculo em azul representa incorporação de um deutério.

Para o peptídeo Protonectarina-MP (-OH) na ausência de deutério, além do íon molecular de PC e PG de m/z 760.5 [M+H]⁺ e 772.2 [M+H]⁺, respectivamente; foi encontrado o íon molecular do peptídeo de m/z 1583.1 [M+H]⁺ (Figura 29).

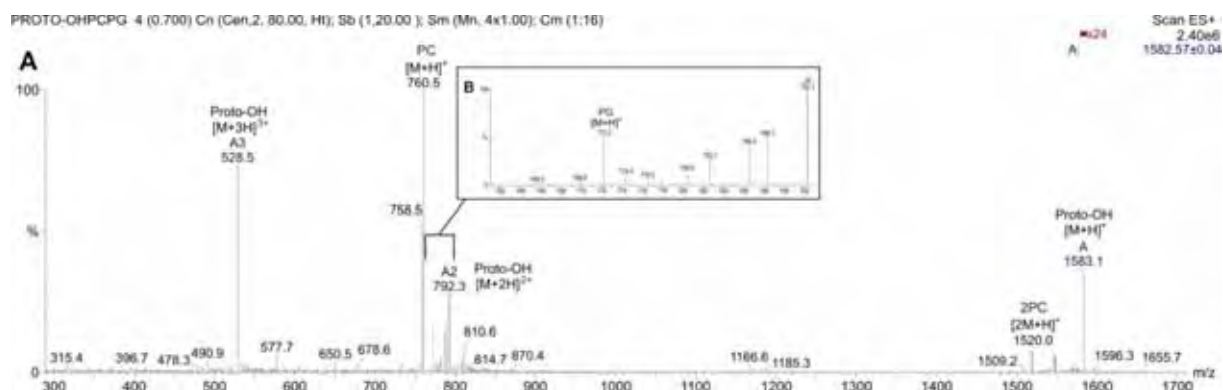
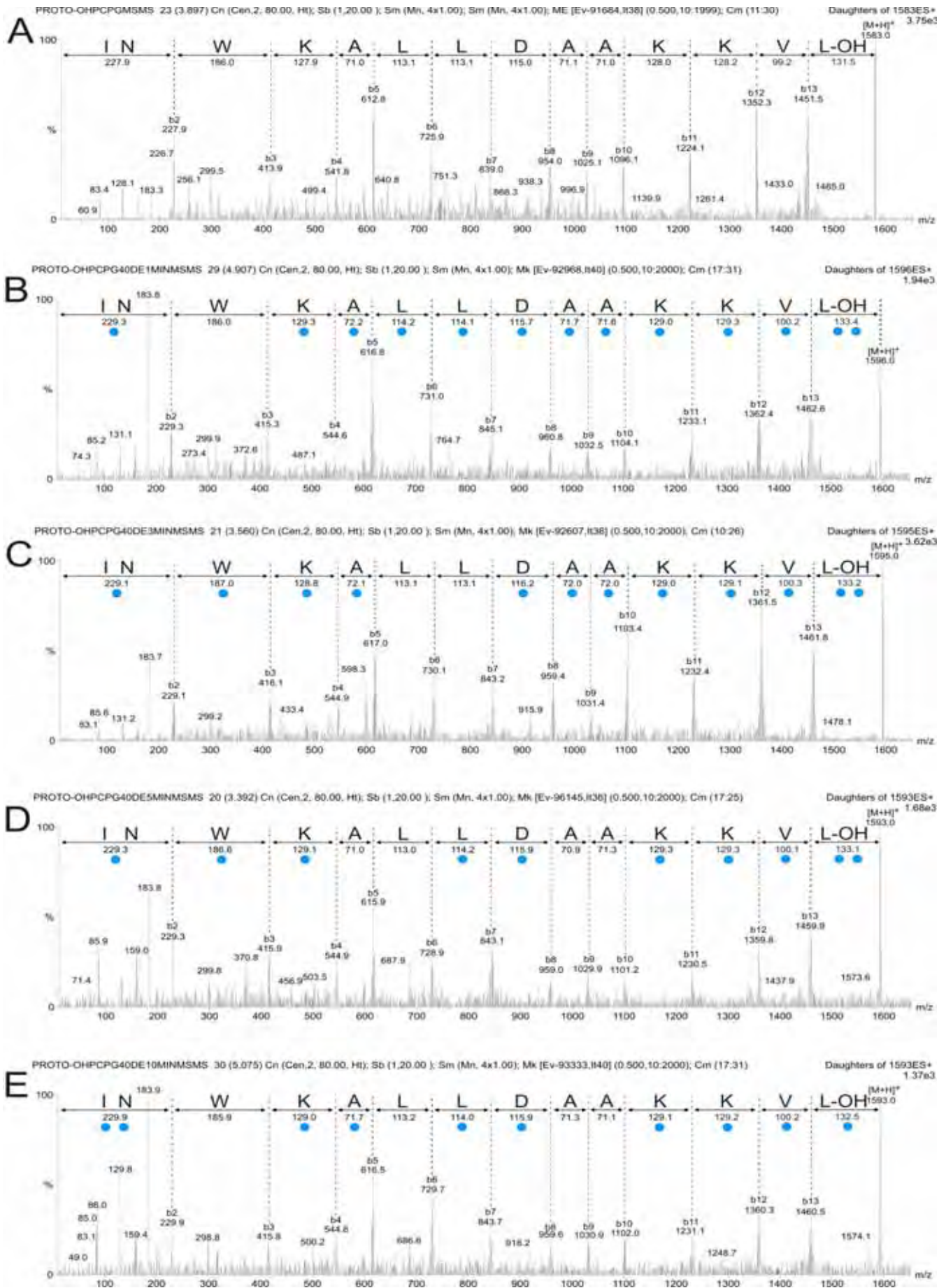


Figura 29: (A) Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC/PG (70:30). Em (B), mostra-se a região onde se encontra o íon molecular de PG, que foi aumentada para facilitar a visualização.

Comparando-se os valores de m/z dos íons moleculares nas formas não deuterada (Figura 30A) e deuterada (Figura 30B a 30H), observados nos espectros ESI-MS/MS obtidos em cada diferente tempo de incubação, verifica-se que o nível de incorporação de deutério no peptídeo Protonectarina-MP (-OH) foi de 13 deutérios no tempo de 1 minuto, 12 deutério nos tempos de 3 e 15 minutos, 11 deutérios nos tempos de 30 e 60 minutos e 10 deutérios nos tempos de 5 e 10 minutos.

No espectro de massas MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) formando proteolipossomos com vesículas de PC/PG, em ausência de deutério, foi detectada uma série de picos característicos da fragmentação do peptídeo correspondentes a íons-fragmento do tipo “-b” de m/z : 227.9 (b_2), 413.9 (b_3), 541.8 (b_4), 612.8 (b_5), 725.9 (b_6), 839.0 (b_7), 954.0 (b_8), 1025.1 (b_9), 1096.1 (b_{10}), 1224.1 (b_{11}), 1352.3 (b_{12}) e 1451.5 (b_{13}) (Figura 30A). A interpretação dos espectros MS/MS do peptídeo nestas condições (Figuras 30A a 30H) mostram que a troca isotópica também varia ao longo do tempo, com os resíduos Trp³, Lys⁴, Ala⁵, Leu⁶, Leu⁷, Ala⁹, Ala¹⁰ e Lys¹¹ deuterados em alguns tempos de incubação, e não deuterados em outros tempos; ou seja, em determinados momentos alguns destes resíduos estão interagindo com a membrana das vesículas de PC/PG, e em outros momentos estes mesmos resíduos estão orientados para fora da membrana da vesícula. Também foi observado que os resíduos Ile¹, Asn², Asp⁸, Lys¹², Val¹³ e Leu¹⁴ permanecem deuterados durante todo o experimento, indicando que tais resíduos estão posicionados para fora da membrana durante os 60 minutos de incubação.



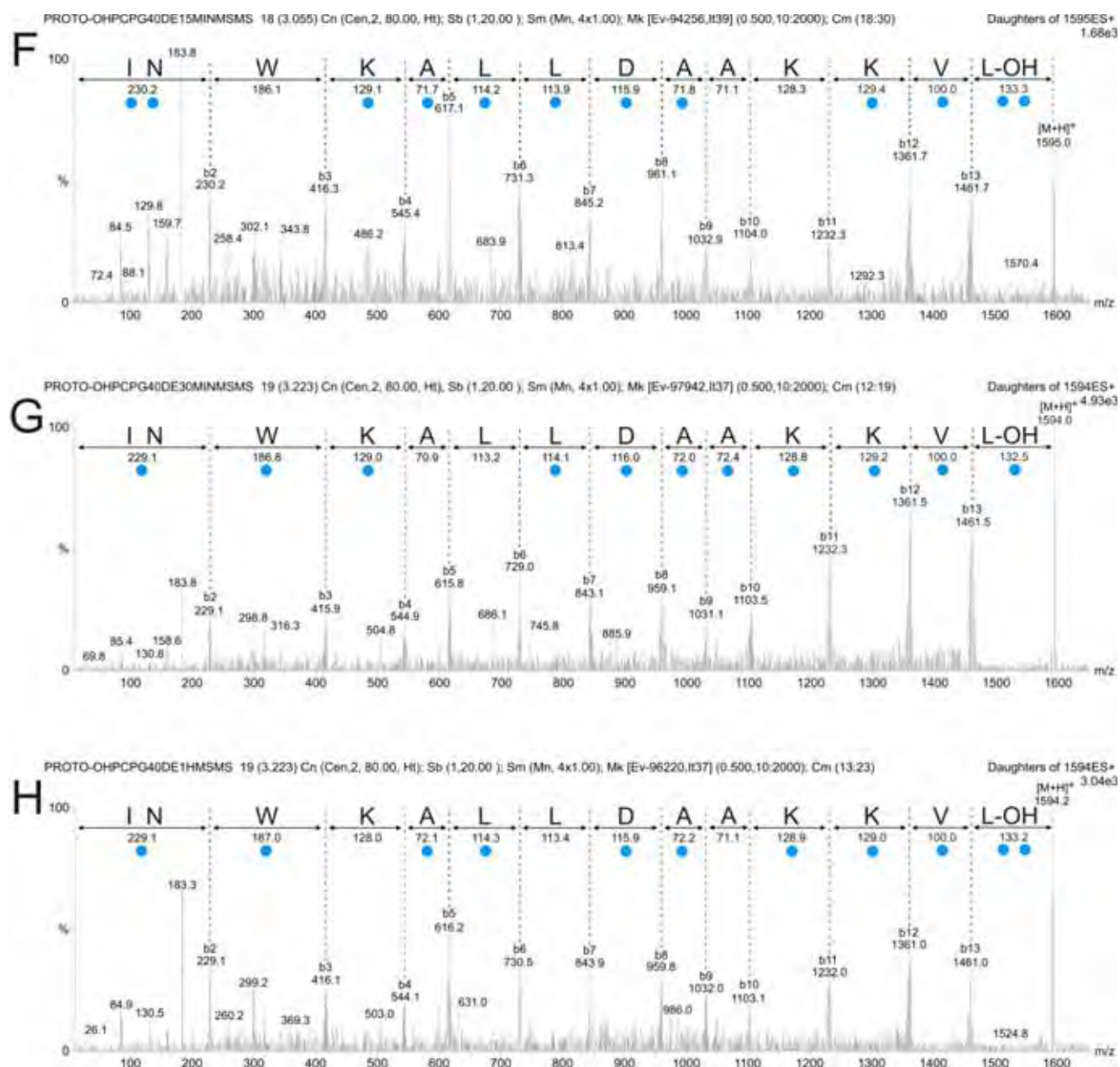


Figura 30: Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC/PG na ausência de D₂O (A) e na presença de D₂O 40% (v/v), nos tempos de incubação de 1 minuto (B), de 3 minutos (C), de 5 minutos (D), de 10 minutos (E) de 15 minutos (F), de 30 minutos (G) e de 60 minutos (H). O círculo em azul representa incorporação de um deutério.

Com base nos dados obtidos dos espectros de massas, foi construída a figura 31, que mostra a dinâmica de movimentação dos resíduos de aminoácidos de ambos os peptídeos ao interagir com o lipossomo de PC/PG.

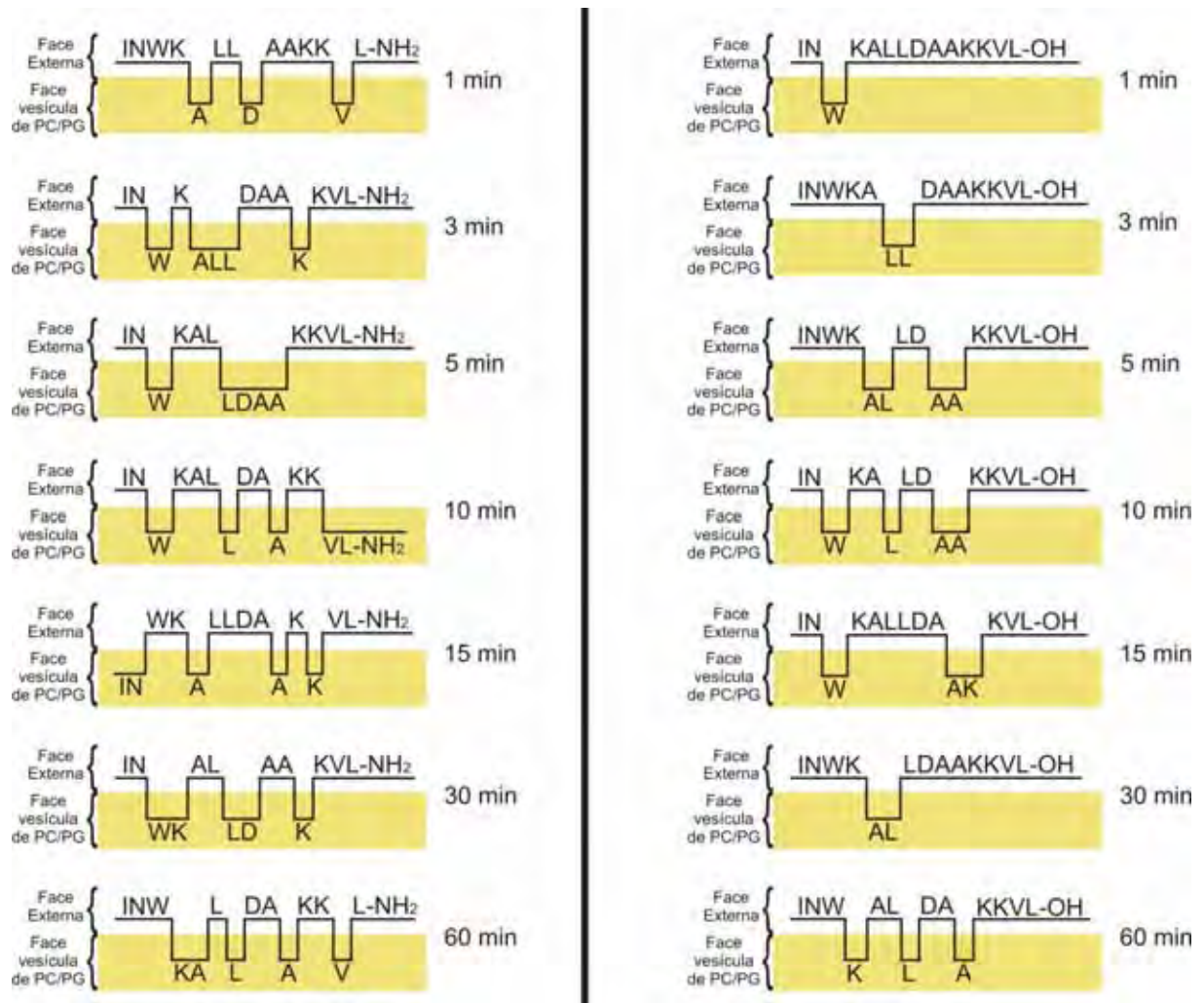


Figura 31: Esquema da interação do peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂) (A) e Protonectarina-MP (-OH) (B) com a membrana de PC/PG ao longo do tempo, construídos através dos dados da troca isotópica H/D e espectrometria de massas seqüencial.

A figura 31 mostra que novamente ambos os peptídeos interage paralelamente à superfície da membrana de PC/PG, de forma semelhante ao observado nos ensaios com as vesículas zwitteriônicas. Porém, observa-se que ambos os peptídeos acabam apresentando uma maior interação com a vesícula aniônica, com um maior número de resíduos de aminoácidos interagindo com a região hidrofóbica da membrana da vesícula. Além disso, o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) apresenta a sua região N-terminal (no tempo de 15 minutos) e C-terminal (no tempo de 10 minutos) orientadas para o interior da membrana, diferentemente do que foi observado anteriormente nos ensaios em PC e PC/Chol. Esse comportamento de ora orientar-se para fora da membrana e, ora orientar-se para dentro da membrana também foi observado em todos os resíduos da seqüência, que tendem a se movimentar bastante ao longo do tempo. Além disso, desde 1 minuto de incubação até o tempo de 60 minutos, ocorreu um aumento do número total de resíduos de aminoácidos

posicionados no interior da vesícula, que passou de 3 resíduos (1 min) para 5 resíduos de aminoácidos (60 min) (Figura 31A).

Em relação ao peptídeo Protonectarina-MP (-OH), apesar de não apresentar suas regiões N-terminal e C-terminal interagindo com a membrana, este apresenta alguns resíduos do interior da seqüência ora interagindo e ora não, porém, de forma mais sutil se comparado ao peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂). Além disso, também foi observado que ao longo do tempo aumentou o número de resíduos interagindo com a vesícula, passando de 1 resíduo no tempo de 1 minuto para 3 resíduos no tempo de 60 minutos (Figura 31B).

Assim como nos outros experimentos, também não foi observado nenhum tipo de agregação dos peptídeos na superfície da membrana, porém, observou-se uma grande movimentação de seus resíduos, o que pode talvez provocar uma grande desestabilização nos lipídios localizados na vesícula. Se consideradas as semelhanças, ainda que por aproximação grosseira, entre os sistemas membrano-miméticos aniônicos, e as membranas das células bacterianas, e o fato de que ambos os peptídeos apresentaram alguma atividade antimicrobiana, os resultados obtidos no monitoramento das trocas isotópicas H/D por ESI-MS em vesículas sintéticas de diferentes composições de fosfolipídios explicam tais observações:

i) ambos os peptídeos interagem com membranas aniônicas e com membranas neutras; por isso, além de interagirem com células eucariontes (que possuem membranas zwiteriônicas), também interagem com membranas aniônicas, e desta maneira, apresentam atividade antimicrobiana;

ii) Protonectarina-MP (-NH₂) apresenta valores de MIC menores que Protonectarina-MP (-OH), tanto para bactérias Gram-positivas, como para bactérias Gram-negativas; essa observação é corroborada pelos resultados que mostram que o peptídeo apresentando o resíduo C-terminal amidado interage mais intensamente com as membranas aniônicas, que o peptídeo com o resíduo C-terminal na forma ácida.

5.3.3.2.2 Troca H/D em complexos proteolipossomos de fosfatidilcolina/cardiopina

Foram obtidos para os espectros ESI-MS dos peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) na forma de complexo proteolipossomo com PC/CL, na ausência de deutério. O peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) apresentou o íon molecular m/z 1582.3 [M+H]⁺ (Figura 32); além disso, foram observados os íons moleculares do peptídeo com cargas +2 e +3, que correspondentes aos íons de m/z 791.8 e 528.1, respectivamente.

Também foi encontrado o íon molecular do PC e de seu dímero, que apresentaram, respectivamente, m/z 760.6 $[M+H]^+$ e 1520.3 $[2M + H]^+$ (Figura 32). A figura 32-B mostra detalhadamente a região do íon molecular de CL que apresentou o m/z 1494.7 $[M+H]^+$.

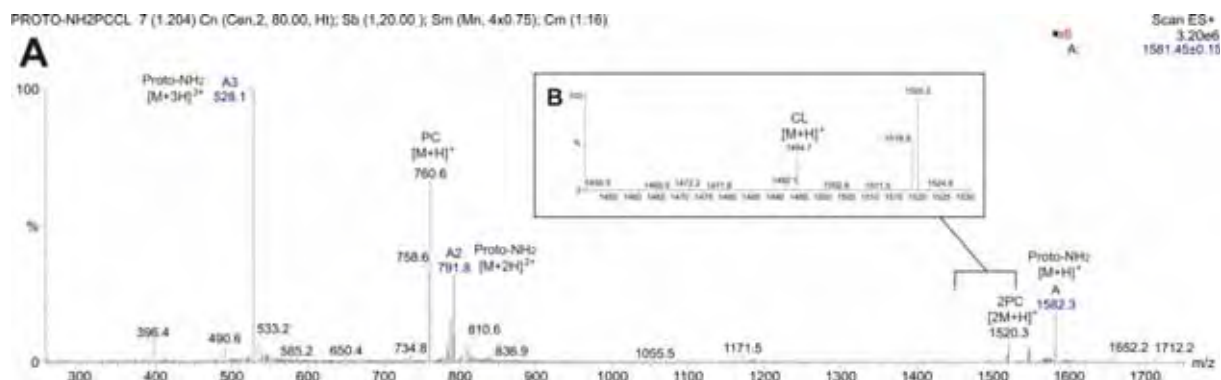
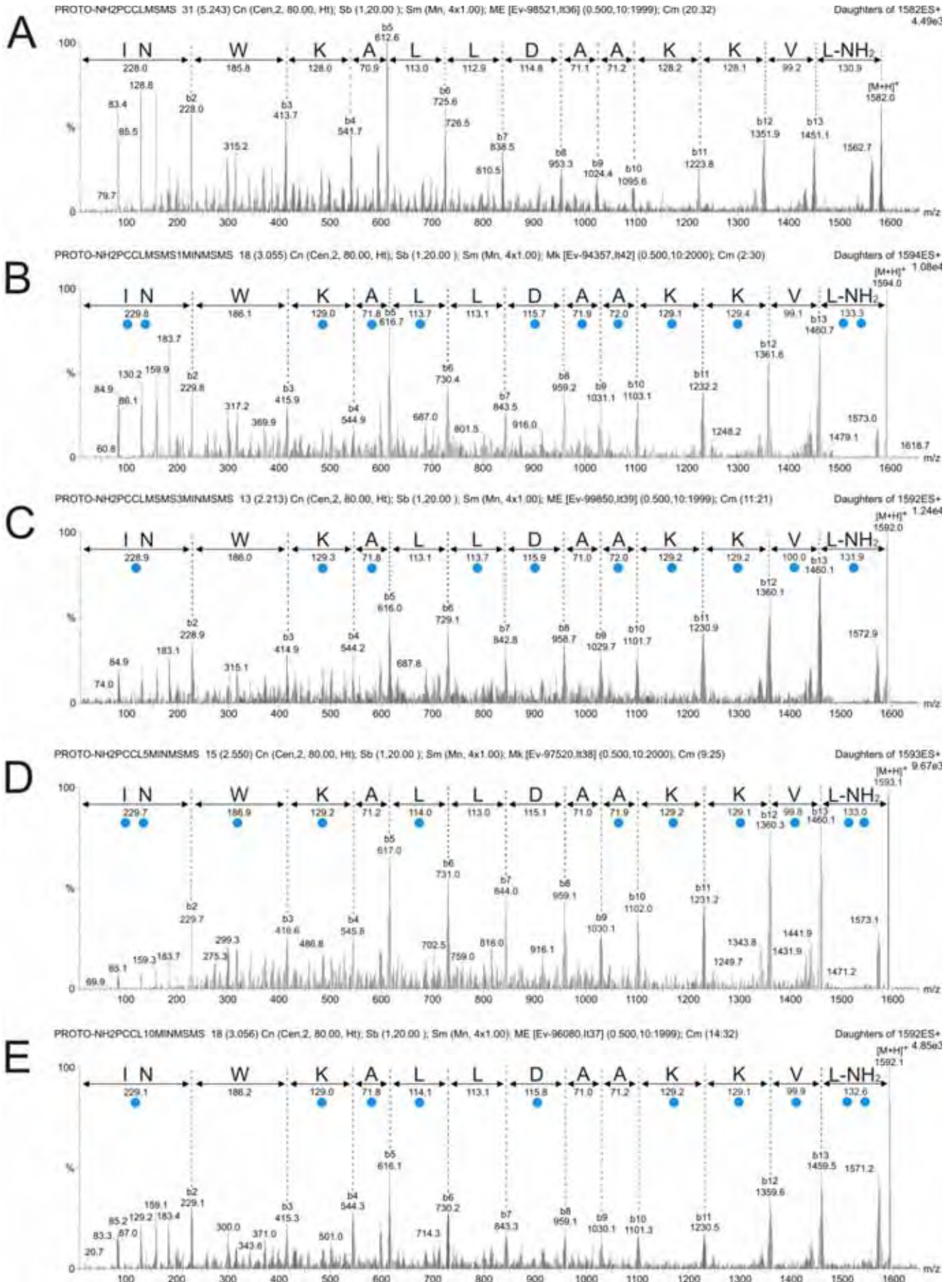


Figura 32: (A) Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP ($-\text{NH}_2$) em presença de vesícula de PC/CL (90:10). Em (B), mostra-se a região onde se encontra o íon molecular de CL, que foi aumentada para facilitar a visualização.

Comparando-se os valores de m/z dos íons moleculares nas formas não deuterada (Figura 33A) e deuterada (Figura 33B a 33H), observados nos espectros ESI-MS/MS obtidos em cada diferente tempo de incubação, verifica-se que o nível de incorporação de deutério no peptídeo Protonectarina-MP ($-\text{NH}_2$) foi de 12 deutérios nos tempos de 1 e 60 minutos, 10 deutério nos tempos de 3, 10 e 30 minutos, 11 deutérios no tempo de 5 minutos e 9 deutérios no tempo de 15 minutos.



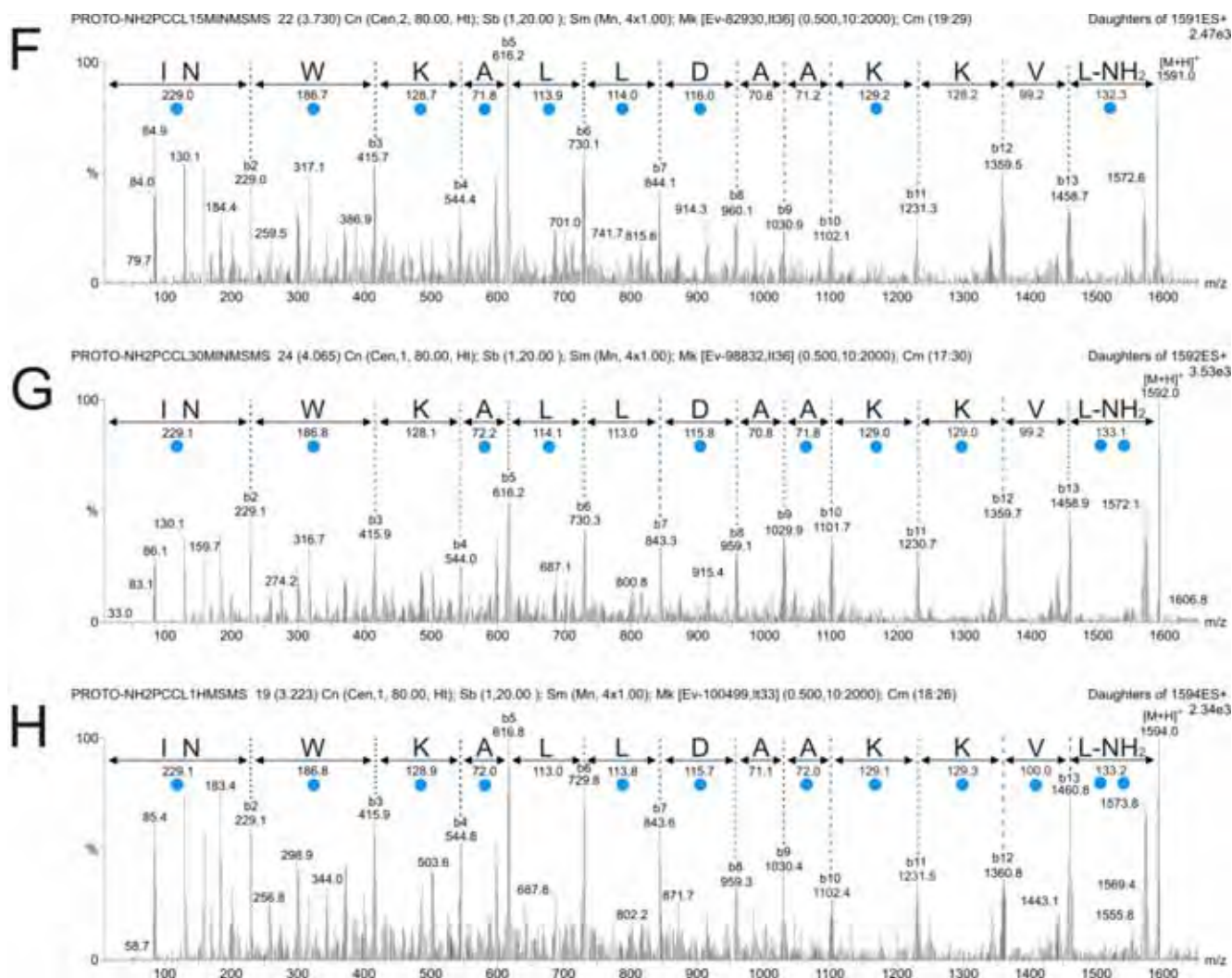


Figura 33: Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) em presença de vesícula de PC/CL na ausência de D₂O (A) e na presença de D₂O 40% (v/v), nos tempos de incubação de 1 minuto (B), de 3 minutos (C), de 5 minutos (D), de 10 minutos (E) de 15 minutos (F), de 30 minutos (G) e de 60 minutos (H). O círculo em azul representa incorporação de um deutério.

No espectro de massas MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) formando proteolipossomos com vesículas de PC/CL, em ausência de deutério, foi detectada uma série de picos característicos da fragmentação do tipo “-b” de m/z: 228.0 (b₂), 413.7 (b₃), 541.7 (b₄), 612.6 (b₅), 725.6 (b₆), 838.5 (b₇), 953.3 (b₈), 1024.4 (b₉), 1095.6 (b₁₀), 1223.8 (b₁₁), 1351.9 (b₁₂) e 1451.1 (b₁₃) (Figura 33A). A análise dos espectros MS/MS revelou que a localização das trocas isotópicas varia ao longo do tempo nos resíduos internos da seqüência primária (figura 33), sendo que em determinados momentos alguns destes resíduos estão interagindo com a região mais interna da vesícula, e em outros momentos estes mesmo resíduos estão expostos para fora da vesícula. Porém, os resíduos localizados na região N-terminal e C-terminal permanecem deutrerados todo o tempo.

Foi encontrado para o peptídeo Protonectarina-MP (-OH) na ausência de deutério, o íon molecular de m/z 1583.1 $[M+H]^+$. Além disso, foi observado o íon molecular de PC e CL de m/z 760.5 $[M+H]^+$ e 1494.5 $[M+H]^+$, respectivamente (Figura 34).

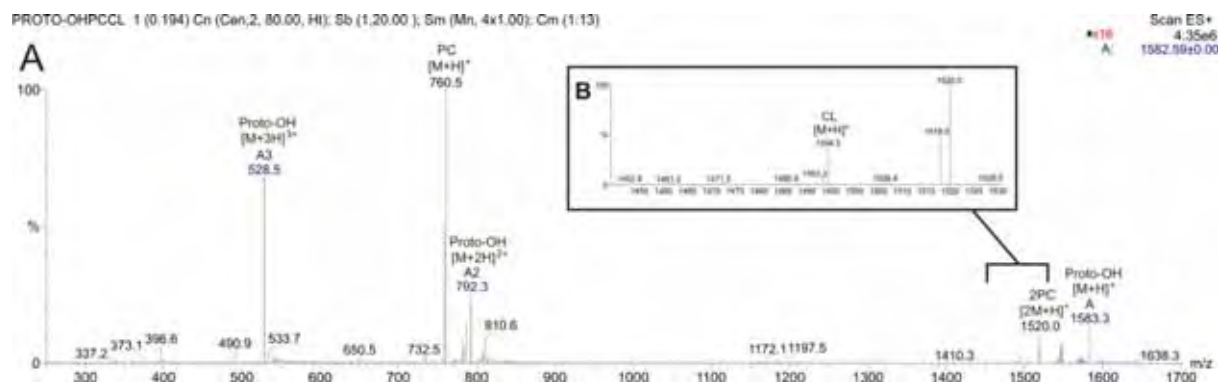
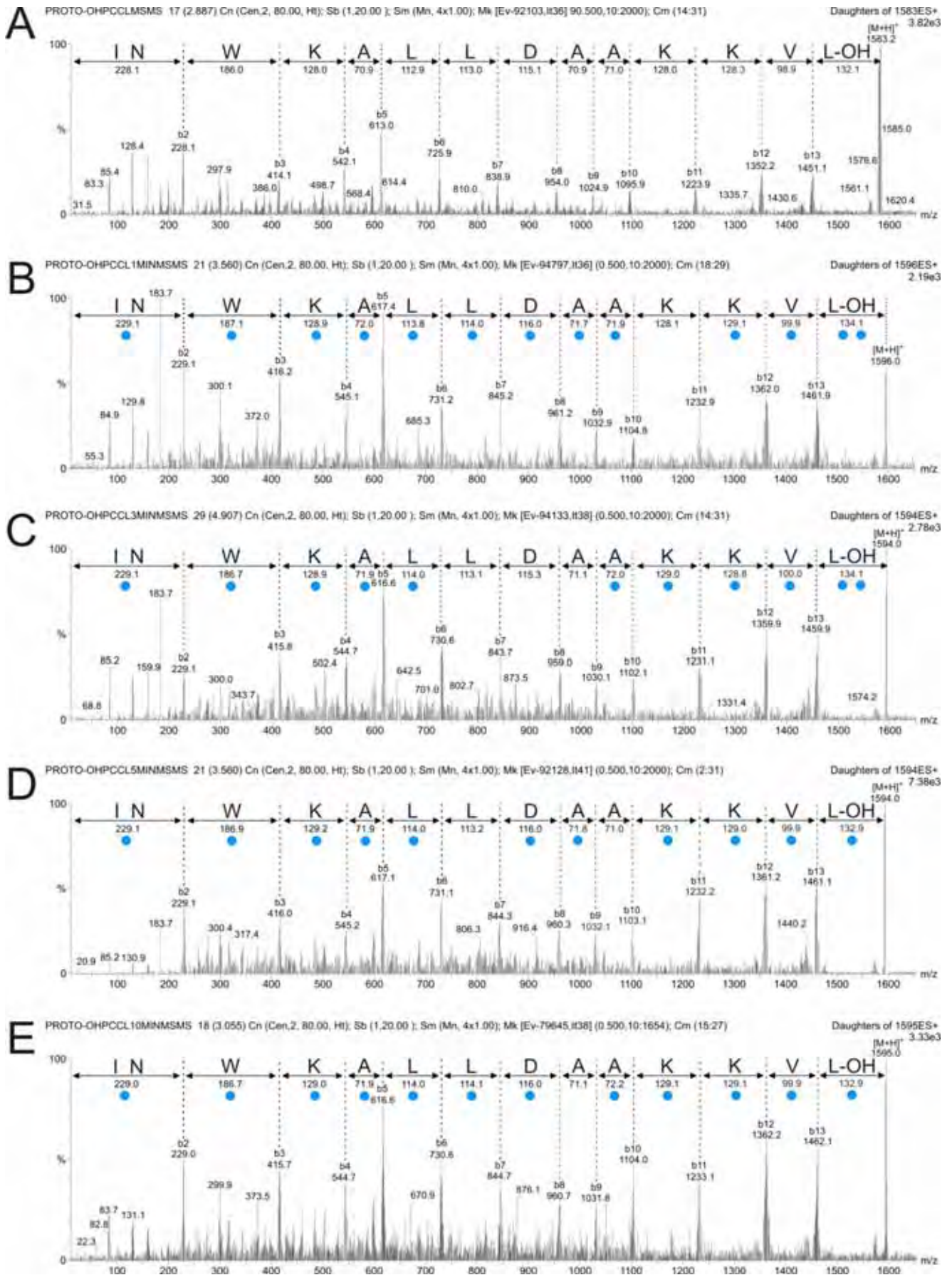


Figura 34: (A) Espectro de massas ESI-MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC/CL (90:10). Em (B), mostra-se a região onde se encontra o íon molecular de CL, que foi ampliada para facilitar a visualização.

Comparando-se os valores de m/z dos íons moleculares nas formas não deuterada (Figura 35A) e deuterada (Figura 35B a 35H), observados nos espectros ESI-MS/MS obtidos em cada diferente tempo de incubação, verifica-se que o nível de incorporação de deutério no peptídeo Protonectarina-MP (-OH) foi de 13deutérios no tempo de 1 minuto, 11 deutério nos tempos de 3, 5 e 15 minutos, 12 deutérios nos tempos de 10 e 30 minutos e 10 deutérios no tempo de 60 minutos.

No espectro de massas MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) formando proteolipossomos com vesículas de PC/CL, em ausência de deutério, foi detectada uma série de picos característicos da fragmentação do peptídeo correspondentes a íons-fragmento do tipo “-b” de m/z : 228.1 (b_2), 414.1 (b_3), 542.1 (b_4), 613.0 (b_5), 725.9 (b_6), 838.9 (b_7), 954.0 (b_8), 1024.9 (b_9), 1095.9 (b_{10}), 1223.9(b_{11}), 1352.2(b_{12}) e 1451.1 (b_{13}) (Figura 35A). A interpretação dos espectros MS/MS (Figuras 35A a 35H) mostra que a troca isotópica também varia ao longo do tempo, com os resíduos Leu⁶, Leu⁷, Asp⁸, Ala⁹, Ala¹⁰ e Lys¹¹ deuterados em alguns tempos de incubação, e não deuterados em outros tempos. Já os resíduos Ile¹, Asn², Trp³, Lys⁴, Ala⁵, Lys¹², Val¹³ e Leu¹⁴ permanecem deuterados durante todo o experimento, indicando que tais resíduos estão posicionados para fora da membrana.

Com base nos dados obtidos dos espectros de massas, foi construída a figura 36, que mostra a dinâmica de movimentação dos resíduos de aminoácidos de ambos os peptídeos ao interagir com o lipossomo de PC/CL.



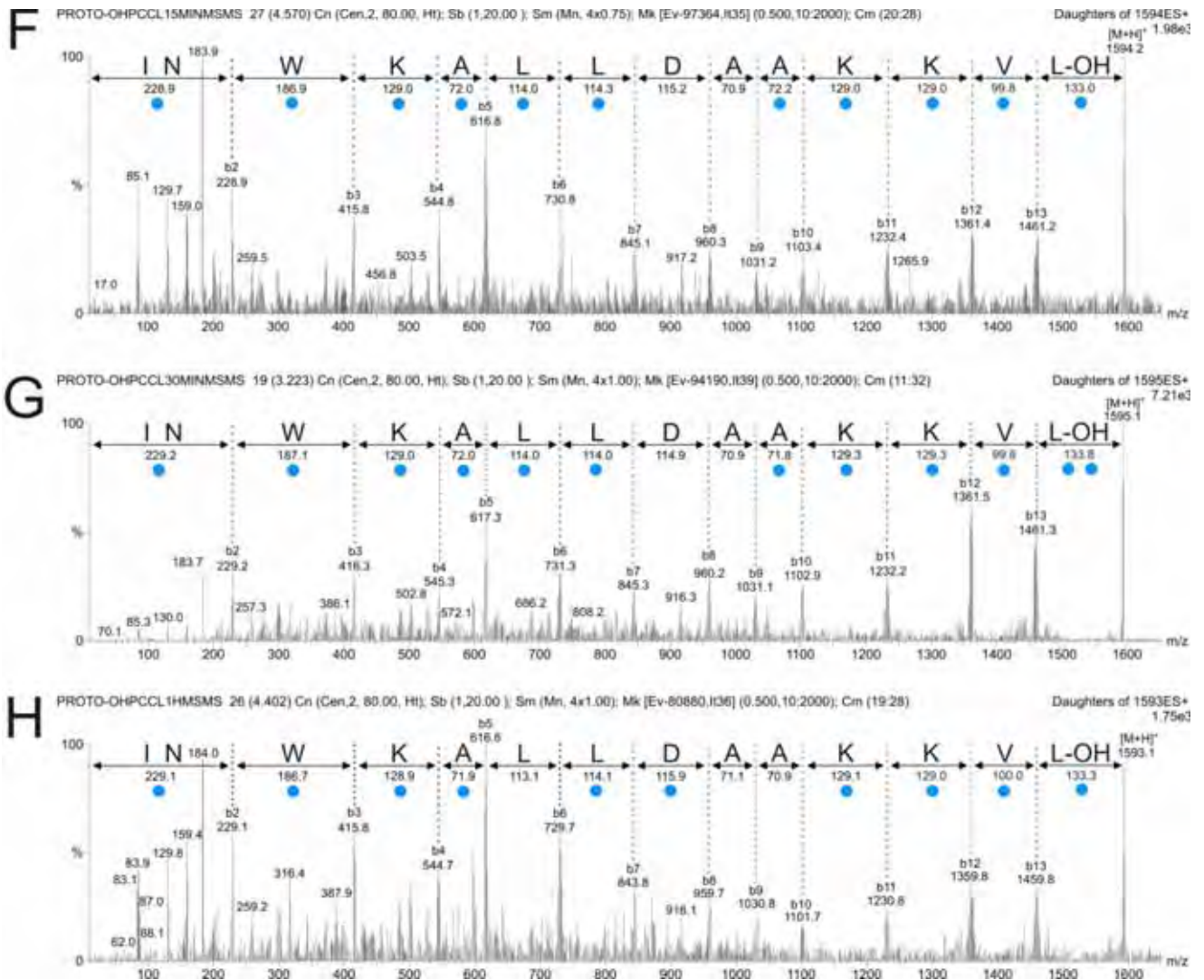


Figura 35: Espectro de massas ESI- MS/MS do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em presença de vesícula de PC/CL na ausência de D₂O (A) e na presença de D₂O 40% (v/v), nos tempos de incubação de 1 minuto (B), de 3 minutos (C), de 5 minutos (D), de 10 minutos (E) de 15 minutos (F), de 30 minutos (G) e de 60 minutos (H). O círculo em azul representa incorporação de um deutério.

A figura 36 mostra que novamente ambos os peptídeos interagem paralelamente à superfície da membrana de PC/CL, de forma semelhante ao observado nos ensaios com as vesículas zwitteriônicas. Observam-se comportamentos semelhantes de interação, com os resíduos mais internos ora interagindo com a membrana e ora não interagindo. Porém, ocorre uma maior interação do peptídeo com o resíduo C-terminal amidado (figura 36A) em relação ao seu análogo (figura 36B), apresentando um maior número de resíduos na região hidrofóbica da vesícula, exceto no tempo de incubação 60 minutos. Apesar da menor interação do peptídeo com terminal-C carboxilado, este apresenta uma maior interação em PC/CL do que em somente vesícula de PC, mostrando que a carga negativa acabou sendo importante para interação desse peptídeo em vesícula.

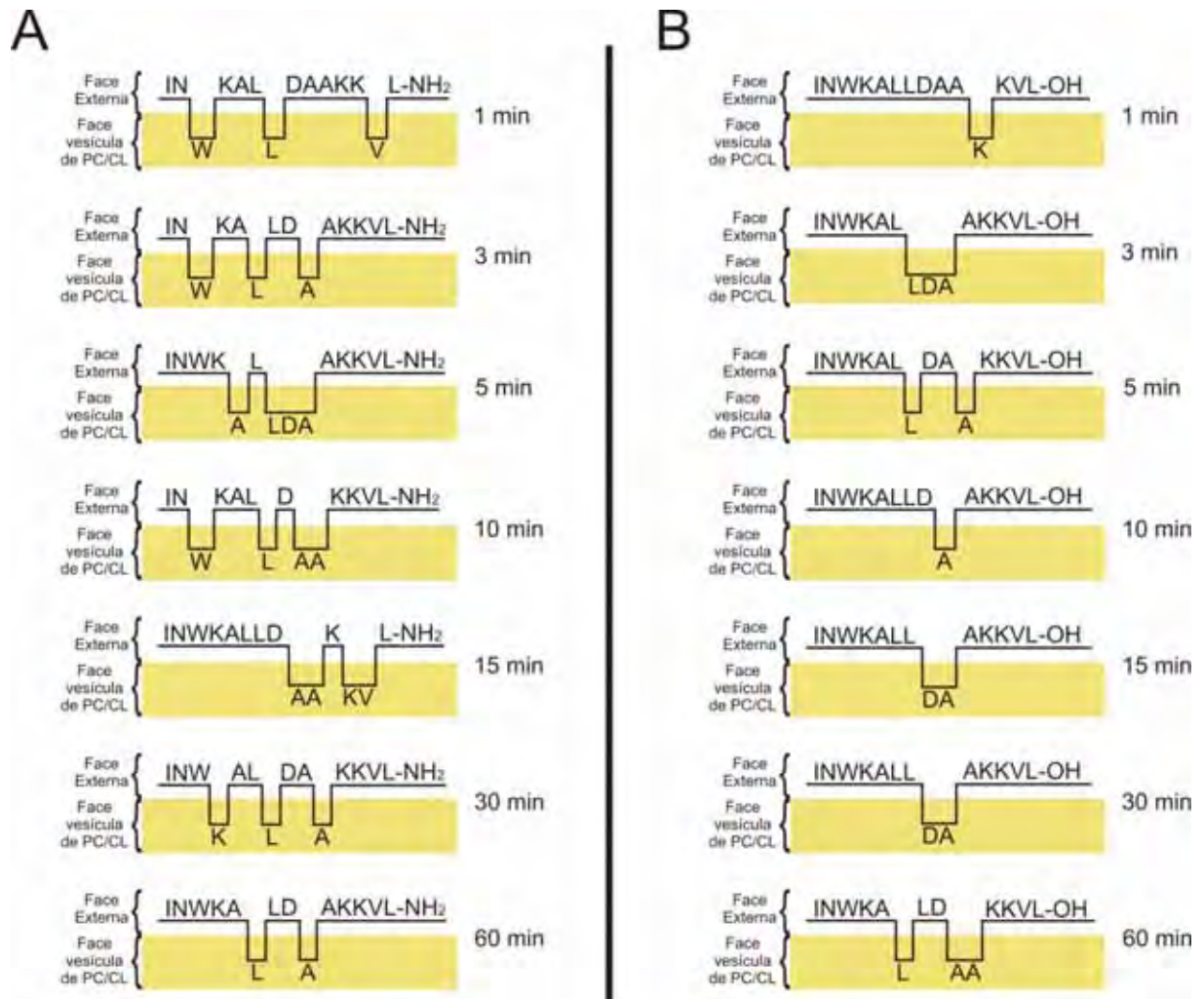


Figura 36: Esquema da interação do peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂) (A) e Protonectarina-MP (-OH) (B) com a membrana de PC/CL ao longo do tempo, construídos através dos dados da troca isotópica H/D e espectrometria de massas seqüencial.

O comportamento do peptídeo com C-terminal amidado foi mais semelhante ao observado nas outras vesículas, especialmente as vesículas de PC; isso pode ser devido ao fato da vesícula de PC/CL ser composta predominantemente por PC (90%). Além disso, ocorreu uma menor interação de ambos os peptídeos em vesículas de PC/CL em relação a vesícula de PC/PG, o que, provavelmente pode ser explicado pela quantidade de fosfolípidios nas membranas de PC/CL, resultando numa menor quantidade de cargas negativas nestas vesículas, e por isso se observa uma menor interação membrana-peptídeo assim nestas vesículas. Como foi observado no teor helicoidal desses peptídeos nas diferentes vesículas aniônicas. Porém, esses peptídeos em PC/CL também apresentaram uma menor interação, se comparados com a vesícula de PC/Chol, apesar de apresentarem um maior teor helicoidal em vesículas de PC/CL se comparados a vesícula de PC/Chol.

5.3.3.3. Validação dos modelos de interação peptídeo-membrana propostos

Para o monitoramento da troca de deutério ao nível de resíduos de aminoácidos foi utilizado para a fragmentação dos peptídeos a dissociação induzida por colisão (CID). Em estudos realizados por Kim et. al. (2001), observou-se que os fragmentos do tipo *-b*, originados por CID apresentam um nível de deutério consistente com os valores medidos por análises de NMR. No entanto, devido à intensa movimentação deste isótopo parece que o deutério pode sofrer um intenso processo de “deslocalização” (*scrambling*), dependente das condições físico-químicas do meio experimental, do tipo de instrumento usado nas medidas, da quantidade de energia aplicada nos processos de colisão e do tipo de íons-fragmentos formados durante a fragmentação dos peptídeos. Ainda podem influenciar esse processo outros fatores, tais como: a seqüência de aminoácidos, a estrutura secundária do peptídeo, afinidade do peptídeo pelo próton na fase gasosa e acessibilidade dos sítios trocáveis na superfície do peptídeo (DEMMERS et al., 2002). Assim, o “*scrambling*” acaba envolvendo uma redistribuição dos deutérios ao longo da cadeia polipeptídica, devido à elevada mobilidade do deutério. Como a localização exata dos deutérios ao longo da seqüência peptídica é de fundamental importância para a análise, interpretação e proposição de modelos de interação peptídeo-membrana, baseados nas trocas H/D, se faz necessário validar os modelos propostos calculando-se o “Fator de Movimentação de Deutérios”, conhecido também com “Scrambling Factor” (SF).

Para avaliar o grau de confiabilidade dos resultados relatados nos experimentos de troca H/D, foi necessário quantificar estatisticamente a incorporação de deutério nos íons-fragmentos formados (íons tipo *-b*) diferentes replicas experimentais, sob condições de CID. As diferenças relativas entre o conteúdo de deutério acumulado nos íons-fragmento do tipo *-b* nos modelos teóricos ideais (*modelo estatístico*- completamente deuterado, e *modelo parcialmente protegido* de deuteração pelo interior das membranas) e aqueles obtidos experimentalmente para os peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) na forma de proteolipossomos (em diferentes composições de lipídeos) foram avaliados pelo cálculo do Fator de Movimentação do Deutério (SF) proposto no trabalho De Souza e Palma (2008), utilizando-se a equação para o cálculo do Fator de Movimentação do Deutério (SF) mostrada a seguir:

$$SF = \frac{\sum_i^N |\Delta(D_{st} - D_{co})| - \sum_i^N |\Delta(D_{st} - D_{ex})|}{\sum_i^N |\Delta(D_{st} - D_{co})|}$$

onde, $\Delta(D_{st} - D_{co})$: é o desvio entre o conteúdo de deutério por íon-fragmento no *modelo estatístico* e no *modelo ideal parcialmente protegido pela membrana*; $\Delta(D_{st} - D_{ex})$: é o desvio entre o conteúdo de deutério por ion-fragmento entre o *modelo estatístico* e os resultados experimentais obtidos em cada caso; i : representa os íons-fragmentos individuais subseqüentes; N : representa o número total de picos de íons-fragmentos à partir dos quais os aumentos de massas podem ser determinados num espectro CID.

Deste modo, o fator de “*scrambling*” é um número definido entre 0 (indica não ocorrência de movimentação dos deutérios) e 1 (que representa um estado com a distribuição estatística de todos os átomos de deutério sob movimentação). Assim, quanto menor o fator de movimentação do deutério, menor a sua movimentação e, conseqüentemente, maior a confiabilidade no modelo proposto.

Os valores de fator de movimentação do deutério calculados para todos os experimentos realizados ficaram entre 0,00 e 0,38 (Tabela 5). Isso significa que os 56 modelos propostos de interação peptídeo-membrana nas diferentes situações, são modelos confiáveis, pois valores menores que 0,3 são considerados muito bons e de alta confiabilidade, enquanto que valores entre 0,3 e 0,4 são considerados bons. Neste sentido, 44 modelos propostos neste trabalho são considerados muito bons e de alta confiabilidade e 12 dos modelos propostos neste trabalho são considerados bons e de razoável confiabilidade. Assim, pode-se confiar nos modelos de interação peptídeo-membrana propostos nas figuras 21, 26, 31 e 36. Portanto, os valores encontrados do fator de movimentação do deutério mostrados na tabela 5 acabam validando os modelos propostos.

Isto significa que o protocolo desenvolvido no presente estudo resultou em resultados altamente confiáveis, no que se refere a movimentação do deutério para ambos os peptídeos em complexo de proteolipossomo.

Tabela 5 – Valores determinados para o “Fator de Movimentação de Deutério” (SF), para cada experimento de troca H/D realizado para os peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Proteonectarina-MP (-OH) em presença de proteolipossomos

Tempo (min)	PC		PC/Chol		PC/PG		PC/CL	
	MP -(NH ₂)	MP -(OH)	MP -(NH ₂)	MP -(OH)	MP -(NH ₂)	MP -(OH)	MP -(NH ₂)	MP -(OH)
1	0.25	0.00	0.38	0.18	0.25	0.05	0.25	0.09
3	0.35	0.23	0.32	0.24	0.38	0.08	0.24	0.21
5	0.38	0.27	0.37	0.20	0.37	0.28	0.32	0.18
10	0.32	0.20	0.25	0.30	0.10	0.30	0.37	0.07
15	0.28	0.14	0.27	0.17	0.08	0.23	0.30	0.15
30	0.31	0.07	0.34	0.22	0.32	0.17	0.29	0.17
60	0.10	0.35	0.29	0.24	0.27	0.29	0.14	0.24

5.3.4 Emissão de fluorescência do triptofano

Fluorescência do triptofano (Trp) é uma interessante ferramenta para a análise das interações de peptídeos, que apresentam esse resíduo em sua seqüência primária, com vesículas sintéticas. Como mostra a figura 37, o Trp quando excitado em 280 nm, apresenta seu máximo de emissão em 351 nm, porém, ao interagir com vesículas, a sua máxima intensidade de fluorescência tende a se deslocar para a região do azul, conforme ele vai se ancorando em regiões mais internas da membrana. Com isso, pode-se inferir sobre a interação do peptídeo em meio de vesícula.

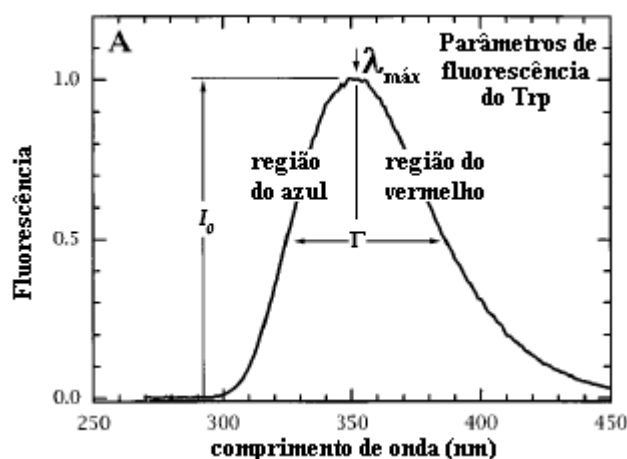


Figura 37: Parâmetros de fluorescência do triptofano que quando excitado em λ de 280 nm, apresenta emissão de $\lambda_{\text{máx}}$ de 351 nm (espectro ilustrativo adaptado de Ladokhin et al. (2000)).

Foram obtidos espectros de emissão de fluorescência para os peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) na concentração de 5×10^{-6} M em solução tampão tris/HCl e em presença de vesículas unilamelar grandes (LUVs) de fosfatidilcolina (PC) e de fosfatidilcolina/fosfatidilglicerol (PC/PG: 70/30), que mimetizam ambiente de membrana zwitteriônica e aniônica, respectivamente. Os peptídeos foram incubados em meio de vesícula a 24°C, durante 30 minutos, e então os espectros foram medidos no comprimento de onda de excitação em 280 nm. A razão peptídeo/lipídio (P/L) foi de 5/100 para todas as análises.

Foi obtido para os peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) em tampão tris/HCl o máximo de intensidade de emissão compatível com a emissão de 351nm esperada para o Trp em meio polar (LADOKHIN et al., 2000). Sobre adição de 1×10^{-4} M de vesícula, foi observada uma mudança no espectro do Trp, indicando as diferenças de interação dos peptídeos com vesículas zwitteriônicas e aniônicas.

No peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂), a intensidade de fluorescência do peptídeo em meio de lipossomo aumentou em relação ao peptídeo em solução aquosa. Essa mudança na fluorescência é característica da interação e aprofundamento do resíduo de Trp em um meio mais hidrofóbico. Em meio de PC e PC/PG, o peptídeo passou a apresentar uma emissão de 338 nm e 324 nm, com $\Delta\lambda_{\max}$ de 10nm e 25nm, respectivamente (Figuras 38 e 39). Os menores valores de λ_{\max} indicam que o Trp deve estar internalizado em um ambiente não polar. Assim, é evidente a interação desse resíduo com as vesículas, com uma maior interação em vesículas aniônicas. Esses resultados com o PC e PC/PG são compatíveis com a mudança de fluorescência observada no peptídeo Mastoparano-X, que também tem seu resíduo de Trp na terceira posição; foi observado na razão peptídeo/lipídio de 3/50, a máxima intensidade de fluorescência de 338 nm em PC e 327 nm em PC/PG (MATSUZAKI et al., 1996a).

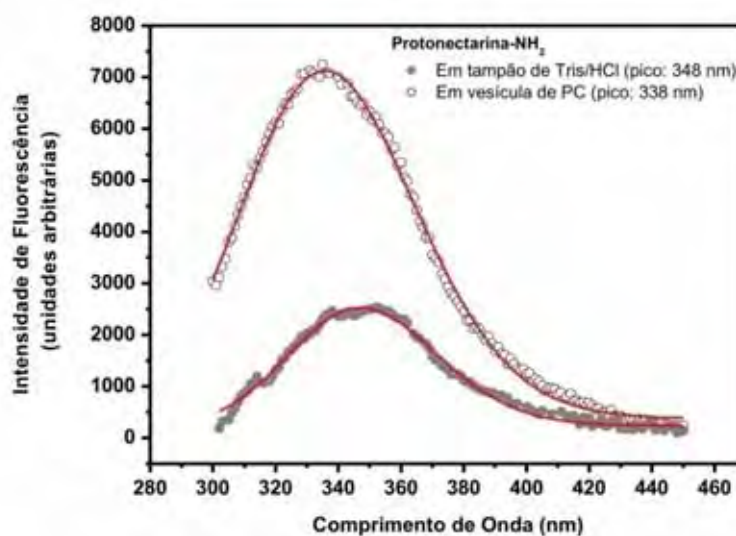


Figura 38: Intensidade de fluorescência do Trp no peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) em tampão de tris/HCl (●) e em vesícula de PC (○). As curvas sólidas em vermelho correspondem ao ajuste log-normal.

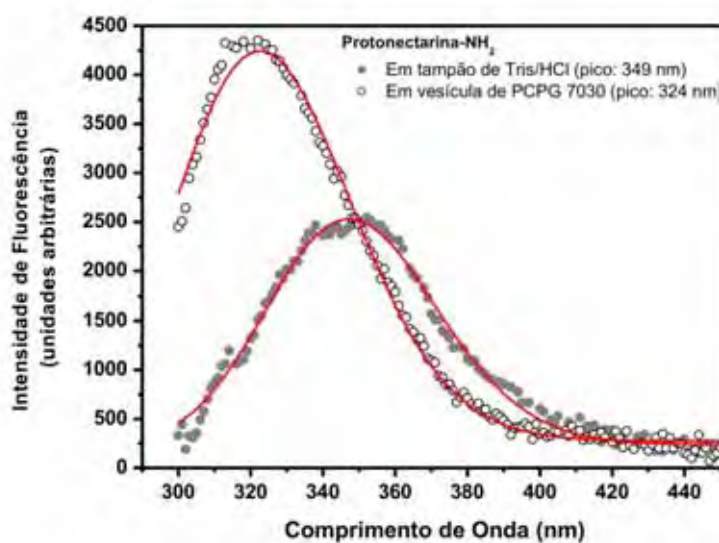


Figura 39: Intensidade de fluorescência do Trp no peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) em tampão de tris/HCl (●) e em vesícula de PCPG (70:30) (○). As curvas sólidas em vermelho correspondem ao ajuste log-normal.

Em relação ao peptídeo Protonectarina-MP (-OH), as figuras 40 e 41 mostram que a intensidade de fluorescência praticamente não variou após o acréscimo de vesículas. Além disso, o máximo de intensidade em meio de PC e PC/PG foram de 350nm e 343nm, com $\Delta\lambda_{\max}$ de 0 nm e 7 nm, respectivamente. Assim, a intensidade de fluorescência do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em meio de PC não se alterou, e em meio de PC/PG alterou, porém, menos que o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂). Essa alteração do peptídeo Protonectarina-

MP (-OH), em meio de PC/PG, com máxima ao redor de 340 nm, é compatível com a interpretação dada por Ladokhin et al. (2000) para um agregado, onde em algumas moléculas os resíduos de Trp estão expostos ao solvente, e em outras moléculas os resíduos de Trp estão enterrados na membrana.

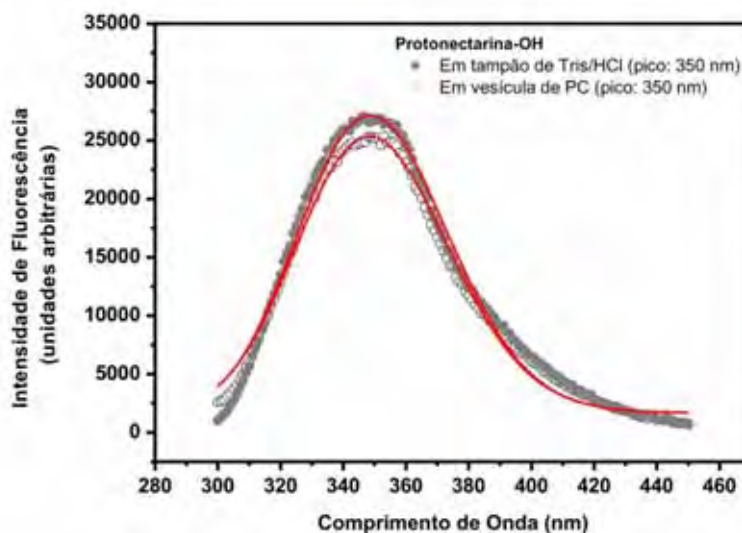


Figura 40: Intensidade de fluorescência do Trp no peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em tampão de tris/HCl (●) e em vesícula de PC (○).As curvas sólidas em vermelho correspondem ao ajuste log-normal. Por causa da não interação do Trp com membrana zwitteriônica, a adição de LUV não afetou a distribuição do espectro. A redução da intensidade na presença de LUVs é devido à perda de excitação e emissão da luz pelo espalhamento.

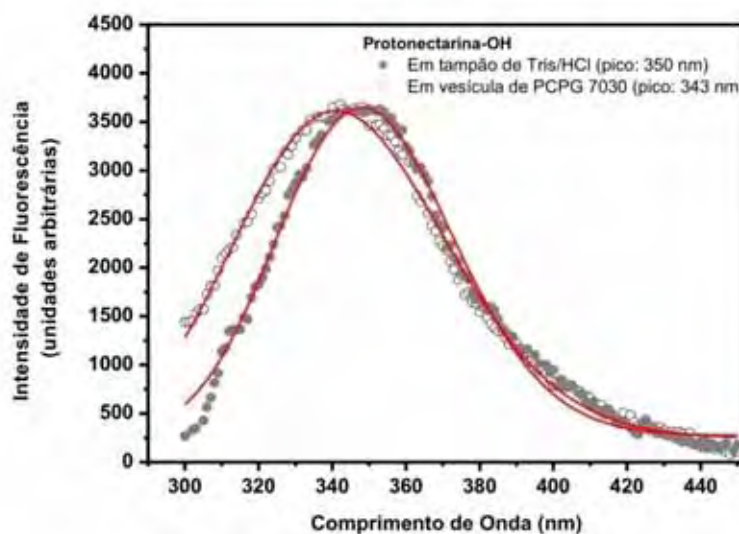


Figura 41: Intensidade de fluorescência do Trp no peptídeo Protonectarina-MP (-OH) em tampão de tris/HCl (●) e em vesícula de PC/PG (70:30) (○).As curvas sólidas em vermelho correspondem ao ajuste log-normal.

Em vesículas zwitteriônicas, os peptídeos Protonectarina-MP (-OH) e Protonectarina-MP (-NH₂) apresentaram, respectivamente, 7% e 22% de estruturação em hélice- α , o que pode ser correlacionado com $\Delta\lambda_{\max}$ de 0 nm e 10 nm, respectivamente. Em vesícula aniônica, a porcentagem de estrutura secundária dos peptídeos Protonectarina-MP (-OH) e Protonectarina-MP (-NH₂) foi maior, com 24% e 39%, respectivamente, o que condiz com maior mudança na $\Delta\lambda_{\max}$ de 7 nm e 25nm. Assim, em meio de vesícula aniônica, apesar do aumento da carga negativa provocar o aumento da $\Delta\lambda_{\max}$, ao comparar essa variação com outros meios aniônicos, o aumento da carga negativa da vesícula não aumentou significativamente a ligação do peptídeo na vesícula. Em solução micelar de SDS, o deslocamento máximo para a região de azul é de 35 nm; essas micelas apresentam alta densidade de carga negativa e a fluorescência do Trp depende da polaridade e rigidez do ambiente local (LADOKHIN et al. 2000).

Nos experimentos de troca isotópica H/D, foi observado que o Protonectarina-MP (-NH₂) em complexo de proteolipossomo de PC e PC/PG (70:30), apresentou na maior parte dos tempos analisados o seu resíduo de Trp não deuterado, ou seja, interagindo com a membrana. O peptídeo Protonectarina-MP (-OH) apresentou na maior parte do tempo de incubação, o resíduo de Trp na forma deuterada, ou seja, não interagindo com as vesículas.

Dos Santos-Cabrera et al. (2008) realizou estudos de medidas da intensidade de fluorescência do mastoparano Polybia-MPI (que apresenta o resíduo C-terminal amidado) em presença de vesículas zwitteriônicas de PC e PC/Chol (80:20), de vesículas aniônicas de PC/PG (70:30) e PC/CL (70:30). Os resultados mostram um comportamento semelhante ao observado no peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂); também foi observado menor helicoidade e interação do peptídeo com vesículas zwitteriônicas em relação às vesículas aniônicas. Porém, apenas esta aparente “preferência” não é suficiente para explicar sua seletividade por membranas aniônicas. O peptídeo MP-X também apresenta menor afinidade por vesículas de PC quando comparado às vesículas de PC/PG, com uma pequena mudança na $\Delta\lambda_{\max}$; porém, apesar disso, MP-X é um peptídeo hemolítico (MATSUZAKI et al., 1996a). Um análogo ao peptídeo Polybia-MPI com Asn² no lugar do Asp², mostrou variação na fluorescência em vesículas de PC semelhante ao observado para Polybia-MPI, porém, esta alteração no segundo resíduo torna o peptídeo hemolítico (De SOUZA, 2006).

5.3.5 Experimentos de vazamento de vesículas por fluorimetria

A permeabilização de membranas induzida pelos peptídeos foi avaliada por meio de experimentos de vazamento de vesículas nos quais a recuperação da fluorescência da sonda carboxifluoresceína foi monitorada por fluorimetria. Nestes experimentos, uma alíquota de suspensão de vesículas PC ou PC/PG (70:30), contendo em seu interior carboxifluoresceína, foi adicionada a uma solução de peptídeo, Protonectarina-MP (-NH₂) ou Protonectarina-MP (-OH), e a emissão de fluorescência em 520 nm (excitação em 490 nm) foi coletada durante 20 a 30 minutos.

As curvas de dose-resposta (% vazamento) em função da concentração de peptídeo para as vesículas de PC e PC/PG (70:30) estão representadas nas figuras 42 e 43, respectivamente. A forma sigmoidal destas curvas, obtidas para Protonectarina-MP(-NH₂) em vesículas PC e para os dois peptídeos em vesícula aniônicas PCPG, indicam um processo cooperativo, característico de peptídeos líticos. Neste processo o peptídeo acumula na superfície externa da vesícula até alcançar um valor limiar, a partir do qual o vazamento aumenta rapidamente. Em vesículas zwitteriônicas esta concentração limiar ocorre numa razão entre concentrações peptídeo por lipídeo (P/L) de 0,75/100 para Protonectarina-MP (-NH₂). A curva de dose e resposta para o peptídeo na forma ácida em PC não possui forma similar à observada para o perfil da curva obtida para o peptídeo Protonectarina-MP (-OH), o que torna difícil determinar a concentração limiar; entretanto, somente por volta da razão P/L de 45/100 é que há um ligeiro aumento no vazamento, indicando que o peptídeo na forma amidada é cerca de 60 vezes mais eficiente para dar início ao processo lítico, que o peptídeo na forma ácida. Isso sugere ainda, que Protonectarina-MP (-NH₂) tem uma afinidade muito maior pela membrana que Protonectarina-MP(-OH). O peptídeo cujo C-terminal é amidado apresentou uma razão P/L semelhante ao descrito para o peptídeo mastoparano Polybia-MPI em presença dessa mesma vesícula (dos SANTOS CABRERA et al., 2008).

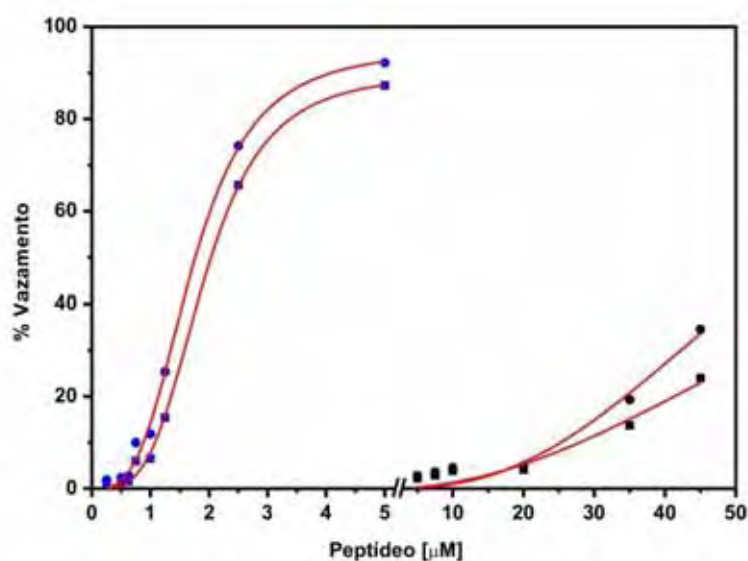


Figura 42: Curvas de dose-resposta em vesículas zwitteriônicas de PC. O percentual de vazamento do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) está apresentado para os tempos de contato de (■) 5 e (●) 10 minutos. O percentual de vazamento do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) está apresentado para os tempos de contato de (■) 5 e (●) 10 minutos. As curvas em vermelho representam o perfil obtido pela equação de Hill, com o coeficiente de correlação > 94% para peptídeo Protonectarina-MP (-OH) e > 99% para peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂).

As curvas de dose-resposta para vesículas aniônicas, mostradas na figura 43, são sigmóides, mesmo para o peptídeo na forma ácida. As concentrações limiares para dar início ao processo cooperativo foram observadas em razões P/L 2,7/100 e 3,6/100 para Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH), respectivamente. As curvas de dose-resposta encontradas para os peptídeos MP-X e Polybia-MPI em vesículas de PC/PG (70:30) apresentam razão P/L igual 1/100 (MATSUZAKI et al., 1996a) e 2,5/100 (Dos SANTOS-CABRERA et al., 2008).

Uma análise geral do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) mostra que na razão P/L de 6,5/100 em vesículas de PC/PG ocorre praticamente 100% de vazamento; porém, em vesícula de PC, essa mesma concentração provoca somente 4% de vazamento. Assim, a eficiência de permeabilização de vesículas por Protonectarina-MP (-OH) apresentou-se diretamente dependente do caráter iônico da bicamada lipídica, da mesma forma como encontrado em relação ao teor helicoidal. Já o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) não apresentou dependência do caráter iônico da bicamada lipídica, apesar da diferença encontrada no teor helicoidal entre as vesículas, ou seja, causou extravasamento de carboxifluoresceína em ambos os tipos de vesículas.

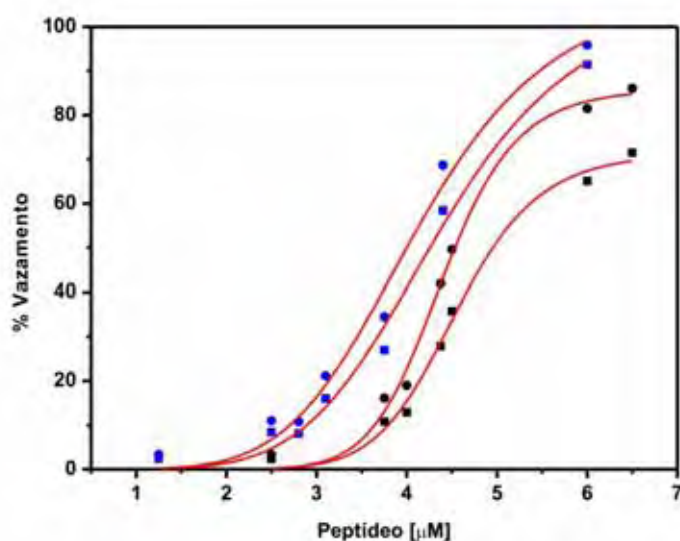


Figura 43: Curvas de dose-resposta em vesículas aniônicas de PC/PG (70:30). O percentual de vazamento do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) está apresentado para os tempos de contato de (■) 5 e (●) 10 minutos. O percentual de vazamento do peptídeo Protonectarina-MP (-OH) está apresentado para os tempos de contato de (■) 5 e (●) 10 minutos. As curvas em vermelho representam o perfil obtido pela equação de Hill, com o coeficiente de correlação > 99% para peptídeo Protonectarina-MP (-OH) e > 98% para peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂).

Ambos os peptídeos apresentaram uma dependência da relação P/L e também se observou uma dependência sigmoidal da curva de dose-resposta (% vazamento) em função da concentração de peptídeo (figura 42 e 43). Isso fica evidente ao se analisar os valores de coeficiente de Hill (n) encontrados para cada peptídeo, nos diferentes tempos e composições de vesículas (tabela 6).

A forma sigmoidal é característica de processo cooperativo positivo e mostra a existência de uma concentração crítica de peptídeo, necessária à indução de vazamento das vesículas. Comportamento semelhante foi observado para peptídeos que formam poro toroidal em vesículas de PC/PG (70:30), como mastoparano MP-X (MATSUZAKI et al., 1996a) e em vesículas zwitteriônicas para a melitina (YANG et al., 2001). Além disso, os mecanismos de formação de poros do tipo “carpete” (OREN; SHAI, 1998) e poro toroidal (HUANG, 2000) que explicam mecanismos de ação da maioria dos peptídeos antimicrobianos, supõem o acúmulo de moléculas do peptídeo na superfície da membrana para que ocorra o início do processo lítico.

Em uma tentativa de entender melhor o processo cooperativo de vazamento, utilizou-se a equação proposta por Hill em 1910 (NELSON; COX, 2004) para descrever este tipo de processo. A equação de Hill pode ser escrita da seguinte maneira:

$$V = \frac{S^n}{S_{50}^n + S^n}$$

Reorganizando a equação, e aplicando log em ambos os lados, a equação pode ser escrita da seguinte maneira:

$$\frac{V}{1 - V} = \frac{S^n}{S_{50}^n}$$

$$\log \left(\frac{V}{1 - V} \right) = n \log S - n \log S_{50}$$

onde V representa o vazamento da vesícula na concentração S de peptídeo; S_{50} , representa a concentração de peptídeo para se alcançar a metade de V_{max} ; n é o coeficiente de Hill, que é uma medida do grau de cooperatividade (ou sigmóidicidade): quando $n = 1$ a equação acima fica simplificada e se torna igual à equação de Michaelis-Menten (ausência de cooperatividade), caracterizada por uma cinética hipérbolica; quando $n > 1$, a cooperatividade é positiva e descreve uma sigmóide, sendo que o n aumenta conforme aumenta o grau de cooperatividade; $n < 1$, a cooperatividade é negativa. Como ainda não existe um modelo de mecanismo comprovado para o caso da interação peptídeo/vesícula, tal como existe para muitas enzimas, só se pode dizer que quando o $n > 1$ o sistema é cooperativo. As curvas contínuas nas fig. 42 e 43 são ajustes utilizando a equação de Hill. Os valores de n obtidos nestes ajustes estão mostrados na tabela 6.

Esta tabela mostra um dado muito interessante a respeito do fenômeno cooperativo: os coeficientes de Hill (n) determinados para o extravasamento de vesículas de PC/PG são significativamente maiores que aqueles determinados para extravasamento de vesículas de PC. Além disso, também se deve salientar que a despeito de o peptídeo Protonectarina-MP (-OH) apresentar menor afinidade pelas membranas que seu análogo com o resíduo C-terminal amidado, uma vez alcançada a concentração crítica em vesículas de PC/PG, o processo se torna altamente cooperativo, com valores de coeficientes de Hill próximos a 10,0.

Tabela 6: Os valores de n encontrados no ajuste segundo a equação de Hill para os peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) nas vesículas de PC e PC/PG (70:30) nos tempos de 5 e 10 minutos. Observa-se que todos os valores são maiores que um, evidenciando uma cooperatividade positiva.

	Tempo (minuto)	Valores de n	
		Protonectarina-MP (-OH)	Protonectarina-MP (-NH ₂)
PC	5	2,0 ± 0,4	3,6 ± 0,2
	10	2,6 ± 0,5	3,2 ± 0,2
PC/PG	5	9,9 ± 1,6	5,5 ± 0,9
	10	10,7 ± 1,5	5,4 ± 0,9

5.4 Ensaios de Atividade Biológica

Foram realizados ensaios de atividade biológica com os peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH). As atividades testadas foram: hemólise; desgranulação de mastócitos; medida da liberação da enzima lactato desidrogenase do citoplasma de mastócitos e antibiose.

5.4.1 Atividade hemolítica

Para o ensaio de atividade hemolítica foi testado os peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH), variando a concentração de $6,1 \times 10^{-7}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M. Como padrão, utilizou-se a Melitina, principal componente tóxico no veneno de *Apis mellifera*, potente causador de hemólise em eritrócitos. A melitina é um peptídeo catiônico composto por 26 resíduos de aminoácidos cuja região amino-terminal é predominantemente hidrofóbica e a região carboxil-terminal é hidrofílica devido à presença de aminoácidos com cargas positivas. Essa propriedade anfipática da melitina resultou na sua utilização em estudos de interação peptídeo-membrana, sendo um dos peptídeos mais estudados (RAGHURAMAN; CHATTOPADHYAY, 2007).

Os resultados do ensaio foram expressos em porcentagem, sendo os valores obtidos a partir da comparação com o controle de 100% de hemólise. A figura 44 mostra a atividade hemolítica em função da concentração dos peptídeos estudados.

A Melitina mostrou ser altamente hemolítica, com aproximadamente 50% de hemólise na concentração mais baixa ($6,1 \times 10^{-7}$ M), com 100% de hemólise na concentração de $1,9 \times 10^{-5}$ M. Porém, nessas mesmas concentrações os outros dois peptídeos não apresentaram atividade hemolítica.

Observa-se que o peptídeo Protonectarina-MP na forma amidada começa a apresentar alguma atividade hemolítica a partir da concentração de $3,9 \times 10^{-5}$ M, com hemólise de 18,68% dos eritrócitos, atingindo 67,93% de hemólise na concentração de $3,1 \times 10^{-4}$ M. Entretanto, o mesmo peptídeo na forma ácida não apresentou atividade hemolítica, atingindo 1,63% de hemólise na concentração mais elevada. Assim, quando o resíduo C-terminal está na forma ácida, o peptídeo fica com a atividade hemolítica muito reduzida.

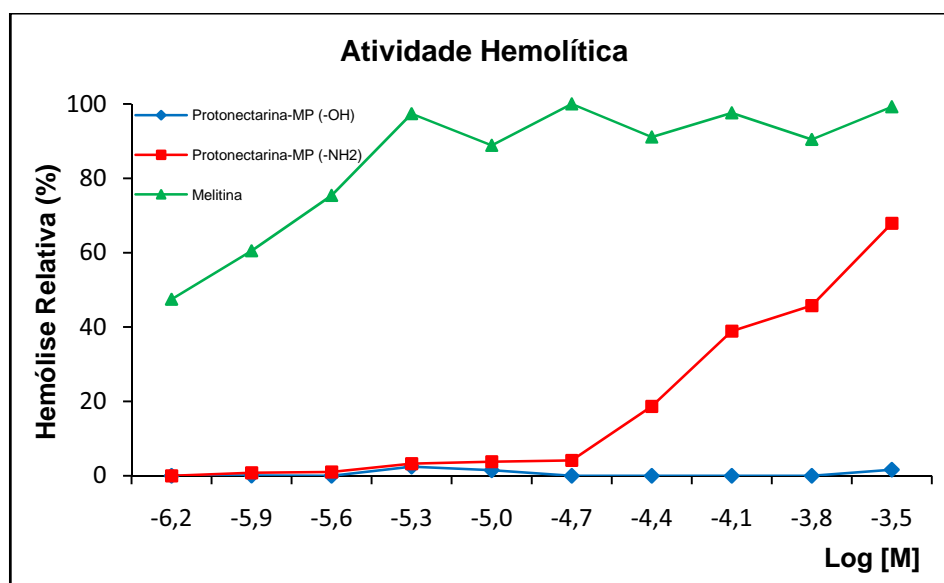


Figura 44: Atividade hemolítica dos peptídeos Protonectarina-MP (-OH) (azul), Protonectarina-MP(-NH₂) (vermelho) e Melitina (verde) em dez diferentes concentrações, variando de $6,1 \times 10^{-7}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M.

Dessa forma, este resultado sugere que a amidação do terminal-C é importante para a atividade hemolítica do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂), e que o peptídeo na forma ácida não apresenta esta atividade.

5.4.2 Ensaio de desgranulação de mastócitos

Para o ensaio de desgranulação de mastócitos utilizou-se mastócitos peritoniais de ratos *Wistar*. Os peptídeos foram testados em doze diferentes concentrações, variando de $1,5 \times 10^{-7}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M. Os resultados foram expressos em porcentagem de desgranulação. O tetradecapeptídeo HR-II, um mastoparano isolado do veneno de vespa *Vespa orientalis* foi usado como padrão, pois esse peptídeo tem sido mencionado na literatura como referência em termos de desgranulação de mastócitos e liberação de histamina (TUICHIBAEV et al., 1988).

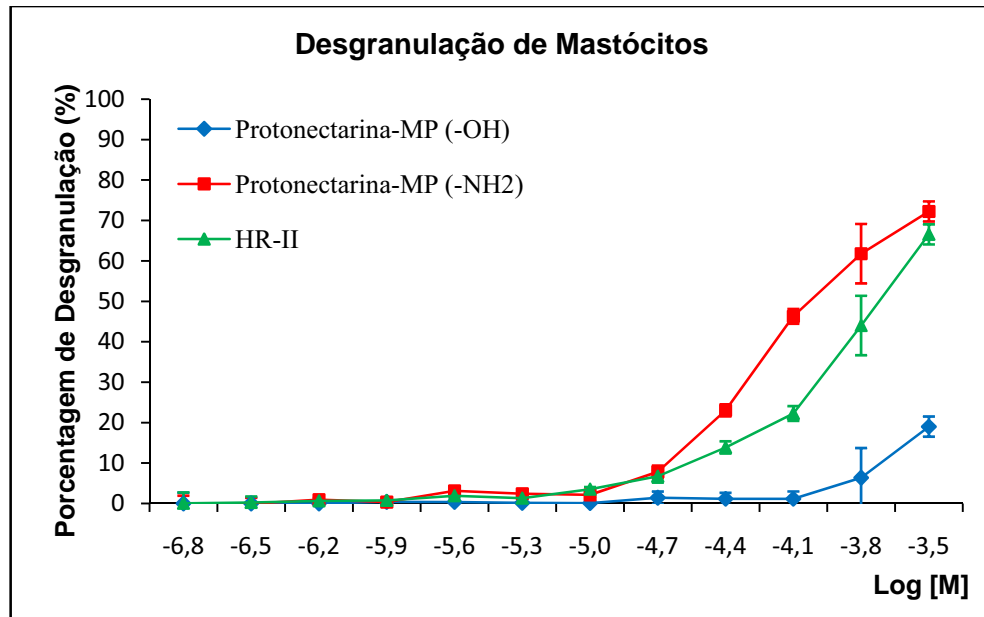


Figura 45: Atividade desgranuladora de mastócitos peritonias de ratos Wistar dos peptídeos Protonectarina-MP (-OH) (azul), Protonectarina-MP (-NH₂) (vermelho) e HR-II (verde) em doze diferentes concentrações, variando de $1,5 \times 10^{-7}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M.

A figura 45 mostra a porcentagem de desgranulação de mastócitos peritonias em função das concentrações dos peptídeos. Na concentração de $3,9 \times 10^{-5}$ M, o peptídeo Protonectarina-MP(-NH₂) e o padrão (HR-II) apresentaram atividade de 23,05% e 13,88% de desgranulação, respectivamente; estes peptídeos alcançaram 72,23% e 66,54%, respectivamente, na concentração de $3,1 \times 10^{-4}$ M. Assim, o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) apresentou uma atividade de desgranulação mais intensa que o próprio peptídeo padrão. Enquanto isso, Protonectarina-MP (-OH) apresentou uma baixa atividade, com somente 19,02% de desgranulação na maior concentração.

Portanto, o peptídeo HR-II e o Protonectarina-MP (-NH₂) apresentaram atividade degranuladora de mastócitos peritonias, enquanto que essa atividade diminuiu consideravelmente no peptídeo Protonectarina-MP (-OH).

5.4.3 Medida da liberação da enzima lactato desidrogenase do citoplasma de mastócitos

Os mastoparanos podem interagir com mastócitos e causar atividade degranuladora através de duas formas distintas: i) interagindo com receptores acoplados às proteínas-G (GPCRs) localizados na membrana celular dos mastócitos e, conseqüentemente, ativando o processo de exocitose dessas células (FERRY et al, 2001); ii) esses peptídeos podem simplesmente interagir diretamente com a membrana celular, causando uma

desestabilização estrutural e, conseqüentemente, a lise destas células, com o extravasamento de todo o conteúdo citoplasmático (RAGHURAMAN; CHATTOPADHYAY, 2007).

Com o extravasamento do conteúdo citoplasmático, moléculas biológicas, até então, encontradas somente no citoplasma dos mastócitos, passam a ser encontradas na solução extracelular. Uma das moléculas biológicas é a enzima lactato desidrogenase (LDH), exclusiva do citoplasma, responsável por catalisar a redução do piruvato por NADH, obtendo como produto o NAD^+ . A presença extracelular de LDH é um indicador de lise dos mastócitos, ocasionada por peptídeos líticos. A cinética desta enzima pode ser determinada a partir da velocidade de consumo de NADH, medido em espectrofotômetro com o comprimento de onda a 340nm.

Assim, a atividade de lactato desidrogenase foi medida a partir do meio extracelular, utilizado para a suspensão de mastócitos, após a incubação com os mastoparans para medida da atividade de desgranulação. A medida da atividade de LDH foi realizada com o Kit UV LDH (BIOBRÁS DIAGNÓSTICOS).

Os peptídeos Protonectarina-MP (-OH), Protonectarina-MP ($-\text{NH}_2$) e o peptídeo padrão HR-II tiveram suas atividades medidas em cinco diferentes concentrações, variando de $1,2 \times 10^{-6}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M. A liberação de LDH do citoplasma dos mastócitos, em função da concentração de cada um dos peptídeos são mostradas na figura 46.

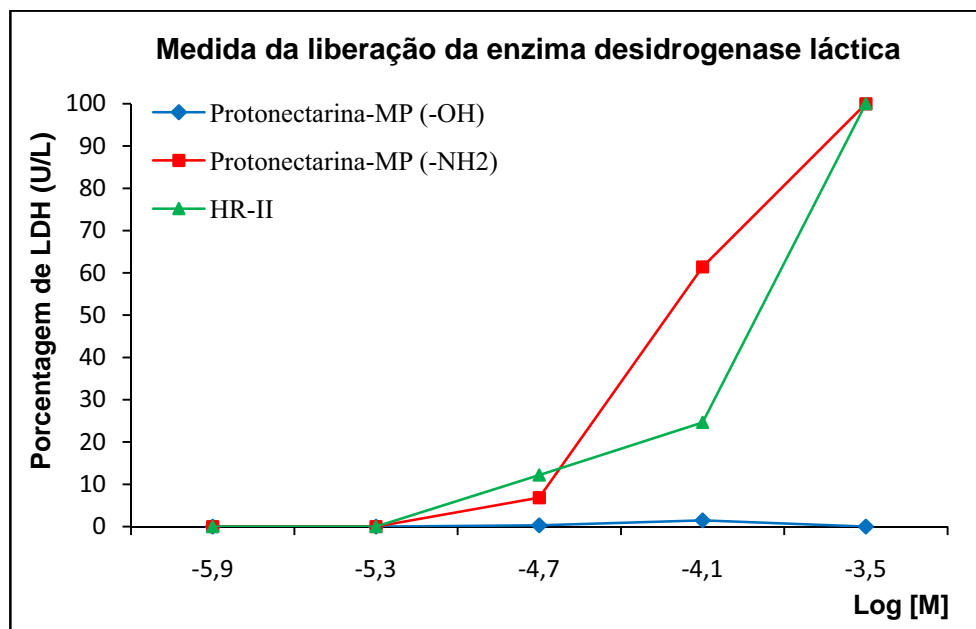


Figura 46: Atividade de LDH dos peptídeos Protonectarina-MP(-OH) (azul), Protonectarina-MP ($-\text{NH}_2$) (vermelho) e HR-II (verde) em cinco concentrações diferentes, variando de $1,2 \times 10^{-6}$ a $3,1 \times 10^{-4}$ M.

O peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) e o padrão HR-II apresentaram 100% de atividade de liberação de LDH na concentração 3,1 x 10⁻⁴ M; esta atividade é superior aos 72,23% e 66,54% de desgranulação de mastócitos, respectivamente, encontrados para estes peptídeos na mesma concentração. Já o peptídeo Protonectarina-MP (-OH), na mesma concentração, não apresentou atividade de liberação de LDH, enquanto que na atividade de desgranulação, apresentou 19,02% de atividade.

A partir da análise dos dados, pode-se concluir que o peptídeo padrão HR-II e Protonectarina-MP (-NH₂) atuam nas células de mastócitos através de interações com a membrana plasmática, desestabilizando-a ao ponto de causar a lise das células, promovendo, então, a liberação de LDH citoplasmática. Entretanto, o fato de Protonectarina-MP (-OH) não ser lítico, ou seja, não causar liberação de LDH, porém causar uma pequena desgranulação de mastócitos, indica que provavelmente este peptídeo interage fracamente com GPCRs na membrana plasmática de mastócitos, induzindo uma pequena atividade de exocitose dos grânulos.

5.4.4 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) foram testadas, determinando-se os valores de concentração mínima inibitória (MIC) de cada um deles. Os peptídeos foram testados na concentração de 0,24 a 500 µg/mL (1,5 x 10⁻⁷ a 3,1 x 10⁻⁴ M). Os resultados obtidos nos ensaios de antibiose foram expressos em µg/mL e são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de concentração inibitória mínima (MIC) expressos em µg/mL, para os peptídeos e para o padrão do experimento (Oxitetraciclina), frente à bactérias Gram+ e Gram-.

Peptídeos	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			
	Gram- negativa		Gram- positiva	
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
Protonectarina-MP (-OH)	62,5	> 500,0	250,0	62,5
Protonectarina-MP (-NH ₂)	7,8	62,5	15,6	7,8
Oxitetraciclina	1,0	3,9	< 0,2	1,0
Anoplin ¹	50,0	20,0	5,0	20,0
Crabrolina ²	150,0	> 500,0	> 500,0	75,0
EMP-AF ³	50,0	20,0	5,0	> 500,0
Mastoparano-M ⁴	12,5	12,5	6,2	> 500,0

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

Os valores de MIC observados indicam que o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) apresentou alguma atividade antibiótica, tanto para bactérias Gram+ como Gram-. Entretanto, apresentou todos os valores de MIC superiores ao padrão (Oxitetraciclina). Já o peptídeo Protonectarina-MP (-OH) apresentou os maiores valores de MIC, além disso, em nenhuma concentração testada conseguiu inibir a bactéria *P. aeruginosa*. Portanto, a amidação do resíduo C-terminal parece ser importante para a atividade antibiótica de Protonectarina-MP.

Ao fazer-se uma comparação entre os peptídeos citados da literatura e os aqui testados, observa-se que de maneira geral, o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) pode ser considerado um promissor modelo estrutural para o desenvolvimento de antibiótico, pois apresentam valores de MIC inferiores à maioria daqueles observados para seus equivalentes da literatura. O mesmo não pode ser dito do peptídeo Protonectarina-MP (-OH), que no geral apresentou valores de MIC superiores aos demais peptídeos da literatura.

Considerando-se que as membranas bacterianas são aniônicas de uma maneira geral, parece que a amidação do resíduo C-terminal é importante para promover a interação de Protonectarina-MP (-NH₂) com tais membranas. Os resultados acima indicam que Protonectarina-MP (-NH₂) deve interagir mais intensamente com as membranas de bactérias Gram-positivas que com as Gram-negativas.

6. CONCLUSÕES

Foram realizados experimentos para analisar características estruturais dos peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Protonectarina-MP (-OH) em solução e em interação com sistemas membrano-miméticos. As técnicas utilizadas foram dicroísmo circular, modelagem molecular e troca isotópica H/D em solução e em presença de suspensões de vesículas de PC, PC/PG, PC/CL e PC/Chol.

Os resultados mostram que o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) apresentou, em todos os meios estudados, uma maior organização da estrutura secundária em relação ao peptídeo Protonectarina-MP (-OH). Os maiores valores de porcentagens de estruturas em hélice- α foram observados em meios contendo TFE ou SDS. Além disso, em proteolipossomos com vesículas aniônicas (PC/PG e PC/CL) os peptídeos apresentaram uma porcentagem de hélice- α superior àquele observado na forma de proteolipossomos com vesículas zwitteriônicas (PC e PC/Chol). A presença de fosfolipídios aniônicos nas vesículas aumenta a interação eletrostática de peptídeos positivamente carregados com as membranas destas vesículas, além de permitir uma penetração mais profunda do peptídeo na membrana.

A simulação do modelo tridimensional dos peptídeos foi feito através da modelagem molecular por homologia. Ambos os modelos foram considerados estereoquimicamente possíveis, e como os resultados observados nas análises de dicroísmo circular; os peptídeos apresentaram uma estruturação em hélice- α anfipática, que é conhecida por facilitar a interação de peptídeos com membranas. Porém, não foram observadas grandes diferenças entre as estruturas modeladas para o peptídeo apresentando o resíduo C-terminal na forma ácida, em relação ao seu análogo com tal resíduo na forma amidada; o ideal seria a realização de estudos de dinâmica molecular para uma maior compreensão da estabilidade conformacional desses peptídeos, o que não foi realizado no presente estudo.

A interação dos peptídeos Protonectarina-MP (-NH₂) e Proteonectarina-MP (-OH) em concentrações líticas, baseado nas concentrações encontradas nos ensaios de atividade hemolítica, na forma de proteolipossomos com sistemas membrano-miméticos foi estudado através da troca isotópica H/D, monitorada por ESI-MS. Pode-se observar que ambos os peptídeos apresentam movimentação em paralelo à superfície das membranas, não chegando a se internalizar completamente na camada lipídica. A técnica de ESI-MS da forma como foi utilizada, não permitiu observar a formação de poros, porque aparentemente este processo é muito rápido em relação à velocidade de análise de massas. Portanto, os peptídeos interagem

com a membrana através da intensa movimentação de entrada e de saída dos resíduos de aminoácidos na região hidrofóbica das membranas, ao longo do tempo; e essa alternância de penetração e saída da membrana, provavelmente deve ocasionar uma perturbação estrutural suficientemente forte para desestabilizar e despermeabilizar parcialmente a membrana. Isso fica evidente ao corroborar as informações da troca H/D e do dicroísmo circular com os resultados observados na atividade biológica e atividade lítica em vesículas.

Foram analisadas a despermeabilização dos peptídeos em vesículas de PC e PC/PG contendo o corante carboxifluoresceína, através de medidas de espectrofluorimetria. Ambas as formas do peptídeo apresentaram dependência da relação L/P e uma curva dose-resposta sigmóide, característica de processos de cooperatividade positiva. Isso sugere que esses peptídeos se acumulam na superfície da vesícula, onde se movimentam intensamente (como se estivessem rolando nesta superfície, em torno de um eixo longitudinal horizontal); esta movimentação, provavelmente permite que as moléculas do peptídeo interajam entre si, até atingir uma concentração crítica, quando tal interação se torna cooperativa, e leva à formação de poros e o conseqüente extravasamento da vesícula. O acúmulo de peptídeos na superfície da vesícula é uma característica importante do modelo proposto por Matsuzaki, Shai e Huang (MATSUZAKI, 1999; OREN; SHAI, 1998; HUANG, 2000) para explicar o mecanismo de ação de peptídeos que formam poros.

Espectros de fluorescência de Trp obtidos para o Protonectarina-MP (-NH₂) em ausência e presença de vesículas de PC e PC/PG indicam uma penetração do resíduo de Trp na membrana, devido ao aumento da intensidade e o deslocamento de banda para a região do azul, especialmente em vesículas de PC/PG. O mesmo não foi observado para o peptídeo Protonectarina-MP (-OH), o que condiz com a sua falta de atividade biológica, especialmente a atividade hemolítica. O peptídeo MP-B que é hemolítico, penetra no núcleo hidrofóbico de vesícula DPPC, deslocando a fluorescência do resíduo de Trp para menor comprimento de onda (PARK et al., 1995). Essa diferença de interação do resíduo de Trp com a membrana, encontrada entre as duas formas do peptídeo, pode ser atribuída à diferença de cargas, já que o peptídeo com o resíduo C-terminal amidado apresenta uma carga positiva a mais que seu análogo. Segundo Dathe et al. (2001) existe uma relação direta entre o aumento do número de cargas positivas (dentro de certos limites) e o aparecimento de atividade hemolítica.

Nos ensaios de atividades biológicas foi observado que o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) atua em eritrócitos e mastócitos de ratos, causando a liberação parcial do conteúdo citoplasmático destas células. Portanto, provavelmente, o modo de ação do peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) é ocasionado pela movimentação de entrada e saída de seus

resíduos na membrana, que de certa maneira deve favorecer o acúmulo de moléculas do peptídeo no meio hidrofóbico, levando à formação de poros e, conseqüentemente, o extravasamento do conteúdo citoplasmático. O peptídeo Protonectarina-MP (-OH) aparentemente tem atividade biológica mais reduzida em relação ao seu análogo amidado, porque interage menos intensamente com as membranas e/ou sistema membrano-miméticos. Provavelmente, isto decorre de uma menor organização estrutural deste peptídeo, em função da perturbação causada pela carga negativa da carboxila C-terminal ionizado, conforme já relatado por Sforza et al., (2004) para outro mastoparano.

Em relação à atividade antibiótica, ambos os peptídeos apresentaram os valores de MIC superior ao padrão (Oxitetraciclina). Porém, o peptídeo Protonectarina-MP (-NH₂) apresentou atividade antibiótica contra todas as bactérias testadas, com valores de MIC mais reduzidos que aqueles observados para Protonectarina-MP (-OH). Corroborando tais resultados com o observado nos experimentos de troca H/D e CD em vesículas aniônicas, fica claro que a maior interação de Protonectarina-MP (-NH₂) com a região hidrofóbica das membranas, em relação ao Protonectarina-MP (-OH), deve ser um dos fatores responsáveis pela maior atividade antimicrobiana do primeiro.

Os dados obtidos indicam que ambos os peptídeos têm afinidade tanto por membranas neutras, como aniônicas, e, portanto, podem interagir com membranas de células eucariontes e bacterianas. Os modelos de interação peptídeos-membrana conhecidos atualmente, trabalham com hipóteses de formação de poros relativamente grandes, e apesar de transitórios, são de longa duração (da ordem de segundos) (MATSUZAKI, 1999; SHAY, 1999; HUANG, 2000); por exemplo: o peptídeo alamethicina que forma poros do tipo barril e que são compostos por oito monômeros e apresentam o raio (R_p) de cerca de 20Å (HUANG, 2006). Já a melitina que se orienta em perpendicular a membrana para a formação de poros, apresenta diversos estudos sobre a estrutura e função de seus poros e os resultados mostram que a melitina forma poros com ampla distribuição de tamanhos, por exemplo, 13-24 Å (MATSUZAKI et al., 1997) e 25-30 Å (LADOKHIN et al., 1997). O diâmetro desses poros aumenta conforme aumenta a concentração de peptídeo. Por outro lado, foi mostrado que o diâmetro de poros induzido pela melitina é de 44 Å, e curiosamente foi independente da concentração (YANG et al., 2001). Em resumo, estima-se que os peptídeos melitina, magainina e protegrina apresentam normalmente dimensão R_p em torno de 35-42 Å, estimando 4-7 monômeros de peptídeos para formação do poro.

O peptídeo policatiônico antimicrobiano Eumenitin, isolado do veneno da vespa solitária *Eumenes rubronotatus*, apresenta a formação de poros menores e de curta duração,

com diâmetro aproximado de 4.3 Å em membrana zwitteriônica de DPhPC e entre 8.5 e 9.8 Å em membrana aniônica de azolectina (ARCISIO-MIRANDA et al., 2008). O decapeptídeo antimicrobiano Anoplin, isolado do veneno da vespa *Anoplius samariensis*, também apresenta a formação de poros pequenos, com diâmetro estimado de 0.5 - 0.6 nm, de duração 0.045 ± 0.006 a 0.039 ± 0.016 segundos (Dos SANTOS-CABRERA et al., 2007). Esses trabalhos apresentaram uma série de evidências de que mastoparanos podem formar poros transitórios, que permitem a liberação de parte do conteúdo de células e/ou vesículas. Tais poros podem se formar e se desfazer em frações de segundos, de maneira que os mesmos não podem ser detectados por técnicas analíticas baseadas em espectrometria de massas, que exigem que os fenômenos ocorram em escalas de tempo de meia vida da ordem de pelo menos 90 segundos. Além disso, através de técnicas como o extravasamento não é possível medir tamanho e o tempo de formação de poros e nem inferir se são formados muitos poros de curta duração ou poucos poros de duração maior.

Contudo, a movimentação dos peptídeos observada nas superfícies das vesículas durante os experimentos de troca H/D, aparentemente indicam que esses peptídeos podem apresentar um mecanismo de ação semelhante ao do carpete, com a formação de poros, porém, com sutis diferenças em relação a este modelo, já que foi observado uma intensa dinâmica conformacional dos peptídeos que deslizam na superfície da membrana, parcialmente mergulhados na bicamada lipídica. Tal movimentação deve provocar uma série de perturbações, que podem levar a um desarranjo estrutural das cabeças dos fosfolipídios, formando poros transitórios de curta duração, que conseqüentemente, causam o extravasamento do conteúdo das vesículas. Se estes poros têm as mesmas características estruturais daqueles poros originalmente descritos nos modelos clássicos de interação entre peptídeos antimicrobianos e membranas aniônicas, ainda não sabemos. As evidências produzidas no presente trabalho, somadas aos resultados recentemente descritos em literatura para os mastoparanos, indicam que esta família de peptídeos segue o modelo geral de formação de poros, baseados no modelo do carpete, porém com algumas características próprias, diferentes daquelas já conhecidas para o modelo clássico, tais como: tamanho muito reduzido, de curtíssima duração, de arquitetura molecular ainda desconhecida. O presente estudo contribuiu com a geração de conhecimentos sobre a forma de interação de pequenos peptídeos policatiônicos, de natureza anfipática, com diferentes tipos de membranas naturais e sintéticas (membrano-miméticas), com foco principalmente na orientação que a molécula do peptídeo assume, em relação à superfície da membrana, durante um período de tempo de

incubação. Provavelmente, o mecanismo de ação deste tipo de peptídeos deverá ser um sub-tipo do modelo do carpete.

Portanto, apesar da interação de ambos os peptídeos em membranas zwitteriônicas e aniônicas, o peptídeo com o C-terminal amidado apresenta uma maior interação peptídeo-membrana, que provavelmente se deve a sua maior estabilidade estrutural e que, conseqüentemente, potencializa sua atividade biológica, especialmente antimicrobiana. Isso demonstra a importância dessa modificação pós-traducional para a atividade de peptídeos com essas características, que podem, futuramente, tornarem-se modelos racionais para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas.

Além disso, a principal contribuição desse estudo foi a de melhorar o entendimento do mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos até então descrito na literatura, através do acréscimo de uma visão dinâmica na interação dos peptídeos com a superfície das membranas. Aparentemente, os peptídeos estudados interagem com as membranas, através do mecanismo de ação no modelo do “carpete”; isso justifica o fato de os peptídeos se alinharem paralelamente a superfície das membranas, entretanto, os resultados do presente trabalho acrescentam a este mecanismo a observação de que isto ocorre com intensa movimentação, provocando um desarranjo estrutural dos fosfolipídios, que leva a um aumento da permeabilidade da membrana e eventualmente a ruptura da mesma. Além disso, se for considerada a observação de que os peptídeos se associam de forma cooperativa ao alcançarem uma concentração crítica, levando à ocorrência de vazamento das vesículas, pode-se especular que a intensa movimentação dos peptídeos na superfície das membranas, propicia condições de os mesmos se agregarem transitoriamente, formando pequenos poros transientes, de curta duração.

Dessa forma, o presente trabalho aumentou a compreensão sobre as interações de peptídeos mastoparano-membrana, o que certamente contribuirá para o desenvolvimento de “compostos-modelos” para novas drogas antimicrobianas, contra patógenos resistentes aos antibióticos convencionais, que possam ser racionalmente inspirados à partir de mastoparanos.

7 REFERÊNCIAS

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

ANDERSEN, O. S.; KOEPPE, R. E. Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, Palo Alto, v. 36, p. 107–130, 2007.

ARCISIO-MIRANDA, M.; SANTOS CABRERA, M. P.; KONNO, K.; RANGEL, M.; PROCOPIO, J. Effects of the cationic antimicrobial peptide eumenitin from the venom of solitary wasp *Eumenes rubronotatus* in planar lipid bilayers: Surface charge and pore formation activity. **Toxicon**, New York, v. 51, p. 736–745, 2008.

BECHINGER, B. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1462, p. 157-183, 1999.

CASTRO FF, PALMA MS, BROCHETTO-BRAGA MR, MALASPINA O, LAZARETTI J, BALDO MA, ANTILA MA, ZUPPI LJ, CROCE J, COSSERMELLI W. Biochemical properties and study of antigenic cross-reactivity between africanized honey bee and wasp venom. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 4, n. 1, p. 37-41, 1994.

CHEN, F. Y.; LEE, M. T.; HUANG, H. W. Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on Alamethicin. **Biophysical Journal**, New York, v. 82, p. 908-914, 2002.

COSTA, S. T. B. **Estudos Conformacionais por Dinâmica Molecular de Peptídeo Antimicrobianos da Família dos Mastoporanos em Mistura de TFE-água**. Sao Jose do Rio Preto, 2006, 133p. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular). – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho.

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. **Biometals**, London, v. 16, p. 321-9, 2003.

DATHE, M. et al. Optimization of the antimicrobial activity of Magainin peptides by modification of charge. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 501, p. 146-150, 2001.

De SOUZA, B. M. **Estrutura e função de mastoparanos dos venenos de vespas**. Rio Claro, 2006.115p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociencias de Rio Claro-SP, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho.

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*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, New Jersey, v. 18: p. 1095 – 1102, 2004.

De SOUZA, B.M.; PALMA, M.S. Monitoring the positioning of short polycationic peptides in model lipid bilayers by combining hydrogen/deuterium exchange and electrospray ionization mass spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1778, p. 2797–2805, 2008.

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

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin as a food preservative. **Food Australia**, North Sydney, v. 57, p. 525–527, 2005.

DEMMERS, J. A. A.; RIJKERS, D. T. S.; HAVERKAMP, J.; KILLIAN, J. A.; HECK, A. J. R. Factors affecting gas-phase deuterium scrambling in peptide ions and their implications for protein structure determination. **Journal American Chemical Society**, Easton, v. 124, p. 11191–11198, 2002.

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 hydrogenydeuterium exchange

kinetics of transmembrane peptides in lipid bilayers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, n. 7, p. 3189-3194, 2000.

Dos 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.

Dos 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 mastoprn: a new antimicrobial peptide from wasp venom. **Journal of Peptide Science**, Copenhagen, v. 64, n.3, p. 95-103, 2004.

Dos SANTOS-CABRERA, M. P.; ARCISIO-MIRANDA, M.; COSTA, S. T. B.; KONNO, K.; RUGGIERO, J. R.; PROCOPIO, J.; NETO, J. R. Study of the mechanism of action of anoplin, a helical antimicrobial decapeptide with ion channel-like activity, and the role of the amidated C-terminus. **Journal of Peptide Science**, Copenhagen, v. 14, p. 661 – 669, 2007.

Dos SANTOS-CABRERA, M. P.; COSTA, S. T. B.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; RUGGIERO, J. R.; NETO, J. R. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. **European Biophysics Journal**, New York, v. 37, p. 879–891, 2008.

DOWHAN, W. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 66, p. 199-232, 1997.

ESHER S.H.; CASTRO, A.P.B; CROCE, J; PALMA, M.S; MALASPINA, O; KALIL J.E; CASTRO, F.F.M. Study of laboratorial methods for Hymenoptera allergy diagnosis: A critical analysis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Saint Louis, v.107, n.2, p.375, 2001.

FERRY, X.; EICHWALD, V.; DAEFFLER, L.; LANDRY, Y. Activation of $\beta\gamma$ subunits og Gi2 and Gi3 proteins by basic secretagogues induces exocytosis through phospholipases C β

and arachidonate release through phospholipases C γ in mast cells. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.167, p.4805-4813, 2001.

HANCOCK, R. E. Peptide antibiotics. **Lancet**, New York, v. 349, p. 418-422, 1997.

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 Ca²⁺ and guanine nucleotides: an all-or-none event. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.123, n.3, p.585-93, 1993.

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*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 27, p. 1942–1944, 1979.

HOFFMAN, D.R. Hymenoptera Venom Allergens. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, Baltimore, v.30, p. 109-128, 2006.

HÖLTJE, H. D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. **Introduction to comparative protein modeling**. In Molecular Modeling: Basic Principles and Applications. Weinheim: Wiley-VCH, 2003.

HORI, Y. et al. Interaction of mastoparan with membranes studied by 1H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state 2H-NMR spectroscopy in oriented lipid. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 268, p. 3029, 2001.

HUANG, H. W. Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model. **Biochemistry**, Washington, v. 39, n. 29, p. 8347-8352, 2000.

HUANG, H. W. Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity. **Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, New York, v. 1758, p. 1292–1302, 2006.

HUMPHREY, W. F.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. *VMD* { Visual Molecular Dynamics, **Journal of Molecular Graphics**, Guildford, v. 14, p. 33-38, 1996.
<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

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

IVANOVA, P. T. et al. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of change in phospholipids in RBL-2H3 mastocytoma cells during degranulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v.98, p. 7152-7157, 2001.

KHANDELIA, H.; IPSEN, J. H.; MOURITSEN, O. G. The impact of peptides on lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1778, p. 1528–1536, 2008.

KIM, M. Y.; MAIER, C. S.; REED, D. J.; DEINZER, M. L. Site-specific amide hydrogen/deuterium exchange in E. coli thioredoxins measured by electrospray ionization mass spectrometry. **The Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 123, p. 9860 – 9866, 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 solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). **Toxicon**, New York, v. 38, p. 1505-15, 2000.

KORADI, R.; BILLETTER, M.; WUTHRICH, K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. **Journal of Molecular Graphics**, Guildford, v. 14, p. 51-55, 1996.

LADOKHIN, A.S.; JAYASINGHE, S.; WHITE, S.H. How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? **Analytical Biochemistry**, New York, v. 285, p. 235–245, 2000.

LADOKHIN, A.S.; SELSTED, M.E.; WHITE, S.H. Sizing membrane pores in lipid vesicles by leakage of coencapsulated markers: pore formation by melittin. **Biophysical Journal**, New York, v. 72, p. 1762–1766, 1997.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 16, p. 307-321, 1998

LASKOWSKY, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORNTON, J.M. **Applied Crystallograph.**, Copenhagen, v. 26, p. 283–91, 1993.

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 et al. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation. **Biochemistry**, Washington, v. 35, p. 8450-8456, 1996a.

MATSUZAKI, K. et al. An antimicrobial peptide, Magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. **Biochemistry**, Washington, v. 35, p. 11361-11368, 1996b.

MATSUZAKI, K. et al. Orientational and aggregational states of Magainin 2 in phospholipid bilayers. **Biochemistry**, Washington, v. 33, p. 3342-3349, 1994.

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

MATSUZAKI, K., et al. Interactions of an antimicrobial peptide, Magainin 2, with lipopolysaccharide containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative Bacteria. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 449, p. 221-224, 1999.

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. **Biochemistry**, Washington, v. 37, p. 11856–11863, 1998.

MATSUZAKI, K.; YONEYAMA, S.; MIYAJIMA, K. Pore formation and translocation of Melittin. **Biophysical Journal**, New York, v. 73, p. 831-838, 1997.

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

MENDES, M.A.; 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. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, New Jersey, v. 18: p. 636 – 642, 2004.

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

MORRIS, A. L.; MACARTHUR, M. W.; HUTCHINSON, E. G. and THORNTON, J. M. Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins**, Baltimore, v. 12, p. 345-364, 1992.

NAKAJIMA, T. **In: Venoms of the Hymenoptera: Pharmacology and Biochemistry of Vespid Venoms**; Piek, T. Editor, Academic Press: London, 1986, p. 309–327.

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

NAYEEM, A.; SITKOFF, D.; JUNIOR, S.K. A comparative study of available software for high accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. **Protein Science**, New York, v.15, p. 808-824, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4.ed. Worth Publishers, New York, 2004, p.167.

OLIVEIRA, M. R.; PALMA, M. S. Polybitoxins: a group of phospholipases A2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*). **Toxicon**, New York, v.36, p.189-99, 1998.

OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, New York, v. 47, p. 451-463, 1998.

PALMA, M. S. **Insect Venom Peptides**. In: Abba Kastin (Texas University). (Org.). Handbook of Biologically Active Peptides. 1a ed. San Diego , CA , USA: Elsevier/Academic Press, 2006, v. 1, p. 409-417.

PAPO, N.; SHAI, Y. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? **Journal of Peptides** , Copenhagen, v. 24, p. 1693-703, 2003.

PARISIEN, A.; ALLAIN, B.; ZHANG, J.; MANDEVILLE, R.; LAN, C. Q. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, p. 1–13, 2008.

PARK, N. G. et al. Interaction of Mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayer and its antimicrobial activity. **Biopolymers**, New York, v. 36, p. 793-801, 1995.

PFEIFFER, C. et al. Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 181, p. 1569-1574, 1995.

RAGHURAMAN, H.; CHATTOPADHYAY, A. Melittin: a Membrane-active Peptide with Diverse Functions. **Bioscience Reports**, Amsterdam, v. 27, p.189–223, 2007.

RAMACHANDRAN, G. N. Protein structure and crystallography. **Science**, Washington, 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. **Biophysical Journal**, New York, v.5, n.6, p.909-33, 1965.

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

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 234, p. 779-815, 1993. <http://guitar.rockefeller.edu/modeller/modeller.html>

SANTOS, L.D.; SANTOS, K.S.; DE SOUZA, B.M.; ARCURI, H.A.; CUNHA-NETO, E.; CASTRO, F.M.; KALIL, J.E.; PALMA, M.S. Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae). **Toxicon**, New York, v. 50, p. 923-937, 2007.

SATO, H.; FEIX, J. B. Peptide–membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1758, p. 1245–1256, 2006.

SENGUPTA, D.; LEONTIADOU, H.; MARK, A. E.; MARRINK, S. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1778, p. 2308–2317, 2008.

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

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by K-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1462, p. 55-70, 1999.

STRAUS, S.K.; HANCOCK, R.E.W. Mode of action of the new antibiotic for gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, New York, v. 1758, p. 1215–1223, 2006.

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

TODOKORO, Y., YUMEN, I., FUKUSHIMA, K., KANG, S.-W., PARK, J.-S., KOHNO, T., WAKAMATSU, K., AKUTSU, H., FUJIWARA, T. Structure of tightly membrane-bound mastoparan-x, a g-protein-activating Peptide, determined by solid-state NMR. **Biophysical Journal**, New York, v. 9, p. 1368-1379, 2006.

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. **Biokhimiia**, Moskva, v. 53, n.2, p.219-26, 1988.

VETTER, R. S.; VISSCHER, P. K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 37, p.481-496, 1998.

WU, M. H.; MAIER, E.; BENZ, R.; HANCOCK, R. E. W. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, Washington, v. 38, p. 7235–7242, 1999.

YANG, L. et al. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on Melittin pores. **Biophysical Journal**, New York, v. 81, p. 1475-1485, 2001.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanism of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, Philadelphia, v.55, p.27-55, 2003.

YEE, C.J.; PALMA, M.S.; MALASPINA, O.; MORATO-CASTRO, F.M.; AZEVEDO-NETO, R.S.; MANSO, E.C.; CROCE, J. Acquired immunity to African honeybee (*Apis mellifera*) venom in Brazilian beekeepers. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Saint Louis, v. 7, p. 583 – 587, 1997.

YOKOKAWA, N.; KOMATSU, M.; TAKEDA, T.; AIZAWA, T.; YAMADA, T. Mastoparan, a wasp venom stimulates insulin release by pancreatic islets through pertussis toxin sensitive GTP-binding protein. **Biochemical Biophysical Research. Communications**, Orlando, v. 158, p. 712–716, 1989.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, London, v. 415, p. 389-395, 2002.