
Ciências Biológicas

Kenny Umino Sato

Avaliação da estrutura e atividade biológica do mastoparano Polybia-MPII, marcado com fluoróforo e visualização de sua ação em mastócitos através da microscopia de fluorescência.



Rio Claro
2017

KENNY UMINO SATO

Avaliação da estrutura e atividade biológica do mastoparano Polybia-MPII marcado com fluoróforo e visualização de sua ação em mastócitos através da microscopia de fluorescência.

Orientador: Prof. Dr. Mario Sergio Palma

Co-orientadora: Dra. Bibiana Monson de Souza

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2017

595.798	Sato, Kenny Umino
S253a	<p data-bbox="443 1189 1362 1256">Avaliação da estrutura e atividade biológica do mastoparano Polybia-MPII, marcado com fluoróforo e visualização de sua ação em mastócitos através da microscopia de fluorescência</p> <p data-bbox="443 1267 831 1294">/ Kenny Umino Sato. - Rio Claro, 2017</p> <p data-bbox="477 1305 799 1332">40 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.</p>
	<p data-bbox="443 1384 1305 1451">Trabalho de conclusão de curso (bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro</p> <p data-bbox="477 1462 799 1489">Orientador: Mario Sérgio Palma</p> <p data-bbox="477 1500 884 1527">Coorientador: Bibiana Monson de Souza</p>
	<p data-bbox="443 1581 1342 1648">1. Vespa. 2. Maração fluorescente de peptideo. 3. Alexa Fluor 488. 4. Antibiose. 5. Desgranulação de mastócitos. 6. Polybia paulista. 7. Síntese química de peptideo. I. Título.</p>

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me dado a possibilidade de chegar até o presente momento de realização deste trabalho com o privilégio de aprender com pessoas muito capacitadas e amigas.

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

À Dra. **Bibiana Monson de Souza** pela atenciosa co-orientação sempre estando muito presente, tendo muita paciência e pela amizade.

Ao Prof. Dr. **Osmar Malaspina** por todo o apoio, ajuda e amizade.

À Profa. Dra. **Roberta Nocelli** pela orientação, atenção e pronta disponibilidade na parte de microscopia de fluorescência.

À Dra. **Marcia Perez dos Santos Cabrera** por auxiliar nos experimentos de dicroísmo circular.

Ao Prof. Dr. **Fernando Carlos Pagnocca** por disponibilizar os micro-organismos utilizados neste trabalho.

Ao **Eduardo Yoshioka**, ao Ms. **Fernando Cocchi**, à Ms. **Franciele Grego Esteves** e à Dra. **Nathalia Dias** pelo auxílio nos experimentos presentes neste trabalho e a amizade.

Aos funcionários do Centro de Estudos de Insetos Sociais (C.E.I.S.) por garantir o correto funcionamento das instalações e dependências do laboratório.

Ao Sr. (a) Relator (a) deste projeto junto ao Cnpq pelas sugestões e críticas para o correto desenvolvimento deste trabalho. Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. **Patrícia Pasquali Parise Maltempi**, ao Prof Dr. **Jonas Contiero** e ao Dr. **Paulo Ávila Neto** por todo o ensinamento e amizade.

A toda minha família que sempre me apoia e auxilia para que eu alcance meus objetivos e cresça cada vez mais sempre pensando no próximo.

E a todos meus amigos pelo companheirismo e momentos de risos importantíssimos na minha caminhada.

Obrigado!

1 RESUMO

Os venenos de vespas têm importantes ações farmacológicas e imunológicas durante os envenenamentos (HABERMANN, 1972). A liberação de histamina a partir da desgranulação dos mastócitos pode causar ativação de vários processos inflamatórios. As toxinas peptídicas destes venenos podem ainda causar lise de diferentes tipos celulares, quimiotaxia de macrófagos e leucócitos.

Dentre os peptídeos mais comuns aos venenos de vespas sociais estão os mastoparanos, conhecidos por interagirem com membranas celulares, causando diferentes ações farmacológicas como, por exemplo, o Polybia-MPII isolado do veneno de *Polybia paulista* (DE SOUZA, 2005). Desta forma, a proposta deste trabalho foi de identificar possíveis locais de atuação deste peptídeo no interior dos mastócitos, através de fluorescência. A preparação do peptídeo para acoplamento de um grupo fluoróforo exigiu a cisteinilação do mesmo, e a caracterização do peptídeo modificado.

Para obtenção dos peptídeos foi utilizada a técnica de síntese automática de peptídeos em fase sólida, com posterior purificação em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), e análise em espectrometria de massas para verificação da pureza, para assim serem realizados os ensaios de antibiose e desgranulação de mastócito. Além disso, foram realizadas análises de dicroísmo circular para verificar as alterações estruturais causados pela modificação na estrutura do Polybia-MPII, e experimento de microscopia de fluorescência, utilizando-se o peptídeo marcado com fluoróforo, em mastócitos do peritônio de camundongos Wistar fêmea.

As formas sintéticas dos peptídeos Polybia-MPII e cisteinil-Polybia-MPII (C-Polybia-MPII) foram purificados sob condições isocráticas, utilizando-se acetonitrila 45% (v/v) e 42 % (v/v), respectivamente, como fase móvel. Posteriormente, as massas moleculares de ambos os peptídeos e o grau de pureza foram avaliados por espectrometria de massas.

O ensaio de desgranulação de mastócitos mostrou que o peptídeo modificado apresenta uma atividade desgranuladora e antibiótica inferior em relação ao peptídeo não cisteinilado. Essa redução de atividade biológica do peptídeo modificado não impossibilitou o monitoramento da interação do mesmo, com os mastócitos. Os resultados do presente trabalho mostraram que o mastoparano Polybia-MPII poderia causar a formação de poros na membrana plasmática, devido à mudança de posições das fosfatidilserinas do folheto interno para o externo da

membrana plasmática, por uma movimentação do tipo *flip-flop*. Além disso, também se demonstrou que o peptídeo parece estar modificando a permeabilidade do envoltório nuclear.

Palavras-chave: Alexa Fluor 488, antibiose, desgranulação de mastócitos, dicroísmo circular, síntese química de peptídeo, *Polybia paulista*, HPLC.

SUMÁRIO

2 INTRODUÇÃO	6
2.1 Classificação da espécie <i>Polybia paulista</i>	6
2.2 Venenos de Hymenoptera	7
2.3 Mastoparano	8
2.4 Polybia-MPII	10
3 OBJETIVO.....	11
4 MATERIAIS E MÉTODO	11
4.1 Síntese automática de peptídeos em fase sólida	11
4.2 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....	12
4.3 Acoplamento do peptídeo C-Polybia-MPII ao fluoróforo Alexa flúor 488.	13
4.4 Espectrometria de massas ESI.....	13
4.5 Dicroísmo circular	14
4.6 Atividade antibiótica	144
4.7 Atividade Desgranuladora de Mastócitos.....	15
4.8 Microscopia de fluorescência.....	16
5 RESULTADOS	16
5.1 Purificação e análise.....	16
5.2 Ensaio de dicroísmo circular	19
5.3 Ensaio de antibiose	21
5.4 Ensaio de desgranulação de Mastócito	22
5.5 Monitoramento da interação mastócito-peptídeo com o uso de microscopia de fluorescência.....	22
6 DISCUSSÃO	26
6.1 Purificação e análise.....	26
6.2 Ensaio de dicroísmo circular	27
6.3 Ensaios de antibiose e desgranulação de mastócitos	28
6.4 Acoplamento e purificação.....	29
6.5 Microscopia de fluorescência.....	31
7 CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS.....	35

2 INTRODUÇÃO

2.1 Classificação da espécie *Polybia paulista*

A ordem Hymenoptera contém os insetos de maior interesse para o ser humano com indivíduos parasitos, predadores de pragas de insetos e polinizadores, apresentando uma grande variedade de hábitos e comportamentos que culminam na organização social. Os membros alados possuem dois pares de asas dos quais o par posterior é menor que o anterior, apresentando uma fileira de ganchos (hámulos) na margem anterior que são utilizadas na sua fixação na dobra da borda posterior da asa anterior, havendo poucas veias em ambas. As peças bucais são mandibuladas e, muitas vezes, o lábio e a maxila formam uma espécie de língua que captura o alimento líquido. As antenas são geralmente longas com dez artículos, já os tarsos apresentam somente cinco artículos. O ovipositor é bem desenvolvido, porém se modifica, em alguns casos, a um ferrão que é exclusivo das fêmeas. A larva se assemelha a um coró ou lagarta, que sofre o processo de metamorfose completa para chegar ao indivíduo adulto; as pupas são exaradas, sendo formadas em casulos, ou no interior de hospedeiros no caso de parasitos, ou em câmaras especiais. O sexo é definido pela fertilização ou não dos ovos, ou seja, ovos não fertilizados darão origem a machos e os fertilizados originarão fêmeas (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011).

Dentro da ordem Hymenoptera, a família Vespidae é um grupo relativamente grande com cerca de 325 espécies norte-americanas em que os insetos apresentam o corpo negro com manchas amarelas, esbranquiçadas ou acastanhadas. Algumas espécies são eussociais, distribuindo-se em três castas: os machos, a rainha e as operárias, estando o ferrão presente somente nas operárias e rainha. Os indivíduos sociais constroem seus ninhos com um material semelhante ao papel derivado da mastigação de madeira ou folhagem. As colônias das regiões temperadas sobrevivem apenas por uma temporada, em que somente a rainha sobrevive ao inverno, construindo uma nova colônia na primavera (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011).

Os insetos da subfamília Polistinae, que pertencem à família Vespidae, são alongados e delgados com o metassomo fusiforme avermelhados ou castanho com marcações amarelas. São eussociais em que a colônia pode ser iniciada por indivíduos ou um pequeno grupo de fêmeas. O ninho consiste em apenas um favo horizontal, mais ou menos circular suspenso por um pedúnculo delgado. As células

são abertas na superfície interior enquanto as larvas estão em fase de crescimento, sendo fechadas quando empupadas (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011).

A espécie *Polybia paulista* (Figura 1) apresenta um tamanho médio, dois pares de asas transparentes com venação reduzida, abdômen entre os segmentos 1 e 2, formando uma fusão com o metatórax (GILLOTT, 1995), sendo uma vespa social neotropical ocorrendo principalmente na região sudeste do Brasil. Há uma grande importância médica dessa espécie devido ao elevado número de acidentes por ferroadas, uma vez que se trata de uma vespa que constrói seus ninhos em habitações urbanas (JENNINGS et al., 2010).

Figura 1: Representante da espécie *Polybia paulista*.



Fonte: BRAIMA, 2015.

O veneno desta vespa tem sido amplamente estudado pela sua grande gama de ações farmacológicas, alérgicas e sistêmicas, tais como: urticária, prurido, angiodema, choque anafilático, e até perda de consciência. O peptídeo Polybia-MPII é um mastoparano presente em seu veneno. Este peptídeo afeta a musculatura estriada esquelética, agindo nos retículos sarcoplasmáticos e nas mitocôndrias das fibras além de agir na membrana plasmática podendo levar à divisão das fibras (ROCHA, 2008).

2.2 Venenos de Hymenoptera

O êxito da dominância dos insetos no ambiente terrestre pode ser associado à sua ampla diversidade de mecanismo de defesas químicas, sendo o aparecimento dos venenos e do ferrão atributos evolucionários que ajudaram os insetos a se adaptarem a diversos ambientes terrestres (WHITMAN et al., 1990). As espécies solitárias da ordem Hymenoptera apresentam um veneno que paralisa suas presas,

permitindo o desenvolvimento de suas larvas dentro do corpo do animal predado. Porém também pode haver uma ação na prevenção da contaminação do alimento ou da infecção da progênie futura. Já as espécies sociais possuem o veneno relacionado principalmente ao comportamento de defesa da colônia contra os ataques de predadores, exibindo o efeito inflamatório ou deficiência respiratória (CASTRO, 2001).

Em geral, os acidentes com estes insetos podem causar uma vermelhidão como também reação sistêmica. Na população mundial, cerca de 0,8 a 5% apresentam reação sistêmica, havendo de 20 a 50 mortes todos os anos nos Estados Unidos (HOFFMAN et al., 1983). Os venenos de Hymenoptera têm sido amplamente estudados pela sua grande gama de ações farmacológicas, alérgicas e sistêmicas, tais como: “urticária, prurido, angiodema, dispneia, náuseas, vômitos, sudorese, salivação, estridor, disfagia, hipotensão, broncospasmo, incontinência urinária e fecal, confusão mental, sensação de morte eminente, choque anafilático, e até perda de consciência” (ESHER, 2001). Algumas das atividades biológicas mais estudadas dos venenos são atividade hemolítica, degranulação de mastócitos, antibiose e quimiotaxia.

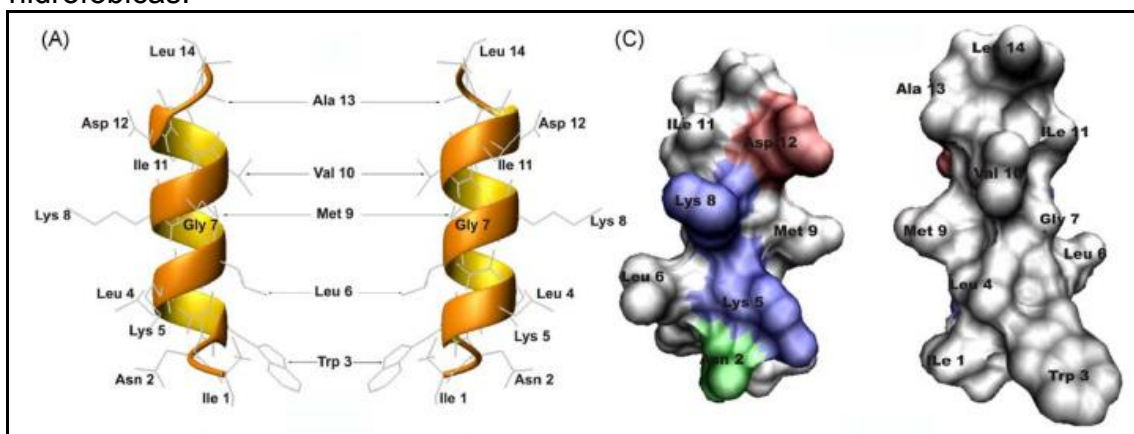
Os venenos de Hymenoptera são constituídos normalmente de amins biogênicas, peptídeos, proteínas e hidrolases como fosfolipases, proteases, hialuronidases, fosfatases e nucleotidases (NAKAJIMA et al., 1986). Entre os peptídeos presentes no veneno encontram-se as cininas, que são análogas às bradicininas responsáveis por dores, contrações da musculatura lisa e redução da pressão sanguínea (PISANO, 1968); os mastoparanos que são tetradecapeptídeos hidrofóbicos desgranuladores de mastócitos (HIRAI et al., 1978); e peptídeos quimiotáticos que são tridecapeptídeos hidrofóbicos com atividade quimiotática (TOKI et al., 1988).

2.3 Mastoparano

Os mastoparanos são os peptídeos mais abundantes no veneno de vespas (NAKAJIMA et al., 1986). Sua principal atividade biológica é a desgranulação de mastócitos. Esses peptídeos são anfifílicos, com conformação em α -hélice, compostos por 10 a 14 resíduos de aminoácidos sem a presença de cisteína. Ricos em aminoácidos hidrofóbicos como leucina, isoleucina, alanina e algumas lisinas que ocupam normalmente as posições onze e doze, além de aminoácidos básicos,

apresentando, geralmente, o resíduo C-terminal amidado (NAKAJIMA et al., 1986). A sequência primária se assemelha à Bombinina que é um peptídeo hemolítico presente na pele do sapo *Bombina variegata* (CSORDÁS; MICHL, 1970). Em água, os mastoparanos apresentam formas randômicas. Já em metanol ou presença de vesículas, tomam a forma de hélice α , o que gera a sua anfipaticidade, e ajuda esses peptídeos a causarem efeitos em membranas plasmáticas (DE SOUZA, 2006) (Figura 2).

Figura 2: Modelo estrutural do mastoparano Polybia-MPII em que se observa o esqueleto principal de 14 resíduos de aminoácidos em fita (A) e superfície de preenchimento (C). Os resíduos negativos são representados em vermelho; em azul para os positivos; verde para as regiões hidrofílicas e branco para as hidrofóbicas.



Fonte: DE SOUZA, 2009.

Além da atividade desgranuladora de mastócitos, os mastoparanos, ainda que em baixas concentrações, também podem levar à exocitose de diversas células de mamíferos (PARK et al., 1995), secreção de serotonina de plaquetas (HIGASHIJIMA et al., 1988), de prolactina proveniente da pituitária anterior (KURODA et al., 1980), podem facilitar a formação de poros nas membranas (PFEIFFER et al., 1995), podem apresentar atividade hemolítica (HIRAI et al., 1979), e são potentes ativadora de fosfatases A_2 e C, o que leva a um aumento na formação de ácido araquidônico (ARGIOLAS; PISANO, 1984).

Há dois grupos de mastoparanos segundo seu modo de ação: os que causam lise celular pela formação de poros na membrana (NAKAJIMA, 1986); ou aqueles que interagem com os receptores de proteínas G que ativam os mecanismos de desgranulação levando à diferentes tipos de secreção dependendo do tipo celular (MENDES et al., 2005). Essa interação com a proteína G parece ser causada pela

ligação cargas positivas presentes na superfície da molécula do peptídeo com sítios negativos presentes na membrana plasmática, esta que propicia uma posterior ativação da proteína G pelo peptídeo (MOUSLI et al., 1992) através de uma fosforilação mediada pela conversão de GTP em GDP (ROSS; HIGASHIJIMA, 1994).

Os receptores associados às proteínas G são a maior família de receptores de superfície de membrana das células eucarióticas, mediando uma vasta diversidade de moléculas sinalizadoras como hormônios, neurotransmissores, mediadores locais, proteínas, peptídeos e aminoácidos. Os receptores sofrem uma mudança conformacional ao se ligarem às moléculas sinalizadoras, ativando as proteínas de ligação à GTP: proteínas G.

Os mastoparanos podem interagir com membranas lipídicas artificiais compostas por lecitina e colesterol em que aumenta sua permeabilidade iônica, aumentando a condutividade desta (OKUMURA et al., 1981). Esse aumento de permeabilidade pode ter efeito na liberação de mediadores pela ativação celular já que estes requerem um aumento no influxo de íons Ca^{2+} para realizar a exocitose (NAKAJIMA, 1986). A mudança conformacional dos mastoparanos para α -hélice ao se ligarem às membranas plasmáticas causa perturbações na bicamada lipídica, o que leva a um aumento de permeabilidade (DANILENKO et al., 1993) e/ou formações de canais iônicos (MELLOR; SANSOM, 1990).

2.4 Polybia-MPII

Dois mastoparanos foram isolados do veneno da vespa *Polybia paulista* por De Souza et al. (2004) que apresentam as seguintes sequências primárias: INWLKLGKMVIDAL-NH₂ e IDWLKLGKMVMDVL-NH₂. A primeira sequência recebeu o nome de Polybia-MPII e apresentou uma forte atividade hemolítica em que houve 100% de hemólise com apenas $6,2 \times 10^{-5}$ M; atividade desgranuladora de 57% dos mastócitos de peritônio de rato em uma concentração de somente $6,2 \times 10^{-5}$ M; e atividade quimiotática relativa de 90% de leucócitos polimorfo nucleados de rato com apenas 1×10^{-5} M. Normalmente, os mastoparanos apresentam baixa atividade quimiotática, porém, o peptídeo Polybia-MPII apresenta uma alta atividade citolítica e quimiotática, sendo considerado um peptídeo pertencente a um novo subgrupo de mastoparanos envolvidos em processos inflamatórios.

Segundo o estudo realizado no tecido muscular de rato por Rocha et al. (2008), o mastoparano Polybia-MPII causou o rompimento do sarcolema e colapso na organização das miofibrilas; em que o sarcolema, o retículo sarcoplasmático e a mitocôndria são os alvos principais desse peptídeo.

A partir dessas características notáveis do Polybia-MPII, esse trabalho se propôs a identificar os possíveis locais de atuação dessa molécula no interior dos mastócitos, monitorando suas posições intracelulares, através da fluorescência emitida pela incorporação de um grupo fluoróforo em sua estrutura molecular.

3 OBJETIVO

O principal objetivo deste trabalho foi a observação da ação do peptídeo Polybia-MPII em mastócitos. Para tal, um dos objetivos é avaliar a integridade estrutural e biológica do peptídeo Polybia-MPII alterado por uma cisteinilação no resíduo C-terminal (C-Polybia-MPII). Sintetizar e purificar o peptídeo Polybia-MPII e sua sequência cisteilina, verificar as modificações em sua estrutura através de análises de Espectrometria de Massas e Espectroscopia de Dicroísmo Circular. Além disso, foram avaliadas possíveis alterações em sua ação nas atividades biológicas, tais como: degranulação de Mastócito e antibiose. Para então ser feito o acoplamento do fluoróforo Alexa 488 no peptídeo modificado e posterior observação de sua ação em Mastócito com a microscopia de fluorescência.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Síntese automática de peptídeos em fase sólida

A síntese dos peptídeos lineares foi realizada através do método automático no sintetizador Prelude (Protein Technologies, Inc.) em fase sólida, utilizando-se química N-9-fluorenilmetoxicarbonil (estratégia Fmoc). Foram sintetizados os seguintes peptídeos:

Tabela 1: Sequência primária dos peptídeos em estudo.

PEPTÍDEOS	Seqüências primárias
Polybia-MPII	I N W L K L G K M V I D A L -NH ₂
C-Polybia-MPII	C I N W L K L G K M V I D A L -NH ₂

Em cada ciclo da síntese foi adicionado Fmoc-aminoácido-OH (NOVABIOCHEM), contendo HCTU (NOVABIOCHEM) como agente acoplante. Para as lavagens da resina e desproteção foram utilizados N-N-Dimetilformamida (SYNTH) e Piperidina (FLUKA), respectivamente.

Todas as reações foram realizadas sob agitação por nitrogênio em capela. Após a acoplagem do último resíduo de aminoácido, a resina foi lavada com diclorometano (MALLINCKRODT) e seca com gás nitrogênio.

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

Esta solução de TFA-Anisol-Etanoditiol-Fenol-peptídeo foi centrifugada em uma centrífuga (Thermo Electron Corporation, modelo IEC Centra CL2Centrifuge) por 15 minutos a 3000 rpm na presença de éter etílico (SYNTH) para promover a precipitação do peptídeo. O peptídeo foi ressuspensionado em água bidestilada (destilador MARCONI, modelo MA 078) e ultrapurificada (purificador Mili-Q, modelo Advantage A10). O controle de qualidade foi feito em espectrômetro de massas ESI-MS.

4.2 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Para a purificação dos peptídeos, foi utilizado um sistema de HPLC Shimadzu modelo LC-8A, equipado com detector de luz ultravioleta do tipo arranjo de diodos modelo SPD-20A prominence, constituído por duas bombas LC-8A (bombas A e B), com injetor Rheodyne modelo 7725i com "loop" de 2,0 mL, um sistema controlador Shimadzu (modelo SLC-10Avp) e coluna preparativa SHIM PACK C-18 Prep-ODS(K) 30x250mm (SHIMADZU). Para a fase móvel, foram utilizados dois solventes, A (acetonitrila 100% (MALLINCKRODT) contendo 0,1% TFA (v/v)) e B (água, contendo 0,1% TFA (v/v)). O fluxo do solvente para todos os peptídeos foi de 20 mL/min.

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

Tabela 2: Concentração de Solvente B (Acetonitrila em presença de 0,1% de TFA) utilizado na purificação dos peptídeos sintéticos, por RF-HPLC em condições isocráticas.

PEPTÍDEOS	% Solvente B
Polybia-MPII	45
C-Polybia-MPII	42

A eluição dos componentes presentes foi monitorada em dois comprimentos de onda: 214 nm e 280 nm e as frações coletadas manualmente. Após a coleta, as amostras foram analisadas por Espectrometria de Massas e aquelas contendo os peptídeos de interesse foram liofilizadas no Heto drywinner 3 (DW3) e mantidas em freezer -20°C até o uso.

4.3 Acoplamento do peptídeo C-Polybia-MPII ao fluoróforo Alexa flúor 488.

O acoplamento do peptídeo cisteinilado com o fluoróforo Alexa 488 seguiu o protocolo sugerido pelo fabricante (Invitrogen, 2006) com modificações, em que 250 µg de peptídeo foram solubilizados em 500 µL de tampão fosfato (0,3174 g de NaH₂PO₄ e 2,0636 g de Na₂HPO₄.7H₂O em 100 mL de água Mili-Q com pH 7,25) que foram depositados no recipiente de 1 mg de fluoróforo previamente protegido com papel alumínio. Esta mistura foi mantida sob agitação por 4 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a reação foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular utilizando-se a resina G-25 (GE Healthcare Life Science) e o mesmo tampão fosfato em que foi coletada a primeira fração que foi seca por speed-vac (Heto Drywinner 3, modelo DW3) *over night*.

4.4 Espectrometria de massas ESI

A obtenção dos espectros de massas foi realizada em um Espectrômetro de Massas ESI, do tipo íon trap seguido de TOF modelo LC-IT-TOF (SHIMADZU). O espectrômetro de massas ESI foi equipado com probe padrão, do tipo electrospray (ESI), auxiliado por um sistema de injeção LC diretamente acoplado ao espectrômetro de massas. O software LCMS solutions (SHIMADZU) foi utilizado para controle de aquisição de dados.

Durante todos os experimentos a temperatura do CDL e da interface foi mantida a 200 °C, a voltagem na agulha a 4,5 kV e a voltagem no cone a 3,5 V. O fluxo de gás secante (nitrogênio) foi de 100 L/h e o fluxo de gás nebulizador (nitrogênio) de 1,5 L/h. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada com varreduras feitas no intervalo de m/z 50 a 3000, com uma resolução de aproximadamente 15000.

4.5 Dicroísmo circular

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados em um espectropolarímetro Jasco (modelo 815), junto ao Departamento de Física, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto/SP, sob coordenação da Dra. Marcia Perez dos Santos Cabrera como descrito por DE SOUZA (2006, 143f.). O espectro de dicroísmo circular do mastoparano foi coletado na região de UV distante, no intervalo de comprimento de onda de 190 a 250 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 miligraus, tempo de resposta de 1 s e 0,1 nm de resolução. O espectro final foi obtido a partir da média de seis acumulações e foram usadas cubetas de quartzo de caminho óptico de 0,5 cm.

O mastoparano foi solubilizado em água Mili-Q (modelo A10), TFE (merck) ou SDS (SIGMA), 5mM, pH 8,0. A partir dessas soluções foram feitas preparações contendo diferentes concentrações de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) (MERCK) e dodecil sulfato de sódio (SDS) (AMERSHAM BIOSCIENCES).

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: $[\Theta]=100\theta/Lcn$; onde "l" é o caminho óptico da cubeta em centímetros, c é a concentração do peptídeo em milimolar e "n" é o número de resíduos do peptídeo. A elipticidade residual observada a 222nm (em graus cm²/dmol resíduo) foi convertida em fração de hélice (*fH*) e posteriormente em porcentagem de hélice α segundo Rohl e Baldwin (1998).

4.6 Atividade antibiótica

Os microrganismos utilizados para a realização dos antibiogramas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Streptococcus pneumoniae*, obtidos no Laboratório de Microbiologia

do Centro de Estudos de Insetos Sociais do IBRC/UNESP. Foram utilizados: meio de cultivo Müller-Hinton (DIFCO), meio de cultivo Müller-Hinton Broth (DIFCO) para manutenção e cultivo desses microrganismos. Toda a manipulação dos microrganismos foi feita em câmara de fluxo laminar vertical (PACHANE) e todo material utilizado no cultivo foi esterilizado em autoclave vertical AV30 (PHOENIX) por 20 minutos à 121°C e 1 atm.

O inóculo foi preparado utilizando-se 2 mL de salina e uma “alçada” de células, previamente cultivadas, em Müller-Hinton Agar (DIFCO). Foi ajustada a concentração de células através da comparação com 0,5 da escala de McFarland. Foram adicionados 200 µL do inóculo em 20 mL de meio Müller-Hinton líquido, esta suspensão foi utilizada nos testes com o peptídeo. A determinação do MIC foi realizada em microplacas (COSTAR), em triplicata, onde cada um dos orifícios foi preenchido com 90µL da suspensão de células, 10µL de solução de peptídeo. Para o valor de referência zero, foram montados pocinhos contendo 90µL de meio de cultivo Müller-Hinton e 10 µL de água Milli-Q. Para o valor de referência 100%, foram acrescentados ao orifício 90µL de suspensão de células, 10µL de água. Foi montada uma placa para cada espécie de microrganismo mencionado acima. As placas foram incubadas em estufa de cultura a 34 °C por 18 horas. Após esse período, a cada orifício foram adicionados 10 µL de cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) 5% (m/v) em água. As leituras foram realizadas após 3 horas de re-incubação das placas em estufa a 34 °C.

4.7 Atividade Desgranuladora de Mastócitos

A desgranulação de mastócitos foi determinada através de medidas da liberação de β-D-glucosaminidase, que se co-localiza com a histamina nos grânulos dos mastócitos, segundo metodologia descrita por Hide et al. (1993). As células retiradas do lavado peritoneal de rato foram incubadas em uma solução 150mM NaCl (MERCK), 4mM KCl (MERCK), 4mM NaH₂PO₄ (SYNTH), 3mM KH₂PO₄ (SYNTH), 5 mM glicose (SYNTH), 15mM BSA (SIGMA) e 1mM CaCl₂ (VETEC), contendo várias concentrações do peptídeo sintético, por 15 minutos a 37 °C. Em seguida foram centrifugadas e aos sobrenadante, foram acrescentados p-nitrofenil-β-D-glucosamina (SIGMA) em solução 0,2M de citrato (MERCK), com pH 4,5. Após 6h de incubação a 37°C, foi feita leitura de absorbância a 405 nm em leitora de

placas (Molecular Devices, modelo Versa Max Tunable microplate reader) edindo-se a taxa de p-nitrofenol formado.

4.8 Microscopia de fluorescência.

Para visualização da fluorescência retirou-se os mastócitos a partir do lavado peritoneal de rato em que as células foram mantidas em uma solução 150mM NaCl (MERCK), 4mM KCl (MERCK), 4mM NaH₂PO₄ (SYNTH), 3mM KH₂PO₄ (SYNTH), 5 mM glicose (SYNTH), 15mM BSA (SIGMA) e 1mM CaCl₂ (VETEC) para a centrifugação e lavagens com posterior incubação com o peptídeo Polybia-MPII ou C-Polybia-MPII a uma concentração de 250 µg/mL durante 5 minutos. Adicionou-se 25 µL de annexin V e 2 µL de PI solução de trabalho (5 µL iodeto de propídio (PI) e 45 µL 1X annexin-binding buffer) para cada 100 µL de suspensão celular como descrito pelo fabricante (Thermo, 2010) e se incubou por 30 minutos antes da visualização em microscópio de fluorescência com o filtro DAPI de excitação a 330 – 385 nm e emissão a 445 – 450 nm e o filtro FITC de excitação a 450 – 490 nm e emissão a 515 – 565 nm.

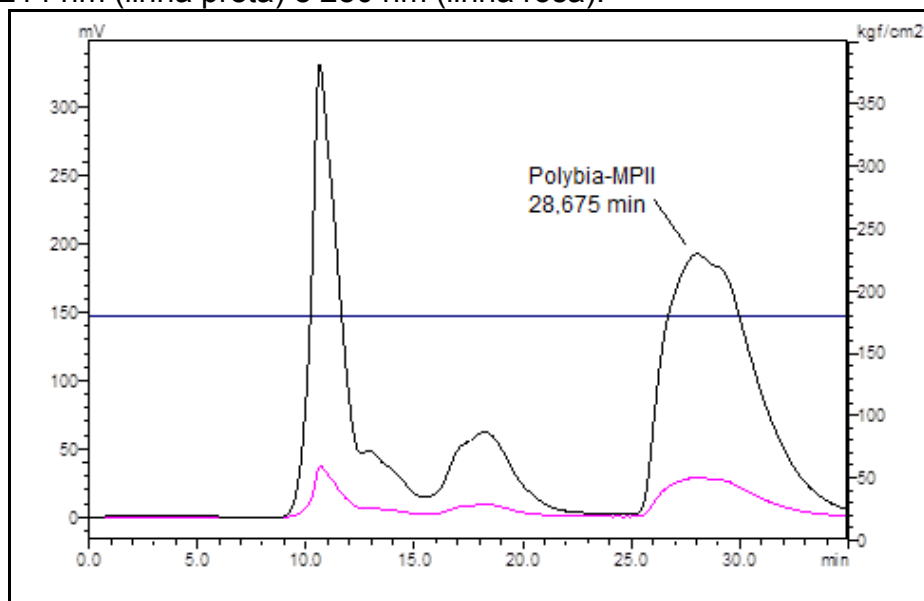
As imagens foram capturadas através de uma câmera (Olympus, modelo DP71) acoplada ao microscópio (Olympus, modelo BX51) e tratadas com o software Image J e Fiji em que realizamos a sobreposição da imagem da fluorescência do A488 e da imagem de annexin V e PI.

5 RESULTADOS

5.1 Purificação e análise

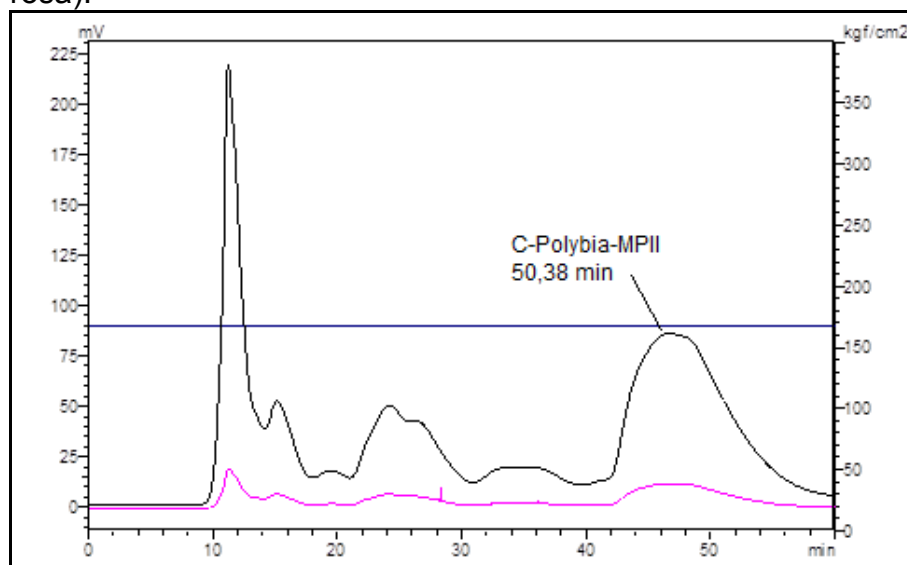
Os peptídeos obtidos a partir da síntese foram purificados em HPLC. A Figura 3 mostra o cromatograma de purificação do Polybia-MPII utilizando-se Acetonitrila 45% (v/v) (contendo TFA 0,1% (v/v)) em condição isocrática. Como pode ser observado, o pico referente ao Popybia-MPII eluiu aos 28,675 minutos. Essas condições de purificação foram repetidas inúmeras vezes para o peptídeo em questão, até obtenção de uma quantidade de amostra suficiente para a realização das análises propostas neste projeto.

Figura 3: Cromatograma de purificação do Polybia-MPII utilizando condição isocrática de Acetonitrila 45% (v/v) [contendo TFA 0,1% (V/V)] em coluna C18 (30x250), fluxo de 20 mL/min e detecção a 214 nm (linha preta) e 280 nm (linha rosa).



Para a purificação do peptídeo C-Polybia-MPII, foi desenvolvido um cromatograma em condições isocráticas de Acetonitrila 42% (contendo TFA 0,1%(v/v)) por 60 minutos. O pico eluído aos 50,38 minutos refere-se ao peptídeo em questão como pode-se ver na figura 4.

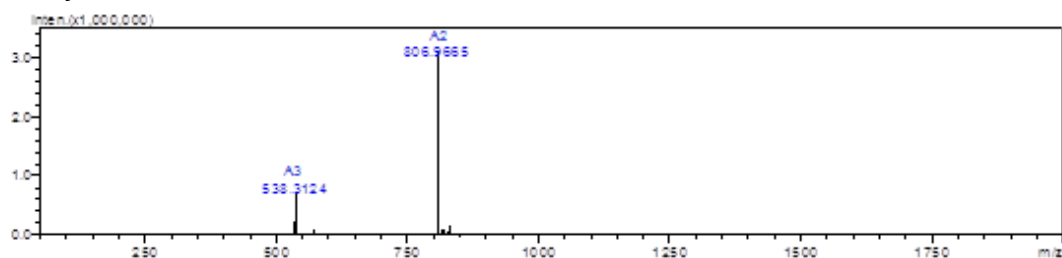
Figura 4: Cromatograma de purificação do C-Polybia-MPII utilizando condição isocrática de Acetonitrila 42% (v/v) [contendo TFA 0,1% (V/V)] em coluna C18 (30x250), fluxo de 20 mL/min e detecção a 214 nm (linha preta) e 280 nm (linha rosa).



Após a purificação de todos os peptídeos, foram feitas as análises de massas. Esses experimentos foram realizados tanto para a confirmação das massas correspondentes aos peptídeos como para verificação da pureza de cada amostra.

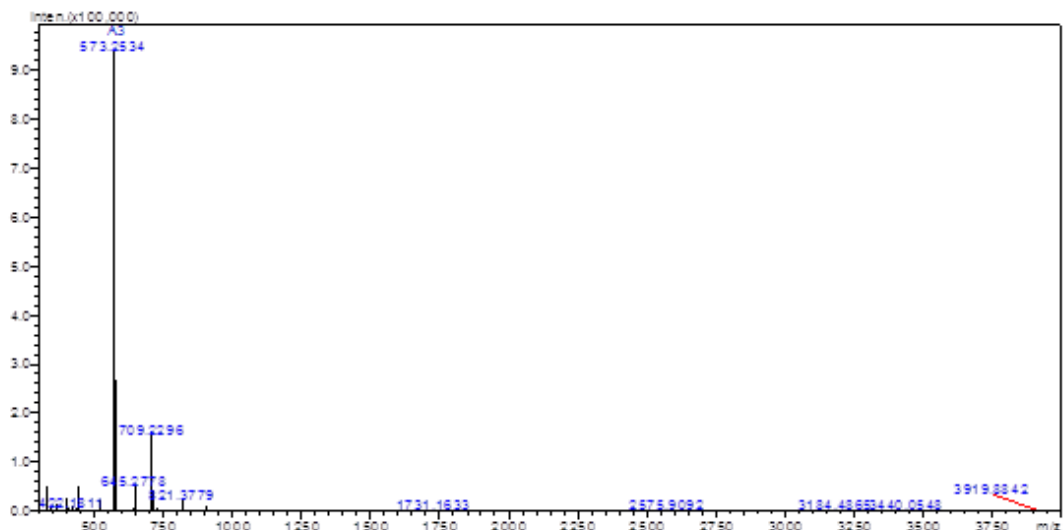
A Figura 5 mostra o espectro de massas obtido para a amostra cromatografada referente ao peptídeo Polybia-MPII. Utilizando-se o software LC-solution para cálculo da massa molecular teórica, obteve-se um valor de 1611,943 Da, sendo que com o espectro de massas foi detectado um valor de 1611,933 Da como pode-se ver pelos picos de m/z 806,966 $[M+2H^+]$ e 538,312 $[M+3H^+]$, confirmando o valor previsto.

Figura 5: Espectro de massas ESI-MS no modo positivo do peptídeo Polybia-MPII.



Para o C-Polybia-MPII, foi obtido um valor de m/z 573,2534, sendo este valor correspondente ao íon quase-molecular na forma $[M+3H^+]$ (Figura 6). Desta forma, podemos concluir que a massa molecular obtida experimentalmente do composto sintético é 1716,7602 Da, confirmando a modificação química no mesmo.

Figura 6: Espectro de massas ESI-MS no modo positivo do peptídeo C-Polybia-MPII.



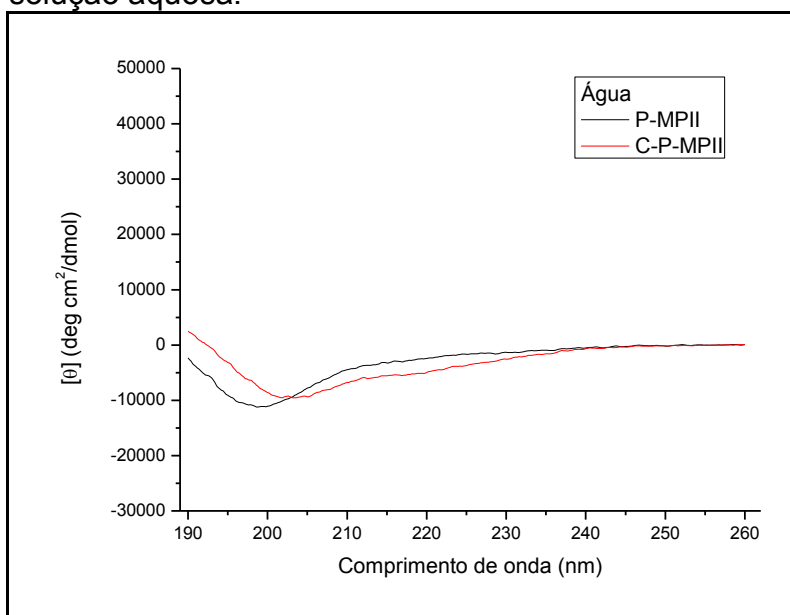
5.2 Ensaio de dicroísmo circular

Com a finalidade de verificar as alterações estruturais do peptídeo Polybia-MPII com a adição da cisteína na extremidade C-terminal, foi realizada a técnica de dicroísmo circular em que foram utilizadas três condições: em solução aquosa (Figura 7), solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Figura 8) e em solução de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) 40% (Figura 9). Dessa forma, pode-se entender as mudanças estruturais da molécula que estariam nos diferentes meios em que pode atuar.

Os espectros de dicroísmo circular permitem detectar as estruturas secundárias nessas distintas condições; em que as hélices α apresentam bandas negativas a 222 nm e 208 nm, além de uma banda positiva a 190 nm. A conformação de folha- β pode ser observada pela região negativa em 216 nm e positiva em 195 nm. E as estruturas radômicas são evidenciadas com um forte sinal negativo um pouco abaixo de 200 nm, uma banda positiva em 218 nm e outra negativa em 235 nm (ROGER; NORDÉN, 1997).

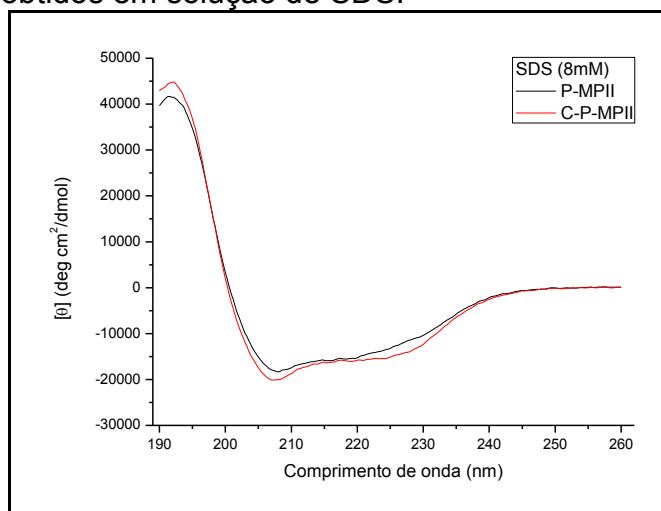
Em água, observa-se uma banda positiva a 190 nm, principalmente no peptídeo C-Polybia-MPII; uma região negativa bem acentuada que engloba os comprimentos de 200 nm e 208 nm para ambos peptídeos; voltando a ocupar a porção positiva na região dos 218 nm para o peptídeo Polybia-MPII e 235 nm para o C-Polybia-MPII (Figura 7).

Figura 7: Espectros de dicroísmo circular dos peptídeos Polybia-MPII e C-Polybia-MPII obtidos em solução aquosa.



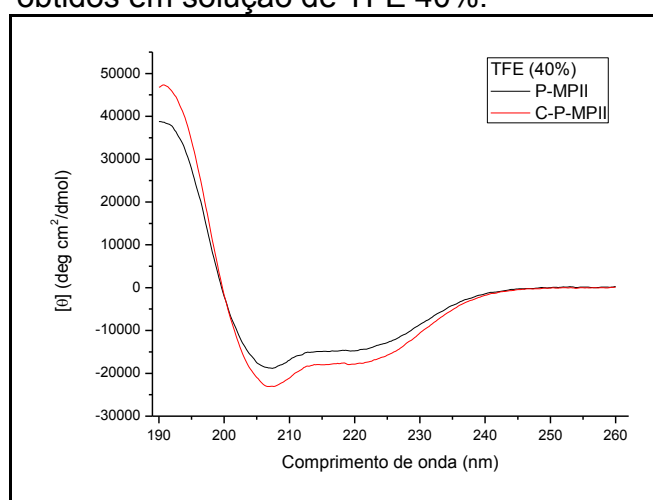
No espectro adquirido em presença de SDS, verifica-se uma porção notavelmente positiva na região dos comprimentos de onda 190 nm e 195 nm para ambos peptídeos; a porção negativa engloba os comprimentos 208 nm, 216 nm, 218 nm e 235 nm também para os dois peptídeos (Figura 8).

Figura 8: Espectros de dicroísmo circular dos peptídeos Polybia-MPII e C-Polybia-MPII obtidos em solução de SDS.



Na condição com TFE 40%, há uma grande similaridade com o espectro visto na condição com SDS em que se observa uma região acentuadamente positiva na porção dos comprimentos de onda 190 nm e 195 nm para ambos peptídeos; e a porção negativa engloba os comprimentos 208 nm, 216 nm, 218 nm e 235 nm também para os dois peptídeos (Figura 9).

Figura 9: Espectros de dicroísmo circular dos peptídeos Polybia-MPII e C-Polybia-MPII obtidos em solução de TFE 40%.



A partir dos espectros de dicroísmo circular nessas diferentes condições, foi possível determinar a porcentagem de cada estrutura secundária das moléculas dos peptídeos Polybia-MPII e C-Polybia-MPII, ou seja, a porcentagem de hélices α , folhas- β voltas e estruturas aleatórias (Tabela 3).

Tabela 3: Resumo de porcentagens de estrutura secundária cálculos a partir do CD-Pro para os peptídeos P-MPII e C-P-MPII.

ESTRUTURA SECUNDÁRIA (%)	H2O		TFE		SDS	
	P-MPII	CP-MPII	P-MPII	CP-MPII	P-MPII	CP-MPII
HÉLICE- α	5	12	50	67	59	66
FOLHAS- β	39	31	7	1	6	4
VOLTAS	21	23	16	5	13	13
RANDOM	35	34	27	27	22	17

5.3 Ensaio de antibiose

Realizou-se a atividade de antibiose para averiguar uma possível alteração na ação biológica do peptídeo Polybia-MPII com sua cisteinilação. Como pode-se ver na tabela 4, houve uma grande perda da atividade antibiótica do peptídeo cisteinilado, principalmente nos micro-organismos Gram-negativos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e no micro-organismo *Staphylococcus aureus* nos quais não houve inibição de crescimento dos micro-organismos. Com a bactéria *Streptococcus pneumoniae* houve certa inibição, porém em uma concentração mínima inibitória (MIC) de peptídeo modificado muito mais elevada (15,7 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao peptídeo não modificado que necessita apenas 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para inibir seu crescimento, ou seja, um aumento de 38,4 vezes em relação à sequência não modificada.

Tabela 4: Valores de concentração mínima inibitória (MIC) expressos em $\mu\text{g/mL}$ para o Polybia-MPII e C-Polybia-MPII, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; NI: não houve inibição do crescimento bacteriano.

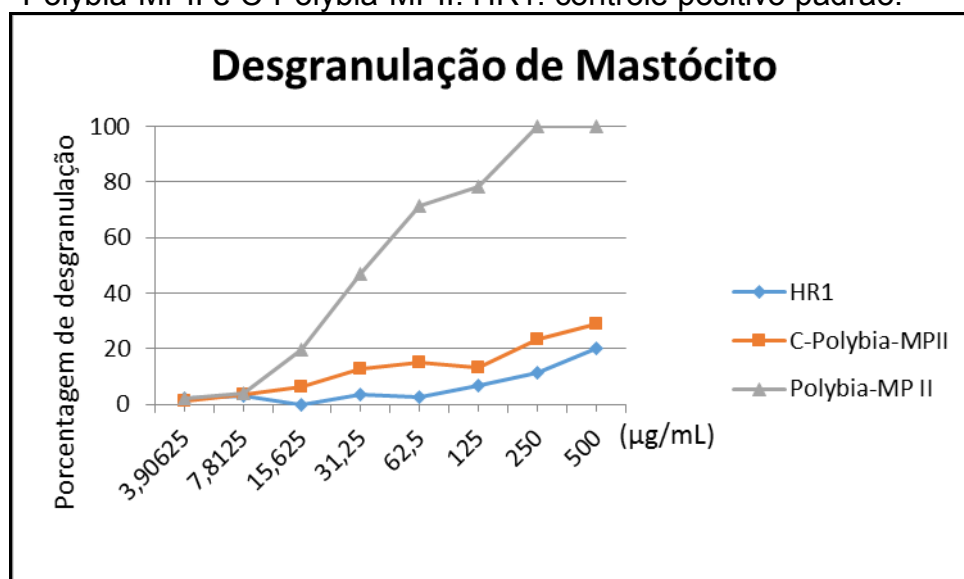
Peptídeo	Valores de MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	Gram negativas		Gram positivas	
	<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>
P-MPII	15,7	125	62,5	0,5
C-P-MPII	NI	NI	NI	15,7

5.4 Ensaio de desgranulação de Mastócito

Como houve uma diminuição brusca da atividade biológica de antibiose, executou-se o experimento de desgranulação de mastócitos que é a principal ação do peptídeo Polybia-MPII que lhe confere o nome de mastoparano. Contudo, este teste também confirmou a perda de sua atividade, como pode ser observado no (Figura 10) no qual o peptídeo sem a modificação atinge 100% de desgranulação com a concentração de 250 µg/mL enquanto que o peptídeo cisteinilado apresentou apenas 23,25% de desgranulação nesta mesma concentração de peptídeo.

Embora a atividade de desgranulação do peptídeo C-Polybia-MPII seja mais elevada em relação ao controle positivo utilizado no teste, HR1, houve uma redução drástica na principal atividade deste peptídeo causa pela cisteinilação, quando comparado ao peptídeo sem qualquer modificação de sua estrutura.

Figura 10: Porcentagem de desgranulação nas diferentes concentrações apresentadas em µg/mL dos peptídeos Polybia-MPII e C-Polybia-MPII. HR1: controle positivo padrão.

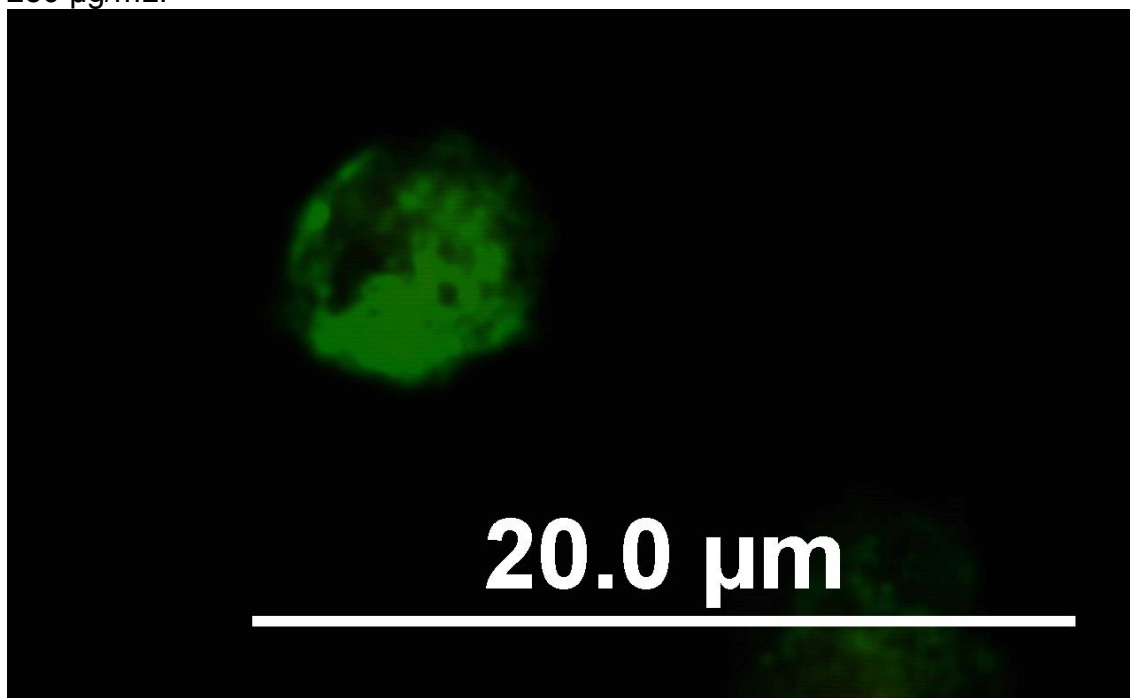


5.5 Monitoramento da interação mastócito-peptídeo com o uso de microscopia de fluorescência

Com o ensaio de fluorescência, observou-se um padrão de início de desorganização membranar na figura 11 em que o mastócito foi incubado por 5 minutos com o peptídeo Polybia-MPII, e corado com annexin V e iodeto de propídio (PI) para sua visualização em microscopia. Nessa figura observa-se uma externalização da fosfatidilserina, que se acopla à Anexina V, formando um

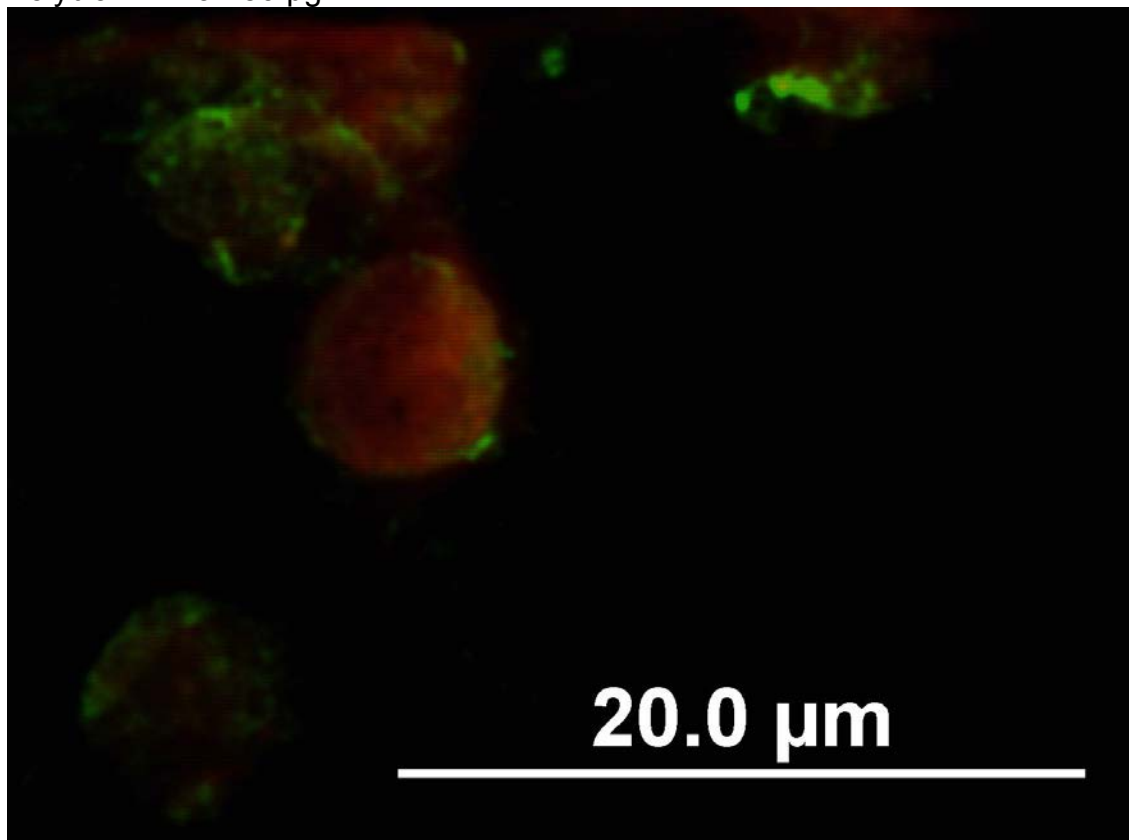
complexo fluorescente de cor verde, indicando uma mudança da estrutura da membrana plasmática desta célula.

Figura 11: Foto de microscopia de fluorescência feita com os filtros DAPI de excitação a 330-385 nm e emissão a 445-450 nm e o filtro FITC de excitação a 450-490 nm e emissão a 515-565 nm em que o mastócito foi marcado com annexin V (verde), PI e incubado durante 5 min com o peptídeo Polybia-MPII a 250 µg/mL.



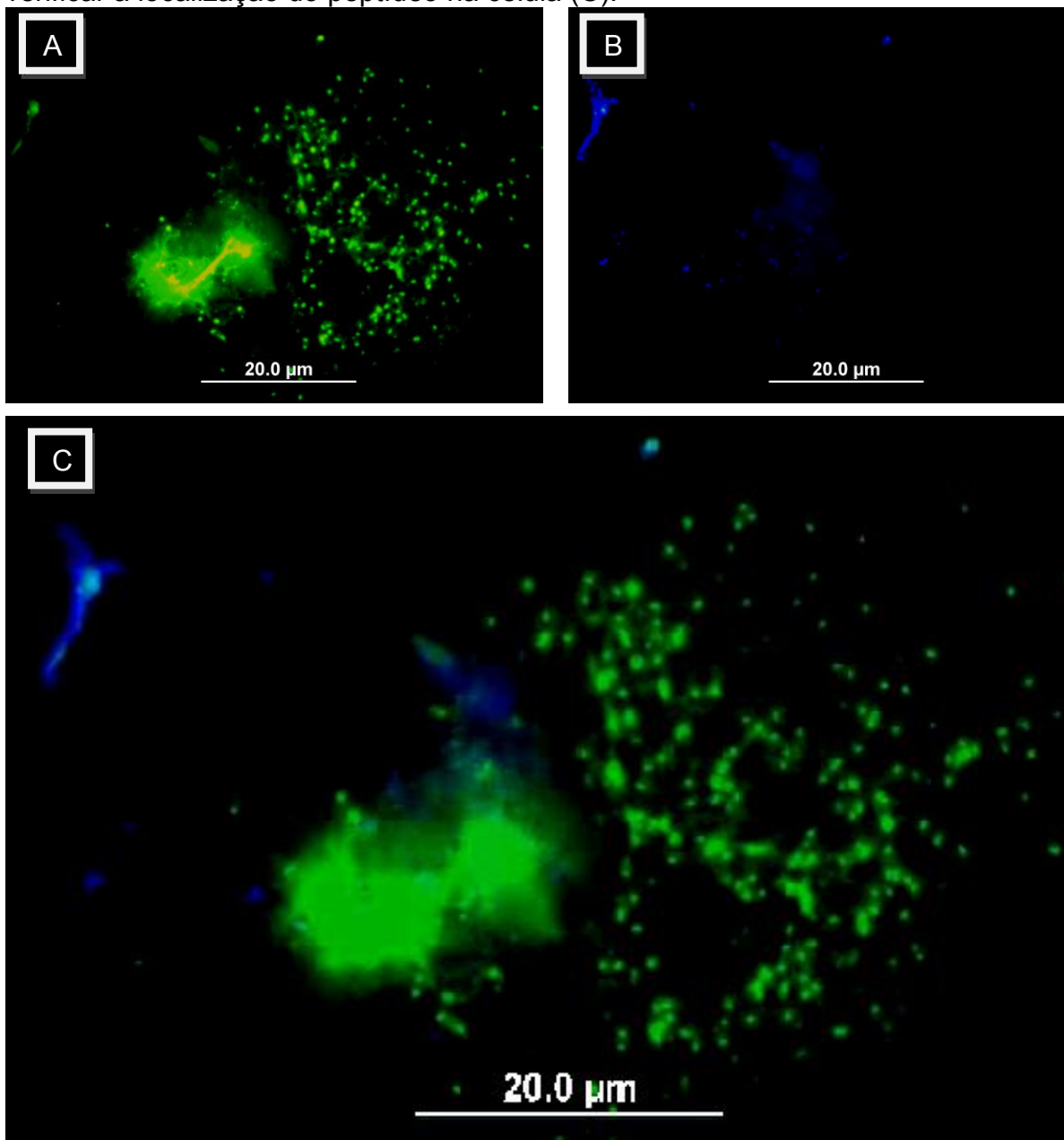
Uma desorganização mais avançada é possível de ser vista na figura 12, na qual pode-se observar a internalização do PI (que atravessou a membrana plasmática com auxílio da desorganização causada pelo Polybia-MPII), através dos poros formados pelo peptídeo no envoltório nuclear, possibilitando a entrada do PI, que por sua vez forma complexo com o DNA, visualizado pela fluorescência do cor vermelha.

Figura 12: Foto de microscopia de fluorescência feita com os filtros DAPI de excitação a 330-385 nm e emissão a 445-450 nm e o filtro FITC de excitação a 450-490 nm e emissão a 515-565 nm em que o mastócito foi marcado com annexin V (verde) e PI (vermelho) e incubado durante 5 min com o peptídeo Polybia-MPII a 250 µg/mL.



Na incubação com o peptídeo C-Polybia-MPII conjugado ao fluoróforo Alexa 488 (Figura 13), pode-se observar que houve uma desorganização da membrana plasmática do mastócito, evidenciada pela marcação verde do corante annexin V (Figuras 13A e 13C). É possível verificar também a internalização do peptídeo C-Polybia-MPII conjugado com o fluoróforo Alexa 488 na célula pela pigmentação azul na região membranárea e interna à célula (Figuras 13B e 13C).

Figura 13: Fotos de microscopia de fluorescência feitas com os filtros DAPI de excitação a 330-385 nm e emissão a 445-450 nm em que o mastócito foi marcado com annexin V (verde) e PI (vermelho) (A); e o filtro FITC de excitação a 450-490 nm e emissão a 515-565 nm para o fluoróforo Alexa 488 (azul) (B); em que as células foram incubadas durante 5 min com 250 µg/mL do peptídeo C-Polybia-MPII conjugado com o fluoróforo Alexa 488; para que se pudesse sobrepor as imagens e verificar a localização do peptídeo na célula (C).

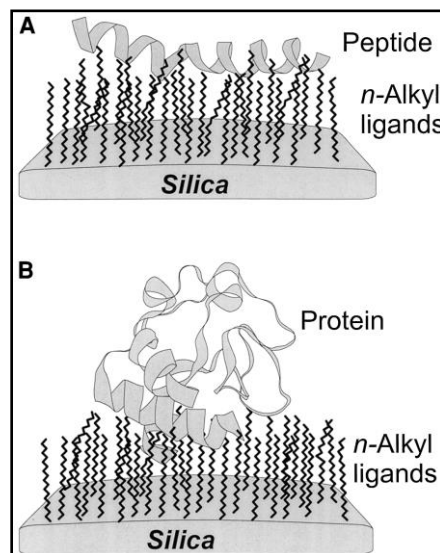


6 DISCUSSÃO

6.1 Purificação e análise

A cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC) é uma técnica que se baseia na interação hidrofóbica/hidrofílica da amostra com a resina da coluna, fase estacionária, e com o solvente que passa através da mesma, fase móvel. Normalmente, as colunas deste tipo de técnica apresentam a fase estacionária de sílica de n-alquila, ou seja, um hidrocarboneto que apresenta uma determinada hidrofobicidade (JOSIC e KOVAC, 2010, v. 251, p. 9–22) (Figura 14). Ao injetar a amostra, esta deve ficar retida na coluna pela interação com a fase estacionária ser mais forte que com a fase móvel que apresenta uma proporção de água maior no início.

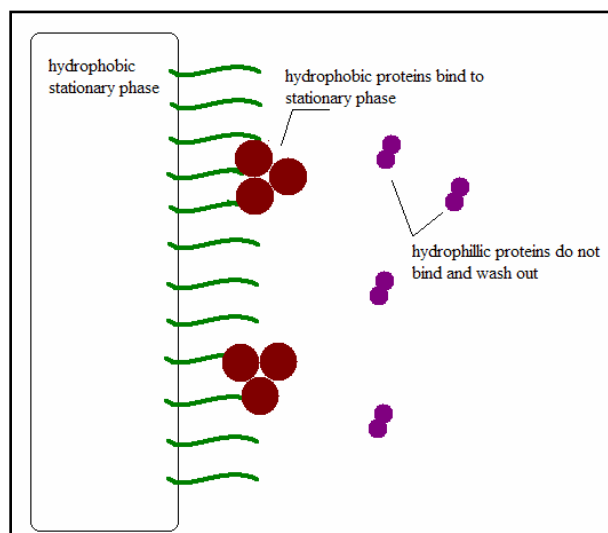
Figura 14: Esquema da fase estacionária de sílica n-alquilada de uma coluna utilizada para a técnica de RP-HPLC interagindo com um peptídeo (A) e uma proteína (B).



Fonte: JOSIC e KOVAC, 2010.

Posteriormente, a quantidade de solvente orgânico, que apresenta maior hidrofobicidade, vai aumentando aos poucos na mistura da fase móvel em um gradiente, de modo que a interação entre a fase móvel e a amostra começa a ser maior que a interação entre a amostra e a fase estacionária. Esse procedimento faz com que os compostos mais hidrofílicos eluam em um tempo menor que os hidrofóbicos (GRELL e BUTARBUTAR, 2013) (Figura 15).

Figura 15: Diagrama de uma cromatografia líquida de alta performance de fase reversa em que os compostos mais hidrofóbicos (em marrom) ficam retidos à fase estacionária hidrofóbica (em verde), enquanto que os compostos mais hidrofílicos (em roxo) são eluídos pela fase móvel.



Fonte: GRELL; BUTARBUTAR, 2013.

Depois de estabelecido o tempo de retenção do composto de interesse, neste estudo os peptídeos Polybia-MPII e C-Polybia-MPII, é feito um isocrático, em que não há mudança de concentração dos solventes polares e apolares na mistura da fase móvel (JOSIC e KOVAC, 2010, v. 251, p. 9–22).

A partir dos cromatogramas apresentados pelas figuras 3 e 4, pode-se verificar que houve uma modificação na hidrofobicidade do peptídeo com sua cisteinilação que passou de ser eluído em uma concentração de 45% para 42% de acetonitrila em água Mili-Q com 0,1% (v/v). Ainda que apresente um valor mais elevado e um maior cuidado de degaseificação da fase móvel, a acetonitrila foi utilizada como solvente orgânico em vez de metanol, pois ela apresenta uma melhor resolução em detecções com ondas de comprimento curtos, evitando a aparição de ruídos e picos fantasmas; realiza menor pressão na coluna; apresenta um maior poder de eluição; e é mais recomendada para polímeros de colunas de fase reversa pela afinidade por solventes orgânicos (SHIMADZU, 2017). Estas condições foram propícias para a purificação das amostras como se verifica nas figuras 5 e 6 que mostram uma prevalência dos sinais m/z nestes espectros de massas.

6.2 Ensaio de dicroísmo circular

Como pode-se observar na tabela 3, há uma formação de 5% de hélice α em água para o peptídeo Polybia-MPII que aumenta essa proporção para 50% em TFE e 59% em SDS; já o peptídeo C-Polybia-MPII apresentou 12% de α -hélice em água, 67% em TFE e 66% em SDS, sempre havendo uma maior proporção de hélice no

peptídeo modificado quando comparado com sua sequência natural em que se verifica um aumento de 58,34% em água, 25,37% em TFE e 10,6% em SDS.

A conformação de folha- β apresenta 39% da estrutura em água, 7% em TFE e 6% em SDS para o peptídeo Polybia-MPII; sendo 31% em água, 1% em TFE e 4% em SDS para o C-Polybia-MPII. Neste caso, averigua-se uma predominância de porcentagens estruturais do peptídeo Polybia-MPII em relação ao seu cisteinilado, pois apresenta uma porcentagem de estrutura de 20,51% maior em água, 81,71% em TFE e 33,33% em SDS.

Para as voltas, o peptídeo Polybia-MPII apresentou 21% de sua estrutura em água, 16% em TFE e 13% em SDS; o peptídeo cisteinilado apresentou 23% em água, 5% em TFE e 13% em SDS. Nessa condição, a maior disparidade está no experimento feito com TFE, em que o peptídeo Polybia-MPII apresenta uma porcentagem de estrutura 68,75% maior que a porcentagem apresentada pelo peptídeo C-Polybia-MPII; porém, também há uma menor diferença na condição de água em que o peptídeo modificado apresentou uma porcentagem de estrutura 8,69% maior que a sequência natural, e a mesma porcentagem em SDS.

E as formas randômicas obtiveram uma porcentagem de estrutura de 35% em água, 27% em TFE e 22% em SDS para o peptídeo Polybia-MPII; para o C-Polybia-MPII, houve uma porcentagem de 34% em água, 27% em TFE e 17% em SDS. Observa-se uma predominância dessa estrutura de 2,86% em Polybia-MPII em água e 22,73% em SDS, sendo a mesma porcentagem em TFE.

6.3 Ensaios de antibiose e desgranulação de mastócitos

Um peptídeo é formado pela união de vários aminoácidos através de ligações amida substituída, ligações peptídicas. A sequência dos resíduos de aminoácidos, estrutura primária, ditará a conformação que o peptídeo adotará, estrutura secundária. Em outras palavras, os resíduos de aminoácidos devem seguir alguns requisitos para que possam formar hélices α , folhas β e voltas (NELSON e COX, 2014, p. 115-156).

A formação de hélices α exige a presença de resíduos de aminoácidos que apresentem os átomos de conexão da cadeia principal capazes de aceitar ângulos φ e ψ ; os radicais dos resíduos adjacentes não devem ser de mesma carga para evitar repulsão; bem como radicais muito volumosos ou com formas incompatíveis como os dos aminoácidos asparagina (Asn), serina (Ser), treonina (Thr) e cisteína (Cys) os

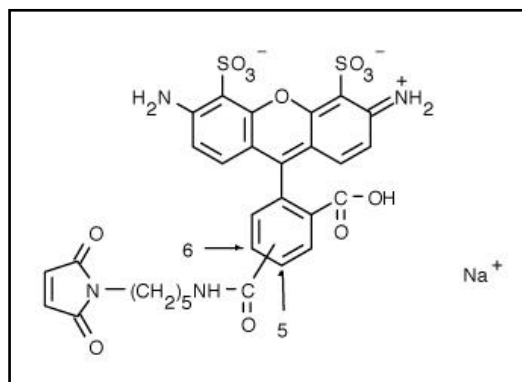
quais não devem estar em sequência para evitar deformações na hélice; os aminoácidos prolina (Pro) e glicina (Gly) devem ser evitados por apresentar rigidez na rotação da ligação N - C α e demasiada flexibilidade respectivamente; e os resíduos carregados negativamente, normalmente, encontram-se na extremidade amino terminal para estabilizar a carga positiva do dipolo da hélice, assim como ocorre com os resíduos carregados positivamente que se encontram na extremidade carboxiterminal. Desse modo, a estabilidade da hélice é garantida pela interação dos radicais dos aminoácidos que estão três ou quatro resíduos adiante de forma que os resíduos carregados positivamente estejam três ou quatro resíduos dos carregados negativamente, possibilitando a formação de pares iônicos; resíduos aromáticos são espaçados de maneira semelhante para a formação de interações hidrofóbicas (NELSON e COX, 2014, p. 115-156).

A cisteína é um aminoácido de radical polar não carregado, o que lhe confere maior solubilidade em água quando comparado com radicais hidrofóbicos. A polaridade do radical deste aminoácido é formada pela presença do grupo sulfidril, podendo fazer ligações de hidrogênio com o oxigênio ou nitrogênio, além de ser considerado um ácido fraco (NELSON e COX, 2014, p. 115-156). Essas características podem explicar a possível alteração de conformação do peptídeo Polybia-MPII com a adição da cisteína, de modo que seu sítio ativo tenha sido alterado e anulado sua atividade de antibiose em *E. coli*, *E. aerogenes* e *S. aureus*, além de aumentar cerca de 38,4 vezes a MIC para a inibição do crescimento de *S. pneumoniae* (Tabela 4) e diminuir 4,3 vezes o poder desgranulador a 250 $\mu\text{g/mL}$ do mastoparano sem a cisteína (Gráfico 1).

6.4 Acoplamento e purificação

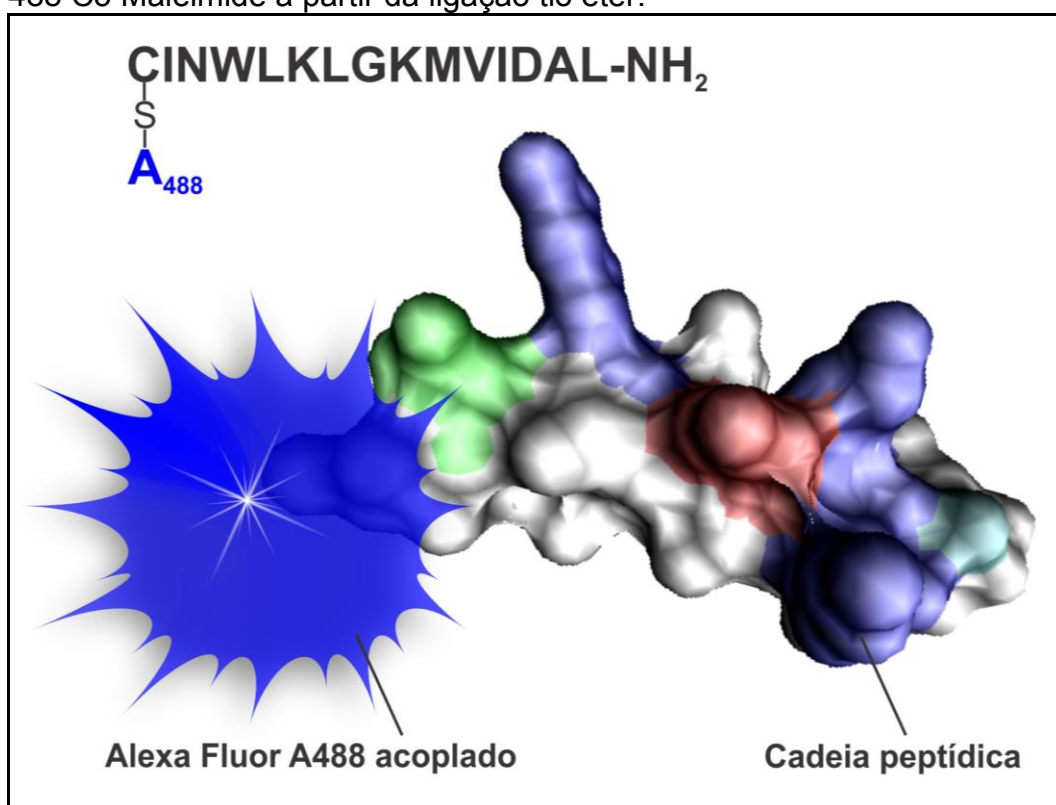
O fluoróforo utilizado, Alexa Fluor® 488 C5 Maleimide (Figura 16), apresenta cargas na periferia de sua molécula, o que lhe confere certa solubilidade em água. Este composto reage com o grupo tiol presente na cadeia lateral da cisteína adicionada ao Polybia-MPII e forma uma ligação tio éter (THERMO, 2017). Na figura 17, está representado um esquema mostrando uma sequência peptídica e esse acoplamento entre o grupo tiol e uma molécula de fluoróforo.

Figura 16: Estrutura molecular do Alexa fluor® 488 C5 Maleimide.



Fonte: THERMO, 2017.

Figura 17: Esquema adaptado de um peptídeo ligado ao Alexa Fluor® 488 C5 Maleimide a partir da ligação tio éter.

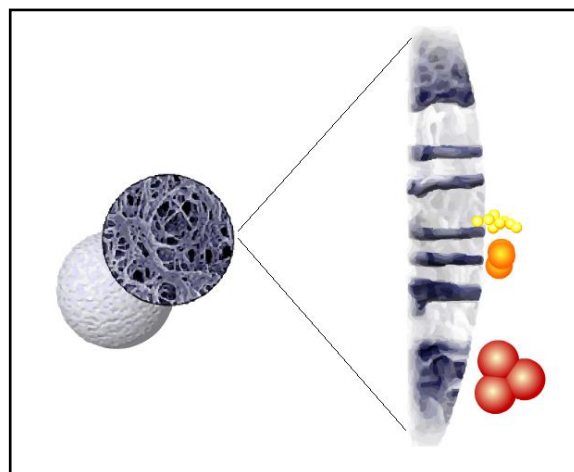


Fonte: DE SOUZA, 2009; BEST et al., 2015.

O acoplamento do fluoróforo ao peptídeo C-Polybia-MPII gera uma molécula de massa mais elevada que esses compostos separados. Essa propriedade foi utilizada para a purificação do peptídeo acoplado com o uso da resina Sephadex G-25 (Figura 18), em que a molécula com menor massa permeia a maioria dos poros da resina, como é o caso do fluoróforo não acoplado; e o composto com maior

massa não entra em todos os poros da resina, passando mais rapidamente pela coluna.

Figura 18: Esquema adaptado de uma unidade aproximada da resina Sephadex G-25 Medium.



Fonte: GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES, 2006.

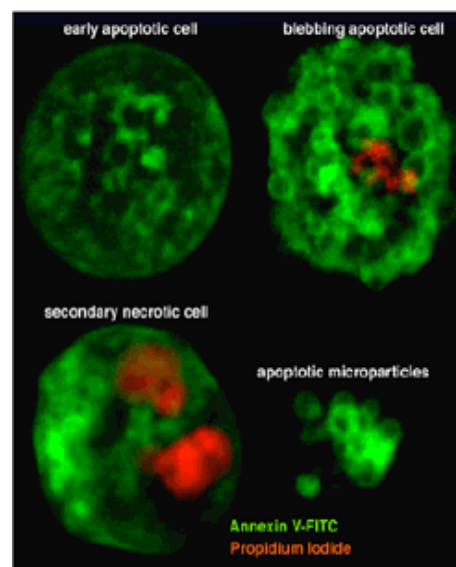
6.5 Microscopia de fluorescência

As células sanguíneas normais apresentam uma certa assimetria fosfolipídica, de modo que o folheto exterior de suas membranas plasmáticas apresenta, predominantemente, fosfatidilcolinas e esfingomielinas; e o folheto interno fosfatidiletanolaminas e fosfatidilserinas. O composto annexin V, utilizado para corar a membrana celular dos mastócitos deste trabalho, liga-se preferencialmente em cargas negativas como as da fosfatidilserinas que, como dito anteriormente, estão principalmente no folheto interno da membrana plasmática. Quando há uma desorganização da membrana, a fosfatidilserina é externalizada como parte do mecanismo de troca de fosfolipídeos, conhecido como *flip-flop*, o que permite a membrana plasmática ser corada pela annexin V (KOOPMAN, 1994, v. 84, n. 5, p. 1415-1420).

O iodeto de propídio é um intercalante molecular de DNA, deixando este com uma coloração vermelha. Este composto somente consegue entrar na célula e realizar sua marcação quando a membrana plasmática apresentar certa permeabilidade, pois se trata de um marcador de DNA com elevado peso molecular que não consegue permear a bicamada lipídica por causa do seu tamanho (STUNM et al., 2010). Além disso, esse intercalante também necessita que o peptídeo de interesse permeabilize de alguma maneira o envoltório nuclear. Desse modo, consegue-se diferenciar células viáveis daquelas que apresentam início de

desorganização membranar, que apresentam apenas uma marcação verde da annexin V devido à externalização da fosfatidilserina, assim como as células em que o processo de desorganização está mais avançado que permite a entrada do iodeto de propídio (PI) onde se observa a marcação verde da membrana plasmática e vermelha do material genético (Figura 19).

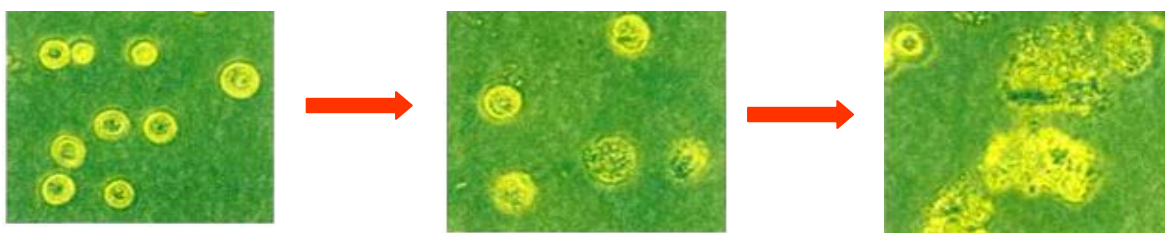
Figura 19: Microscopia de fluorescência de hepatócitos em diferentes estágios de apoptose e necrose marcados com annexin V e PI. Na célula de início de apoptose se observa o começo da desorganização membranar em que a fosfatidilserina começa a ser externalizada, permitindo a ligação com a annexin V resultando na coloração verde de toda a célula. Os estágios mais avançados de apoptose e necrose apresentam uma coloração verde mais intensa, demonstrando uma maior desorganização na membrana plasmática que é evidenciada pela entrada do PI que marca o material genético de vermelho.



Fonte: STUNM et al., 2010.

É possível observar na figura 20 que as fosfatidilserinas também estão presentes, ainda que em menor proporção, no folheto externo da membrana plasmática de mastócito pela formação de um anel ao redor da célula que, depois do primeiro contato com mastoparanos, começa a desorganização membranar evidenciada pela coloração mais uniforme de toda a superfície celular e, após um maior tempo de incubação ocorre a lise celular.

Figura 20: Foto de microscopia de fluorescência de mastócitos intactos (esquerda), incubados por 5 min com um mastoparano (meio) e depois de 10 min de incubação com o mastoparano (direita), sendo corados com annexin V.



Fonte: NAKAYAMA, 1994.

A desorganização membranar evidenciada pelas figuras 11 a 13 corroboram com a hipótese de Rocha et al. (2008, v. 71, n. 3, p. 220–229), de que o mastoparano Polybia-MPII poderia causar a formação de poros como uma consequência de uma perturbação físico-química da membrana plasmática, que pode ser vista na figura 11 pela coloração verde do mastócito devido à mudança de posições das fosfatidilserinas do folheto interno para o externo, por uma movimentação do tipo *flip-flop*, possibilitando a ligação do corante annexin V com essa molécula. Na figura 12 pode-se verificar a entrada do intercalante molecular iodeto de propídio pelos poros formados, já que apresenta massa molecular muito elevada para permear a membrana plasmática intacta e corar o material genético de vermelho como visto nesta figura (STUNM et al., 2010).

O distúrbio físico-químico pode estar relacionado com uma mudança conformacional do peptídeo para hélice α mesmo em meios aquosos, o que lhe confere uma natureza anfifílica que possibilita a interação de sítios alifáticos da molécula com o interior hidrofóbico da membrana. Essa interação causaria um aumento considerável da permeabilidade às substâncias hidrofílicas e da atividade da fosfolipase A₂ citosólica (ROCHA et al., 2008, v. 71, n. 3, p. 220–229), o que explica a entrada do peptídeo Polybia-MPII na célula vista nas imagens obtidas por microscopia de fluorescência (figura 13C).

7 CONCLUSÕES

Foi utilizada a técnica de síntese manual de peptídeo em fase sólida por estratégia Fmoc com resultados esperados. Após os experimentos de purificação utilizando um sistema HPLC e análises para controle de qualidade das preparações,

como espectrometria de massas, concluímos que as amostras obtidas estavam dentro de padrão esperado para serem submetidas às análises subsequentes propostas neste projeto.

Assim como a redução nas atividades biológicas de antibiose e desgranulação de mastócito do peptídeo modificado (C-Polybia-MPII) em relação à sequência natural, a não execução dos testes biológicos com o peptídeo conjugado ao fluoróforo devido ao seu alto custo não foi um empecilho para a continuação do projeto, uma vez que conseguimos detectar a interação do mastoparano com a célula, corroborando com a teoria de formação de poro proposto por Rocha et al. (2008), que possibilitaria a entrada do peptídeo no interior da célula, atingindo a região citoplasmática.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4ª ed. Porto Alegre, Artmed Editora, 2004, p. 852-6.
- ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Isolation and characterization of two new peptides, mastoparan C and crabrolin, from of the european hornet, *Vespa crabro*. Washington, **J. Biol. Chem.**, v. 259, n. 16, p. 10106-11, 1984.
- BEST, R. B.; HOFMANN, H.; NETTELS, D.; SCHULER, B. Quantitative Interpretation of FRET Experiments via Molecular Simulation: Force Field and Validation. Rehovot, **Biophysical Journal**, v. 108, p. 2721-31, 2015.
- BRAIMA, C. **Estudo mostra como veneno de vespa brasileira pode matar células de câncer**: pesquisa explica como uma toxina do inseto ataca lipídeos nas membranas das células cancerosas, 2015. Disponível em: <
<http://oglobo.globo.com/sociedade/saude/estudo-mostra-como-veneno-de-vespa-brasileira-pode-matar-celulas-de-cancer-17373131>>. Acesso em: 28 fev. 2017.
- CASTRO, F. F. M. **Reações alérgicas por venenos de Hymenoptera**: experiência de 20 anos. São Paulo, 2001. 132p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica. Disciplina de Alergia e Imunologia. Universidade de São Paulo.
- CSORDÁS, A.; MICHL, H. Isolation and structure of a hemolytic polypeptide from the defensive secretion of European Bombina species. Wien, **Monatsh. Chem.**, v. 101, p. 182-9, 1970.
- DANILENKO, M.; WORLAND, P.; CARLSON, B.; SAUSVILLE, E. A.; SHARONI, Y. Selective effects of mastoparan analogs: separation of G-protein-directed and membrane perturbing actives. Orlando, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 196, n. 3, p. 1296-302, 1993.
- DE SOUZA, B. M.; DA SILVA, A. V. R.; RESENDE, V. M. F.; ARCURI, H. A.; CABRERA, M. P. S.; NETO, J. R.; PALMA, M. S. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptide from the venom of the social wasp *Polubia paulista*. Oxford, **Peptides**, v.26, p. 1387-95, 2009.
- DE SOUZA, B. M. **Estrutura e função de mastoparanos dos venenos de vespas**. 2006. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2006.
- DE SOUZA, B. M.; MARQUES, M. R.; TOMAZELA, D. M.; EBERLIN, M. N.; MENDES, M. A.; PALMA, M. S. Mass spectrometric characterization of two novel inflammatory peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. New Jersey, **Rap. Commun. Mass Spectrom.**, v. 18, p. 1095-1102, 2004.
- DE SOUZA, B. M.; MENDES, M. A.; SANTOS L. D.; MARQUES, M. R.; CÉSAR, L. M.; ALMEIDA, R. N.; PAGNOCCA, F. C.; KONNO, K.; PALMA, M. S. Structural and

functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. Oxford, **Peptides**, p. 2157-64, 2005.

ESHER, S. H. G. et al. Estudo dos métodos laboratoriais utilizados no diagnóstico de alergia a Hymenoptera: análise crítica. Rio de Janeiro, **Rev Bras Alerg Immunopatol.**, 2001. v. 24, n. 2, p. 46-53.

GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES. **The principle of gel filtration chromatography**, 2006. Disponível em:

<https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc29091645_20161014164320.swf>. Acesso em: 13 fev. 2017.

GILLOTT, C. **Entomology**. 2nd Ed. Nova York: Plenum Press, 1995. p. 324.

GRELL, L.; BUTARBUTAR, A. **Proteomics/Protein Separations:**

Chromatography/Reversed Phase, 2013. Disponível em:

<https://en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Protein_Separations_-_Chromatography/Reversed_Phase>. Acesso em: 03 fev. 2017.

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

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

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

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

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

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

JENNINGS, A.; DUGGAN, E.; PERRY, I. J.; HOURIHANE, J. O. Epidemiology of allergic reactions to hymenoptera stings in Irish school children. **Allergy Immunol.**, p. 1166-70, 2010.

JOSIC, D.; KOVAC, S. Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography of proteins. Totowa, **Methods in Molecular Biology**. v. 251, p. 9-22, 2010.

- KOOPMAN, C. P. M.; REUTELINGSPERGER, G. A. M.; KUIJTEN, R. M. J.; KEEHNEN, S. T.; PALS, .H. J.; VAN OERS. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Washington, **Blood**, v. 84, n. 5, p. 1415-20, 1994.
- KURODA, Y.; YOSHIOKA, M.; KUMAKURA, K.; KOBAYASHI, K.; NAKAJIMA, T. Effects of peptides on the release of catecholamines and adenine nucleotides from cultured adrenal chromaffin cells. Tokyo, **Proc. Jpn. Acad.**, v. 56, p. 660-4, 1980.
- MELLOR, I. R.; SANSOM, M. S. Ion-channel properties of mastoparan, a 14-residue peptide from wasp venom, and os MP3, a 12-residue analogue. London, **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol.**, v. 239, n. 1296, p. 383-400, 1990.
- MENDES, M. A.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua* (Suassure). Elmsford, **Toxicon**, v. 45, p. 101-6, 2005.
- MOUSNLI, M.; HUGLI, T. E.; LANDRY, Y.; BRONNER, C. A mechanism of action for anaphylatoxin C3a stimulation of mast cell. Baltimore, **J. Immunol.**, n. 8, v. 148, p. 2456-61, 1992.
- NAKAJIMA, T. Pharmacological biochemistry of vespid venoms. In: PIEK, T. (Ed.) **Venoms of the Hymenoptera: biochemical, pharmacological and behavioral aspects**. London, Academic Press Inc. Ltd., 1986. p.309-27.
- NAKAJIMA, T.; UZU, S.; WAKAMATSU, K.; SAITO, K.; MIYAZAWA, T.; YASUHARA, T.; TSUKAMOTO, Y.; FUJINO, M. Amphiphilic peptides in wasp venom. New York, **Biopolymers**, v. 25, p. 115-21. 1986.
- NAKAYAMA, K. **Structural characterization of biologically active peptides from of social wasps venoms**. 1994. 94 f. Monografia (Curso de farmácia) - Tokyo University, 1994.
- NELSON, D. L., COX, M. M. Estrutura tridimensional de proteínas. In: _____. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6th ed. Nova Iorque: Artmed, 2014. p. 115-56.
- OKUMURA, K.; INUI, K.; HIRAI, Y.; NAKAJIMA, T. The effect of mastoparan of of ion movement in black lipid membrane. Tokyo, **Biomed. Res.**, v. 2, p. 450-2, 1981.
- PARK, N. G.; YAMAMOTO, Y.; LEE, S.; SUGIHARA, G. Interaction of mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayers and its antimicrobial activity. New York, **Biopolymers**, v. 36, p. 793-801, 1995.
- PFEIFFER, D.; GUDZ, T. I.; NOVGORODOV, S. A.; ERDAHL, W. L. The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition. Washington, **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 9, p. 4923-32, 1995.

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

ROCHA, T.; LEONARDO, M. B.; DE SOUZA, B. M.; PALMA, M. S.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Mastoparan effects in skeletal muscle damage: an ultrastructural view until now concealed. Hanover, **Microscopy Research and Technique**, v. 71, n. 3, p. 220-9, 2008.

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

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

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

SHIMADZU. **Differences between using acetonitrile and methanol for reversed phase chromatography**, 2017. Disponível em: <<http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/35/35lab.html>>. Acesso em: 03 fev. 2017.

STUNM, A.; AMINO, R.; SAND, C. V.; REGER, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A. **GD IV – Material Complementar**: Glossário para a leitura do artigo “Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids” de Sturm et al. (2006), 2010. Disponível em: <lineu.icb.usp.br/~farmacia/matsup/GDIV/glossario.doc>. Acesso em: 16 fev. 2017.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Alexa fluor 488 annexin v/dead cell apoptosis kit**: Protocols, 2010. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/flow-cytometry-protocol/apoptosis/alexa-fluor-488-annexin-v-dead-cell-apoptosis-kit.html#prot6>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Alexa fluor 488 C₅ Maleimide**, 2017. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A10254>>. Acesso em: 14 fev. 2017.

THIOL-REACTIVE PROBES: pó. Eugene: Invitrogen, 2006. Bula do composto. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A10254>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

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

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. Ordem Hymenoptera: abelhas, vespas parasitárias, formigas, vespas e moscas-de-serra. In: _____. **Estudo dos insetos**. 7th ed. São Paulo: Cengage Learning, 2011. p. 483-559.

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

Prof. Dr. Mario Sérgio Palma
(Orientador)

Dra. Bibiana Monson de Souza
(Co-orientadora)

Kenny Umino Sato
(Aluno)