

Thaís Joanna Uzan

**Estudo da ação e interação de peptídeos antimicrobianos (PAMs) de
potencial anticancerígeno com modelos de membrana celular por
simulações computacionais**

São José do Rio Preto
2024

Thaisa Joanna Uzan

**Estudo da ação e interação de peptídeos antimicrobianos (PAMs) de
potencial anticancerígeno com modelos de membrana celular por
simulações computacionais**

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Suman de Araújo
Coorientadora: Dra. Ingrid Bernardes Santana Martins

São José do Rio Preto
2024

U99e

Uzan, Thaisa Joanna

Estudo da ação e interação de peptídeos antimicrobianos (PAMs) de potencial anticancerígeno com modelos de membrana celular por simulações computacionais / Thaisa Joanna Uzan. -- São José do Rio Preto, 2024

71 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Alexandre Suman de Araújo

Coorientadora: Ingrid Bernardes Santana Martins

1. Biofísica Molecular. 2. Dinâmica Molecular. 3. Peptídeos antimicrobianos. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Thaís Joanna Uzan

Estudo da ação e interação de peptídeos antimicrobianos (PAMs) de potencial anticancerígeno com modelos de membrana celular por simulações computacionais

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Alexandre Suman de Araújo (Orientador)
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Natália Bueno Leite Slade
UFTM – Uberaba

Profa. Dra. Manuela Leal da Silva
UFRJ – Câmpus de Macaé

São José do Rio Preto
02 de maio de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Mércia e Gilberto, a minha irmã Thamily e a meu namorado Lucas que me deram todo o apoio emocional e psicológico para continuar, sempre me incentivando e me ouvindo nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, o professor Alexandre e a minha coorientadora Ingrid, por tudo que me ensinaram ao longo deste projeto, por estarem sempre disponíveis para me ajudar em qualquer dificuldade e pela amizade que criamos.

Ao Ibilce, onde tive a oportunidade de não só me formar na graduação como agora, também, dou mais um passo na minha carreira acadêmica, e aos professores que compartilharam seu conhecimento e com quem pude aprender muito.

Agradeço também ao Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) por fornecer o poder computacional do supercomputador Santos Dumont e permitir que este trabalho fosse concluído.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço, pois sem este apoio este trabalho não seria possível.

RESUMO

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) apresentam atividade de amplo espectro, seu modo de ação consiste em perturbar a membrana celular da bactéria alvo através de interações eletrostáticas e hidrofóbicas que levam à inserção do peptídeo na bicamada. Devido a suas características, os PAMs têm sido estudados em diversas aplicações e provaram ser um candidato potencial no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de câncer. Membranas de células cancerígenas apresentam uma exposição de lipídios, como a fosfatidiletanolamina (PE), juntamente com lipídios negativamente carregados, como a fosfatidilserina (PS), na monocamada externa. Essa condição confere a essas células características semelhantes às das células bacterianas; isso sugere que os PAMs podem selecionar e agir efetivamente rompendo membranas de células tumorais. O peptídeo Polybia-MP1 é um peptídeo extraído da vespa Polybia Paulista, e apresenta ação anti bactericida de amplo espectro sem ser hemolítico ou citotóxico, o H-MP1 é um análogo sintético do MP1 onde as lisinas são substituídas por histidinas. Estudos experimentais *in vitro* mostraram que estes peptídeos possuem afinidade por membranas de células cancerígenas contendo o fosfolipídio PS, resultando na adsorção deles na bicamada e, consequentemente, causando perturbações, que resultam na formação de poros e vazamento. Neste trabalho foi investigada a interação dos peptídeos antimicrobianos MP1 e H-MP1 com um modelo mimético de membrana de célula cancerígena utilizando simulações de Dinâmica Molecular (DM). As simulações foram realizadas usando um modelo de membrana composto por fosfolipídios POPC e POPS na proporção 80:20, com os peptídeos desenovelados posicionados a uma distância de 10 Å da superfície da bicamada. O sistema foi solvatado em água e foram adicionados íons NaCl de modo a mimetizar o ambiente fisiológico. Através das simulações de DM foi possível observar em nível atômico o processo de adsorção dos peptídeos na bicamada e a estruturação dos resíduos em conformação alfa-hélice. A interação entre os peptídeos MP1 e H-MP1 e a bicamada causou distúrbios como alterações na espessura da membrana, na curvatura da superfície e diminuição do parâmetro de ordem (PO) dos fosfolipídios. Este estudo se concentrou em simulações com um único peptídeo adsorvendo na membrana, sendo possível visualizar apenas pequenas perturbações. No entanto, os resultados sugerem que os peptídeos tornam a membrana mais fluida e tem o potencial de induzir vazamento da membrana ou formação de poros com o aumento da concentração de peptídeos na superfície da membrana.

Palavras-chave: Peptídeos antimicrobianos. Membrana de célula cancerígena. Dinâmica Molecular.

ABSTRACT

Antimicrobial Peptides (AMPs) present a broad-spectrum activity, their mode of action consists of disturbing the cell membrane of the target bacteria through electrostatic and hydrophobic interactions that lead to the insertion of the peptide in the bilayer. Due to these characteristics, AMPs have been studied in several applications and proved to be a potential candidate in the development of new therapies for cancer treatment. Cancer cell membranes present an exposure of lipids, such as phosphatidylethanolamine (PE), together with negatively charged lipids, such as phosphatidylserine (PS), in the outer monolayer. This condition confers to these cells characteristics similar to those of bacterial cells; this suggests that AMPs can select and act efficiently in disrupting tumor cell membranes. The Polybia-MP1 is a peptide extracted from Polybia Paulista wasp, and has a broad spectrum anti-bactericidal action without being hemolytic or cytotoxic, H-MP1 is a synthetic analogue of MP1 where lysines are replaced by histidines. *In vitro* experimental studies have shown that these peptides have affinity for cancer cell membranes containing the PS phospholipid, resulting in their adsorption into the bilayer and, consequently, causing perturbations, which result in the formation of pores and leakage. In this work, was investigated the interaction of the antimicrobial peptides MP1 and H-MP1 with a mimetic model of cancer cell membrane using Molecular Dynamics (MD) simulations. The simulations were performed using a membrane model composed of POPC and POPS phospholipids in 80:20 ratio, with the unfolded peptides positioned at a distance of 10 Å from the bilayer surface. The system was solvated in water and NaCl ions were added in order to mimic the physiological environment. Through MD simulations it was possible to observe at the atomic level the process of adsorption of peptides in the bilayer and the structuring of residues into an alpha-helix conformation. The interaction between the MP1 and H-MP1 peptides and the bilayer caused disturbances such as changes in membrane thickness, surface curvature and decreased in the order parameter (OP) of phospholipids. This study focused on simulations with a single peptide absorbing into the membrane, making it possible to visualize only small perturbations. However, the results suggest that the peptides make the membrane more fluid and have the potential to induce membrane leakage or pore formation with increasing peptide concentration on the membrane surface.

Keywords: Antimicrobial peptides. Cancer Cell Membrane. Molecular Dynamics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos.	17
Figura 1.2 – Seletividade dos peptídeos antimicrobianos por membranas alvo. À esquerda, está representada a membrana de uma célula eucariótica, com a qual os PAMs possuem interações fracas; à direita, está representada uma membrana de bactéria, na qual os PAMs interagem fortemente.	18
Figura 1.3 – a) Representação de um fosfolipídio, composto por dois ácidos graxos e um grupo fosfato modificado ligado a uma cadeia de glicerol. b) Representação de uma bicamada lipídica, a cabeça polar dos fosfolipídios está voltada para a fase aquosa enquanto as caudas apolares se encontram no meio da bicamada.	20
Figura 1.4 – Esquema representativo comparando características das membranas celulares normais e tumorais quanto a sua composição lipídica e pH extracelular. A esquerda está representado a membrana celular normal e a direita a membrana celular cancerígena.	21
Figura 1.5 - Sequência de aminoácidos do peptídeo Polybia-MP1.	23
Figura 1.6 - Estruturas iniciais utilizadas para os peptídeos (a) MP1 e (b) H-MP1, que encontram-se desenovelados e coloridos da seguinte maneira: os resíduos não polares são representados em branco, os polares representados em verde, os resíduos básicos em azul e os resíduos ácidos em vermelho.	24
Figura 3.1 -Representação da caixa de simulação utilizada, contendo a bicamada de POPC (ciano) e POPS (verde), o peptídeo desenovelado (magenta), água (superfície transparente) e os íons Na ⁺ (azul) e Cl ⁻ (vermelho). Os peptídeos são adicionados na caixa com estrutura secundária em <i>random coil</i> e aproximadamente a uma distância de 10 Å da membrana.	38
Figura 4.1 - Representação do processo de adsorção dos peptídeos antimicrobianos (a) MP1 e (b) H-MP1. Os peptídeos MP1 e H-MP1 estão representados em verde e azul, respectivamente, e a membrana em cinza.	43
Figura 4.2 - Distância entre as diferentes regiões dos peptídeos ao centro de massa da bicamada lipídica, em (a) MP1 e (b) H-MP1 calculada durante todo o tempo de simulação. Considerando a região N-terminal (resíduo ILE1) representado em ciano, região C-terminal (resíduo LEU14) em roxo, e o centro de massa (CM) do peptídeo em preto	44

Figura 4.3 - Figura 4.3 - Processo de enovelamento do peptídeo MP. Em (a) no início da simulação, (b) com ~250 ns de simulação, (c) com ~500 ns de simulação, com (d) ~ 800 ns de simulação e (e) com ~1500 ns de simulação.	45
Figura 4.4 - Processo de enovelamento do peptídeo H-MP1. Em (a) no início da simulação, (b) com ~700 ns de simulação, (c) com ~1000 ns de simulação, com (d) ~1200 ns de simulação e (e) com ~1500 ns de simulação.	46
Figura 4.5 - Estrutura secundária de cada resíduo de aminoácido em função do tempo de simulação. (a) MP1 (b) H-MP1. Na cor magenta quando o resíduo apresenta estrutura secundária em α -hélice e em ciano quando o resíduo está em <i>random coil</i> .	48
Figura 4.6 - Distância das pontes salinas formadas entre os aminoácidos carregados dos peptídeos ao longo da simulação, em (a) MP1 e em (b) H-MP1	49
Figura 4.7 - Relação entre as ligações de hidrogênio com a água e com a bicamada e as pontes salinas formadas no peptídeo MP1 ao longo do tempo de simulação. No eixo à esquerda temos o número de ligações de hidrogênio e no da direita a distância das pontes salinas em Å. São mostradas as interações em cada resíduo, em (a) resíduo 2, (b) resíduo 4, (c) resíduo 5, (d) resíduo 8 e (e) resíduo 11.	52
Figura 4.8 - Relação entre as ligações de hidrogênio com a água e com a bicamada e as pontes salinas formadas no peptídeo H -MP1 ao longo do tempo de simulação. No eixo à esquerda temos o número de ligações de hidrogênio e no da direita a distância das pontes salinas em Å. São mostradas as interações em cada resíduo, em (a) resíduo 2, (b) resíduo 4, (c) resíduo 5, (d) resíduo 8 e (e) resíduo 11.	53
Figura 4.9 - Energias de interações eletrostáticas (em azul), de Van der Waals (em vermelho) e energia total (em preto) para os peptídeos (a) MP1 e (b) H-MP1 ao longo da simulação.	55
Figura 4.10 - Distribuição lipídica ao longo da superfície da bicamada para as simulações com os peptídeos (a) MP1 e (b) H-MP1.	56
Figura 4.11 - Área por lipídio ao longo da simulação para o (a) MP1 e (b) H-MP1, onde a área por lipídio total é representada em preto, a dos fosfolipídios POPC é representado em azul e de POPS em verde.	57
Figura 4.12 - Espessura da membrana ao longo da simulação para (a) MP1 e (b) H-MP1. Em verde está representada a espessura e em preto a sua média móvel.	58

- Figura 4.13** - Mapa de calor mostrando as variações na espessura da bicamada lipídica dos peptídeos (a) MP1 antes da adsorção e (b) MP1 após a adsorção. Cores mais quentes (vermelhos) indicam regiões mais espessas e cores mais frias (azuis) representam áreas mais finas na bicamada. 59
- Figura 4.14** - Mapa de calor mostrando as variações na espessura da bicamada lipídica dos peptídeos (a) H-MP1 antes da adsorção e (b) H-MP1 após a adsorção. Cores mais quentes (vermelhos) indicam regiões mais espessas e cores mais frias (azuis) representam áreas mais finas na bicamada. 60
- Figura 4.15** - Grid mostrando as curvaturas da superfície da membrana quando os peptídeos (a) MP1 e (b) H-MP1 estão adsorvidos. 61
- Figura 4.16** - Distribuição do desvio angular da curvatura na superfície da bicamada lipídica para os fosfolipídios POPC, representado em azul, e POPS, representado em verde, no início e no final da simulação. Em (a) para MP1 e em (b) para H-MP1. 62
- Figura 4.17** - Parâmetro de ordem das cadeias (a) saturadas e (b) insaturadas dos fosfolipídios da bicamada. Os cálculos foram feitos considerando os últimos 100 ns de simulação em que os peptídeos se encontram adsorvidos, MP1 é representado em ciano e H-MP1 em azul escuro, e também para 100 ns anteriores à adsorção dos peptídeos, onde MP1 é representado em preto e H-MP1 em cinza. 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMBER	<i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>
CHARMM	<i>Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics</i>
CUDA	<i>Compute Unified Device Architecture</i>
DM	Dinâmica Molecular
GROMOS	<i>GRoningen Molecular Simulation</i>
NAMD	<i>NAnoescale Molecular Dynamics</i>
PAMs	Peptídeos Antimicrobianos
PBC	<i>Periodic Boundary Conditions</i>
PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
POPE	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
POPS	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina
SM	Esfingomielina
SuAVE	<i>Surface Assessment Via grid Evaluation</i>
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

I – Ile	Isoleucina
D – Asp	Ácido aspártico
W – Trp	Triptofano
K – Lys	Lisina
L – Leu	Leucina
A – Ala	Alanina
Q – Gln	Glutamina
H – His	Histidina
mM	Milimolar
Å	Angstrom
μs	Microsegundo
fs	Femtosegundo
K	Kelvin
atm	Atmosfera
ns	Nanosegundo
kcal	Quilocaloria
mol	Mol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Resistência Antimicrobiana	14
1.2	Peptídeos Antimicrobianos	15
1.2.1	Mastoparanos	16
1.3	Mecanismo de Ação dos Peptídeos Antimicrobianos	17
1.4	Composição lipídica em membranas cancerígenas	19
1.5	Peptídeos MP1 e H-MP1	22
1.6	Dinâmica Molecular	25
1.6.1	Referencial teórico	26
1.6.2	Campos de Força	28
1.6.3	Minimização de energia	31
1.6.4	Algoritmos de integração	33
2	OBJETIVOS	35
3	METODOLOGIA	36
3.1	Montagem dos sistemas	36
3.2	Simulações	38
3.3	Análises	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
4.1	Processo de adsorção	42
4.1.1	Processo de enovelamento dos peptídeos	45
4.2	Análises de estrutura secundária, pontes salinas e ligações de hidrogênio	47
4.4	Análises da interação entre o peptídeo e a bicamada	54
4.3.1	Interações com a bicamada	54
4.3.2	Alterações na bicamada	57
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	64
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resistência Antimicrobiana

Nas últimas décadas, a resistência a antibióticos se tornou uma grande ameaça à saúde pública global. Com a resistência antimicrobiana, bactérias, vírus e parasitas não respondem mais aos medicamentos, de modo que antibióticos e outros medicamentos antimicrobianos se tornam ineficazes e as infecções ficam mais difíceis, ou até impossíveis, de tratar. Estudos apontam que infecções resistentes a antimicrobianos causam em torno de 4,95 milhões de mortes a cada ano em todo o mundo (MURRAY et al., 2022).

Apesar da resistência antimicrobiana ser um processo natural que ocorre devido a mutações genéticas em patógenos, o surgimento e a propagação de bactérias resistentes é acelerado pelo uso excessivo de antibióticos pelos sistemas de saúde e na agricultura (MELLON; BENBROOK; BENBROOK, 2001).

Na busca de novas estratégias e desenvolvimento de novos medicamentos antibacterianos, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) têm mostrado grande potencial e vêm sendo amplamente estudados a fim de que se possa compreender seus mecanismos de ação e suas possíveis aplicações terapêuticas (LUONG; THANH; TRAN, 2020).

Atualmente os PAMs são estudados em diversas aplicações, como no tratamento de feridas e infecções de pele, ao prevenir a proliferação de bactérias e promover a cicatrização (PFALZGRAFF; BRANDENBURG; WEINDL, 2018; SØRENSEN, 2016), como alternativa terapêutica para infecções na córnea (GRIFFITH; KASUS-JACOBI; PEREIRA, 2017), apresentaram alta eficácia no tratamento de infecções intestinais através de inibição da inflamação e aumento da barreira epitelial do intestino (YI et al., 2016), vêm sendo estudados no tratamento de infecções nos ossos (MELICHERČÍK et al., 2018) e também se mostraram potenciais candidatos no tratamento de câncer (BAXTER et al., 2017), sendo que esta última aplicação será o foco deste trabalho.

Embora procedimentos como quimioterapia e radioterapia sejam os mais utilizados no tratamento de câncer, tais aplicações apresentam desvantagens, como diversos efeitos colaterais, incluindo cardiotoxicidade e neurotoxicidade, além de resistência a múltiplas drogas. Mesmo com o surgimento de novas terapias direcionadas que apresentam melhores resultados, como a imunoterapia, elas apresentam um alto custo, além de não poderem ser aplicadas a todos os tipos de câncer. Assim, os peptídeos antimicrobianos com propriedades

anticancerígenas têm mostrado grande potencial no desenvolvimento de novas terapias. (BAXTER et al., 2017).

Estudos mostram que, devido às suas características, os peptídeos antimicrobianos possam selecionar e agir de modo eficiente em membranas tumorais, podendo causar uma ruptura da membrana, formação de poros ou permeação (LUONG; THANH; TRAN, 2020).

1.2 Peptídeos Antimicrobianos

Ao longo da evolução, um fator importante para a sobrevivência é a capacidade de todas as espécies, desde bactérias, insetos, anfíbios, aves, plantas e mamíferos, de resistir a microorganismos invasores por meio de um mecanismo envolvendo peptídeos antimicrobianos (PAMs) (WANG; LI; WANG, 2016). Os PAMs são componentes dos sistemas de defesa presentes em todos os organismos e são produzidos em todos os tipos de células, sendo importantes e eficazes no combate de patógenos invasores. Após uma infecção, os peptídeos antimicrobianos são prontamente sintetizados e disponibilizados para neutralizar micróbios ou outros invasores (PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012).

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas anfipáticas curtas, geralmente com menos de 50 resíduos de aminoácidos, com atividade antimicrobiana de amplo espectro, contra ambas as classes de bactérias, espécies Gram-positiva e Gram-negativa, e exibem vários modos de ação, incluindo propriedades bacteriostáticas, microbicidas e citolíticas (PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012). Além da atividade antimicrobiana, os PAMs podem também apresentar atividade antiviral, antifúngica, antiparasitária, anti-HIV, e antitumoral (HUAN et al., 2020).

Apesar dos PAMs apresentarem um alto grau de conservação da função antimicrobiana, há pouca conservação da sequência peptídica. A principal razão disso é a necessidade do sistema imunológico de se adaptar a diferentes condições fisiológicas, mantendo sua eficiência contra diferentes patógenos microbianos, que diferem em suas características de membrana (PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012).

Quanto a sua estrutura, os PAMs podem ser divididos em quatro categorias, incluindo peptídeos lineares de α -hélice, peptídeos de folha β , peptídeos com estrutura de extensão linear e peptídeos que apresentam tanto α -hélice como folha β (HUAN et al., 2020), mas também pode apresentar estruturas mais complexas (KOEHBACH; CRAIK, 2019).

Devido a diversidade de peptídeos antimicrobianos naturais, há diversas maneiras de classificá-los, tal classificação pode ser feita com base na sua fonte, na sua atividade, nas suas

características estruturais ou até em espécies ricas em aminoácidos específicos (HUAN et al., 2020).

1.2.1 Mastoparanos

Os PAMs podem ser classificados em várias famílias, sendo uma delas a família dos mastoparanos, que são peptídeos antimicrobianos de cadeias curtas, encontrados no veneno de diversas espécies de vespas. Trata-se de tetradecapeptídeos catiônicos com o C terminal amidado, ricos em aminoácidos básicos e hidrofóbicos, que lhes conferem uma estrutura anfipática, tais características são essenciais para sua atividade. (DOS SANTOS CABRERA et al., 2011, 2019; KONNO et al., 2019).

Uma das principais características dessa classe de peptídeos antimicrobianos é a sua propriedade catiônica, pois a carga líquida positiva é essencial para que ocorra interação inicial com a superfície carregada negativamente encontrada nas membranas de bactérias. Essa carga líquida geralmente varia entre +2 e +9, devido a maior quantidade de lisina e/ou arginina em comparação com ácidos aspártico e glutâmico encontradas na maioria dos PAMs (YOUNT; YEAMAN, 2005).

Em meio aquoso, os mastoparanos são frequentemente encontrados na sua forma desestruturada, porém adotam uma conformação helicoidal ao interagir com a interface hidrofóbica/hidrofílica das membranas lipídicas (DOS SANTOS CABRERA et al., 2019). Uma das estruturas secundárias mais comumente adotadas pelos PAMs é a α -hélice. Devido tanto a sua estrutura como ao seu caráter catiônico, esses peptídeos tendem a apresentar seletividade por membranas lipídicas aniônicas, características de bactérias (PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012).

Outra característica importante dos mastoparanos é a sua hidrofobicidade, que é definida pela proporção de resíduos hidrofóbicos no peptídeo e geralmente fica em torno de 50% para a maioria dos peptídeos. Estudos mostram que a hidrofobicidade pode definir a eficiência antimicrobiana na permeabilização da membrana, pois as interações eletrostática seguidas pelo particionamento hidrofóbico permitem que os PAMs sejam altamente solúveis em água e ainda capazes de interagir fortemente com bicamadas fosfolipídicas (GIANGASPERO; SANDRI; TOSSI, 2001). Porém, níveis muito altos de hidrofobicidade podem levar a perda da atividade antimicrobiana (YOUNT; YEAMAN, 2005) e ao aumento da toxicidade, pois em células eucarióticas peptídeos com maior hidrofobicidade apresentam

baixa solubilidade em soluções aquosas, de modo que se ligam também as membranas celulares eucarióticas (DENNISON et al., 2005).

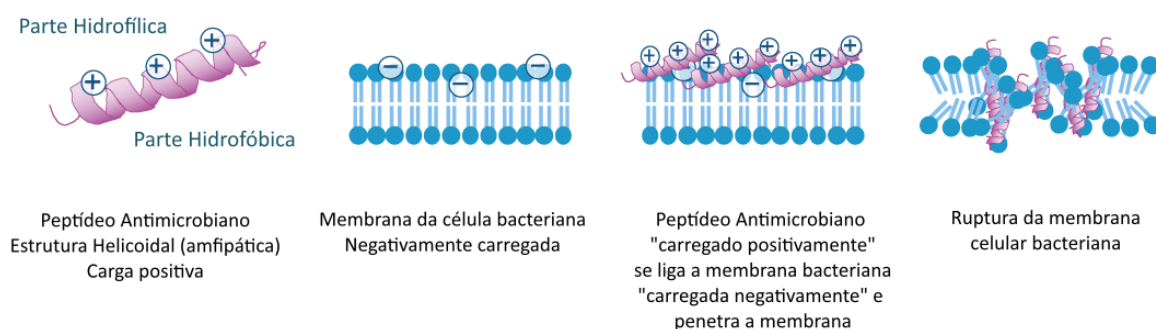
Devido às suas características promissoras os PAMs vêm sendo muito estudados no tratamento de diversas doenças e também no desenvolvimento de novos medicamentos e cosméticos (LUONG; THANH; TRAN, 2020).

1.3 Mecanismo de Ação dos Peptídeos Antimicrobianos

Podemos entender que a atividade dos PAMs é determinada por uma combinação de fatores, como carga líquida, hidrofobicidade, anfipaticidade, sequência, posição dos resíduos catiônicos e fluidez da membrana, no entanto, não há regra quanto ao número ideal de resíduos carregados e hidrofóbicos para se obter uma máxima atividade antimicrobiana e mínima toxicidade, pois isso varia entre diferentes peptídeos (PASUPULETI; SCHMIDTCHEN; MALMSTEN, 2012; SOUZA et al., 2015) .

Atuam através da perturbação da membrana bacteriana ou inibição das funções intracelulares das bactérias, seu mecanismo de ação consiste na adsorção dos peptídeos na bicamada, como mostrado na Figura 1.1. Após atingir uma certa concentração, os PAMs podem induzir formação de poros, causando lise celular, ou então entrar na célula e romper a membrana de organelas. (LUONG; THANH; TRAN, 2020).

Figura 1.1 - Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos.



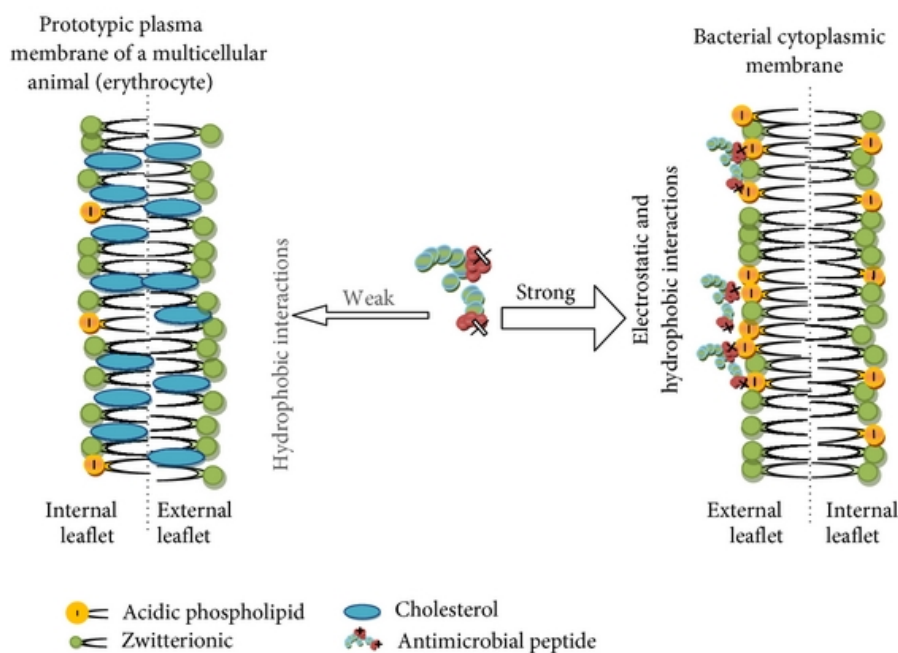
Fonte: <https://www.funpep.co.jp/en/pipeline-curepeptin>, traduzido pelo autor.

Observou-se que interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre peptídeos antimicrobianos e a membrana bacteriana leva a uma forte interação entre eles e, conseqüentemente, a uma inserção deste peptídeo na bicamada, que pode causar perturbações locais na membrana e alterações nas suas propriedades, podendo induzir tanto a uma mudança

na sua curvatura (SCHMIDT; WONG, 2013) como também alterações na espessura da membrana (FRANCO et al., 2022; GRAGE et al., 2016). Além disso, a adsorção de peptídeos carregados positivamente pode atrair lipídios de carga oposta para próximo do peptídeo, resultando na formação de domínios lipídicos (MAY; HARRIES; BEN-SHAUL, 2000).

PAMs atacam membranas bacterianas de modo seletivo, ou seja, matam os micróbios em concentrações que não causam toxicidade ao organismo. Tal seletividade, mostrada na Figura 1.2, é determinada principalmente pelas diferentes composições lipídicas encontradas nas membranas bacterianas e também por características físico-químicas dos PAMs, como sua propriedade catiônica e seu caráter anfipático (BOBONE; STELLA, 2019).

Figura 1.2 - Seletividade dos peptídeos antimicrobianos por membranas alvo. À esquerda, está representada a membrana de uma célula eucariótica, com a qual os PAMs possuem interações fracas; à direita, está representada uma membrana de bactéria, na qual os PAMs interagem fortemente.



Fonte: (EBENHAN et al., 2014)

Até o momento, discutimos o modo de ação dos peptídeos antimicrobianos em membranas bacterianas. No entanto, uma vez que este estudo visa investigar a ação anticancerígena desses peptídeos, torna-se crucial compreender a composição e as características específicas de membranas de células cancerígenas.

Células eucarióticas saudáveis apresentam uma certa assimetria na distribuição dos fosfolipídios na membrana celular, enquanto em células tumorais tal assimetria é perdida.

Células normais e cancerígenas se diferem estruturalmente uma da outra devido, principalmente, à maior carga negativa na monocamada externa de membrana de células malignas em comparação com a membrana externa predominantemente zwitteriônica de células saudáveis. Isso se deve à presença de moléculas aniônicas como fosfolipídios do tipo fosfatidilserina (PS), mucinas O-glicosiladas, gangliosídeos ciliados e sulfato de heparina nas membranas cancerígenas, que cria um microambiente tumoral ácido em seu entorno, além disso, membranas de células cancerígenas geralmente são mais fluidas do que as de células mamíferas comuns (SRIVASTAVA; PATRA, 2023).

1.4 Composição lipídica em membranas cancerígenas

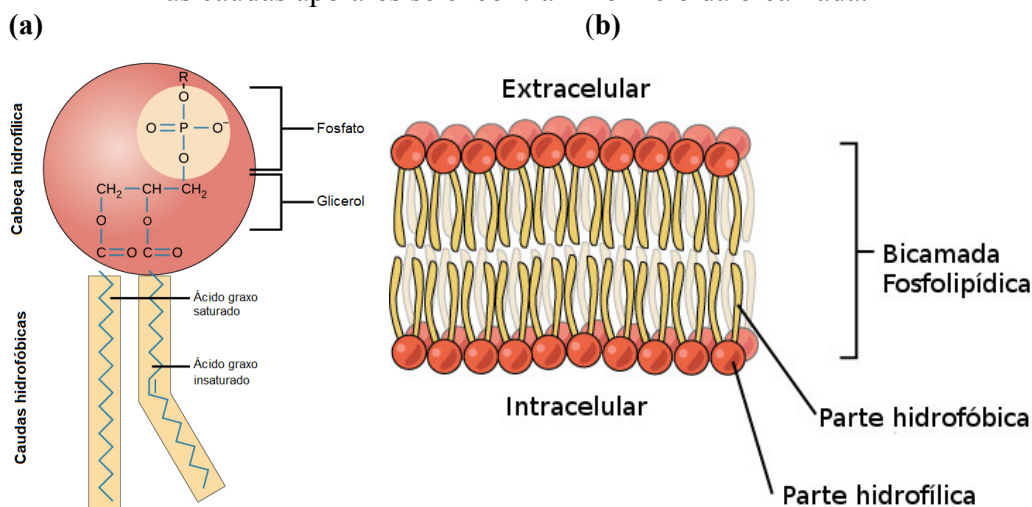
Lipídios são moléculas insolúveis em água que exercem diversas funções químicas e biológicas. Eles atuam no armazenamento de energia (WELTE; GOULD, 2017), transporte de elétrons (GREEN; FLEISCHER, 1963), no enovelamento de proteínas (BOGDANOV; DOWHAN, 1999) e são também os principais elementos estruturais das membranas biológicas (HARAYAMA; RIEZMAN, 2018).

Lipídios estruturais de membrana são conhecidos como fosfolipídios, eles são compostos por glicerol, duas caudas de ácido graxo e uma cabeça com um grupo de cadeias de fosfato, como mostrado na Figura 1.3a. Trata-se de uma molécula anfipática, formada por uma extremidade hidrofóbica (cauda) e uma hidrofílica (cabeça) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2013).

Na presença de água essas moléculas tendem a se ordenar de modo evitar o contato da região hidrofóbica com a água, podendo se organizar em uma dupla camada e formar uma membrana, de tal forma que as cabeças polares ficam em contato com as moléculas de água, enquanto as caudas apolares se encontram na parte interna da bicamada e protegidas da água, como mostra a Figura 1.3b (LEHNINGER; NELSON; COX, 2013).

As membranas celulares são principalmente compostas por fosfolipídios e proteínas, entretanto, o perfil lipídico das membranas é uma propriedade celular distinta e característica de cada célula, podendo apresentar diferentes composições lipídicas entre os tecidos, dependendo da função fisiológica da célula (LEHNINGER; NELSON; COX, 2013).

Figura 1.3 - a) Representação de um fosfolípido, composto por dois ácidos graxos e um grupo fosfato modificado ligado a uma cadeia de glicerol. b) Representação de uma bicamada lipídica, a cabeça polar dos fosfolípídios está voltada para a fase aquosa enquanto as caudas apolares se encontram no meio da bicamada.



Fonte: <https://openstax.org/books/biology-2e/pages/3-3-lipids>

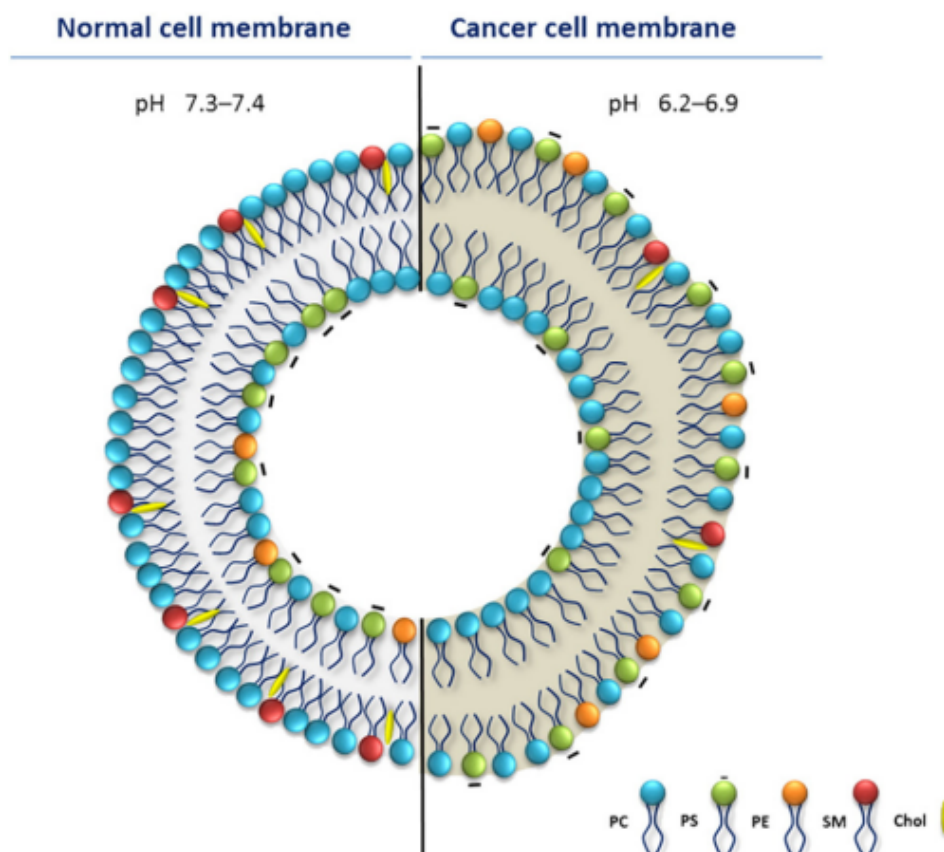
Em células comuns eucarióticas, a bicamada lipídica é predominantemente composta por lipídios do tipo fosfatidilcolina (PC), que se trata de um fosfolípido de membrana com carga neutra, presente tanto nas formas de éster e éter, que também pode ser citado como zwitterion, pois ele consiste em um grupo de cabeça de colina carregado positivamente e um substituinte de grupo de fosfato carregado negativamente (SZLASA et al., 2020).

Além de PC zwitteriônico, na camada externa da membrana saudável pode ser encontrado esfingomielina (SM) e colesterol, enquanto na camada interna podem ser encontrados outros fosfolípídios, como fosfatidiletanolamina (PE) e fosfolípídeos aniônicos, como fosfatidilserina (PS) (ALVES et al., 2016).

Em vários tipos de câncer é observada uma perda dessa distribuição assimétrica de fosfolípídios na membrana celular, resultando numa exposição de PS carregado negativamente para a camada externa da membrana, como pode ser observado na Figura 1.4, onde vemos a comparação das composições lipídicas em uma membrana de célula saudável e de célula cancerígena.

Além disso, foi relatado que também ocorre uma externalização dos fosfolípídios PE para a monocamada externa de membranas plasmáticas apoptóticas e tumorais. Isso ocorre devido ao fato dos fosfolípídios PS e PE serem co-regulados pelos mesmos transportadores, de modo que a exposição à monocamada externa de um deles, consequentemente, leva à exposição do outro (STAFFORD; THORPE, 2011).

Figura 1.4 - Esquema representativo comparando características das membranas celulares normais e tumorais quanto a sua composição lipídica e pH extracelular. A esquerda está representado a membrana celular normal e a direita a membrana celular cancerígena.



Fonte: (ALVES et al., 2016)

A fosfatidilserina é um fosfolípídio que consiste em dois ácidos graxos ligados em ligação éster aos carbonos C1 e C2 do glicerol e uma serina ligada a um fosfato que se liga ao carbono C3 do glicerol por meio de uma ligação fosfodiéster (LEHNINGER; NELSON; COX, 2013b).

O principal papel do PS em células normais é a sinalização da apoptose celular, essa sinalização ocorre quando PS passa para a camada externa da membrana celular devido a ação da proteína transportadora flippase (HANKINS et al., 2015). Fisiologicamente PS só é exposto na superfície celular durante a apoptose, enquanto em células tumorais esse processo está presente também durante o processo oxidativo celular, devido a isso, o excesso de PS na camada externa da membrana é considerado um marcador tumoral (SZLASA et al., 2020).

Estudos mostram que fosfatidilserina é exposta na superfície de células cancerígenas de modo a evitar a resposta autoimune do organismo, dessa forma a célula com câncer passa a não ser reconhecida como uma ameaça (BIRGE et al., 2016). A exposição desses lipídios na

superfície das membranas de células cancerígenas é um fator importante para a atividade antitumoral de peptídeos antimicrobianos, uma vez que eles apresentam maior seletividade por membranas carregadas negativamente (HARRIS et al., 2013).

Ainda vale ressaltar que não só a célula cancerosa sofre alterações, mas também o microambiente ao seu redor, que passa a apresentar pH acidificado. Esse cenário favorece a sobrevivência e o crescimento de células tumorais em comparação com células saudáveis (HUBER et al., 2017; ROHANI et al., 2019). Desse modo, medicamentos anticancerígenos podem interagir com as membranas biológicas de acordo com o seu estado de carga, que depende sobretudo do pH de cada microambiente encontrado (ALVES et al., 2016). Neste trabalho também será levado em conta este fator.

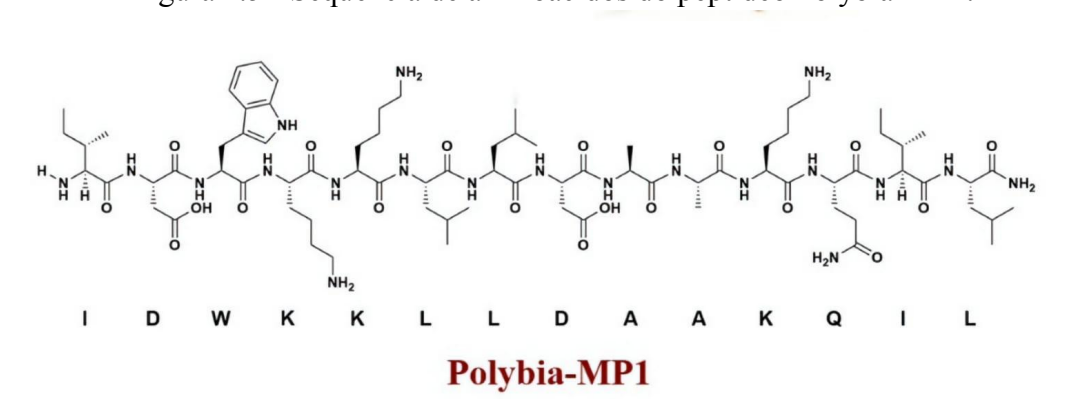
Membranas biológicas reais são complexas e compostas por diversos tipos de lipídios e proteínas, entretanto, em experimentos *in vitro* e simulações computacionais é comum utilizar modelos de membranas simplificadas, utilizando menos componentes, ou apenas alguns tipos de lipídios, de modo a mimetizar o arranjo lipídico de membranas reais e possibilitar o estudo destes sistemas, permitindo assim a investigação de suas propriedades e obtenção de informações em nível molecular (SAIZ; KLEIN, 2002).

1.5 Peptídeos MP1 e HMP1

O peptídeo antimicrobiano Polybia-MP1, ou simplesmente MP1, é um peptídeo da família dos mastoparanos, extraído do veneno da vespa brasileira Polybia Paulista. Sua sequência primária (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂), que pode ser observada na Figura 1.5, contém dois resíduos ácidos (D2 e D8) e três resíduos básicos (K4, K5 e K11), que somados ao N terminal carregado positivamente conferem ao peptídeo uma carga líquida de +2, em pH neutro.

Essa distribuição dos resíduos ácidos e básicos estabiliza sua estrutura anfipática, aumentando consequentemente sua atividade lítica e afinidade pela bicamada aniônica (LEITE et al., 2011).

Figura 1.5 - Sequência de aminoácidos do peptídeo Polybia-MP1.



Fonte: (XUAN et al., 2021)

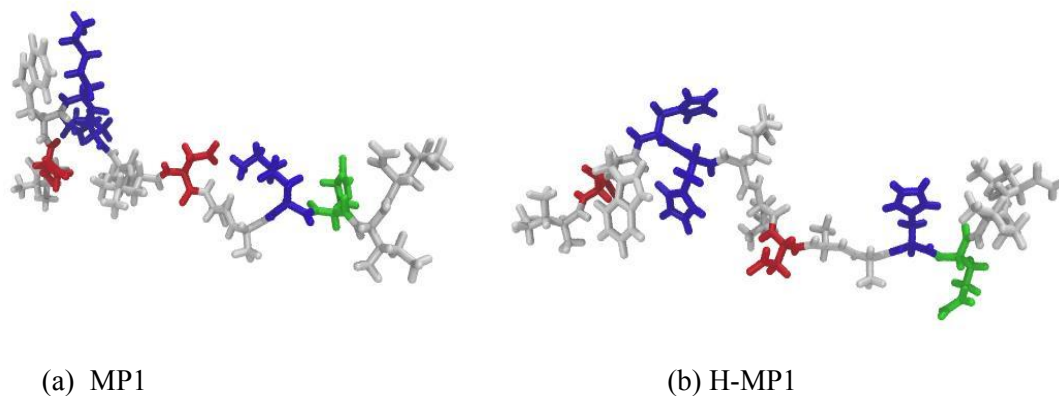
O MP1 apresenta amplo espectro contra ambas as classes de bactérias, Gram positivas e Gram negativas, sem ser hemolítico ou citotóxico. Além disso, mostrou inibição seletiva contra vários tipos de células cancerígenas, apresentou inibição da proliferação de células cancerígenas da próstata e bexiga (WANG et al., 2008), efetividade contra células leucêmicas multirresistentes (WANG et al., 2009), teve atividade tumoricida observada em estudos *in vivo* com ratos (ZHANG et al., 2010) e também apresentou atividade contra linfócitos T leucêmicos humanos (células Jurkat) (DOS SANTOS CABRERA et al., 2012).

Um análogo ao peptídeo MP1 é o peptídeo sintético H-MP1 (IDWHHLLDAAHQIL-NH₂), no qual as lisinas são substituídas por histidinas, apresentando uma carga líquida de -1 em pH neutro, mas é catiônico em ambiente ácido. A estratégia de substituir resíduos de lisina por histidina vem sendo utilizada em alguns estudos para aumentar a seletividade e ação desses peptídeos em ambientes ácidos (VOGT; BECHINGER, 1999).

Além disso, em estudos com peptídeos ricos em histidinas foi observado uma diminuição da toxicidade em células saudáveis, isso devido a maior sensibilidade que esses peptídeos adquirem com a mudança de pH que ocorre no meio próximo às células tumorais (MAKOVITZKI; FINK; SHAI, 2009).

A distribuição de resíduos ácidos e básicos ao longo da estrutura dos peptídeos MP1 e HMP1 leva à formação de uma estrutura em hélice quando em contato com a interface hidrofóbica/hidrofílica da membrana, e de acordo com estudos experimentais *in vitro*, os resíduos básicos desempenham papel importante na afinidade do MP1 com vesículas aniônicas e zwitteriônicas. Na figura 1.6 estão representados ambos os peptídeos e seus aminoácidos estão coloridos de acordo com sua classificação físico-química.

Figura 1.6 - Estruturas iniciais utilizadas para os peptídeos (a) MP1 e (b) H-MP1, que encontram-se desenovelados e coloridos da seguinte maneira: os resíduos não polares são representados em branco, os polares representados em verde, os resíduos básicos em azul e os resíduos ácidos em vermelho.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido a atividade antimicrobiana, sua afinidade por membranas carregadas negativamente e suas propriedades eletrostáticas e hidrofóbicas, tais peptídeos vem sendo amplamente estudados em aplicações adicionais à atividade antimicrobiana, uma dessas aplicações é na ação lítica sobre células cancerígenas.

Estudos experimentais utilizando técnicas de imagem, realizados com o peptídeo MP1 mostraram que este apresenta grande afinidade por membranas contendo fosfolipídios do tipo PS, e que tal interação resulta na permeabilização da membrana pelo MP1, mesmo em baixas concentrações. Ainda foi observado que em maiores concentrações ou em composições lipídicas com PS e PE pode ocorrer formação de poros na membrana e, consequentemente, lise celular (ALVARES; RUGGIERO NETO; AMBROGGIO, 2017; LEITE et al., 2015). Desse modo, assim como feito em alguns estudos experimentais *in vitro* (DOS SANTOS CABRERA et al., 2012; LEITE et al., 2015), podemos considerar uma membrana composta por porcentagens específicas de fosfolipídeos dos tipos PC e PS como um mimético de membrana cancerígena.

Apesar da grande importância desses estudos, as técnicas experimentais *in vitro* utilizadas apresentam algumas limitações, não sendo possível obter detalhes em nível atômico/molecular de tais sistemas. Desse modo, a fim de realizar novas análises e compreender melhor o processo de adsorção e a interação dos peptídeos antimicrobianos MP1 e H-MP1 com membranas miméticas de células cancerígenas, é interessante fazer o uso de simulações computacionais. No estudo de sistemas biológicos uma das técnicas de simulação mais utilizada é a Dinâmica Molecular (LEACH, 2001).

1.6 Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular (DM) consiste em um método de simulação computacional utilizado para estudar a nível atômico/molecular a evolução temporal de um conjunto de átomos interagindo em um sistema biomolecular, de modo que é possível obter propriedades do sistema de interesse e detalhes microscópicos que não são possível apenas com técnicas experimentais (LEACH, 2001; RAPAPORT, 2004).

As simulações computacionais surgiram como uma das primeiras ferramentas usadas nos primeiros computadores que surgiram durante a Segunda Guerra Mundial, criados para executar cálculos envolvidos em desvendar códigos e desenvolver armas nucleares. Quando finalmente os computadores foram disponibilizados para pesquisas em universidades, um dos primeiros problemas abordados foi a simulação numérica de líquidos densos (FRENKEL; SMIT, 2002). A primeira simulação de um líquido foi realizada em 1953 por N. Metropolis utilizando o método de simulação de Monte Carlo (METROPOLIS et al., 1953).

As primeiras simulações de Dinâmica Molecular só foram realizadas alguns anos depois, em 1957, por B. J. Alder e T. E. Wainwright. Eles fizeram uso de um modelo de esferas rígidas e consideraram que os átomos interagem por meio de colisões perfeitas (ALDER; WAINWRIGHT, 1957). Com o aperfeiçoamento do método, surgiram potenciais de interação mais realísticos para simulações de sistemas líquidos, e a primeira simulação deste tipo foi realizada em 1974 por F. H. Stillinger e A. J. Rahman (STILLINGER; RAHMAN, 1974).

Os avanços computacionais, juntamente com o desenvolvimento de novos potenciais de interação permitiram a simulação de sistemas biológicos mais complexos. A primeira simulação de uma proteína foi realizada em 1977 por J. A. McCammon com o intuito de estudar o inibidor de tripsina pancreática bovino (MCCAMMON; GELIN; KARPLUS, 1977), tal estudo foi muito importante para a compreensão de que as proteínas são estruturas dinâmica e que desempenham papéis funcionais (KARPLUS; MCCAMMON, 2002). Já a primeira simulação de uma bicamada lipídica foi realizada em 1982, por Berendsen e Van Der Ploeg (VAN DER PLOEG; BERENDSEN, 1982).

Desde então, as simulações de Dinâmica Molecular vem sendo amplamente utilizadas no estudo de diversos sistemas biológicos quando se quer observar processos dinâmicos ao longo do tempo, como por exemplo, o enovelamento de proteínas (LINDORFF-LARSEN et al., 2011), transporte entre membranas (BUCH; GIORGINO; DE FABRITIIS, 2011), mudanças conformacionais de proteínas (HIRANO et al., 2021), ligação de ligantes

(PROVASI et al., 2011) ou interações entre uma membrana e uma proteína (CHAKRABORTY et al., 2021).

A precisão e a confiabilidade dos resultados obtidos por DM dependem muito da modelagem utilizada. Na modelagem mais detalhada, utiliza-se a Mecânica Quântica, entretanto, quando se trabalha com sistemas com muitos átomos, os cálculos se tornam muito extensos e o custo computacional é muito alto, de modo que tal modelagem se torna inviável computacionalmente. Por outro lado, é possível utilizar a modelagem *coarse-grained*, onde os átomos são modelados de forma simplificada e um grupo de átomos são representados por um único sítio, de modo que interações como pontes de hidrogênio não são explicitamente modeladas. Apesar de ser uma modelagem útil quando se quer estudar sistemas muito grandes ou complexos, há a desvantagem de que não é possível observar com muitos detalhes processos envolvendo interações específicas.

Na Dinâmica Molecular de todos os átomos, abordagem utilizada neste trabalho, são modelados todos os átomos do sistema de interesse e suas interações são calculadas através de uma função potencial clássica que engloba de forma efetiva os efeitos complexos das interações quânticas, a fim de reproduzir com certa precisão o comportamento de um sistema real e com um custo computacional viável.

Neste trabalho foram utilizadas simulações de DM a fim de observar a ação e interação dos peptídeos antimicrobianos MP1 e H-MP1 com bicamadas lipídicas miméticas de células cancerosas, a fim de entender como as perturbações causadas pelo peptídeo na membrana estão relacionadas com sua atividade anticâncer.

1.6.1 Referencial teórico

Nas simulações de Dinâmica Molecular a evolução temporal das posições e velocidades dos átomos do sistema estudado são obtidas ao integrar as equações de movimento de Newton a seguir, para cada um dos átomos do sistema:

$$\vec{F}_i(t) = m_i \cdot \vec{a}_i = m_i \cdot \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2}. \quad (1)$$

Essa equação descreve a força $F_i(t)$ resultante que atua sobre uma partícula i de massa m_i , na posição $\vec{r}_i$, em um instante de tempo t . Assim, dadas as posições e velocidades iniciais,

as massas e as forças de interação que atuam sobre cada partícula, é possível obter a trajetória de cada átomo ao longo do tempo.

As forças que atuam sobre cada um dos átomos são obtidas ao calcular o gradiente da função potencial em relação às posições dos átomos:

$$F_i = -\nabla V(\vec{r}_i) \quad (2)$$

Esta função potencial, que descreve a interação entre os átomos, é representada por um campo de força, que descreve classicamente as interações entre os átomos do sistema, mas que engloba de forma efetiva os efeitos complexos das interações quânticas (LEACH, 2001).

Devido ao elevado número de átomos presentes em sistemas contendo macromoléculas biológicas, é atualmente impossível descrever computacionalmente as moléculas destes sistemas utilizando a Mecânica Quântica. Assim, é utilizada a aproximação de Born-Oppenheimer, implementada pela divisão do Hamiltoniano do sistema, separando o movimento do núcleo do movimento dos elétrons. Leva-se em conta que a massa do núcleo é muito maior do que a dos elétrons e que, portanto, os núcleos se movem mais lentamente. Dessa forma, os elétrons percebem o núcleo como se este estivesse praticamente estático e são capazes de se adequar rapidamente a qualquer disposição nuclear (KERLEY, [s.d.]).

A partir do cálculo das forças é possível resolver as equações de movimento de Newton descritas em (1), de modo que obtemos as trajetórias de cada um dos átomos ao longo do tempo. A cada passo da Dinâmica Molecular essas forças são recalculadas por meio de um processo iterativo, obtendo-se a cada passo novas posições e velocidades para os átomos. Devido ao elevado número de átomos presentes em sistemas biológicos, essas equações devem ser resolvidas numericamente, uma vez que não é possível obter a solução de forma analítica.

Na Dinâmica Molecular é necessário o uso de algumas técnicas e conceitos para que as simulações dos sistemas a serem estudados sejam feitas da forma mais realista possível.

Os sistemas líquidos estudados, a princípio, deveriam ter tamanho praticamente infinito, entretanto, essa abordagem é computacionalmente inviável. Ao realizar simulações de DM é necessário construir uma caixa de simulação com número finito de partículas, de modo que temos um sistema restrito e com alguns efeitos de borda. Para contornar tais problemas é necessário utilizar Condições Periódicas de Contorno (PBC, do inglês *Periodic Boundary Conditions*). Nessa técnica, são simuladas infinitas réplicas ao redor da caixa

central, dessa forma, quando um átomo sai da caixa um átomo idêntico entra na caixa pelo lado oposto com mesma velocidade, mantendo o número de partículas constante na caixa de simulação (FRENKEL; SMIT, 2002).

Além disso, os campos de força utilizados nas simulações de DM consideram termos de interações entre átomos que não estão covalentemente ligados com seus átomos vizinhos, dessa forma, com o uso de PBC tais interações deveriam ser consideradas entre cada átomo e os átomos das infinitas caixas ao redor da caixa central, porém, o cálculo de tais interações não é possível computacionalmente.

Uma alternativa é a utilização de um raio de corte, a partir do qual tais interações não são consideradas, que funciona bem para interações não ligadas de curto alcance, entretanto, para interações de longo alcance a melhor abordagem é utilizar o método de soma de Ewald (PME, do inglês *Particle Mesh Ewald*), que consiste em separar a função potencial em componentes de curto e longo alcance. A contribuição de curto alcance é calculada no espaço real a partir de interações partícula-partícula, enquanto a contribuição de longo alcance é calculada a partir de métodos de malha de partículas, usando uma transformada de Fourier. Tal método requer que o sistema possua carga neutra para calcular com precisão a interação coulombiana total, trata-se de um método com alta precisão e velocidade (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993).

Também são utilizados algoritmos de controle de temperatura e pressão para que as simulações sejam realizadas num *ensemble* isotérmico isobárico (NPT), onde é mantido fixo o número de partículas e o sistema se encontra em contato com reservatórios de temperatura e pressão. Isso é importante pois os sistemas simulados são validados com base em resultados experimentais e, geralmente, os experimentos são realizados em condições em que a temperatura e pressão são mantidas constantes, de modo que é necessário realizar as simulações nas mesmas condições (LEACH, 2001).

1.6.2 Campos de Força

Um campo de força descreve um sistema com muitos átomos considerando termos que levam em conta a interação de átomos ligados covalentemente entre si, descritos por um potencial de interação intramolecular com termos harmônicos e um termo torcional. Também leva em conta as interações entre átomos não ligados covalentemente, que são descritos por um potencial de interação intermolecular, com termos de interações de curto alcance,

combinadas no termo de Lennard-Jones, e de longo alcance, descritas por termos eletrostáticos (DRIGO FILHO, 2019).

Os termos harmônicos modelam os átomos como se fossem partículas ligadas por molas, e os comprimentos das ligações químicas oscilam em torno de um valor de equilíbrio, de modo que obedecem a função potencial de Hooke, que é dada por:

$$V_b = \frac{1}{2}K_b(b - b_0)^2, \quad (3)$$

onde K_b é a constante de Hooke associada a ligação química, b é o comprimento da ligação em um instante qualquer e b_0 é o comprimento da ligação no equilíbrio.

Da mesma forma, os termos harmônicos descrevem as oscilações dos ângulos entre ligações químicas vizinhas:

$$V_\theta = \frac{1}{2}K_\theta(\theta - \theta_0)^2, \quad (4)$$

onde K_θ é a constante de Hooke associada ao ângulo entre as ligações, θ é o ângulo entre duas ligações químicas e θ_0 é o ângulo entre duas ligações químicas no equilíbrio.

Além disso, é considerado um termo harmônico, chamado de potencial diedral impróprio, para manter a estrutura tridimensional em um conjunto de quatro átomos i, j, k e l, considerando que um átomo central é ligado a três outros átomos de maneira que:

$$V_\xi = \frac{1}{2}K_\xi(\xi - \xi_0)^2, \quad (5)$$

onde K_ξ é a constante de Hooke associada ao ângulo entre os dois planos, ξ é o ângulo entre o plano formado pelos átomos i-j-k e o plano formado pelos átomos j-k-l, e ξ_0 é o ângulo de equilíbrio entre esses dois planos.

O termo torcional, chamado de diedral próprio, que modela as rotações em torno das ligações químicas, descrevendo a energia associada aos ângulos de rotação entre átomos ao longo de cada ligação, e é descrito por:

$$V_\varphi = \frac{1}{2}K_\varphi[1 + \cos(n\varphi - \delta)], \quad (6)$$

onde K_φ define a barreira de rotação, n é o número de mínimos de energia para a torção de determinada ligação química, φ é o ângulo diedral para a ligação central em uma sequência de quatro átomos e δ é a defasagem do ângulo diedral. Como o potencial torcional tem caráter periódico, podemos entendê-lo como uma série de Fourier truncada.

As interações entre átomos não ligados pode ser descrita pelo potencial de Lennard-Jones, que combina termos de interações de maior e menor alcance. Um par de átomos que se encontra a uma curta distância está sujeito a uma força repulsiva, devido a sobreposição dos orbitais eletrônicos, e também sujeito a uma força atrativa, devida a forças de Van der Waals:

$$V_{LJ} = 4\epsilon_{ij}[(\frac{\sigma}{r})^{12} - (\frac{\sigma}{r})^6]. \quad (7)$$

O primeiro termo da equação é associado a repulsão e é de curtíssimo alcance, enquanto o segundo termo é associado a atração dos átomos e é relativamente de curto alcance, ϵ é o parâmetro que mede a profundidade do poço entre a barreira atrativa e a repulsiva, σ é o diâmetro de Lennard-Jones e r é a distância que separa os núcleos do par de átomos. Os parâmetros ϵ e σ são ajustados para reproduzir dados experimentais e cálculos teóricos

Além disso, também é preciso levar em conta as interações devido às forças eletrostáticas entre as cargas parciais dos átomos, ou seja, interações coulombianas :

$$V_c = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} \quad (8)$$

Na equação q_i e q_j são as cargas parciais dos átomos i e j respectivamente, r é a distância entre os átomos e ϵ é a constante dielétrica que corrige ϵ_0 para considerar a polarizabilidade do meio (DRIGO FILHO, 2019).

Existe um grande número de campos de força destinados a simulações de Dinâmica Molecular, os mais utilizados para o estudo de macromoléculas biológicas são AMBER (HORNAK et al., 2006), CHARMM (HUANG; MACKERELL, 2013), GROMOS (HORTA et al., 2016), entre outros .

A escolha do campo de força a ser utilizado depende do sistema de estudo e também das propriedades a serem analisadas na simulação. Como o CHARMM é geralmente utilizado em simulações de fosfolipídios e fornece um conjunto completo de parâmetros para todos os tipos de biomoléculas, ele foi escolhido para ser utilizado neste trabalho. Sua função potencial é dada por:

$$\begin{aligned}
V_{CHARMM} = & \sum_{ligacoes} K_b(b-b_0)^2 + \sum_{angulos} K_\theta(\theta-\theta_0)^2 + \sum_{improprio} K_\xi(\xi-\xi_0)^2 + \\
& \sum_{diedral} K_\varphi[1 + \cos(n\varphi - \delta)] + \sum_{Urey-Bradley} K_u(u-u_0)^2 + \sum_{CMAP} u_{CMAP}(\Phi, \Psi) + \\
& \sum_{i,j}^4 \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right] + \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}}.
\end{aligned} \tag{9}$$

Na equação pode-se identificar alguns dos termos potenciais já descritos, além de alguns termos adicionais, os três primeiros termos são os potenciais harmônicos, o quarto termo é o potencial torcional, o quinto termo é o termo harmônico de Urey-Bradley, o sexto termo é CMAP, o sétimo termo é o potencial de Lennard-Jones e o último termo é o potencial eletrostático. O potencial de Urey-Bradley é um termo harmônico que descreve as oscilações na distância entre os átomos i e k dos termos angulares, já o termo CMAP é utilizado para aprimorar as propriedades conformacionais do *backbone* das proteínas.

1.6.3 Minimização de energia

Em muitos aspectos, as simulações de Dinâmica Molecular são semelhantes aos experimentos reais. Primeiro devemos preparar a amostra, ou seja, montar sistema modelo composto de N partículas, devendo ser feita uma minimização de energia de modo a otimizar a geometria molecular para que esta corresponda a conformação ativa do sistema. Então, resolvemos as equações de Newton para esse sistema até que suas propriedades termodinâmicas não variem mais com o tempo, obtendo um sistema em equilíbrio termodinâmico. Em seguida podemos realizar a Dinâmica Molecular onde observamos como o sistema se comporta ao longo do tempo (FRENKEL; SMIT, 2002).

Na minimização de energia a finalidade é encontrar um conjunto de coordenadas que minimize a energia potencial do sistema a ser simulado. Esse processo consiste em explorar a superfície de energia potencial do sistema no sentido decrescente de energia, levando-o a um mínimo de energia local próximo. Porém, pode haver um elevado número de mínimos locais de energia, dependendo das dimensões do sistema. Esses arranjos de mínima energia correspondem a estados estáveis, em que as forças que atuam sobre cada um dos átomos do sistema estão balanceadas.

Macromoléculas biológicas possuem um alto grau de liberdade, assim, a minimização de energia só é capaz de varrer uma pequena parte do espaço configuracional, porém, já é

suficiente para relaxar as distorções em ligações químicas, em ângulos entre ligações e nos contatos de Van der Waals. É importante eliminar tais distorções na preparação do sistema sobre o qual se quer aplicar a Dinâmica Molecular, pois durante a dinâmica ocorrem conversões de energias cinética e potencial, de modo que se a energia potencial inicial for demasiado elevada o sistema pode apresentar temperaturas muito altas nos primeiros passos da dinâmica, o que pode levar o sistema a visitar pontos indesejáveis do espaço de fase (RAPAPORT, 2004).

A minimização de energia do sistema pode ser realizada através de um processo iterativo representado por:

$$r_{i,n+1} = r_{i,n} + \Delta r_{i,n} \quad (i = 1, 2, \dots, N_{at}), \quad (10)$$

onde n é o número de passos e $\Delta r_{i,n}$ é o incremento nas coordenadas do átomo i (DRIGO FILHO, 2019).

Um dos algoritmos de minimização de energia mais utilizados em modelagem molecular, e que foi utilizado neste trabalho, é o método dos gradientes conjugados. Esse método utiliza o valor do gradiente do potencial na posição atual e também leva em conta o caminho já percorrido a fim de obter a posição do átomo no passo seguinte, alcançando, dessa forma, uma convergência mais rápida ao mínimo de energia do que outros métodos que utilizam somente a informação do gradiente no passo atual, como o algoritmo *steepest-descent*. No método dos gradientes conjugados a direção do gradiente no novo ponto é obtido da seguinte maneira:

$$r_{i,n+1} = r_{i,n} + \Delta r_{i,n} \quad , \quad (11)$$

o deslocamento das coordenadas é dado por:

$$\Delta r_{i,n} = \alpha_n \delta_{i,n} \quad , \quad (12)$$

onde:

$$\delta_{i,n} = \frac{F_{i,n}}{|F_{i,n}|} + \delta_{i,n-1} \left(\frac{|F_{i,n}|^2}{|F_{i,n-1}|^2} \right), \quad (13)$$

onde α_n é um parâmetro que se ajusta a cada passo e seu valor ideal é obtido por um processo de minimização do potencial na direção e sentido do vetor $\delta_{i,n}$.

A grande vantagem em utilizar esse método é que ele irá determinar um caminho mais direto ao fundo do poço de potencial, evitando retornar sobre caminhos já percorridos, isso ocorre devido ao fato de o gradiente no novo passo ser ortogonal ao gradiente do ponto anterior e de a direção do passo ser conjugada a todas as direções anteriores (DRIGO FILHO, 2019).

1.6.4 Algoritmos de integração

Na Dinâmica Molecular, um dos algoritmos mais utilizados para obter a trajetória das partículas é o algoritmo de Verlet. Nele, as equações do movimento são integradas utilizando o método das diferenças finitas e assume-se que as posições e velocidades podem ser aproximadas por uma expansão de Taylor, já que os incrementos de tempo são infinitesimais.

Levando em conta que a energia potencial é função das posições dos átomos e que essas posições variam em um intervalo de tempo δt , então, dado um conjunto inicial de posições atômicas em um instante t , as posições no passo seguinte podem ser obtidas por uma expansão de Taylor de $r_i(t)$:

$$r_i(t + \delta t) = r_i(t) + \dot{r}_i \delta t + \frac{1}{2!} \ddot{r}_i(t) \delta t^2 + \dots \quad (14)$$

Do mesmo modo, as posições no passo anterior podem ser obtidas por:

$$r_i(t - \delta t) = r_i(t) - \dot{r}_i \delta t + \frac{1}{2!} \ddot{r}_i(t) \delta t^2 - \dots \quad (15)$$

Somando essas duas equações e desprezando termos de ordem superior, obtemos a nova posição da partícula $r_i(t+\delta t)$ em função da posição e aceleração no tempo t e da posição no tempo $t - \delta t$:

$$r_i(t + \delta t) = 2r_i(t) + \ddot{r}_i(t) \delta t^2 - r_i(t - \delta t). \quad (16)$$

A aceleração pode ser obtida a partir da segunda lei de Newton:

$$\ddot{r}_i(t) = \frac{F_i(t)}{m_i}, \quad (17)$$

e a força que atua sobre a partícula em um dado instante é calculada a partir do campo de força (Equação 2). Além disso, também é preciso realizar o cálculo das velocidades que são dadas por:

$$\dot{r}_i(t) = \frac{[r_i(t + \delta t) - r_i(t - \delta t)]}{2\delta t}. \quad (18)$$

Assim, a partir das posições e velocidades iniciais são calculadas as forças de interação através do campo de forças, a partir da força é obtida a aceleração, cujo valor é utilizado no algoritmo de Verlet para obter as novas posições dos átomos, e assim tal processo se repete por uma quantidade determinada de vezes (DRIGO FILHO, 2019).

Apesar do algoritmo de Verlet ter uma implementação simples e ser muito utilizado, as trajetórias obtidas através dele estão sujeitas a imprecisões numéricas devido ao fato de a nova posição ser obtida da diferença entre duas posições, da posição atual e da posição no passo anterior. Além disso, a velocidade não é explícita nas equações, o que dificulta a sua obtenção.

O algoritmo *leap-frog* é uma variação do algoritmo de Verlet, utilizado nos *softwares* NAMD e GROMACS, que surgiu de modo a evitar imprecisões, nele inicialmente são calculadas as velocidades no meio passo $v(t+\delta t/2)$ a partir das velocidades $v(t-\delta t/2)$ e da aceleração no tempo t , em seguida a nova posição é obtida a partir da posição anterior e da velocidade no meio passo $t + \delta t/2$, de acordo com as seguintes relações (FRENKEL; SMIT, 2002):

$$r_i(t + \delta t) = r_i(t) + \delta t \dot{r}_i(t + \frac{1}{2}\delta t), \quad (19)$$

$$\dot{r}_i(t + \frac{1}{2}\delta t) = \dot{r}_i(t - \frac{1}{2}\delta t) + \delta t \ddot{r}_i(t). \quad (20)$$

2 OBJETIVOS

Neste trabalho, o objetivo geral é investigar o processo de adsorção dos peptídeos MP1 e H-MP1 em um modelo mimético de membrana de célula cancerígena e analisar a ação e interação dos peptídeos sobre esta bicamada, fazendo uso de simulações de Dinâmica Molecular.

Assim, com as trajetórias obtidas, é esperado fazer uma descrição a nível molecular e com detalhes de como os peptídeos, que inicialmente se encontram em solução aquosa e totalmente desenovelados, adsorvem na bicamada e como funciona o processo de enovelamento de tais peptídeos nessa interface. Tal informação é muito importante, uma vez que até então não se tem estudos que mostram todo esse processo para esses peptídeos. Além disso, estamos em busca de resultados que complementem os já alcançados por estudos experimentais, visando ampliar nossa compreensão sobre o potencial anticancerígeno desses peptídeos, bem como seus mecanismos de ação.

Sendo assim, temos por objetivos específicos:

1. Visualizar a nível molecular como ocorre o processo de adsorção dos peptídeos na membrana de célula cancerígena.
2. Observar as modificações na estrutura secundária dos peptídeos durante o processo de adsorção destes na membrana.
3. Identificar quais resíduos de aminoácidos interagem com a bicamada, bem como o tipo de interação e a sua intensidade.
4. Averiguar possíveis perturbações na bicamada lipídica causadas pela adsorção dos peptídeos, como mudanças na espessura e curvatura da bicamada e variações no parâmetro de ordem, que possam indicar alguma propensão para a formação de poros na membrana.

3 METODOLOGIA

Todas as simulações descritas neste trabalho foram realizadas no software NAMD versão 2.13, acelerado por CUDA (PHILLIPS et al., 2005). Os procedimentos de minimização de energia utilizaram o algoritmo de gradientes conjugados, como citado anteriormente.

As simulações de DM utilizaram um *time-step* de 2 fs e condições periódicas de contorno no *ensemble* isotérmico-isobárico (NPT), à temperatura de 298 K e pressão de 1.01325 atm, sendo que a temperatura e pressão foram controladas, respectivamente, pelo termostato de Langevin (DAVIDCHACK; HANDEL; TRETYAKOV, 2009) e pistão de Langevin (FELLER et al., 1995). Foi aplicado um raio de corte de 12 Å com switch distance de 10 Å para truncar as interações não-ligas de curto alcance, enquanto as interações não-ligadas de longo alcance foram tratadas com algoritmo PME, também descrito anteriormente (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993).

3.1 Montagem dos sistemas

Ambos os peptídeos, tanto MP1 (IDWKKLLDAAKQIL-NH₂) como seu análogo H-MP1 (IDWHLLDAAHQIL-NH₂), foram gerados utilizando o *plugin* Molefacture do *software* VMD versão 1.9.4 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996), onde é possível criar e editar moléculas. No processo, foram adicionados manualmente cada um dos resíduos de aminoácidos e os peptídeos foram gerados com estrutura em *random coil*, pois o intuito é, que com as simulações, possamos observar todo o processo de enovelamento dos peptídeos. Para ambos os peptídeos o C-terminal foi amidado e o N-terminal foi carregado positivamente.

Em estudos realizados por meio de simulações de Dinâmica Molecular e ensaios de fluorescência, foi analisado o efeito do pH ácido na adsorção dos peptídeos antimicrobianos MP1 e H-MP1 em membranas bacterianas. Observou-se que os resíduos de aminoácidos apresentam diferentes estados de protonação dependendo do pH do meio. Em pH 6,5, que será utilizado neste trabalho para mimetizar o microambiente acidificado, ambos os peptídeos apresentam uma carga líquida de +2 (ALVARES et al., 2021).

Assim, as cargas dos resíduos de aminoácidos dos peptídeos foram baseadas no pH da simulação. Como queremos simular os sistemas em pH ácido (em torno de 6,0 e 6,5), os estados de protonação utilizados para o MP1 foram o N-terminal e lisinas carregados

positivamente enquanto os ácidos aspárticos foram carregados negativamente, já para o H-MP1 foram utilizados o N-terminal e histidinas carregados positivamente e ácidos aspárticos carregados negativamente. Foi escolhido utilizar um pH ácido, pois o microambiente em torno de células cancerígenas é acidificado e também devido ao fato de o peptídeo H-MP1 ser responsivo ao pH e apresentar ação máxima em ambiente ácido.

A bicamada lipídica foi construída utilizando a ferramenta *Membrane Builder Plugin* (WU et al., 2014) do *website* CHARMM-GUI (JO et al., 2008) utilizando o campo de força CHARMM36 (HUANG; MACKERELL, 2013). Assim, foi gerada uma membrana composta por fosfolipídios POPC e POPS em uma proporção de 80:20, respectivamente, contendo 130 fosfolipídios (65 em cada monocamada).

A bicamada foi solvatada em uma caixa de água, utilizando o modelo TIP3P (MARK; NILSSON, 2001), contendo uma camada de água de aproximadamente 40 Å de espessura de cada lado da membrana. A caixa de simulação gerada possui dimensões de aproximadamente 65x65x120 Å, e contém íons positivos (Na^+) e negativos (Cl^-) para neutralizar a caixa, além de íons adicionais para se conseguir uma concentração de 150 mM de sal NaCl com o objetivo de mimetizar o ambiente fisiológico.

Para equilibrar a membrana gerada e termalizar o sistema, foi realizada uma simulação de minimização de energia com 15000 passos e uma simulação de DM de equilíbrio por 200 ns (100000000 passos). Essa equilibrção do sistema foi realizada sem restrições na membrana e deixando a área variar livremente.

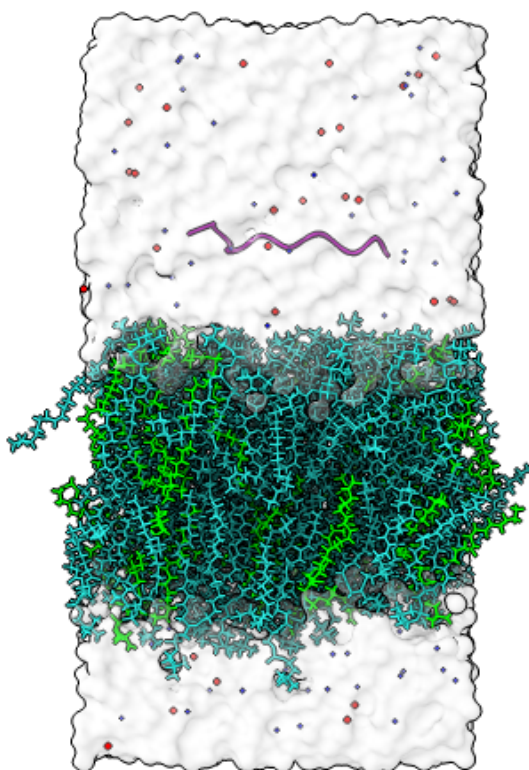
Ao fim da simulação de equilibrção, foi realizado o cálculo da área por lipídio ao longo da simulação, utilizando a ferramenta MEMBPLUGIN no *software* VMD (GUIXÀ-GONZÁLEZ et al., 2014). Esse procedimento é essencial para verificar se a área por lipídio atingiu estabilidade, o que indica que o sistema está adequadamente equilibrado.

Com a bicamada lipídica já equilibrada, foram montados dois sistemas, cada um contendo um dos peptídeos em *random coil*, MP1 e H-MP1, protonados de modo que os sistemas se encontrem em pH em torno de 6,0 a 6,5. Eles foram inseridos na fase líquida da caixa de simulação a uma distância de aproximadamente 10 Å da superfície da bicamada, para que possamos observar todo o processo de adsorção dos peptídeos. Após a inserção dos peptídeos a quantidade de íons na caixa foi corrigida.

3.2 Simulações

Utilizando o NAMD versão 2.13, os dois novos sistemas foram otimizados com 15000 passos de minimização de energia e em seguida foram equilibrados por 50 ns (25000000 passos) com uma simulação de Dinâmica Molecular com restrição no backbone do peptídeo. Isso é necessário para que o solvente se distribua adequadamente ao redor do soluto. Além disso, todas as simulações nessa etapa foram realizadas mantendo a área do sistema no plano x-y constante. O modelo da caixa equilibrada que foi utilizada na simulação de DM é representado na figura 3.1.

Figura 3.1 - Representação da caixa de simulação utilizada, contendo a bicamada de POPC (ciano) e POPS (verde), o peptídeo desenovelado (magenta), água (superfície transparente) e os íons Na^+ (azul) e Cl^- (vermelho). Os peptídeos são adicionados na caixa com estrutura secundária em *random coil* e aproximadamente a uma distância de 10 Å da membrana.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a literatura o uso de múltiplas réplicas de tempos curtos de uma simulação se mostrou mais eficiente para explorar o espaço de fase do sistema do que apenas uma simulação longa (KNAPP; OSPINA; DEANE, 2018), assim, foram realizadas cinco réplicas com diferentes distribuições de velocidades iniciais para cada um dos sistemas, MP1

e H-MP1. No total foram realizados, aproximadamente, 10 μ s de Dinâmica Molecular para cada um dos sistemas, MP1 e H-MP1.

Das cinco réplicas foi escolhida, para cada peptídeo, a que apresentou a melhor adsorção deste na bicamada depois de 2 μ s de simulação, sendo esta continuada por mais 2 μ s, obtendo-se um total de 4 μ s. As análises apresentadas neste trabalho foram realizadas considerando apenas essa réplica escolhida, sendo as outras réplicas descartadas. O procedimento de selecionar apenas a réplica que exibiu melhor amostragem e prosseguir as simulações a partir desse ponto é amplamente empregado em diversas pesquisas (IKIZAWA et al., 2024).

As simulações de Dinâmica Molecular permitiram obter a trajetória do sistema ao longo do tempo e a partir disso foi possível realizar diversas análises das propriedades físico-químicas dos sistemas e observar as interações em nível molecular.

3.3 Análises

As análises que serão mostradas no capítulo seguinte foram realizadas, principalmente, utilizando o *software* VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) e alguns de seus *plugins*, além do *software* SuAVE (SANTOS; COUTINHO; SOARES, 2022). A partir dos dados obtidos foram gerados os gráficos utilizando a linguagem Python. Todos os scripts citados neste trabalho podem ser encontrados no GitHub do grupo de pesquisa, com acesso pelo link: <https://github.com/SSiLiq>

O cálculo das distância entre as diferentes regiões dos peptídeos ao centro de massa da bicamada lipídica foram realizados através de scripts desenvolvidos pelo nosso grupo e do *software* VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996). Nos scripts, inicialmente são feitas as seleções do centro de massa da bicamada e da região de interesse do peptídeo, em seguida é calculada a distância entre eles.

Análises de estrutura secundária também foram realizadas por meio de scripts desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando o *software* STRIDE (FRISHMAN; ARGOS, 1995) implementado no programa VMD. O STRIDE classifica o tipo de estrutura secundária de cada resíduo baseando-se na informação das ligações de hidrogênio formadas entre átomos do *backbone* para resíduos i e $i+4$ e em informações dos ângulos diedrais ϕ e ψ .

As análises das pontes salinas foram realizadas utilizando o *plugin* “Salt Bridges” no VMD, onde são encontradas todas as pontes salinas formadas em uma proteína ao longo da trajetória fornecida. O critério para a formação de uma ponte salina é que a distância entre um

dos átomos de oxigênio dos resíduos ácidos e um dos átomo de nitrogênio dos resíduos básicos estejam dentro de uma distância de corte de 3.2 Å em, pelo menos, um frame da simulação.

Utilizando o *plugin* “Hydrogen Bonds” no *software* VMD, foi possível encontrar o número de ligações de hidrogênio que os resíduos carregados do peptídeo fazem com a membrana e com água ao longo da simulação.

Valores para as energias Coulombiana e de Van der Waal foram obtidos pelo *plugin* “NAMD Energy” do VMD utilizando todos os frames da simulação, onde foi feita uma média móvel para os valores da energia ao longo da simulação.

Utilizando a ferramenta MEMBPLUGIN (GUIXÀ-GONZÁLEZ et al., 2014) do *software* VMD, foram obtidas a área por lipídio total e de cada fosfolipídio da bicamada, bem como a espessura da membrana, ao longo da simulação. Também foram obtidos os mapas de calor da espessura do peptídeo no início da simulação e após o peptídeo estar adsorvido.

Um grid representando as curvaturas da superfície da bicamada lipídica quando os peptídeos se encontram adsorvidos foi obtido utilizando o *software* SuAVE (SANTOS; COUTINHO; SOARES, 2022) com os parâmetros padrões. Ele é gerado considerando pequenas caixas de partição retangulares ao longo da superfície da bicamada.

Ainda utilizando uma das ferramentas do *software* SuAVE, foi obtida a distribuição dos ângulos de curvatura da superfície da bicamada, onde foram obtidas as curvaturas de cada espécie de fosfolipídios, POPC e POPS, no início e no final da simulação. O *software* utiliza o grid da superfície para calcular a distribuição do ângulo de curvatura θ , que é o ângulo formado entre a direção z e o vetor normal de uma das partições do grid da superfície. O vetor normal é calculado para cada partição retangular do grid, fazendo um produto vetorial dos dois vetores que cruzam o centro da partição retangular. A partir dos ângulos de curvatura médios sobre todas as partições, calculados a cada frame da trajetória, é possível obter o histograma da distribuição angular.

Também foi calculado o parâmetro de ordem (S_{CH}) das cadeias saturadas e insaturadas dos fosfolipídios da bicamada usando a equação (PIGGOT et al., 2017):

$$S_{CH} = \langle 3/2 \cos^2 \theta - 1/2 \rangle. \quad (21)$$

O script que calcula o parâmetro de ordem foi desenvolvido pelo grupo e descreve, assim como na equação, a orientação do vetor de ligação C-H em relação ao vetor normal à

superfície da bicamada, calculada em média sobre todos os lipídios e em todo o tempo de simulação. Os cálculos foram realizados considerando toda a membrana nos últimos 100 ns simulação, com os peptídeos adsorvidos na bicamada, e também foram realizados no início das simulações, durante 100 ns anteriores à adsorção dos peptídeos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Processo de adsorção

A partir das simulações de DM realizadas, obteve-se trajetórias nas quais foi possível observar o processo de adsorção dos peptídeos MP1 e H-MP1 em um modelo mimético de membrana cancerígena (80POPC:20POPS) em pH ácido e, conseqüentemente, como os peptídeos interagem com a bicamada. É importante ressaltar que inicialmente os peptídeos se encontravam fora da bicamada e totalmente desenovelados, e com as simulações foi possível visualizar a nível molecular todo o processo, tanto de adsorção como de enovelamento dos peptídeos, algo que até então não havia sido feito.

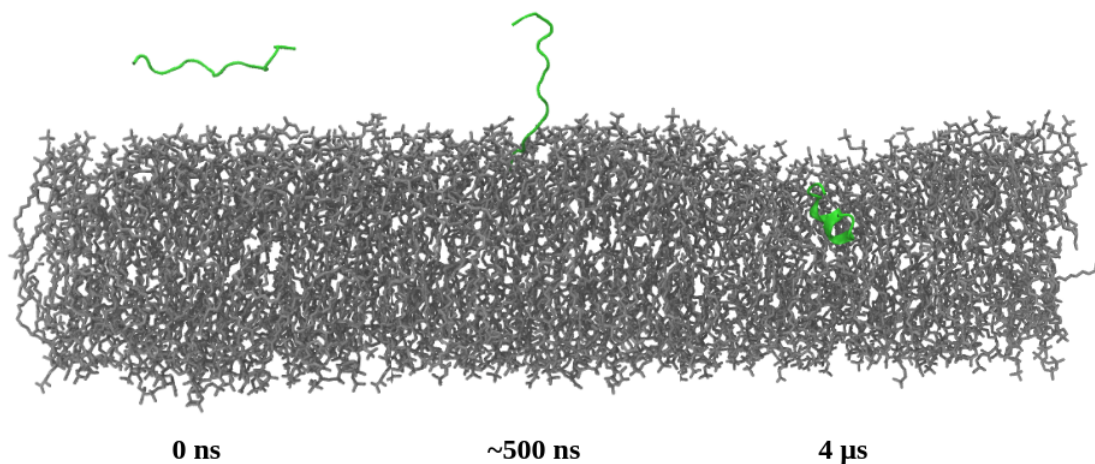
De modo geral, as simulações mostram os peptídeos antimicrobianos, partindo de uma conformação desenovelada em água, se aproximando da membrana e iniciando sua adsorção pelo N-terminal carregado positivamente, e assim os sistemas evoluem até que o C-terminal também esteja inserido na bicamada.

Na Figura 4.1 podemos visualizar o processo de adsorção de ambos os peptídeos. Em 4.1a é representado o peptídeo MP1, que inicialmente se encontra em solução a uma distância de aproximadamente 10 Å da bicamada e em uma conformação de random coil. O peptídeo se aproxima da bicamada pelo N-terminal e por volta de 500 ns de simulação inicia o seu processo de adsorção. Ao final da simulação o peptídeo se encontra já inserido completamente na bicamada e com alguns resíduos apresentando estrutura helicoidal. É possível visualizar a influência da adsorção do peptídeo na bicamada pela curvatura induzida na mesma.

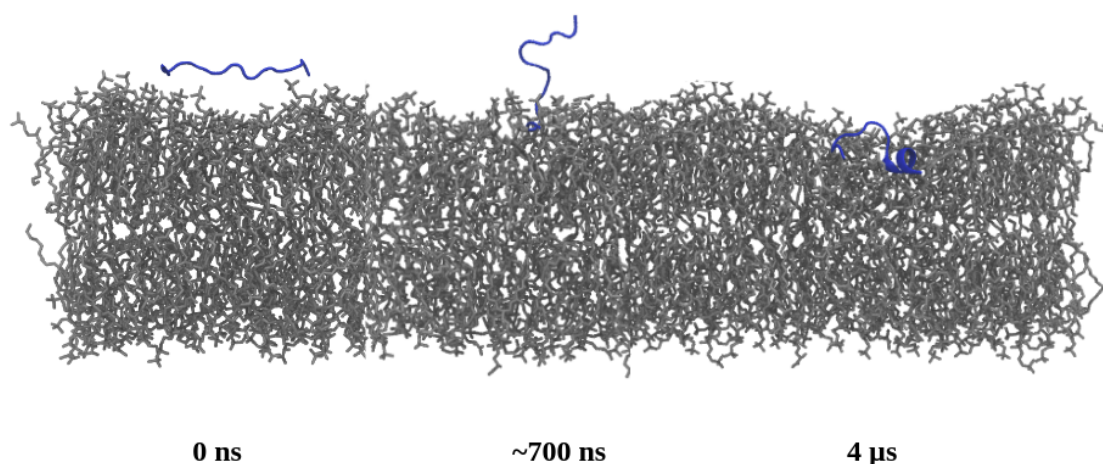
Já na Figura 4.1b vemos o processo de adsorção para o H-MP1, que no geral ocorre de forma semelhante ao MP1, porém leva mais tempo para iniciar sua adsorção. O peptídeo H-MP1 também se encontra inicialmente em solução aquosa e totalmente desenovelado, ele se aproxima da bicamada pelo N-terminal e inicia seu processo de adsorção por volta de 700 ns. Ao final da simulação podemos ver o peptídeo inserido paralelamente à superfície da bicamada e com alguns resíduos apresentando estrutura helicoidal, também é possível observar uma curvatura induzida, da mesma forma que acontece para o MP1.

Figura 4.1 - Representação do processo de adsorção dos peptídeos antimicrobianos (a) MP1 e (b) H-MP1. Os peptídeos MP1 e H-MP1 estão representados em verde e azul, respectivamente, e a membrana em cinza.

(a)



(b)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Podemos também explorar de forma quantitativa a orientação dos peptídeos em relação a bicamada lipídica ao longo da simulação, isso pode ser feito medindo as distâncias entre o N-terminal, C-terminal e centro de massa (CM) dos peptídeos ao CM da bicamada ao longo da simulação, de modo que obtemos a evolução temporal da adsorção dos peptídeos na membrana (Figura 4.2).

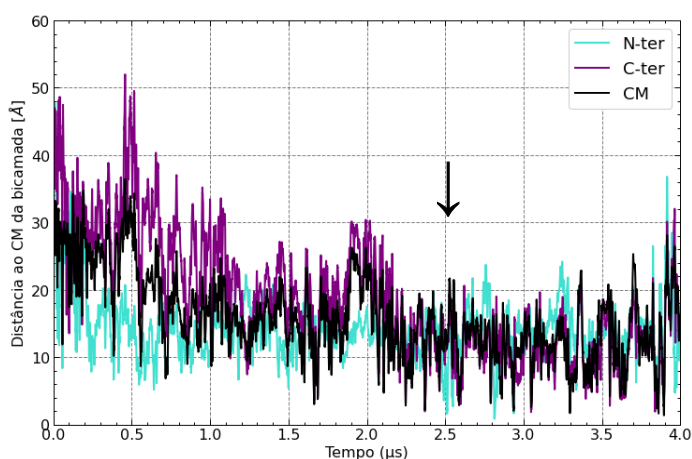
Nos primeiros nanossegundos de simulação ambos os peptídeos se encontram paralelos à bicamada, vemos na Figura 4.2 que rapidamente os peptídeos mudam sua orientação, ficando perpendicular à bicamada, ou se curvando em direção a ela. Em 4.2a vemos MP1 se aproximando na bicamada pelo N-terminal e sendo adsorvido por completo, inicialmente com a região C-terminal levemente voltada para a região hidrofílica, no entanto

após 2500 ns o peptídeo muda de orientação e o C-terminal se encontra voltado para a região hidrofóbica da bicamada, indicado pela seta. O H-MP1, mostrado na Figura 4.2b, também se aproxima perpendicularmente à bicamada pelo N-terminal, e após adsorver completamente, por volta de 1000 ns, o peptídeo muda sua orientação ficando quase paralelo a bicamada, porém com o C-terminal mais enterrado na região hidrofóbica da bicamada, como indica a seta.

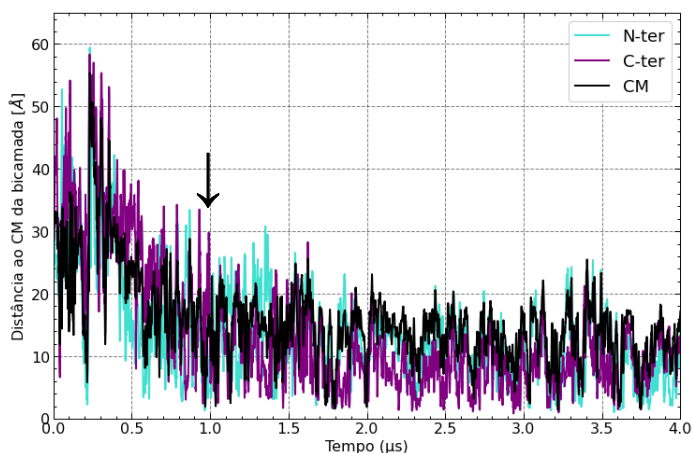
Tais resultados apontam que o fator principal que conduz ao início da adsorção dos peptídeos é a interação entre o N-terminal destes com os grupos fosfatos da bicamada lipídica aniônica, além disso, pode-se notar que uma vez que os peptídeos adsorvem na bicamada eles permanecem nesse estado até o final das simulações.

Figura 4.2 - Distância entre as diferentes regiões dos peptídeos ao centro de massa da bicamada lipídica, em (a) MP1 e (b) H-MP1 calculada durante todo o tempo de simulação. Considerando a região N-terminal (resíduo ILE1) representado em ciano, região C-terminal (resíduo LEU14) em roxo, e o centro de massa (CM) do peptídeo em preto.

(a)



(b)



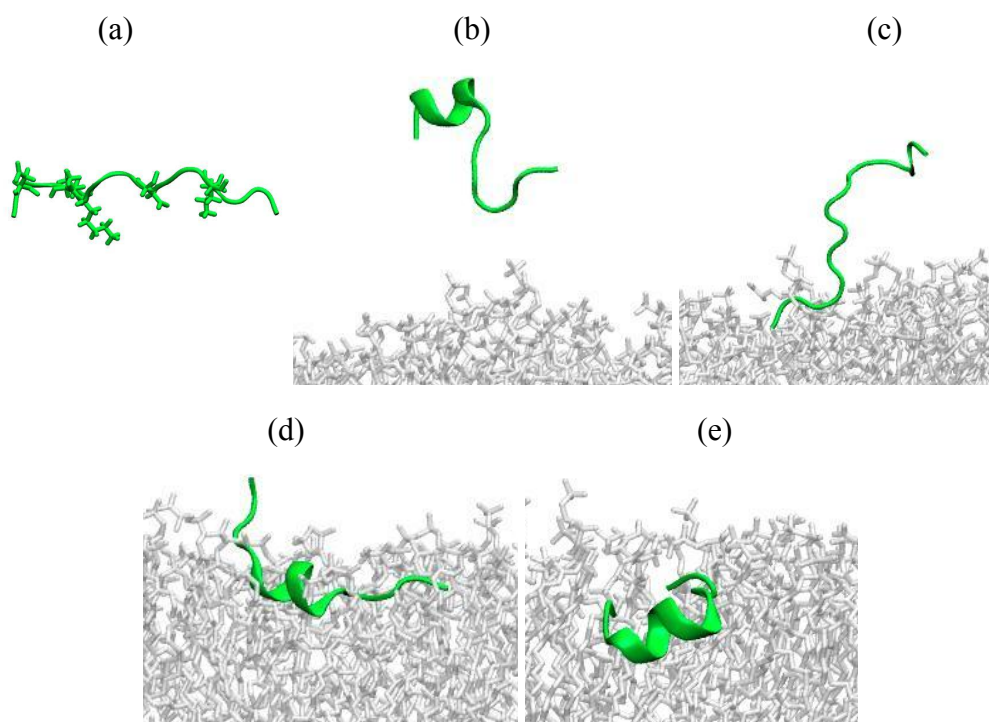
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.1 Processo de enovelamento dos peptídeos

Com as trajetórias obtidas a partir das simulações de DM também conseguimos informações importantes a respeito do enovelamento dos peptídeos, de modo que podemos observar todo seu caminho de enovelamento, desde que se encontram em água até estarem completamente adsorvido na bicamada.

Na Figura 4.3, podemos ver o processo de enovelamento do peptídeo MP1, que no início das simulações se encontra em água e em estrutura *random coil*. Por volta de 250 ns de simulação, o peptídeo ainda se encontra em água, mas é possível ver alguns resíduos em conformação helicoidal na região C-terminal. Após algum tempo, ele perde sua estrutura e, por volta de 500 ns, começa a interagir com a bicamada, ainda desenovelado. Conforme adsorve na bicamada, o peptídeo volta a se enovelar e, por volta de 800 ns de simulação, podemos ver o peptídeo parcialmente adsorvido e com resíduos em conformação helicoidal em sua região central. Com 1500 ns de simulação, quando o peptídeo está completamente inserido na bicamada, é possível ver uma estrutura helicoidal bem definida na região central, que se mantém estável até o final das simulações.

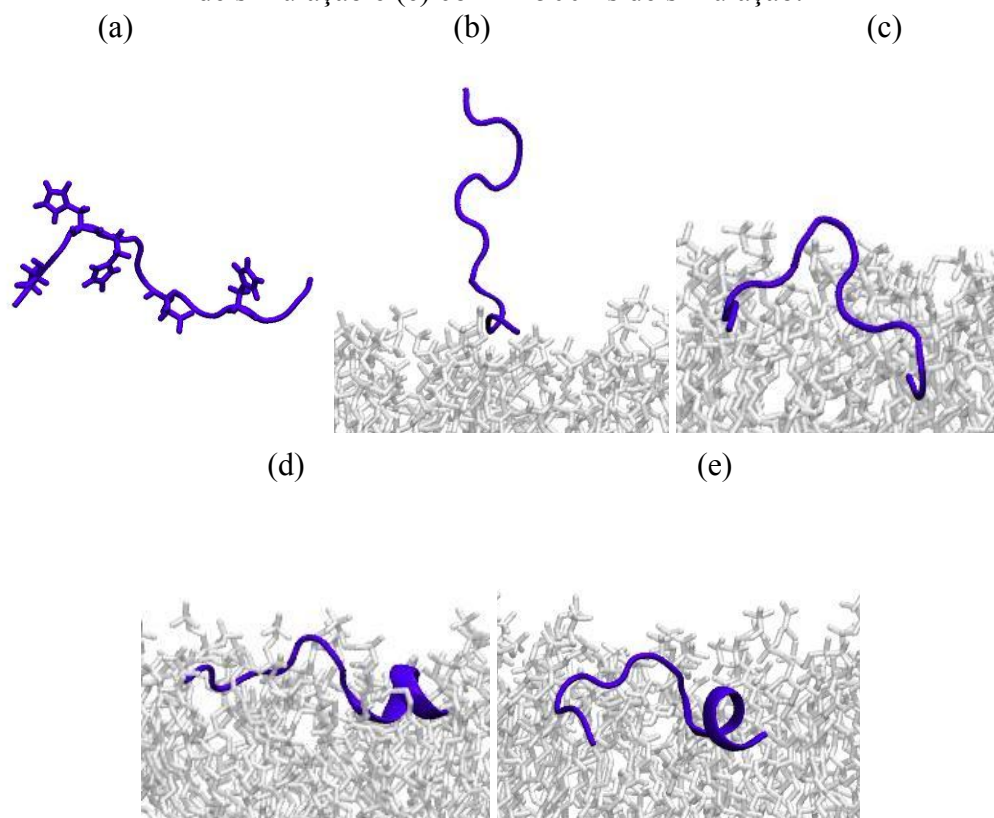
Figura 4.3 - Processo de enovelamento do peptídeo MP. Em (a) no início da simulação, (b) com ~250 ns de simulação, (c) com ~500 ns de simulação, com (d) ~ 800 ns de simulação e (e) com ~1500 ns de simulação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O processo ocorre de forma semelhante para o H-MP1, conforme mostrado na Figura 4.4. No início das simulações, o peptídeo H-MP1 também se encontra em água e em estrutura *random coil*. Após aproximadamente 700 ns de simulação, ele começa a interagir com bicamada, ainda totalmente desenovelado. Ele inicia seu processo de adsorção e, por volta de 900 ns, vemos o peptídeo curvado sobre a bicamada e parcialmente inserido na mesma, mas ainda sem apresentar variações na sua estruturação. Podemos ver, em aproximadamente 1200 ns de simulação, que à medida que o peptídeo adsorve na bicamada alguns resíduos começam a adotar conformação helicoidal na região C-terminal. Com o peptídeo já bem inserido na bicamada, em torno de 1500 ns de simulação, vemos uma estrutura helicoidal ainda na região C-terminal, no entanto essa estrutura não é tão estável e se perde em alguns momentos da simulação.

Figura 4.4 - Processo de enovelamento do peptídeo H-MP1. Em (a) no início da simulação, (b) com ~700 ns de simulação, (c) com ~1000 ns de simulação, com (d) ~1200 ns de simulação e (e) com ~1500 ns de simulação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De modo geral, o peptídeo MP1 apresenta um maior conteúdo helicoidal e uma estrutura bem mais definida e mais estável do que o H-MP1. A seguir serão apresentadas algumas análises mais detalhadas a respeito da estruturação dos peptídeos.

4.2 Análises de estrutura secundária, pontes salinas e ligações de hidrogênio

Análises referentes à estrutura secundária dos peptídeos antimicrobianos são muito importantes ao se estudar a adsorção desses peptídeos em bicamadas lipídicas, pois ao interagirem com a superfície da membrana esses peptídeos costumam apresentar mudanças conformacionais, geralmente se organizando em uma estrutura secundária anfipática em alfa-hélice. Os resíduos polares e apolares se separam nas duas faces opostas, de modo que esse tipo de estrutura favorece a acomodação do peptídeo na interface hidrofóbica/hidrofílica entre a membrana e o solvente.

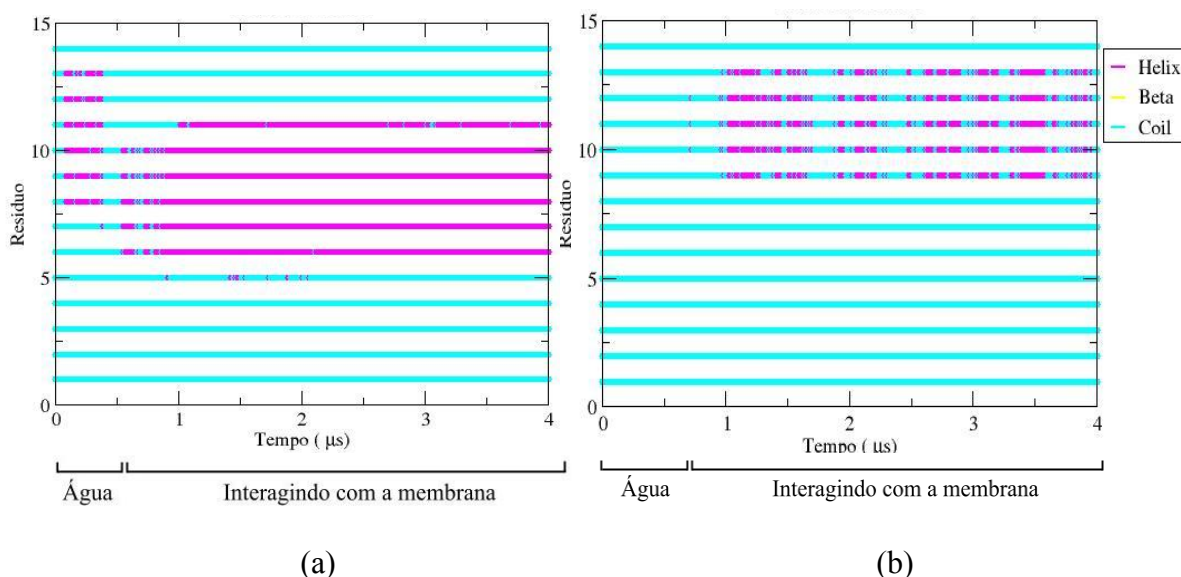
Como dito anteriormente, a fim de observar se os peptídeos apresentam alguma estruturação ao interagir com o modelo de membrana de célula cancerígena, os peptídeos MP1 e H-MP1 foram inicialmente colocados na caixa de simulação desenovelados, ou seja, com estrutura secundária em *random coil*.

A Figura 4.5 mostra a estrutura secundária de cada resíduo de aminoácido do peptídeo ao longo do tempo de simulação para o MP1 e H-MP1. Podemos observar que ambos os peptídeos, que inicialmente se encontram em *random coil*, passam a apresentar mais resíduos com estrutura secundária em α -hélice ao interagir com a bicamada lipídica.

O peptídeo MP1, na Figura 4.5a, apresenta alguns resíduos estruturados em α -hélice logo no início da simulação, mesmo estando em água, embora perca essa estrutura após aproximadamente 300 ns e antes da adsorção completa. No entanto, em torno de 500 ns de simulação, logo após iniciar sua adsorção na bicamada, o peptídeo volta a apresentar resíduos em conformação helicoidal, estando esta estruturação concentrada principalmente na região central do peptídeo, enquanto os terminais permanecem desenovelados. A estrutura secundária do peptídeo permanece estável desde sua adsorção completa (adsorção do C-terminal) até o final da simulação.

Já o peptídeo H-MP1 não apresenta nenhum resíduo em α -hélice enquanto está em água, somente apresenta certa conformação helicoidal por volta de 1 μ s, quando está completamente adsorvido na bicamada lipídica. Pode-se notar que o peptídeo MP1 apresenta maior porcentagem de conformação helicoidal e que as hélices formadas são mais estáveis do que no peptídeo H-MP1.

Figura 4.5 - Estrutura secundária de cada resíduo de aminoácido em função do tempo de simulação. (a) MP1 (b) H-MP1. Na cor magenta quando o resíduo apresenta estrutura secundária em α -hélice e em ciano quando o resíduo está em *random coil*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Podemos comparar os resultados obtidos com as simulações com estudos experimentais de Dicroísmo Circular. As análises experimentais realizadas para esses peptídeos em solução aquosa com pH ácido, mostraram que o MP1 apresenta aproximadamente 46% de conformação em α -hélice enquanto o H-MP1 permanece desestruturado em mesmo pH (apresenta apenas ~10% de conteúdo de α -hélice) (MARTINS et al., 2021). Tais resultados estão de acordo com o que se observa nos primeiros nanossegundos de simulação, enquanto os peptídeos se encontram em solução, onde só é possível observar a formação de hélice no peptídeo MP1.

Além disso, estudos experimentais realizados em condições semelhantes a deste presente trabalho, ou seja, em bicamadas com mesma composição lipídica (com fosfolipídios POPC e POPS em uma proporção de 80:20) e em mesmo pH (6,5), mostraram que o MP1 apresenta por volta de 60% de conformação em α -hélice, enquanto seu análogo H-MP1 apresenta aproximadamente 35% de conteúdo em α -hélice (VIEGAS, 2019).

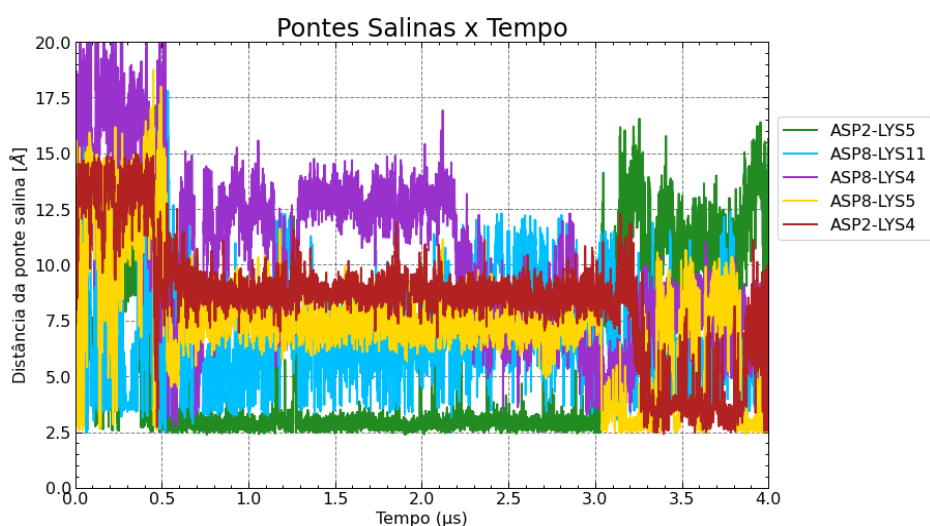
Com as simulações foram obtidos valores próximos aos observados experimentalmente, onde vemos que o peptídeo MP1 apresenta maior conformação em α -hélice e o H-MP1 tem uma estrutura helicoidal menos estável, que pode ser explicado pelo fato de ele ter apresentado uma menor formação de α -hélice nos estudos experimentais. Vale ressaltar que nas simulações os peptídeos inicialmente se encontravam desenovelados em

água, e com o tempo de simulação obtido foi possível observar como de fato ocorre a inserção destes peptídeos na bicamada e como se dá seu caminho de enovelamento.

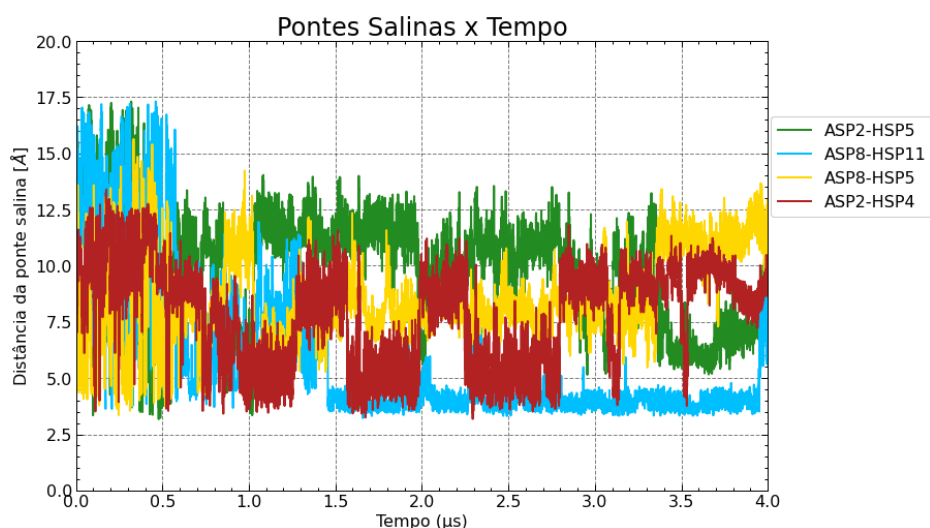
Outra análise estrutural interessante é observar a formação de pontes salinas entre resíduos de aminoácidos carregados para compreender se elas interferem na formação e/ou estabilização da estrutura dos peptídeos em alfa-hélice. As pontes salinas são interações que podem se formar mesmo quando a proteína ainda está estruturada em *random coil*. Elas se caracterizam pela interação entre resíduos de aminoácidos com cargas opostas que estejam a uma distância menor que um valor pré-definido. A Figura 4.6 mostra as distâncias entre as pontes salinas formadas pelos peptídeos MP1 e H-MP1 ao longo do tempo de simulação.

Figura 4.6 - Distância das pontes salinas formadas entre os aminoácidos carregados dos peptídeos ao longo da simulação, em (a) MP1 e em (b) H-MP1

(a)



(b)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o MP1, representado na Figura 4.6a, pode-se notar a formação de pontes salinas menos instáveis por volta de 500 ns, quando o peptídeo inicia sua adsorção na bicamada. Inicialmente forma-se uma ponte salina estável entre o Asp 2 e Lys 5 (em verde) e também entre Asp8 e Lys 11 (em azul), enquanto as outras pontes salinas encontradas se apresentam, em média, a uma distância maior, indicando que ainda não se estabilizaram por completo. Na parte final da simulação, por volta de 3 μ s, pode-se notar a perda da ponte salina entre o Asp 2 e Lys 5 (em verde), no entanto, novas pontes salinas são formadas, entre Asp2 e Lys4 (em vermelho) e outra entre Asp8 e Lys5 (em amarelo).

Já para o H-MP1, na Figura 4.6b, podemos perceber a formação de pontes salinas estáveis depois de o peptídeo adsorve por completo na bicamada, por volta de 1 μ s. Nota-se a formação de uma ponte salina entre Asp 8 e His 11 (em azul) que é bem estável e permanece até o final da simulação. As demais pontes salinas, apesar de se formarem em alguns momentos da simulação, são menos estáveis.

Comparando os resultados das pontes salinas (Figura 4.6) com os gráficos de estrutura secundária (Figura 4.5), podemos deduzir que a formação de pontes salinas precede a estruturação dos resíduos em α -hélice. Para ambos os peptídeos é possível observar a formação de pontes salinas pouco antes dos peptídeos apresentarem estrutura helicoidal, com destaque para as interações entre os resíduos 8 e 11, que estão justamente na região em que posteriormente é possível observar formação de hélice. Isso pode indicar que a formação de pontes salinas induz a formação de estrutura secundária helicoidal nos peptídeos, sendo um fator importante a ser considerado em propostas de mutações visando peptídeos mais eficientes.

Apesar do peptídeo H-MP1 ser mais responsivo ao pH acidificado (MARTINS et al., 2021), característico de células cancerígenas, ele possui uma rede menor de pontes salinas intra peptídeo e por esse motivo apresenta também um menor conteúdo em α -hélice. É interessante notar que o fato de a cadeia lateral das lisinas ser mais comprida do que das histidinas permite que a lisina se aproxime mais dos ácidos aspárticos, o que favorece a formação das pontes salinas e, consequentemente, a formação de estrutura em α -hélice. Isso pode explicar o fato de o MP1 apresentar maior conteúdo em hélice do que o H-MP1.

O fato de algumas pontes salinas não se formarem, juntamente com fato de os peptídeos terem cadeias curtas (apenas 14 resíduos de aminoácidos), e até mesmo o pH acidificado do meio, são fatores que podem influenciar o enovelamento do peptídeo e podem explicar a razão destes peptídeos não apresentarem um maior conteúdo helicoidal.

A fim de compreender melhor os processos de enovelamento e adsorção do peptídeo, também foram calculados os números de ligações de hidrogênio que os resíduos de aminoácidos carregados dos peptídeos formam com a água e com a bicamada ao longo da simulação, que podem ser comparados com as pontes salinas formadas por esses resíduos em função do tempo. Na Figura 4.7 são mostrados os resultados para o peptídeo MP1 e na Figura 4.8 para o H-MP1.

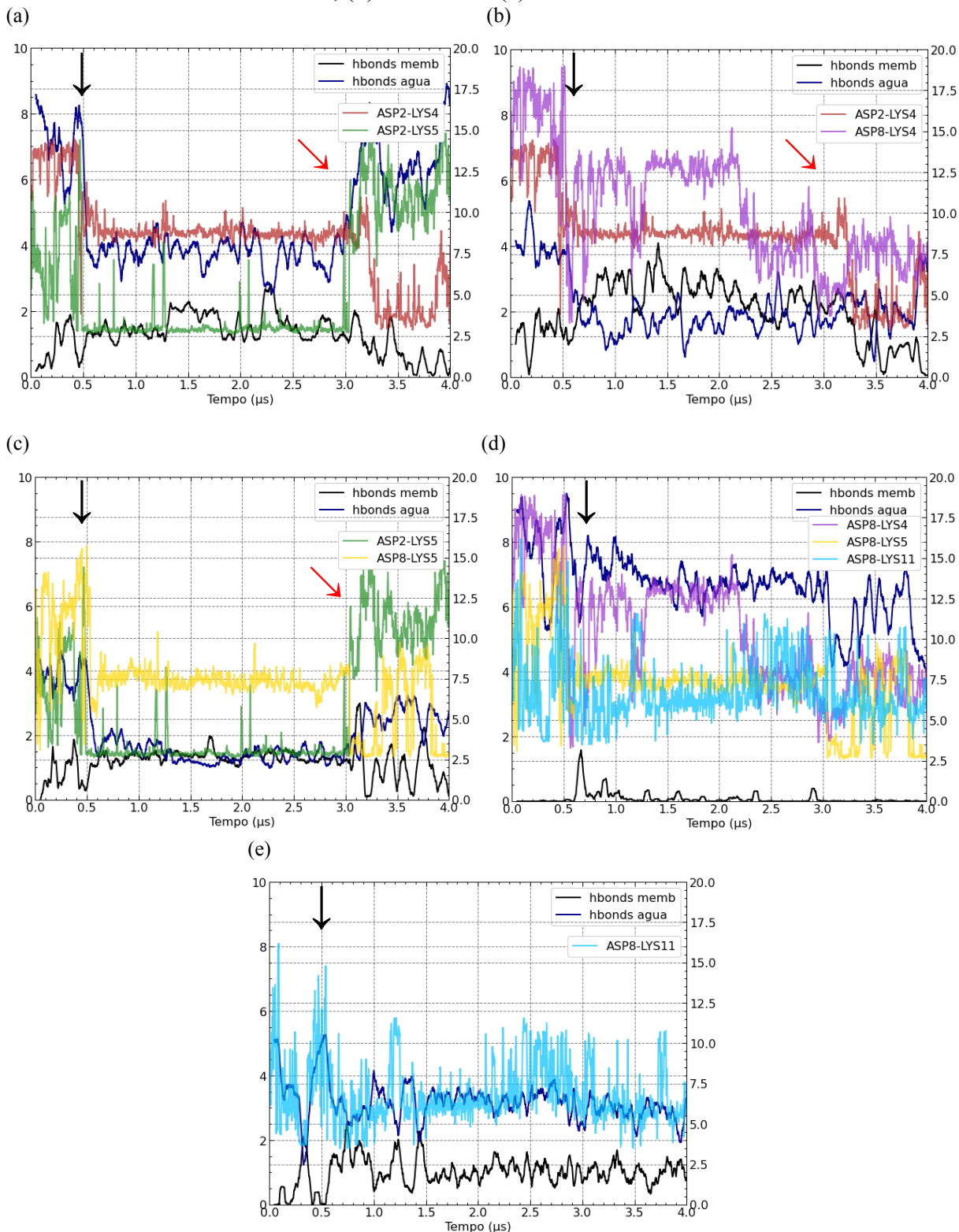
Para ambos os peptídeos ao longo da simulação é possível observar uma perda das ligações de hidrogênio com a água enquanto há um aumento de ligações de hidrogênio com a bicamada lipídica conforme eles são adsorvidos, como esperado.

Para o MP1 (Figura 4.7), pode-se notar que quando o peptídeo inicia sua adsorção na bicamada, por volta de 500 ns, indicado pelas setinhas pretas, todos os resíduos carregados passam a perder ligações de hidrogênio com a água e formar ligações de hidrogênio com a bicamada ou pontes salinas intra peptídeo; sendo possível ver a formação de ambos em alguns resíduos. Por volta de 3 μ s de simulação, indicado pelas setinhas vermelhas, quando ocorre a troca das pontes salinas como mostrado anteriormente, os resíduos Asp2, Lys4 e Lys5, que participam dessa troca de pontes salinas, acabam perdendo ligações de hidrogênio com a bicamada e voltando a formar ligações de hidrogênio com a água, enquanto interagem entre si.

Com relação ao resíduo 8, é possível observar a formação de pontes salinas com todas as lisinas, maior perda de ligações de hidrogênio com a água e a quase ausência de ligações de H com a bicamada, indicando que esse resíduo está majoritariamente envolvido com interações intra-cadeia.

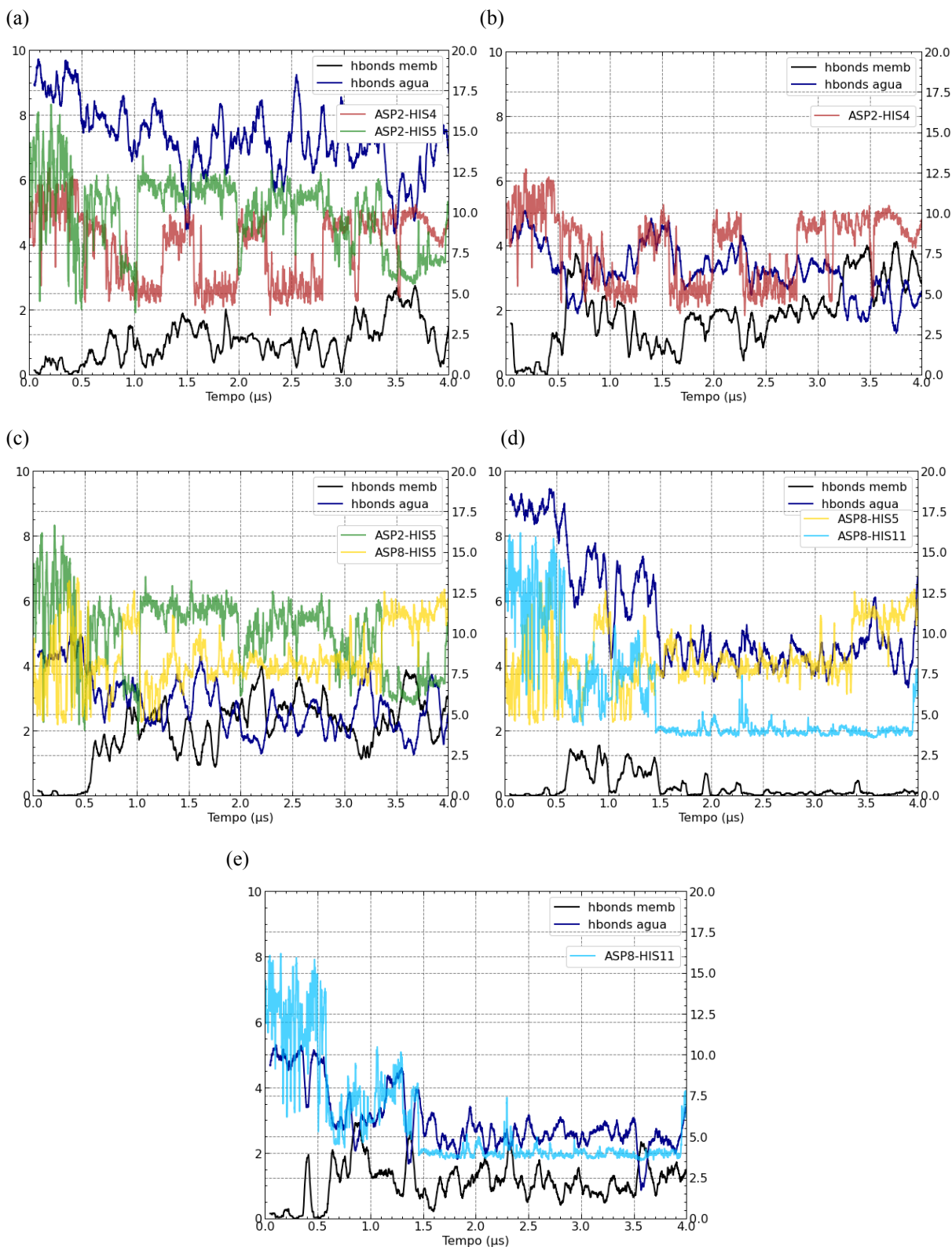
No geral, vemos que conforme o peptídeo adsorve, seus resíduos carregados perdem ligações de hidrogênio com a água, o que é esperado, mas não passam a fazê-las com os lipídios da bicamada mas sim se envolvem, preferencialmente, em pontes salinas intra peptídeo, o que provavelmente influencia em sua estruturação em alfa-hélice.

Figura 4.7 - Relação entre as ligações de hidrogênio com a água e com a bicamada e as pontes salinas formadas no peptídeo MP1 ao longo do tempo de simulação. No eixo à esquerda temos o número de ligações de hidrogênio e no da direita a distância das pontes salinas em Å. São mostradas as interações em cada resíduo, em (a) resíduo 2, (b) resíduo 4, (c) resíduo 5, (d) resíduo 8 e (e) resíduo 11.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.8 - Relação entre as ligações de hidrogênio com a água e com a bicamada e as pontes salinas formadas no peptídeo H-MP1 ao longo do tempo de simulação. No eixo à esquerda temos o número de ligações de hidrogênio e no da direita a distância das pontes salinas em Å. São mostradas as interações em cada resíduo, em (a) resíduo 2, (b) resíduo 4, (c) resíduo 5, (d) resíduo 8 e (e) resíduo 11.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As interações acontecem de forma semelhante durante a adsorção do H-MP1 (Figura 4.8), os resíduos carregados trocam as ligações de hidrogênio com as moléculas de água do sistema por ligações de hidrogênio com a membrana ou passam a atuar na formação de pontes salinas, isso é visto principalmente nos resíduos 8 e 11, mostrada em azul ciano, com a formação de uma ponte salina estável entre eles. Entretanto, a quantidade e estabilidade das pontes salinas formadas entre os resíduos carregados do H-MP1 após a adsorção é menor que no caso do MP1.

Vemos que o peptídeo H-MP1 apresenta uma maior perda de ligações de hidrogênio com a água e uma maior interação com bicamada em comparação com MP1, que por sua vez, apresenta maior quantidade de pontes salinas entre os resíduos de aminoácidos e, conseqüentemente, uma melhor estruturação.

4.3 Análises da interação entre o peptídeo e a bicamada

4.3.1 Interações com a bicamada

Com as simulações de DM realizadas também é possível obter informações a respeito das interações que ocorrem entre os resíduos de aminoácidos dos peptídeos com a bicamada lipídica, esse tipo de análise é importante principalmente pelo fato de tais observações serem difíceis de se realizar experimentalmente e de trazerem informações importantes sobre o impacto da adsorção dos peptídeos nas propriedades da bicamada.

Uma informação importante que pode ser tirada das simulações de DM é a respeito das energias de interações Coulombiana e de Van der Waals entre os peptídeos antimicrobianos e a bicamada lipídica.

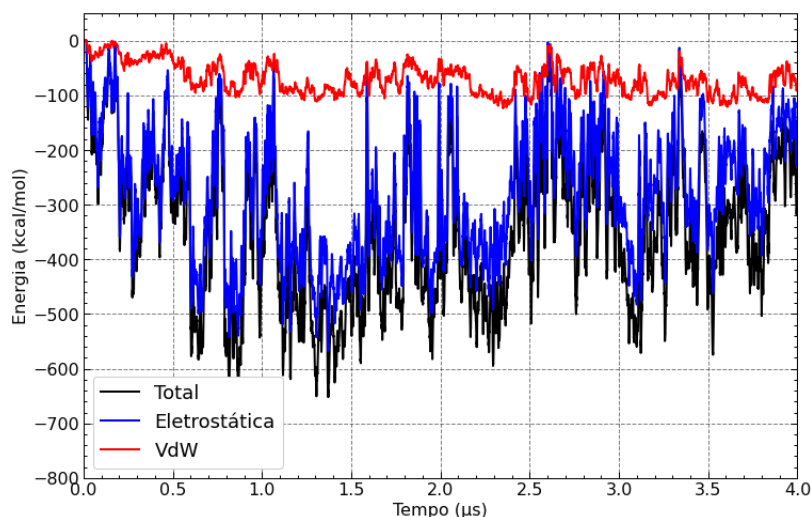
A Figura 4.9 mostra que para ambos os peptídeos as energias de interação entre peptídeo e membrana do tipo eletrostática e de Van der Waals diminuem ao longo da simulação, ocorrendo um decréscimo considerável quando os peptídeos começam a absorver na bicamada, por volta de 500 ns para o MP1 e 700 ns para o H-MP1. As energias diminuem gradualmente conforme os peptídeos interagem com a bicamada e após a adsorção a energia de interação Van der Waals se mantém estável em aproximadamente -100 kcal/mol, enquanto a energia de interação eletrostática, embora menos estável, se mantém entre -300 e -600 kcal/mol aproximadamente.

Isso indica que ambos os peptídeos se encontram em um estado de maior estabilidade entálpica ao se inserirem na bicamada, apesar de fatores entrópicos importantes não serem considerados nesse tipo de cálculo energético.

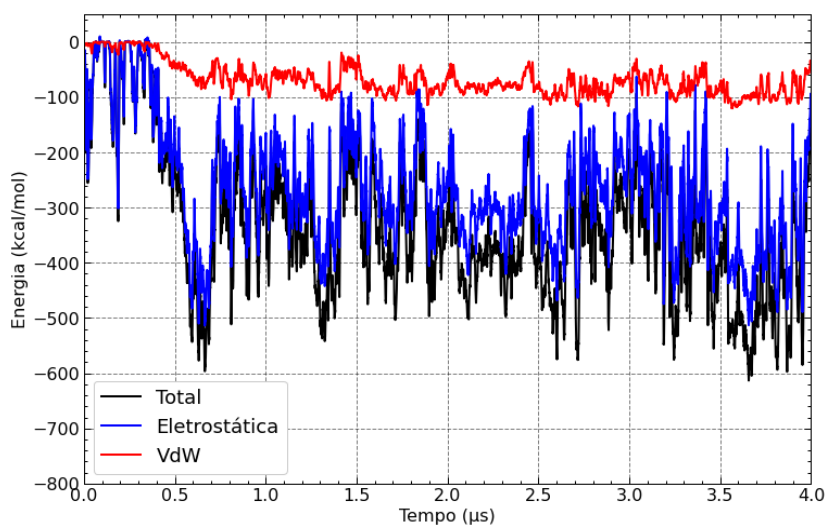
Em ambos os sistemas a energia de interação Coulombiana prevalece sobre a de Van der Waals, tal interação ocorre entre grupos carregados, o que evidencia que a adsorção dos peptídeos na bicamada ocorre devido, principalmente, a interações entre os resíduos carregados do peptídeo e grupos carregados/polares dos fosfolipídios.

Figura 4.9 - Energias de interações eletrostáticas (em azul), de Van der Waals (em vermelho) e energia total (em preto) para os peptídeos (a) MP1 e (b) H-MP1 ao longo da simulação.

(a)



(b)



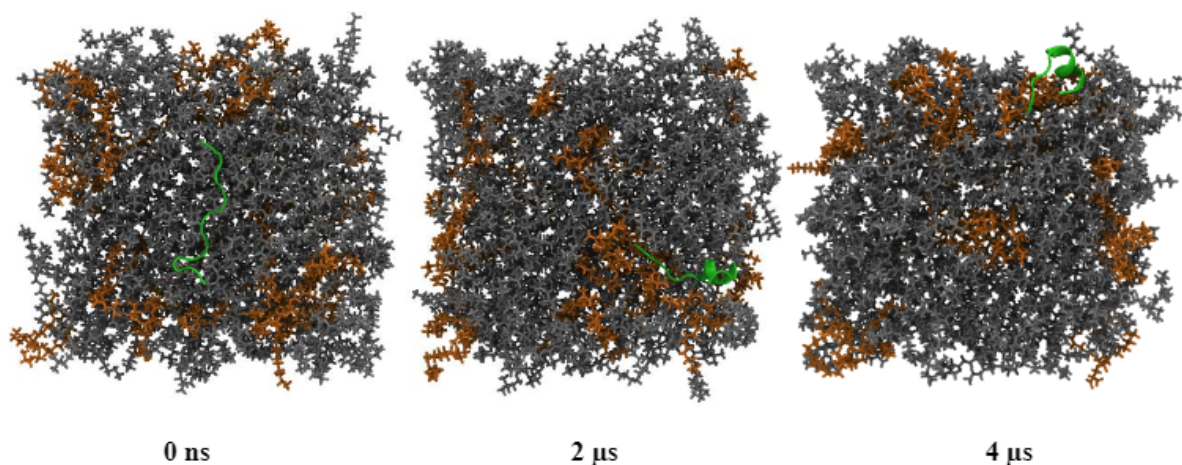
Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o objetivo de investigar a interação dos peptídeos com os diferentes tipos de fosfolipídios da bicamada, foram geradas representações visuais, utilizando o VMD, exibindo a distribuição dos fosfolipídios na superfície da bicamada. Na Figura 4.10, são apresentadas as distribuições lipídicas no início da simulação, bem como após a adsorção dos peptídeos na bicamada, com 2 μ s de simulação e 4 μ s de simulação.

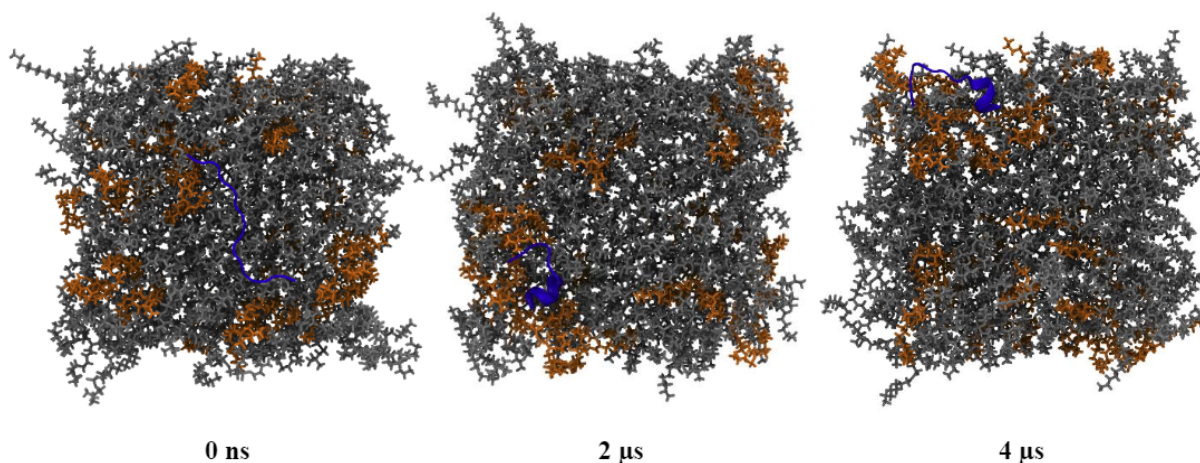
Para ambos os peptídeos é possível observar a formação de aglomerados lipídicos do fosfolipídio POPS próximo a região em que os peptídeos estão adsorvidos. Isso sugere que ao serem adsorvidos, os peptídeos passam a interagir preferencialmente com fosfolipídios POPS. Essas interações ocorrem devido às cargas positivas dos peptídeos, que atraem os fosfolipídios POPS com carga oposta para próximo de si.

Figura 4.10 - Distribuição lipídica ao longo da superfície da bicamada para as simulações com os peptídeos (a) MP1 e (b) H-MP1.

(a)



(b)



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2 Alterações na bicamada

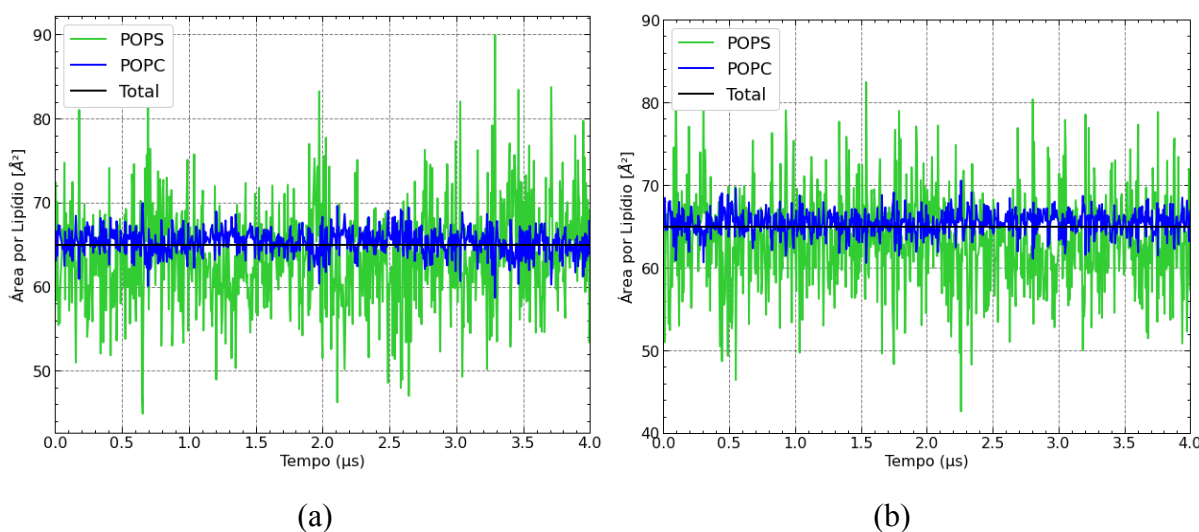
As análises apresentadas até aqui foram focadas nos peptídeos antimicrobianos, entretanto, também é foco deste estudo identificar as alterações que tais peptídeos possam causar na bicamada lipídica ao se inserir na mesma.

Uma análise importante é a área por lipídio, que serve tanto para validar se o modelo de membrana que foi utilizado nas simulações se comporta de forma realista, como para entender se interações com outras moléculas afetam a organização lipídica. A área por lipídio total e a área por lipídio de cada espécie de lipídio da membrana ao longo da simulação estão representadas na Figura 4.11.

Para ambos os peptídeos podemos observar que a área por lipídio total permanece constante durante toda a trajetória, isso mostra a integridade da membrana utilizada e que as interações entre os componentes da membrana e outras moléculas estão equilibradas.

Além disso, podemos reparar que os valores da área por lipídio de POPC são um pouco mais estáveis e próximos da área por lipídio total, enquanto para POPS a área por lipídio possui uma variação maior, isso acontece devido ao fato de o número de fosfolipídios POPS ser menor e indica que passam por maiores mudanças na organização e distribuição na membrana ao longo da simulação.

Figura 4.11 - Área por lipídio ao longo da simulação para o (a) MP1 e (b) H-MP1, onde a área por lipídio total é representada em preto, a dos fosfolipídios POPC é representado em azul e de POPS em verde.

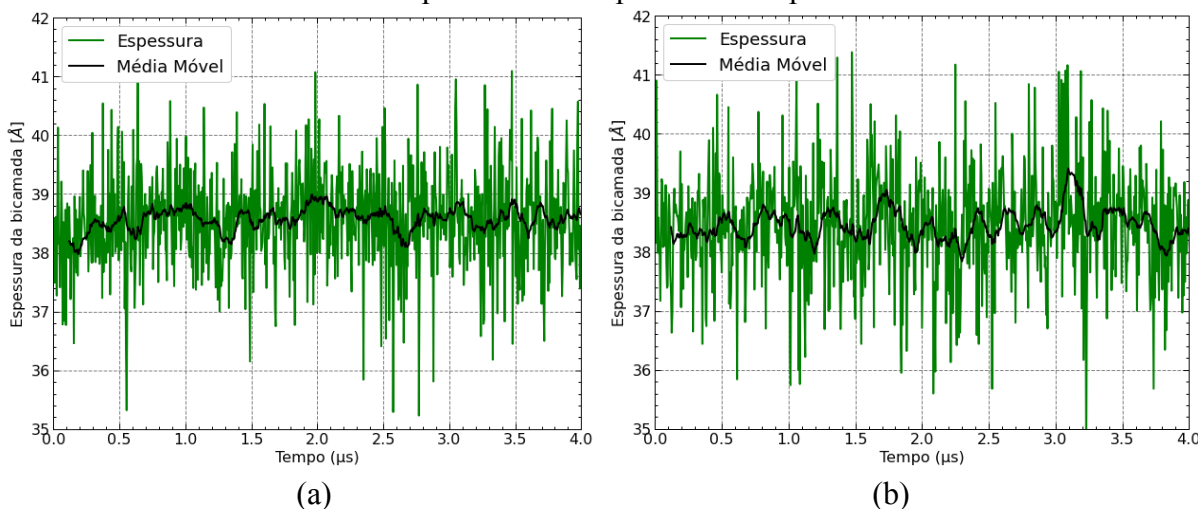


Fonte: Elaborado pelo autor.

Resultados experimentais *in vitro* apontam que os peptídeos MP1 e H-MP1 perturbam o empacotamento lipídico ao se inserirem na bicamada lipídica, causando alterações que, consequentemente, resultam na formação de poros ou vazamento. Tais estudos foram realizados utilizando os peptídeos em concentrações específicas (VIEGAS, 2019; MARTINS et al., 2021). Nas simulações, foi considerado apenas um peptídeo interagindo com a bicamada lipídica, assim, espera-se observar pequenas alterações, como variações na espessura da bicamada ou nos ângulos de curvatura da superfície, de modo que também foram realizadas análises que nos permitiram observar esses efeitos.

A espessura da bicamada ao longo da simulação é mostrada na Figura 4.12. Podemos observar que tanto para MP1, na Figura 4.12a, quanto para H-MP1, na Figura 4.12b, houve um pequeno acréscimo nos valores médios da espessura da bicamada, essa variação é pequena e pode ser atribuída a tanto à incorporação do peptídeo na bicamada como a mudanças na organização lipídica que o peptídeo causou ao ser adsorvido.

Figura 4.12 - Espessura da membrana ao longo da simulação para (a) MP1 e (b) H-MP1. Em verde está representada a espessura e em preto a sua média móvel.



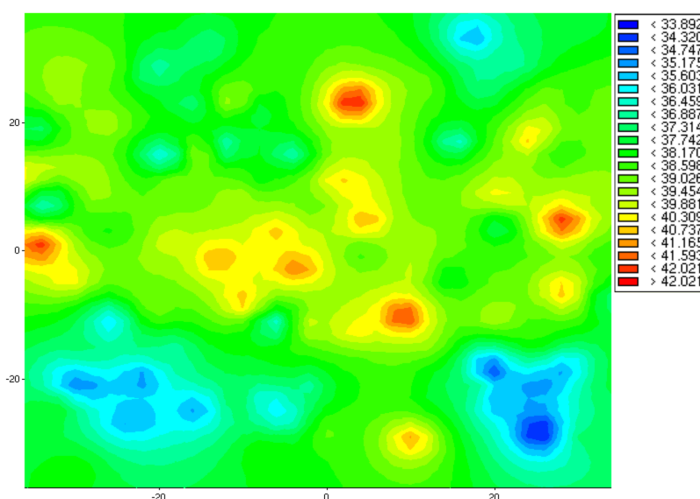
Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar de a variação da espessura média ao longo da simulação ter sido mínima, é importante considerar que, como o gráfico representa uma média, pode ter havido variações significativas em regiões específicas. Para compreender melhor essas variações locais, também foi gerado um mapa de calor da espessura ao longo da superfície da bicamada, no início da simulação e após a adsorção do peptídeo. O mapa de calor da espessura foi obtido conforme mostrado nas imagens a seguir (Figura 4.13 e Figura 4.14).

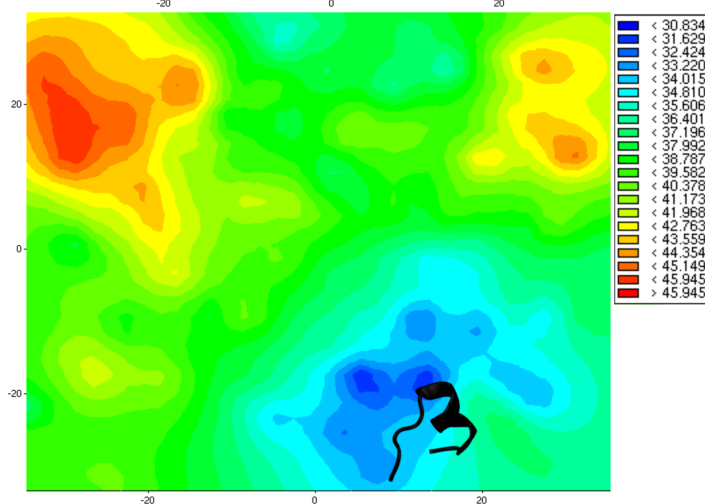
A análise revela que a adsorção de ambos os peptídeos induz a uma distribuição heterogênea da espessura ao longo da bicamada, destacando áreas de espessura aumentada ou reduzida. Antes da adsorção, são observadas algumas regiões pontuais onde há variações na espessura, no entanto, essas regiões estão muito espaçadas e a maioria desses pontos são de regiões mais espessas. Após a adsorção já é possível observar uma ampla área onde a espessura é significativamente reduzida. Em ambos os sistemas, observa-se que os peptídeos quando adsorvidos se encontram sobre regiões de menor espessura da bicamada, sugerindo que sua presença provoca deformações locais. Embora ambos os peptídeos exibam comportamento e efeitos de deformação semelhantes, o peptídeo MP1 apresenta uma variação maior nos valores de espessuras, em comparação com o H-MP1.

4.13 - Mapa de calor mostrando as variações na espessura da bicamada lipídica dos peptídeos (a) MP1 antes da adsorção e (b) MP1 após a adsorção. Cores mais quentes (vermelhos) indicam regiões mais espessas e cores mais frias (azuis) representam áreas mais finas na bicamada.

(a)



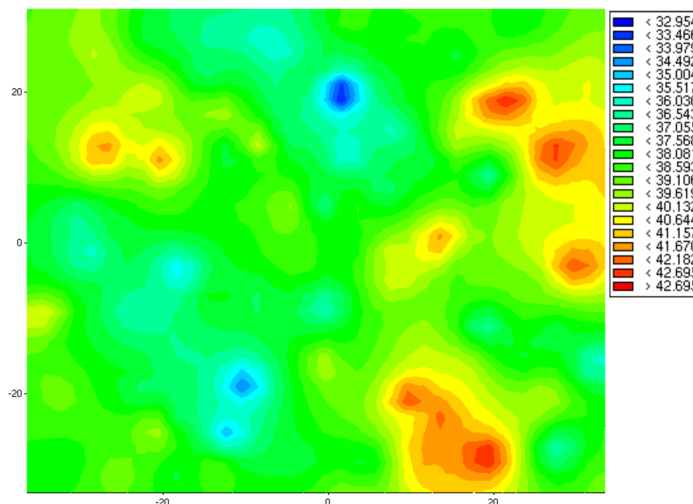
(b)



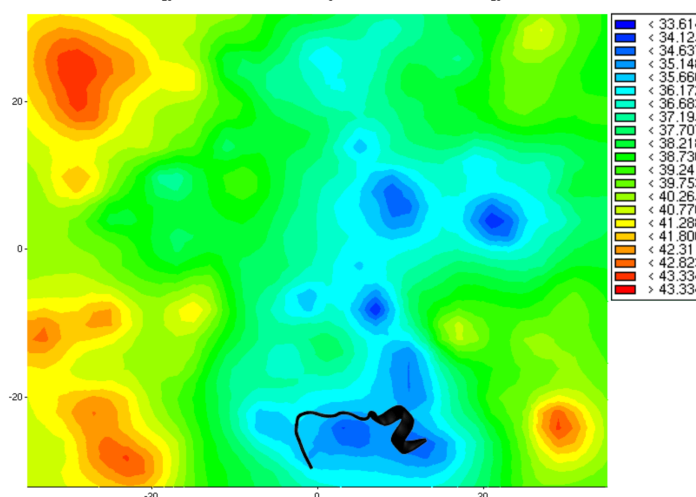
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.14 - Mapa de calor mostrando as variações na espessura da bicamada lipídica dos peptídeos (a) H-MP1 antes da adsorção e (b) H-MP1 após a adsorção. Cores mais quentes (vermelhos) indicam regiões mais espessas e cores mais frias (azuis) representam áreas mais finas na bicamada.

(a)



(b)

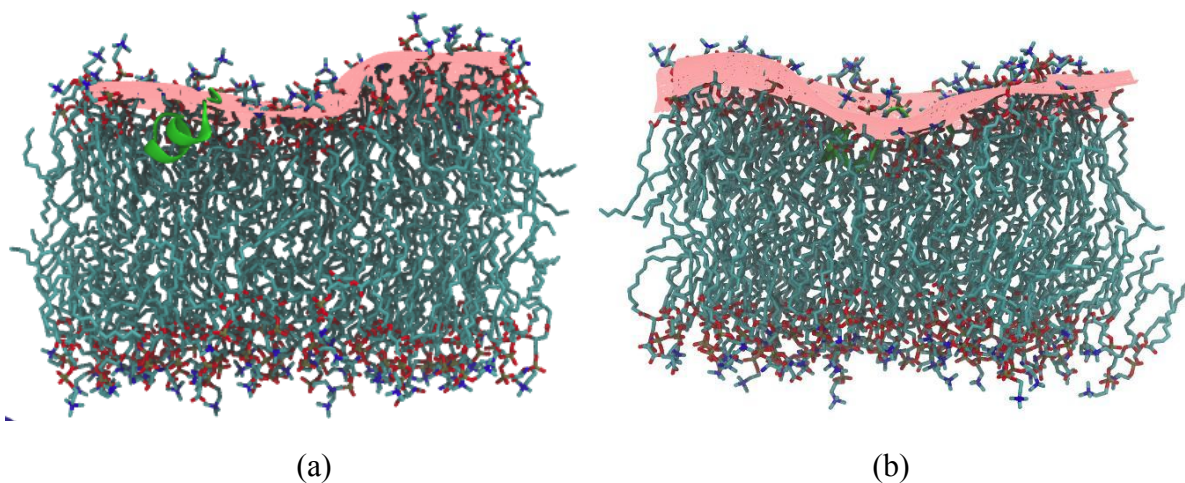


Fonte: Elaborado pelo autor.

Tais variações de espessura eram esperadas, uma vez que estudos experimentais indicam que o efeito de afinamento local da membrana, causado pela adsorção de um peptídeo, é um mecanismo que pode induzir a formação de poros (CHEN; LEE; HUANG, 2003).

Dado que os peptídeos demonstraram induzir alterações na espessura da bicamada lipídica, é igualmente relevante investigar as curvaturas geradas na sua superfície. Assim, as curvaturas da superfície da bicamada lipídica quando os peptídeos se encontram adsorvidos estão representadas de forma mais visual na Figura 4.15. É possível notar o aumento da curvatura da bicamada lipídica causada pela presença de ambos os peptídeos, apresentando cavidades e abaulamentos.

Figura 4.15 - Grid mostrando as curvaturas da superfície da membrana quando os peptídeos (a) MP1 e (b) H-MP1 estão adsorvidos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

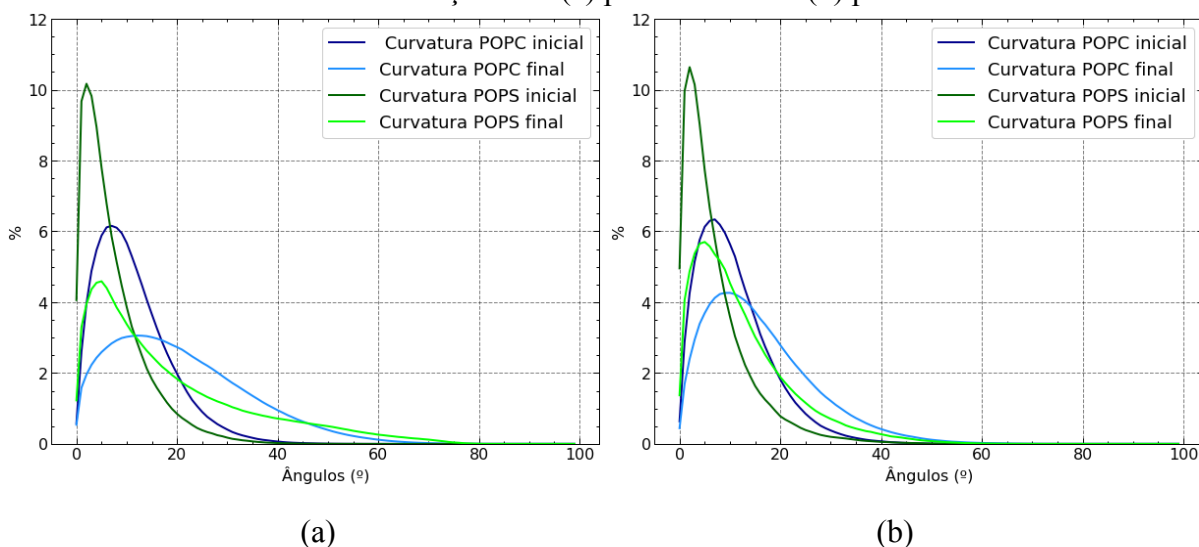
De modo a complementar essa informação, foi também obtida a distribuição dos ângulos de curvatura da superfície da bicamada de cada espécie de fosfolipídios, POPC e POPS, no início e no final da simulação, como mostra a Figura 4.16.

Com a adsorção dos peptídeos MP1 e H-MP1 na membrana, é possível notar uma diferença significativa na distribuição dos ângulos de curvatura média da superfície da bicamada. Isso pode ser observado para ambos os peptídeos, mas o MP1, Figura 4.16a, apresenta um deslocamento para ângulos de curvatura ainda maiores. Após a adsorção os ângulos variam de 0° a aproximadamente 70° , enquanto no início da simulação era possível observar ângulos de curvatura de no máximo 40° .

Embora o H-MP1, Figura 4.16b, apresente uma variação menor na distribuição dos ângulos de curvatura, ainda é possível observar uma diferença significativa, no início da simulação os ângulos de curvatura chegavam no máximo a 40° , e após a adsorção do peptídeo os ângulos de superfície variam de 0° a aproximadamente 50° .

O fato dos peptídeos causarem curvaturas na superfície da bicamada lipídica está de acordo com resultados experimentais de fluorescência, que mostraram que esses peptídeos, em maiores concentrações, provocam inicialmente uma curvatura na membrana, seguida pela formação de um poro e subsequente vazamento (VIEGAS, 2019).

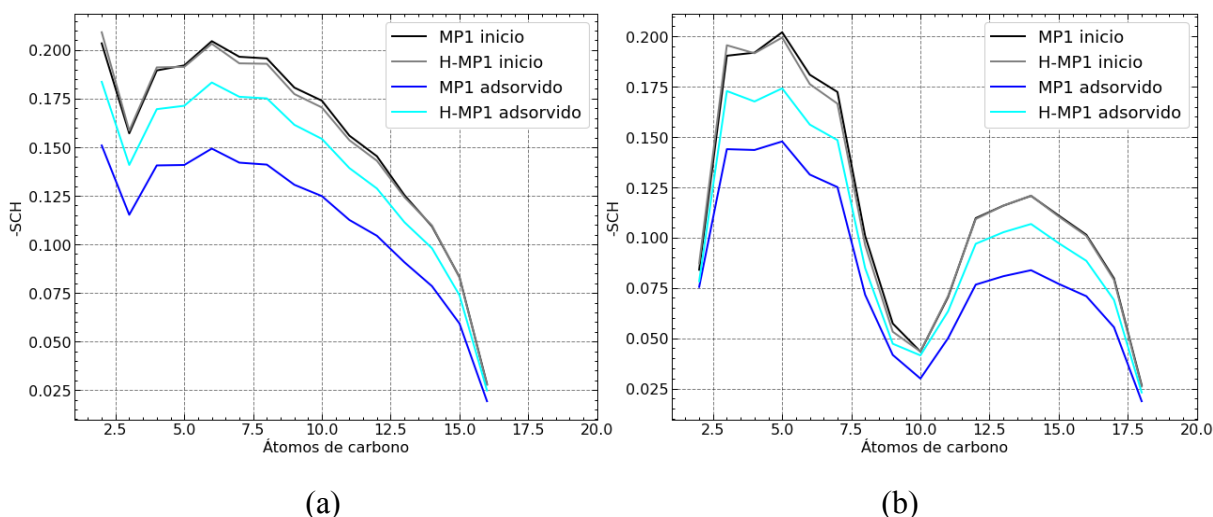
Figura 4.16 - Distribuição do desvio angular da curvatura na superfície da bicamada lipídica para os fosfolipídios POPC, representado em azul, e POPS, representado em verde, no início e no final da simulação. Em (a) para MP1 e em (b) para H-MP1.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, foi também calculado o parâmetro de ordem (S_{CH}) das cadeias saturadas e insaturadas dos fosfolipídios da bicamada, para os últimos 100 ns simulação, com os peptídeos adsorvidos na bicamada, e também no início das simulações, durante 100 ns anteriores à adsorção dos peptídeos, a fim de comparar se os peptídeos causam alguma alteração na bicamada, e os resultados podem ser vistos na Figura 4.17.

Figura 4.17 - Parâmetro de ordem das cadeias (a) saturadas e (b) insaturadas dos fosfolipídios da bicamada. Os cálculos foram feitos considerando os últimos 100 ns de simulação em que os peptídeos se encontram adsorvidos, MP1 é representado em ciano e H-MP1 em azul escuro, e também para 100 ns anteriores à adsorção dos peptídeos, onde MP1 é representado em preto e H-MP1 em cinza.



Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível notar na figura 4.17 que a adsorção dos peptídeos na bicamada lipídica causa uma diminuição do parâmetro de ordem tanto da cadeia saturada como da insaturada, ou seja, os peptídeos afetam a bicamada lipídica causando uma perturbação do empacotamento lipídico. O parâmetro de ordem foi consideravelmente menor para o peptídeo MP1, em comparação com seu análogo H-MP1, o que indica que MP1 causa maior perturbação na bicamada lipídica, consequentemente levando a uma maior fluidez da membrana.

Tais resultados podem ser comparados com o parâmetro de ordem calculado em estudos sobre a ação desses peptídeos em modelos de membranas bacterianas (POPC:POPG) (MARTINS et al., 2021), que mostra um padrão semelhante no gráfico do parâmetro de ordem, indicando que os peptídeos atuam de forma parecida nas duas bicamadas. Também foi possível notar que o peptídeo MP1 perturbou mais a bicamada bacteriana, em comparação com o H-MP1.

As simulações deste trabalho foram realizadas com apenas um peptídeo adsorvendo na bicamada, de modo que já não era esperado observar grandes perturbações como formação de poros ou rompimento da bicamada lipídica. A diminuição observada na ordem da bicamada e as variações nos ângulos de superfície, principalmente para o MP1, evidenciam que a adsorção dos peptídeos causa uma desestruturação do empacotamento lipídico, e devido a essa dispersão das cadeias lipídicas a bicamada fica mais fluida. Isso pode levar a um aumento da capacidade de permeação da bicamada ou formação de poros, podendo ser um indício da potencial ação anticancerígena desses peptídeos.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste estudo foi investigado, fazendo uso de simulações de Dinâmica Molecular, o processo de adsorção e a ação dos dois peptídeos antimicrobianos, o Polybia-MP1 e seu análogo H-MP1, em uma bicamada lipídica mimética de célula cancerígena composta pelos fosfolipídios POPC e POPS na proporção 80:20 respectivamente.

Ambos os peptídeos, que inicialmente se encontravam totalmente desenovelados e posicionados a uma distância aproximada de 10 Å da superfície da bicamada, apresentam comportamento similar ao interagirem com bicamada lipídica. Eles se aproximam pelo N-terminal e após a adsorção se posicionam paralelamente ao plano da bicamada e passam a apresentar, em parte dos seus resíduos, estrutura secundária em α -hélice.

As análises apontam que o MP1 apresenta uma maior quantidade de pontes salinas intra peptídeo e, conseqüentemente, apresenta uma maior porcentagem de conformação em α -hélice, enquanto o H-MP1, por formar uma quantidade menor de pontes salinas, apresenta uma estrutura em α -hélice menos estável. Tais resultados a respeito da estrutura secundária dos peptídeos concordam com resultados obtidos através de estudos experimentais, que mostram que o MP1, de fato, apresenta uma maior estruturação do que o H-MP1.

As simulações de DM também mostraram que no processo de adsorção os peptídeos perdem ligações de hidrogênio com as moléculas de água e passam a formar pontes salinas que ajudam a estabilizar (ou até induzir a formação de) a estrutura secundária e também formam ligações de hidrogênio com a bicamada.

Do ponto de vista energético as simulações mostraram que as interações eletrostáticas são as que mais contribuem para a ancoragem do peptídeo na bicamada.

Foram analisadas ainda alterações que os peptídeos MP1 e H-MP1 causaram na bicamada lipídica, onde foi mostrado que ao serem adsorvidos eles perturbam a bicamada causando uma afinamento na espessura da bicamada na região em que o peptídeo se encontra adsorvido, alterações nos ângulos de curvatura da superfície e uma diminuição da ordem das cadeias lipídicas.

Tais resultados indicam que esses peptídeos atuam perturbando o empacotamento lipídico e deixando a membrana toda mais fluida, o que facilita a permeação da membrana e, conseqüentemente, a formação de poros. O fato de nesse estudo ter sido realizado com apenas um peptídeo na caixa de simulação não nos permitiu observar grandes alterações na bicamada lipídica, uma vez que há indícios de que o poder lítico desses peptídeos está relacionado a um fenômeno coletivo de ação de vários lipídios sobre a bicamada. Assim, as perturbações

observadas, podem indicar que tais peptídeos tem potencial para levar ao vazamento de membrana ou formação de poros se presentes em maior número na caixa de simulação, evidenciando sua potencial ação terapêutica contra células cancerígenas.

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, temos como perspectiva estudar tais sistemas com um número maior de peptídeos na caixa de simulação, a fim de poder visualizar maiores perturbações na bicamada lipídica causadas pela ação coletiva dos peptídeos sobre ela. Além disso, tomando como base os resultados de pontes salinas e estrutura secundária, é de nosso interesse propor peptídeos híbridos, ou seja, com resíduos de lisina, histidina e ácido glutâmico em posições chave, a fim de tentar obter uma estrutura secundária com maior conteúdo helicoidal e, portanto, uma maior eficiência lítica contra bactérias e células cancerígenas.

REFERÊNCIAS

- ALDER, B. J.; WAINWRIGHT, T. E. Phase Transition for a Hard Sphere System. **The Journal of Chemical Physics**, v. 27, n. 5, p. 1208–1209, 1957.
- ALVARES, D. D. S. et al. Modulatory Effects of Acidic pH and Membrane Potential on the Adsorption of pH-Sensitive Peptides to Anionic Lipid Membrane. **Membranes**, v. 11, n. 5, p. 307, 22 abr. 2021.
- ALVARES, D. S.; RUGGIERO NETO, J.; AMBROGGIO, E. E. Phosphatidylserine lipids and membrane order precisely regulate the activity of Polybia-MP1 peptide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1859, n. 6, p. 1067–1074, jun. 2017.
- ALVES, A. C. et al. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 9, p. 2231–2244, set. 2016.
- BAXTER, A. A. et al. Tumor cell membrane-targeting cationic antimicrobial peptides: novel insights into mechanisms of action and therapeutic prospects. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 20, p. 3809–3825, 1 out. 2017.
- BIRGE, R. B. et al. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 6, p. 962–978, jun. 2016.
- BOBONE, S.; STELLA, L. Selectivity of Antimicrobial Peptides: A Complex Interplay of Multiple Equilibria. Em: MATSUZAKI, K. (Ed.). **Antimicrobial Peptides**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore, 2019. v. 1117p. 175–214.
- BOGDANOV, M.; DOWHAN, W. Lipid-assisted Protein Folding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 52, p. 36827–36830, dez. 1999.
- BUCH, I.; GIORGINO, T.; DE FABRITIIS, G. Complete reconstruction of an enzyme-inhibitor binding process by molecular dynamics simulations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 25, p. 10184–10189, 21 jun. 2011.
- CHAKRABORTY, A. et al. Molecular Dynamics Simulation of the Interaction of Two Linear Battacin Analogs with Model Gram-Positive and Gram-Negative Bacterial Cell Membranes. **ACS Omega**, v. 6, n. 1, p. 388–400, 12 jan. 2021.
- CHEN, F.-Y.; LEE, M.-T.; HUANG, H. W. Evidence for Membrane Thinning Effect as the Mechanism for Peptide-Induced Pore Formation. **Biophysical Journal**, v. 84, n. 6, p. 3751–3758, 1 jun. 2003.
- DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 15 jun. 1993.

DAVIDCHACK, R. L.; HANDEL, R.; TRETYAKOV, M. V. Langevin thermostat for rigid body dynamics. **The Journal of Chemical Physics**, v. 130, n. 23, p. 234101, 21 jun. 2009.

DENNISON, S. et al. Amphiphilic Alpha-Helical Antimicrobial Peptides and Their Structure / Function Relationships. **Protein & Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 31–39, 1 jan. 2005.

DOS SANTOS CABRERA, M. P. et al. New Insight into the Mechanism of Action of Wasp Mastoparan Peptides: Lytic Activity and Clustering Observed with Giant Vesicles. **Langmuir**, v. 27, n. 17, p. 10805–10813, 6 set. 2011.

DOS SANTOS CABRERA, M. P. et al. Influence of the Bilayer Composition on the Binding and Membrane Disrupting Effect of Polybia-MP1, an Antimicrobial Mastoparan Peptide with Leukemic T-Lymphocyte Cell Selectivity. **Biochemistry**, v. 51, n. 24, p. 4898–4908, 19 jun. 2012.

DOS SANTOS CABRERA, M. P. et al. Chemical and Biological Characteristics of Antimicrobial α -Helical Peptides Found in Solitary Wasp Venoms and Their Interactions with Model Membranes. **Toxins**, v. 11, n. 10, p. 559, out. 2019.

DRIGO FILHO, E. **Métodos computacionais no estudo de macromoléculas biológicas**. [s.l.: s.n.].

EBENHAN, T. et al. Antimicrobial Peptides: Their Role as Infection-Selective Tracers for Molecular Imaging. **BioMed Research International**, v. 2014, p. e867381, 27 ago. 2014.

FELLER, S. E. et al. Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 11, p. 4613–4621, 15 set. 1995.

FRANCO, L. R. et al. Simulations reveal that antimicrobial BP100 induces local membrane thinning, slows lipid dynamics and favors water penetration. **RSC Advances**, v. 12, n. 8, p. 4573–4588, 2022.

FRENKEL, D.; SMIT, B. **Understanding Molecular Simulation: From Algorithms to Applications**. 2nd edition ed. [s.l.] Academic Press, 2002.

FRISHMAN, D.; ARGOS, P. Knowledge-based protein secondary structure assignment. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 23, n. 4, p. 566–579, dez. 1995.

GIANGASPERO, A.; SANDRI, L.; TOSSI, A. Amphipathic α helical antimicrobial peptides. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 21, p. 5589–5600, 2001.

GRAGE, S. L. et al. Membrane Thinning and Thickening Induced by Membrane-Active Amphipathic Peptides. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, 2016.

GREEN, D. E.; FLEISCHER. The role of lipids in mitochondrial electron transfer and oxidative phosphorylation. 1963.

GRIFFITH, G. L.; KASUS-JACOBI, A.; PEREIRA, H. A. Bioactive Antimicrobial Peptides as Therapeutics for Corneal Wounds and Infections. **Advances in Wound Care**, v. 6, n. 6, p. 175–190, jun. 2017.

GUIXÀ-GONZÁLEZ, R. et al. MEMBPLUGIN: studying membrane complexity in VMD. **Bioinformatics**, v. 30, n. 10, p. 1478–1480, 15 maio 2014.

HANKINS, H. M. et al. Role of Flippases, Scramblases and Transfer Proteins in Phosphatidylserine Subcellular Distribution. **Traffic**, v. 16, n. 1, p. 35–47, 2015.

HARAYAMA, T.; RIEZMAN, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 5, p. 281–296, maio 2018.

HARRIS, F. et al. On the selectivity and efficacy of defense peptides with respect to cancer cells: ON THE SELECTIVITY AND EFFICACY OF DEFENSE. **Medicinal Research Reviews**, v. 33, n. 1, p. 190–234, jan. 2013.

HIRANO, Y. et al. Molecular Dynamics Study of Conformational Changes of Tankyrase 2 Binding Subsites upon Ligand Binding. **ACS Omega**, v. 6, n. 27, p. 17609–17620, 13 jul. 2021.

HORNAK, V. et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins**, v. 65, n. 3, p. 712–725, 15 nov. 2006.

HORTA, B. A. C. et al. A GROMOS-Compatible Force Field for Small Organic Molecules in the Condensed Phase: The 2016H66 Parameter Set. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 12, n. 8, p. 3825–3850, 9 ago. 2016.

HUAN, Y. et al. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 15 out. 2020.

HUANG, J.; MACKERELL, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. **Journal of Computational Chemistry**, v. 34, n. 25, p. 2135–2145, 30 set. 2013.

HUBER, V. et al. Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. **Seminars in Cancer Biology**, v. 43, p. 74–89, abr. 2017.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1 fev. 1996.

IKIZAWA, S. et al. PaCS-Toolkit: Optimized Software Utilities for Parallel Cascade Selection Molecular Dynamics (PaCS-MD) Simulations and Subsequent Analyses. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 128, n. 15, p. 3631–3642, 18 abr. 2024.

JO, S. et al. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1859–1865, ago. 2008.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 9, p. 646–652, set. 2002.

KERLEY, G. I. On Corrections to the Born- Oppenheimer Approximation. p. 51, [s.d.].
KNAPP, B.; OSPINA, L.; DEANE, C. M. Avoiding False Positive Conclusions in Molecular Simulation: The Importance of Replicas. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v.

14, n. 12, p. 6127–6138, 11 dez. 2018.

KOEHBACH, J.; CRAIK, D. J. The Vast Structural Diversity of Antimicrobial Peptides. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 40, n. 7, p. 517–528, jul. 2019.

KONNO, K. et al. New Mastoparan Peptides in the Venom of the Solitary Eumenine Wasp *Eumenes micado*. **Toxins**, v. 11, n. 3, p. 155, mar. 2019.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**. Second edition ed. [s.l.] Pearson Education, 2001.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6th ed ed. New York: W.H. Freeman, 2013.

LEITE, N. B. et al. PE and PS Lipids Synergistically Enhance Membrane Poration by a Peptide with Anticancer Properties. **Biophysical Journal**, v. 109, n. 5, p. 936–947, set. 2015.

LINDORFF-LARSEN, K. et al. How Fast-Folding Proteins Fold. **Science**, v. 334, n. 6055, p. 517–520, 28 out. 2011.

LUONG, H. X.; THANH, T. T.; TRAN, T. H. Antimicrobial peptides – Advances in development of therapeutic applications. **Life Sciences**, v. 260, p. 118407, nov. 2020a.

LUONG, H. X.; THANH, T. T.; TRAN, T. H. Antimicrobial peptides – Advances in development of therapeutic applications. **Life Sciences**, v. 260, p. 118407, nov. 2020b.

MAKOVITZKI, A.; FINK, A.; SHAI, Y. Suppression of human solid tumor growth in mice by intratumor and systemic inoculation of histidine-rich and pH-dependent host defense-like lytic peptides. **Cancer Research**, v. 69, n. 8, p. 3458–3463, 15 abr. 2009.

MARK, P.; NILSSON, L. Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 105, n. 43, p. 9954–9960, 1 nov. 2001.

MARTINS, I. B. S. et al. The effect of acidic pH on the adsorption and lytic activity of the peptides Polybia-MP1 and its histidine-containing analog in anionic lipid membrane: a biophysical study by molecular dynamics and spectroscopy. **Amino Acids**, v. 53, n. 5, p. 753–767, maio 2021.

MAY, S.; HARRIES, D.; BEN-SHAUL, A. Lipid Demixing and Protein-Protein Interactions in the Adsorption of Charged Proteins on Mixed Membranes. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 4, p. 1747–1760, out. 2000.

MCCAMMON, J. A.; GELIN, B. R.; KARPLUS, M. Dynamics of folded proteins. **Nature**, v. 267, n. 5612, p. 585–590, jun. 1977.

MELICHERČÍK, P. et al. Testing the efficacy of antimicrobial peptides in the topical treatment of induced osteomyelitis in rats. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 1, p. 97–104, jan. 2018.

MELLON, M.; BENBROOK, C.; BENBROOK, K. **Hogging It: Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock.** [s.l: s.n.].

METROPOLIS, N. et al. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. **The Journal of Chemical Physics**, v. 21, n. 6, p. 1087–1092, 1 jun. 1953.

MURRAY, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, fev. 2022.

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

PFALZGRAFF, A.; BRANDENBURG, K.; WEINDL, G. Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential for Bacterial Skin Infections and Wounds. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 281, 28 mar. 2018.

PHILLIPS, J. C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1781–1802, dez. 2005.

PIGGOT, T. J. et al. On the Calculation of Acyl Chain Order Parameters from Lipid Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 11, p. 5683–5696, 14 nov. 2017.

PROVASI, D. et al. Ligand-Induced Modulation of the Free-Energy Landscape of G Protein-Coupled Receptors Explored by Adaptive Biasing Techniques. **PLOS Computational Biology**, v. 7, n. 10, p. e1002193, 13 out. 2011.

RAPAPORT, D. C. **The Art of Molecular Dynamics Simulation.** [s.l.] Cambridge University Press, 2004.

ROHANI, N. et al. Acidification of Tumor at Stromal Boundaries Drives Transcriptome Alterations Associated with Aggressive Phenotypes. **Cancer Research**, v. 79, n. 8, p. 1952–1966, 15 abr. 2019.

SAIZ, L.; KLEIN, M. L. Computer Simulation Studies of Model Biological Membranes. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 6, p. 482–489, 1 jun. 2002.

SANTOS, D. E. S.; COUTINHO, K.; SOARES, T. A. Surface Assessment via Grid Evaluation (SuAVE) for Every Surface Curvature and Cavity Shape. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 62, n. 19, p. 4690–4701, 10 out. 2022.

SCHMIDT, N. W.; WONG, G. C. L. Antimicrobial peptides and induced membrane curvature: Geometry, coordination chemistry, and molecular engineering. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 17, n. 4, p. 151–163, ago. 2013.

SØRENSEN, O. E. Antimicrobial Peptides in Cutaneous Wound Healing. Em: HARDER, J.; SCHRÖDER, J.-M. (Eds.). **Antimicrobial Peptides.** Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 1–15.

- SOUZA, B. M. DE et al. Structure-activity relationship of mastoparan analogs: Effects of the number and positioning of Lys residues on secondary structure, interaction with membrane-mimetic systems and biological activity. **Peptides**, v. 72, p. 164–174, out. 2015.
- SRIVASTAVA, D.; PATRA, N. Enhanced Uptake of Anticancer C6-Pep Dimer in a Model Membrane Caused by Differential pKa in Acidic Microenvironment. **The Journal of Physical Chemistry B**, 30 set. 2023.
- STAFFORD, J. H.; THORPE, P. E. Increased Exposure of Phosphatidylethanolamine on the Surface of Tumor Vascular Endothelium. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 13, n. 4, p. 299–308, abr. 2011.
- STILLINGER, F. H.; RAHMAN, A. Improved simulation of liquid water by molecular dynamics. **The Journal of Chemical Physics**, v. 60, n. 4, p. 1545–1557, 15 fev. 1974.
- SZLASA, W. et al. Lipid composition of the cancer cell membrane. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 52, n. 5, p. 321–342, out. 2020.
- VAN DER PLOEG, P.; BERENDSEN, H. J. C. Molecular dynamics simulation of a bilayer membrane. **The Journal of Chemical Physics**, v. 76, n. 6, p. 3271–3276, 15 mar. 1982.
- VIEGAS, T. G. **Efeito do pH e da composição lipídica na interação do peptídeo antimicrobiano MP1 e seu análogo H-MP1 com membranas modelo**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista (Unesp), 20 maio 2019.
- VOGT, T. C.; BECHINGER, B. The interactions of histidine-containing amphipathic helical peptide antibiotics with lipid bilayers. The effects of charges and pH. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 41, p. 29115–29121, 8 out. 1999.
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1087-1093, 4 jan. 2016.
- WANG, K. et al. Antitumor effects, cell selectivity and structure–activity relationship of a novel antimicrobial peptide polybia-MPI. **Peptides**, v. 29, n. 6, p. 963–968, jun. 2008.
- WANG, K. et al. Novel mode of action of polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells. **Cancer Letters**, v. 278, n. 1, p. 65–72, jun. 2009.
- WELTE, M. A.; GOULD, A. P. Lipid droplet functions beyond energy storage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Recent Advances in Lipid Droplet Biology. v. 1862, n. 10, Part B, p. 1260–1272, 1 out. 2017.
- WU, E. L. et al. CHARMM-GUI Membrane Builder toward realistic biological membrane simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 35, n. 27, p. 1997–2004, 15 out. 2014.
- XUAN, H. L. et al. Chemical approaches in the development of natural nontoxic peptide Polybia-MP1 as a potential dual antimicrobial and antitumor agent. **Amino Acids**, v. 53, n. 6, p. 843–852, jun. 2021.

YI, H. et al. High therapeutic efficacy of Cathelicidin-WA against postweaning diarrhea via inhibiting inflammation and enhancing epithelial barrier in the intestine. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25679, 16 maio 2016.

YOUNT, N.; YEAMAN, M. Immunocontinuum: Perspectives in Antimicrobial Peptide Mechanisms of Action and Resistance. **Protein & Peptide Letters**, v. 12, n. 1, p. 49–67, 1 jan. 2005.

ZHANG, W. et al. A novel analog of antimicrobial peptide Polybia-MPI, with thioamide bond substitution, exhibits increased therapeutic efficacy against cancer and diminished toxicity in mice. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1832–1838, out. 2010.