



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

Taisa Giordano Viegas

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

São José do Rio Preto
2019

Taisa Giordano Viegas

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

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

Financiadora: CNPq- Processo 167069/2014-4

Orientador: Prof. Dr. João Ruggiero Neto

São José do Rio Preto
2019

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Taisa Giordano Viegas

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

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

Financiadora: CNPq– Processo 167069/2014-4

Comissão Examinadora

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

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

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

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

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

São José do Rio Preto
20 de maio de 2019

Agradecimento

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

Sumário

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

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

CAPÍTULO 1

1. Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

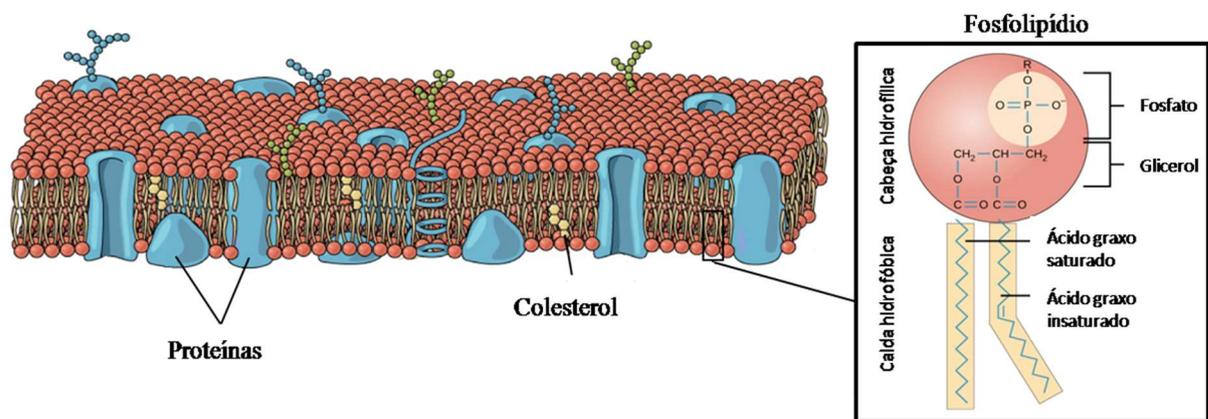
Nesse trabalho foi avaliada a interação dos peptídeos MP1 e H-MP1 com vesículas aniônicas formadas por POPC:POPG (7:3) mimetizando membranas bacterianas e POPC:POPE (9:1), POPC:POPS (8:2) e POPC:POPS:POPE(7:2:1) mimetizando células tumorais, e como esses peptídeos respondem ao pH do meio sendo este fixado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

1.2 Desenvolvimento teórico

1.2.1 Membranas biológicas

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

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



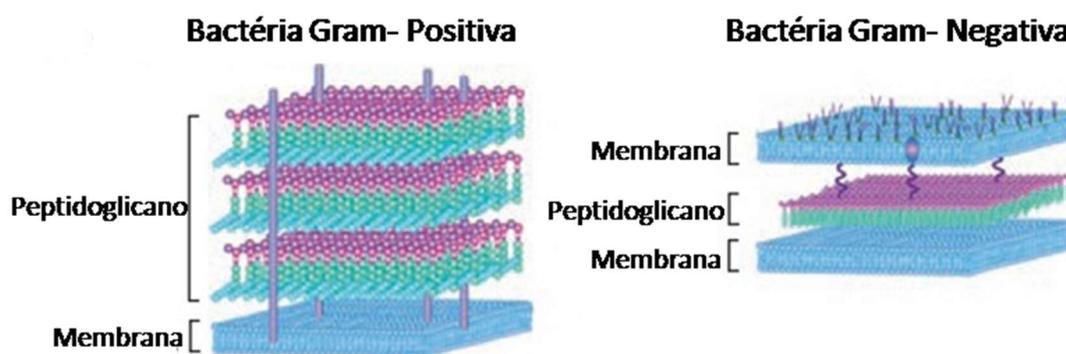
Os lipídios são moléculas anfipáticas formadas basicamente por uma parte hidrofílica (cabeça polar) e a outra parte hidrofóbica composta de ácidos graxos não polares (caudas) (NELSON; COX, 2011). Os principais tipos de lipídios encontrados em membranas biológicas são: os fosfolipídios, glicolipídios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

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

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

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

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

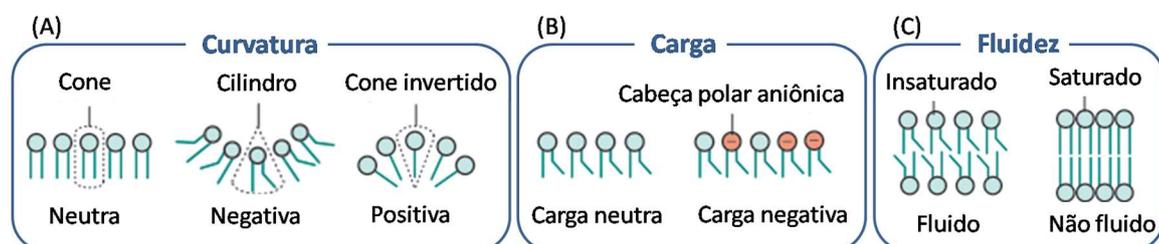


As membranas das células eucarióticas e as membranas bacterianas possuem funções similares, mas composições diferentes em relação aos fosfolipídios e outros componentes. Em geral as membranas bacterianas são compostas por lipídios aniônicos como fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL) e fosfatidilserina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

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

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

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

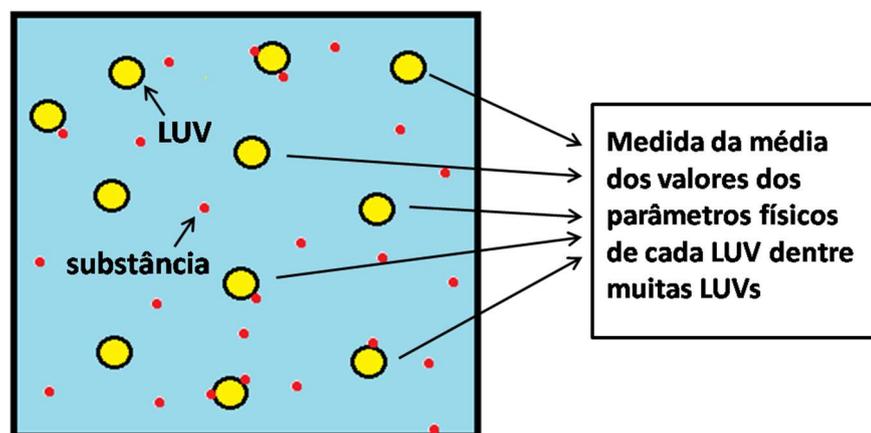


A complexidade das membranas biológicas frente a sua composição lipídica, proteica e glicoproteica dificulta a realização de estudos que visem investigar a interação de compostos ativos com as mesmas. Desta maneira, a utilização de sistemas modelo que mimetizem a composição das membranas de interesse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

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

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

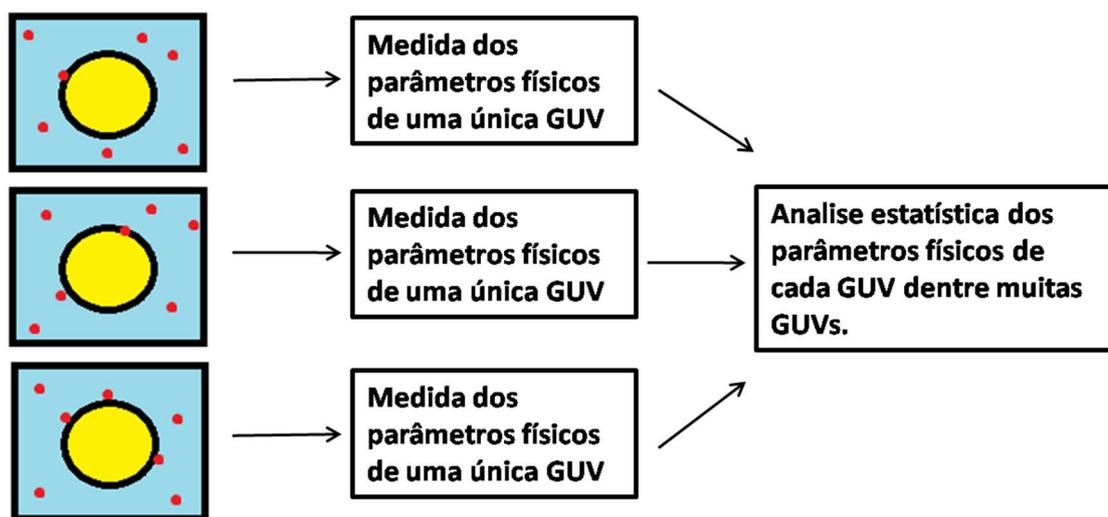
Figura 4 - Diagrama esquemático do princípio de uma medida usando uma suspensão de LUVs. Modificado de (YAMAZAKI, 2008).



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

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

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



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

1.2.2 Peptídeos

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

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

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

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

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



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

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

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

CAPÍTULO 2

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal investigar a interação do peptídeo MP1 e seu análogo sintético H-MP1 com membranas modelo em sistemas de interesse biológico.

Objetivos específicos:

- Implementar o método de vesícula gigante única;
- Avaliar a afinidade e a atividade lítica dos peptídeos com membranas modelos formadas por POPC:POPG (7:3) e POPC:POPS (8:2), POPC:POPS:POPE (7:2:1) e POPC:POPE (9:1) nos pHs 5,5 6,5 e 7,4;
- Comparar os parâmetros de afinidade e de atividade lítica obtidos para cada peptídeo em cada ambiente;
- Entender como as cargas líquidas dos peptídeos modulam a especificidade entre peptídeo e bicamada.

CAPÍTULO 3

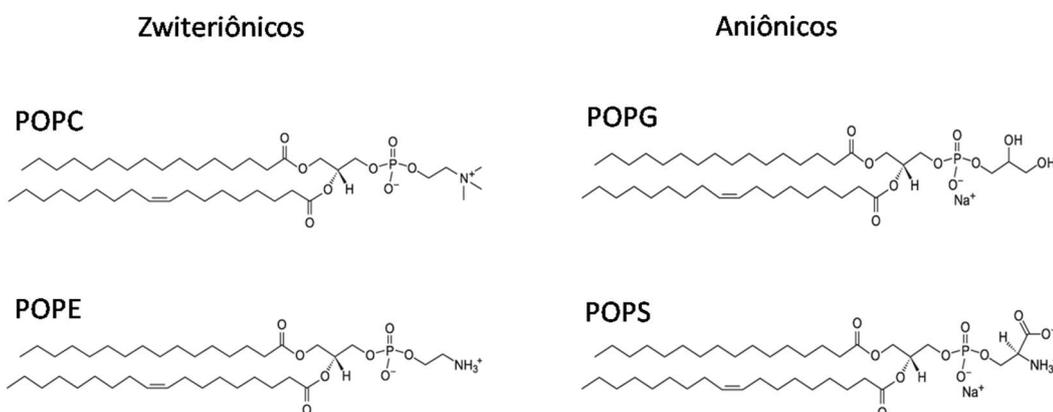
3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os peptídeos MP1(IDWKLLDAAKQIL-NH₂) e H-MP1(IDWHLLDAAHQIL-NH₂) utilizados foram sintetizados pelo grupo Prof. Mario S. Palma, Centro de estudos de insetos sociais, UNESP em Rio Claro. As soluções estoques de peptídeos foram preparadas com água bi-destilada e mantidas refrigeradas; a concentração final foi determinada espectroscopicamente em 280nm usando absorvidade molar do triptofano como 5580 M⁻¹cm⁻¹.

Os lipídios 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina (POPC) e 1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine(POPE),1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Rhod-PE) de natureza zwitteriônica, 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilglicerol(POPG) e 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (POPS) de natureza ácida, foram adquiridos da Avanti Polar Lipidis, Alabaster, AL. USA, (Figura 7). As soluções estoques de lipídios em diferentes razões molares foram preparadas em clorofórmio/metanol (2:1).

Figura 7- Estruturas dos fosfolipídios utilizados. Figura adaptada de <http://avantilipids.com>.



Clorofórmio e metanol com grau HPLC foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). Cloreto de sódio, citrato de sódio, fosfato de sódio, borato de sódio, hidróxido de sódio e sacarose foram obtidos de Sigma Aldrich. Brometo de sódio da Anedra, fluoreto de sódio e ácido clorídrico da Merck.

Tampão utilizado nos experimentos de CD é composto por 1mM citrato de sódio, 1mM de borato de sódio, 1mM fosfato de sódio e 150mM fluoreto de sódio em pHs acertados com HCl e NaOH para 5,5, 6,5 e 7,4. Nos experimentos de vesícula única foi utilizada uma solução salina de 150mM de NaCl nos três pHs de estudo.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação de vesículas grandes (LUVs)

Para a formação de um filme lipídico, um determinado volume de fosfolípidios em solução de clorofórmio/metanol (2:1) é adicionado a um tubo de vidro de fundo arredondado. Então o solvente é evaporado sob fluxo de nitrogênio e para garantir total evaporação do solvente orgânico o tubo de ensaio é levado a vácuo por 3 horas. Em seguida, esse filme é hidratado pela adição de tampão ou solução salina e agitado em um vortex para que ocorra o deslocamento das camadas de lípidios presas a parede do tubo e assim formar uma suspensão de MLVs.

Para obter as LUVs, a suspensão de MLVs é submetida a 6 extrusões através de membranas de policarbonato de 400nm e 11 extrusões com a de 100nm em um mini extrusor Avanti (Figura 8).

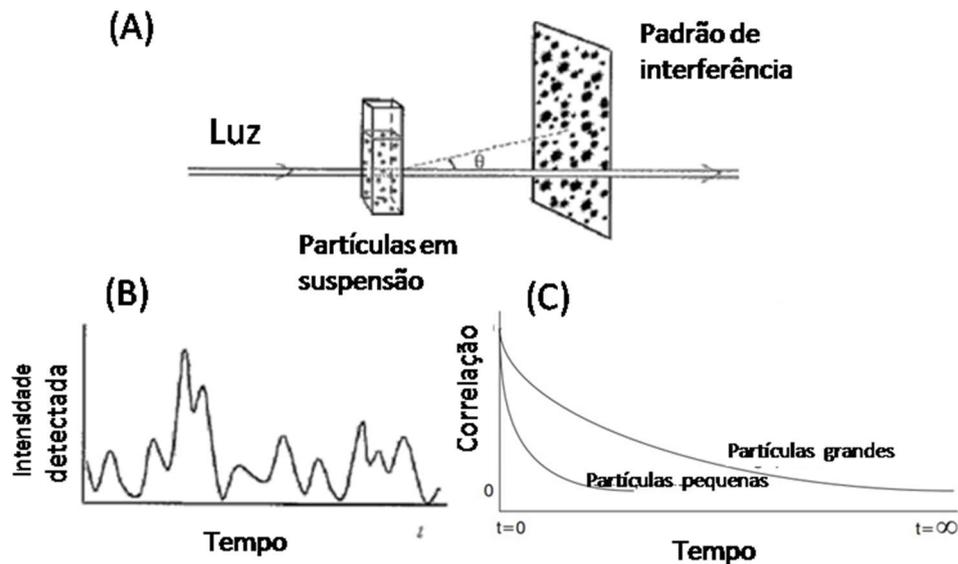
Figura 8 - Imagem de um extrusor. Figura adaptada de www.avantilipids.com.



3.2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico é uma técnica não invasiva e bem estabelecida para medir o tamanho e a distribuição do tamanho de partículas em solução. Nessa técnica um feixe de laser ao iluminar a amostra é espalhado em um ângulo θ em relação ao feixe inicial. Como as partículas em solução estão em movimento Browniano, ou seja, estão em movimento constante devido às colisões com partículas vizinhas, a intensidade da luz espalhada flutua no decorrer do tempo. Um receptor, localizado na região do espalhamento (fazendo ângulo θ em relação ao feixe inicial), capta a luz espalhada pela amostra, obtendo padrões com regiões brilhantes e regiões escuras, oriundos da interferência construtiva e destrutiva da luz espalhada (Figura 9).

Figura 9 - Experimento de DLS. (A) Representação de produção de perfis de interferência decorrente do espalhamento de luz coerente por partículas em suspensão. (B) Intensidade detectada em função do tempo devido ao deslocamento das partículas. (C) Gráfico da curva de auto correlação de intensidade espalhada em função do tempo. Figura adaptada de (DIALETACHI, 2017).



Considerando que partículas pequenas possuem maiores velocidades que partículas grandes por ter maior facilidade em se difundir pelo meio viscoso, as flutuações das intensidades obtidas do espalhamento de luz proveniente de partículas pequenas, associa-se a perfis com tempos de correlação mais curtos, pois o trânsito para dentro e para fora do volume de espalhamento é mais rápido. Em contrapartida, partículas grandes, cuja movimentação tende a ser mais lenta, apresentam perfis de intensidade com tempos de correlação mais longos. A análise da função de correlação obtida permite o cálculo do coeficiente de difusão das

partículas que estão em solução. Portanto, pela equação de Stokes-Einstein, é possível calcular o diâmetro hidrodinâmico da partícula (D_H), em equilíbrio térmico com o solvente, $D_H = K_B T / 3\pi\eta D$, onde η é a viscosidade do meio, K_B a constante de Boltzmann, T a temperatura e D o coeficiente de difusão.

Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para monitorar as mudanças no tamanho das vesículas devido à interação dos peptídeos e verificar a possibilidade de formação de agregados. O diâmetro hidrodinâmico foi determinado para LUVs a $50\mu\text{M}$ em solução 150mM NaF nos pHs 5,5, 6,5 e 7,4 a 25°C pelo equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, U.K.

3.2.3 Potencial Zeta

Vesículas lipídicas em solução possuem cargas em sua superfície devido aos grupos ionizáveis das cabeças polares dos fosfolípidos e adsorção de contra-íons da solução. A carga líquida na superfície da vesícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície, formando uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. O potencial zeta é o potencial obtido no plano de cisalhamento da vesícula posicionado entre a camada iônica formada na superfície das vesículas lipídicas e o meio.

Um método para determinar o potencial zeta é a partir da medida de mobilidade eletroforética com o uso da velocimetria Doppler. Nessa técnica a aplicação de um campo elétrico E , resulta de uma velocidade v da partícula que é proporcional ao campo aplicado

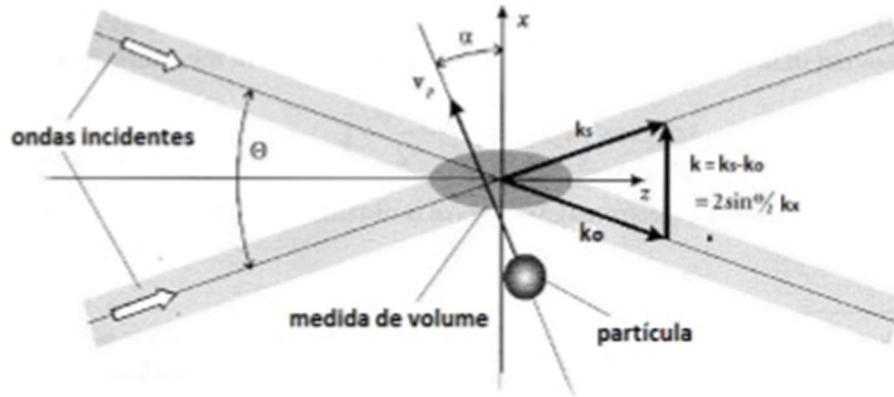
$$|\vec{v}| = u_E |\vec{E}| \quad (\text{Equação 1})$$

A constante de proporcionalidade u_E , é a mobilidade eletroforética. Além da força elétrica a partícula está sujeita também a uma força que depende da viscosidade do meio, do raio da partícula e da temperatura, dada pela relação de Stokes.

As medidas de mobilidade eletroforética foram realizadas no equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90, utilizando celas capilares em forma de U com eletrodo de ouro com volume de 1,0 ml. Nesse equipamento, um raio laser de He-Ne, é dividido em dois feixes que são refletidos para a amostra por espelhos. Um desses espelhos é móvel e capaz de modular a frequência do feixe. Então, quando a luz passa pela amostra, as partículas que estão em movimento espalham a luz variando a frequência inicial de ν_0 para ν_S , assim $\Delta\nu = \nu_S - \nu_0$,

dependente da velocidade da partícula, do comprimento da luz incidente (λ_0) e do ângulo de espalhamento (θ).

Figura 10 - Configuração do feixe duplo. Modificado de (ELGHRAOUI; LO, 2010).



Considerando o vetor \vec{k}_0 , como o vetor de onda incidente e \vec{k}_s o vetor onda espalhada, então o vetor espalhamento deve ser $\vec{K} = \vec{k}_s - \vec{k}_0$ (Figura 10). Com isso pode-se escrever a relação entre o deslocamento de frequência devido ao efeito Doppler e a velocidade como

$$2\pi\Delta\nu = |\vec{K}| \cdot |\vec{v}| \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo n o índice de refração do meio e o λ_0 comprimento de onda incidente, o vetor espalhamento pode ser reescrito como

$$|\vec{K}| = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{Equação 3})$$

E o deslocamento de frequência Doppler pode ser reescrito

$$\Delta\nu = \frac{2n|\vec{v}|}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \cos \frac{\theta}{2} = \frac{n|\vec{v}|}{\lambda_0} \sin \theta \quad (\text{Equação 4})$$

Então, substituindo a velocidade obtida na equação 4, obteve-se

$$u_E = \frac{\Delta\nu\lambda_0}{n \sin \theta} \frac{1}{|\vec{E}|} \quad (\text{Equação 5})$$

No equipamento utilizado Zetasizer Nano ZS90, o ângulo de detecção é 90° , o comprimento de onda da luz incidente 633nm e foi considerado o índice de refração igual a

1,4. Com os valores de mobilidade eletroforética obtidos é possível calcular o potencial zeta pela equação de Smoluchowski,

$$u_E = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta f(\kappa a)}{\eta} \quad (\text{Equação 6})$$

ζ é o potencial zeta, ε_r e ε_0 são as constantes dielétrica do meio e do vácuo respectivamente, η é a viscosidade da solução e $f(\kappa a)$ é a função de Henry, dependente de κ , inverso do comprimento de Debye-Huckel, que fornece o valor da espessura da camada de íons ao redor de um macro íon. Essa função é igual a 1 se $\kappa R \gg 1$, ou seja, o raio da partícula é muito maior que a distância de Debye, e $1,5$ se $\kappa R \ll 1$.

Com o valor obtido experimentalmente do potencial zeta, considerando a distância $x = 0,2\text{nm}$, como a espessura da camada de cisalhamento, pode-se calcular o potencial na superfície da vesícula pela equação (HUNTER, 1981):

$$\tanh\left(\frac{e \cdot \zeta}{4 \cdot K_B \cdot T}\right) = \tanh\left(\frac{e \cdot \psi_0}{4 \cdot K_B \cdot T}\right) e^{-\kappa x} \quad (\text{Equação 7})$$

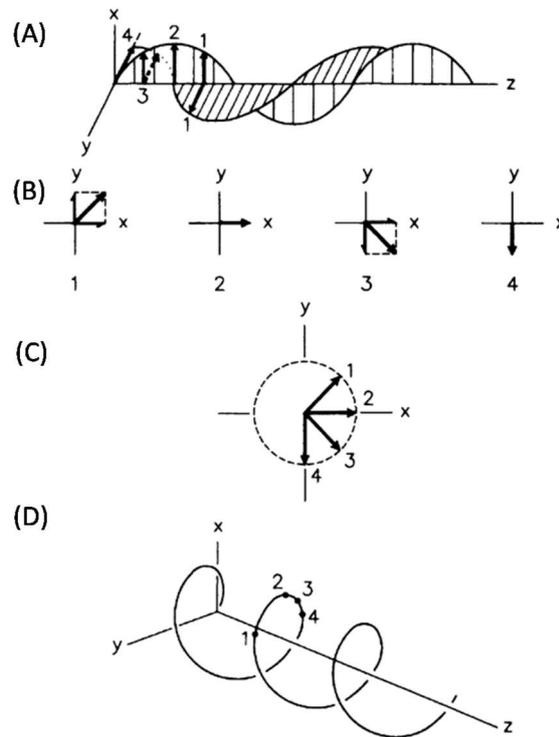
K_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura, e a carga do próton e κ o inverso do comprimento de Debye.

3.2.4 Dicroísmo Circular (CD)

Luz circularmente polarizada é obtida pela composição de duas componentes linearmente polarizadas de direções fixas e magnitudes variáveis defasadas por 90° . A luz resultante tem magnitude fixa e a direção do vetor campo elétrico gira sobre a direção de propagação, executando uma volta completa em um período, formando uma hélice que pode ser direita (girando no sentido horário) E_H ou esquerda (sentido anti-horário) E_A , como ilustrado na Figura 11. O dicroísmo circular (CD) é definido a partir da diferença que ocorre entre essas duas componentes ao serem absorvidas por amostras opticamente ativas (FASMAN, 1996).

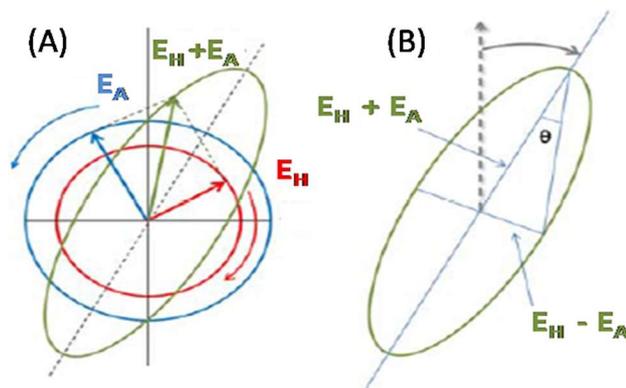
Figura 11 - Luz polarizada circularmente sentido horário. (A) Os vetores campo elétricos de feixes polarizados ortogonalmente 90° fora de fase. (B) Os componentes x e y são mostrados nos pontos ao longo do eixo z rotulados 1 a 4, com seus respectivos vetores resultantes. (C) As somas vetoriais em (B) foram projetadas em um plano normal ao sentido z , demonstrando que a ponta do vetor elétrico segue um caminho circular quando visto ao longo da direção de propagação. (D) A luz polarizada circularmente representada, mostrando o vetor

elétrico como uma função da posição ao longo da direção de propagação. Note que a ponta do vetor elétrico forma uma hélice destra. Figura adaptada de (FASMAN, 1996).



Se após atravessar a amostra as magnitudes de alguma dessas componentes E_A ou E_H é mais absorvida, a somatória dessas componentes após a absorção passa a apresentar uma diferença de fase que resulta em uma polarização elíptica, sendo essa radiação denominada elipticamente polarizada (Figura 12).

Figura 12 - (A) Componentes circularmente polarizadas E_H (no sentido horário em vermelho) e E_A (no sentido anti-horário em azul) com magnitudes diferentes que resultam em uma luz elipticamente polarizada (elipse em verde). (B) Elipticidade, tangente obtida pela razão entre o menor e do maior eixo da elipse. Adaptado de (VERLY, 2010).



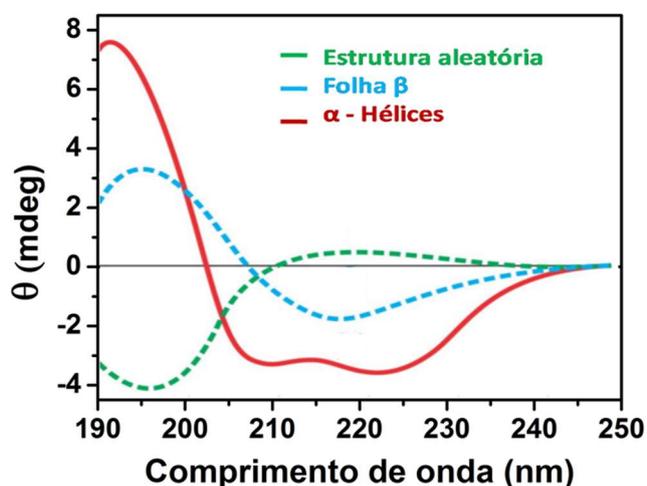
O espectro mede a diferença na absorção dessas duas componentes circulares da luz polarizada em função do comprimento de onda (λ). Descrevendo essa diferença em termos de elipticidade (θ), a qual é dada pela tangente entre o menor e maior eixo da elipse formada após a luz ter sido absorvida (Figura 12C), temos

$$\tan\theta = \frac{E_H - E_A}{E_H + E_A} \quad (\text{Equação 8})$$

Os valores de elipticidade obtidos na região do ultravioleta do espectro eletromagnético podem assumir valores positivos ou negativos em função de qual componente da luz é preferencialmente absorvida. Porém essas variações de sinal de CD ou θ , surgem somente quando ocorre absorção de radiação por parte de grupos cromóforos, como o grupo amido que forma a ligação peptídica (KRITTANAI; JOHNSON, 1997). Dessa forma os espectros de CD possuem padrões para cada estrutura, como mostrado na Figura 13. Quando o peptídeo está desenovelado o espectro apresenta uma banda dicróica negativa em 200nm, em α -hélice duas bandas características em 222nm e 208nm, e folhas β um abanda característica em torno de 216nm.

Portanto, essa técnica é frequentemente usada para estudos biofísicos como uma ferramenta capaz de dar informações sobre a estrutura secundária de um peptídeo ou proteína e suas mudanças conformacionais em diferentes meios.

Figura 13 - Espectros de dicroísmo circular característicos para peptídeos estruturados. Adaptado de (ALVES, 2012).



Nesse trabalho os espectros de CD foram coletados no intervalo de comprimento de onda de aproximadamente 190 a 260 nm, usando um espectro polarímetro Jasco-815 (Tokyo, Japan) a 25°C, com velocidade de 50nm/mim com no mínimo 10 acumulações. A elipticidade observada, θ (mdeg), é corrigida pela função da diluição, descontada a linha de base e convertida em elipticidade molar média por resíduo $[\theta]$ em deg.cm²/dmol, usando a relação

$$\theta = \frac{100\theta}{lcn} \quad (\text{Equação 9})$$

onde l é o caminho óptico em centímetro, c é a concentração de peptídeo em mM e n é o número resíduos.

Com os valores de elipticidade molar observada em 222nm (Θ_{obs}), pode-se encontrara fração helicoidal, f_H , usando a seguinte equação, proposta por Luo e Baldwin (LUO; BALDWIN, 1997):

$$f_h = \frac{\Theta_{obs} - \Theta_c}{\Theta_H - \Theta_c} \quad (\text{Equação 10})$$

onde Θ_c é a elipticidade molar para o peptídeo desenovelado (-1500 deg cm²/dmol) e Θ_H é a elipticidade molar do peptídeo completamente helicoidal, obtida por (LUO; BALDWIN, 1997):

$$\Theta_H = (-44000 + 250T) \left(1 - \frac{x}{n}\right) \quad (\text{Equação 11})$$

sendo T é a temperatura em graus Celsius e x o número de grupos carbonila da cadeia peptídica que não estão envolvidos na formação de pontes de hidrogênio, no nosso caso $x = 3$.

Nesse trabalho, todas as medidas de CD foram feitas em tampão citrato, borato e fosfato, 1mM nos pHs 5,5, 6,5 e 7,4. Solução de 10 μ M de MP1 ou de H-MP1 foi titulada por adição de alíquotas de LUVs até atingir 1,8mM, utilizando cubetas de quartzo de 0,2 cm de caminho óptico e tomando-se de 10 a 20 acumulações. Os dados de elipticidade molar, em 222 nm, normalizados pela elipticidade molar do peptídeo em tampão (Θ_0), em função da concentração de lipídio podem ser analisados por pela equação de Lagmuir:

$$\frac{\Theta_{obs}}{\Theta_0} = 1 + \left(\frac{\Theta_{\infty}}{\Theta_0} - 1\right) \left(\frac{K_p \gamma [L]}{1 + K_p \gamma [L]}\right) \quad (\text{Equação 12})$$

K_p é a constante de partição, Θ_∞ a elipticidade molar máxima, $[L]$ é a concentração de lipídios e $\gamma = 0,75 \text{ dm}^3/\text{mol}$ é o volume molar lipídico (MARSH, 2013; SANTOS, NUNO C; PRIETO; CASTANHO, 2003).

3.2.5 Espectroscopia de fluorescência

O processo de fluorescência ocorre devido à incidência de radiação eletromagnética na matéria. Com isso, pode acontecer de parte dessa radiação ser espalhada e parte absorvida pela matéria. A probabilidade relativa da ocorrência de cada processo é uma propriedade particular da molécula encontrada. Se a energia absorvida for suficiente, os elétrons sofrerão uma transição de um estado de energia mais baixo, chamado nível fundamental (S_0) para um estado de energia mais alto, nível excitado (S_1), (Figura 14), nesse caso a molécula é dita estar excitada ou em um estado excitado. A energia absorvida é igual à diferença de energia entre os estados excitado e fundamental, relacionada com o comprimento de onda da radiação incidente (λ) da forma

$$\Delta E = E(exc) - E(fund) = h \frac{c}{\lambda} \quad (\text{Equação 13})$$

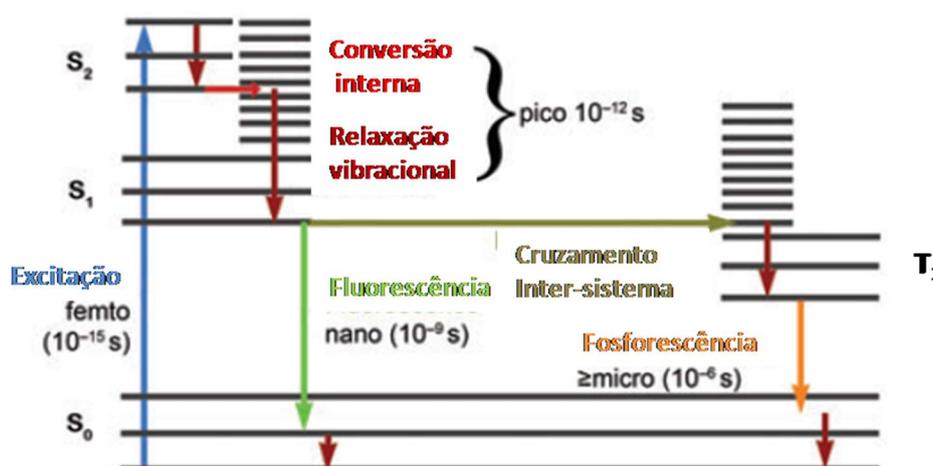
onde h é a constante de Planck com valor de $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$ e c é a velocidade da luz no vácuo. Segundo o princípio de Franck-Codon, a transição dos elétrons para diferentes níveis eletrônicos ocorre mais rápido do que os núcleos conseguem responder por conta de possuir muito mais massa que os elétrons. Desse modo as transições eletrônicas mais prováveis são aquelas em que a separação com o núcleo seja a de equilíbrio, verticalmente acima do nível fundamental. E devido a ação do novo campo de forças, os núcleos correspondem entrando em vibração e oscilação (ITO, BERNARD, PAZIN, 2016).

Após a molécula ser excitada, ela pode ceder energia de forma não radioativa ou de forma radioativa. O processo de decaimento não-radioativo é o mais comum, onde a perda de energia se dá devido a colisões com moléculas do meio, para vibrações e rotações das moléculas vizinhas, ou seja, a energia é transformada no movimento térmico do ambiente, na forma de calor. Os processos não-radioativos que competem com frequência incluem conversão interna, cruzamento inter-sistema e outros tipos de supressões.

O decaimento de forma radioativa ocorre devido à emissão de um fóton pela molécula para perder energia adquirida. A radiação espontânea emitida pode ocorrer tanto pelo processo de fluorescência (na ordem de nano segundos), como também pelo processo de fosforescência,

que ocorre após o cruzamento inter-sistemas, onde a emissão espontânea persiste durante intervalos de tempos longos após a excitação (na ordem de microssegundos). A Figura 14 ilustra o diagrama de Jablonski com principais tipos de processos radioativos e não radiativos após a absorção de luz.

Figura 14 - Diagrama de Jablonski representando os processos de excitação e emissão eletrônica. No lado esquerdo do diagrama estão os estados de singlete (esses estados mantêm os estados de rotação combinados $+\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$ dos elétrons). S_0 é o estado fundamental. S_1 e S_2 são estados singulares excitados. À direita do diagrama estão os estados de tripleto em que um elétron, impulsionado para um novo orbital também sofreu uma reversão subsequente na rotação, de modo que um par de elétrons esteja paralelo. Figura adaptada de (LICHTMAN; CONCHELLO, 2005).



Devido à perda de energia de excitação por processos não radioativos, a fluorescência ocorre com a emissão de fótons com comprimentos de ondas maiores do que os da radiação de excitação. A diferença entre esses comprimentos de onda de emissão e excitação é chamada de deslocamento de Stokes e sua magnitude varia consideravelmente de um fluoróforo para outro (LICHTMAN; CONCHELLO, 2005). Existem muitos fatores que alteram o espectro de fluorescência, como por exemplo, o meio em que a amostra está inserida. Deste modo, as medidas de fluorescência de macromoléculas podem nos dar informações sobre: conformação, sítios de ligação, interações com solventes, grau de flexibilidade, distâncias intermoleculares e coeficiente de difusão rotacional de macromoléculas (ITO, BERNARD, PAZIN, 2016). Neste trabalho essa técnica foi empregada em experimentos de supressão de fluorescência por acrilamida e no vazamento de corante das LUVs.

3.2.5.1 Supressão do triptofano por acrilamida

Por esses experimentos é possível obter informações sobre a acessibilidade do supressor ao resíduo de triptofano presente na cadeia peptídica. Portanto, é possível acompanhar as mudanças no ambiente em que o peptídeo está inserido.

A supressão do resíduo de triptofano pode ocorrer de modo estático ou colisional, e nos dois casos é necessário que ocorra contato entre o fluoróforo e o supressor. No caso da supressão colisional, o supressor se liga ao fluoróforo durante o seu estado excitado, e o retorno ao estado fundamental ocorre sem a emissão de fóton. Na supressão estática ocorre um complexo ainda no estado fundamental, obtendo um complexo não fluorescente.

Nestes experimentos alíquotas de uma solução de acrilamida em água a 2,77 M foram adicionadas a uma solução de peptídeo a 5µM em 150mM de NaCl em diferentes pHs, na ausência e na presença de vesículas sendo que a concentração total de fosfolípidios foi de 500 µM. Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados entre 308 e 450 nm, com excitação em 285 nm. O espalhamento de luz foi minimizado usando filtros de polarização nas vias de excitação e emissão em 90° e 0°, respectivamente (LADOKHIN, ALEXEY; JAYASINGHE; WHITE, 2000). Os espectros obtidos foram corrigidos pelo fator de diluição e foi descontada a contribuição do espalhamento de luz a partir de uma titulação da suspensão de vesículas com acrilamida na ausência de peptídeo (LAKOWICZ, 1999).

Os dados foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer para supressão colisional:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (\text{Equação 14})$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, a acrilamida (Q), respectivamente, e K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer, que é uma medida da acessibilidade do triptofano à acrilamida. No caso de supressão estática a equação usada para o ajuste numérico foi:

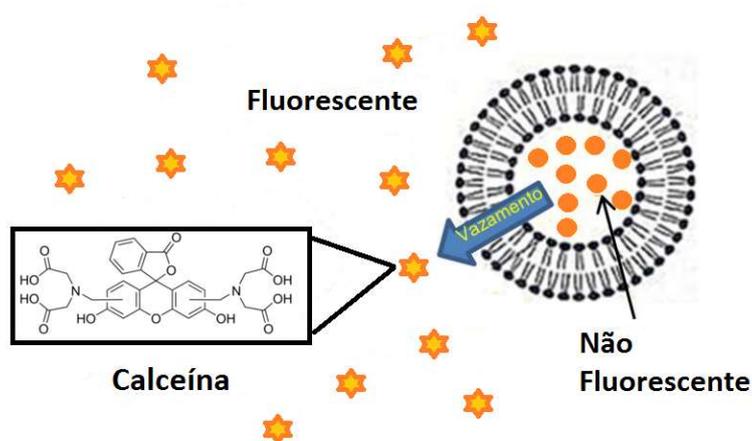
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q].e^{(V[Q])} \quad (\text{Equação 15})$$

cujo V é uma constante de supressão estática (EFTINK; GHIRON, 1976).

3.2.5.2 Vazamento de vesículas por fluorimetria

Neste trabalho a espectroscopia de fluorescência também foi utilizada para acompanhar a cinética de vazamentos da calceína encapsulada em vesículas lipídicas. A calceína é um marcador fluorescente, hidrofílico. Quando encapsulada em alta concentração no interior de lipossomas a fluorescência dos fluoróforos é suprimida por processo colisional. Essas características auxiliam no estudo a permeação de vesículas lipídicas, pois quando essas vesículas são preparadas com uma alta concentração de calceína no seu interior, esta não apresenta fluorescência, porém através de mudança na bicamada lipídica induzida por algum agente lítico a calceína é liberada para o meio extra-vesicular a favor do gradiente de concentração e, assim, diluindo o marcador minimizando a colisão entre moléculas de calceína, provocando um aumento da fluorescência, Figura 15.

Figura 15 - Esquema de vazamento de vesículas com um marcador que apresenta auto supressão. Adaptado de (NASCIMENTO; DO, 2014).



Nesse trabalho foi analisada a atividade lítica dos peptídeos MP1 e H-MP1, seguindo o extravasamento de marcador fluorescente calceína, encapsulado em LUVs. O extravasamento foi monitorado por espectros de emissão (520nm) de fluorescência usando o espectrofluorímetro ISS modelo PC1 (Urbana, Champaign, IL, USA) e comprimentos de excitação de 490nm. Nestes experimentos, alíquotas do estoque de peptídeo em estudo foram adicionadas sob agitação à cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico, contendo a solução de vesícula (100 μ M), em tampão. O percentual do marcador liberado é dado pela equação seguinte:

$$\%vazamento = 100 \left(\frac{F - F_0}{F_{100} - F_0} \right) \quad (\text{Equação 16})$$

F é a intensidade de fluorescência medida, F_0 corresponde à intensidade de fluorescência de LUVs intactos e F_{100} a intensidade de fluorescência após liberação total do conteúdo das vesículas, obtido por adição de 20 μ L de solução de Triton X-100 a 10%. Estes dados foram analisados por meio de curvas de dose resposta, % vazamento por concentração de peptídeos.

3.2.6 Preparação e observação de vesículas gigantes (GUVs)

As GUVs foram preparadas pelo método de eletroformação (DIMOVA *et al.*, 2006). Desse modo, um filme lipídico é formado na superfície condutora de duas placas de vidro revestidas com óxido de índio e titânio (ITO). Este filme é formado a partir de 20 μ l de uma solução de 1 mM de fosfolípidios em clorofórmio com 0,4% de rodamina-PE e o solvente removido por evaporação sob o fluxo de nitrogênio. As duas placas são sobrepostas com as faces condutoras contendo o filme lipídico voltadas para o interior de uma câmara formada pelas placas e um espaçador de teflon de 2mm de espessura. O interior dessa câmara é preenchido com a solução de sacarose a 0,27mM e 0,5mM de calceína. As extremidades das placas são ligadas um gerador de tensão Minipa que estimula a formação das GUVs durante 1 hora a uma voltagem de 2,7V e 10 Hz de frequência.

3.2.7 Atividade lítica dos peptídeos em vesículas únicas (GUVs)

Para visualização das GUVs foi utilizada uma câmara de observação, construída com uma lâmina comum de microscópio, revestida com uma solução de 0,1% de albumina soro bovino (BSA) e um espaçador de Teflon de 2 mm de espessura. Nessa câmara foi diluída uma alíquota de 2 μ l da solução contendo as GUVs em 200 μ l de uma solução de 150 mM de NaCl nos pHs 5,5 6,5 e 7,4. Para evitar efeitos da diferença de pressão osmótica, a osmolaridade da solução interna e externa a GUV foi medida e ajustada usando um osmômetro (Osmette A 5002, Precision Systems, Inc., USA).

Após a seleção de uma vesícula estável e com pouca ondulação, inicia-se a filmagem do processo lítico. A solução de peptídeos, preparada na mesma solução em que as GUVs foram diluídas, foi adicionada continuamente a uma única GUV por uma micropipeta de vidro de 40

μm de diâmetro acoplada a um micro-manipulador (Narishige) que permite injeção do peptídeo a distância de cerca de 100 μm da GUV(Figura 16). Para controlar a velocidade de injeção da solução com peptídeos próximos à GUV um motor de precisão foi acoplado ao parafuso micrométrico do micro-manipulador. As vesículas foram observadas por uma objetiva de aumento 40x por contraste de fase e fluorescência.

Figura 16 - Esquema do método para induzir interação de substâncias com uma única vesícula gigante. Modificada de (TAMBA; YAMAZAKI, 2005).



3.2.8 Microscopia óptica

Em geral a microscopia é usada para observar amostras que estão acima do limite de resolução do olho humano. A microscopia óptica é caracterizada pelo uso de luz, transmitida ou refletida pela amostra, que ao passar através de um conjunto de lentes permite uma visualização da amostra. Existem diferentes técnicas de microscopia óptica que podem ser utilizadas de acordo com a aplicação de interesse.

Nesse trabalho as GUVs foram observadas usando um microscópio invertido (Olympus IX71, Tóquio, Japão) que usa como fonte de luz uma lâmpada de tungstênio e uma de mercúrio para microscopia de contraste de fase e microscopia de fluorescência, respectivamente, Figura 17. O microscópio possui lentes objetivas planas semi-apocromáticas, usadas nesses experimentos com poder de aumento de 40x. Para a prática de microscopia de fluorescência foram utilizados filtros de excitação verde (460-490 nm) para observar a calceína e vermelho para observar o marcador da membrana (515-550nm). As imagens são capturadas por uma câmera CCD acoplada ao microscópio e conectada a um computador.

Figura 17 - Microscópio invertido Olympus IX71.



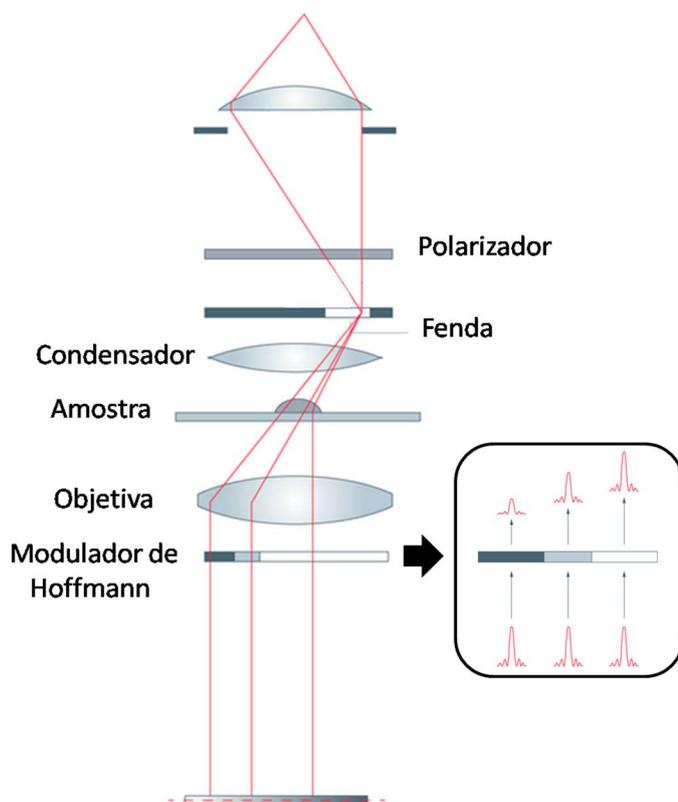
3.2.8.1 Microscopia de contraste de fase

A técnica de microscopia de contraste de fase foi descrita pela primeira vez em 1935, pelo físico holandês Fritz Zernike, Nobel de Física em 1953. Com o uso dessa técnica é possível observar células vivas, sem a necessidade de matá-las, fixá-las e colorir, podendo assim assistir a dinâmica dos processos biológicos em curso e registrá-la em alto contraste com clareza acentuada da amostra (BURCH, 1942.).

Em 1975 Robert Hoffman aprimorou a técnica de contraste de fase obtendo o contraste por modulação (HOFFMAN; GROSS, 1975). Esse método possui dois componentes principais, uma fenda que fica localizada no plano frontal do condensador para permitir uma iluminação oblíqua da amostra. E um modulador que fica localizado no plano focal traseiro da objetiva, conhecido como modulador de Hoffmann, que é constituído por três áreas com diferentes densidades ópticas: uma área transparente com transmissão de 100%, uma com transmissão de 15% e outra com 1% de transmissão da luz (Figura 18).

Figura 18 - A luz do condensador passa pela fenda e ilumina amostra. Subsequentemente, a luz é desviada para as partes opacas ou transparentes do modulador, produzindo uma

impressão de imagem tridimensional, semelhante a um relevo. Modificado de <https://www.leicamicrosystems.com>.



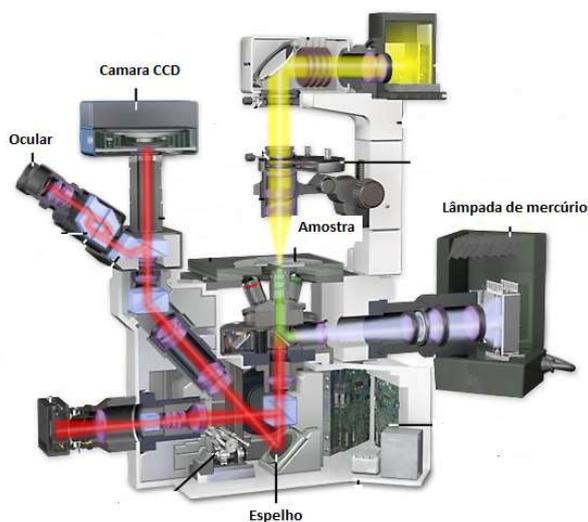
Devido à iluminação oblíqua usada, a luz sofre um desvio maior ao ser refratada chegando ao modulador em uma região diferente da luz não refratada. Desse modo, a luz que passa por áreas homogêneas dentro da amostra não sofrerá nenhuma refração e passará pela região cinza central do modulador com transmissão de 15% e aparecerá na imagem na cor cinza. Quando a luz passa por áreas da amostra que causam um desvio maior (por exemplo, mudanças na inclinação de uma membrana celular), a luz passa pelo modulador na área escura (permissão de 1%) ou transparente (permissão de 100%) do modulador. Nós experimentos de GUV as diferenças nas densidades e índice de refração entre a solução interna da vesícula e o meio externo permitem observação por microscopia de contraste de fase.

3.2.8.2 Microscopia de fluorescência

A imagem de fluorescência tornou-se o meio mais usado de microscopia biológica e analítica, devido a sua sensibilidade. Essa técnica utiliza das características fluorescentes de

determinadas moléculas, podendo ser usada para determinar a distribuição dessas moléculas em células, possibilitando o estudo de diferentes mecanismos celulares (LICHTMAN; CONCHELLO, 2005).

Figura 19 - Esquema e componentes de um microscópio invertido de fluorescência. Adaptado de <https://www.olympuslifescience.com>.



Para visualizar os fenômenos de fluorescência o microscópio de fluorescência invertido Olympus IX-71 utiliza lâmpadas de mercúrio localizadas na parte traseira do microscópio. A luz proveniente da lâmpada passa pelo filtro de excitação apropriado, no qual separa o comprimento de onda de interesse. A onda ao passar pelo filtro incide em um espelho dicróico, esse espelho, por sua vez, reflete a luz que entra na objetiva (que nesse momento atua como um condensador) e chega até a amostra. A amostra que contém o fluoróforo absorve a luz e emite em um comprimento de onda diferente, devido ao deslocamento de Stokes. A fluorescência emitida pela amostra retorna através da objetiva e passa pelo filtro de emissão para remover completamente a luz residual de excitação, em seguida chega à ocular ou detector, que nesse trabalho foi uma câmera CCD, como apresentado no diagrama da Figura 19.

3.2.9 Análises das imagens das GUVs

As intensidades da fluorescência no interior e exterior das GUVs, na presença e ausência de peptídeo, foram quantificadas pelo software IMAGEJ (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, MD). A concentração de calceína no interior da GUV foi calculada pela relação:

$$c(t) = \frac{(I_{int,t} - I_{ext,t})}{(I_{int,0} - I_{ext,0})} \quad (\text{Equação 17})$$

$I_{in,t}$ e $I_{ex,t}$ são as intensidades médias dos pixels no interior da GUV e na solução externa à GUV, t segundos após o início da injeção de peptídeo, respectivamente; e $I_{in,0}$ e $I_{ex,0}$ são estas intensidades médias antes do início da injeção de peptídeo.

O fluxo volumétrico através da GUV foi determinado por meio da variação da concentração de calceína no interior da GUV ao longo do tempo e dado por:

$$c(t + dt) = c(t) - \frac{dN_{int \rightarrow ext} - dN_{ext \rightarrow int}}{V} \quad (\text{Equação 18})$$

$dN_{int \rightarrow ext}$ e $dN_{ext \rightarrow int}$ são os números de moléculas do corante que atravessam a membrana da vesícula do interior para o exterior e no sentido oposto, respectivamente, e V é o volume da vesícula. Considerando a concentração $c = N/V$, e ainda que o número de moléculas que entram na vesícula é desprezível, esta equação é reescrita como:

$$c(t + dt) = c(t) - \frac{c(t)}{V} dV = c(t) - \frac{c(t)}{V} P A dt \quad (\text{Equação 19})$$

P é a permeabilidade (fluxo volumétrico) e A é a área da vesícula. Considerando as GUVs como esferas de raio R , com área $A=4\pi R^2$, e volume $V=4\pi/3R^3$, a expressão acima pode ser reescrita como a equação diferencial:

$$\frac{dc(t)}{dt} = -\frac{3P}{R} c(t) \quad (\text{Equação 20})$$

Essa equação tem como solução:

$$\frac{-R}{3} \ln(c(t)) = Pt \quad (\text{Equação 21})$$

A permeabilidade (ou fluxo volumétrico) foi determinada da inclinação dos gráficos da dependência log-linear da concentração de calceína no interior da GUV com o tempo de vazamento, $\frac{-R}{3} \ln(c(t))$ vs t, onde R é o raio da vesícula observada (LEITE *et al.*, 2015).

CAPÍTULO 4

4. Resultados

Neste capítulo estão apresentados os resultados obtidos por meio dos experimentos realizados no estudo da interação do MP1 e seu análogo H-MP1, com vesículas de diferentes composições, em três pHs distintos. A apresentação destes resultados encontra-se dividida em três partes: caracterização dos sistemas utilizados; interação dos peptídeos com bicamadas formadas de 7POPC:3POPG; e interação dos peptídeos com bicamadas de 8POPC:2POPS, 8POPC:2POPS:1POPE e 9POPC:1POPE.

4.1 Caracterização dos sistemas

Os experimentos espectroscópicos foram realizados com LUVs obtidas pelo método de extrusão. Os raios hidrodinâmicos das vesículas foram determinados por DLS, utilizando o Zetasizer com uma amostra de 50 μM , em solução de 150mM de NaF com o pH ajustado. Os resultados apresentados na Tabela 1 mostraram que o diâmetro das vesículas foi independente da composição lipídica e do pH do meio.

Tabela 1- Raios hidrodinâmicos (nm) medidos por DLS de 50 μM de LUVs nas composições 7POPC:3POPG, 8POPC:2POPS, 9POPC:1POPE e 7POPC:2POPS:1POPE nos pHs 5,5 e 7,4.

pH	POPC:POPG	POPC:POPS	POPC:POPE	POPC:POPS:POPE
7,4	66,5 \pm 0,6	63,6 \pm 0,7	59,8 \pm 0,7	68,5 \pm 0,2
5,5	66,3 \pm 0,8	65,0 \pm 0,6	59,3 \pm 0,5	70,0 \pm 0,5

Os valores de potencial zeta obtidos através de medição na mesma amostra de vesículas utilizada para realizar as medidas de tamanho estão apresentados na Tabela 2. Como esperado, o potencial zeta aumentou com a fração de lipídios carregados negativamente.

Devido ao fato de que os lipídios que constituem as vesículas possuem pKa distantes da faixa de pH experimentada, os valores de potencial zeta não variaram com a mudança do pH do meio. Nestes pHs, os lipídios POPC e POPE permaneceram com caráter zwitteriônicos, uma

vez que o lipídio POPC possui grupo fosfato carregado com o $pK_{PO_4^-} = 1$, com carga negativa que é compensada pela carga positiva do grupo colina com $pK_{NH_3^+} = 11,25$. Do mesmo modo, o pK_a do grupo amino do PE medido quando contido em vesículas de PE:PC, é de $9,6 \pm 0,1$ e $pK_{PO_4^-} = 1,7$, conferindo neutralidade a este lipídio (TSUI; OJCIUS; HUBBELL, 1986).

O lipídio POPG, por sua vez, possui carga negativa na faixa de pH usada para os experimentos, devido ao grupo fosfato com $pK_a = 3,5$. Do mesmo modo, o pK_a do grupo carboxil do PS, em vesículas compostas por PC:PS, é $3,6 \pm 0$, e o pK_a do grupo amino é de $9,8 \pm 0,1$, independente da proporção de PC e PS utilizada na composição da bicamada (TSUI; OJCIUS; HUBBELL, 1986).

Tabela 2- Potencial zeta (ξ) e Potencial de superfície (Ψ_0) das LUVs, calculados a partir dos resultados experimentais de potencial zeta usando camada de cisalhamento de 2Å da superfície. Os desvios padrão foram obtidos a partir de pelo menos três medições.

Vesícula	pH					
	7,4		6,5		5,5	
	ξ (mV)	Ψ_0 (mV)	ξ (mV)	Ψ_0 (mV)	ξ (mV)	Ψ_0 (mV)
POPC:POPG	$-30,9 \pm 0,8$	-41	$-30,4 \pm 1,3$	-40	$-31,2 \pm 1,3$	-41
POPC:POPS	$-22,3 \pm 1,4$	-29	$-19,5 \pm 0,8$	-25	$-20,8 \pm 1,5$	-27
POPC:POPS:POPE	$-20,0 \pm 0,4$	-26	$-21 \pm 1,9$	-27	$-20 \pm 0,4$	-26
POPC:POPE	$1,6 \pm 1,0$	2,1	$2,0 \pm 1,1$	2,62	$1,34 \pm 0,3$	1,73

O potencial de superfície, calculado pela Equação 7 e apresentado na Tabela 2, pode alterar o pH da solução próximo da superfície da membrana por atrair prótons, como pode também induzir variações na carga do peptídeo. O efeito do potencial de superfície nos aminoácidos que compõe o peptídeo pode ser calculado assumindo que na interface bicamada-tampão, a fração de grupos protonados no peptídeo é dado pela equação de Handerson Hasselbach (SEELIG *et al.*, 1993):

$$f_{AH} = \left(1 + 10^{pH + 0,43 \frac{F\Psi_0}{RT} - pK_a} \right)^{-1} \quad (\text{Equação 22})$$

onde $pK_a = -\log(K_a)$, e K_a é a constante de dissociação da cadeia lateral. Os valores obtidos da fração protonada para os aminoácidos que possuem pK_a próximos dos valores de pH estudados estão apresentados na Tabela 3. Os valores de pK_a usados para os cálculos foram 3,86 para ácido aspártico, 6,54 para histidina e 8,0 para o N terminal (THURLKILL *et al.*, 2006).

Tabela 3- Frações de protonação do ácido aspártico, histidina e N terminal, calculados pela (Equação 22) com os respectivos potenciais de superfícies. Carga efetiva dos peptídeos (Z_{ef}) H-MP1 e MP1 em

LUV	pH	Fração de protonação (f_{AH})			Z_{ef}	
		Asp	His	N-term.	MP1	H-MP1
POPC:POPG	7,4	0,00	0,41	0,95	1,95	0,18
	5,5	0,10	0,98	1,00	2,20	2,14
POPC:POPS	7,4	0,00	0,30	0,93	1,93	-0,17
	5,5	0,06	0,97	1,00	2,12	2,03
POPC:POPS:POPE	7,4	0,00	0,28	0,92	1,92	-0,24
	5,5	0,06	0,97	1,00	2,12	2,03
POPC:POPE	7,4	0,00	0,11	0,79	1,79	-0,88
	5,5	0,02	0,91	1,00	2,04	1,77

A partir dos cálculos da fração de protonação dos resíduos de aminoácidos, foi estimada a valência efetiva (Z_{ef}) do peptídeo, pela relação

$$Z_{ef} = \sum_{i=1}^{n_b} f_{AHi} - \sum_{j=1}^{n_a} (1 - F_{AHj}) \quad (\text{Equação 23})$$

onde o primeiro termo da equação corresponde ao somatório da fração de cada resíduo básico protonado (f_{AHi}), com n_b o número de resíduos básicos, e o segundo termo da equação corresponde ao somatório da fração de cada resíduo ácido protonado (f_{AHj}), com n_a o número de resíduos ácidos.

Os valores obtidos para a valência efetiva calculadas para os peptídeos estão apresentadas na Tabela 3. A fração de protonação do resíduo de ácido aspártico e do N terminal sofreram pouca variação com a mudança do pH do meio, o que garantiu ao peptídeo MP1 carga efetiva positiva próximo de 2. No entanto, os resíduos de histidina apresentaram sensibilidade tanto ao

pH como presença da membrana carregada. Por isso em pH 7,4 o potencial eletrostático de -41mV foi capaz de protonar as histidinas o suficiente para conferir ao H-MP1 carga efetiva positiva de 0,18. Na presença de uma bicamada com potencial superficial mais positivo, este mesmo peptídeo possui uma carga efetiva negativa, chegando a -0,88 quando o potencial foi positivo. Em todas as composições estudadas o H-MP1 apresentou valências positivas em pH 5,5.

4.2 Interação entre os peptídeos e membranas formadas por POPC:POPG (7:3)

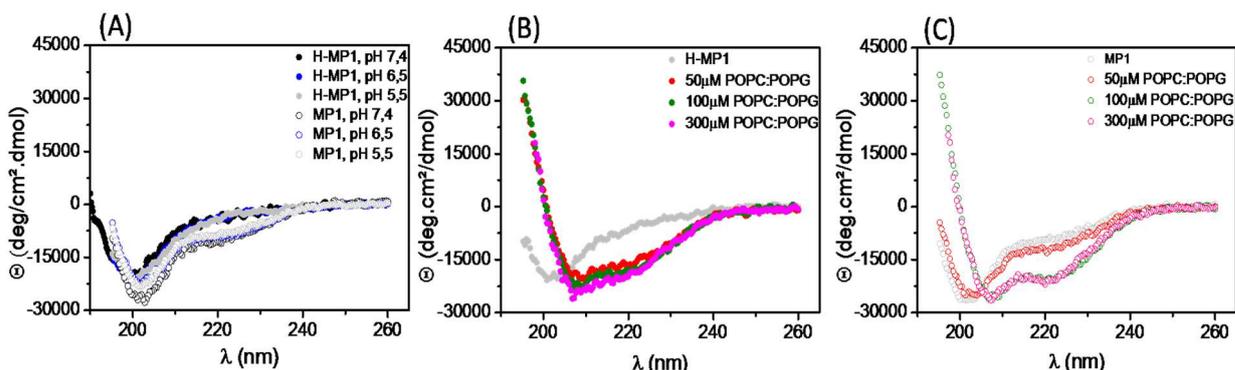
4.2.1 Espectroscopia de Dicroísmo circular (CD)

Foi utilizada a técnica de Espectroscopia de CD para obter informações sobre as características estruturais dos peptídeos em diferentes pHs e ao serem adsorvidos em membranas modelo aniônicas de 7POPC:3POPG, assim como os efeitos causados pelo pH nestas estruturas. Nestes experimentos, soluções de peptídeo a 10 μ M foram preparadas em tampão citrato de sódio, borato de sódio, fosfato de sódio e fluoreto de sódio a 150mM nos pHs 5,5; 6,5 e 7,4. Em seguida, foram tituladas com suspensão de LUVs, preparadas em tampão de mesma composição, para uma faixa de concentração de 0 a 1,5mM, de modo a atingir uma condição em que todos os peptídeos estivessem adsorvidos nas membranas modelo. Os espectros de CD foram coletados após 3 minutos da adição de uma alíquota de vesículas. Os valores de elipticidade (θ) obtidos foram transformados em elipticidade molar (Θ) por meio da (Equação 9), subtraindo a linha de base e realizando as correções volumétricas necessárias.

Para ambos os peptídeos, nos três pHs utilizados, os espectros de CD apresentaram uma banda de intensidade negativa posicionada em torno de 200 nm, característico de estrutura desordenada que não apresentou variações significativas com a mudança de pH (**Figura 20A**). No entanto a banda do espectro em 222nm foi mais intensa para o MP1 ($\Theta_{222} = -10000 \pm 800$ deg.cm².dmol⁻¹) comparado com a intensidade apresentada pelo H-MP1 ($\Theta_{222} = -3200 \pm 500$ deg.cm².dmol⁻¹).

Figura 20 - Espectros de dicroísmo circular, elipticidade molar em função do comprimento de onda, (A) dos peptídeos H-MP1 (símbolos preenchidos) e MP1 (símbolos abertos) a 10 μ M, em tampão pH 7,4 (preto), 6,4 (azul) e 5,5 (cinza); (B) H-MP1 na presença de vesículas de POPC:POPG e (C) MP1 na presença de vesículas de POPC:POPG. As concentrações de

vesículas apresentadas são 50 μ M (vermelha), 100 μ M (verde) e 300 μ M (rosa) em pH 5,5.



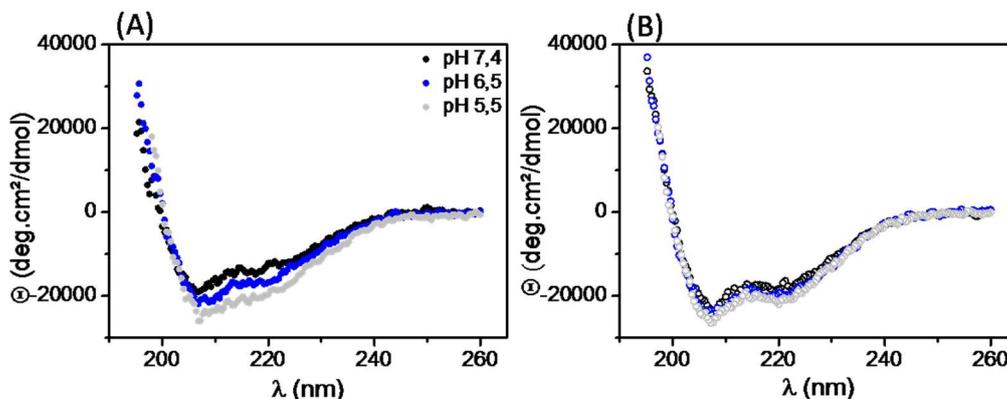
Na presença de vesículas de POPC:POPG, foi possível observar o aparecimento de duas bandas dicróicas negativas, em 222 nm e 208 nm, características de conformação helicoidal. Com o aumento da concentração de vesículas aniônicas, as intensidades destas bandas aumentaram, até que foi atingida uma estruturação máxima. Ao mesmo tempo, os espectros mostraram a existência de um ponto isodicroico em 204 nm, indicando um processo de dois estados em equilíbrio: um estado com o peptídeo desestruturado na solução; e um estado com o peptídeo estruturado em contato com a bicamada (KRITTANAI; JOHNSON, 1997), **Figura 20B**.

A estruturação desses peptídeos, comparada em função do pH da solução (

Figura 21), mostrou que para uma mesma concentração de vesículas, o análogo H-MP1 possuiu conteúdo helicoidal menor em pH neutro, e com a diminuição do pH ocorreu pequeno aumento na intensidade das bandas dicróicas negativas, resultado do aumento do conteúdo helicoidal, indicando que a formação de hélice foi dependente do pH da solução. Enquanto que, para o MP1 na presença de LUVs, a influência do pH foi pequena, com espectros com intensidades aproximadamente iguais.

Em pH 7,4 para o MP1 foram observados espectros com bandas negativas mais intensas que as obtidas para o H-MP1 neste mesmo pH. Em pH 5,5, mesmo com o aumento nas intensidades das bandas negativas do espectro para o H-MP1, a elipticidade molar no comprimento de onda de 222nm deste peptídeo ($\Theta_{222} \sim -18550 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) ainda foi discretamente menor que a do MP1 ($\Theta_{222} \sim -20770 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$).

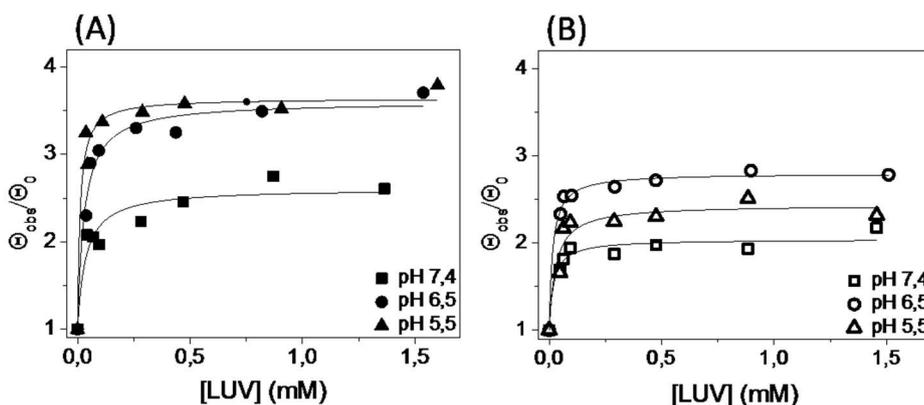
Figura 21 - Espectros de dicroísmo circular dos peptídeos na presença 300 μ M de LUVs de 7POPC: 3POPG em tampão pH 7,4 (azul), 6,5 (verde) e 5,5 (vermelha) (A) 10 μ M H-MP1 e (B) 10 μ M MP1.



Os valores de elipticidade molar em 222nm, obtidos dos espectros de CD, foram usados para investigar a partição do peptídeo em bicamadas lipídicas. As isotermas de adsorção são apresentadas na

Figura 22 e foram construídas com os dados de elipticidade molar normalizada em 222 nm (Θ_{222}/Θ_0) em função da concentração de lipídio exposto ao peptídeo [L], ou seja, 50% da concentração de vesículas usadas. Os valores experimentais foram ajustados pela equação de Langmuir (Equação 12), com um coeficiente de correlação maior que 0,97. As constantes de partição obtidas dos ajustes das isotermas são mostradas na Figura 23.

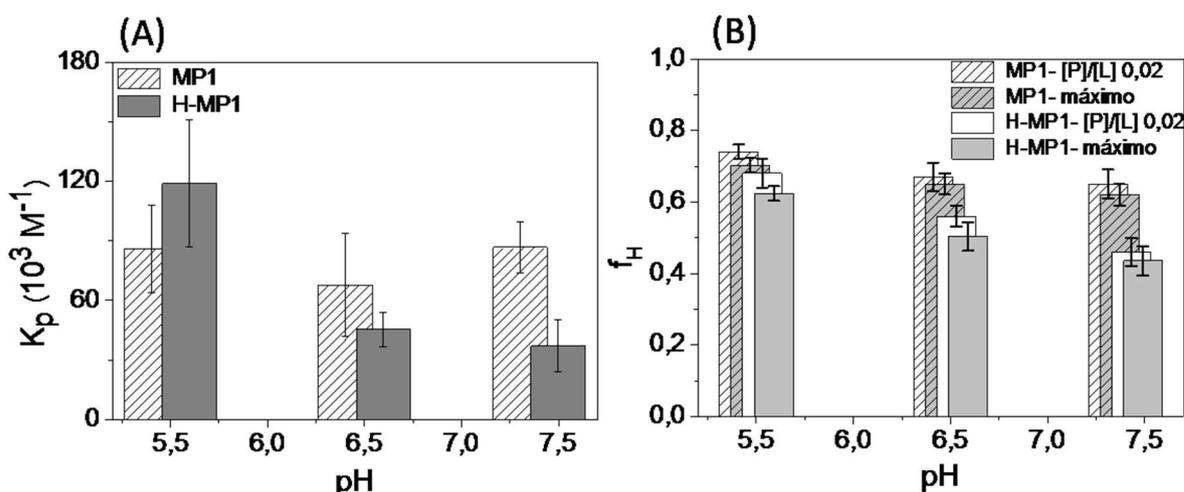
Figura 22 - Isotermas de adsorção: elipticidade molar normalizada em 222 nm em função da concentração de lipídios; a linha sólida é obtida pelo ajuste da equação não linear (Equação 12), para o peptídeo (A) 10 μ M de H-MP1 e (B) 10 μ M de MP1 nos pHs 5,5 (triângulo), 6,5 (círculos) e 7,4 (quadrados).



A Figura 23A mostra que os valores das constantes de partição obtidos para o MP1 em vesículas 7POPC:3POPG foram praticamente independentes do pH e próximos de $80 \cdot 10^3 \text{M}^{-1}$. Por outro lado, as constantes de partição obtidas para o peptídeo H-MP1 foram dependentes do pH da solução, mostrando decréscimo de seu valor com o aumento do pH da solução, sendo que em meio ácido a afinidade ($119 \cdot 10^3 \text{M}^{-1}$) foi cerca de 3 vezes maior do que em pH 7,4 ($37 \cdot 10^3 \text{M}^{-1}$). Estes resultados mostraram que, em relação à afinidade, o peptídeo análogo foi mais sensível ao pH do meio.

Os valores das frações de hélices calculados na razão 10 μM de peptídeo e 500 μM de LUV, ($[P]/[L] = 0,02$), foram próximos das frações máximas de hélice calculadas com os valores obtidos pelos ajustes das isotermas, indicando que nesta razão os peptídeos já haviam atingido um máximo de estruturação (Figura 23B). Em todos os pHs, o teor de hélice obtido foi maior para o MP1 do que para o análogo, onde também foi observado uma tendência em aumentar a estruturação com a diminuição do pH para ambos os peptídeos. No entanto, esta tendência foi mais evidente para o H-MP1, com 19% de hélice a mais em pH 5,5 do que em pH 7,4.

Figura 23 - (A) Constante de partição K_p (10^3M^{-1}) em função do pH da solução, obtidas por titulações com vesículas de 7POPC:3POPG. (B) Fração de hélice induzida nos peptídeos pela interação com as LUVs de POPC:POPG na razão $[P]/[L]=0,02$ e fração máxima de hélice obtida a partir dos valores do ajuste dos dados experimentais.



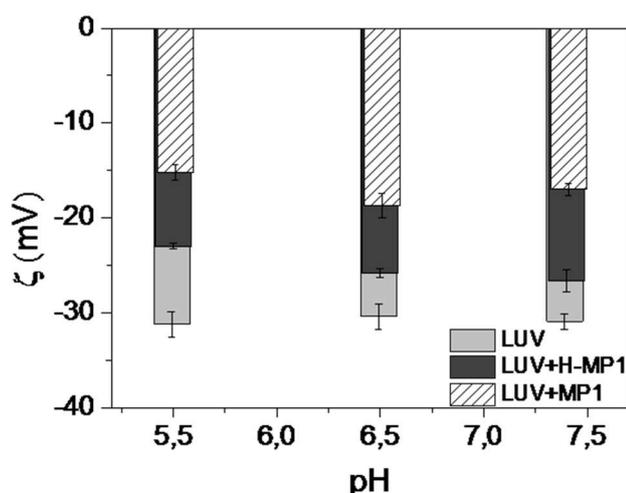
4.2.2 Medidas de tamanho e potencial zeta

A adsorção do peptídeo na bicamada lipídica foi investigada através da medição de potencial zeta após 3 minutos da adição de 50 μ M de LUVs em solução de 150mM de NaF contendo 5 μ M de peptídeo. Os valores obtidos de potencial zeta das vesículas e na presença dos peptídeos estão apresentados na **Figura 24**.

A adsorção de peptídeos carregados na membrana provocou uma variação na magnitude da carga superficial da vesícula, alterando os valores de potencial zeta da LUV como resultado da interação dos peptídeos com as bicamadas lipídicas. O MP1 provocou um aumento de 14 mV no potencial zeta em pH 7,4, sofrendo uma variação de apenas 2mV a mais em pH 5,5, indicando que o peptídeo com carga positiva adsorve-se na superfície da vesícula, sofrendo pouca dependência com o pH da solução, em bom acordo com a previsão de carga e as constantes de partição obtidas nos experimentos de CD.

O H-MP1 provocou variação do potencial zeta da vesícula de aproximadamente 4 mV positivos em pH 7,4, indicando que mesmo em pH neutro o peptídeo possui carga efetiva positiva, em acordo com a valência efetiva calculada para este caso. Em pH 5,5, apesar do potencial zeta da vesícula na presença do H-MP1 ter aumentado em relação ao obtido em pH 7,4 o potencial zeta foi aproximadamente metade do obtido com o MP1.

Figura 24 - Potencial zeta (mV) em função do pH. Valores obtidos por medidas de potencial zeta de 50 μ M de LUV formada por POPC:POPG e das vesículas na presença e 5 μ M de H-MP1 e MP1.



Os raios hidrodinâmicos das vesículas das mesmas amostras utilizadas para a medida do potencial zeta foram medidos por DLS. Como apresentado na Tabela 4, as vesículas não variam

seu tamanho devido à interação com os peptídeos, sugerindo que durante a interação peptídeo-membrana não tenha ocorrido agregação nem total destruição das mesmas.

Tabela 4- Raio hidrodinâmico medido por DLS de 50 μM de LUVs compostas por POPC:POPG e 50 μM de LUVs após 3 min na presença de 5 μM de MP1 e H-MP1.

pH	LUV (nm)	LUV+MP1 (nm)	LUV+H-MP1(nm)
7,4	66,6 \pm 0,6	70,1 \pm 0,7	66,6 \pm 0,6
5,5	66,3 \pm 0,8	69,4 \pm 1,3	65,9 \pm 0,6

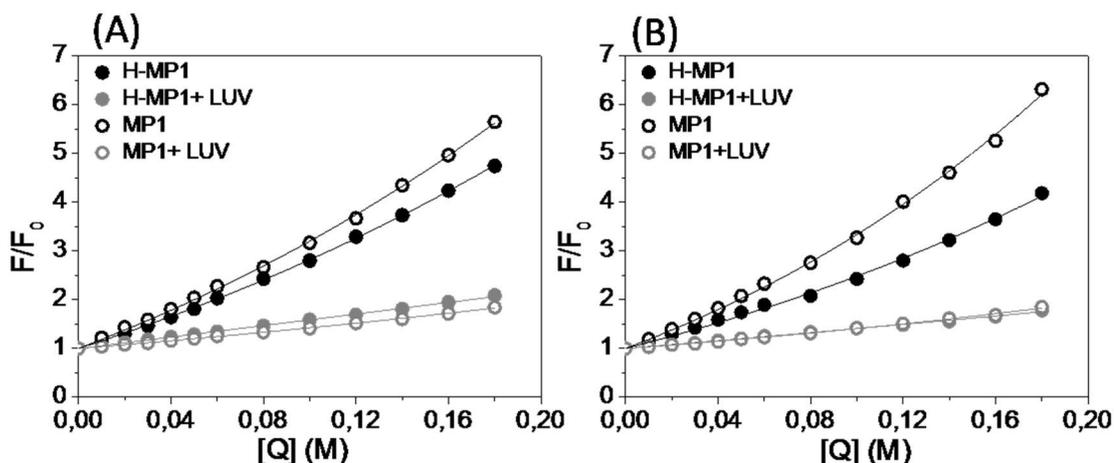
4.2.3 Supressão da emissão de fluorescência do triptofano por acrilamida

Com a finalidade de quantificar a extensão da penetração dos peptídeos na região hidrofóbica da bicamada, foram realizados experimentos de supressão do triptofano com acrilamida. Esses experimentos foram realizados com 500 μM de LUVs e 5 μM de peptídeo em 150mM de NaCl nos pHs 5,5, 6,5 e 7,4. A perda da intensidade de fluorescência devido à supressão causada pela acrilamida foi analisada por meio de gráficos de Stern-Volmer (Figura 25). As curvas obtidas não apresentaram uma forma linear, sugerindo que além do processo de supressão de triptofano devido à interação com membranas houve ainda um processo de supressão estática que pode ser atribuído à presença de moléculas de acrilamida vizinhas ao triptofano durante sua excitação (EDWARDS M.; SILVA S., 1986). O ajuste não linear usando a Equação 15 apresentou coeficientes de correlação superiores aos ajustes lineares e permitiram a obtenção das constantes de Stern-Volmer.

As constantes de Stern-Volmer para cada peptídeo em solução (K_{SVS}) indicaram que o grau de exposição do resíduo de triptofano do MP1 foi pouco maior do que do peptídeo H-MP1 (Tabela 5). Na presença de vesículas, a acessibilidade da acrilamida ao triptofano foi reduzida, obtendo menores constantes de Stern-Volmer (K_{SVL}), em todos os casos, indicando que os resíduos de triptofano dos peptídeos foram parcialmente protegidos pela bicamada (PALGUNACHARI; SEGREST; ANANTHARAMAIAHS, 1994).

Figura 25- Gráficos de Stern-Volmer dos peptídeos MP1(5 μM) e H-MP1(5 μM). Supressão da fluorescência do triptofano por acrilamida em tampão e na presença de 500 μM

de LUVs compostas por POPC:POPG. As linhas contínuas são os melhores ajustes obtidos com a equação de Stern-Volmer para supressão estática. (A) pH 7,4 e (B) pH 5,5.



Com a finalidade de comparar os dados de supressão, as constantes de Stern-Volmer para cada peptídeo (K_{SVL}) em vesículas foram normalizadas pelos respectivos valores em solução salina (K_{SVS}) e os resultados são mostrados na Tabela 5. Com os valores da Tabela 5, pode-se notar que a inserção do MP1 ocorreu independente do pH e para o H-MP1 a razão K_{SVL}/K_{SVS} diminuiu ligeiramente em pH mais ácido, indicando uma maior afinidade do peptídeo nesse caso, onde ele está mais inserido na bicamada protegido do solvente. No entanto, o resíduo de triptofano do MP1 encontra-se mais protegido do solvente que no H-MP1, em todos os pHs.

Tabela 5 - Constantes de supressão de Stern-Volmer para 5 μ M de MP1 e H-MP1 em solução 150mM de NaCl e relação entre as constantes de Stern-Volmer na presença de 500 μ M de LUVs compostas por POPC:POPG e em solução K_{SVL}/K_{SVS} .

	MP1		H-MP1	
	K_{SVS}	K_{SVL}/K_{SVS}	K_{SVS}	K_{SVL}/K_{SVS}
pH 5,5	$17,9 \pm 0,5$	$0,19 \pm 0,03$	$12,3 \pm 0,4$	$0,32 \pm 0,02$
pH 6,5	$17,2 \pm 0,2$	$0,22 \pm 0,03$	$13,4 \pm 0,2$	$0,32 \pm 0,02$
pH 7,4	$18,2 \pm 0,4$	$0,20 \pm 0,01$	$15,3 \pm 0,2$	$0,36 \pm 0,01$

4.2.4 Atividade Lítica

A atividade lítica dos peptídeos foi testada pela permeabilização da vesícula lipídica, pois o mecanismo de ação dessa classe de peptídeos tem como alvo a camada de fosfolípidios da

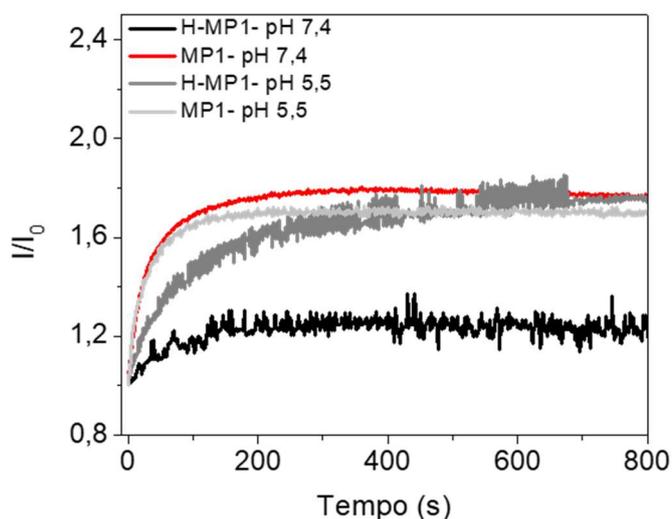
membrana celular de modo a induzir poros ou defeitos nessas membranas. O vazamento do conteúdo de vesículas lipídicas formadas por 7POPC: 3POPG foi analisado por medidas dos vazamento de corantes fluorescentes através de experimentos de espectroscopia de fluorescência com LUVs e de microscopia óptica com GUVs.

4.2.4.1 Vazamento de LUVs seguido por fluorimetria

O vazamento de vesículas lipídicas foi seguido por experimentos de espectroscopia de fluorescência monitorando a cinética de liberação do corante fluorescente calceína encapsulado nas LUVs. Enquanto a calceína estava encapsulada, sua fluorescência foi auto suprimida, e após o início do seu vazamento a intensidade de fluorescência detectada aumentou com o decorrer do tempo. A cinética de vazamento da calceína de vesículas compostas por POPC:POPG, devido à ação dos peptídeos, foi monitorada em função do tempo e está apresentada na **Figura 26**.

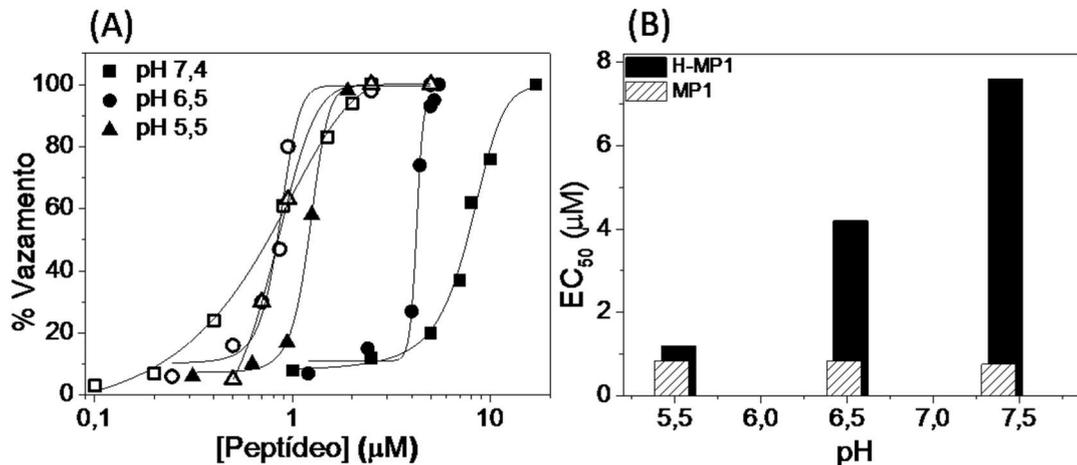
O pH afetou drasticamente a cinética de liberação de corante das LUVs, com um aumento pronunciado e rápido da intensidade de fluorescência em pH ácido para o H-MP1, enquanto que a fluorescência foi recuperada mais lentamente e em menor quantidade em pH 7,4. Ao passo que, para o MP1, o pH não influenciou no vazamento do corante, acontecendo rapidamente nos dois pHs apresentados.

Figura 26 - Cinética de vazamento de calceína de 50 μM de LUVs compostas por POPC:POPG com adição do de 2,5 μM de MP1 e H-MP1 em pH 7,4 e 5,5.



A porcentagem de calceína liberada em função da concentração de peptídeo, após 10 minutos da injeção de uma alíquota de vesículas, foi expressa na forma da curva dose-resposta da Figura 27A. Estas curvas de dose-resposta mostraram vazamento completo provocado pelos dois peptídeos nos três valores de pH investigados. As curvas obtidas também apresentaram dependência sigmoide entre a porcentagem de corante vazado do interior da vesícula e a concentração do peptídeo, caracterizando um processo cooperativo, onde foi observada uma concentração crítica de peptídeo, acima da qual ocorre um processo intenso de liberação de corante, sendo que esta concentração crítica foi maior para o análogo H-MP1 e dependente do pH. O vazamento induzido pelo MP1 não apresentou grande variação em relação ao pH da solução como o análogo. As curvas mostraram ainda que a cooperatividade diminuiu com o aumento do pH da solução, sendo que a cooperatividade foi semelhante para os dois peptídeos.

Figura 27 - (A) Curvas de dose-resposta da atividade lítica de H-MP1 (símbolos preenchidos) e MP1 (símbolos abertos) em pH 5,5, 6,5 e 7,4 na presença de 100 μM de vesículas à 25°C depois de 10 min de interação com os peptídeos; (B) Valores de concentração de peptídeo necessária para que ocorra o vazamento de 50% do conteúdo da LUV (EC_{50}).



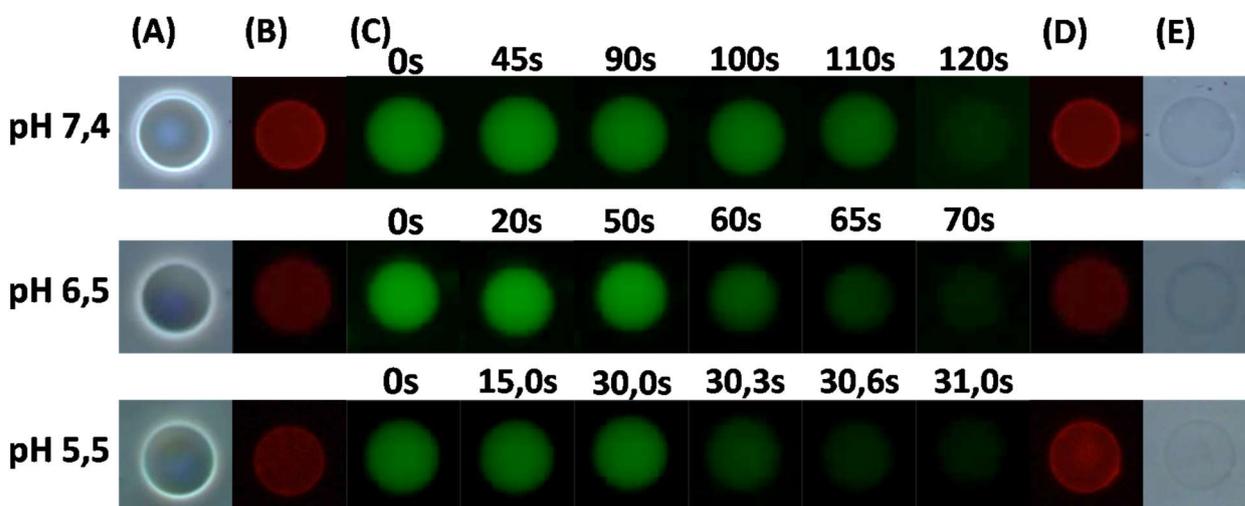
A eficiência lítica pode ser estimada pela concentração de peptídeo para induzir 50% de vazamento, EC_{50} . Os valores de EC_{50} para todos os pHs são mostrados na Figura 27B. O peptídeo MP1 foi mais eficiente nos três pHs investigados, sendo os valores de EC_{50} aproximadamente independentes do pH. Para o H-MP1, no entanto, a eficiência lítica diminuiu significativamente com o aumento de pH, passando de 1,2 μM (pH 5,5) para 7,6 μM (pH 7,4). Estes resultados mostraram que o análogo H-MP1 foi mais seletivo em relação ao pH comparado com o MP1 para vesículas que contém POPG, atingindo em pH 5,5 uma eficiência lítica (EC_{50}) aproximadamente igual à do MP1.

4.2.4.2 Vazamento observado por microscopia óptica

A atividade lítica também foi investigada por observação de GUVs pelo método de vesícula única. Nesta técnica, além de informação a respeito do fluxo através da membrana, é possível observar variações na forma das vesículas durante a interação bicamada-peptídeo (TAMBA; YAMAZAKI, 2005). Neste método, o efluxo do interior da GUV foi induzido pelo peptídeo que foi injetado continuamente próximo à membrana fosfolipídica, de maneira a garantir que a concentração de peptídeo próximo à vesícula se mantivesse constante. As GUVs de 7POPC: 3POPG foram obtidas pelo método de eletroformação, contendo calceína e sacarose no seu interior e observadas em solução de 150mM de NaCl nos pHs 5,5 6,5 e 7,4.

As imagens das GUVs, obtidas por microscopia de contraste de fase, na ausência de peptídeo, apresentaram alto contraste devido à diferença nos índices de refração da sacarose (interior da GUV) e da solução salina (exterior da GUV). Por microscopia de fluorescência, a imagem da mesma GUV mostrou a membrana intacta, marcada com rodamina-PE e alta concentração de calceína encapsulada (Figura 28A e B).

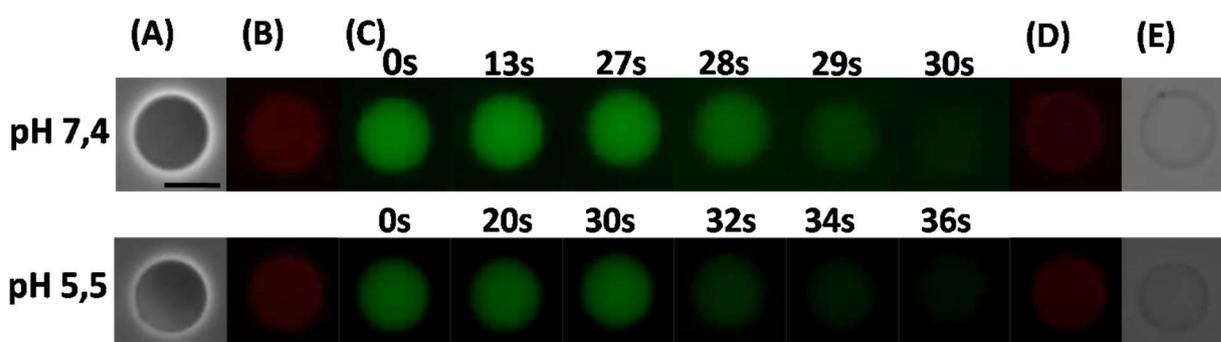
Figura 28 - Efluxo de calceína de uma única vesícula gigante de 7POPC: 3POPG induzido por 10 μ M de H-MP1 em pH 7,4., 6,5 e 5,5. (A) Imagem de contraste de fase antes de iniciar a adição do peptídeo, (B) Imagem de fluorescência do marcador rodamina-PE antes da adição do peptídeo, (C) Imagens de fluorescência da GUV obtidas ao longo do tempo, após o início da injeção de H-MP1, (D) Membrana marcada por rodamina-PE depois da perda total de fluorescência no interior da GUV e (E) Imagem de contraste de fase após perda total de fluorescência no interior da GUV. A barra de escala de 20 μ m.



Após o início da injeção da solução de peptídeo próximo da vesícula, observou-se que a intensidade da fluorescência no interior da GUV manteve-se inalterada por um tempo da ordem de minuto. Esse período inicial pode ser atribuído ao tempo necessário para a adsorção do peptídeo e sua acumulação na superfície da vesícula, causando perturbações que provocam a formação de poros ou defeitos na bicamada, dando início ao efluxo da calceína (TAMBA *et al.*, 2010). Posteriormente ao período inicial, o sinal de fluorescência no interior da GUV decresceu rapidamente, em uma escala de segundos, até não ser mais detectado, indicando que ocorreu a liberação do corante encapsulado (Figura 28C). Foi possível observar que durante o vazamento da calceína do interior da vesícula, a membrana não apresentou rupturas, não variou seu formato e não houve associação com outras GUVs.

Por fim, após a completa redução da fluorescência da calceína no interior da vesícula foi observado que a membrana marcada com rodamina permaneceu intacta e o contraste de fase foi perdido, indicando que houve uma transferência entre as soluções de sacarose e salina através da membrana (Figura 28D e 28E). O mesmo comportamento foi observado na injeção do peptídeo MP1 próximo a GUV de POPC:POPG, diferindo apenas nos tempos para que ocorressem as mudanças na intensidade de fluorescência (Figura 29).

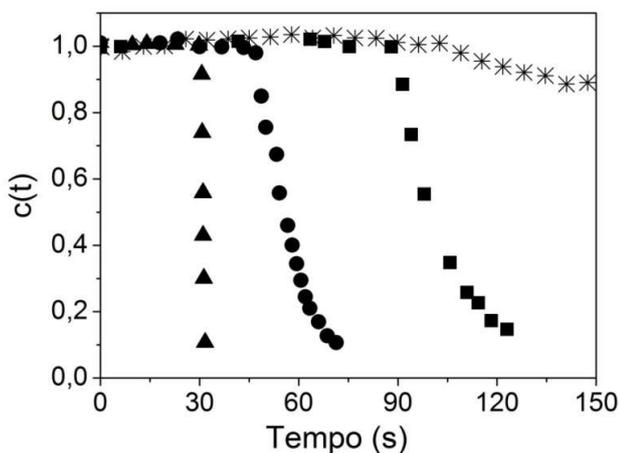
Figura 29 - Efluxo de calceína de uma única vesícula gigante de 7POPC: 3POPG induzido por 10 μ M de MP1 em pH 7,4 e 5,5. (A) Imagem de contraste de fase antes de iniciar a adição do peptídeo, (B) Imagem de fluorescência do marcador rodamina-PE antes da adição do peptídeo, (C) Imagens de fluorescência da GUV obtidas ao longo do tempo após o início da injeção do peptídeo MP1, (D) Membrana marcada por rodamina-PE depois da perda total de fluorescência no interior da GUV e (E) Imagem de contraste de fase após perda total de fluorescência no interior da GUV. A barra de escala de 20 μ m.



As intensidades de fluorescência de todas as imagens obtidas, como as apresentadas na Figura 28 e Figura 29, foram quantificadas com o uso do Software ImageJ (National Institutes

of Health, Bethesda, MD) e a concentração de calceína calculada com a (Equação 17). Os valores obtidos foram dispostos em função do tempo, como mostrados na Figura 30, onde pode ser observada de forma quantitativa a diminuição da calceína encapsulada com o decorrer do tempo. A Figura 30 indica que a concentração de calceína no interior da vesícula se manteve constante por um tempo da ordem de minutos, e em seguida esta concentração diminuiu rapidamente na ordem de segundos, até chegar próximo de zero. Esta figura apresenta também a curva obtida das imagens de GUV de um experimento controle sem a adição de peptídeo. Nesse caso, houve apenas uma diminuição gradual e contínua na intensidade de fluorescência, o que pode ser atribuído a foto-supressão da calceína. Para que a foto-supressão do corante não interfira nos resultados obtidos, a obtenção de imagens foi realizada somente por contraste de fase quando a interação entre o peptídeo e a vesícula duraram mais que 180 segundos para ocorrer.

Figura 30 - Curso temporal da alteração da concentração de calceína encapsulada obtido pelas medidas de intensidade de fluorescência do GUVs de POPC:POPG (estrela) e da GUV ao interagir com $10\mu\text{M}$ de H-MP1 nos pHs 5,5 (triângulo), 6,5 (círculos) e 7,4 (quadrados).



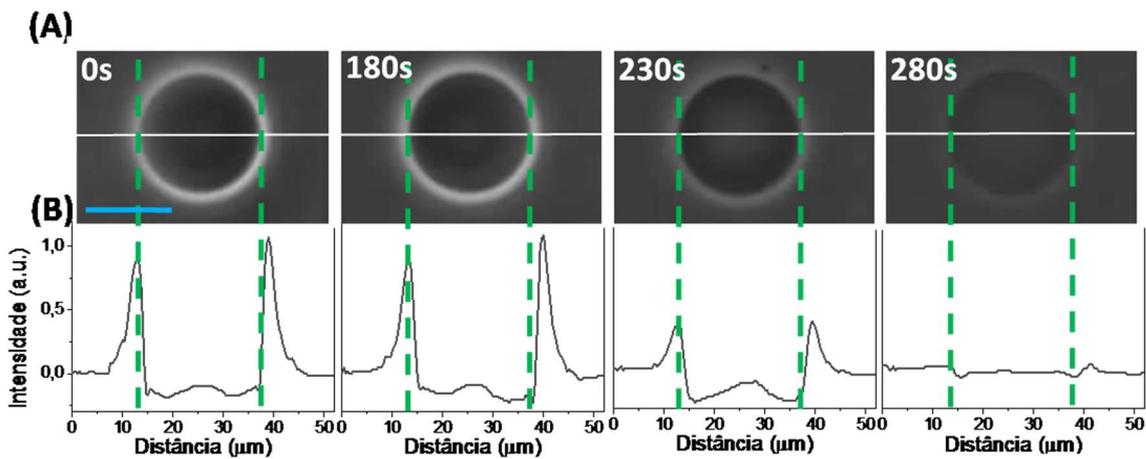
A Figura 31A mostra imagens de contraste de fase das GUVs sob a ação de $4\mu\text{M}$ de H-MP1 em pH 5,5. Inicialmente, as imagens das GUVs mostraram um alto contraste óptico devido à assimetria do índice de refração de sacarose encapsulada e o meio exterior. Com a injeção de peptídeo próximo à GUV, o contraste permaneceu inalterado por um período de tempo de aproximadamente 2 min, seguido de uma perda de contraste, que ocorreu com tempo menor, até não ser mais observada diferença entre o meio externo e o interno da GUV, enquanto a estrutura vesicular foi preservada (Figura 31A).

Nesses casos, para quantificar o processo lítico, foi obtido o perfil de nível de cinza, medido ao longo do equador da GUV, usando o software ImageJ (MERTINS, 2014). O perfil mostrado na Figura 31B, caracterizado por altos picos positivos simétricos na borda da GUV ($I_{borda,t}$) mais intenso do que no seu interior e no exterior ($I_{ext,t}$). O decréscimo do contraste devido ao efluxo da solução encapsulada foi seguido pela diminuição da intensidade do pico. Assim, a diferença das intensidades na borda em um tempo de observação t após a injeção de peptídeo foi normalizada pela mesma diferença antes da injeção do peptídeo:

$$c(t) = \frac{(I_{borda,t} - I_{ext,t})}{(I_{borda,0} - I_{ext,0})} \quad (\text{Equação 24})$$

Onde $I_{borda,0}$ e $I_{ext,0}$ são as intensidades da borda e do exterior antes de começar a injeção do peptídeo, respectivamente.

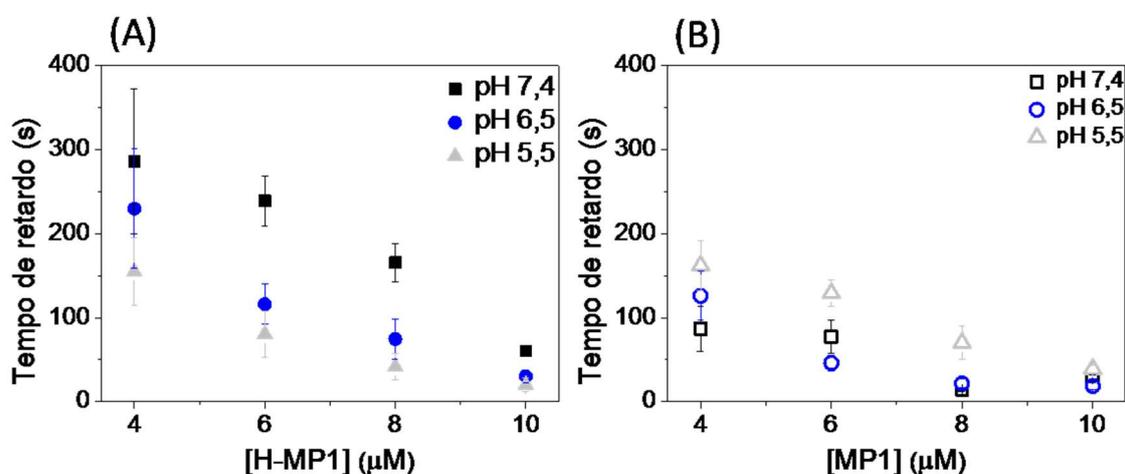
Figura 31 - (A) Sequência temporal das imagens de contraste de fase de uma GUV única composta por 7POPC: 3POPG durante a injeção de $4\mu\text{M}$ de H-MP1 no pH 5,5. A barra azul na primeira imagem corresponde a $20\mu\text{m}$. (B) Nível de cinza em função da distância calculado através do equador das imagens correspondentes em (A) pelo software IMAGEJ.



Considerando a observação de, no mínimo, 15 GUVs independentes para cada condição, com raios próximos de $10\mu\text{m}$, foi estabelecida uma média dos tempos de retardo, que foi o tempo decorrido da injeção do peptídeo até o início da perda de contraste de fase ou de decréscimo da intensidade de fluorescência no interior da vesícula. A Figura 32, evidencia que o tempo de retardo médio para o efluxo tenha se iniciado, calculado para o conjunto de vesículas, foi inversamente proporcional à concentração do peptídeo, ou seja, o tempo de

retardo foi maior para baixas concentrações de peptídeos. Também foi observado dependência em relação ao pH. Quando o vazamento foi induzido pelo peptídeo H-MP1, os menores tempos encontrados foram em pH 5,5, sendo cerca de 150s mais rápidos que em pH neutro, nas concentrações de peptídeo é 4, 6 e 8 μ M. Para o MP1 o comportamento é o contrário, sendo os menores tempos de retardo obtidos em pH 7,4 para todas concentrações estudadas.

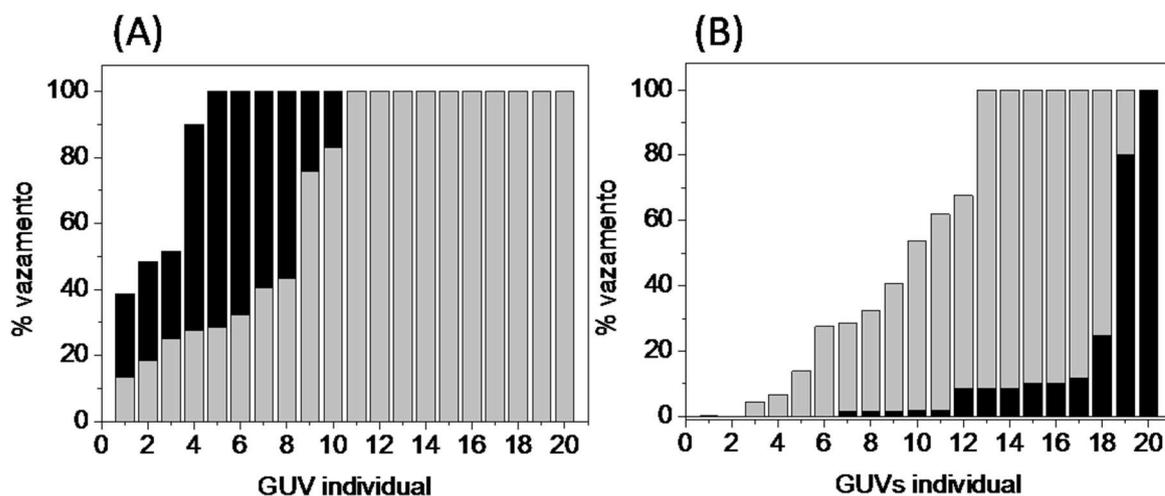
Figura 32 - Tempo de retardo em função da concentração de peptídeo injetado próximo à vesícula (A) H-MP1 e (B) MP1 nos pHs 5,5 (triângulos), 6,5 (círculos) e 7,4 (quadrados). Os valores de tempos são valores médios calculados em um conjunto de pelo menos 15 GUVs.



Após 50 segundos do início da injeção de 10 μ M de peptídeo a porcentagem de corante vazado de 20 vesículas independentes está apresentada nos histogramas da Figura 33. Quando induzido pelo MP1, o vazamento do corante das vesículas foi maior em pH 7,4 do que em pH 5,5, com 75% das GUVs analisadas totalmente vazadas. Um comportamento contrario foi observado para o H-MP1, onde os maiores vazamentos foram obtidos em pH 5,5, com 40% das GUVs completamente vazadas enquanto apenas uma vesícula concluiu o vazamento em pH 7,4, neste intervalo de tempo.

Para analisar o efluxo de calceína através da membrana lipídica, foram obtidos valores de intensidade de fluorescência ou intensidade de cinza, de todas as imagens obtidas nas interações de H-MP1 e MP1 nos três pHs estudados. Os valores de concentração em relação ao tempo permitiram determinar o fluxo volumétrico, por meio da dependência log-linear da concentração de calceína com o tempo, como podem ser visto no exemplo da Figura 34.

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



Estes resultados indicaram alta atividade lítica induzida pelo MP1 nos três valores de pH. O peptídeo H-MP1 apresentou maior atividade em pH 5,5, em excelente acordo com os resultados obtidos pelos experimentos de vazamento de LUVs, sendo que o H-MP1 foi mais seletivo em relação ao pH da solução do que o MP1.

Por meio das inclinações das retas apresentadas na Figura 34, foram obtidos os valores dos fluxos volumétricos, ou seja, da permeabilidade da vesícula, e então se estabeleceu uma média desses valores. Considerando o erro experimental nestas médias, as permeabilidades médias (P_m) obtidas pelas imagens de microscopia de fluorescência não diferiram substancialmente das obtidas pelas imagens de contraste de fase mesmo para baixas concentrações de peptídeo onde o tempo de retardo é grande e ocorre a foto-supressão da calceína (Figura 35). Portanto, nesse trabalho os valores das permeabilidades foram obtidos por vídeos gravados por microscopia de fluorescência para as concentrações em que a foto-supressão do corante fluorescente não comprometeu a resolução das imagens e por microscopia de contraste de fase para os casos onde as imagens ficaram comprometidas devido ao foto-supressão do corante.

Figura 34 - Dependência log-linear da concentração de calceína no interior da GUV em função do tempo contabilizado após o tempo de retardo: $-R/3\ln(c) (10^{-6})$ vs t (s), induzido por

10 μM de MP1 (símbolos abertos) e 10 μM de H-MP1 (símbolos fechados) em GUVs de 7POPC: 3POPG nos pHs 7,4 (quadrados), 6,5 (círculos) e 5,5 (triângulos).

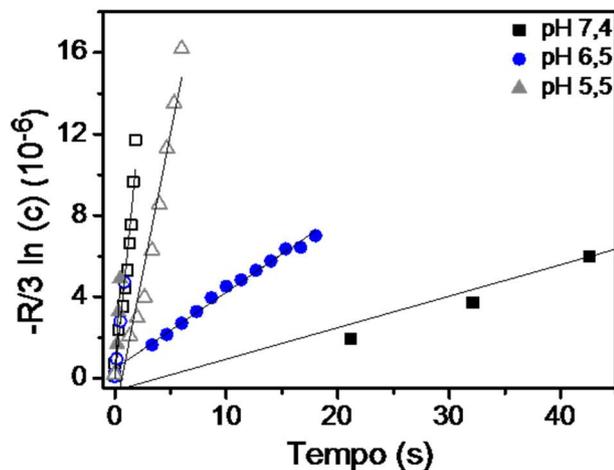
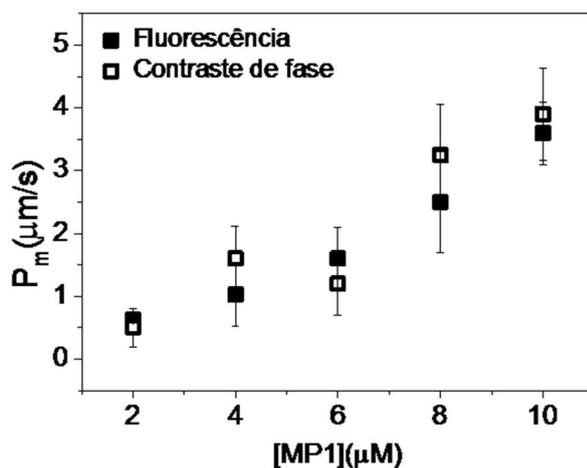


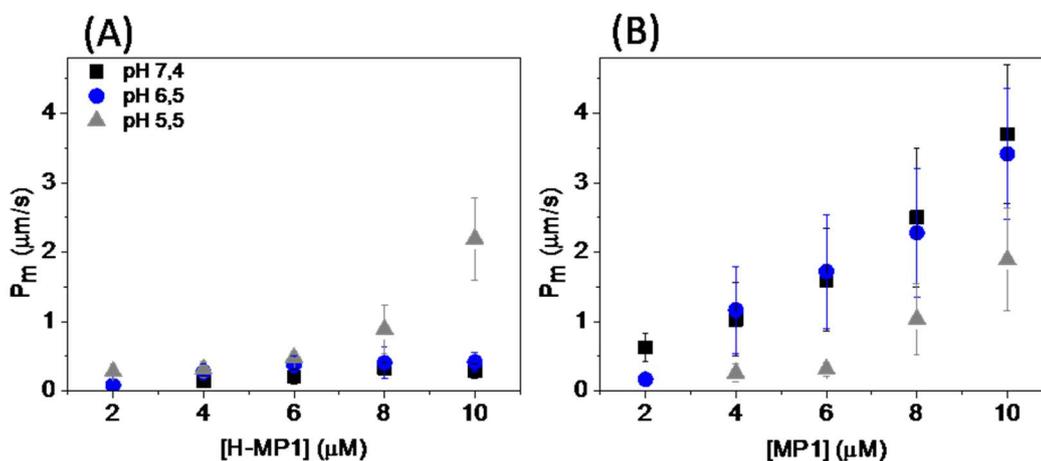
Figura 35- Permeabilidade média induzida em função da concentração de MP1 calculada a partir da análise das imagens de GUVs independentes de POPC:POPG em pH 7,4 gravadas por microscopia de fluorescência (no mínimo 15 GUVs) e microscopia de contraste de fase (no mínimo 8 GUVs).



Deste modo, foram calculadas as permeabilidades médias (P_m) induzidas por H-MP1 e MP1 nos pHs 5,5, 6,5 e 7,4 e os valores obtidos estão apresentados na Figura 36. Em todos os casos a P_m foi dependente da concentração de peptídeo, no entanto nas condições em que foi estimado que os peptídeos possuíssem carga efetiva positiva, a dependência da permeabilidade com a concentração do peptídeo foi consideravelmente maior.

Os valores de permeabilidades induzidas pelo H-MP1 sofrem variações significativas com a mudança do pH do meio, tendo aumentado cerca de 8 vezes em meio ácido (pH 5.5) atingindo um valor de $2,2 \pm 0,6 \mu\text{m/s}$ neste pH comparado com o meio fisiológico de pH 7,4 com valor menor que $0,3 \mu\text{m/s}$, ambos em $10 \mu\text{M}$ de peptídeo. A permeabilidade induzida pelo peptídeo MP1 foi $3,7 \pm 1 \mu\text{m/s}$ em pH 7,4 a $10 \mu\text{M}$, quase o dobro da permeabilidade ($P_m=1,9 \pm 0,7 \mu\text{m/s}$) em pH 5,5.

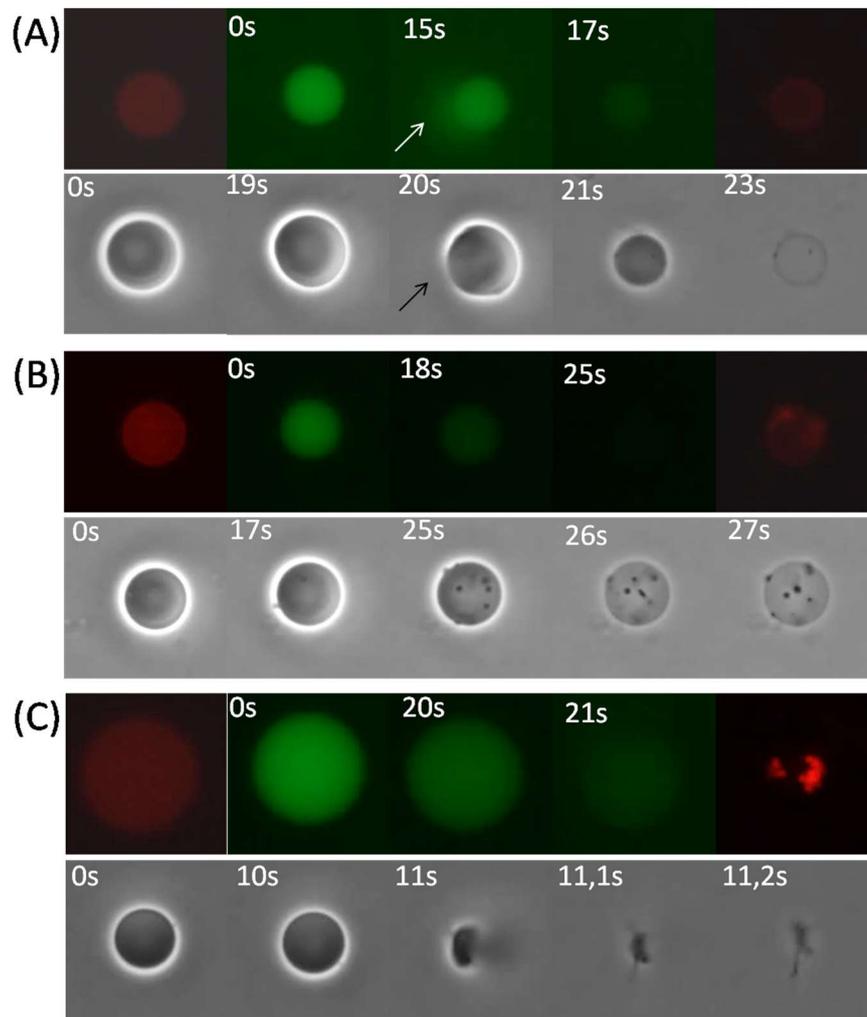
Figura 36 - Permeabilidade media induzida em função da concentração de peptídeo nos pHs 7,4, 6,5 e 5,5 obtida das imagens de microscopia das GUVs de POPC:POPG sob fluxo constante de (A) H-MP1 e (B) MP1. Valores médios calculados para um conjunto de no mínimo 15 GUVs.



Em adição a perda do contraste, os peptídeos também induziram, em alguns casos, modificações estruturais nas GUVs, tais como a ruptura, perda de contraste acompanhada por formação de regiões densas provavelmente devido à agregação peptídeo/lipídio que estão denominadas genericamente de domínios e diminuição do raio da vesícula. As vesículas que tiveram o tamanho variado e/ou romperam a membrana durante a interação com o peptídeo não foram consideradas para obtenção dos valores de permeabilidade média e dos histogramas de vazamento. Na Figura 37 são mostrados exemplos de cada um desses eventos observados durante os experimentos. Nesta figura estão apresentadas imagens em uma sequência temporal de seis diferentes vesículas de 7POPC: 3POPG sob o efeito de MP1 em pH 7,4.

Figura 37 - Imagens em sequência temporal da interação do MP1 com GUVs compostas de 7POPC: 3POPG em pH 7,4. A primeira sequência de cada figura é obtida pela visualização da vesícula por microscopia de fluorescência. Nesse caso, a primeira e a última imagem dessa

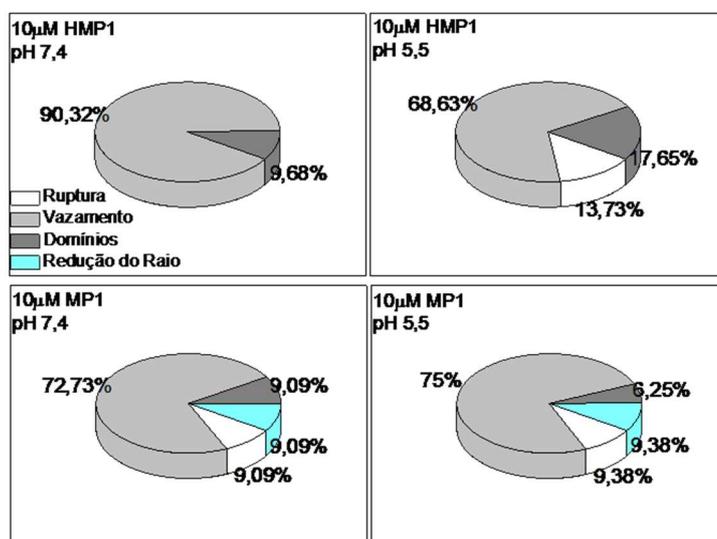
sequência são obtidas antes e após a interação do peptídeo, respectivamente. A segunda sequência é obtida pela visualização por microscopia de contraste de fase. (A) É possível observar o aparecimento de um macro poro na membrana, seguido de diminuição do raio da GUV concomitante com o vazamento do corante encapsulado. (B) Além da perda do corante encapsulado, a vesícula apresenta regiões mais densas na sua membrana e (C) explosão da vesícula acompanhada da formação de massa amorfa provavelmente de fosfolípidios e peptídeos.



Em todos os casos observados a vesícula permaneceu intacta por um período de tempo, considerado necessário para a adsorção do peptídeo na membrana. Na Figura 37A é observada uma leve modificação na curvatura da membrana seguida da formação de um poro visível na membrana (seta), acompanhado de uma diminuição de tamanho e perda do sinal de fluorescência e contraste entre interior/exterior. Este comportamento foi semelhante ao observado por Archila para o peptídeo sintetizado de uma mistura das regiões mais ativas de

pediocina A e plantaricina 149 com GUVs de POPC, assim como com a interação do detergente SDS com GUVs de POPC (ARCHILHA, 2009). Na Figura 37B, após o período de adsorção do peptídeo a vesícula começou a perder o contraste ao mesmo tempo em que apareceram manchas escuras na membrana, provavelmente devido ao acúmulo local de peptídeo/lipídio, indicando uma possível dobra da membrana. Por fim, a Figura 37C apresenta uma GUV que sofreu uma espécie de explosão da vesícula (vesicle burst), resultando na formação de uma massa amorfa, provavelmente formada por fosfolipídio e peptídeo. Os eventos observados nas figuras Figura 37B e C já haviam sido relatados em trabalhos anteriores do grupo (Cabrera et al., 2011).

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



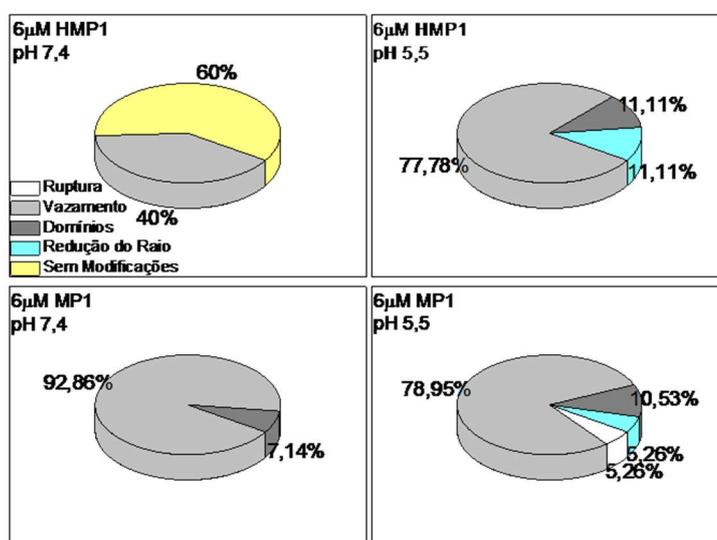
A distribuição do percentual de vesículas com esses diferentes tipos de eventos foram contabilizados e apresentados nas Figura 38 e Figura 39. Para 10 μ M de H-MP1 em pH 7,4, mais de 90% das GUVs observadas apresentam vazamento do conteúdo interno sem alterar estrutura da bicamada. Em pH 5,5 observou-se aumento de vesículas que apresentaram regiões densas, e também o aparecimento de uma população de GUVs que explodiram. Enquanto que para o MP1, aparecem vesículas em todas as condições discutidas indiferentes ao pH da

solução, sendo que 9% das GUVs observadas explodiram e 9% reduziram o raio, dentro das quais algumas GUVs sofreram a redução do raio acompanhado do aparecimento de regiões escuras (domínios) na bicamada.

Foi observada também uma forte dependência entre a concentração dos peptídeos e a variação no formato da GUV. Quando a concentração de peptídeo injetado foi reduzida para $6\mu\text{M}$, 40% das GUVs perderam o contraste, enquanto não ocorreu nada com 60% das GUVs, durante 30 minutos de injeção de H-MP1 em pH 7,4. Porém em pH 5,5 todas as GUVs observadas vazaram e cerca de 22% sofreram modificações estruturais como diminuição do raio (algumas reduziram o raio acompanhado da formação de domínios) e formação de domínios na membrana mantendo seu tamanho inicial.

Para o $6\mu\text{M}$ de MP1 em pH 7,4 não foram observadas vesículas explodindo e com redução do raio como quando a interação ocorre com $10\mu\text{M}$. No entanto, em pH 5,5 cerca de 5% das vesículas continuaram sofrendo explosão e 5% alteraram seu tamanho.

Figura 39 - Porcentagem de modificações observadas nas GUVs durante a interação entre os peptídeos $6\mu\text{M}$ de H-MP1 e $6\mu\text{M}$ de MP1 com vesículas de POPC:POPG em pH 7,4 e 5,5. Porcentagem de GUVs que sofreram a ruptura na bicamada lipídica está representada na cor branca, GUVs tiveram o conteúdo interno vazado sem modificações visíveis na bicamada lipídicas representadas de cinza claras, GUVs que durante o vazamento apresentaram regiões mais escuras na bicamada (domínios) em cinza escura, GUVs que tiveram redução do raio durante o vazamento em azul claro e GUVs onde nenhuma modificação foi observada durante o período dos experimentos representados na cor amarelo.



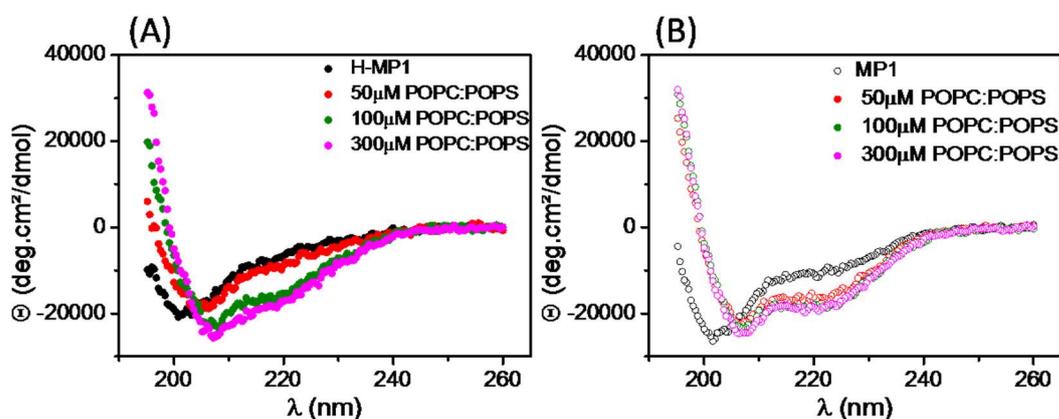
4.3 Interação entre os peptídeos e membranas de diferente composições

4.3.1 Espectroscopia de Dicroísmo circular (CD)

Para obter informações a respeito das variações nas características estruturais dos peptídeos quando interagem com vesículas formadas por 8POPC:2POPS, 7POPC:2POPS:1POPE e 9POPC:1POPE nos pHs 7,4, 6,5 e 5,5 foi utilizada a técnica de dicroísmo circular. Nesses experimentos, uma solução de peptídeo a 10 μ M foi titulada com uma solução de LUVs, do mesmo modo que foi descrito para o experimento feito com vesículas de POPC:POPG.

Os peptídeos em solução apresentaram espectros característicos de estruturas aleatórias, e ao interagirem com uma pequena alíquota de vesículas, passaram a apresentar espectros compostos por duas bandas de intensidade negativa em 222 nm e 208 nm, característicos de conformação helicoidal (Figura 40). Com o aumento da concentração de vesículas, estas bandas negativas se tornaram mais intensas, evidenciando que o peptídeo se estruturou com o aumento da concentração de lipídios. Em todas as situações estudadas, foram observadas a existência de um ponto isodicroico em 204 nm indicando que ocorreu um processo de dois estados em equilíbrio, um estado onde o peptídeo possuía estrutura aleatória em solução e um estado com o peptídeo em estrutura helicoidal em contato com a bicamada lipídica.

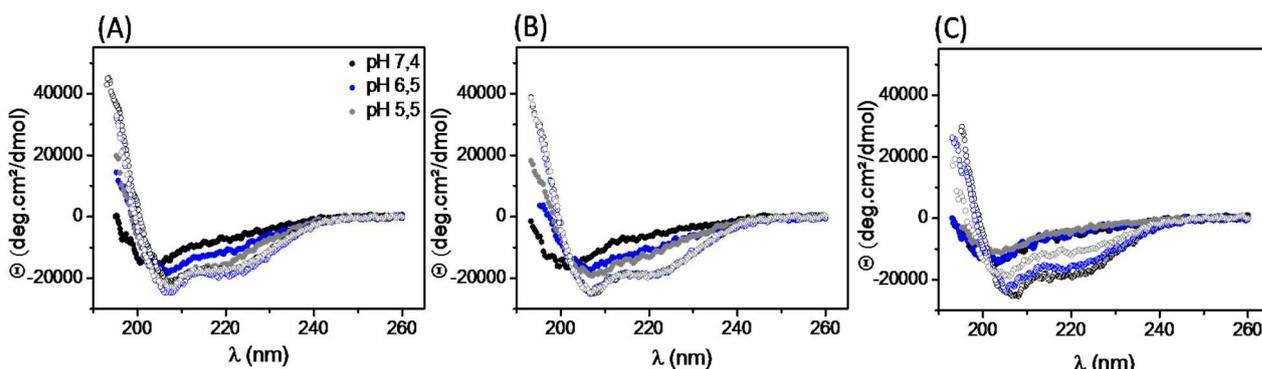
Figura 40 - Espectro de dicroísmo circular, elipticidade molar versus comprimento de onda para os peptídeos H-MP1 (símbolos preenchidos) e MP1 (símbolos abertos) a 10 μ M, em tampão (preto) e após o equilíbrio, com LUVs de POPC:POPS a 50 μ M (vermelha), 100 μ M (azul) e 300 μ M (verde) em pH 5,5.



A relação entre a estruturação desses peptídeos com e a variação do pH pode ser analisada pelos espectros coletados após 3 minutos de interação entre os peptídeos e 300 μ M de LUVs, apresentados na Figura 41. Na presença de vesículas aniônicas, os espectros do peptídeo MP1 apresentaram picos negativos mais intensos, indicando maior estruturação que o análogo H-MP1 nos três pHs estudados. O H-MP1, por sua vez, aumentou a intensidade das bandas negativas com diminuição do pH, indicando maior teor helicoidal em pH 5,5.

Para a interação com LUVs compostas por POPC:POPE, o H-MP1 apresentou pouca estruturação, mesmo em pH 5,5, enquanto que para o MP1 as bandas se tornaram mais intensas com o aumento de pH, sendo maiores em pH 7,4 em relação as obtidas em pH 5,5.

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



A partição do peptídeo em bicamadas lipídicas foi investigada a partir dos valores de elipticidade molar em 222 nm. As isotermas de adsorção, elipticidade molar normalizada em 222 nm (Θ_{222}/Θ_0) em função da concentração de lipídio exposto ao peptídeo [L], estão apresentadas na Figura 42, onde os valores experimentais foram ajustados pela equação de Langmuir (Equação 12), com coeficientes de correlação maiores que 0,96. Destes ajustes foram obtidas as constantes de partição (K_p).

Em vesículas aniônicas, foram observados valores maiores de K_p quando comparado com os valores obtidos em vesículas zwitteriônicas (Figura 43), indicando que o processo de associação dos peptídeos à bicamada foi influenciado pelas interações eletrostáticas.

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

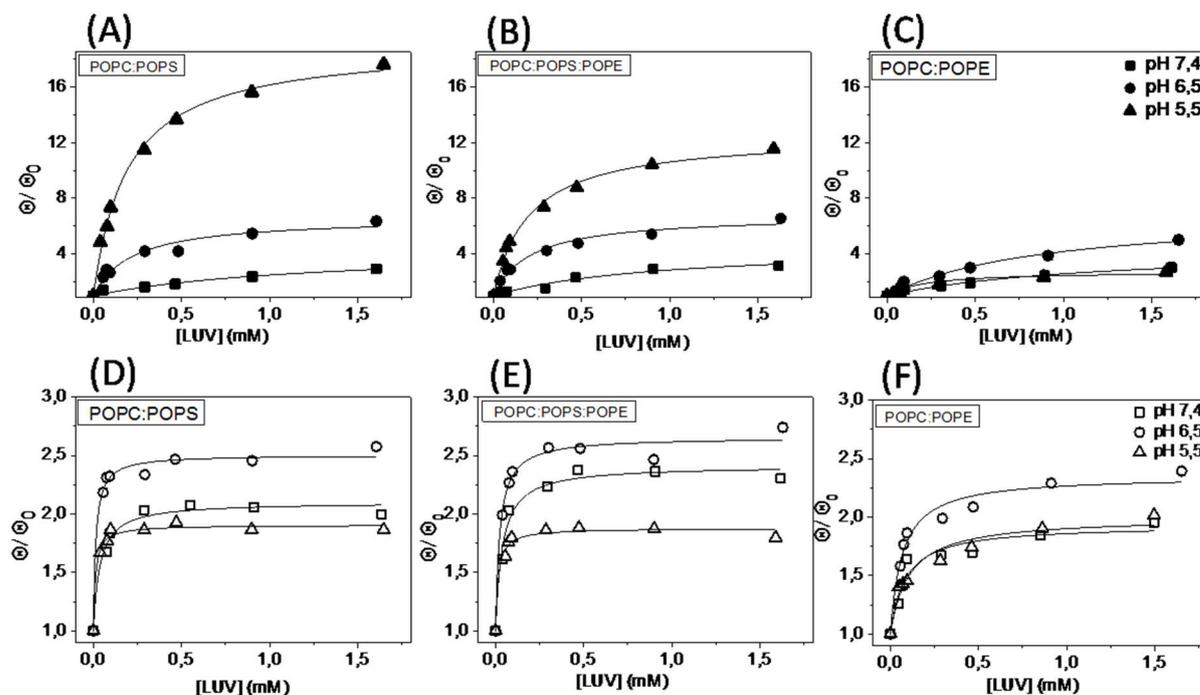
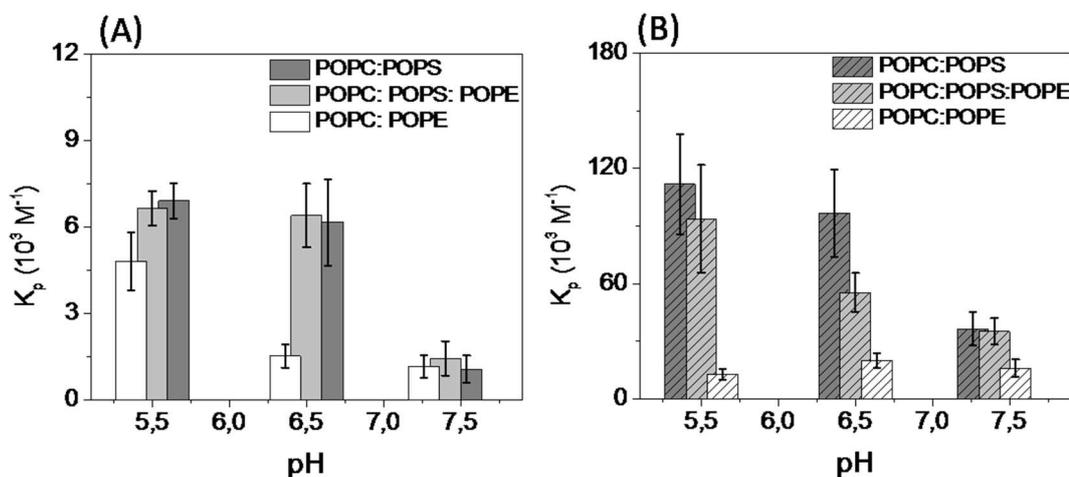


Figura 43 - Constante de partição ($10^3 M^{-1}$) em função do pH, obtidas pelo ajuste dos dados de CD das titulações dos peptídeos (A) H-MP1 e (B) MP1 com vesículas de POPC:POPS (cinza), POPC:POPS:POPE (cinza claro) e POPC:POPE (branco).

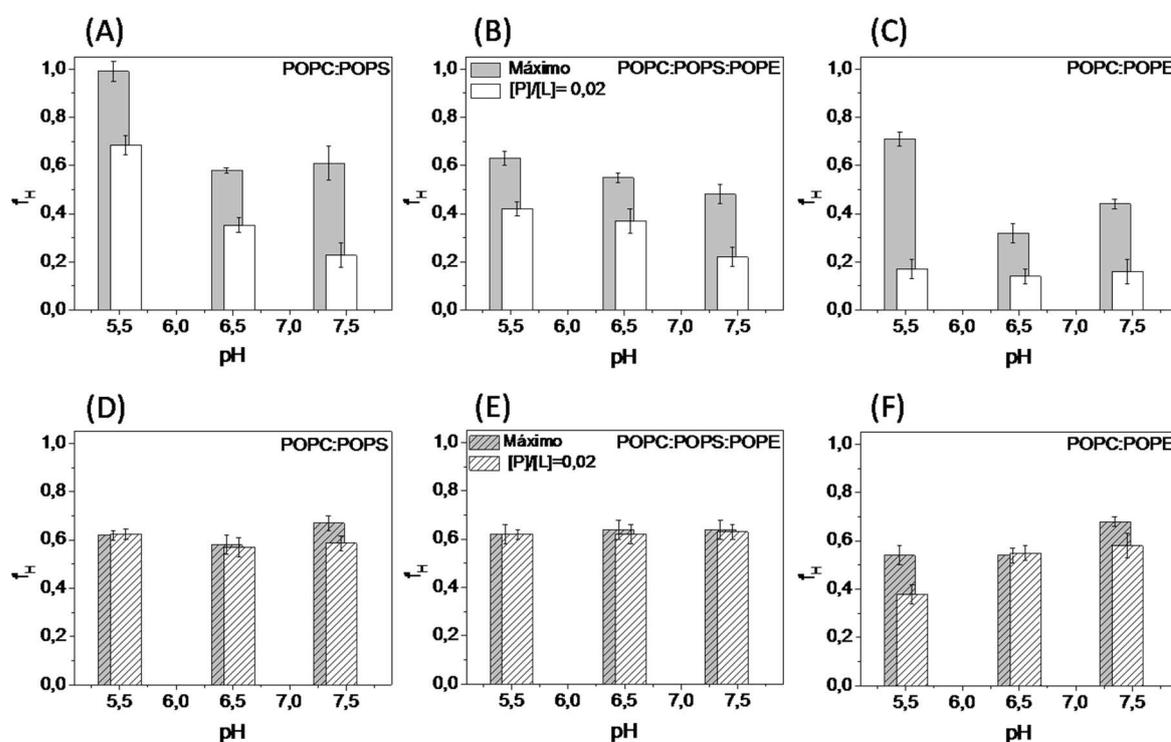


Nas vesículas aniônicas, a constante de partição apresentou tendência de aumentar com a diminuição do pH do meio, entretanto, os valores obtidos com o MP1 foram maiores que os

obtidos com o análogo H-MP1. A maior discrepância ocorreu para LUVs de POPC:POPS onde K_p do MP1 foi cerca de 16 vezes maior em pH 5,5 e 30 vezes maior em pH 7,4 quando comparado com as constantes do H-MP1 nos respectivos pHs. Para essas vesículas aniônicas, a presença do POPE na composição não afetou a partição do peptídeo H-MP1, enquanto foi observada uma ligeira diminuição na partição do peptídeo MP1, principalmente em pH 5,5.

As porcentagens de hélices foram calculadas de duas formas: a partir dos valores de elipticidade molar, no comprimento de onda de 222nm, dos peptídeos na presença de 500 μ M de LUV, ou seja, 250 μ M de lipídios compondo as monocamadas externas das vesículas, e a partir dos parâmetros obtidos dos ajustes dos dados experimentais, considerada neste caso, a máxima fração helicoidal que o peptídeo poderia ter adquirido. Os valores obtidos estão apresentados na Figura 44.

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



O peptídeo MP1, quando em contato com 250 μ M de lipídios, já estava praticamente com o máximo de hélices em todos os casos estudados, exceto na presença de LUV POPC:POPE em

pH 5,5, enquanto o H-MP1, na presença de todas as composições de vesículas e pHs, ainda não tinha sido completamente estruturado em hélice.

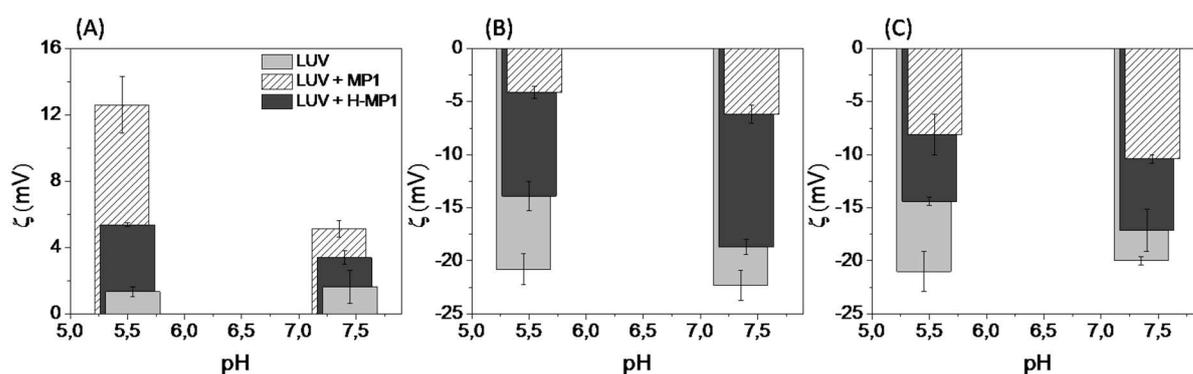
As frações helicoidais máximas do H-MP1 apresentaram tendência de aumentar em pH ácido, alcançando a mesma fração helicoidal que o MP1 em POPC:POPS e POPC:POPS:POPE e valores mais elevados que o MP1 nas outras composições, chegando a atingir quase 100% de hélices em pH 5,5 na presença de LUV de POPC:POPS. Para o MP1 as frações de α -hélices foram aproximadamente iguais a 60% nas vesículas aniônicas e cerca de 10% a menos em vesículas de POPC:POPE.

4.3.2 Potencial zeta

As adsorções dos peptídeos em LUVs POPC:POPS, POPC:POPS:POPE e POPC:POPE foram monitoradas através das medidas de potencial zeta. Neste experimento o potencial zeta foi medido após 3 minutos da adição de 50 μ M de LUV à solução de 5 μ M de peptídeo em 150mM de NaF nos pHs 5,5 e 7,4.

Como apresentado na Figura 45, os valores de potencial zeta das LUVs na presença dos peptídeos variaram para valores mais positivos em relação aos encontrados inicialmente para as vesículas puras, indicando que os peptídeos carregados positivamente foram adsorvidos às bicamadas lipídicas e alteraram a densidade superficial de carga das vesículas. Mesmo em pH 7,4 a variação no potencial zeta devido a adsorção do H-MP1 ocorreu para valores mais positivos, contrariando a previsão de carga realizada para essa condição, porém em concordância com os resultados obtidos nas vesículas de POPC:POPG.

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



Para as LUVs zwitteriônicas, foi observado uma mudança no potencial zeta da mesma ordem de grandeza obtida em vesículas aniônicas. Nas vesículas compostas somente por POPC:POPS a adsorção do MP1 causou uma variação do potencial zeta, em relação a vesícula pura, de aproximadamente 16mV em ambos os pHs. No entanto, a presença do lipídio POPE na composição das LUVs aniônicas, aparentemente, modificou as interações peptídeo/lipídio e a adsorção do MP1 a essas vesículas se tornou ligeiramente dependente do pH, sendo maior em pH 5,5.

O potencial zeta de todas as composições de vesículas na presença do peptídeo H-MP1 foram dependentes do pH, nos quais os valores tornaram-se mais positivos em pH 5,5 do que em pH 7,4. No entanto, mesmo em pH ácido, onde é esperada uma maior carga positiva desse peptídeo, as variações provocadas no potencial zeta foram consideravelmente menores que as obtidas quando na presença de MP1.

O tamanho das vesículas antes e após a interação com os peptídeos foi medido por DLS nas mesmas condições dos experimentos de potencial zeta. Os valores dos raios hidrodinâmicos encontram-se na Tabela 6. Para esses experimentos as vesículas não variaram seu tamanho devido à interação com os peptídeos, não foram destruídas e nem se aglomeram com vesículas vizinhas da solução.

Tabela 6- Raio hidrodinâmico (nm) medidos de 50 μ M LUVs compostas por 9POPC:1POPE, 8POPC:2POPS e 7POPC:2POPS:1POPE na presença de 5 μ M de MP1 e de H-MP1 em solução 150mM NaF nos pHs 5,5 e 7,4.

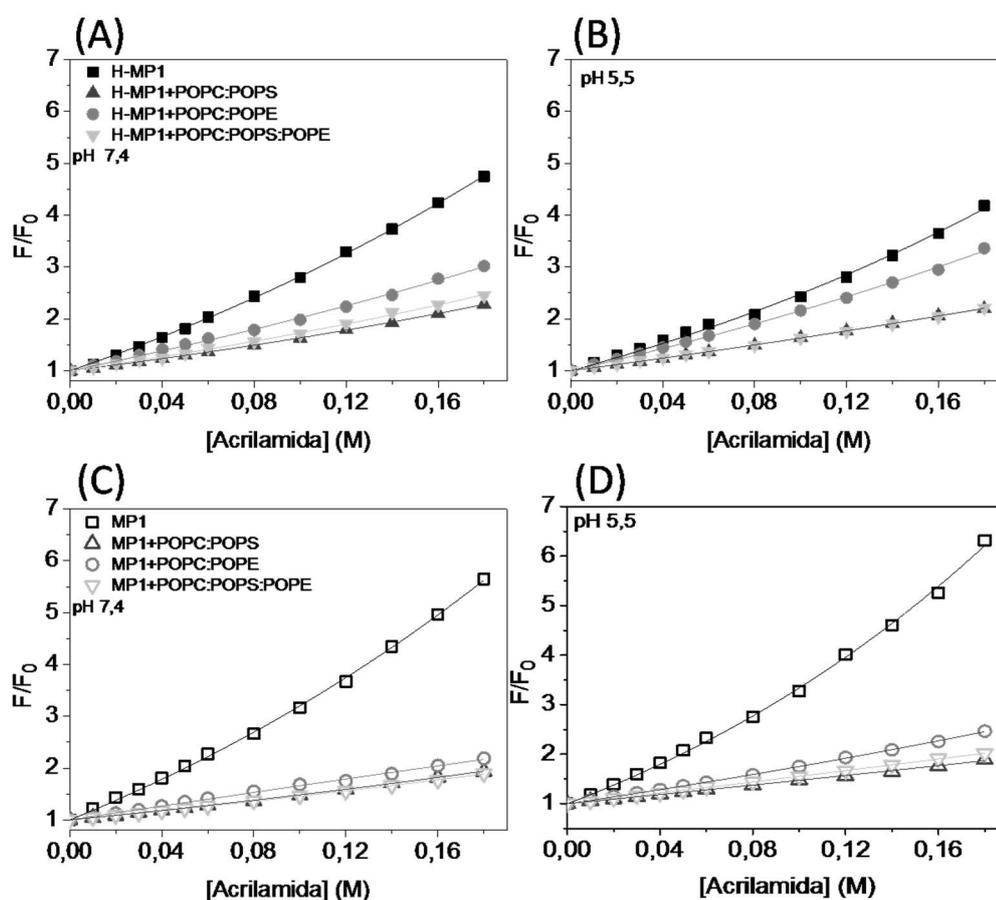
Peptídeo	pH	Composição		
		POPC:POPE	POPC:POPS	POPC:POPS:POPE
MP1	7,4	66,3 \pm 0,6	64,4 \pm 0,1	67,3 \pm 1,2
	5,5	61,6 \pm 0,1	66,1 \pm 1,5	66,8 \pm 0,8
H-MP1	7,4	60,7 \pm 1,8	64,9 \pm 1,7	69,9 \pm 0,9
	5,5	59,2 \pm 0,9	65,6 \pm 1,3	67,6 \pm 1,5

4.3.3 Supressão da emissão de fluorescência do triptofano por acrilamida

Os experimentos de supressão do triptofano por acrilamida também foram realizados com LUVs compostas de POPC:POPS, POPC:POPS:POPE e POPC:POPE, com a finalidade de quantificar a extensão da penetração dos peptídeos na região hidrofóbica da bicamada. A perda

da intensidade de fluorescência foi analisada por meio de gráficos de Stern-Volmer (Figura 46). O ajuste dos valores experimentais foi obtido pela forma não linear (Equação 15), pois esta apresenta um coeficiente de correlação superior ao ajuste linear.

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



Pelo ajuste dos dados experimentais foram obtidas as constantes de Stern Volmer (K_{SV}) para cada um dos peptídeos. Em solução salina, na ausência de meios miméticos, os gráficos apresentam uma supressão máxima da fluorescência por parte da acrilamida, portanto as constantes de Stern-Volmer (K_{SVs}) apresentam valores maiores em comparação às constantes obtidas na presença de LUVs (K_{SVL}), indicando uma redução da acessibilidade da acrilamida aos resíduos de triptofano devido a uma interação entre as cadeias laterais desses resíduos com a porção hidrofóbica do interior da membrana.

Os valores obtidos da relação K_{SVL}/K_{SVS} (Tabela 7) indicaram que os resíduos de triptofano de ambos os peptídeos encontraram-se mais protegidos do supressor em vesículas aniônicas, evidenciando a importância dos lipídios carregados na ligação do peptídeo. Para todas as composições de vesícula o MP1 estava mais enterrado na bicamada lipídica em relação ao análogo. Os resíduos de triptofano do H-MP1 se enterraram mais nas bicamadas de POPC:POPS. No entanto, em todas as composições, para ambos os peptídeos, foram obtidos valores de constante de Stern-Volmer sugerindo que em pH 5,5 a localização dos peptídeos seja mais superficial na bicamada lipídica que em relação ao pH 7,4.

Tabela 7- Relação entre as constantes de supressão de Stern-Volmer de 5 μ M dos peptídeos MP1 e H-MP1 em solução 150mM de NaCl, pH 5,5 e 7,4 (K_{SVS}) e na presença de 500 μ M de LUVs em diferentes composições (K_{SVL}).

	pH	K_{SVL}/K_{SVS}	
		MP1	H-MP1
POPC:POPE	7,4	0,36 \pm 0,02	0,59 \pm 0,04
	5,5	0,38 \pm 0,03	0,82 \pm 0,04
POPC:POPS	7,4	0,23 \pm 0,03	0,36 \pm 0,03
	5,5	0,26 \pm 0,02	0,46 \pm 0,03
POPC:POPS:POPE	7,4	0,22 \pm 0,02	0,41 \pm 0,02
	5,5	0,30 \pm 0,03	0,46 \pm 0,04

4.3.4 Atividade litica

As atividades liticas dos peptídeos H-MP1 e MP1 foram testadas por vazamento do conteúdo de vesículas lipídicas de 8POPC:2POPS, 7POPC:2POPS:1POPE e 9POPC:1POPE, através de medidas dos vazamentos de corantes fluorescentes acompanhados por espectroscopia de fluorescência, no caso de POPC:POPS e de microscopia óptica para todas as composições.

4.3.4.1 Vazamento de LUVs seguida por Fluorimetria

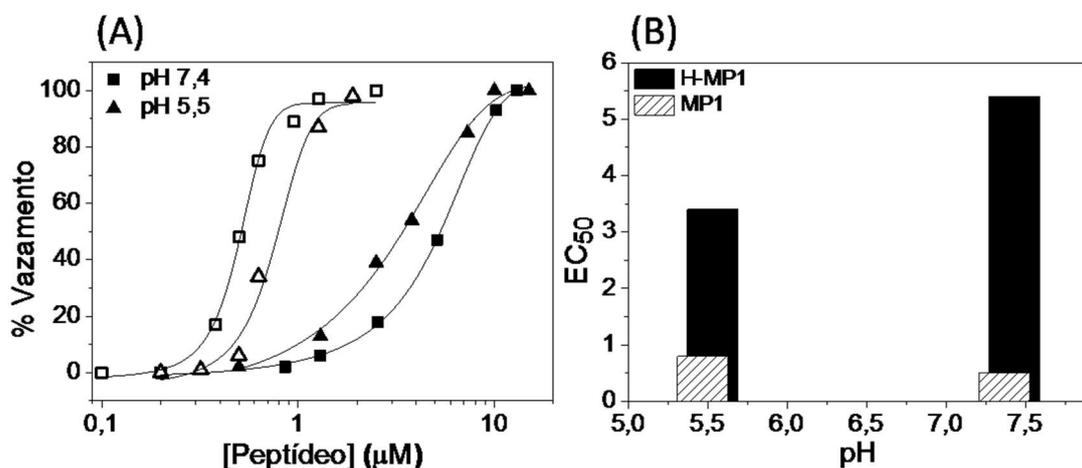
A liberação de corante fluorescente encapsulado nas LUVs de 8POPC:2POPS induzida pelos peptídeos foi monitorada pelo aumento da fluorescência. Na Figura 47A, as curvas dose-

resposta da porcentagem de liberação de calceína como função da concentração de peptídeo, após 10 minutos de ação dos peptídeos, mostraram vazamento completo das LUVs provocado pelos dois peptídeos. Estas curvas são sigmóides e foram ajustadas pela equação sigmóide de Boltzmann.

Para ambos os peptídeos foi observado uma concentração crítica, acima da qual ocorreu um processo intenso de liberação de corante caracterizando um processo cooperativo. Quando o vazamento foi induzido pelo análogo H-MP1 foi observada uma cooperatividade menor em relação ao MP1. Para o vazamento induzido pelo peptídeo MP1, foi possível observar a curva de dose-resposta deslocada para menores concentrações de peptídeos em pH 7,4 do que em pH 5,5. Para o análogo H-MP1, a diferença entre as curvas dose-resposta devido a variação de pH, não foi tão significativa como as obtidas para vesículas formadas por POPC:POPG, e em consequência disso, em pH 5,5, apesar de ser necessárias menores concentrações de H-MP1 para atingir o vazamento completo das LUVs, nessa composição de vesículas o H-MP1 não obteve o mesmo desempenho que o MP1.

Na Figura 47B são mostrados os valores de concentrações de peptídeos necessárias para que ocorra 50% de vazamento do corante das LUVs (EC_{50}). O peptídeo MP1 foi mais eficiente nos dois pHs, com EC_{50} iguais a 0,5 e 0,8 μM nos pHs 7,4 e 5,5, respectivamente. Para o H-MP1 foi obtida uma resposta mais eficiente em meio ácido sendo $EC_{50}=3,4 \mu\text{M}$ e $5,4 \mu\text{M}$ entre os pHs 5,5 e 7,4 respectivamente.

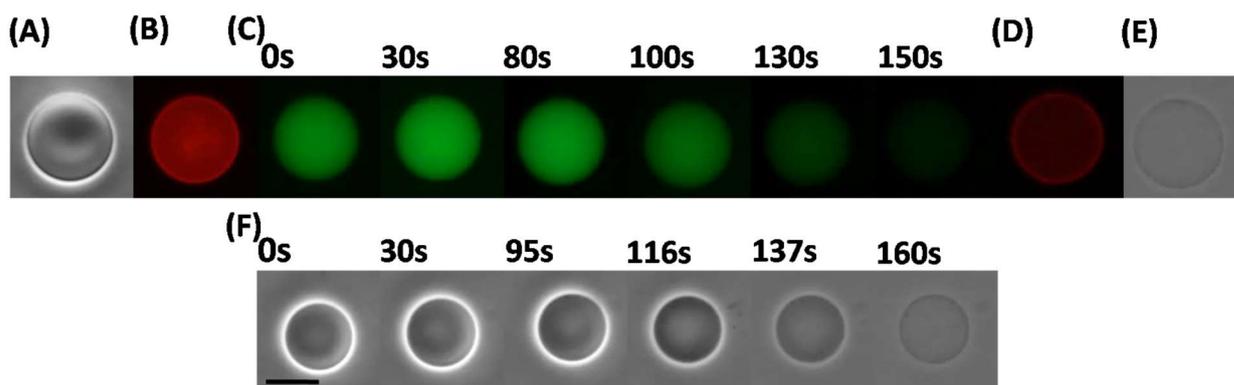
Figura 47 - (A) Curvas de dose-resposta da atividade lítica de H-MP1 (símbolos preenchidos) e MP1 (símbolos abertos) em pH 5,5 e 7,4 na presença de 100 μM de LUVs de POPC:POPG à 25°C, depois de 10 min; (B) Valores de concentração de peptídeo necessária para que ocorra o vazamento de 50% do conteúdo encapsulado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



4.3.4.2 Vazamento de GUV observado por microscopia óptica

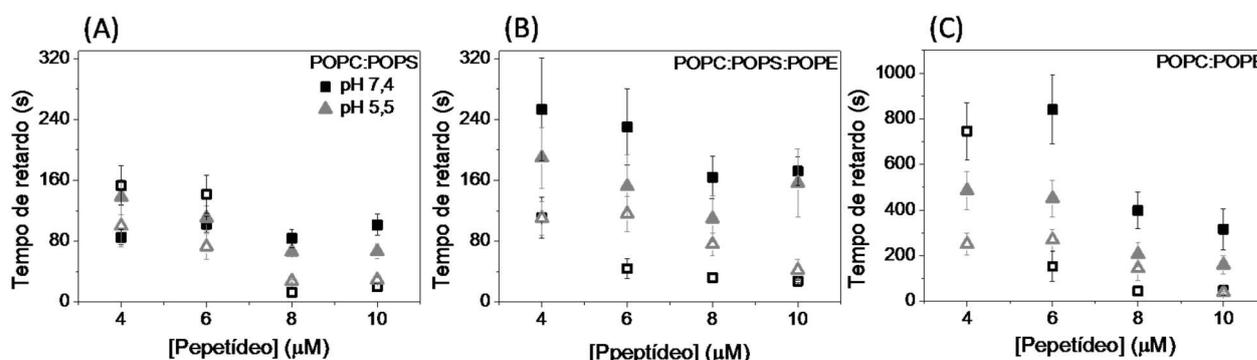
A atividade lítica dos peptídeos foi investigada por observação de GUVs de POPC:POPS, POPC:POPS:POPE e POPC:POPE, pelo método de vesícula única, assim como foi apresentado nos resultados anteriores para GUVs de POPC:POPG. As imagens de fluorescência da GUV antes do início da injeção do peptídeo apresentaram a membrana marcada com rodamina-PE intacta. Por contraste de fase foi observado a vesícula com alto contraste devido a diferença entre os índices de refração da solução encapsulada e a solução do exterior da GUV, **Figura 48A**. Após o início da injeção de peptídeo, tanto a fluorescência do interior da vesícula como o contraste da GUV com o exterior se manteve por tempo na escala de minutos e em um determinado instante (nesse exemplo 80 segundos) iniciou um rápido decréscimo da fluorescência até não ser mais vista a vesícula. As imagens de fluorescência da membrana marcada com rodamina-PE e de contraste de fase confirmaram que a integridade da membrana foi mantida durante a interação. Quando observado outra GUV independente somente pelo modo de contraste de fase, após o tempo onde não foi observada nenhuma modificação na GUV, o contraste foi perdido gradualmente, indicando que houve a liberação da calceína encapsulada e a entrada da solução salina através da bicamada lipídica.

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



O tempo contado desde o início da injeção do peptídeo próximo a GUV até que o processo da transferência da solução encapsulada na GUV através da membrana lipídica começou a ocorrer depende de diversos fatores, como a composição da bicamada lipídica e o peptídeo. Após analisar pelo menos 15 GUVs individuais foi realizada uma média desses tempos, nomeado como tempo de retardo, e os valores obtidos em função da concentração de peptídeo injetado estão apresentados na Figura 49.

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

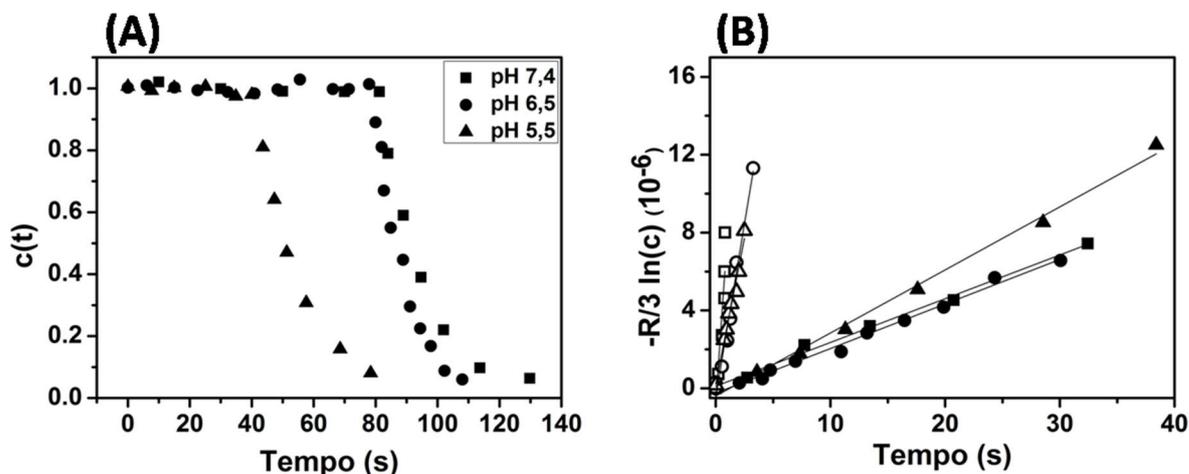


Os menores tempos de retardos foram obtidos na injeção de solução mais concentrada de peptídeo. A indução do vazamento de GUVs que contem POPS foi mais rápida em relação às GUVs zwitteriônicas, indicando que a atração eletrostática seja uma componente importante na etapa inicial da ação do peptídeo. Nas vesículas formadas por POPC:POPS os tempos de retardo medidos nas soluções mais concentradas de peptídeo são maiores para o H-MP1 do que para o MP1. Entretanto, com a redução da concentração dos peptídeos, foi observado um aumento maior no tempo de retardo para o MP1 comparado ao análogo H-MP1, o que levou a tempos iguais se considerado o desvio das médias dos tempos.

Com a adição de POPE na composição da GUV aniônica o tempo de retardo foi maior quando induzido por H-MP1 em todas as concentrações. Enquanto para o MP1, em baixas concentrações, foram observados tempos menores do que os obtidos nas GUVs somente de POPC:POPS, como já havia sido observado em trabalhos anteriores (LEITE *et al.*, 2015). Em relação ao pH da solução não foi observado um comportamento claro devido aos altos desvios associados as médias.

A perda da intensidade de fluorescência da vesícula ou do contraste de fase foi analisado com software IMAGEJ, e por meio da (Equação 17) foi obtida uma relação da concentração de calceína no interior da vesícula em função do tempo decorrido desde o início da injeção de peptídeo. No exemplo apresentado na Figura 50A, foi observado que por certo período de tempo a concentração de calceína dentro da GUV não variou, em seguida ocorreu uma rápida diminuição da concentração de corante encapsulado. Os valores de concentração em relação ao tempo permitiram determinar a influência da composição lipídica e do pH na permeabilidade da membrana, a qual foi calculada pela dependência log-linear da concentração de calceína no interior da GUV com o tempo para H-MP1 e MP1, como no exemplo da Figura 50B.

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

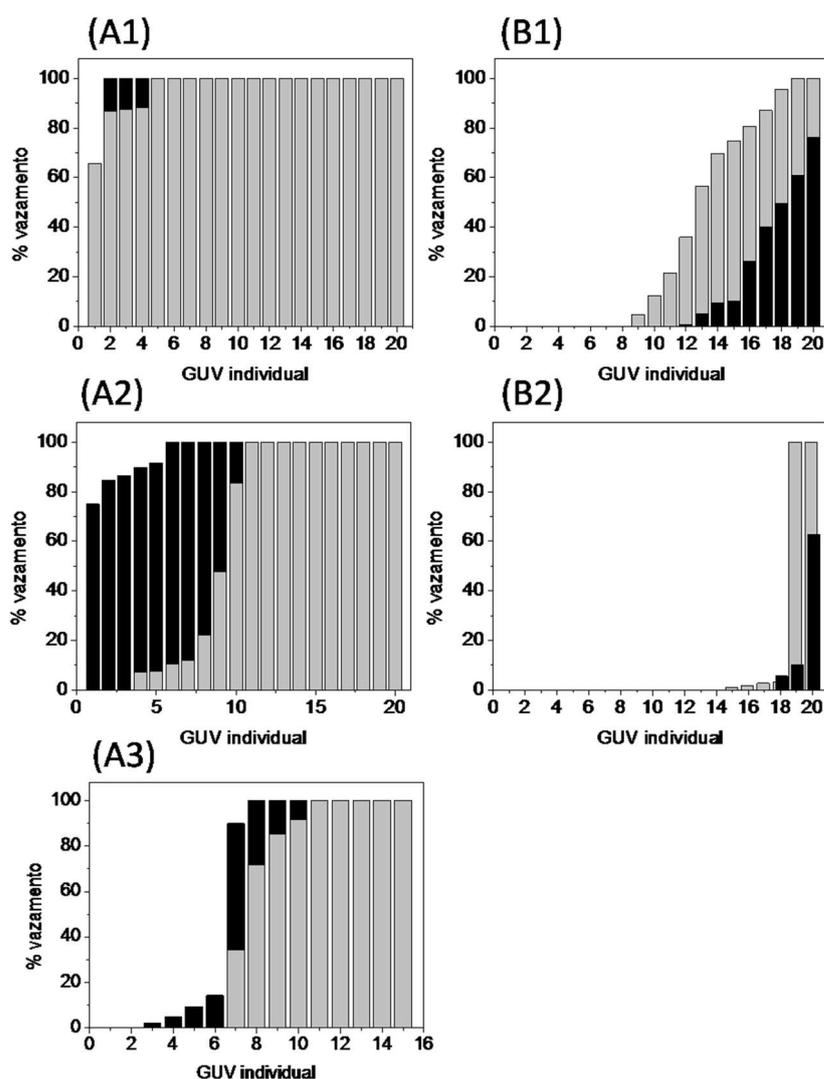


A porcentagem de vazamento da calceína após 50 segundos do início da injeção dos peptídeos para pelo menos 15 vesículas independentes estão apresentadas nos histogramas da Figura 51. Para o peptídeo MP1, na presença da composição zwitterionica POC:POPE, 60% das GUVs analisadas foram totalmente vazadas neste período, em pH 7,4. Na composição POPC:POPS:POPE foi observada dependência do pH para o vazamento, com a diminuição do número de vesículas vazadas no pH 5,5. Uma observação importante foi as vesículas foram

observadas principalmente em duas faixas, ou com pouco vazamento ou proximo de estar completamente vazadas, como já relatado para esse peptídeo (LEITE *et al.*, 2015).

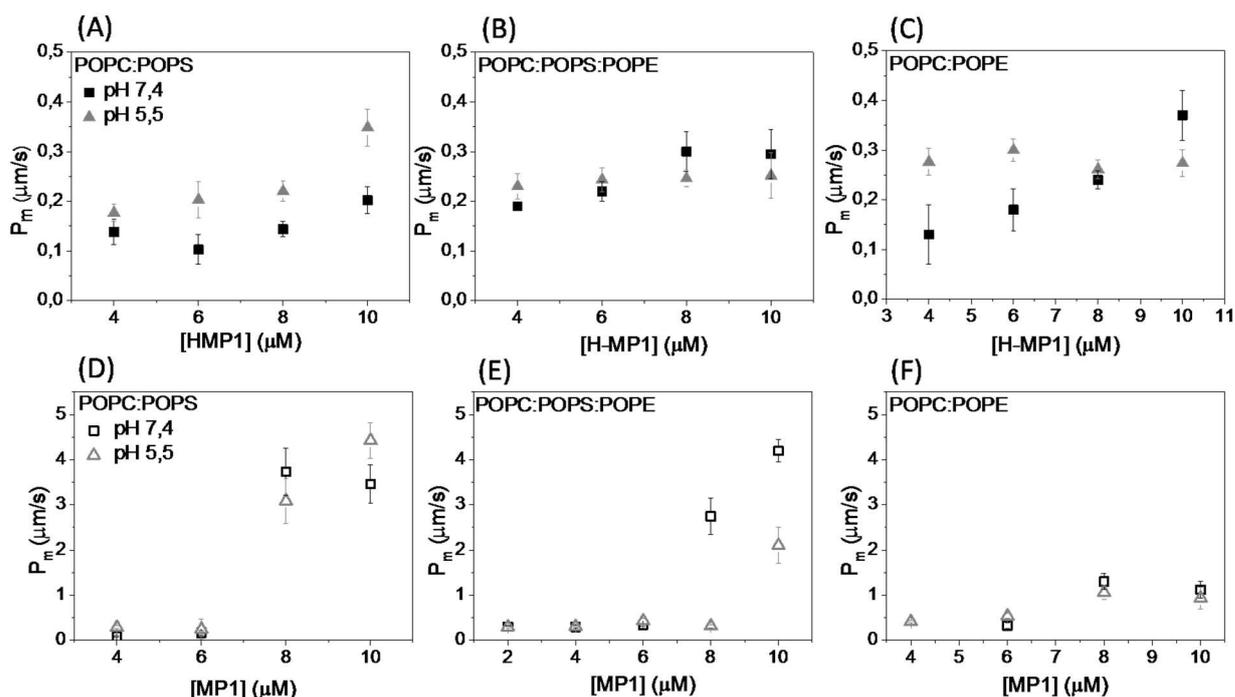
Para o H-MP1, a presença de POPE na composição da GUV pareceu não provocar o mesmo efeito observado para o MP1. Neste caso foi observado maior número de vesículas vazadas na composição de POPC:POPS, indicando uma forte dependencia da atração eletrostática na interação, enquanto nas vesículas zwitterionicas não foi observado nenhuma vesícula com inicio de vazamento nessa faixa de tempo. Em todos os casos o H-MP1 se mostrou mais efetivo no vazamento de vesículas em pH 5,5.

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



Considerando a observação de, no mínimo, 15 GUVs independentes, com raios próximos de $12\mu\text{m}$, foi calculada uma média dos valores obtidos das inclinações das curvas da Figura 50B, obtendo assim, os valores de permeabilidades médias (P_m).

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



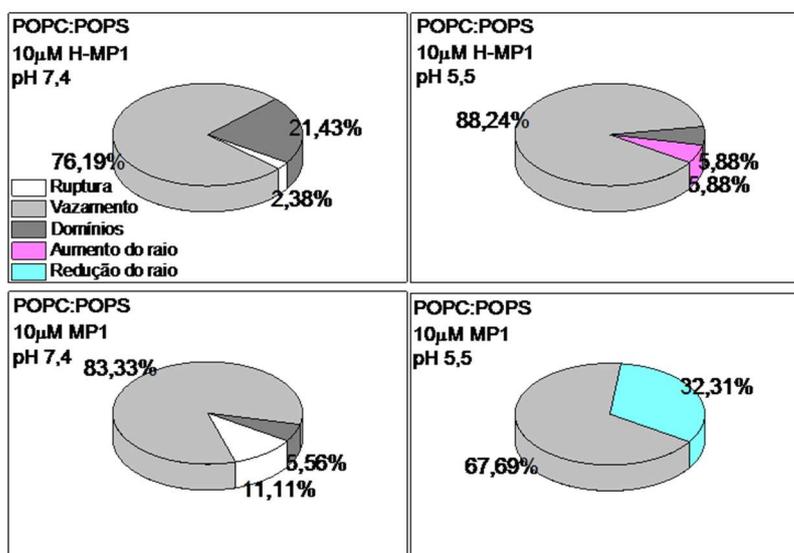
Os valores de permeabilidade média (Figura 52) apresentaram dependência com a concentração de MP1 em todas as composições de vesículas estudadas. Nas concentrações mais altas de MP1 as permeabilidades em vesículas aniônicas foram da ordem de 4 vezes maior em relação as vesículas zwitterônicas, entretanto essa discrepância foi diminuída em concentrações menores do que $6\mu\text{M}$ onde as permeabilidades possuem mesma ordem de grandeza. Quando analisado apenas vesículas de POPC:POPS a permeabilidade induzida pelo MP1 foi indiferente aos pH estudados, no entanto com POPE na composição da GUVs permeabilidades obtidas foram maiores em pH neutro do que em pH 5,5 nas concentrações de 8 e $10\mu\text{M}$ de MP1.

O peptídeo H-MP1 induziu permeabilidades médias menores que o MP1 em todas as composições de GUV. Nas vesículas formadas por POPC:POPS o H-MP1 induz uma permeabilidade maior em pH 5,5 em comparação ao pH 7,4 em todas concentrações experimentadas. No entanto, nas GUVs contendo POPE, no pH 5,5, a P_m foi independente da

concentração do peptídeo, ao contrário do obtido em pH 7,4, onde as permeabilidades são maiores nas condições de injeção de soluções mais concentradas de H-MP1.

Durante a interação entre o peptídeo e a GUV, em alguns casos, em adição à perda do contraste também pode ser observado variações na estrutura da membrana lipídica. Estes casos não foram considerados no cálculo das permeabilidades médias e nos histogramas de vazamento. A proporção em que estes eventos foram observados os diferentes tipos de comportamentos foram contabilizados e estão apresentados na Figura 53, para a GUV POPC:POPS, Figura 54 para POPC:POPS:POPE e Figura 55 para composição POPC:POPE.

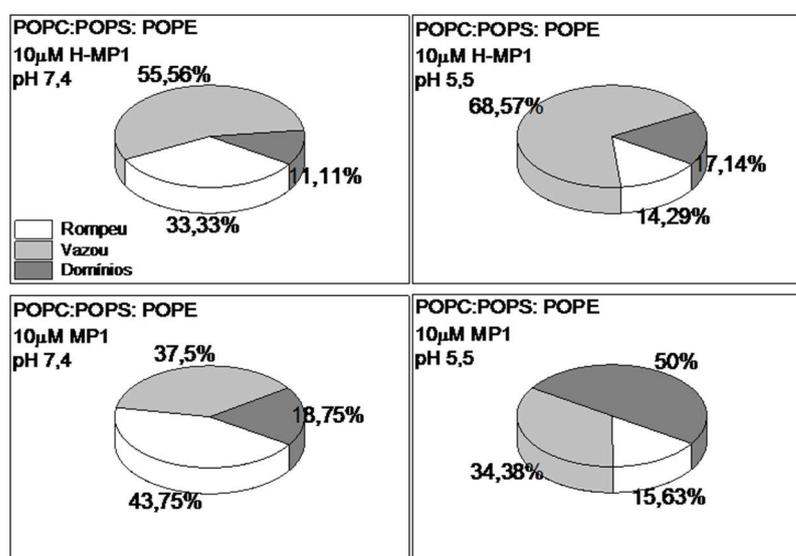
Figura 53 - Porcentagem de modificações observadas nas GUVs durante a interação entre os peptídeos 10 μ M de H-MP1 e 10 μ M de MP1 com vesículas de POPC:POPS em pH 7,4 e 5,5. Porcentagem de GUVs que sofreram a ruptura na bicamada lipídica está representada na cor branca, GUVs tiveram o conteúdo interno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



Para 10 μ M de H-MP1 injetado próximo das GUVs formadas por POPC:POPS em pH 7,4, 21% das vesículas apresentaram formação de domínios na bicamada, ao passo que essa porcentagem diminuiu em pH 5,5, com o aparecimento de vesículas que aumentam seu diâmetro. Oposto a esse comportamento, em pH 5,5 o MP1 induziu a diminuição do diâmetro da GUV,

enquanto em pH 7,4 cerca de 11% das vesículas observadas explodem e se transforma em uma massa amorfa.

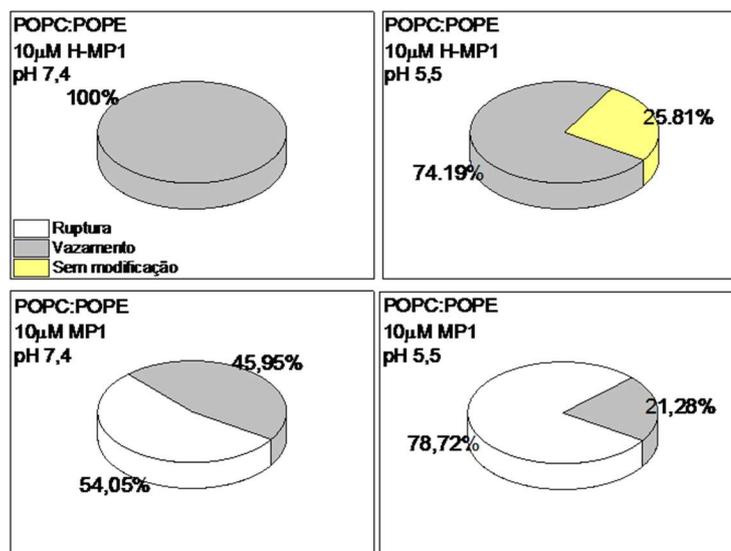
Figura 54 - Porcentagem de modificações observadas nas GUVs durante a interação entre os peptídeos 10 μ M de H-MP1 e 10 μ M de MP1 com vesículas de POPC:POPS:POPE em pH 7,4 e 5,5. Porcentagem de GUVs que sofreram a ruptura na bicamada lipídica está representada na cor branca, GUVs tiveram o conteúdo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



Com a adição de POPE na composição das vesículas aniônicas foi observado um claro aumento na porcentagem de vesículas que explodiram. Para essa composição ambos os peptídeos em pH 5,5 provocaram a explosão de menos vesículas do que em pH 7,4, no entanto foi observado um aumento na quantidade de GUVs com formação de regiões mais densas na em sua membrana.

Cerca de 26% das GUVs zwitteriônicas não possuíram sua estrutura influenciada pelo H-MP1 em pH ácido, enquanto em pH 7,4 todas GUVs visualizadas perderam o conteúdo interno mantendo sua membrana intacta. Nessa composição, oMP1 causou a maior porcentagem de GUVs que explodiram dentre as diferentes composições estudadas, causando a destruição da bicamada de 54% das GUVs em pH neutro e chegando a 79% em pH ácido. Para essa composição não foi visualizada nenhuma formação de domínios na membrana, como já havia sido observado para o MP1 (LEITE *et al.*, 2015).

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



CAPÍTULO 5

5. Discussão

Peptídeos antimicrobianos vêm sendo estudados em busca de alternativas no combate de microorganismos resistentes aos antibióticos convencionais por possuírem especificidade e atividade centrada na membrana lipídica destes organismos (JENSSEN; HAMILL; HANCOCK, 2006). O MP1 é um peptídeo altamente seletivo com atividade bactericida de amplo espectro, sem ser hemolítico e citotóxico (SOUZA *et al.*, 2005). Possui ainda propriedades inibidoras de proliferação de células de câncer em cultura celular devido a afinidade aos fosfolipídios fosfatidilserina e fosfatidiletalona presentes na bicamada das células de câncer (LEITE *et al.*, 2015). Para obter um peptídeo com atividade similar ao MP1 e que responda a pequenas variações do pH do meio, foi sintetizado um peptídeo no qual as lisinas presentes na estrutura primária do MP1 foram substituídas por histidinas, nomeado H-MP1. Este análogo possui pI teórico, ou seja do peptídeo isolado em solução, de aproximadamente 6,8, enquanto o MP1 tem pI teórico próximo de 9,8. Desta maneira na faixa de pH estudada entre 5,5 e o fisiológico de 7,4, espera-se que o análogo tenha carga líquida positiva e próximo de 2 em pH 5,5 e carga líquida muito baixa ou mesmo negativa em pH neutro ou fisiológico.

Considerando que a adsorção do peptídeo catiônico a vesícula aniônica é dirigida prioritariamente por interações eletrostáticas, seria esperado que a adsorção fosse muito baixa ou mesmo inexistente em solução neutra (pH 7,4). A baixa adsorção deveria resultar também em baixa inserção na membrana e consequentemente em baixa atividade lítica. Neste trabalho, foi explorado o efeito conjunto do pH do meio e do potencial eletrostático da membrana bem como da sua composição lipídica, na adsorção e inserção dos peptídeos nas bicamada e na atividade lítica dos peptídeos MP1 e de seu análogo H-MP1 em três valores de pH.

Análises conformacionais obtidas por experimentos de CD indicam que estes peptídeos inicialmente em tampão se encontram em estrutura aleatória. A partição em vesículas lipídicas é acompanhada de mudança conformacional do tipo desordenada para hélice, indicando que o meio hidrofóbico da bicamada lipídica, caracterizado por uma constante dielétrica menor, favorece a formação de pontes hidrogênio na cadeia principal (WHITE; WIMLEY, 1999). Além de que estudos de simulação computacional mostram que a disposição entre os resíduos de lisina e ácido aspártico no MP1 possuem fundamental importância na estabilização da estrutura em hélice através de interações eletrostáticas, com a formação de pontes de hidrogênio entre os ácidos aspárticos e lisinas (DOS SANTOS CABRERA, MARCIA PEREZ *et al.*, 2008). As

histidinas quando desprotonadas reduzem a possibilidade de pontes de hidrogênio com os resíduos ácidos, visto que em pH 7,4 o H-MP1 apresenta menor conteúdo helicoidal do que em pH 5,5.

As medidas de potencial zeta indicam que os peptídeos adsorvem nas vesículas provocando variações na magnitude da carga superficial que levam a valores de potenciais zeta mais positivos. As variações obtidas dependem tanto da composição da membrana como do pH da solução. As maiores variações provocadas pelo H-MP1 foram em pH 5,5, sugerindo que o potencial elétrico da vesícula associado ao pH da solução modulam afinidade do peptídeo, por meio de mudanças no estado de protonação dos grupos básicos em um processo de regulação de cargas, alterando conseqüentemente as interações eletrostáticas peptídeo-bicamada (LUND; JO, 2013).

A histidina é um resíduo fundamental para a função de muitas proteínas. Devido ao pKa da cadeia lateral estar próximo do pH fisiológico, ela é capaz de funcionar tanto como ácido quanto como base em muitas enzimas (HENDERSON, 2017). No entanto, alguns dos valores de pKa para resíduos cruciais em proteínas de membrana tendem a diferir substancialmente dos valores que são observados em solução aquosa devido as propriedades dielétricas do ambiente em que se encontram (EDGCOMB; MURPHY, 2002). O pKa do anel imidazol da cadeia lateral do resíduo de histidina de proteínas solúveis é influenciado pela polaridade do microambiente e sua localização na sequência de aminoácidos (ARMSTRONG; BALDWIN, 1993). Por exemplo, His149 localizada no núcleo hidrofóbico da xilanase tem um pKa menor que 2,3 (PLESNIAK *et al.*, 1996), enquanto His72 da proteína tirosina fosfatase bovina tem um pKa de 9,2, devido a interações eletrostáticas entre o anel imidazol e resíduos carregado negativamente da proteína (TISHMACK *et al.*, 1997). Bechinger, por sua vez, observou uma mudança de pKa na faixa de 4,9 a 6,6 para os resíduos de histidina contidos nos peptídeos LAH₂ e LAH₄ quando incorporados em micelas de detergente (BECHINGER, 1996).

Aparentemente a partição em uma bicamada lipídica tem um efeito semelhante no pKa das histidinas do peptídeo H-MP1, uma vez que o acúmulo dos peptídeos na superfície da membrana modelo, avaliado em medidas de potencial zeta, provocou variação na carga superficial das vesículas associado à presença de resíduos positivamente carregados na cadeia peptídica que diminuem o excesso de carga negativa das LUVs mesmo em pH 7,4.

A adsorção dos peptídeos na monocamada externa das LUVs, investigadas por medidas de espectroscopia de CD da titulação dos dois peptídeos com vesículas foram analisadas por meio de isothermas de Langmuir, nas quais as afinidades foram quantificadas com os cálculos

das constantes de partição, mostraram que na faixa de pH investigado as afinidades dos peptídeos são fortemente dependentes da composição lipídica da membrana e do pH da solução.

A constante de partição do H-MP1 em vesículas de POPC:POPG em pH 7,4 é consideravelmente menor (~3 vezes) do que em pH 5,5, onde o valor obtido para este peptídeo é aproximadamente igual ao obtido para o MP1. Entretanto apesar da tendência de a constante de partição aumentar com a diminuição do pH, em vesículas compostas por POPC:POPS, o MP1 apresentou constante de partição 16 vezes maior que a do H-MP1 em pH 5,5. Ambos os fosfolípidios, PG e PS, possuem, no entanto, uma carga líquida negativa. Enquanto PG, o principal componente das membranas celulares bacterianas, tem apenas uma carga negativa, PS, que é o principal lipídio ácido em membranas de mamíferos, possui duas cargas negativas e uma carga positiva em pH neutro. Ainda não está claro por que existem diferenças tão significativas na interação de peptídeos antimicrobianos com PG e PS. Isso, em parte, pode estar relacionado a diferentes ligações de hidrogênio de ambos os grupos de cabeças, resultando em diferentes densidades de empacotamento (JING *et al.*, 2005).

As características de ligação dos peptídeos às bicamadas que contém PE também podem ser diferentes, pois apesar dos lipídios POPC e POPE serem zwitteriônicos, os dois grupos de cabeça polar têm tamanhos diferentes e PE tem a possibilidade adicional de funcionar como um doador de ligação de hidrogênio (AROURI; DATHE; BLUME, 2009). Como já havia sido relatado para o MP1 em pH fisiológico (LEITE *et al.*, 2015), a presença do PE em vesículas aniônicas provoca uma ligeira diminuição na constante de partição do MP1. Essa diminuição torna-se mais acentuada nos pHs 6,5 e 5,5. Entretanto para o H-MP1, neste caso, não é observada nenhuma variação considerável na constante de partição.

Os experimentos de supressão da fluorescência por acrilamida, quantificados por constantes de Stern-Volmer, indicam que após a partição dos peptídeos a bicamadasos resíduos de Trp são parcialmente protegidos do solvente. As LUVs que contém apenas os fosfolípidios zwitteriônicos, etanolamina e colina, fornecem proteção mais fraca à supressão por acrilamida dos resíduos Trp de ambos os peptídeos. Porém, indicado pelos menores valores entre a razão K_{SVL}/K_{SVS} , em todas as composições e pHs estudados, o MP1 se encontra mais enterrado nas bicamadas que o análogo.

Enquanto o H-MP1 se enterra mais em pH 5,5 do que em pH 7,4 nas bicamadas de POPC:POPG, nas outras composições de vesículas em pH 5,5 os resíduos de tirptofano do H-MP1 se encontram mais superficiais que em pH 7,4. Estudos presentes na literatura relatam uma dependência do estado de protonação e da posição dos resíduos de histidinas presentes nas sequências primárias dos peptídeos com as suas localizações nas bicamadas lipídicas, quando

adsorvidos. Para o peptídeo LH₄ em conformação de hélice, quando as histidinas se encontram protonadas, o peptídeo assume posição alinhada, aproximadamente em paralelo, com a superfície da bicamada. Para valores elevados de pH, as cadeias laterais de histidina não são carregadas, o que causa ao núcleo central do polipeptídeo um caráter muito mais hidrofóbico assumindo posição transmembranar (BECHINGER, 1996). Com a inserção dos resíduos de His na posição 12 ou 14 do peptídeo GWALP23, em pH neutro, as hélices GWALP23-H12 e GWALP23-H14 exibem orientações transmembranar inclinadas nas bicamadas de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC). Sob condições ácidas, quando His12 encontra-se protonada a hélice GWALP23-H12 exibe uma população principal que se move para a superfície da bicamada de DOPC e uma população menor ocupa múltiplos estados transmembranares. Quando a histidina mutada na posição 14 o peptídeo GWALP23-H14 permanece na orientação transmembrana independente do pH (MARTFELD; GREATHOUSE; II, 2016).

Apesar da inibição a inserção mais profunda na bicamada acredita-se que o acúmulo de uma grande quantidade de peptídeos adsorvidos perturbe a bicamada, aumentando a pressão superficial lateral e, conseqüentemente, alterando sua funcionalidade (AROURI; DATHE; BLUME, 2009). A adsorção do peptídeo à membrana pode provocar o vazamento do conteúdo interno da LUV, acompanhado pela recuperação do sinal fluorescência que ocorre devido a liberação do corante encapsulado que pode ocorrer através de canais pequenos formados pela reorganização entre os peptídeos ligados à membrana, ou ser o resultado da desorganização geral da bicamada lipídica induzida pelo peptídeo (CAAVEIRO *et al.*, 1998). Na curva de dose-resposta do vazamento das LUVs de POPC:POPG e POPC:POPS foram observadas dependência sigmoideal entre a porcentagem de vazamento e a concentração de peptídeo, característica de processos cooperativos, com a existência de uma concentração crítica de peptídeo, necessária à indução de vazamento das vesículas. Comportamento semelhante foi observado para outros peptídeos que formam poros toroidais como magainina 2 (MATSUZAKI *et al.*, 1995) e melitina (YANG *et al.*, 2001). Os resultados obtidos por experimentos com LUVs indicam alta atividade lítica induzida pelo MP1, o qual é mais eficiente nas duas composições (POPC:POPG e POPC:POPS) e nos três valores de pH investigados. Para o H-MP1, no entanto, a concentração necessária para que ocorra 50% de vazamento varia significativamente com o pH, com a maior eficiência atingida no pH 5,5 para ambas as composições. Entretanto o EC₅₀ do análogo nas vesículas de POPC:POPS é cerca de 2,8 vezes maior do que em POPC:POPG, enquanto para o MP1 os valores obtidos são aproximadamente iguais nas duas composições.

Nos experimentos de vazamento realizados com uma suspensão de LUVs, cada ponto da curva dose resposta é obtido para muitas vesículas, nas quais parte pode estar intacta, parte pode

ter vazado parcialmente e parte delas ter o seu conteúdo completamente vazado e/ou ter sofrido completa destruição da membrana. Os experimentos de vesículas únicas GUVs são realizados com a injeção constante de peptídeos por meio de uma micropipeta localizada próximo a uma única vesícula e possui a vantagem de poder observar se ocorrem variações nas propriedades físicas e estruturais da vesícula no decorrer da interação (YAMAZAKI, 2008).

Devido à injeção do peptídeo próximo a GUV foi observado um decréscimo da fluorescência e/ou perda do contraste de fase decorrente da liberação do conteúdo da vesícula. O tempo de retardo (lag time), medido entre o início da injeção de peptídeo e o início do efluxo da calceína e/ou da sacarose corresponde ao tempo de difusão do peptídeo próximo à GUV, o tempo de adsorção do peptídeo na membrana, formação da hélice e o tempo para a formação de defeito ou poro para dar início à liberação da solução encapsulada. Os valores médios de tempo de retardo obtidos com a injeção de H-MP1 próximo as GUVs de 7POPC:3POPG em pH 5,5 decresceu de 150s a 20s quando a concentração de peptídeo aumentou de 4 para 10 μM , enquanto que para o MP1 este tempo variou de 180 a 50s, indicando que a formação de poro ou defeito na membrana, como esperado, é dependente da concentração de peptídeo adsorvido na membrana, como observado para a magainina2 na interação com membranas de DOPC:DOPG (TAMBA *et al.*, 2010). Nesse caso, os tempos de retardos foram menores para o análogo do que para o MP1, em bom acordo com os resultados de constante de partição, na qual o valor obtido para o análogo foi aproximadamente 10% maior do que para o MP1, mostrando que a adsorção do peptídeo é um passo limitante na formação do poro/defeito.

No entanto, nas GUV contendo fosfatidilserina (8POPC:2POPS) os valores médios dos tempos de retardo observados para o análogo, quando em solução ácida foram consistentemente maiores (140 a 80 s) do que para MP1 (90 a 50 s) com a concentração de peptídeo aumentando de 4 para 10 μM . A substituição de 10% de PC por PE a esta composição (7POPC:2POPS:1POPE) mostrou a mesma tendência com tempos médios de retardo maiores para o análogo comparado com MP1 em acordo com as constantes de partição nestas duas composições e nos três pHs investigados, onde os valores obtidos são maiores para o MP1 do que para o análogo.

Analisando as GUVs após 50s de injeção de 10 μM de peptídeo, dentre as GUVs que perdem a solução do seu interior sem alterar o tamanho ou explodir, em pH 5,5 o H-MP1 causa o vazamento completo ou o início do vazamento de 90% das GUVs de 7POPC:3POPG, enquanto na composição com POPS apenas 45% das GUVs iniciaram seu vazamento nesse período. Em pH 7,4 essa taxa é consideravelmente menor em ambas as composições. Para o

MP1 neste mesmo tempo praticamente todas as vesículas compostas por 7POPC:3POPG e 8POPC:2POPS tinham vazado completamente o conteúdo interno nestes 50s.

Com a adição de POPE nas vesículas aniônicas a fração de vesículas vazadas por indução do análogo H-MP1 cai para apenas duas dentre as 20 GUVs observadas em pH 5,5 e nenhuma vesícula inicia o vazamento dentro deste tempo em pH 7,4. A quantidade de vesículas vazadas também diminui 20% para MP1 em pH 5,5. Na composição zwitteriônica o MP1 apresenta o vazamento de algumas vesículas enquanto para o H-MP1 é necessário mais tempo para que ocorra o início do vazamento.

A partir dessa análise pode-se calcular a fração de, ou a probabilidade de, encontrar vesículas intactas no tempo t ($P_{\text{intacta}}(t)$). Na figura 56 está representada um exemplo da relação de P_{intacta} em função do tempo decorrido desde o início das injeções de peptídeo. A curva obtida decresce exponencialmente com o tempo e os valores experimentais são bem ajustados pela função de decaimento exponencial definida por: $P_{\text{intacta}}(t) = \exp(-k_p \cdot t)$, onde k_p é uma constante cinética de formação de poro, ou seja, um estágio posterior à adsorção de peptídeo na monocamada externa da GUV e à formação de hélice. Valores de k_p obtidos para os dois peptídeos são resumidos na Tabela 8.

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

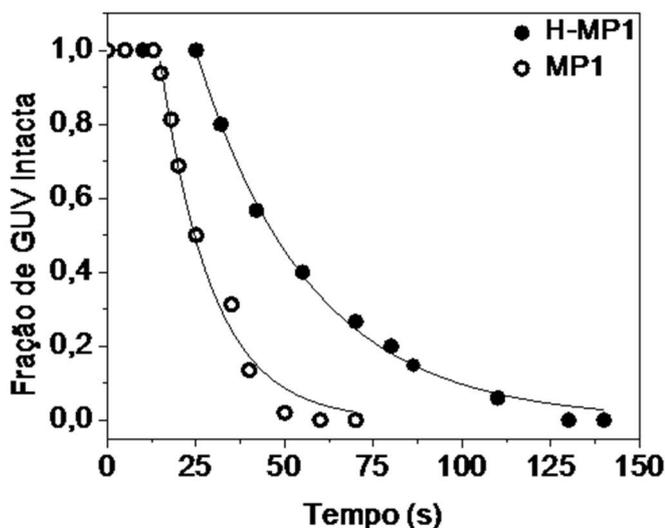


Tabela 8- Constante cinética de formação de poro k_p (s^{-1}) induzidas pelos peptídeos MP1 e HMP1 em GUVs em pH 7,4 e 5,5. Valores médios calculados em conjunto de no mínimo 15 GUVs.

Vesícula	pH	10 μ M MP1	6 μ M MP1	10 μ M H-MP1	6 μ M H-MP1
7POPC:3POPG	7,4	0,034 \pm 0,001	0,0160 \pm 0,0004	0,022 \pm 0,001	0,0055 \pm 0,0003
	5,5	0,054 \pm 0,004	0,0220 \pm 0,0006	0,048 \pm 0,002	0,043 \pm 0,002
8POPC:2POPS	7,4	0,070 \pm 0,009	0,014 \pm 0,002	0,022 \pm 0,003	0,013 \pm 0,002
	5,5	0,068 \pm 0,007	0,023 \pm 0,004	0,027 \pm 0,001	0,016 \pm 0,001
7POPC:2POPS: 1POPE	7,4	0,10 \pm 0,01	0,041 \pm 0,005	0,015 \pm 0,003	0,0036 \pm 0,0004
	5,5	0,035 \pm 0,005	0,017 \pm 0,003	0,021 \pm 0,001	0,013 \pm 0,002
9POPC:1POPE	7,4	0,030 \pm 0,005	0,0046 \pm 0,0001	0,0030 \pm 0,0002	0,0018 \pm 0,0001
	5,5	0,007 \pm 0,001	0,0055 \pm 0,0005	0,0070 \pm 0,0004	0,0020 \pm 0,0007

Os valores de k_p obtidos com 10 μ M de MP1 foram maiores para as vesículas com fosfatidilserina. Enquanto que para o análogo H-MP1 na mesma concentração, esta constante foi maior nas vesículas de POPC:POPG e em pH 5,5 em todas as composições quando comparado ao pH 7,4. Observou-se ainda que os valores de k_p aumentaram com o aumento da concentração de peptídeo injetado e, conseqüentemente, com a fração de peptídeo ligado, em acordo com as reduções nos tempos de retardo obtidos. Os valores obtidos neste estudo estão próximos dos obtidos na formação de poros pelo peptídeo magainina2 em membranas de 6DOPC:4DOPG(TAMBA; YAMAZAKI, 2009). Os valores de k_p nas vesículas de POPC:POPE são da ordem de 3 a 5 vezes menores que nas vesículas aniônicas de POPC:POPS:POPE, indicando que a atração eletrostática é um fator importante ligação dos peptídeos as bicamadas e conseqüente formação de poros nas mesmas, em acordo com os resultados apresentados por Yamazaki, onde obteve que o k_p depende fortemente da densidade superficial de carga da membrana (YAMAZAKI *et al*, 2014).

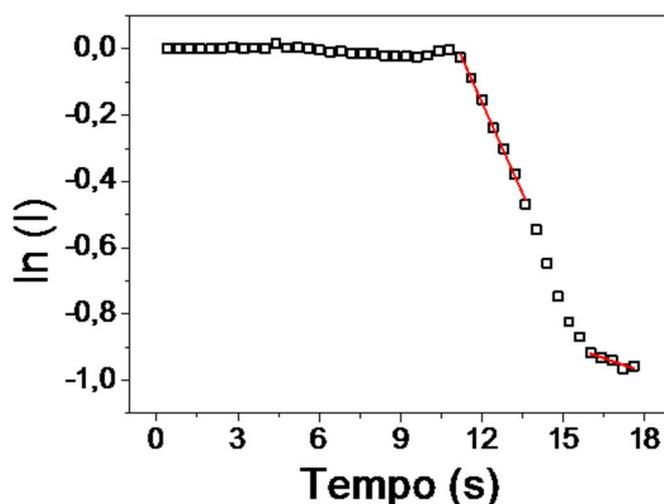
Após a formação dos poros o conteúdo interno das vesículas começa a vazar. A variação da concentração de corante fluorescente dentro da GUV com o decorrer do tempo segue a seguinte relação

$$C^{in}(t) = C_0^{in} \exp(-k_{leak}t)$$

onde $C^{\text{in}}(t)$ e C_0^{in} é a concentração de corante fluorescente dentro da GUV depois de um tempo t e antes do início do vazamento, respectivamente, em mol/m^3 , e k_{leak} é a constante de vazamento do corante, podendo ser usada para avaliar o tamanho e o número de poros provocados na membrana e suas variações temporais (TAMBA *et al.*, 2010).

Experimentalmente, a concentração normalizada da calceína dentro de uma GUV, $C^{\text{in}}(t)/C_0^{\text{in}}$ é aproximadamente proporcional à intensidade de fluorescência da GUV, $I(t)$, ou seja, $C^{\text{in}}(t)/C_0^{\text{in}} = I(t)/I(0)$, onde $I(0)$ é a intensidade de fluorescência da GUV intacta. Então em um gráfico do logaritmo neperiano da intensidade de fluorescência normalizada em função do tempo pode-se obter a constante de vazamento k_{leak} . Um exemplo de um desses gráficos obtidos com nossos dados está na Figura 57.

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



Como pode ser observado na Figura 57 há duas inclinações no gráfico, logo, dois tipos de constante de vazamento: uma constante correspondente ao estágio inicial (k_{leakI}) e uma no estágio final (k_{leakF}). A existência de dois estágios de permeação induzidos pelos peptídeos é um aspecto importante, pois indica que o processo lítico induzido por estes dois peptídeos está compatível com o processo proposto por Yamazaki e cols. (2010 e 2018), ou seja, que estes peptídeos formam poros nas bicamadas lipídicas. Os valores obtidos para essas constantes estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Constantes de vazamento iniciais e finais obtidas pelos ajustes dos gráficos de $\ln(I/I_0)$ em função para as diversas composições de bicamada lipídica com $10 \mu\text{M}$ de peptídeo nos pHs 5,5 e 7,4.

GUV	Peptídeo	pH7,4		pH 5,5	
		k_{leakI}	k_{leakF}	k_{leakI}	k_{leakF}
POPC:POPG	H-MP1	$0,089 \pm 0,024$	$0,006 \pm 0,002$	$0,488 \pm 0,12$	$0,009 \pm 0,002$
	MP1	$0,514 \pm 0,086$	$0,011 \pm 0,004$	$0,209 \pm 0,028$	$0,065 \pm 0,015$
POPC:POPS	H-MP1	$0,029 \pm 0,003$	$0,007 \pm 0,001$	$0,042 \pm 0,010$	-
	MP1	$0,547 \pm 0,089$	-	$0,843 \pm 0,187$	-
POPC:POPS:POPE	H-MP1	$0,078 \pm 0,024$	$0,009 \pm 0,003$	$0,108 \pm 0,035$	-
	MP1	$0,495 \pm 0,142$	$0,011 \pm 0,002$	$0,326 \pm 0,094$	-

Pelos valores obtidos pode-se perceber que a k_{leakI} é sempre maior que k_{leakF} , indicando que o tamanho do poro muda com o tempo, em alguns casos a k_{leakF} não foi observada. Os valores de k_{leakI} são aproximadamente 4 vezes maior que o k_{leakF} quando induzido pelo MP1, enquanto para o análogo essa relação varia segundo a composição da vesícula, chegando a ter k_{leakI} 54 vezes maior que k_{leakF} em POPC:POPG pH 5,5. A partir dos resultados obtidos pode-se levantar a hipótese de que a partição do peptídeo na bicamada provoca instabilidade local devido ao estresse elástico na monocamada externa. Esta instabilidade é então seguida pela abertura de poros que aliviam o estresse e inicia o primeiro estágio de vazamento. Devido a abertura dos poros acontece a passagem de lipídeos (flip-flop) seguido de translocação de um número pequeno de peptídeos para a monocamada interna, resultando em uma tensão positiva na monocamada interna que leva ao fechamento do poro, diminuindo a constante cinética de vazamento.

Após a formação de poros a liberação de calceína induzida pelos peptídeos pode ser quantificada como o cálculo da permeabilidade média (P_m), a qual também é uma constante de taxa, a de liberação de calceína induzida pelos peptídeos. Os valores de P_m das membranas apresentam dependência com a concentração do peptídeo, sendo encontrada que a permeabilidades cresce com as concentrações de peptídeo, possivelmente devido a poros com diâmetros maiores.

Nas GUVs de 7POPC:3POPGa permeabilidade obtida para com a injeção de $10 \mu\text{M}$ de H-MP1 em pH ácido é cerca de 10 vezes maior do que em pH neutro, e aproximadamente igual a permeabilidade induzida pela mesma concentração de MP1. A substituição do lipídio aniônico POPG por POPS acarretou em permeabilidades médias consideravelmente maior com a injeção

de MP1 do que com o análogo H-MP1 (~12 vezes), em pH ácido. Ao mesmo tempo MP1 induz permeabilidade com maior dependência do pH na composição 7POPC:2POPS:1POPE, com permeabilidade duas vezes maior em pH 7,4 do que em pH ácido quando na concentração de 10 μ M de peptídeo. As permeabilidades induzidas pelo análogo (H-MP1) em vesículas aniônicas contendo POPE são da mesma magnitude que as induzidas em vesículas zwitteriônicas.

A comparação dos valores de k_p e P_m obtidos do experimento de GUV única para os dois peptídeos e nas vesículas de 7POPC:3POPG e 8POPC:2POPS e nos dois pHs 7,4 e 5,5 sugere que além da carga da vesícula outros fatores devem desempenhar papel importante. Nas membranas compostas por 8POPC:2POPS foi observado que os valores de k_p obtidos para o 10 μ M de MP1 não dependem do pH enquanto os valores de P_m foram ~30% maiores em meio ácido e estes dois parâmetros foram maiores do que os medidos na composição 7POPC:3POPG, mesmo com a maior fração de lipídio aniônico. A adição de POPE na membrana (7POPC:2POPS:1POPE), resultou em ligeiro aumento de k_p para o MP1 (~10%) em pH neutro e redução significativa em pH 5,5 (~50%), enquanto que para o análogo a adição de PE resultou em decréscimo desta constante nos dois pHs.

Além da perda do conteúdo interno das GUVs, foram visualizadas em alguns casos, modificações estruturais na bicamada, tais como formação de regiões densas na membrana, redução no raio vesicular durante o vazamento e rompimento da vesícula acompanhada de formação de massa amorfa peptídeo/lipídio. As formações de regiões densas ocorreram concomitantes ao vazamento do conteúdo interno. Estas regiões são provavelmente constituídas de peptídeos prensados ligando bicamadas justapostas. Em alguns casos a extensão da sobreposição acaba causando a diminuição no tamanho da vesícula. A formação dessas regiões densas já havia sido observada para o peptídeo MP1 (CABRERA. *et al.*, 2011), e também com outros peptídeos antimicrobianos, como gomesina (DOMINGUES; RISKE; MIRANDA, 2010) e o BP100 (MANZINI *et al.*, 2014).

Deve ser notado que estes eventos não ocorreram em todas as condições avaliadas. Ruptura, formação de regiões densas e redução de raio vesicular, foram induzidas por MP1 na composição 7POPC:3POPG nos dois pHs. Enquanto nesta mesma composição o análogo induziu a formação de regiões densas em 10% das vesículas em pH 7,4 e em pH 5,5 14% das GUVs observadas explodiram e em outras 17% foram observadas regiões densas. Já nas vesículas de 8POPC:POPS em pH ácido nenhuma vesícula sofreu ruptura da membrana, porém o H-MP1 causou o aumento do raio em aproximadamente 6% das GUVs observadas enquanto 32% diminuiram o raio na presença do MP1.

Enquanto a liberação gradual de conteúdo interno é uma consequência da perturbação da membrana por um pequeno número de moléculas peptídicas, a perda essencialmente instantânea dos conteúdos internos, sob condições de alta concentração peptídeo ligado na bicamada, aumenta a probabilidade de ocorrer uma ruptura da membrana. Como observado em maiores proporções sob maiores concentrações de peptídeo, é razoável que uma das causas da explosão da vesícula (vesicleburst) possa, possivelmente, ser devido a um grande excesso de peptídeo ligado as vesículas, induzindo tensões de curvatura muito alta, resultando assim, na explosão da vesícula, assim como observado para o BP100 (MANZINI *et al.*, 2014).

Entretanto, nem sempre somente o acúmulo de peptídeos na membrana é a causa da explosão da vesícula. É interessante notar que em vesículas aniônicas contendo 10% de fosfatidiletanolamina os dois peptídeos provocaram ruptura em fração grande de GUVs em pH fisiológico (MP1 ~44% e HMP1 ~33%) estas frações diminuíram para cerca de 15% em meio ácido para os dois peptídeos. E nas GUVs de 9POPC:1POPE o MP1 a 10 μ M provoca a explosão da membrana de cerca de 50% das vesículas em pH 7,4 e 79% em pH 5,5. Nesses casos o aumento de ruptura pode estar relacionado à geometria da fosfatidiletanolamina, com tendência em formar curvatura negativa, aumentando a tensão elástica na monocamada externa sem que seja compensada pela monocamada interna levando à ruptura ou explosão da vesícula.

Portanto, foi observado que o H-MP1 sofre uma modulação da sua carga líquida, sendo mais efetivo sob condições de pH ácido em todas as composições de vesículas estudadas. É provável que a estrutura da cabeça polar do PS e a distribuição de grupos ionizáveis do peptídeo devido à substituição de todas as lisinas, tenham desfavorecido a afinidade do análogo em relação ao MP1, uma vez que o MP1 manteve sua eficiência nas vesículas com 20% de POPS mesmo com um potencial eletrostático reduzido em relação às com 30% de POPG, indicando que além da componente eletrostática outros fatores são importantes para a interação. A preferência dos peptídeos antimicrobianos entre os lipídios PS e PG ainda não é bem compreendida. Enquanto alguns peptídeos como a melitina se ligam e internalizam mais eficientemente quando a bicamada continha PS, em vez de PG (MONETTE; LAFLEUR, 1995). Outro como o peptídeo antimicrobiano magainina2 é mais efetivo em induzir vazamento em vesículas com PG em sua composição do que PS, sugerindo que a carga da membrana não é o único fator a determinar a permeabilização (MATSUZAKI *et al.*, 1998).

Apesar de uma menor eficiência frente ao lipídio POPS o análogo se torna mais efetivo em pH ácido que em pH neutro. Essa seletividade ao pH que pode proporcionar uma nova estratégia para o tratamento de tumores sólidos em ambientes extracelulares de baixo pH que ocorrem naturalmente. Yechiel Shai observou em estudos de tratamento de carcinoma de

próstata em ratos que a substituição das lisinas do peptídeo [D]- K₆L₉ por histidinas torna o peptídeo mais seletivo em relação pH e reduz a toxicidade sistêmica em comparação com o peptídeo contendo as lisinas (MAKOVITZKI; FINK; SHAI, 2009).

CAPÍTULO 6

6. Conclusões

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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