

ESTUDO DOS EFEITOS DE CARGA E DA HIDROFOBICIDADE NA INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E MEMBRANAS MODELO

LAIANA CRISTINA DA COSTA

Orientador: Prof. Dr. João Ruggiero Neto

Co-Orientador: Prof^a. Dra. Marcia Perez dos Santos Cabrera

São José do Rio Preto
2010

LAIANA CRISTINA DA COSTA

ESTUDO DOS EFEITOS DE CARGA E DA HIDROFOBICIDADE NA INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E MEMBRANAS MODELO

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular, área de Biofísica Molecular junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biologia, Letras e Ciências Exatas da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Ruggiero Neto
Professor Assistente Doutor
UNESP- São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Bibiana Monson de Souza
Professor Doutor
UNESP- Rio Claro

Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey
Professor Assistente Doutor
UNESP- São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 24 de agosto de 2010.

Costa, Laiana Cristina.

Estudo dos efeitos de carga e da hidrofobicidade na interação de peptídeos antimicrobianos e membranas modelo / Laiana Cristina da Costa. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2010.
60 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: João Ruggiero Neto

Co-orientador: Marcia Perez dos Santos Cabrera

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica. 2. Biologia molecular. 3. Peptídios. 4. Lipossomos.
I. Ruggiero Neto, João. II. Dos Santos Cabrera, Marcia Perez. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.32

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto – UNESP

Lista de Publicações Originais

Índice de Figuras

Índice de Tabelas

Abreviações

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1 Materiais.....	8
3.2 Métodos.....	8
3.2.1 Preparação de tampões.....	8
3.3 Preparação de vesículas	9
3.3.1 Preparação de vesículas unilamelares, pequenas (SUVs)	9
3.3.2 Preparação de vesículas unilamelares, grandes (LUVs).....	10
3.4 Dicroísmo Circular (CD).....	10
3.5 Vazamento de vesículas por fluorimetria	12
3.6 Potencial Zeta	13
3.6.1 Medidas de Potencial Zeta	13
3.6.2 Medidas de diâmetro médio das vesículas	17
3.8 Experimento de Anisotropia de Fluorescência de DPH.....	18
3.9 Experimento de Supressão de Emissão de Fluorescência de Triptofano por Acrilamida.....	19
4. RESULTADOS	21
4.1 Análise Conformacional por Dicroísmo Circular	23
4.2 Atividade Lítica em Vesículas por Fluorimetria	25
4.3 Potencial Zeta	30
4.4 Medidas de diâmetro médio das vesículas.....	36
4.5 Titulações Fluorimétricas.....	38
4.6 Experimento de Anisotropia de Fluorescência de DPH.....	41
4.7 Experimento de Supressão de Emissão de Fluorescência de Triptofano por Acrilamida.....	43
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
7. AGRADECIMENTOS	55
8. REFERÊNCIAS	56
PUBLICAÇÕES ORIGINAIS	

Lista de Publicações Originais

- I. Dos Santos Cabrera, M. P., Arcisio-Miranda, M., Costa, L. C., Souza, B. M., Costa, S. T. B., Palma, M. S., Ruggiero Neto, J., Procopio, J. (2009) Interactions of mast cell degranulating peptides with model membranes: A comparative biophysical study. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 486, 1-11.
- II. Leite, N. B., Costa, L. C., Alvares, D. S., dos Santos Cabrera, M. P., Souza, B. M., Palma, M. S., Ruggiero Neto, J. (2010) The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy. *Amino Acids* DOI 10.1007/s00726-010-0511-9.

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Representação esquemática dos modelos propostos para o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos helicoidais (Brogden, 2005).....	4
2	Cubetas usadas no experimento de potencial zeta.....	14
3	Projeção helicoidal dos peptídeos.....	22
4	Espectros de CD dos quatro peptídeos a 20µM, 25°C em diversos ambientes.....	24
5	Cinética de vazamento de vesículas PC e PCPG, a 100µM, causado pela interação com Polybia-MP3, a 25°C.....	26
6	Cinética de vazamento de vesículas PC e PCPG, a 100µM, causado pela interação com Polybia-MP2, a 25°C.....	27
7	Cinética de vazamento de vesículas PC e PCPG, a 100µM, causado pela interação com Protonectarina-MP, a 25°C.....	28
8	Cinética de vazamento de vesículas PC e PCPG, a 100µM, causado pela interação com Parapolybia-MP, a 25°C.....	29
9	Medidas de potencial zeta de vesículas PC e PCPG interagindo com os quatro peptídeos em estudo.....	31
10	Comparação do potencial zeta teórico e experimental de vesículas PC e PCPG interagindo com Protonectarina-MP.....	33
11	Histograma de distribuição de tamanho da solução LUV PC.....	36
12	Histograma de distribuição de tamanho da solução LUV PCPG.....	37
13	Diâmetro médio das vesículas PC e PCPG, 100µM, em função da concentração de peptídeo.....	37
14	Espectros de emissão de fluorescência do Polybia-MP3 em tampão e diferentes concentrações de vesícula PC.....	38

15	Isotermas de ligação para os quatro peptídeos em vesícula PC.....	40
16	Anisotropia de fluorescência do DPH em vesículas PC e PCPG interagindo com os quatro peptídeos.....	42
17	Supressão de fluorescência do Trp por acrilamida.....	44

ÍNDICE DE TABELAS

1	Sequência primária, carga líquida e hidrofobicidade dos peptídeos estudados.....	21
2	Propriedades estruturais dos peptídeos.....	25
3	Valores de razão molar crítica P/L e EC ₅₀ de vazamento para os quatro peptídeos em vesículas PC e PCPG.....	29
4	Valores de C_p , C_M , X_b , C_f , K_{ap} , potencial zeta experimental, carga efetiva do peptídeo e densidade superficial de cargas para o Protonectarina-MP em vesícula PC.....	34
5	Valores de C_p , C_M , X_b , C_f , K_{ap} , potencial zeta experimental, carga efetiva do peptídeo e densidade superficial de cargas para o Protonectarina-MP em vesícula PCPG.....	35
6	Constante de adsorção calculado a partir das isotermas do potencial zeta para os quatros peptídeos em vesículas PC e PCPG.....	35
7	Constante de adsorção calculado a partir das isotermas de ligação X_b vs c_f , em bicamadas zwitteriônicas.....	41
8	Razão entre as constantes de Stern-Volmer em vesículas e em tampão.....	45
9	Características estruturais e atividade biológica dos peptídeos.....	49
10	Comparação das energias de contribuição para os peptídeos em estudo em interação com vesículas aniônicas.....	51
11	Valores de X_b calculado através das constantes de adsorção obtida no experimento de potencial zeta.....	52

ABREVIATÓES

PC – fosfatidilcolina

PG – fosfatidilglicerol

PCPG – vesícula composta por 70% PC e 30% PG, mol/mol

CF – carboxifluoresceína

DPH - difenilhexatrieno

f_H – fração helicoidal

ζ - potencial zeta

K_{ap} – constante aparente de ligação

X_b - fração de peptídeos associados por total de lipídeo

z_p – carga efetiva

Q – carga líquida teórica

c_p – concentração total de peptídeos

c_L – concentração de lipídeo total

c_f – concentração de peptídeo livre

r – anisotropia de fluorescência

K_{SV} – constante de Stern-Volmer

H – hidrofobicidade média

CD – dicroísmo circular

P/L – razão molar entre as concentrações de peptídeo e lipídeo

CIM – concentração inibitória mínima

RESUMO

Mastoparanos são uma família de peptídeos líticos, extraídos do saco de veneno de vespas sociais, que apresentam moderada a intensa atividade antimicrobiana e alguns são hemolíticos e citotóxicos. Embora o mecanismo de ação destes peptídeos não seja bem compreendido ainda, aceita-se que envolva desestabilização da fase lipídica da membrana celular. Acredita-se que a carga líquida do peptídeo e sua hidrofobicidade média contribuam na modulação da atividade lítica e na seletividade. Nesta dissertação apresentamos um estudo de quatro peptídeos mastoparanos que possuem resíduos ácidos e básicos resultando em uma carga elétrica líquida variando de +1 a +4. Este estudo envolve a análise conformacional destes peptídeos em vesículas zwitteriônicas e aniônicas por dicróismo circular. Suas atividades líticas foram avaliadas usando espectroscopia de fluorescência monitorando a recuperação da intensidade de fluorescência devido à liberação de marcador fluorescente encapsulado em vesículas. As constantes de partição destes peptídeos em vesículas zwitteriônicas foram também determinadas por espectroscopia de fluorescência usando um método de análise que é independente de modelo. Com o objetivo de entender a influência de resíduos ácidos e a carga líquida dos peptídeos e sua hidrofobicidade na interação peptídeo-lipídio, foram estimadas as contribuições energéticas eletrostáticas e não eletrostática. Para alcançar este objetivo, os resultados obtidos nas isotermas de ligação por fluorescência foram associados com medidas de potencial zeta. Foi observado que a afinidade destes peptídeos em vesículas zwitteriônicas decresce com a carga líquida do peptídeo e as curvas de dose-resposta são mais cooperativas para os dois peptídeos com as cargas mais baixas. Os peptídeos com maior carga apresentaram uma maior afinidade e atividade lítica em vesículas aniônicas. Os peptídeos mais carregados mostraram maior seletividade para as vesículas estudadas. O presente trabalho também mostra que os resíduos ácidos têm influência no conteúdo helicoidal destes peptídeos. Os valores das contribuições energéticas indicam que a interação destes peptídeos com membranas modelo é dirigida pela interação hidrofóbica nas duas vesículas.

ABSTRACT

Mastoparans are a family of lytic peptides extracted from the venom sac of wasps which present moderate to intense antimicrobial activity and some of them are hemolytic and cytotoxic. Although the mechanism of action of these peptides are still not completely understood, it is accepted that it involves the destabilization of the lipidic phase of the cell membrane. It is believed that both the peptide net electrical charge and its mean hydrophobicity contribute to modulate their lytic activity and selectivity. In this dissertation we present a study of four mastoparan peptides which have acidic and basic residues resulting in net electrical charges ranging from +1 to +4. This study involves the conformational analysis of these peptides in zwitterionic and anionic lipid vesicles by circular dichroism. Their lytic activities were evaluated using fluorescence spectroscopy by the release of fluorescent dye entrapped in these two types of vesicles. The partition constants of these peptides to zwitterionic vesicles were also determined by fluorescence spectroscopy using a method of analysis which is model independent. Aiming to understand the influence of acidic residues and of the peptides net charge and hydrophobicity on the peptide-lipid interaction, the electrostatic and non electrostatic energetic contributions were estimated. To achieve this goal it was used the association of the results of fluorescence binding isotherms and zeta potential measurements. It was observed that the affinity and lytic activity of these peptides in zwitterionic vesicles decrease with the peptides net electrical charges and the dose-response curves are more cooperative for the two peptides with lower net charges. The more charged peptides exhibit higher affinity and lytic activity in anionic vesicles. The most charged peptide displayed the higher selectivity for the vesicles studied. The present work also shows that the acidic residues have influence on the helical content of these peptides. The values of the energetic contributions indicate that the interaction of these peptides with model membrane is driven by the hydrophobic interaction in both vesicles.

1. INTRODUÇÃO

Peptídeos antimicrobianos participam do sistema imunológico inato, desde plantas até mamíferos (Zasloff, 2002), inclusive de respostas inflamatórias (Hancock & Diamond, 2000), promovem a cicatrização, possuem ação antiparasita, anti-câncer e antivírus com envelopes (Powers & Hancock, 2003). Apresentam efeitos colaterais limitados (Brogden et al., 2003) e não induzem resistência facilmente (Zasloff, 2002).

Os venenos de vespas são altamente tóxicos e ricos em enzimas, toxinas e peptídeos biologicamente ativos, responsáveis por dores prolongadas, edema, reações alérgicas e sistêmicas (Daher et al., 2003). Em geral os componentes dos venenos podem agir contra os sistemas cardiovascular, nervoso e imunológico (Triggiani et al., 2000). A reação local também pode ser resultado da ação de peptídeos antimicrobianos, tais como os mastoparanos (Monteiro et al., 2009). O conhecimento da composição dos venenos e estrutura dos alérgenos é um pré-requisito para o diagnóstico e tratamento das alergias provocadas pelo veneno destes insetos (Bilo et al., 2005). Os componentes do veneno de vespa têm sido extensivamente estudados, com o intuito de produzir peptídeos com função de agentes terapêuticos.

Os mastoparanos são tetradecapeptídeos com o terminal-C amidado, possuem três ou quatro resíduos básicos e são ricos em aminoácidos hidrofóbicos ou apolares. Estes peptídeos apresentam amplo espectro de atividade biológica, incluindo atividade antimicrobiana (Hancock et al., 1995), hemolítica, regulação da proteína G e estimulação de fosfolipases (Wakamatsu et al., 1992). A classe dos mastoparanos foi assim denominada devido ao seu primeiro alvo reconhecido, os mastócitos. Estes e os basófilos são parte do sistema imunológico e responsável pelas reações alérgicas (Ivanova et al., 2001; Triggiani et al., 2000).

Em geral, estes peptídeos apresentam uma estrutura predominantemente na forma aleatória quando em solução aquosa, enquanto assumem uma conformação helicoidal anfipática quando interagem com ambientes também anfipáticos, como por exemplo, TFE, micelas de surfactantes e vesículas lipídicas. A hélice- α é termodinamicamente favorecida em ambientes de membrana, pois permite a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares entre os grupos amida e carbonila da cadeia

peptídica. Além disso, promove interações de van der Waals favoráveis entre as cadeias laterais da hélice- α e os fosfolípídeos das membranas (Deber & Li, 1995).

Mastoparanos e muitos outros peptídeos podem interagir com membranas fosfolipídicas, independentemente de receptores específicos, de um modo rápido e dependente da concentração. Essa interação é baseada em efeitos eletrostáticos e/ou em interações hidrofóbicas. Estes peptídeos são responsáveis pela formação de canais de íons em membranas lipídicas, conduzindo a lise celular (Pfeiffer et al., 1995) e também são conhecidos por aumentar a permeabilidade de íons e pequenas moléculas através da membrana biológica por formação de poros a baixas concentrações de peptídeos (Hirata et al., 2000).

Três modelos foram propostos para explicar a atividade lítica de peptídeos por Matsuzaki (1999) e Shai (1999) e por Huang (2000). Embora apresentem diferenças fundamentais entre si, estes modelos podem ser sintetizados em um único modelo, como segue: o peptídeo liga-se, inicialmente, à superfície externa da membrana onde assume a conformação helicoidal, tendo o eixo da hélice orientado paralelamente à bicamada. Nesta situação o peptídeo acumula na superfície externa da membrana até alcançar uma concentração crítica. Acima desta concentração ocorre a atividade lítica através da formação de poros toroidais transientes (Matsuzaki, 1999) e/ou de rompimento da bicamada (Shai, 1999). Ao atingir a concentração crítica, a orientação dos peptídeos em relação à bicamada muda e eles se orientam perpendicularmente a ela e formam poros toroidais ou poros com estrutura de barril ("barrel stave", Huang, 2000). Observa-se que a concentração crítica para desencadear a atividade lítica é fortemente dependente dos lipídeos que compõem a membrana. Esta dependência está relacionada às características elásticas da bicamada (módulos de flexão e de compressibilidade) e à morfologia desses lipídeos da membrana (Harroun et al., 1999; Huang, 2000; Chen et al. 2003).

As interações de origem eletrostática e hidrofóbica agem em conjunto para promover as associações entre lipídeos e peptídeos (Deber & Li, 1995). Na superfície das membranas, as interações eletrostáticas de relativamente longo alcance são as primeiras a serem estabelecidas entre resíduos de aminoácidos catiônicos, como Lys e Arg, e os grupos fosfato negativamente carregados da membrana celular alvo, mas as interações hidrofóbicas são responsáveis pela incorporação na fase lipídica (Seelig, 2004).

No modelo denominado *Poro barril* (Figura 1C) os peptídeos helicoidais revestem completamente a superfície interna do poro, com suas superfícies hidrofóbicas interagindo diretamente entre si e com as cadeias acílicas dos fosfolipídeos, e suas superfícies hidrofílicas voltadas para o canal aberto. No entanto, este modelo tem como condição necessária que os peptídeos possuam comprimento adequado para atravessar o núcleo hidrofóbico da membrana (Yang et al., 2001). Esta barreira a ser transposta apresenta, em bactérias, uma espessura da ordem de 30Å. Os peptídeos antimicrobianos de cadeias curtas, com 10 a 15 resíduos, apresentam um comprimento inferior ao necessário para atravessar as bicamadas e então indicam outros mecanismos para superar a diferença de comprimento. Recentemente mostrou-se que, em concentrações de peptídeo abaixo da concentração limite necessárias para a lise, ocorre uma redução da espessura da membrana devido ao aumento da sua área externa, proporcional à concentração de peptídeo associado à monocamada externa (Chen et al., 2002 e 2003).

O modelo de *Poro toroidal* (Figura 1B) foi descrito através deste afinamento. Neste tipo de poro, a bicamada se dobrará e as moléculas de peptídeo revestirão sua superfície interna, empacotadas juntamente com as cadeias lipídicas (Yang et al., 2001); uma importante restrição deste modelo é que nele o peptídeo deve estar sempre associado às cabeças dos fosfolipídeos e nunca com a região das cadeias acílicas (Yang et al., 2001).

No mecanismo denominado *Carpete* (Figura 1A) os peptídeos acumulam-se paralelamente à superfície da bicamada formando um carpete. A alta concentração de peptídeos ocorre à ruptura da membrana conduzindo a formação de micelas (Shai, 1999).

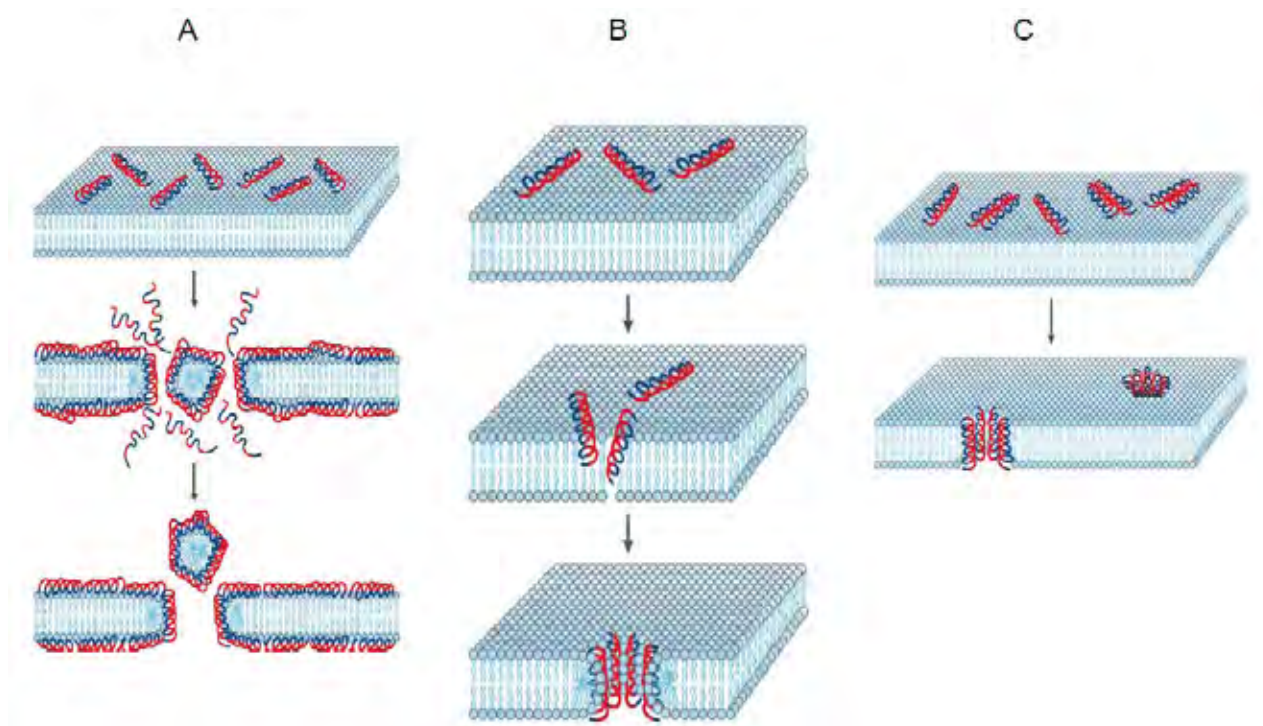


Figura 1: Representação esquemática dos modelos propostos para o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos helicoidais (Adaptado de Brogden, 2005). (A) Modelo tapete. (B) Modelo denominado Poro toroidal. (C) Formação do poro barril.

Brochard-Wyart e colaboradores (Puech et al., 2003; Brochard-Wyart et al., 2000) estudaram a formação de poros espontâneos induzidos por estresse em vesículas gigantes, procurando entender as contribuições da tensão superficial e da tensão de linha. Resumidamente, um poro é o resultado de um excesso de tensão superficial na membrana, que pode ser criada tanto por forte iluminação, como por eletroporação ou adição de surfactantes. Poros transientes se abrem devido a um excesso de tensão superficial em relação à tensão de linha e se fecham quando esta supera a primeira.

Esses conceitos desenvolvidos para o caso da formação de poro sob estresse luminoso foram estendidos para a análise do mecanismo da formação de poros pelos peptídeos antimicrobianos por Huang et al. (2004); a tensão superficial é criada pela área adicional ocupada pelos peptídeos ligados na região das cabeças polares da camada externa; a inserção de peptídeos (paralelamente ao plano normal em relação à superfície da membrana), a abertura do poro e o vazamento do conteúdo da vesícula reduzem a tensão superficial. A tensão de linha pode assim superar a tensão superficial reduzida e fechar o poro.

Com o fechamento do poro alguns peptídeos são transferidos para a camada interna da membrana, por um mecanismo denominado translocação (Matsuzaki et al., 1999 a e b). Dessa forma, as camadas internas e externas tornam-se contínuas e as moléculas de lipídeo podem mover-se entre ambos lados em um rápido "flip-flop", pois a estrutura do poro é bastante instável. Este mecanismo redistribui as moléculas de peptídeo entre as camadas, e a velocidade de formação de poro é reduzida, desativando o processo.

É preciso salientar que esses modelos foram construídos sobre evidências indiretas da formação do poro, baseados na semelhança entre o padrão de difração de nêutrons obtido para gramicidina e aqueles obtidos para alameticina e magainina, onde água deuterada foi usada para dar o contraste necessário à observação dos poros. E, ainda, estes só puderam ser observados nas condições em que os peptídeos encontravam-se no estado ativo, ou seja, perpendicularmente ao plano da bicamada.

O principal interesse no desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos na terapia humana está relacionado ao crescente problema da resistência aos antibióticos convencionais. As chances de uma bactéria desenvolver resistências a esses peptídeos é muito baixa, pois o seu principal alvo é a membrana celular. Um microorganismo teria de mudar significativamente a composição e/ou a organização de seus lipídeos para desenvolver resistência (Zasllof, 2002).

No entanto, ainda existem muitos obstáculos para as aplicações terapêuticas desses peptídeos, especialmente devido à toxicidade e ao elevado custo para a produção e desenvolvimento de drogas (Parisien et al., 2008). Formas alternativas de terapia poderão surgir do fato que os peptídeos antimicrobianos aumentam ou reconstituem a potência de antibióticos atual em vivo (Zaslloff, 2002), ou baseada na habilidade desses peptídeos em ativar peptídeos antimicrobianos endógenos e ainda considerando seu potencial de ação sinérgica (Yeaman & Yount, 2003; Zaslloff, 2002).

Neste trabalho estudamos a conformação e a atividade lítica em vesículas aniônicas e zwitteriônicas de um conjunto de peptídeos biologicamente ativos, sintetizados a partir de sequências encontradas em veneno de vespas sociais. Esses peptídeos são desgranuladores de mastócitos, apresentam atividade antimicrobiana e hemolítica. Possuem 14 resíduos, carga líquida entre +1 e +4, são lineares e de estrutura aleatória em meio aquoso. Nossa proposta é entender qual é a influencia dos resíduos ácidos, da carga líquida e da hidrofobicidade na atividade lítica e seletividade

em relação a membranas zwitteriônicas e aniônicas dos quatro peptídeos correlacionando-os com os dados biológicos.

Para isso foram estudadas, por Dicroísmo Circular, as mudanças conformacionais induzidas nestes peptídeos por vesículas zwitteriônicas e aniônicas. Os resultados de elipticidade foram analisados e comparados entre os peptídeos deste estudo, considerando-se também o número e distribuição de resíduos carregados. Dados da atividade lítica destes peptídeos em vesículas de diferentes composições foram obtidos em experimentos de liberação de marcador fluorescente encapsulado em lipossomos, monitorado por espectroscopia de fluorescência. Buscou-se correlacionar estes dados de atividade lítica com as características conformacionais dos peptídeos e atividade biológica considerando alguns parâmetros que caracterizam a anfipaticidade do peptídeo. A hidrofobicidade média e a propensão a formar estrutura helicoidal, tem sido utilizadas para caracterizar anfipaticidade. Esses parâmetros têm sido objeto de extensos estudos que procuram estabelecer conexões entre estrutura, atividade biológica e possíveis mecanismos de ação desses peptídeos (Dathe et al., 2002), visando o desenho de novas drogas com ação antibacteriana, menos susceptíveis ao desenvolvimento de resistência. As medidas de potencial zeta foram utilizadas para determinar a constante aparente de ligação dos peptídeos e o potencial na superfície das vesículas. O experimento de supressão da emissão da fluorescência do triptofano por acrilamida permitiu monitorar a inserção do peptídeo na região hidrofóbica da bicamada quando este interage com vesículas em diferentes composições. O experimento de anisotropia de fluorescência de DPH informa sobre alterações na fluidez da bicamada lipídica induzidas pelo peptídeo.

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos desta dissertação foram investigar a atividade lítica, as mudanças conformacionais e a seletividade dos peptídeos Polybia-MP-2, Polybia-MP-3, Protonectarina-MP e Parapolybia-MP com intuito de estabelecer correlações entre características estruturais e atividades biológica e lítica e na seletividade destes peptídeos. O objetivo foi explorar parâmetros estruturais tais como carga elétrica líquida, hidrofobicidade média e propensão para formar estrutura helicoidal e quantificar as constantes de partição destes peptídeos em vesículas e as contribuições energéticas na interação peptídeo-bicamada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Peptídeos Polybia-MP-3, Polybia-MP-2, Protonectarina-MP e Parapolybia-MP foram sintetizados pelo grupo do Prof. M. S. Palma da Unesp de Rio Claro.

Os lipídeos L- α -Fosfatidilcolina (PC), PM=760,09, obtida a partir da gema de ovo e L- α -Fosfatidil-DL-glicerol (PG), PM=771, obtido a partir da lecitina de gema do ovo foram adquiridos da Sigma e usados diretamente.

A carboxifluoresceína (CF) 99% de pureza foi adquirido da Sigma, Tris (hidroxidometilaminometano), acrilamida, difenilhexatrieno (DPH), Na₂EDTA, NaCl, Triton X-100, NaF e clorofórmio adquiridos da Merck e ácido bórico (H₃BO₃) da Reagen. Em todas as preparações foi utilizada água milli-Q ou deionizada e duplamente destilada em equipamento de quartzo.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação de tampões

3.2.1.1 *Tampão Tris/HCl*

Para o preparo deste tampão foram utilizados Tris a 10mM, Na₂EDTA a 1mM e NaCl a 150mM. O pH foi ajustado a 7,5 com o uso de soluções de HCl. O pHmetro foi pré calibrado com soluções padrões de pH igual a 4, 7 e 9.

3.2.1.2 *Tampão Tris/H₃BO₃*

As substâncias usadas foram Tris a 5mM, Na₂EDTA a 0,5mM e NaF a 150mM. O pH foi acertado a 7,5 com o uso de soluções de H₃BO₃.

3.3 Preparação de vesículas

Filmes finos de fosfolipídeos na composição e concentração desejada foram obtidos dissolvendo-os em clorofórmio em tubos de fundo arredondado seguindo da evaporação do solvente sob fluxo de N_2 . O filme foi então deixado por 3 horas sob vácuo para a evaporação do solvente remanescente. Vesículas multilamelares (MLVs) são produzidas a partir da adição de tampão a estes filmes. Em seguida os tubos foram agitados em vórtex para que as bicamadas descolassem das paredes do tubo. A hidratação do filme e a agitação devem ocorrer em temperatura acima da temperatura T_c de transição entre as fases líquidas cristalino-gel, o que no caso dos fosfolipídeos usados pode ser feito em temperatura ambiente.

3.3.1 Preparação de vesículas unilamelares, pequenas (SUVs)

Para os experimentos de dicroísmo circular (CD), o tampão utilizado foi Tris/ H_3BO_3 . Após agitação em vórtex, como descrito acima, a suspensão foi submetida à agitação em sonificador de ponta de titânio (Sonicador Virsonic 475, Virtis Co., Inc., NY) por 50 minutos, na potência 2, em banho de água e gelo e sob fluxo de N_2 , para evitar o aquecimento e a oxidação dos fosfolipídeos. Para remover restos de titânio a suspensão foi centrifugada a 14000 rpm em centrífuga de bancada (Eppendorf Centrifuge 5417C), durante 6 minutos. O sobrenadante dessa suspensão, de aspecto quase transparente e com brilho azulado, foi submetido a 11 extrusões, usando 2 membranas de 50nm (Nuclepore Trackétch Membrane, Whatman Nuclepore, PCBM 19mm 0,4 μ m e 0,1 μ m), em temperatura ambiente, usando um mini-extrusor Avanti.

Foram preparadas vesículas zwitteriônicas, contendo 100% PC (PC) e aniônicas, contendo 70% PC e 30% PG, mol/mol (PCPG 7030), que foram mantidos sob refrigeração e usados dentro de um período de no máximo 24 h.

3.3.2 Preparação de vesículas unilamelares, grandes (LUVs)

O procedimento inicial de preparação de filmes de fosfolípidos foi o mesmo que o descrito anteriormente. Os filmes foram hidratados em tampão Tris/HCl. Em seguida a suspensão foi agitada em vórtex por 2 min e 30 s e depois submetida a 6 extrusões, utilizando 2 membranas de polycarbonato 400 nm e subsequentemente a 11 extrusões, usando 2 membranas de 100 nm (Nuclepore Tracketch Membrane, Whatman Nuclepore, PCBM 19mm 0,4 μ m e 0,1 μ m), em temperatura ambiente, usando um mini-extrusor Avanti. As suspensões foram mantidas sob refrigeração e usadas dentro de 48h.

Para os experimentos de liberação de conteúdo de vesículas, a suspensão de LUVs foi obtida pela adição de 0,75 mL de solução do corante fluorescente carboxifluoresceína 0,025M, em tampão Tris/HCl sem NaCl e seguiu o mesmo procedimento acima descrito. Após a extrusão e uma hora de descanso, a suspensão foi submetida à filtração em gel em coluna Sephadex G 25 M, PD-10 (Amersham Pharmacia, Upsala, Sweeden), para a retirada da carboxifluoresceína livre. Esta coluna foi previamente equilibrada tampão Tris/HCl 10mM, Na₂EDTA 1mM e NaCl 150mM. A suspensão de aspecto levemente turvo e de cor alaranjada foi mantida sob refrigeração e usada dentro de 48 horas.

Foram preparadas vesículas zwitteriônicas, contendo 100% PC, e aniônicas, na razão molar 70% PC e 30% PG (PCPG 7030).

3.4 Dicroísmo Circular (CD)

Os espectros de CD foram coletados no intervalo de comprimento de onda de 190 a 260 nm, usando um espectropolarímetro Jasco-710 (Tokyo, Japan). Os espectros foram obtidos a 25°C, utilizando cubetas de quartzo de 0,5 cm de caminho óptico, tomando-se 6 acumulações. Os parâmetros do instrumento foram mantidos em: velocidade (scan speed) 20 nm/min, largura de banda (bandwidth) 1,0 nm, tempo de resposta (response) 1,0s e resolução (resolution) de 0,2 nm. As linhas de base são obtidas para cada sistema de solvente com 7 acumulações.

A elipticidade observada, θ (mdeg), foi corrigida em função da diluição, quando necessário, e subtraída a respectiva linha de base. Esses dados foram então convertidos em elipticidade molar média por resíduo, $[\Theta]$, usando a relação

$$[\Theta] \left(\frac{\text{deg cm}^2}{\text{dmol}} \right) = \frac{100 \cdot \theta}{l \cdot c \cdot n} \quad 1$$

onde l é o caminho óptico em cm, c é a concentração de peptídeo em mM e n é o número de ligações peptídicas possíveis.

Assumindo um modelo de dois estados, isto é, o peptídeo existe apenas nos estados, hélice ou conformação aleatória, a elipticidade molar observada em 222 nm, $[\Theta]_{222}^{\text{obs}}$, foi convertida em fração helicoidal, f_H , usando o método proposto por Rohl e Baldwin (1998), usando a seguinte equação:

$$f_H = \frac{[\Theta]_{222}^{\text{obs}} - [\Theta]_{222}^c}{[\Theta]_{222}^H - [\Theta]_{222}^c} \quad 2$$

onde $[\Theta]_{222}^c$ é a elipticidade molar para o peptídeo em random coil, corrigida para sua dependência com a temperatura, $T(^{\circ}\text{C})$ pela relação:

$$[\Theta]_{222}^c = 640 - 45 T \quad 3$$

e $[\Theta]_{222}^H$ é a elipticidade molar para a estrutura totalmente helicoidal, igualmente corrigida em função da temperatura, e em função da máxima elipticidade possível, sendo:

$$[\Theta]_{222}^H = (-42500 + 125 \cdot T) \cdot (1 - x/n) \quad 4$$

onde n é o número de ligações peptídicas e x é o número de grupos carbonila da cadeia peptídica que não estão envolvidos na formação de pontes de hidrogênio. Como os resíduos na primeira e na última volta da hélice não podem apresentar seus grupos NH e CO, respectivamente, ligados por pontes de hidrogênio ao restante da hélice, então

$x = 3$ para peptídeos com terminal C amidado e $x = 4$ para aqueles carboxilados (Rohl & Baldwin, 1998). Para os peptídeos em estudo neste trabalho sempre usamos $x = 3$.

A estrutura secundária assumida pelos peptídeos foi determinada em tampão Tris/H₃BO₃ 5mM, em suspensão de vesículas PC e de vesículas PCPG 7030. Uma alíquota da solução de peptídeo foi adicionada à cubeta e homogeneizada com a quantidade necessária de tampão e vesícula para completar 1 mL na concentração final de 20µM de peptídeo e 100µM de vesícula. Os espectros foram obtidos e tratados conforme indicado acima.

3.5 Vazamento de vesículas por fluorimetria

Com o uso de um espectrofluorímetro ISS PC1 (Urbana Champaign, IL, USA) foi monitorado o processo de permeabilização de vesículas. A liberação da fluorescência da carboxifluoresceína (CF) ocorre quando uma solução concentrada de CF tem a sua fluorescência suprimida que é liberada pela diluição. A interação de peptídeos com vesículas contendo CF é monitorada pelo aumento da fluorescência causada pela ruptura dessas vesículas e conseqüente liberação do seu conteúdo interno.

Para completar o volume final de 1,2 mL, alíquotas de suspensão de vesículas foram adicionadas sob agitação à cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, contendo a solução do peptídeo em estudo, em tampão Tris/HCl em pH 7,5 a 25°C. A concentração de vesícula foi mantida constante e igual a 100µM. Os espectros de emissão de fluorescência ao longo do tempo foram obtidos em 520nm, com abertura de fenda de 0,5nm e excitação em 490nm, com abertura de fenda de 0,5nm. O tempo de coleta foi de 20 minutos para a vesícula aniônica e 30 minutos para a vesícula zwitteriônica. A porcentagem de CF liberada foi determinada depois de intervalos de tempo regulares, e calculada com a equação:

$$\% \text{ vazamento} = \frac{100 \cdot (F - F_0)}{F_{100} - F_0} \quad 5$$

onde F é a intensidade de fluorescência medida (em unidades arbitrárias), F_0 corresponde a intensidade de fluorescência das LUVs intactas e F_{100} é a intensidade de

fluorescência após liberação total do conteúdo das vesículas, determinado pela adição de 20µl de solução 10% Triton X-100.

As curvas de dose-resposta, ou seja, % vazamento vs razão molar P/L, apresentam-se geralmente na forma sigmoidal e podem ser ajustados por sigmóides de Boltzmann:

$$y = \frac{y_1 + y_2}{1 + e^{(x - x_0)/dx}} + y_2 \quad 6$$

onde y é a porcentagem de vazamento, x a concentração de peptídeo, y_1 e y_2 são a porcentagem vazamento máximo e mínimo, respectivamente, dx a inclinação da curva e x_0 é a concentração de peptídeo necessária para ocorrer 50% de vazamento (EC_{50} de vazamento).

3.6 Potencial Zeta

3.6.1 Medidas de Potencial Zeta

As medidas foram realizadas em celas capilares na forma de U com eletrodo de ouro e volume de 1mL (DTS1060, figura 2) utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, U.K.). Para completar esse volume total, uma alíquota de suspensão de vesícula foi adicionada a quantidades apropriadas da solução de peptídeo em tampão. Cada suspensão de vesícula-peptídeo, variando de 0/100 a 12/100 P/L, ficou em descanso durante 30 minutos antes das medidas.



Figura 2: Cubetas usadas na medida de potencial zeta.

O potencial zeta foi calculado através da mobilidade eletroforética, u_E , de acordo com a equação de Helmholtz-Smoluchowski

$$\zeta = \frac{\eta u_E}{\varepsilon \varepsilon_0} \quad 7$$

onde η é a viscosidade da fase aquosa, ε_0 é a permissividade do vácuo e $\varepsilon = 78$ é a constante dielétrica da água. Os valores de viscosidade e índice de refração da água foram 0,8872 cP e 1,33, respectivamente.

As curvas de potencial zeta versus concentração de peptídeo foram analisadas pelo modelo de Gouy Chapmann seguindo a estratégia descrita por Beschiaschvili and Seelig (1990).

De acordo com este modelo o peptídeo e a espécie iônica em solução são adsorvidos à bicamada, com uma constante de ligação aparente, K_{ap} , através da isoterma de adsorção de Langmuir.

A bicamada é constituída de fosfolípidos neutros como fosfatidilcolina (zwitteriônica) e uma fração, X_{PG} , de fosfolípidos ácidos (fosfatidilglicerol, PG). Neste trabalho o eletrólito suporte é o NaCl. Os íons de sódio (Na^+) são particionados entre a bicamada e a solução. Considerando que a constante de ligação seja K_{Na} e que a fração destes íons ligados à bicamada seja X_{Na} pode-se escrever que

$$X_{Na} = \frac{K_{Na} C_{M,Na}}{(1 + K_{Na} C_{M,Na})} \quad 8$$

onde $C_{M,Na}$ é a concentração de sódio sob a influência do potencial eletrostático da bicamada. Se a membrana tem um potencial de superfície, ψ_0 , a concentração $C_{M,Na}$ é relacionada com a concentração de sódio do "bulk", C_{Na} , de acordo com a distribuição de Boltzmann

$$C_{M,Na} = C_{Na} e^{\left(-\frac{\psi_0 F_0}{RT}\right)} \quad 9$$

na qual F_0 é a constante de Faraday, R é a constante dos gases e T a temperatura.

No sistema estudado além de íons, peptídeos também são adsorvidos à bicamada, em uma primeira aproximação como um processo ideal, representado também por uma isoterma de Langmuir.

Se X_{PG} é a fração molar de lipídeos carregados na bicamada (número de moles de PG pelo número de moles total de lipídeo), X_b a fração de peptídeos associados por total de lipídeo e z_p a carga efetiva do peptídeo, então a densidade superficial de carga, σ , pode ser descrita como (Beschiaschvili and Seelig, 1990)

$$\sigma = \left(\frac{e}{A_L}\right) \frac{-X_{PG}(1 - X_{Na}) + z_p X_b}{1 + \left(\frac{A_P}{A_L}\right) X_b} \quad 10$$

onde e é a carga elementar, A_p e A_L são a área do peptídeo e do lipídeo, respectivamente, que estabelecem contato durante a interação. O termo $\left(\frac{A_P}{A_L}\right) X_b$ leva em conta a penetração do peptídeo na membrana. A equação acima possui duas incógnitas, X_b e X_{Na} , que é uma função do potencial ψ_0 .

De acordo com o modelo de Gouy-Chapmann (Beschiaschvili and Seelig, 1990) a densidade superficial de carga é dada por

$$\sigma = (2000\varepsilon\varepsilon_0RT)^{\frac{1}{2}} \left[\sum_i C_{i,eq} (e^{(-z_i F_0 \psi_0 / RT)} - 1) \right]^{\frac{1}{2}} \quad 11$$

onde $C_{i,eq}$ é a concentração molar do i-ésimo eletrólito (em moles por litro) e z_i é o sinal de valência da i-ésima espécie.

A partir dos valores do potencial zeta é possível determinar o potencial na superfície através da relação

$$\zeta = \psi_0 e^{(-\kappa d_\zeta)} \quad 12$$

onde κ é o parâmetro de Debye e d_ζ a posição do plano de cisalhamento em relação à bicamada ($d_\zeta \approx 2 \text{ \AA}$).

O valor negativo do potencial na superfície ψ_0 acarreta aumento da concentração de peptídeos na interface, e pode-se escrever esta concentração imediatamente acima do plano de ligação, C_M , é dada por

$$C_M = C_f e^{\left(\frac{-z_p F_0 \psi_0}{RT}\right)} \quad 13$$

onde C_f é a concentração de peptídeo distante do plano ("bulk"), que é o mesmo que a concentração livre.

Pelo método proposto por Beschiaschvili a constante de adsorção pode ser escrita por

$$K_{ap} = \frac{X_b}{C_f} \quad 14$$

Para determinar o valor de X_b foi feito um programa computacional que tem como objetivo encontrar a igualdade das equações 10 e 11. Este programa informa os valores de C_M , X_b , z_p e K_{ap} .

3.6.2 Medidas de diâmetro médio das vesículas

A medida do diâmetro médio das vesículas, zwitteriônica PC e aniônica PCPG 7030 a 100 μ M, utilizados em todos os experimentos anteriores, foi determinado por análise de espalhamento quase-elástico de luz (Malvern Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, U.K.). As medidas foram realizadas com volume total de 1000 μ L em cubetas de poliestireno, com as mesmas amostras utilizadas na medida de potencial zeta. Este método foi utilizado para verificar o procedimento de preparação de vesículas.

3.7 Titulações Fluorimétricas

A ligação entre peptídeo e vesículas pode ser monitorada por um sinal físico apropriado, como por exemplo, a intensidade de fluorescência (Schwarz and Reiter, 2001). Para este fim foram realizados experimentos de titulações fluorimétricas através da adição de alíquotas de suspensão de vesículas a uma solução de peptídeo, com concentração determinada, sob agitação, ambos preparados em tampão Tris/HCl 10mM, 1 mM Na₂EDTA e 0,15M de NaCl, pH 7,5, a 24°C. As medidas foram feitas no espectrofluorímetro PC1-ISS (Urbana, Champaign, IL, USA) com polarizadores cruzados: perpendicular ao feixe de excitação e paralelo ao feixe de emissão. O comprimento de onda de emissão foi fixado em 325nm (abertura de fenda de 2nm) e o de excitação a 278nm (abertura de fenda de 2nm). Usou-se uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1,0cm. Os espectros de fluorescência foram medidos como função do tempo e corrigidos devido à diluição. Foram utilizadas quatro concentrações diferentes de peptídeo: 4,5, 6,5, 8,5 e 10,5 μ M.

Para análise dos dados foi utilizado o modelo proposto por Schwarz and Reiter, 2001, que usa como base a lei de conservação de massa. No equilíbrio, esse sistema é caracterizado termodinamicamente pela sua isoterma de associação, que implica diretamente na relação entre peptídeo ligado por quantidade de lipídeo e quantidade de ligante livre, que é avaliada de uma forma independente de modelos.

A concentração total de peptídeos (C_p) é dada por

$$C_p = C_f + rC_L \quad 15$$

onde C_f e C_L são as concentrações de peptídeo livre e lipídeos total, respectivamente e r a fração de peptídeo ligado por lipídeo.

O sinal de ligação experimental (F) é a intensidade de fluorescência do peptídeo em vesícula, Φ , subtraído do sinal referente ao peptídeo puro: $F = \Phi - \Phi_0$. F pode ser normalizado levando em consideração a concentração de vesícula:

$$Q' = \frac{F}{C_L} \quad 16$$

Em uma série de medidas com C_p suficientemente diferentes, monta-se os gráficos de Q' versus C_p/C_L . Cada reta que corta as curvas determina valores de C_p e C_L .

Estes conjuntos reproduzem uma reta de acordo com a relação de conservação de massa. Os ajustes destas retas fornecem os valores da concentração de peptídeo livre (intercepto) e a fração de peptídeo associado (coeficiente angular), ou seja, os valores necessários para a construção das isotermas de adsorção.

Quando as isotermas mostram um processo de adsorção linear para baixas concentrações de C_f supõe um processo ideal de acordo com a equação abaixo

$$r = K_{ap}C_f \quad 17$$

onde K_{ap} é a constante aparente de adsorção.

3.8 Experimento de Anisotropia de Fluorescência de DPH

A sonda fluorescente DPH foi incorporada durante a preparação dos filmes lipídicos em baixa concentração ($X=0,002$). DPH é uma molécula de formato cilíndrico, com dipolos de transição de absorção e de emissão de fluorescência alinhados, paralelamente, em relação ao eixo molecular. Consequentemente sua polarização de

fluorescência é alta na ausência de movimento rotacional e muito sensível à reorientação desse eixo como resultado da interação com lipídeo ao seu redor. Assim ela é usada para investigar a interação do peptídeo com as cadeias acílicas nas bicamadas fosfolipídicas para dar informação de sua fluidez.

Foram preparadas uma série de diluições, em tampão Tris/HCl, das soluções estoque dos peptídeos em estudo. A concentração de lipídeo usada foi 50µM e a temperatura mantida a 20°C. As amostras foram preparadas, diretamente, em cubetas descartáveis e deixadas em repouso por 3 horas, à temperatura ambiente e protegida da luz.

A anisotropia de fluorescência foi medida usando espectrofluorímetro PC1-ISS (Urbana, Champaign, IL, USA), e polarizadores de Glan-Thompson, por meio das componentes paralelas e perpendiculares de emissão quando o fluoróforo é excitado com feixe polarizado nestas direções. Os comprimentos de onda de emissão e excitação foram fixados em 450nm e 360nm, e a largura da banda de 2 e 2nm, respectivamente.

A anisotropia de fluorescência é calculada da seguinte forma:

$$r = \frac{F_{\parallel} - F_{\perp}}{F_{\parallel} + 2F_{\perp}} \quad 18$$

onde $F_{\parallel}$ é a intensidade de fluorescência paralela ao plano de excitação e $F_{\perp}$ é a componente perpendicular ao mesmo plano (Lakowicz, 1999).

3.9 Experimento de Supressão de Emissão de Fluorescência de Triptofano por Acrilamida

Reações de supressão de fluorescência fornecem informações sobre a acessibilidade do resíduo de Trp na cadeia peptídica que funciona como uma sonda intrínseca, em relação a uma pequena molécula supressora, a acrilamida. Mudanças conformacionais do peptídeo quando interage com bicamadas fosfolipídicas são monitoradas através de mudanças na acessibilidade da acrilamida ao resíduo de Trp.

Para completar o volume final de 1,2 mL, alíquotas de uma solução de acrilamida diluída em água, a 2,77M, foram adicionadas sob agitação à cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, contendo a solução do peptídeo em estudo, em tampão Tris/HCl, em pH 7,5 a 25°C. Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados entre 312 a 450nm, com excitação em 285nm e a 25°C. Foram utilizados polarizadores cruzados: emissão 0° e excitação 90°. Os espectros foram corrigidos pelo fator de diluição e descontou-se a contribuição do espalhamento de luz a partir da titulação da vesícula com acrilamida na ausência de peptídeo. Os resultados foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer (Eftink and Ghiron, 1976):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad 19$$

Onde F_0 e F são as intensidades na ausência e na presença do supressor, K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer, que é a medida da acessibilidade.

Algumas curvas podem apresentar um desvio da linearização. Isto pode ser explicado pelo fato de que algumas moléculas no estado excitado são quase instantaneamente desativadas, porque moléculas de supressor podem estar posicionadas em suas proximidades no mesmo tempo em que estas são excitadas. O modelo que pode ser empregado para descrever este processo de supressão instantâneo, ou estático, conduz a seguinte modificação na equação de Stern-Volmer (Eftink and Ghiron, 1976)

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{SV}[Q])e^{V[Q]} \quad 20$$

onde V é a constante de supressão estática.

4. RESULTADOS

Todos os peptídeos estudados foram sintetizados a partir de sequências encontradas no veneno de vespas sociais brasileiras. Todos são catiônicos, helicoidais e antimicrobianos. A tabela 1 apresenta suas sequências primárias e a figura 3 a projeção da sequência peptídica em estrutura helicoidal ideal.

Tabela 1. Sequência primária, carga líquida e hidrofobicidade média (calculada de acordo com a escala de Consenso proposto por Eisenberg et al., 1984) dos peptídeos estudados; em azul, resíduos positivamente carregados; vermelho, negativamente carregados; verde, polares, sem carga.

		Q	<H>
Polybia-MP-3	Ile- Asp -Trp-Leu- Lys -Leu-Gly- Lys -Met-Val-Met- Asp -Val-Leu-NH ₂	+1	0,06
Polybia-MP-2	Ile- Asn -Trp-Leu- Lys -Leu-Gly- Lys -Met-Val-Ile- Asp -Ala-Leu-NH ₂	+2	0,08
Protonectarina-MP	Ile- Asn -Trp- Lys -Ala-Leu-Leu- Asp -Ala-Ala- Lys - Lys -Val-Leu-NH ₂	+3	-0,05
Parapolybia-MP	Ile- Asn -Trp- Lys - Lys -Met-Ala-Ala- Thr -Ala-Leu- Lys -Met-Ile-NH ₂	+4	-0,03

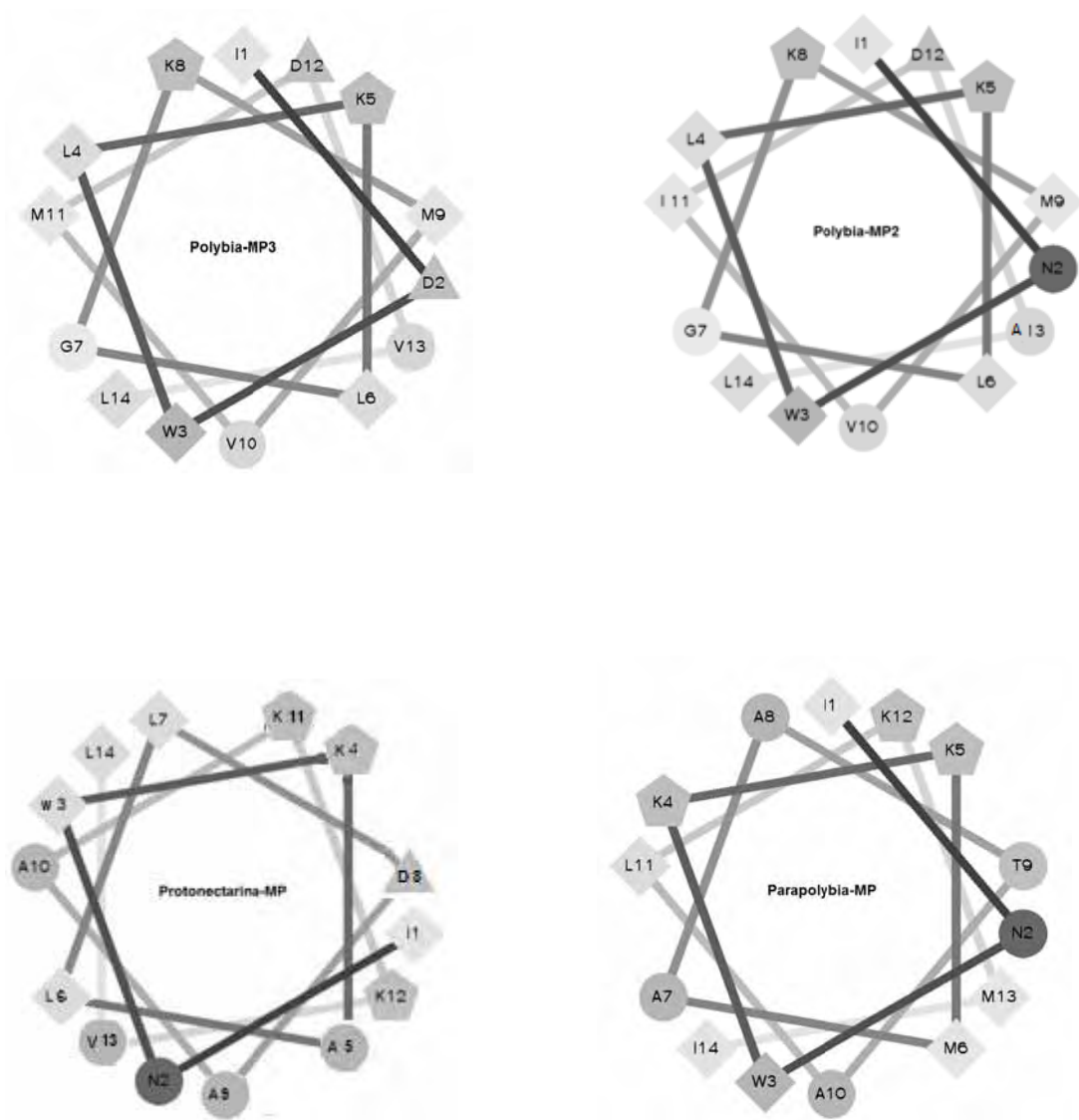


Figura 3: Projeção helicoidal dos peptídeos. A representação dos resíduos é a seguinte: *círculos* hidrofílicos, *losango* hidrofóbicos, *triângulos* os carregados negativamente e *pentágonos* os carregados positivamente. (Software de projeção helicoidal – Zidovevetski et al., 2003).

A figura 3 é a projeção de uma hélice- α ideal, na qual todos os resíduos participam da formação da hélice. Através dela nós podemos ter uma idéia da posição dos resíduos carregados de cada peptídeo em estudo para entender melhor a formação helicoidal dos mastoparanos.

4.1 Análise Conformacional por Dicroísmo Circular

As análises de dicroísmo circular (CD) fornecem informações das características estruturais dos peptídeos quando interagem com membranas modelo, pois permitem estimar quantidades de hélice- α , folha- β e estruturas desordenadas adotadas pelas moléculas. A estrutura secundária dos quatro peptídeos em estudo foi determinada pela análise de dicroísmo circular. Todas as amostras foram analisadas na concentração de 20 μ M em presença de tampão, vesículas PC, mimetizando membranas eucarióticas, e vesículas PCPG 7030, que mimetizam membranas de procariotos.

Os espectros de CD dos quatro peptídeos em tampão Tris/H₃BO₃ são característicos de uma estrutura secundária desordenada, pois apresentam um sinal negativo ao redor de 200nm, como mostra a figura 4. Em contato com bicamadas zwitteriônicas e/ou aniônicas os espectros dos peptídeos estudados, com exceção do peptídeo Parapolybia-MP em vesículas zwitteriônicas, mostram bandas negativas em de 208nm e 222nm indicando uma mudança conformacional para hélice- α quando interagem com estas bicamadas. A fração de hélice- α , para os quatro peptídeos, obtidas destes espectros é dada na tabela 1. Em vesículas zwitteriônicas as frações de hélice diminuem ligeiramente com o aumento de carga líquida do peptídeo. Em vesículas aniônicas as frações de hélice- α são maiores do que em vesículas neutras, contudo estas frações parecem não depender apenas da carga líquida dos peptídeos.

O peptídeo Polybia-MP-3 apesar de possuir carga líquida igual a +1 mostrou a maior fração de α -hélice dentre os peptídeos em estudo, em ambas vesículas (Tabela 1).

Os espectros de dicroísmo circular do peptídeo Polybia-MP-2 apresentam uma diferença na intensidade muito pequena, mostrando então que a fração de α -hélice é praticamente a mesma para ambos tipos de vesículas (figura 4b).

O peptídeo Protonectarina-MP apresentou um sinal mais intenso em meio aniônico (figura 4c).

Os espectros de CD dos peptídeos Polybia-MP-3 e MP-2, em PC, e Parapolybia-MP, em PCPG, mostraram uma maior intensidade na banda de 222nm que em 208nm sugerindo uma pequena e quase desprezível tendência à agregação nessas vesículas e nas concentrações de peptídeo estudada.

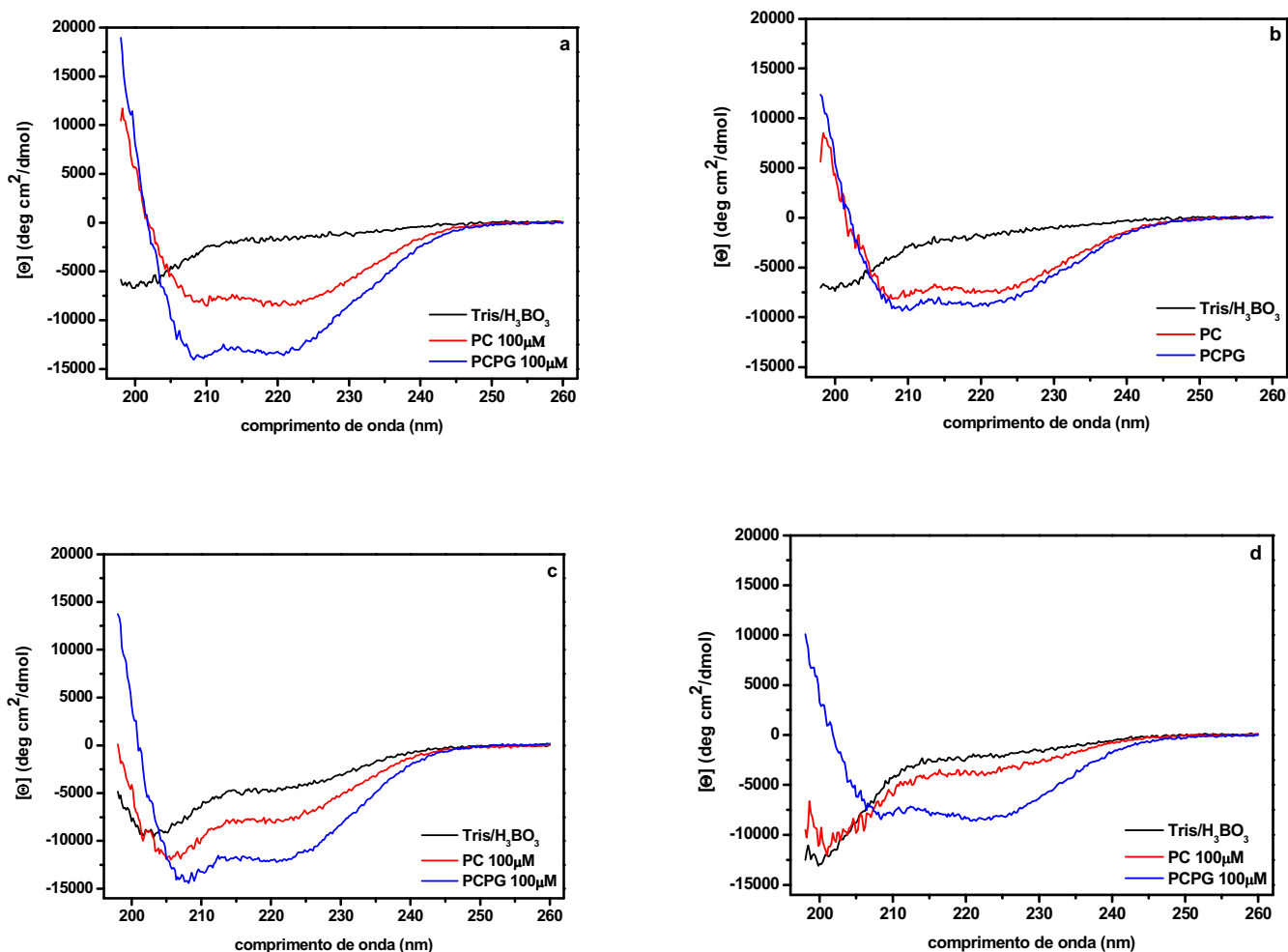


Figura 4: Espectros de CD de Polybia-MP-3 (a), Polybia-MP-2 (b), Protonectarina-MP (c) e Parapolybia-MP (d) a 20 μ M, 25°C, na presença de tampão Tris/H₃BO₃ e de vesículas compostas por PC e PCPG 7030. A elipticidade molar em ambientes zwitteriônicos não apresenta diferenças significativas entre esses peptídeos, exceto em relação a Parapolybia-MP. Em ambientes aniônicos a elipticidade molar é crescente na seguinte ordem: Polybia-MP-2~Parapolybia-MP<Protonectarina-MP< Polybia-MP-3.

A Tabela 2 mostra os valores de fração de α -hélice (f_H) obtidos para os peptídeos em estudo, correlacionados aos valores de carga líquida (Q) e hidrofobicidade (H).

Tabela 2. Propriedades estruturais dos peptídeos: carga líquida (Q), hidrofobicidade (H), fração de α hélice (f_H) e número de resíduos (N_{aa}).

	N_{aa}	Q^1	H^2	f_H	
				PC	PCPG 7030
Polybia-MP-3	14	+1	0,06	0,26	0,42
Polybia-MP-2	14	+2	0,08	0,23	0,27
Protonectarina-MP	14	+3	-0,05	0,24	0,39
Parapolybia-MP	14	+4	-0,03	rc	0,27

¹incluindo C-terminal amidado; ²calculado de acordo com a escala consenso de Eisenberg's (1984); rc = random coil.

Esses resultados revelam que todos os peptídeos apresentam uma maior fração de hélice- α nos meios contendo vesículas carregadas negativamente, no entanto, possuem nenhuma tendência em formar hélice- α em tampão Tri/ H_3BO_3 .

No entanto, não é observada uma relação direta entre a carga líquida do peptídeo e a fração de hélice- α . A contribuição eletrostática, entretanto, não é o fator modulante do conteúdo helicoidal, quando os peptídeos são hidrofóbicos: o peptídeo de menor carga, Polybia-MP-3, apresenta o maior conteúdo helicoidal em vesículas aniônicas.

4.2 Atividade Lítica em Vesículas por Fluorimetria

A atividade lítica (de permeabilização) da membrana, induzida pelos quatro peptídeos em estudo, foi investigada por meio de vazamento de marcadores fluorescente (CF) encapsulados em vesículas, LUV zwitteriônicas PC e aniônica PCPG 7030.

A figura 5a ilustra o processo de lise em vesículas PC e PCPG 7030 por Polybia-MP-3. Após 20 minutos de contato, aproximadamente a mesma quantidade de CF é liberada tanto em vesículas PC como em PCPG 7030, na mesma razão P/L, e o

extravazamento total de CF é obtido na concentração de $0,85\mu\text{M}$ de peptídeo. As curvas de dose-resposta sigmoidais apresentadas na figura 5b exemplificam o perfil que encontramos na maioria dos peptídeos estudados: em baixas razões P/L, o peptídeo causa um vazamento de CF dificilmente detectável; já em P/L acima do valor limiar, o peptídeo causa intenso vazamento. Os valores de P/L crítico encontram-se na tabela 3.

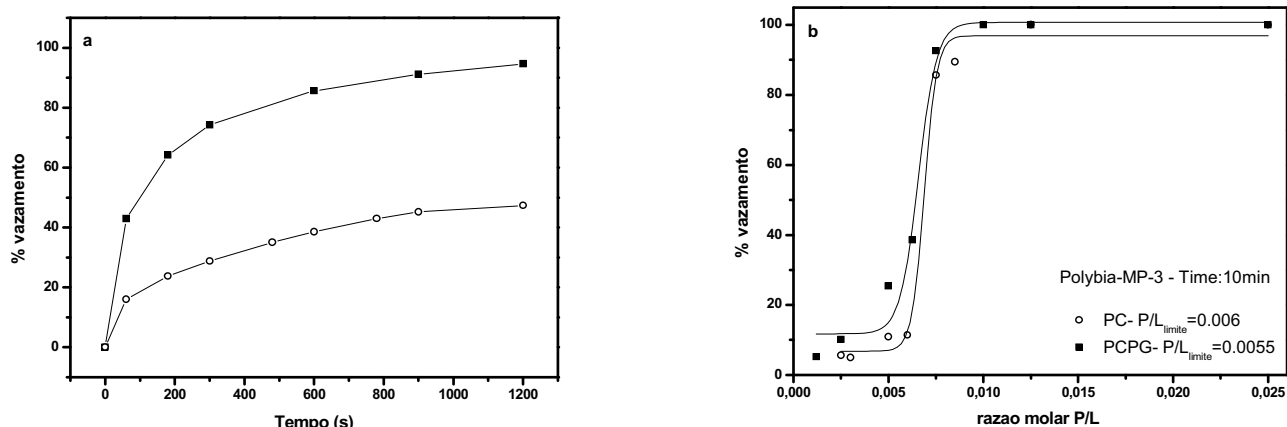


Figura 5: Atividade lítica induzida por Polybia-MP-3 em vesículas PC (círculos) e PCPG (quadrados) a $100\mu\text{M}$ e a 25°C . **(a)** Cinética de vazamento: em vesículas PC na concentração de $0,75\mu\text{M}$ de peptídeo e em vesículas PCPG 7030 na concentração de $0,625\mu\text{M}$ de peptídeo. As linhas contínuas são liga ponto. **(b)** Curvas de dose-resposta depois de 10 min da adição de vesícula, em função da razão P/L. Valores de P/L crítico são 0,006 e 0,0055 para vesículas zwitteriônicas e aniônica, respectivamente. As linhas contínuas são ajustes com a equação sigmoidal de Boltzmann.

O peptídeo Polybia-MP-2, em 2 minutos de contato induziu liberação praticamente completa do conteúdo das vesículas aniônicas, enquanto menos de 40% do conteúdo das vesículas PC foi liberado no mesmo intervalo de tempo e mesma razão P/L de 0,0125. A figura 6b indica um tipo de dependência sigmoidal que é característico de processos cooperativos. Os valores de P/L crítico para o peptídeo Polybia-MP-2 são 0,009 para vesículas PC e 0,007 para vesículas PCPG 7030.

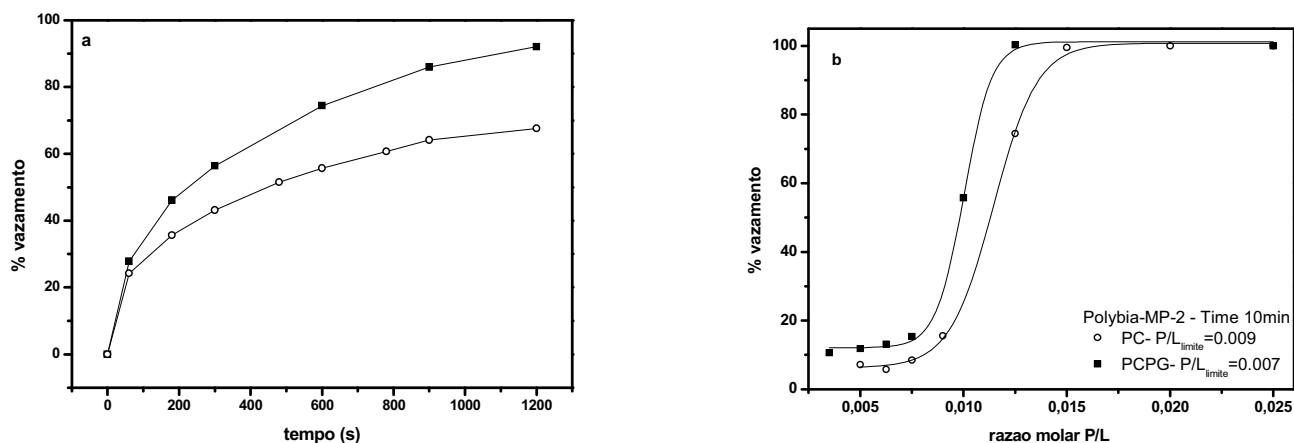


Figura 6: Atividade lítica induzida por Polybia-MP-2 em vesículas PC (círculos) e PCPG (quadrados) a $100\mu\text{M}$ e a 25°C . **(a)** Cinética de vazamento de vesículas PC e PCPG 7030, na concentração de $1,25\mu\text{M}$ e $1,0\mu\text{M}$ de peptídeo, respectivamente. As linhas contínuas são liga ponto. **(b)** Curvas de dose-resposta depois de 10 min da adição de vesícula, em função da razão P/L. Valores de P/L crítico são 0,009 para vesículas PC e 0,007 para PCPG 7030. As linhas contínuas são ajustes com a equação sigmoidal de Boltzmann.

O peptídeo Protonectarina-MP, em 20 minutos de contato, induziu liberação quase completa do conteúdo das vesículas PCPG, enquanto aproximadamente 60% do conteúdo das vesículas PC foi liberado no mesmo intervalo de tempo (figura 7a). O peptídeo Protonectarina-MP apresentou uma cooperatividade baixa em vesículas aniônicas (figura 7b). Os valores de P/L crítico para o peptídeo Protonectarina-MP para as vesículas PC e PCPG 7030 são 0,03 e 0,01, respectivamente.

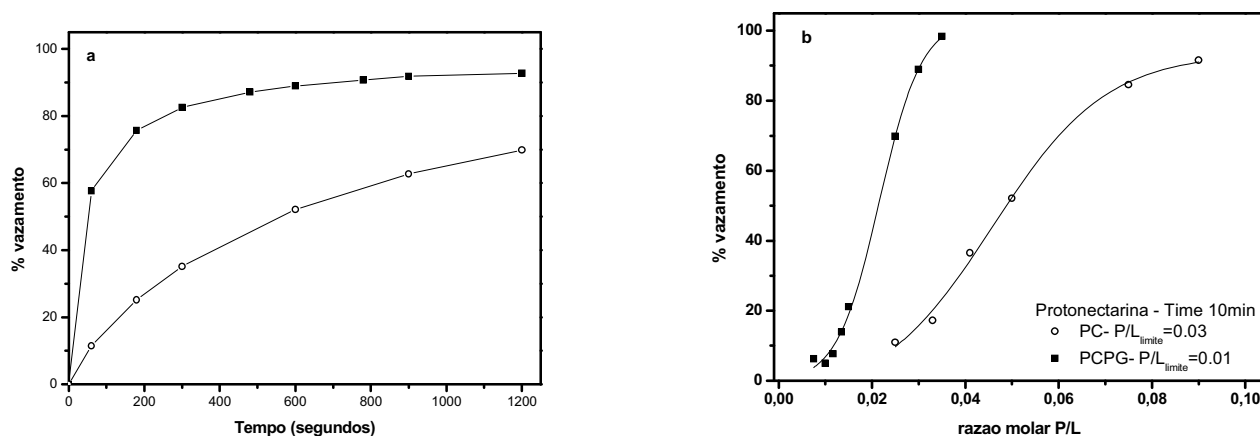


Figura 7: Atividade lítica induzida por Protonectarina-MP em vesículas PC (círculos) e PCPG (quadrados) a 100 μ M e a 25°C. **(a)** Cinética de vazamento de vesículas PC e PCPG 7030, na concentração de 5 μ M e 3 μ M de peptídeo, respectivamente. As linhas contínuas são liga ponto. **(b)** Curvas de dose-resposta depois de 10 min da adição de vesícula, em função da razão P/L. Valores de P/L crítico são 0,03 para vesículas PC e 0,01 para PCPG 7030. As linhas contínuas são ajustes com a equação sigmoidal de Boltzmann.

A atividade lítica do Parapolybia-MP em PC foi avaliada durante 30 minutos de contato, em diferentes concentrações de peptídeo, e foi observado um processo muito lento de vazamento (figura 8a). Somente em concentrações acima de 7,5 μ M verificou-se 90% do vazamento do conteúdo desta vesícula. Enquanto em vesículas aniônicas a concentração necessária para obter a mesma porcentagem de vazamento é igual a 1 μ M, mostrando, portanto um processo de lise muito rápido. O peptídeo Parapolybia-MP mostrou baixa cooperatividade em vesículas zwitteriônicas (figura 8b).

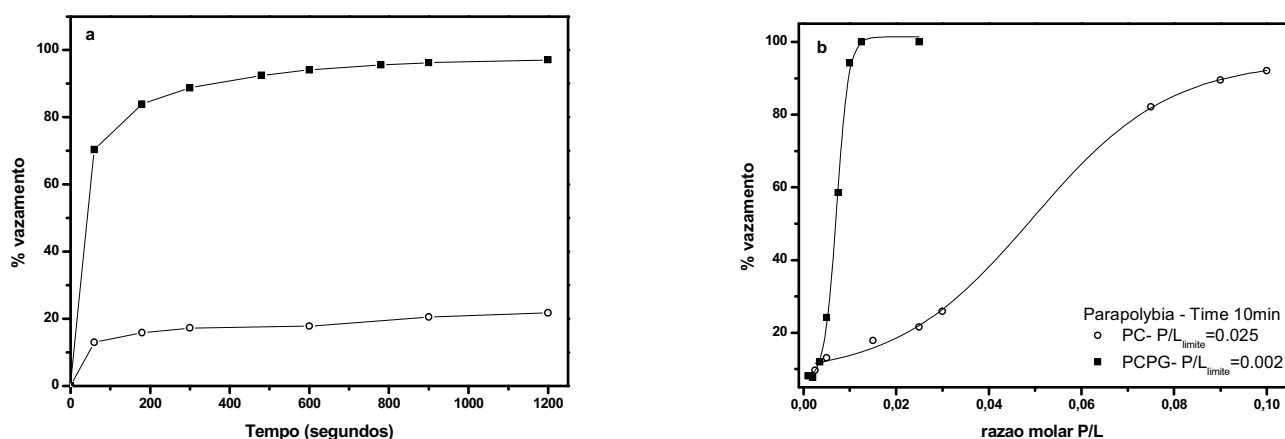


Figura 8: Atividade lítica induzida por Parapolybia-MP em vesículas PC (círculos) e PCPG (quadrados) a 100 μ M e a 25°C. **(a)** Cinética de vazamento de vesículas PC e PCPG 7030, na concentração de 2,5 μ M e 1,0 μ M de peptídeo, respectivamente. As linhas contínuas são liga ponto. **(b)** Curvas de dose-resposta depois de 10 min da adição de vesícula, em função da razão P/L. Valores de P/L crítico são 0,025 para vesículas PC e 0,002 para PCPG 7030. As linhas contínuas são ajustes com a equação sigmoidal de Boltzmann.

Tabela 3: Valores de razão molar crítica P/L, EC₅₀ de vazamento (μ M) que corresponde a concentração de peptídeo para ocorrer 50% de vazamento após 10 minutos de contato, obtido nos experimentos de atividade lítica.

	P/L _{crítico}		EC ₅₀ (μ M)	
	PC	PCPG	PC	PCPG
Polybia-MP-3	0,006	0,0055	0,69	0,66
Polybia-MP-2	0,009	0,007	1,1	1,0
Protonectarina-MP	0,03	0,01	4,6	2,2
Parapolybia-MP	0,025	0,002	4,9	0,7

Os resultados mostraram que o peptídeo Parapolybia-MP, que possui carga líquida igual a +4, foi o que apresentou a menor razão P/L crítico para a vesícula aniônica. O peptídeo que apresentou o processo de lise mais lento foi a Protonectarina-MP tanto em vesículas PC quanto em PCPG.

4.3 Potencial Zeta

A ligação e acumulação dos peptídeos na superfície das membranas podem ser observadas através das mudanças no potencial zeta. As vesículas PC (100 μ M) e PCPG 7030 (100 μ M) foram adicionadas a concentrações crescentes de peptídeos em tampão Tris/HCl, pH 7,5, e o valor do potencial zeta foi medido. Na ausência de peptídeos, os valores do potencial zeta para as vesículas PC e PCPG são $-2,8 \pm 0,9$ mV e $-28,3 \pm 0,3$ mV, respectivamente, que correspondem ao potencial elétrico entre a vesícula e a solução (bulk) devido a interação das bicamadas com os íons de NaCl.

A figura 9 mostra a variação do potencial zeta de vesículas na ausência e na presença de peptídeos carregados positivamente com as bicamadas lipídicas em estudo. Observou-se que para a mesma concentração de peptídeo a variação do potencial zeta em vesículas aniônicas é mais pronunciada do que com vesículas zwitteriônicas, exceto para o Polybia-MP-3 para o qual a variação total de potencial zeta no intervalo de concentrações de peptídeo estudadas foi semelhante em vesículas zwitteriônicas e aniônicas.

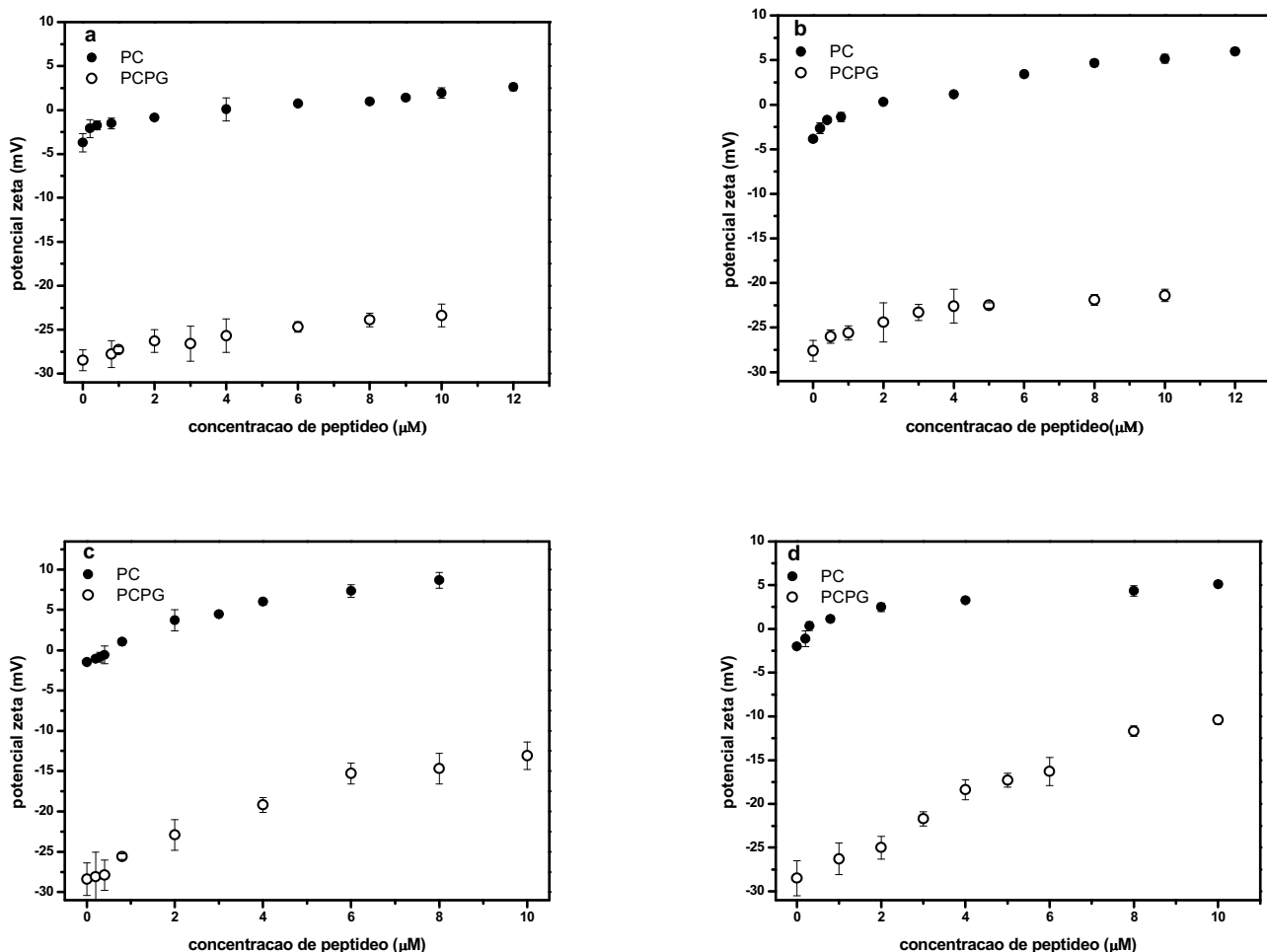


Figura 9: Potencial zeta de vesículas PC e PCPG 7030 em função da concentração de peptídeos à 25°C. A concentração de vesícula foi mantida constante e igual a 100μM. (a) Polybia-MP-3; (b) Polybia-MP-2; (c) Protonectarina-MP; (d) Parapolybia-MP.

Comparando os valores do potencial zeta dos quatro peptídeos em vesículas PC observa-se que há reversão de potencial, devido, provavelmente à presença de sal suporte (NaCl) o potencial da vesícula PC não é zero como esperado, mas tem um valor ligeiramente negativo. À medida que peptídeo é adsorvido na vesícula, o potencial aumenta, e torna-se positivo. Os gráficos de potencial zeta em função da concentração total de peptídeos indicam que a concentração para inverter o potencial é inversamente proporcional à carga do peptídeo. Entretanto, as razões entre estas concentrações e as cargas não são as mesmas, sugerindo que há uma ordem de afinidade que depende

não somente da carga do peptídeo. Em vesículas PCPG 7030, no intervalo de concentrações de peptídeo utilizado, não foi possível observar a reversão do potencial, mas apenas o aumento, e que este é diferente para cada peptídeo.

Utilizando o modelo de Gouy Chapman, como descrito no capítulo anterior e o protocolo proposto por Beschiaschvili e Seelig (1990), foi possível determinar a constante de adsorção (K_{ap}) e o valor da carga efetiva (z_p) dos peptídeos para os dois tipos de membranas em estudo. Os resultados foram mostrados na tabela 6. O algoritmo utilizado nestes cálculos tem como entrada os valores de potencial zeta, a concentração total de peptídeos (c_p) e a concentração total de lipídios (c_L). Os valores de potencial zeta são transformados em potencial na superfície reescrevendo a relação 12:

$$\psi_0 = \frac{\zeta}{e^{(-\kappa d_\zeta)}} \quad 21$$

onde κ é o inverso do comprimento de Debye e d_ζ é a posição da camada de cisalhamento onde o potencial zeta é medido e esta localizada a 2 Å da superfície da vesícula. Usando as equações 12 e 14 do capítulo 3 junto com a lei de conservação das massas pode-se escrever:

$$c_p = c_f + X_b c_L = c_f + K_{ap} c_f c_L \quad 22$$

O algoritmo procura valores de K_{ap} e z_p que satisfazem esta equação. Com estes valores calculam-se as densidades de cargas dadas pelas equações 10 e 11. Os valores de K_{ap} e z_p escolhidos são os que igualam, numericamente, as equações 10 e 11. Alternativamente pode-se utilizar os valores de K_{ap} e de X_b calculado com a equação 14 para estimar C_M e usando a equação 13 obter o potencial zeta usando a equação 12. A comparação deste valor estimado de potencial zeta e o valor medido é utilizada para avaliar o processo de busca para determinar K_{ap} e z_p , pois podem existir mais de um conjunto de soluções.

Na figura 10 são mostrados os gráficos de potencial zeta experimental e o teórico em função da concentração total de peptídeo, para o Protonectarina-MP. O valor teórico foi calculado por meio da maneira alternativa acima descrita, ou seja, gerando uma coleção de valores de K_{ap} e X_b , calculando C_M com a equação 13 e usando a equação 12 para calcular o potencial zeta teórico, sendo que estes valores devem satisfazer a

igualdade das equações 10 e 11. A figura 10 mostra um bom acordo entre os valores experimental e teórico, indicando que a solução de Gouy-Chapman é adequada.

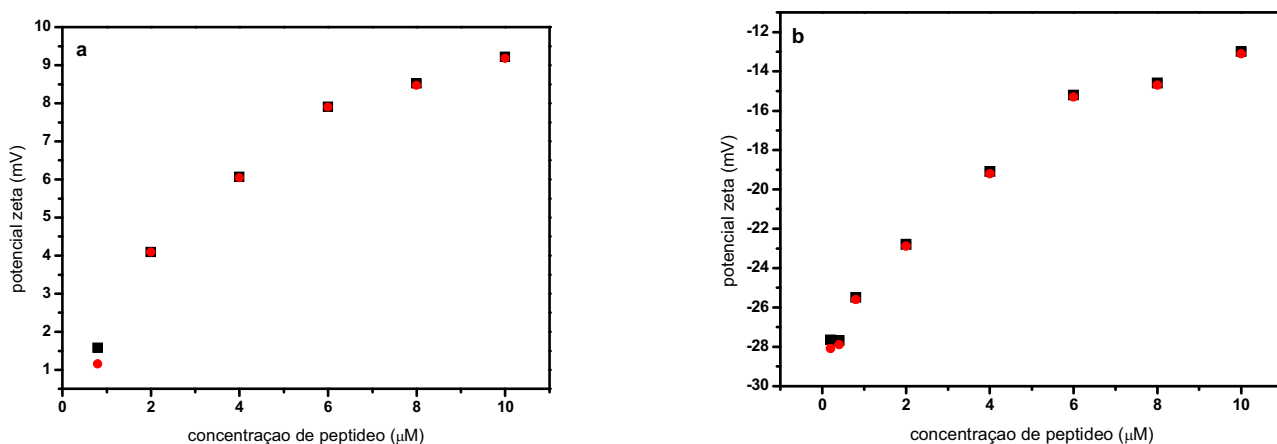


Figura 10: Comparação entre os valores de potencial zeta teórico (em preto) e experimental (em vermelho) em função da concentração de vesículas PC (a) e PCPG 7030 (b), a 25°C, para o peptídeo Protonectarina-MP. A concentração de vesícula foi mantida constante e igual a 100 μM .

Nas tabelas 4 e 5 são mostrados os valores de C_p , C_M , X_b , C_f , K_{ap} , potencial zeta experimental, carga efetiva do peptídeo e densidade superficial de cargas para o Protonectarina-MP em vesículas PC e PCPG 7030 obtidos da solução do modelo de Gouy-Chapman. É interessante notar nestas tabelas que embora os valores da constante de ligação sejam próximos nas duas vesículas as frações molares de peptídeos adsorvidos é praticamente o dobro em PCPG comparado com PC. Após uma determinada concentração de peptídeo adsorvido, a constante de adsorção tende a cair, o que é razoável, devido provavelmente à repulsão eletrostática à medida que a fração de peptídeo adsorvido aumenta. Em vesículas zwitteriônicas a concentração de peptídeos próximos a superfície da bicamada é menor que a concentração de peptídeos livres no “bulk” da solução, enquanto que em vesículas aniônicas aquela concentração é maior que esta. Esta observação sugere que a adsorção em vesículas neutras é dirigida por interação não eletrostática, possivelmente hidrofóbica, enquanto que nas aniônicas é dirigida por interação eletrostática como esperado. Considerando o diâmetro medido da vesícula na interação com o Protonectarina-MP e usando a área do lipídeo como 70 $\text{\AA}^2$, estima-se que cada vesícula seja composta na média por 148000 lipídeo, tendo área externa $4,2 \times 10^{-14} \text{ m}^2$. Para a concentração de peptídeos de 4 μM a fração de Protonectarina-MP ligada a vesícula PC é de 17 peptídeos por 1000 lipídeos, assim

existem aproximadamente 1260 peptídeos ligados à monocamada externa da vesícula. Considerando a carga efetiva média do peptídeo (1,65), a densidade de carga superficial é de 8 mC/m² em excelente acordo com o valor determinado de 8,32 mC/m². Desta forma as soluções encontradas do modelo de Gouy-Chapman estão fisicamente consistentes.

Tabela 4: Valores de C_p , C_M , X_b , C_f , K_{ap} , potencial zeta experimental, carga efetiva do peptídeo e densidade superficial de cargas para o Protonectarina-MP em vesícula PC obtidos da solução de modelo de Gouy-Chapman.

PC							
$C_p(\mu\text{M})$	$C_M(\mu\text{M})$	$X_b(x\ 10^{-3})$	$K_{ap}(x\ 10^3\text{M}^{-1})$	$C_f(\mu\text{M})$	Potencial zeta (mV)	z_p	$\sigma(\text{mC/m}^2)$
0,8	0,39	3,76	10,3	0,42	1,15	1,53	2,19
2	0,66	9,89	14,9	1,01	4,09	2,04	4,70
4	1,33	16,9	12,8	2,3	6,04	1,8	8,32
6	1,83	23,3	12,7	3,67	7,9	1,75	11,04
8	2,62	29,3	11,2	5,07	8,47	1,54	14,03
10	3,33	34,9	10,4	6,5	9,18	1,44	16,6

Tabela 5: Valores de C_p , C_M , X_b , C_f , K_{ap} , potencial zeta experimental, carga efetiva do peptídeo e densidade superficial de cargas para o Protonectarina-MP em vesícula PCPG obtidos da solução de modelo de Gouy-Chapman.

PCPG 7030							
$C_p(\mu\text{M})$	$C_M(\mu\text{M})$	$X_b(x \cdot 10^{-3})$	$K_{ap}(x \cdot 10^3 \text{ M}^{-1})$	$C_f(\mu\text{M})$	Potencial zeta (mV)	z_p	$\sigma(\text{mC/m}^2)$
0,2	0,13	1,76	13,98	0,024	-28,1	1,18	33,5
0,4	0,25	3,39	13,95	0,06	-27,9	0,99	32,7
0,8	0,52	7,37	14,1	0,063	-25,6	1,65	32,1
2	1,2	18,3	15,1	0,17	-22,9	1,69	28,3
4	2,5	34,9	14,2	0,5	-19,2	1,65	22,2
6	3,5	50,2	14,3	0,97	-15,3	1,67	17,2
8	4,55	63,4	14,0	1,66	-14,7	1,36	11,0
10	5,47	76,1	13,99	2,38	-13,1	1,26	5,9

Os valores de constante de partição e carga efetiva para os quatro peptídeos obtidos desta forma estão mostrados na tabela 6.

Tabela 6: Constante de adsorção ($K_{ap} \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) calculado a partir das isotermas do potencial zeta pelo modelo proposto por Beschiashvili and Seelig (1990), como uma função da concentração de peptídeo, em bicamadas aniônicas e zwitteriônicas.

Peptídeo	PC		PCPG 7030	
	K_{ap}	z_p	K_{ap}	z_p
Polybia-MP-3	$31 \pm 0,1$	$0,23 \pm 0,07$	$10,24 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
Polybia-MP-2	$25,9 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,15$	$12,02 \pm 0,06$	$1,1 \pm 0,3$
Protonectarina-MP	$11,5 \pm 0,2$	$1,65 \pm 0,15$	$14,2 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,3$
Parapolybia-MP	$3,76 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,3$	$22,1 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,3$

4.4 Medidas de diâmetro médio das vesículas

A figura 11 mostra os histogramas de distribuição de tamanho de vesículas unilamelares de PC na ausência de peptídeo e na concentração máxima de peptídeo utilizada nos experimentos de potencial zeta. As concentrações máximas utilizadas foram 12 μ M para Polybia-MP-3 e Polybia-MP-2, 8 μ M para Protonectarina-MP e 10 μ M para o Parapolybia-MP. Os histogramas mostram que, na ausência de peptídeos, a suspensão de vesículas obtidas e utilizadas nos nossos experimentos, com LUVs, é homogênea. Na presença de peptídeos Polybia-MP-3 e Polybia-MP-2 em vesículas PC indicando deslocamento da posição do centróide de 15 e 25% respectivamente. Apesar da intensidade da curva do histograma do Polybia-MP-3 diminuir com a adição da máxima concentração de peptídeo, as áreas das duas curvas são muito próximas, portanto não há nenhuma variação na quantidade de vesículas devido a presença do peptídeo.

Os histogramas não apresentam uma variação considerável no tamanho e intensidade para Protonectarina-MP e Parapolybia-MP. Esta figura mostra ainda que sempre existem vesículas intactas em solução após a adição dos peptídeos.

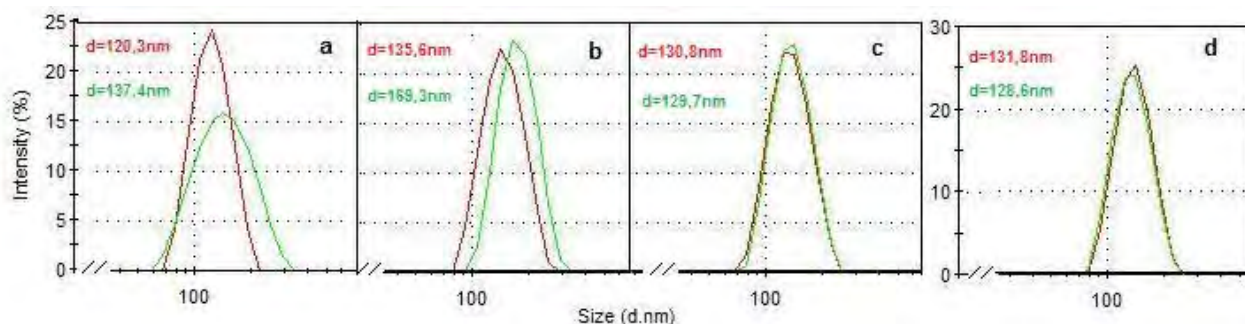


Figura 11: Histograma de distribuição de tamanho da solução LUV PC na ausência de peptídeo (curva vermelha) e na maior concentração de peptídeo (curva verde). (a) Polybia-MP-3, (b) Polybia-MP-2, (c) Protonectarina-MP, (d) Parapolybia-MP.

Os histogramas abaixo ilustram a distribuição de tamanho para vesículas unilamelares grandes de PCPG 7030 na ausência de peptídeo e na concentração de 10 μ M de peptídeo (concentração máxima usada). Verificou-se uma pequena variação no tamanho e localização do centróide das vesículas em estudo com a adição dos

peptídeos Polybia-MP-2 e Polybia-MP-3, isto também pode ser observado na figura 13. No entanto, os peptídeos de 3 e 4 cargas líquidas não alteraram o tamanho das vesículas PCPG 7030, mostrando que a solução é homogênea e constituída de vesículas intactas.

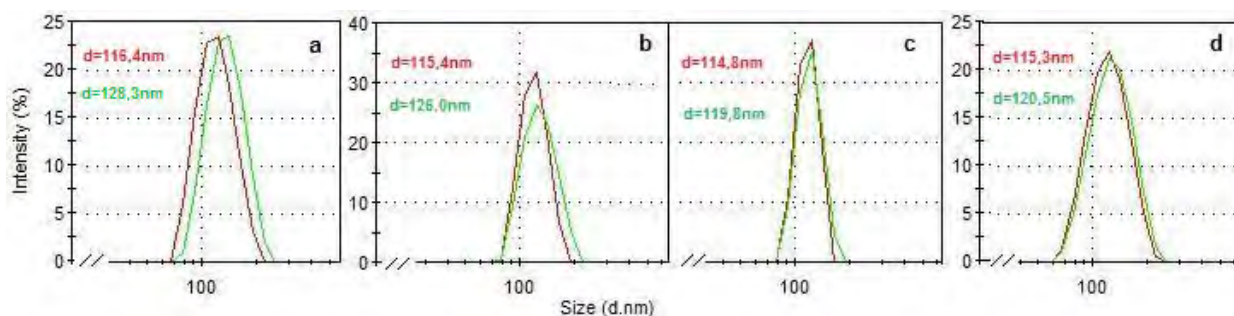


Figura 12: Histograma de distribuição de tamanho da solução LUV PCPG na ausência de peptídeo (curva vermelha) e na maior concentração de peptídeo, 10 μ M, (curva verde). (a) Polybia-MP-3, (b) Polybia-MP-2, (c) Protonectarina-MP, (d) Parapolybia-MP.

O gráfico abaixo mostra que não houve variação do diâmetro das vesículas em estudo em função da concentração crescente dos peptídeos Protonectarina-MP e Parapolybia-MP. No entanto, uma pequena mudança foi observada quando os dois peptídeos de menor carga líquida interagiram com as membranas em estudo.

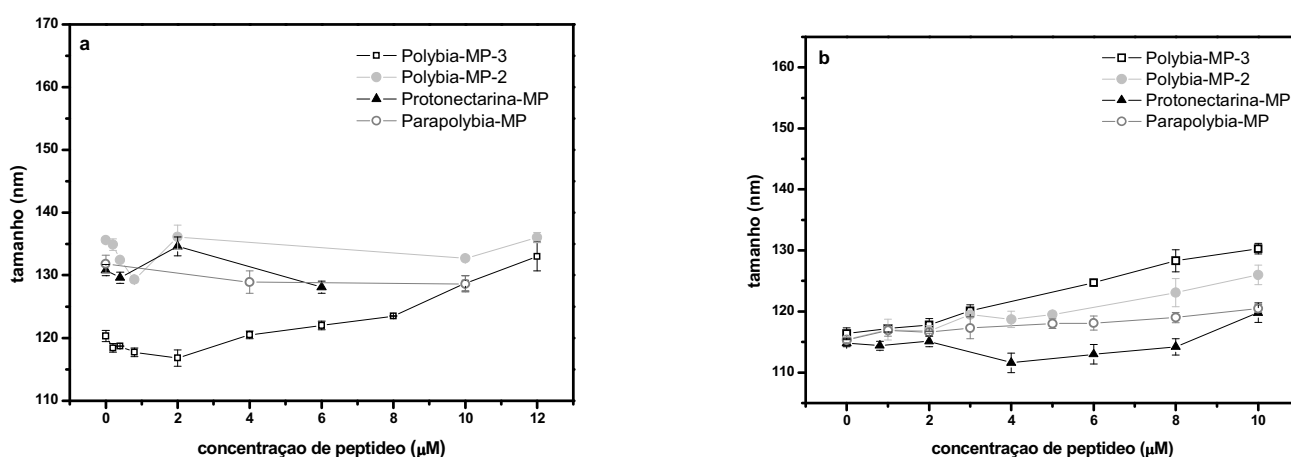


Figura 13: Diâmetro médio das vesículas em função da concentração de peptídeo para as vesículas PC (a) e PCPG 7030 (b). A concentração da vesícula foi mantida constante e igual a 100 μ M.

4.5 Titulações Fluorimétricas

Os espectros de emissão de fluorescência de triptofano do peptídeo em tampão e na presença de concentração crescente de lipídeos são mostrados na figura 14. Observa-se nos espectros um deslocamento espectral seguido de um aumento na intensidade, indicando que o Trp muda para um ambiente menos polar à medida que adiciona-se vesículas.

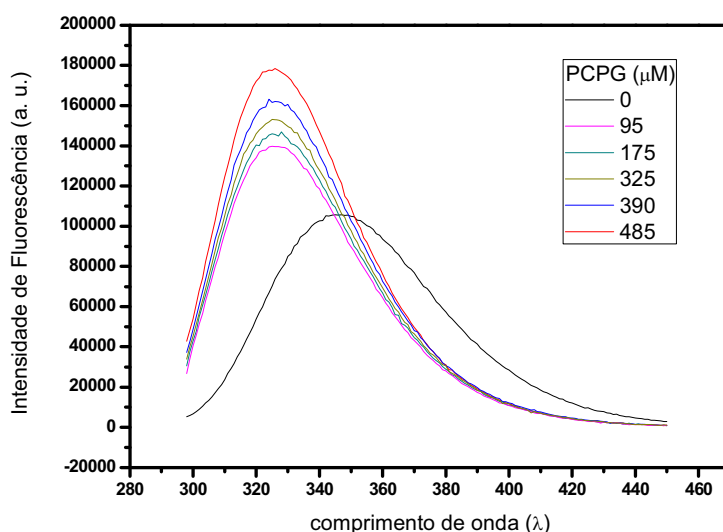


Figura 14: Espectros de emissão de fluorescência do Polybia-MP3 em tampão Tris e em diferentes concentrações de vesícula PC.

Usando o procedimento proposto por Schwarz (2001) e descrito anteriormente, obtivemos boas retas nos gráficos de c_p vs c_L . A regressão linear dessas retas fornece, através da utilização da equação 15, a fração de peptídeo ligado por lipídeo (X_b) e a concentração de peptídeo livre. Esses dados foram exibidos como isotermas de ligação X_b vs c_f . A figura 15 mostra as isotermas de ligação obtida para Polybia-MP-3 e MP-2 em vesículas eletricamente neutras. A isoterma apresenta uma dependência linear para baixos valores de X_b com uma curvatura ascendente para valores maiores desta variável. A dependência linear com concentração de peptídeo para baixa fração de ligação mostra ser caracterizada por um processo de adsorção ideal. Quando uma quantidade crítica de peptídeo é alcançada, os valores de X_b aumentam rapidamente. A curvatura ascendente sugere uma autoassociação dos peptídeos induzida pela bicamada como foi sugerido pelo espectro de CD. Para os outros dois peptídeos que

possuem carga líquida maior as curvaturas decrescentes sugerem que os peptídeos são adsorvidos idealmente na bicamada sem agregação e pode ser descrito pelo modelo de Gouy Chapmann. Os resultados também sugerem que a repulsão eletrostática pode estar dificultando o processo de agregação. Considerando somente o processo ideal nas isotermas de adsorção dos peptídeos de carga mais baixa, todas as isotermas foram analisadas com a equação de Langmuir:

$$X_b = \frac{K_{ap}c_f}{1 + K_{ap}c_f} \approx K_{ap}c_f \quad 23$$

onde K_{ap} é a constante de adsorção aparente. Como nos nossos experimentos foram utilizadas concentrações muito baixas de peptídeos livre, então pudemos utilizar a aproximação expressa na última igualdade. As constantes de adsorção foram obtidas ajustando a curva correspondente à adsorção ideal com uma expressão que leva em consideração a espécie iônica em solução:

$$X_b = \frac{K_{ap}}{\alpha} c_f \quad 24$$

onde α é o coeficiente de atividade iônica e é dado por

$$\ln \alpha = 2z \sinh^{-1}(zbX_b) \quad 25$$

onde b é o parâmetro que leva em consideração a força iônica do meio e é dado por Stankowskii (1991)

$$b = \frac{e^2}{2A_L \kappa \epsilon_0 \epsilon kT} \quad 26$$

onde e é a carga elementar, A_L é a área efetiva do lipídeo (70Å), κ é o comprimento de Debye, ϵ_0 e ϵ são a permissividade elétrica no vácuo e meio, respectivamente e kT a energia térmica. Na concentração de sal igual a 150mM e a 25°C o valor de b é 9,83. As linhas contínuas para as isotermas ideais na figura 15 são os melhores ajustes para os pontos experimentais obtidos com as equações 24, 25 e 26. Observa-se que em

vesículas zwitteriônicas os peptídeos menos carregados e com maior hidrofobicidade média apresentam maior K_{ap} (tabela 7). Este resultado está de acordo com os valores apresentados no experimento de potencial zeta.

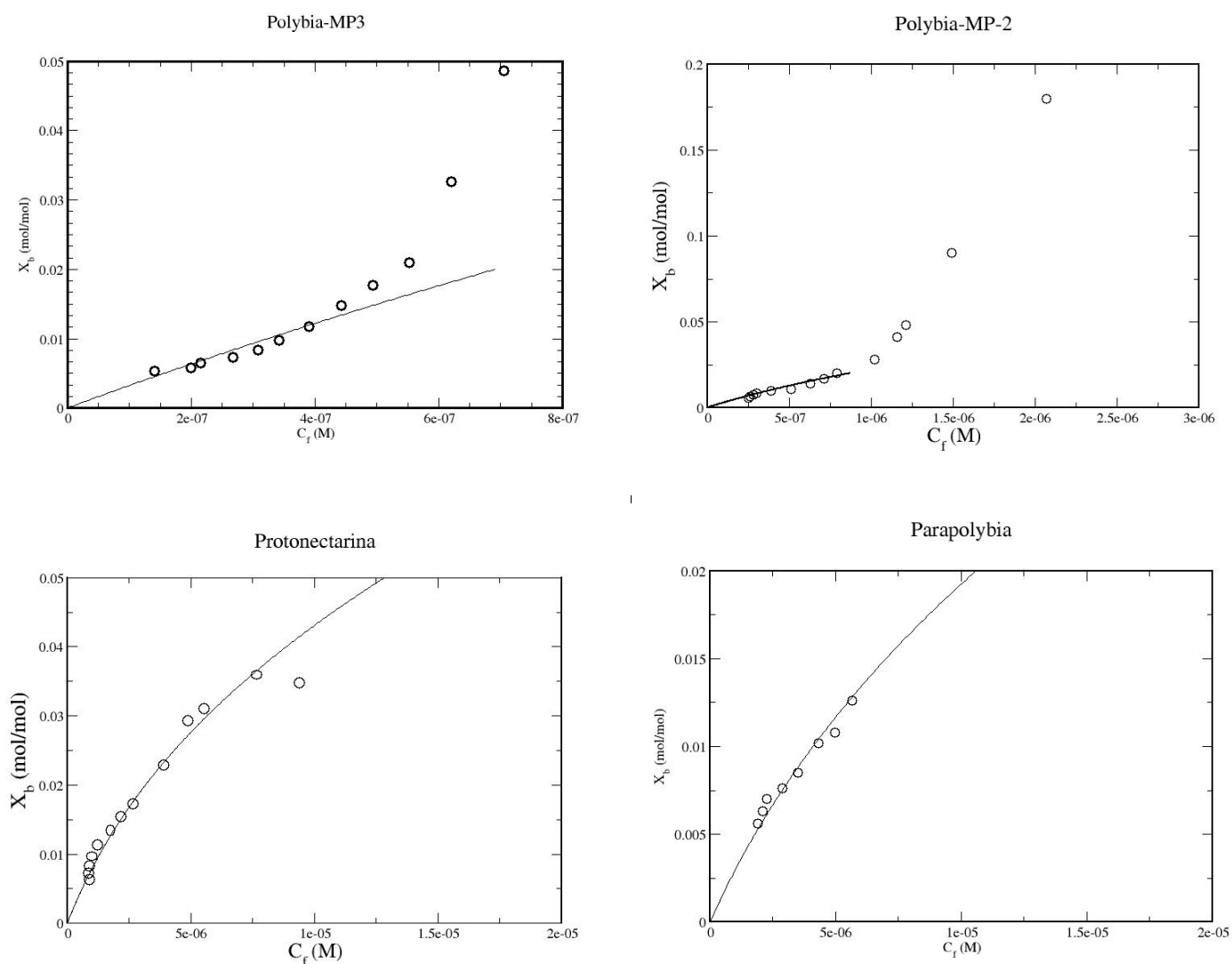


Figura 15: Isothermas de ligação X_b vs c_f para Polybia-MP-3, Polybia-MP-2, Protonectarina-MP e Parapolybia-MP em vesículas PC.

Tabela 7: Constante de adsorção ($K_{ap} \text{ M}^{-1}$) calculado a partir das isotermas de ligação X_b vs c_f , em bicamadas zwitteriônicas.

Peptídeo	PC
	K_{ap}
Polybia-MP-3	30000
Polybia-MP-2	30200
Protonectarina-MP	7260
Parapolybia-MP	2570

4.6 Experimento de Anisotropia de Fluorescência de DPH

Este experimento foi realizado com o objetivo de investigar a perturbação induzida pelos peptídeos no empacotamento das cadeias acílicas das bicamadas fosfolipídicas.

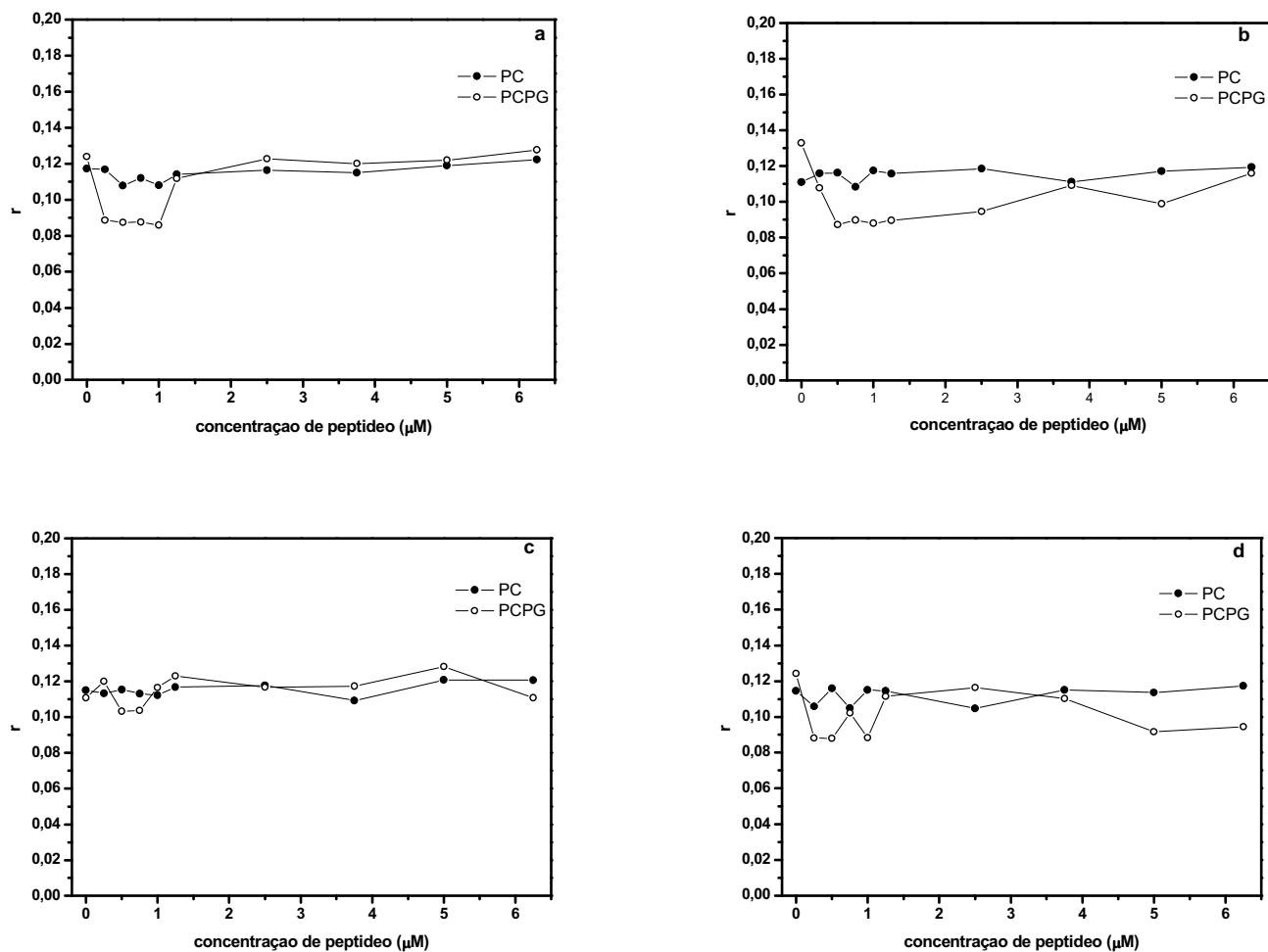


Figura 16: Anisotropia de fluorescência do DPH (r) em função da concentração de peptídeo em LUVs. A concentração do fluoróforo DPH é $X=0,002$. A concentração de lipídeos é de $50\mu\text{M}$ em tampão Tris/HCl, pH 7,5 a 20°C . (a) Polybia-MP-3; (b) Polybia-MP-2; (c) Protonectarina-MP; (d) Parapolybia-MP.

A figura 16 mostra que os quatro peptídeos não induzem mudanças expressivas na fluidez das bicamadas lipídicas PC e PCPG 7030. As pequenas variações de r na vesícula aniônica podem talvez indicar poros formados momentaneamente.

4.7 Experimento de Supressão de Emissão de Fluorescência de Triptofano por Acrilamida

Mudanças conformacionais dos peptídeos quando interagem com bicamadas fosfolipídicas formando hélice- α são consideradas importantes para o peptídeo estabelecer interações com os lipídeos. O resíduo de triptofano pode inserir na fase lipídica para minimizar contato com a fase aquosa. A molécula de acrilamida foi usada como um supressor para o resíduo Trp. A extensão da penetração dos peptídeos na fase hidrofóbica da bicamada pode ser monitorada através das mudanças na acessibilidade da acrilamida ao resíduo de Trp por meio de experimentos de supressão de fluorescência do triptofano por acrilamida, e analisados em gráficos de Stern-Volmer, mostrados na figura 17. Nas concentrações utilizadas no experimento, os gráficos de Stern-Volmer para os peptídeos em tampão não apresentaram na forma linear, sugerindo que além do processo de supressão do Trp devido a interação com membranas existe também uma supressão estática.

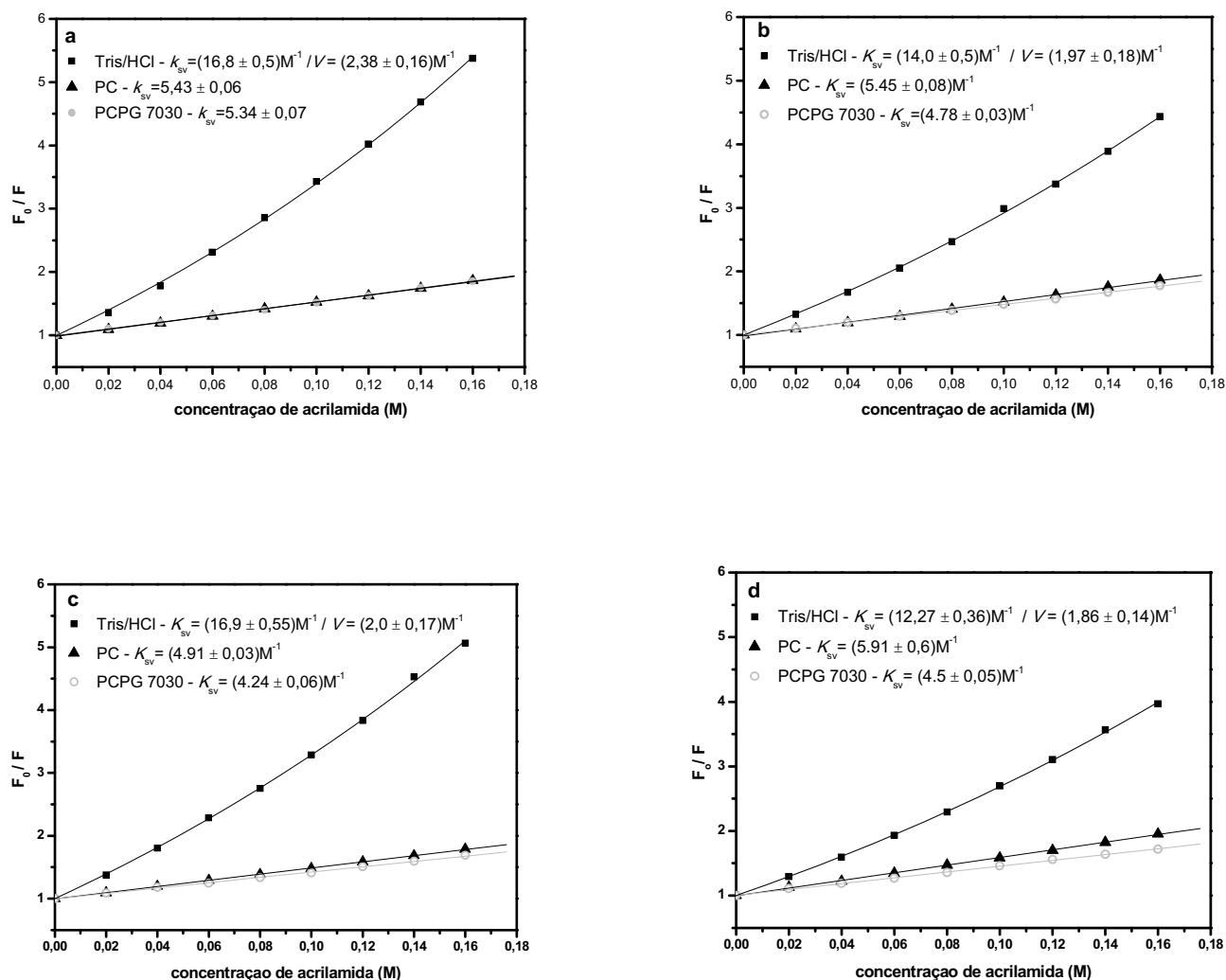


Figura 17: Supressão de fluorescência do Trp por acrilamida, a 25°C. A concentração dos lipídeos é de 500µM em tampão Tris/HCl, pH 7,5. (a) Polybia-MP-3; (b) Polybia-MP-2; (c) Protonectarina-MP; (d) Parapolybia-MP.

A fluorescência do Trp diminui com a adição de acrilamida à solução de peptídeo, na ausência e presença de lipossomos, sem ocasionar qualquer outra modificação nos espectros. Os resultados de supressão da emissão de fluorescência do Trp, mostrados na figura 17, indicam que o valor de k_{sv} diminui na presença PC e PCPG 7030 quando comparado com os valores desta constante na ausência de vesículas, sugerindo que o Trp foi protegido do supressor. Os valores de k_{sv} para vesículas aniônicas é menor quando comparado aos valores obtidos para PC.

Para comparar os dados de supressão, as constantes de Stern-Volmer para cada peptídeo em vesículas (K_{SVL}) foram normalizadas pelo respectivo valor em tampão (K_{SVT}) e os resultados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Razão entre as constantes de Stern-Volmer em vesículas (K_{SVL}) e em tampão (K_{SVT}).

	K_{SVL}/K_{SVT}	
	PC	PCPG 7030
Polybia-MP-3	0,32	0,32
Polybia-MP-2	0,39	0,34
Protonectarina-MP	0,29	0,25
Parapolybia-MP	0,48	0,37

Uma vez que a acrilamida é acessível a todas as espécies de triptofano em solução, com exceção das enterradas na fase lipídica das bicamadas (Mishra et al., 1994) essa constante normalizada representa a fração de intensidade de fluorescência remanescente depois da incorporação do fluoróforo na bicamada e qualitativamente estima a afinidade peptídeo-lipídeo. Os resultados apresentam a seguinte ordem: para vesículas zwitteriônica e aniônicas foi Protonectarina-MP < Polybia-MP-3 < Polybia-MP-2 < Parapolybia-MP.

Os valores mostrados na tabela 8 indicam que todos os peptídeos estudados têm seus resíduos de triptofano protegidos pela bicamada e esta proteção é diferente para cada peptídeo. Polybia-MP-3 apresenta a mesma proteção nas duas vesículas estudadas. A maior proteção foi observada para o Protonectarina-MP, enquanto que o resíduo mais exposto foi observado para o Parapolybia-MP.

5. DISCUSSÃO

Os quatro peptídeos usados no estudo apresentam o terminal-C amidado, de dois a três resíduos de lisina e resíduos de ácido aspártico, exceto o Parapolybia-MP que apresenta carga líquida +4 devido à não presença de resíduos ácidos (Tabela 1). Resultado prévio em atividade biológica tem mostrado que os peptídeos apresentam atividade multifuncional, incluindo atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*, hemolítica e atividade de desgranulação de mastócitos (Souza et al., 2009). Para avaliar a interação peptídeo-lipídeo foram utilizadas técnicas de fluorescência, espectroscopia de dicroísmo circular e medidas de potencial zeta.

Análises de dicroísmo circular em diferentes meios mostraram que os peptídeos em estudo sofrem uma importante mudança conformacional, de random coil em soluções aquosas para estruturas helicoidais em meios contendo vesículas. Para cada peptídeo o teor helicoidal depende do ambiente e também da propensão helicoidal individual dos resíduos (Blondelle et al., 1997; Deber & Li, 1995). As conformações induzidas nas interações lipídeo-peptídeo são importantes para as funções biológicas dos peptídeos (Blondelle et al., 1997). As propriedades biofísicas, tais como, estrutura secundária, carga e hidrofobicidade influenciam as interações de peptídeos com membranas modelo. As tendências para formar estruturas anfipáticas com uma face hidrofóbica bem definida favorecem a interação dos peptídeos com as membranas zwitteriônicas e aniônicas. A face hidrofóbica desses peptídeos pode interagir com as cadeias acílicas dos fosfolipídeos, enquanto os aminoácidos carregados e o terminal amidado podem interagir com as cargas localizadas na superfície da membrana celular.

Os quatro peptídeos em estudo apresentaram conformações helicoidais quando interagiram com membranas modelos, exceto Parapolybia-MP em meio zwitteriônico. A seletividade dos peptídeos catiônicos às vesículas aniônicas é provavelmente devido à interação eletrostática, evidenciada pelas altas helipticidades observadas nos espectros correspondentes e também encontrados em outros mastoparanos (dos Santos Cabrera et al., 2008). A importância da interação eletrostática na estabilização da conformação helicoidal é revelada pela diferença observada na fração de hélice- α entre vesículas aniônicas e zwitteriônicas, como também foi observado para outros peptídeos catiônicos (Dathe et al., 2001; Blondelle et al., 1999).

Deber & Li (1995) e Wieprecht et al. (1997) encontraram que o teor helicoidal de um peptídeo em ambientes que mimetizam aquele das membranas é diretamente

proporcional à hidrofobicidade. No entanto, nos nossos experimentos não observamos uma relação direta entre a porcentagem de hélice, a hidrofobicidade e a carga líquida dos peptídeos. Isto indica que existem outros fatores que devem ser considerados, como por exemplo, a posição relativa dos resíduos carregados ao longo da sequência. O peptídeo Polybia-MP-3 apesar de possuir caráter hidrofóbico, atividade antimicrobiana e carga menores comparados ao peptídeo Polybia-MP-2 apresenta uma quantidade de hélice- α maior. Os peptídeos Polybia-MP-3 e MP-2 possuem dois resíduos de Lys (K5 e K8) e um resíduo ácido de Asp (D12) situados na mesma posição, o que difere esses dois peptídeos é a substituição do resíduo ácido na posição 2 pela asparagina no Polybia-MP-2. Esta substituição reduz o conteúdo helicoidal em 11% e 36% em vesículas zwitteriônicas e aniônicas, respectivamente. A presença de mais um aminoácido carregado negativamente no Polybia-MP-3 ajuda não só na neutralização das cargas positivas, mas especialmente por possibilitar formação de ponte de hidrogênio com resíduos básicos de Lys, que estão distribuídos em posições i e $i+3$ ou i e $i+4$ favorecendo a estabilidade da hélice- α .

Os peptídeos Protonectarina-MP e Parapolybia-MP além de possuírem hidrofobicidade negativa ainda possuem um arranjo de cargas positivas muito próximas que contribuem assim para uma repulsão eletrostática e conseqüentemente uma fração de hélice- α menor. A substituição L7A no Parapolybia-MP favorece o aumento do conteúdo de hélice- α do peptídeo de carga líquida igual a +3, pois a propensão helicoidal do resíduo de leucina é maior que a alanina (Blondelle et al., 1997). A presença de um resíduo de ácido aspártico na posição 8 do Protonectarina-MP também contribui para helipticidade maior comparada ao peptídeo de carga líquida +4, pois este resíduo pode vir a formar ponte de hidrogênio com o resíduo de Lys na posição i e $i+3$.

A ausência de hélice do Parapolybia-MP em vesículas zwitteriônicas deve-se ao fato deste peptídeo não possuir nenhum resíduo negativo, que ajudaria na neutralização das cargas positiva, e ainda sua hidrofobicidade negativa e baixa afinidade por vesículas eletricamente neutras.

A atividade lítica dos peptídeos foi estudada em membranas modelos zwitteriônicas e aniônicas na análise de liberação do corante fluorescente do interior das vesículas. No presente estudo, o mecanismo de ação é representado por uma dependência sigmoideal, que é característico de processos cooperativos e mostra a existência de uma concentração crítica de peptídeo necessária à indução de vazamento das vesículas. Modelos desenvolvidos por Huang e Matsuzaki para o poro toroidal

(Huang, 2000; Chen, 2003; Matsuzaki, 1999a) e por Shai para o mecanismo carpete ou detergente (Oren & Shai, 1998) para explicar o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos partem de um acúmulo de moléculas do peptídeo na superfície da membrana para início do processo lítico. A razão crítica P/L representa a concentração máxima de peptídeos que a membrana pode acumular antes de romper e iniciar o vazamento do conteúdo das vesículas como um modo de aliviar a tensão superficial (Brochard-Wyart et al., 2000).

O peptídeo com carga líquida menor, Polybia-MP-3, apresentou baixas razões críticas com aproximadamente os mesmos valores de P/L crítico para vesículas aniônicas e zwitteriônicas. Para o Polybia-MP-2 a razão crítica P/L é pouco menor em vesículas aniônicas, que está de acordo com a sua baixa concentração inibitória para bactérias Gram+ e Gram-. A alta hidrofobicidade e conteúdo helicoidal destes peptídeos de carga líquida baixa foram responsáveis pela alta atividade lítica em vesículas eletricamente neutras.

O peptídeo Protonectarina-MP foi o que apresentou menor atividade lítica em ambas vesículas com os maiores valores de EC_{50} . A baixa interação deste peptídeo se deve também a sua baixa hidrofobicidade e elipticidade.

O Parapolybia-MP é o peptídeo com maior seletividade, com apenas 0,2 μ M de peptídeo interagindo com vesículas aniônicas observou-se um vazamento muito significativo. Enquanto que em vesículas zwitteriônicas é necessária uma quantidade maior que 2,5 μ M de peptídeo para evidenciar um extravasamento. Isso mostra que este peptídeo com carga líquida maior tem preferência para interagir com membranas aniônicas. A interação dos quatro peptídeos com vesículas aniônicas e zwitteriônicas apresentam uma atividade cooperativa, isto também foi observado para o mastoparano Polybia-MP1 (dos Santos Cabrera et al., 2008). O mecanismo de formação de poros descrito como tipo “carpete” (Shai, 1999) parece não se aplicar a nenhum dos quatro peptídeos, pois a indução de vazamento, tanto em vesículas zwitteriônicas ou aniônicas, acontece em baixíssimas concentrações de peptídeo.

As concentrações de EC_{50} observadas no experimento de vazamento são muito pequenas quando comparadas as concentrações para hemólise (tabela 9). A atividade lítica em ambas vesículas mostrou que os peptídeos menos carregados e mais hidrofóbicos têm os menores valores de EC_{50} . Os valores de EC_{50} para vazamento em PC e para hemólise em WRRBC não estão bem correlacionados, pois os mais eficientes em vesículas foram os menos hemolíticos.

Tabela 9: Características estruturais e atividade biológica dos peptídeos. Q, <H>, f_H , EC_{50} para hemólise, CIM (μM) *S. aureus*, CIM (μM) *E. coli*, correspondem respectivamente, a carga líquida, hidrofobicidade média, fração de hélice- α determinada em vesículas PCPG 7030, EC_{50} atividade hemolítica em células vermelhas de sangue de rato (μM), e valores de concentração inibitória mínima (μM) contra bactérias *S. aureus* (Gram+) e contra *E. coli* (Gram-).

	Q	<H>	f_H	EC_{50} (μM) WRRBC	CIM (μM) <i>S. aureus</i>	CIM (μM) <i>E. coli</i>
Polybia-MP-3	+1	0,06	0,42	50 ¹	19 ¹	38 ¹
Polybia-MP-2	+2	0,08	0,27	50 ¹	2 ¹	5 ¹
Protonectarina-MP	+3	-0,05	0,39	34 ²	2,5 ²	5 ²
Parapolybia-MP	+4	-0,03	0,27	37 ²	1,8 ²	2,4 ²

¹ Souza BM et al., 2009; ² Souza BM et al., 2010.

O caráter catiônico dos peptídeos e o seu alvo preferencial para superfície de membranas possibilitam que a ligação e acumulação sejam acessíveis e comparadas pela mudança no potencial zeta. As constantes de ligação obtida através do experimento de potencial zeta são da mesma ordem de grandeza que as encontradas pela titulação fluorimétrica. O experimento de potencial zeta nos permite também calcular a energia livre eletrostática da interação peptídeo-bicamada aniônica.

A energia livre de adsorção (ΔG_{ads}) da interação peptídeo-lipídeo foi calculada da seguinte forma:

$$\Delta G_{ads} = -RT \ln(K_p 55,5) \quad 27$$

onde RT é a energia térmica e o fator 55,5 é a concentração molar da água que corrige para a contribuição do solvente. As energias livres de adsorção mostrada na tabela 10 variam de -7,8 a -8,3 kcal/mol.

A energia livre eletrostática pode ser calculada assim

$$\Delta G_{el} = -RT \ln \left(\frac{C_M}{C_f} \right) \quad 28$$

onde C_M e C_f são obtidos da análise dos dados experimentais de potencial zeta usando o modelo de Gouy-Chapmann.

A energia não eletrostática, que será referida genericamente como hidrofóbica ($\Delta G_{\text{hidrofóbica}}$), que está relacionada às contribuições energéticas das interações fracas estabelecida no contato peptídeo- lipídeo foi calculada usando:

$$\Delta G_{\text{hidrofóbica}} = \Delta G_{\text{ads}} - \Delta G_{\text{el}} \quad 29$$

Os valores desta contribuição encontram-se na tabela 10.

Os experimentos mostraram que a ligação dos peptídeos em vesícula PC deve-se mais a interações hidrofóbicas, pois a concentração de peptídeos próximos a superfície da bicamada é menor que a concentração de peptídeos livres no “bulk” da solução. Observa-se, então, que a interação peptídeo-lipídio, tanto para vesículas zwitteriônicas quanto aniônicas, é dirigida pela contribuição hidrofóbica. Na presença de vesícula aniônica esta energia é aproximadamente 90% da energia de adsorção. Os resultados da tabela 10 mostraram que a energia livre de adsorção é diretamente relacionada com a carga líquida do peptídeo. O peptídeo Parapolybia-MP apesar de possuir carga líquida maior apresenta uma contribuição eletrostática baixa, isto se deve a presença de quatro resíduos básicos que contribuem para repulsão eletrostática entre os mesmos e diminuindo então a atração eletrostática entre o peptídeo e a bicamada.

Tabela 10: Comparação das energias de contribuição para os peptídeos em estudo em interação com vesícula aniônica.

Peptídeo	ΔG_{ads} (kcal/mol)	ΔG_{el} (kcal/mol)	$\Delta G_{hidrofobica}$ (kcal/mol)
Polybia-MP-3	-7,8	0,06	- 7,7
Polybia-MP-2	-7,9	-1,2	- 6,7
Protonectarina-MP	-8,0	-0,5	- 7,5
Parapolybia-MP	-8,3	-0,5	- 7,8

O peptídeo Polybia-MP-3 apresentou uma constante de adsorção em vesículas PC três vezes maior que em vesícula PCPG e a concentração limiar para ocorrer o vazamento e a fração de peptídeo ligado por lipídeo total (X_b) (tabela 11) são praticamente os mesmos nas duas vesículas.

A constante aparente de adsorção do peptídeo Polybia-MP-2 em vesículas neutras é o dobro que em vesículas aniônicas, o que deve ser provavelmente devido a sua carga líquida relativamente baixa (+2) e alta hidrofobicidade. Estes resultados juntamente com os experimentos de vazamento sugerem que o peptídeo acumula em vesículas eletricamente neutras, interagindo melhor com vesículas PC.

O peptídeo Protonectarina-MP mostrou uma constante aparente de adsorção maior em bicamadas aniônicas, que está de acordo com sua alta fração de hélice- α nesta mesma vesícula e também a sua baixa hidrofobicidade.

O experimento de potencial zeta provou mais uma vez a alta seletividade do peptídeo Parapolybia-MP, a constante aparente de adsorção em vesículas PCPG é aproximadamente seis vezes maior que a mesma em vesículas PC. Estes resultados estão de acordo com a sua carga maior, baixa hidrofobicidade, alta fração de hélice- α em PCPG e baixa razão P/L crítica na mesma bicamada.

A partir das constantes de adsorção obtidas no experimento de potencial zeta foi possível calcular a fração de peptídeo ligado por lipídeo total (X_b) e os resultados estão dispostos na tabela 11.

Tabela 11: Valores de X_b calculado através das constantes de adsorção obtida no experimento de potencial zeta.

Peptídeo	X_b em PC	X_b em PCPG 7030
Polybia-MP-3	0,005	0,003
Polybia-MP-2	0,006	0,004
Protonectarina-MP	0,016	0,006
Parapolybia-MP	0,007	0,001

Os dados de X_b estão de acordo com os valores de P/L crítico, como era esperado, o peptídeo Protonectarina-MP apresenta os maiores valores de P/L crítico e os maiores X_b . Comparando os valores de X_b em PC e PCPG observa-se que os peptídeos com alta carga líquida apresentaram as maiores diferenças entre os X_b , enquanto que os peptídeos com carga baixa mostraram valores de X_b muito próximos. Os altos valores da fração de peptídeo ligado por lipídeo total, em vesícula PC, estão de acordo com a baixa cooperatividade observada para os peptídeos Protonectarina-MP e Parapolybia-MP.

Os peptídeos primeiro ligam e depois inserem nas membranas. A inserção é acompanhada pelo aumento da ordem das cadeias acílicas. Este ordenamento é observado pelo aumento de empacotamento lipídico, assim diminuindo a difusão lateral lipídica (Holopainen JM et al., 1997). Nos resultados obtidos no experimento de anisotropia de fluorescência de DPH observamos que para os quatro peptídeos em estudo não há uma mudança significativa na anisotropia de fluorescência desta sonda em vesículas PC. Já em vesículas PCPG 7030 observa-se uma pequena variação na anisotropia na região da concentração de peptídeo limiar para ocorrer o vazamento, mas esta variação é muito pequena para considerarmos significativa. Esta ausência de variação em vesículas zwitteriônicas e aniônicas se deve ao fato que a sonda fluorescente fica localizada na região central das cadeias acílicas nas bicamadas lipídicas.

As constantes de Stern-Volmer normalizadas mostram que o peptídeo Polybia-MP-3 possui a mesma afinidade em relação às vesículas aniônicas e zwitteriônicas, enquanto todos os outros três peptídeos mostram uma maior afinidade por membranas aniônicas. O peptídeo Protonectarina-MP possui as menores constantes normalizadas indicando que dentre os quatro peptídeos este é o que penetra mais.

Segundo Blondelle et al., (1992) a diminuição da hidrofobicidade acarreta um aumento da atividade antimicrobiana e uma diminuição da atividade hemolítica. Mas, entretanto, estas correlações não são observadas para o peptídeo Polybia-MP-2, pois este possui a maior hidrofobicidade e apresenta a menor atividade hemolítica e a mais baixa concentração inibitória mínima, portanto maior atividade antimicrobiana. O peptídeo Polybia-MP-3 possui hidrofobicidade alta, mas uma atividade hemolítica baixa comparada aos peptídeos de maior carga. Os mastoparanos com maiores cargas não mostram a correlação que Blondelle (1992) observou entre a hidrofobicidade e a atividade hemolítica.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conteúdo helicoidal observado para os quatro peptídeos interagindo com membranas modelos zwitteriônicas é praticamente o mesmo. Já quando estes interagem com vesículas aniônicas o maior conteúdo observado é para Polybia-MP-3 que possui apenas uma carga líquida. Mostrando que a quantidade de hélice- α não depende somente da carga dos peptídeos catiônicos, mas também da sua hidrofobicidade e localização dos aminoácidos carregados. Os peptídeos de carga líquida menor apresentaram a maior atividade lítica em PC, com a razão P/L muito baixa, enquanto que em PCPG quem se destacou foi o peptídeo com maior carga. A alta hidrofobicidade e conteúdo helicoidal dos peptídeos de carga líquida baixa foram responsáveis pela alta atividade lítica em vesículas eletricamente neutras. Considerando os valores de X_b os peptídeos Polybia-MP-3 e MP-2 apresentam a mesma seletividade para vesículas PCPG 7030. O peptídeo Parapolybia-MP apresentou a maior seletividade entre as vesículas em estudo. A adsorção de peptídeos com carga líquida menor em vesículas zwitteriônicas é favorecida em relação aos de carga maior e o inverso é observado quando os peptídeos interagem com membranas aniônicas. Os peptídeos de carga líquida maior interagem mais com vesículas aniônicas provavelmente devido a sua baixa hidrofobicidade e a alta carga líquida. Os cálculos de energia livre de interação mostraram que a contribuição da energia eletrostática é desfavorável para o peptídeo Polybia-MP-3. Para todos os peptídeos a contribuição hidrofóbica dirige a interação peptídeo-lipídeo em ambas vesículas estudadas. Este trabalho mostra os primeiros resultados das interações peptídeo-lipídeo para os peptídeos Polybia-MP-3, Polybia-MP-2, Protonectarina-MP e Parapolybia-MP em vesículas zwitteriônicas e aniônicas, pois os resultados presentes na literatura, até o momento, são de dados biológicos.

7. AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a orientação, dedicação, paciência e amizade dos professores João Ruggiero Neto e Marcia Perez dos Santos Cabrera.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Aos amigos pelas horas de estudos juntos e companheirismo.

Aos meus familiares, pelo amor, respeito e dedicação.

Ao Carlos pelo amor, paciência e incentivo.

A Capes pelo apoio financeiro durante parte do mestrado.

8. REFERÊNCIAS

Beschiaschvili, G. e Seelig, J. 1990. Peptide binding to lipid bilayers. Binding isotherms and ζ -potential of a cyclic somatostatin analogue. *Biochemistry*. 1990, Vol. 29, 10995-11000.

Bilo, B. M., et al. 2005. Interest group on insect venom Hypersensitivity. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*. 2005, Vol. 60, 1339-1349.

Blondelle, S. E. e Houghten, R. A. 1992. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochemistry*. 1992, Vol. 31, 12688-12694.

Blondelle, S. E., et al. 1997. Secondary structure induction in aqueous vs membrane-like environments. *Biopolymers*. 1997, Vol. 42, 489-498.

Blondelle, S. E., Lohner, K. e Aguillar, M. I. 1999. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochim. Biophys. Acta*. 1999, Vol. 1462, 89-108.

Brochard-Wyart, F., De Gennes, P. G. e Sandre, O. 2000. Transient pores in stretched vesicles: role of leakout. *Physica A*. 2000, Vol. 278, 32-51.

Brogden, K. A. et al. 2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2003, Vol. 22, 465-478.

Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. 2005, Vol. 3, 238-250.

Chen, F. Y., Lee, M. T. e Huang, H. W. 2002. Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on Alamethicin. *Biophys. J.* 2002, Vol. 82, 908-914.

Chen, F. Y., Lee, M. T. e Huang, H. W. 2003. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptideinduced pore formation. *Biophys. J.* 2003, Vol. 84, 3751-3758.

Daher, F. E., et al. 2003. Acute renal failure after massive honeybee stings. *Ins. Med. Trop. São Paulo.* 2003, Vol. 45, 45-50.

Dathe, M. et al. 2001. Optimization of the antimicrobial activity of Magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* 2001, Vol. 501, 146-150.

Dathe, M. et al. 2002. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002, Vol. 1558, 171-186.

Deber, C. M. e Li, S. C. 1995. Peptides in membranes: helicity and hydrophobicity. *Biopolymers.* 1995, Vol. 37, 295-318.

Dos Santos Cabrera, M. P. et al. 2008. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. *Eur Biophys J.* 2008, Vol. 37, 879-891.

Eftink, M. R. e Ghiron, C. A. 1976. Fluorescence quenching of indole and model micelle systems. *The Journal of Physical Chemistry.* 1976, Vol. 80, 486-493.

Eisenberg, D. et al. 1984. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* 1984, Vol. 179, 125-142.

Ivanova, P. T. et al. 2001. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of changes in phospholipids in RBL-2H3 mastocytoma cells during degranulation. *PNAS.* 2001, Vol. 98, 7152-7157.

Hancock, R. E., Falla, T. e Brown, M. 1995. Cationic bactericidal peptides. *Adv. Microb. Physiol.* 1995, Vol. 37, 135-175.

Hancock, R. E. W. e Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* 2000, Vol. 8, 402-410.

Harroun, T. A. et al. 1999. Theoretical Analysis of Hydrophobic Matching and Membrane-Mediated Interactions in Lipid Bilayers Containing Gramicidin. *Biophys. J.* 1999, Vol. 76, 3176-3185.

Hirata, Y., Nakahata, N. e Ohizumi, Y. 2000. Identification of a 97kDa mastoparan-binding protein involving in Ca^{2+} release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Mol. Pharmacol.* 2000, Vol. 57, 1235-1242.

Holopainen, J. M., Lehtonen, J. Y. A. e Kinnunen, P. K. J. 1997. Lipid microdomains in dimyristoylphosphatidylcholine-ceramide liposomes. *Chem. Phys. Lipids.* 1997, Vol. 88, 1-13.

Huang, H. W. 2000. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry.* 2000, Vol. 39, 8347-8352.

Huang, H. W., Chen, F. Y. e Lee, M. T. 2004. Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. *Phys. Rev. Lett.* 2004, Vol 92, 198304.

Lakowicz, J. R. 1999. Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Kluwer Academic/Plenum, New York.* 1999

Matsuzaki, K. 1999a. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and Tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999, Vol. 1462, 1-10.

Matsuzaki, K., Sugishita, K. e Miyajima, K. 1999b. Interactions of an antimicrobial peptide, Magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative Bacteria. *FEBS Lett.* 1999, Vol. 449, 221-224.

Monteiro, M. C., Romao, P. R. T. e Soares, A. M. 2009. Pharmacological perspectives of wasp venom. *Protein & Peptide letters.* 2009, Vol. 16, 944-952.

Mishra, V. K. et al. 1994. Interactions of synthetic peptides analogs of class A amphipathic helix with lipids. *J. Biol. Chem.* 1994, Vol. 269, 7185-7191.

Oren, Z. e Shai, Y. 1998. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers.* 1998, Vol. 47, 451-463.

Parisien, A. et al. 2008. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology.* 2008, Vol. 104, 1-13.

Pfeiffer, D. R. et al. 1995. The peptide mastoparan is a potent facilitator of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 1995, Vol. 270, 4923-4932.

Powers, J. P. S. e Hancock, R. E. W. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides.* 2003, Vol. 24, 1681-1691.

Puech, P. H. et al. 2003. Line thermodynamics: adsorption at a membrane edge. *Phys. Rev. Lett.* 2003, Vol. 90, 128304.

Rohl, C. A. e Baldwin, R. L. 1998. Deciphering rules of helix stability in peptides. *Methods in Enzymol.* 1998, Vol. 295, 1-26.

Schwarz, G. e Reiter, R. 2001. Negative cooperativity and aggregation in biphasic binding of mastoparan x peptide to membranes with acidic lipids. *Biophys. Chem.* 2001, Vol. 90, 269-277.

Seelig, J. 2004. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim Biophys Acta.* 2004, Vol. 1666, 40-50.

Shai, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999, Vol. 1462, 55-70.

Souza, B. M. et al. 2009. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. *Peptides*. 2009, Vol. 30, 1387-1395.

Souza, B. M. et al. 2010. Investigating the effect of different positioning of lysine residues along the peptide chain of mastoparans for their secondary structures and biological activities. *Amino Acids On line*. 2010, DOI 10.1007/s00726-010-0481-y

Stankowski, S. 1991. Surface charging by large multivalent molecules: extending the standard Gouy Chapman treatment. *Biophys. J.* 1991, Vol. 60, 341-351.

Triggiani, M. et al. 2000. Lipid mediators from mast cells and basophils in allergic diseases. In: Mast cells and basophils. *New York: Academic Press*. 2000, 525-539.

Wakamatsu, K. et al. 1992. Membrane-bound conformation of Mastoparan-X, a G-protein-activating peptide. *Biochemistry*. 1992, Vol. 31, 5654-5660.

Wieprecht, T. et al. 1997. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of Magainin 2 Amide in interaction with membranes. *Biochemistry*. 1997, Vol. 36, 6124-6132.

Yang, L. et al. 2001. Barrel-stave model or toroidal model ? A case study on Melittin pores. *Biophys. J.* 2001, Vol. 81, 1475-1485.

Yeaman, M. R. e Yount, N. Y. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 2003, Vol. 55, 27-55.

Zaslloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002, Vol. 415, 389-395.

Zidovevetski, R., et al. 2003. Transmembrane domains in the functions of fc receptors. *Biophys. Chem.* 2003, Vol. 100, 555-575.