

Diego Oliveira Nolasco da Silva

Estudos Estruturais por Dinâmica Molecular do Peptídeo
Polybia-MPI via *Replica Exchange*

Tese de doutorado para a obtenção do título de doutor em Biofísica Molecular, área de concentração Biofísica Molecular, apresentada ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Chahine

São José do Rio Preto
2010

Silva, Diego Oliveira Nolasco da.

Estudos estruturais por dinâmica molecular do peptídeo polybia-mpi via *Replica Exchange* / Diego Oliveira Nolasco da Silva. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2010.

70 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Jorge Chahine

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica molecular. 2. Proteínas - Estrutura. 3. Dinâmica molecular. 4. Energia livre. I. Chahine, Jorge. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.32

Diego Oliveira Nolasco da Silva

Estudos Estruturais por Dinâmica Molecular do Peptídeo Polybia-MPI via *Replica Exchange*

Tese apresentada para obtenção do título de doutor em Biofísica Molecular, área de concentração Biofísica Molecular, apresentada ao Departamento de Física do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Jorge Chahine
Livre Docente
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Dr. Alexandre Suman de Araujo
Doutor
USP – Ribeirão Preto

Dr. Leandro Cristante de Oliveira
Doutor
UnB – Brasília

Prof. Dr. José Roberto Ruggiero
Livre Docente
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Sidney Jurado de Carvalho
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 26 de outubro de 2010.

Dedico este trabalho aos amores da minha vida:

Mama, vó Luiza, tia Josi e Bruna.

Amo vocês!

Agradecimentos

Ao prof. Dr. Jorge Chahine por reger a sinfonia da pesquisa sem interferir na forma com a qual eu tocava cada acorde. Obrigado Maestro!

Ao prof. Dr. José Roberto Ruggiero pelos esclarecimentos indispensáveis acerca de cada simulação, pelas dicas e pela estrutura computacional.

Ao prof. Dr. João Ruggiero Neto pelos artigos trocados e pelas dúvidas sanadas, mesmo durante os churrascos do Departamento.

Ao prof. Dr. Vitor Barbanti Pereira Leite pela estrutura computacional e pelos papos a respeito da vida, fosse ela acadêmica ou não.

Aos professores do Departamento de Física pelos ensinamentos transmitidos e pela harmonia.

À amiga Gisele Baldissera pelas ideias trocadas durante todo nosso período de convivência e pelas dicas valiosas no período de escrita da tese.

Aos amigos Ézio, Leandro, Ronaldo e Sidney pelos muitos momentos de companheirismo e pelas inúmeras cervejas.

Às "meninas" Lilian, Bárbara, Joice e Lívia, por fazerem do meu período em Rio Preto uma farra e por se tornarem minhas amigas. Saudades de vocês!

Aos amigos da Altitude Escalada Indoor por me ajudarem a resolver "problemas" e, dessa forma, contribuírem para o meu desenvolvimento.

Aos amigos do Curso de Física da Universidade Católica de Brasília pelo incentivo desde a graduação e pelo apoio durante esta fase de conclusão.

À minha mama, Neusa de Fátima, que com todo amor do mundo me deu a vida, me fez o que sou e me trouxe até aqui. Obrigado, mama! Você é um exemplo! Amo você!

À minha querida avó, Luiza Lina de Jesus, por cuidar de mim durante toda a vida, por me deixar ganhar no jogo de damas e por me ensinar a ser correto e justo. Amo você, vovozinha!

À minha tia, Josimária Lina de Jesus, que sempre me teve como um filho, me defendendo, me tirando de enrascadas e comendo meus tomates. Amo você, titia!

Aos meus demais tios e tias, pelo exemplo, pelo incentivo, pela confiança, pela amizade e pelo carinho durante toda vida.

Aos meus primos, Henrique, Guilherme, Cristiane e Juliana, por fazerem da minha infância um período inesquecível. Vocês são meus irmãos!

Ao meu sogro, José Luís Guido, e minha sogra, Dirce G. Cândido Guido, por me aceitarem como um filho e me darem o maior presente de todos.

Às minhas cunhadas e meus cunhados por me aceitarem como parte da família e me darem a possibilidade de ser titio.

Ao amor da minha vida, Bruna Cândido Guido, por viver ao meu lado, apoiando minhas decisões e dedicando sua vida a mim. Amo você, minha linda!

À CAPES, à FAPESP e à UCB pelo financiamento deste trabalho.

A Deus.

"Emancipate yourselves from mental slavery,
None but ourselves can free our minds."

Bob Marley

Índice Geral

1. Introdução	01
1.1 Venenos de Vespas	01
1.2 Mastoparanos Isolados de Vespas Sociais	02
1.3 Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos	05
1.3.1 PAMs lineares	05
1.3.2 PAMs cíclicos	06
1.4 Potencial de uso terapêutico	12
1.5 Polybia-MPI	14
2. Objetivos	16
3. Métodos Teóricos	17
3.1 Dinâmica Molecular (Mecânica Molecular)	17
3.2 Método de Troca de Réplica – <i>Replica Exchange Method</i> (REM)	18
3.2.1 Implementação do REM em Dinâmica Molecular (SUGITA; OKAMOTO, 2005)	19
3.2.2 Determinação da Escala de Temperaturas (DENSCHLAG <i>et al.</i>, 2009)	23
3.3 Análise de Componente Principal – <i>Principal Component Analysis</i> (PCA)	25
3.4 Método de Análise dos Histogramas Ponderados – <i>Weighted Histogram Analysis Method</i> (WHAM)	27
3.5 Parâmetros da Simulação	32

4. Resultados e Discussão	35
5. Conclusão	59
6. Referências Bibliográficas	60

Resumo

O Polybia-MPI é um peptídeo catiônico curto que tem toxicidade seletiva para as células cancerosas, mas nenhuma atividade hemolítica. Apresenta ação antimicrobiana potente tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. O peptídeo oferece ainda eficácia citotóxica e antiproliferativa pela formação de poros. Pode inibir seletivamente a proliferação de células de câncer de próstata e bexiga, mas tem menor citotoxicidade para fibroblastos murinos normais.

Simulações foram realizadas fazendo uso do pacote computacional GROMACS 4.0 a partir do arquivo de coordenadas espaciais do peptídeo construído com base na estrutura primária, depositada no banco de dados ExpASY/SwissProt sob o código **P0C1Q4**. A dinâmica teve como estrutura inicial o peptídeo estendido imerso em 1831 moléculas de água e 250 moléculas de TriFluorEtanol (TFE), proporção volumétrica de 65% de água e 35% de TFE. Foi utilizado o Método de Troca de Réplicas (*Replica Exchange Method*) no intuito de evitar que o sistema ficasse preso em mínimos locais de energia, o que possibilitou uma visitação aleatória às possibilidades energéticas diferentes.

A combinação dos histogramas provenientes da Análise de Componente Principal (PCA) de cada arquivo de trajetória permitiu o estudo estatístico da simulação. Os resultados e suas respectivas análises indicam a estabilidade da conformação com trechos em hélice α , o que acarreta na possibilidade de inferir que seja esta a estrutura do peptídeo Polybia-MPI.

Abstract

The Polybia-MPI is a short cationic peptide that has selective toxicity to cancer cells, but no hemolytic activity. It displays a potent antimicrobial action against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The peptide also offers cytotoxic and antiproliferative efficiency for the formation of pores. It can selectively inhibit cell proliferation of prostate and bladder cancer, but shows less cytotoxicity to normal murine fibroblasts.

Simulations were performed using the computational package GROMACS 4.0 with the spatial coordinates of the peptide constructed based on the primary structure, deposited in the ExPASy/SwissProt database under the code **P0C1Q4**. The molecular dynamic simulations had as initial structure the extended peptide immersed in 1831 water molecules and 250 TriFluoroEthanol (TFE) molecules, volumetric ratio of 65% water and 35% TFE. The Replica Exchange Method was used in order to prevent the system of getting stuck in energy local minima, which allowed random visits to different energy possibilities.

The combination of the histograms from the Principal Component Analysis (PCA) of each trajectory file allowed the statistical study of the simulation. The results and their respective evaluations indicate stability of the α -helical conformation, resulting in the possibility of inferring that this is the structure of the peptide Polybia-MPI.

1. Introdução

1.1 Venenos de Vespas

A ordem Hymenoptera é uma das maiores dentre os artrópodes, sendo composta por pelo menos 200.000 espécies de abelhas, vespas e formigas. Estes insetos são conhecidos por serem protagonistas de muitos acidentes agrícolas e médicos (VETTER; VISSCHER, 1998). Suas ferroadas podem causar dores prolongadas, edemas, eritemas, reações alérgicas e sistêmicas, distúrbios cardiovasculares e em casos mais extremos podem levar à morte, que pode ocorrer por reações imunológicas ou por toxicidade direta, com o estímulo direto dos mastócitos (ENO, 1997; LORENZI, 2002).

Os insetos desta ordem são classificados em sociais e solitários, conforme a utilização de seu veneno. Himenópteros sociais incluem abelhas, vespas e formigas, os solitários são as vespas solitárias e vespas parasitas (extremamente benéficas à agricultura como agentes de controle biológico de insetos causadores de pestes agrícolas) (SFORÇA *et al.*, 2004; VETTER; VISSCHER, 1998). Os insetos sociais utilizam seu veneno para defesa própria e de suas larvas contra invasores e predadores (KONNO *et al.*, 2001). Já os insetos solitários utilizam seu veneno para a captura de presas. A injeção do veneno em outros insetos acarreta na incapacidade de movimentação do inseto agredido, que servirá de nutriente para as larvas da vespa agressora, o que sugere a existência de um alto número de neurotoxinas em venenos de vespas solitárias (KONNO *et al.*, 1998), além de moléculas similares às encontradas nos venenos de vespas sociais.

Os venenos de vespas sociais são constituídos de aminas biogênicas (histamina, serotonina, dopamina, e norepinefrina), algumas enzimas (fosfolipase, hialuronidase, histidina decarboxilase) e uma série de peptídeos policatiónicos biologicamente ativos como melitina, apamina, mastoparanos, peptídeos quimiotáticos e cininas de vespas (ARGIOLAS; PISANO, 1983).

Diversos peptídeos bioativos foram isolados de venenos de vespas. Tais peptídeos são classificados em famílias, segundo suas atividades biológicas e estruturas moleculares, como, por exemplo, a dos mastoparanos e das cininas de vespas (DOHTSU *et al.*, 1993; NAKAJIMA *et al.*, 1985).

1.2 Mastoparanos Isolados de Vespas Sociais

Os mastoparanos são peptídeos catiónicos, formados por um número de aminoácidos que varia entre 10 e 14. Ricos em aminoácidos hidrofóbicos, os mastoparanos tem o C-terminal amidado e apresentam conformação anfipática. Estes peptídeos possuem uma variedade de atividades biológicas como a ativação da fosfolipase A₂ (ARGIOLAS; PISANO, 1983; HIRAI *et al.*, 1980) e fosfolipase C (ARGIOLAS; PISANO, 1983; CHO *et al.*, 1995; OKANO *et al.*, 1985), a liberação de histamina por meio da degranulação de mastócitos (ARGIOLAS; PISANO, 1983; HIRAI; KUWADA *et al.*, 1979; HIRAI *et al.*, 1980; HIRAI; YASUHARA *et al.*, 1979; KONNO *et al.*, 2000), a capacidade de se ligarem à calmodulina (LINSE *et al.*, 1986; MALENCIK; ANDERSON, 1983; MCDOWELL *et al.*, 1985), ainda apresentam atividades hemolítica e antimicrobiana, através de interações com biomembranas (DOS SANTOS CABRERA *et al.*, 2004; KATSU *et al.*, 1989; NAKAJIMA *et al.*, 1985; WAKAMATSU *et al.*, 1992), e aumentam a atividade da Guanosina trifosfato – GTP (regulador da proteína G), atuando como um receptor acoplado a essa

proteína (HIGASHIJIMA *et al.*, 1988; KLINKER *et al.*, 1994; SUKUMAR; HIGASHIJIMA, 1992; WAKAMATSU *et al.*, 1992; WEINGARTEN *et al.*, 1990). É o grupo de peptídeos mais abundante em venenos de vespa e tem suas atividades biológicas associadas à conformação em hélice α anfifílica (HIRAI; YASUHARA *et al.*, 1979; LORENZI, 2002).

Em geral, estas atividades biológicas estão associadas à forma de interação com as biomembranas provocando aumento da permeabilidade das mesmas, através da liberação de fosfolipídios (KATSU *et al.*, 1990; PARK *et al.*, 1995; WHILES *et al.*, 2001). Na presença da membrana, estes peptídeos assumem a conformação em hélice α anfipática (HIGASHIJIMA *et al.*, 1983; KUSUNOKI *et al.*, 1998; MCDOWELL *et al.*, 1985; WAKAMATSU *et al.*, 1992). Esta conformação é ideal para que ocorra interação entre os grupos catiônicos destes peptídeos e os grupos carregados dos fosfolipídios, e favorece a inserção dos mesmos na face hidrofóbica da bicamada. Além disso, por serem muito pequenos para atravessar as membranas como hélices anfipáticas, os mastoparanos se associam podendo formar poros temporários aumentando a permeabilização das bicamadas lipídicas (ARBUZOVA; SCHWARZ, 1999; NAKAJIMA *et al.*, 1985).

Dados experimentais de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Dicroísmo Circular (CD) mostram que em solução aquosa os mastoparanos apresentam uma conformação aleatória, ou estrutura secundária não mensurável (CHUANG *et al.*, 1996). Já em solução com trifluoretanol (TFE) exibem hélice α anfipática, onde resíduos hidrofóbicos estão dispostos de um lado da hélice, e na outra face os positivamente carregados, como o grupo amina e resíduos de lisina (KATSU *et al.*, 1990). Esta configuração é

fundamental para a ação tóxica destes peptídeos, já que a interação da parte carregada dos fosfolípidios da bicamada ocorre com a parte catiônica desses peptídeos (Fig. 1) (KONNO *et al.*, 2000).

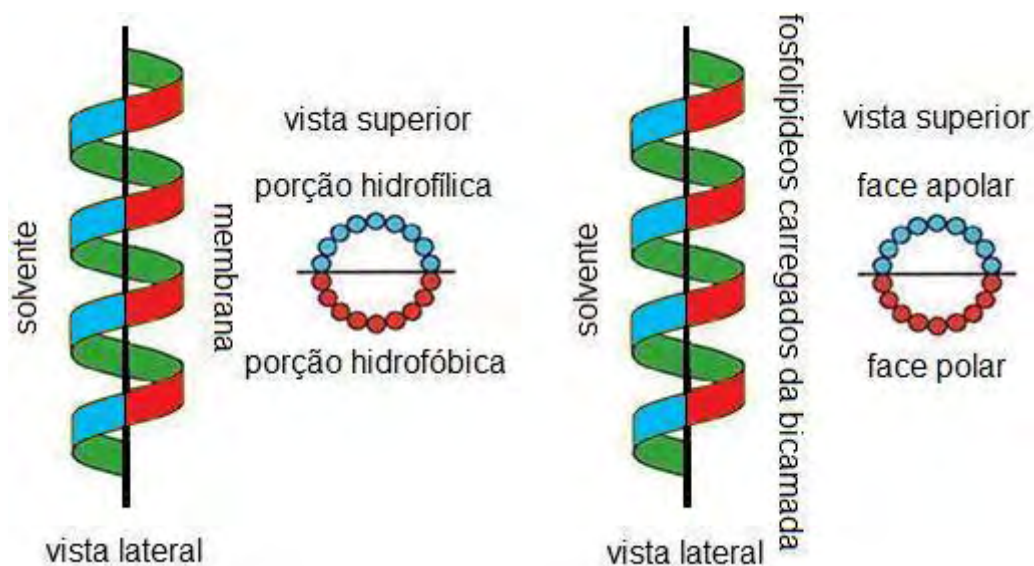


Fig. 1: Representação esquemática da anfipaticidade do peptídeo. A parte apolar (hidrofóbica) fica voltada para o solvente e a parte polar (hidrofóbica) interage com a bicamada fosfolipídica.

Na tabela 1.1 estão as sequências e a origem de alguns peptídeos da família dos mastoparanos.

Tabela 1.1: Sequência de aminoácidos do Polybia-MPI em comparação com outros mastoparanos de venenos de vespas sociais.

Peptídeo	Sequência	Origem
Polybia-MPI	IDWKKLLDAAKQIL	<i>P. paulista</i>
Mastoparano-A	IKWKAILDAVKKVL	<i>Vespa analis</i>
Mastoparano-M	INLKAIAALAKKVL	<i>Vespa mandarina</i>
Protonectarina-MP	INWKALLDAAKKVL	<i>P. Sylveirae</i>
Mastoparano-C	INWKALLAVAKKIL	<i>Vespa crabro</i>
Protopolybia-MPI	INWLKLGKKVSAIL	<i>P. exígua</i>
Parapolybia-MP	INWKKMAATALKMI	<i>P. indica</i>
Protopolybia-MPII	INWKAIIEAAKQAL	<i>P. exígua</i>
Agelaia-MP	INWLKLGKAIDAL	<i>A. p. pallipes</i>
Protopolybia-MPIII	INWLKLGKAVIDAL	<i>P. exígua</i>

1.3 Mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos

Em sua maioria, os peptídeos antimicrobianos (PAMs) apresentam baixa massa molecular, menos de 100 aminoácidos, com predominância de aminoácidos básicos, o que lhes confere uma carga líquida positiva (entre +2 e +9) em pH fisiológico. Além disso, os PAMs também apresentam uma região rica em aminoácidos hidrofóbicos. A separação espacial entre aminoácidos básicos e hidrofóbicos torna os PAMs moléculas anfipáticas (BULET, PHILIPPE; STÖCKLIN, 2005).

Apesar de os estudos com PAMs catiônicos serem os mais abundantes na literatura, PAMs com predominância de aminoácidos ácidos também tem sido descritos. Entre os exemplos de PAMs aniônicos estão os derivados da pró-encefalina, denominados peptídeo B e enkeletina (GOUMON *et al.*, 1996; STERN *et al.*, 1981) os derivados da proteína presente no suor humano, dermicina (SCHITTEK *et al.*, 2001), o peptídeo de sapo, maximina (LAI *et al.*, 2002) e os peptídeos presentes no fluido broncoalveolar de ovinos (BROGDEN *et al.*, 1996; HEIDARI *et al.*, 2002).

Em geral, os PAMs são divididos em dois grupos principais (BULET *et al.*, 2004):

1.3.1 PAMs lineares

São peptídeos que não apresentam pontes dissulfeto em sua estrutura. Em solução aquosa ou ambiente que mimetize a membrana celular, costumam adotar uma estrutura em hélice α anfipática. Como exemplos podemos citar a catelicidina (JOHANSSON *et al.*, 1998), as cecropinas (BOMAN *et al.*, 1993) e a magainina (MATSUZAKI, 1999).

Além dos peptídeos em hélice α , existe outra subclasse de peptídeos lineares que possuem predominância de um ou dois resíduos de aminoácidos tais como prolina, arginina, triptofano, histidina e glicina. Entre estes estão a indolicidina (FRIEDRICH *et al.*, 2001), rica em triptofano e as histatinas (KAVANAGH; DOWD, 2004), ricas em histidinas.

1.3.2 PAMs cíclicos

São peptídeos que contêm um ou mais pares de cisteínas envolvidas na formação de pontes dissulfeto intramoleculares. Os PAMs cíclicos podem apresentar as suas extremidades amino e carboxi-terminal abertas ou fechadas e podem formar estruturas tais como grampos tipo β ou uma mistura de hélices α e folhas β . Entre os exemplos mais conhecidos estão as α -e e β -defensinas (SELSTED *et al.*, 1985), as protegrinas (FAHRNER *et al.*, 1996) e a gomesina (MANDARD *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2000).

Os mecanismos de ação dos PAMs ainda não são totalmente conhecidos, porém, sabe-se que o seu caráter catiônico e sua tendência à anfipaticidade facilitam sua interação com a superfície celular de bactérias e inserção na membrana. As interações eletrostáticas entre PAMs e superfícies celulares de bactérias são facilitadas pela presença de fosfolipídios com carga líquida negativa na face externa da membrana, grupos fosfato de moléculas de lipopolissacarídeo e ácidos teicóicos. A membrana citoplasmática de células de mamíferos, ao contrário das bactérias, apresenta na sua face externa uma predominância de fosfolipídios com carga líquida neutra, o que contribui para que a ação de diversos PAMs seja seletiva para membrana de bactérias (BROGDEN, 2005; ZASLOFF, 2002).

Como já mencionado, a anfipaticidade dos PAMs facilita a sua inserção na membrana por meio da interação de sua região hidrofóbica com a região hidrofóbica dos fosfolípidios de membrana e como consequência, podem ocorrer permeabilização da membrana, vazamento de conteúdo intracelular e morte do patógeno (BROGDEN, 2005; HANCOCK; SAHL, 2006; YOUNT *et al.*, 2007).

Em princípio, se a permeabilização de uma membrana é esperada, o comprimento do peptídeo na sua forma helicoidal deveria ser compatível com a espessura da mesma, que no caso de membranas bacterianas é da ordem de 30 Å. Alguns PAMs, como cecropinas (ANDREU *et al.*, 1992) e gramicidinas (KILLIAN, 1992) são conhecidos por sua conformação helicoidal ser suficientemente longa e flexível para atravessar as bicamadas, entretanto, outros PAMs de cadeias menores, com 10 a 15 resíduos, são claramente mais curtos e indicam a existência de outros mecanismos para superar a diferença de comprimento (DOS SANTOS CABRERA *et al.*, 2004).

Alguns autores consideram a possibilidade de que peptídeos com dobras na estrutura poderiam se alongar, ou outros poderiam adotar conformações do tipo hélice 3_{10} ou π , que são estruturas helicoidais mais longas que a hélice α (ANDREU *et al.*, 1992; SILIGARDI; DRAKE, 1995). Outros autores consideraram que os lipídeos poderiam se adaptar por um efeito de afundamento da membrana (KILLIAN, 1992). Mais recentemente foi mostrado que em concentrações de peptídeo abaixo da concentração limite necessária para a lise, ocorre uma redução da espessura da membrana, que seria provavelmente proporcional à concentração de peptídeo e que foi denominada de efeito de afinamento da membrana (CHEN *et al.*, 2002; 2003;

HELLER *et al.*, 2000; LUDTKE *et al.*, 1995; WU *et al.*, 1995). Esse afinamento é resultado de um aumento na área da membrana que se determinou ser da mesma ordem do tamanho molecular do peptídeo (LUDTKE *et al.*, 1995; WU, X. R. *et al.*, 1995).

O mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos é hipotético e se baseia em três etapas:

1. Ligação de peptídeos em forma monomérica à membrana plasmática;
2. Inserção dos peptídeos na membrana para a formação de poros;
3. Recrutamento progressivo de monômeros para o aumento do diâmetro do poro.

Para ilustrar a inserção na membrana e os danos resultantes causados à célula, três modelos são propostos.

- **Modelo “Carpete”** (OREN; SHAI, 1998)

A membrana da bactéria é totalmente coberta pelo peptídeo. Quando uma concentração crítica é atingida, os peptídeos danificam a membrana de modo semelhante aos detergentes. Os peptídeos permanecem na região de interface das membranas, em conformação paralela, não entrando em contato com as caudas dos fosfolipídios. O processo de desintegração e formação de micelas leva à morte da bactéria.

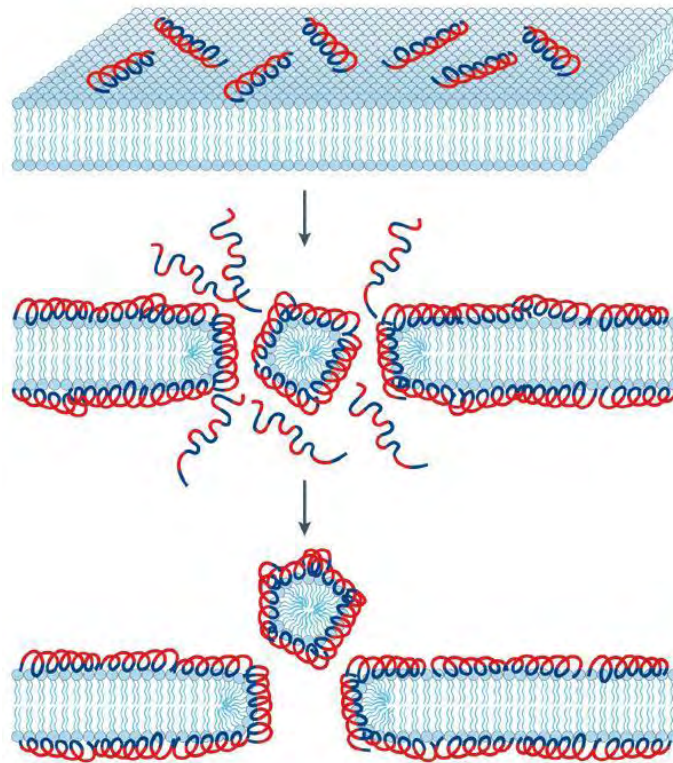


Fig. 2: Neste modelo, os peptídeos rompem a membrana através da orientação paralela à superfície da bicamada lipídica, formando uma extensa camada ou carpete. Regiões hidrofílicas do peptídeo são mostradas em vermelho, hidrofóbicas em azul (figura extraída de BROGDEN, 2005).

- **Modelo “Barril” (HUANG, 2000)**

Neste modelo, os PAMs anfipáticos em hélice α , após interação eletrostática com a face externa da membrana bacteriana, formam poros do tipo barril, nos quais a porção apolar do peptídeo interage com a porção hidrofóbica dos fosfolipídios da membrana e a região hidrofílica do peptídeo fica voltada para dentro do poro. O vazamento do conteúdo intracelular através destes poros pode levar à morte celular.

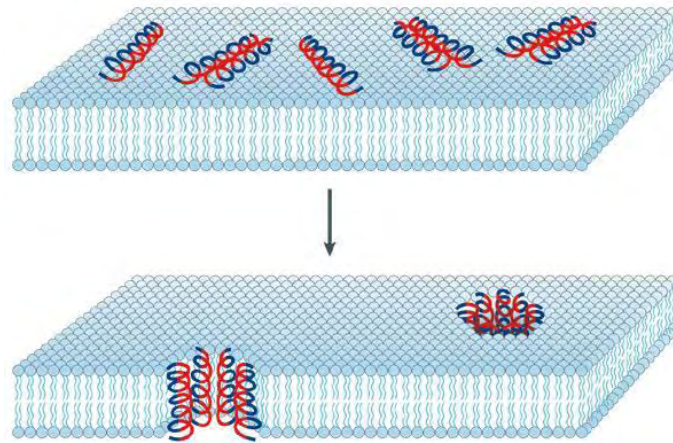


Fig. 3: Neste modelo, os peptídeos agregados se ligam à bicamada da membrana de forma que as regiões hidrofóbicas dos peptídeos possam se alinhar com a região do núcleo lipídico e as regiões hidrofílicas formem o interior do poro. Regiões hidrofílicas do peptídeo são mostradas em vermelho, hidrofóbicas em azul (figura extraída de BROGDEN, 2005).

- **Modelo dos “Poros toroidais” ou “Canais agregados”**

(MATSUZAKI, 1999)

Após interação com fosfolipídios da membrana, várias moléculas de peptídeo se agregam e formam um complexo com moléculas de água associadas. Este complexo induz a formação de canais transmembrânicos temporários que podem permitir a passagem de íons, moléculas de grande massa molecular e, inclusive, do próprio peptídeo, sem que haja grandes alterações na estrutura da membrana. A diferença entre este modelo e o modelo barril é que os peptídeos estão sempre associados com as cabeças polares dos fosfolipídios, mesmo quando inseridos perpendicularmente à bicamada lipídica.

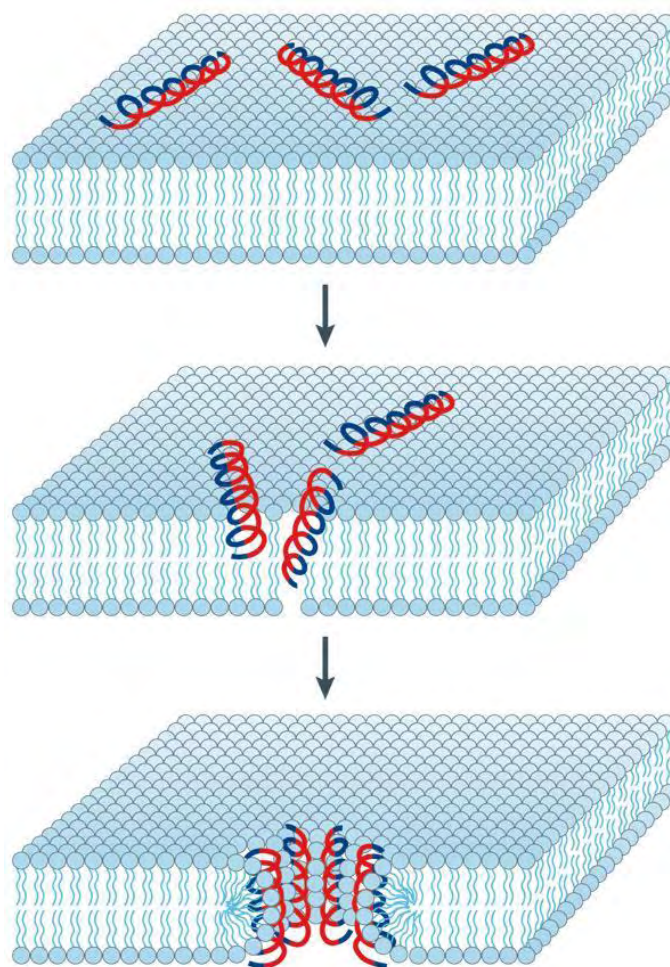


Fig. 4: Neste modelo, os peptídeos agregados se ligam e induzem as monocamadas lipídicas a se dobrar continuamente através do poro. Regiões hidrofílicas do peptídeo são mostradas em vermelho, hidrofóbicas em azul (figura extraída de BROGDEN, 2005).

Estudos sobre o mecanismo de ação dos peptídeos aniônicos ainda são escassos na literatura. Um estudo mais aprofundado foi realizado com os derivados da dermicidina (STEFFEN *et al.*, 2006). Foi demonstrado que estes PAMs formam poros ou desestabilizam as membranas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Também foi observado que os derivados da dermicidina se ligam à superfície de *S. aureus* e formam aglomerados de peptídeos em pontos específicos, o que pode ser um indicativo da presença de receptores específicos na membrana (STEFFEN *et al.*, 2006).

A correlação entre permeabilização da membrana e morte do patógeno nem sempre é observada. Em um estudo envolvendo várias classes de PAMs

e lipossomos que mimetizavam a membrana bacteriana, foi demonstrado que a polifemusina I causava permeabilização em uma concentração que não causava efeito na viabilidade das bactérias (ZHANG, L. *et al.*, 2001). Outro resultado interessante foi o obtido com o derivado do híbrido cecropina-melitina, onde concentrações oito vezes maiores que a sua mínima concentração inibitória para *E. coli* não foram suficientes para causar permeabilização na membrana. Estes estudos indicaram que os PAMs poderiam possuir outros alvos, além da membrana citoplasmática. De fato, nos últimos anos, vários PAMs com habilidade para atravessar a membrana citoplasmática sem causar grandes danos a esta e atingir o meio intracelular tem sido descritos. Estes PAMs agem por meio de diversas maneiras tais como inibição de síntese de DNA, RNA e/ou proteínas, produção de peróxido de hidrogênio, ativação de autolisinas e fosfolipases, inibição de atividade enzimática, inibição de formação de septo de membrana e inibição do arranjo correto das proteínas, entre outros (CUDIC; OTVOS, 2002).

1.4 Potencial de uso terapêutico

Dentre os obstáculos naturais à ação dos PAMs estão a inativação causada pelo plasma e seus componentes e pelas barreiras de oligossacarídeos como a camada de peptidoglicanos nas bactérias, a matriz extracelular das células de eucariotos, ou os oligossacarídeos aniônicos como a heparina. Há ainda a inativação pelos lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativas, a proteólise do peptídeo e o baixo teor de fosfolipídeos aniônicos de algumas bactérias (ANDREU; RIVAS, 1998). O principal argumento a favor das pequenas chances de uma bactéria desenvolver resistência aos PAMs é seu alvo principal, a membrana celular. Um

microrganismo teria que mudar significativamente a composição e/ou a organização de seus lipídeos para desenvolver resistência. Outra possibilidade seria a destruição do PAM por uma protease microbiana, isso requereria a destruição seletiva do PAM e não dos constituintes proteicos da célula (ZASLOFF, M, 2000). Ainda, as cepas mais virulentas de bactérias com que nos deparamos atualmente podem representar a forma de resistência que a maioria dos microrganismos pode desenvolver a um custo viável (DOS SANTOS CABRERA *et al.*, 2004; ZASLOFF, 2002).

A pele é a primeira barreira a proteger os seres vivos de um ambiente ofensivo e é nesse órgão que se encontram muitos PAMs. Assim o maior progresso na área provém do desenvolvimento de agentes de uso tópico, devido à relativa segurança desse tipo de terapia em comparação com a administração sistêmica de novas drogas de uso prolongado (ZASLOFF, 2002). PAMs podem ser administrados via contato com mucosas para promover respostas do sistema imune como nas vacinas, em profilaxia ou em terapia (BROGDEN *et al.*, 2003). Por meio da administração por aerossol de um vetor plasmídico expressando os genes de um PAM, pode-se realizar prevenção e tratamento de infecções por micoplasma em granjas avícolas, evitando os efeitos colaterais da exposição sistêmica e controlando a ação citotóxica (LAZAREV *et al.*, 2004).

Outros campos promissores para aplicação dos PAMs são as infecções buco-dentais, onde as defesas naturais estão baseadas em peptídeos da saliva ricos em histidina; as infecções oculares; e em agentes espermicidas, combinando atividades antibiótica e contraceptiva. Formas alternativas de terapia poderão surgir a partir da observação de que os PAMs aumentam ou

reconstituem a potência de antibióticos atuais *in vivo* (YEAMAN; YOUNT, 2003; ZASLOFF, 2002), ou baseadas na habilidade dos PAMs em ativar PAMs endógenos e ainda considerando seu potencial de ação sinérgica (DOS SANTOS CABRERA *et al.*, 2004; HANCOCK; DIAMOND, 2000; SCOTT *et al.*, 1999; YEAMAN; YOUNT, 2003; ZASLOFF, 2002).

1.5 Polybia-MPI

O Polybia-MPI (Mastoparano I extraído do veneno da vespa *Polybia paulista*) é um tetradecapeptídeo catiônico que tem toxicidade seletiva para as células cancerosas, mas nenhuma atividade hemolítica. Apresenta ação antimicrobiana potente tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (SOUZA *et al.*, 2005). O peptídeo oferece, ainda, eficácia citotóxica e antiproliferativa pela formação de poros na membrana. Pode inibir seletivamente a proliferação de células de câncer de próstata e bexiga, mas tem menor citotoxicidade para fibroblastos murinos normais (WANG *et al.*, 2008).

Sua principal função biológica é a degranulação de mastócitos, que consiste na promoção da liberação de mediadores pré-formados (histamina, por exemplo, responsável pela vasodilatação, permeabilidade vascular, contração da musculatura lisa, secreção mucosa, quimiotaxise de leucócitos, produção de prostaglandinas, secreção ácida gástrica e imunorregulação) e na geração de novos metabólitos derivados de lipídeos (prostaglandina D2, por exemplo, que tem propriedades de vasodilatação, inibição da agregação de plaquetas, vasopermeabilidade, contração de músculos lisos).

O Polybia-MPI tem como alvo a membrana celular, diferente da quimioterapia convencional que consiste em injetar agentes agressores nas células. Por conta disso as células tumorais têm dificuldade em desenvolver resistência ao Polybia-MPI durante o tratamento e sua ação não é afetada por mecanismos de resistência à multidrogas (WANG *et al.*, 2009).

Comparando características físico-químicas de diferentes mastoparanos, é possível inferir que a seletividade do Polybia-MPI pode ser devida à sua baixa hidrofobicidade e ao número de resíduos carregados, o que confere ao peptídeo uma baixa carga elétrica líquida (DOS SANTOS CABRERA *et al.*, 2008).

Em resumo, o PAM Polybia-MPI pode oferecer uma nova estratégia terapêutica no tratamento do câncer de próstata e câncer de bexiga, considerando sua citotoxicidade relativamente mais baixa para as células normais (WANG *et al.*, 2009).

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivos a obtenção do mapa conformacional do peptídeo Polybia-MPI, por meio de simulações por dinâmica molecular, fazendo uso do método de troca de réplicas (*Replica Exchange Molecular Dynamics* - REMD); o estudo da estabilidade de algumas conformações estruturais através do perfil de energia livre e da análise de componente principal do sistema e a proposição do modelo tridimensional da macromolécula.

3. Métodos Teóricos

3.1 Dinâmica Molecular (Mecânica Molecular)

O método de dinâmica molecular foi introduzido pela primeira vez por Alder e Wainwright no final da década de 50 (ALDER; WAINWRIGHT, 1957; 1959) para estudar as interações entre esferas rígidas. Muitas ideias importantes sobre o comportamento de líquidos simples emergiram de seus estudos. Um grande avanço aconteceu em 1964, quando Rahman realizou a primeira simulação utilizando um potencial realístico de argônio líquido (RAHMAN, 1964). A primeira simulação de dinâmica molecular de um sistema realista foi feita por Rahman e Stillinger na sua simulação de água líquida em 1974 (RAHMAN; STILLINGER, 1974).

A dinâmica molecular consiste na solução das equações de movimento de Newton para um sistema de N átomos interagentes, da forma:

$$\vec{F}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2}, i = 1 \dots N \quad 1$$

onde $\vec{F}_i$ é a força resultante sobre o átomo de massa m_i e $\vec{r}_i = (x_i, y_i, z_i)$ é o vetor de coordenadas cartesianas do i -ésimo átomo.

As forças são as derivadas de um potencial $V(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N)$, da forma:

$$\vec{F}_i = -\frac{dV}{d\vec{r}_i} \quad 2$$

As equações são resolvidas simultaneamente em todos os passos da dinâmica, enquanto a temperatura do sistema é controlada por meio de um banho térmico e a pressão é mantida quase que constante, sendo permitidas somente pequenas flutuações em torno de um valor determinado. As

coordenadas dos átomos simulados podem ser gravadas em intervalos regulares e, dadas em função do tempo, representam a trajetória do sistema. Ao longo da simulação o sistema tem a tendência de evoluir para um estado de equilíbrio, não necessariamente o seu mínimo global de energia. Por meio da análise dessa trajetória de equilíbrio, muitas propriedades macroscópicas podem ser extraídas dos arquivos de saída da dinâmica molecular (VAN DER SPOEL, 2006).

3.2 Método de Troca de Réplicas – *Replica Exchange Method* (REM)

Em simulações que tem como objetivo o enovelamento de proteínas, é bastante comum a dificuldade de obtenção de distribuições canônicas acuradas em baixas temperaturas por meio de métodos convencionais de simulação. Isto ocorre pelo fato de os sistemas ficarem presos em um largo número de mínimos locais de energia (armadilhas energéticas). Uma forma de transpor o problema é a realização de simulações que não sigam a distribuição de probabilidades de Boltzmann, de forma que ocorra uma visitação aleatória a possibilidades energéticas diferentes. Este passeio aleatório entre diferentes estados energéticos permite a transposição de qualquer barreira de energia e a visitação a uma porção bem mais ampla do espaço de fase (SUGITA; OKAMOTO, 1999).

Um método bastante conhecido é o chamado *simulated annealing* (BERG; NEUHAUS, 1992). Enquanto a simulação de um *ensemble* multicanônico consiste em um passeio aleatório (*Random walk*) por um espaço de fase energético unidimensional, simulações feitas com o *simulated annealing* fazem um passeio aleatório em um intervalo de temperatura. Este passeio aleatório, por sua vez, induz a visitação a um maior espaço de fase, o

que permite ao sistema a saída de mínimos locais de energia (SUGITA; OKAMOTO, 1999). O método *simulated annealing* tem sido utilizado no problema do enovelamento de proteínas (HANSMANN; OKAMOTO, 1997; IRBÄCK *et al.*, 1997). Métodos que realizam passeios aleatórios no espaço de fase energético devido a não obediência à distribuição de probabilidades de Boltzmann recebem o nome genérico de *generalized ensemble algorithms* (HANSMANN; OKAMOTO, 1997; 1999).

O método de troca de réplicas (REM) é um algoritmo baseado em um *generalized ensemble algorithm* (GEYER, 1991; HUKUSHIMA; NEMOTO, 1995; MARINARI *et al.*, 1998; SWENDSEN; WANG, 1986; TESI *et al.*, 1994).

3.2.1 Implementação do REM em Dinâmica Molecular (SUGITA; OKAMOTO, 2005)

Consideremos um sistema de N átomos de massa m_k ($k = 1, \dots, N$) com suas coordenadas e momento linear denotados pelos vetores $q \equiv \{q_1, \dots, q_n\}$ e $p \equiv \{p_1, \dots, p_n\}$, respectivamente. O Hamiltoniano $H(q, p)$ do sistema é a soma das energias cinética $K(p)$ e potencial $E(q)$, da forma:

$$H(q, p) = K(p) + E(q) \quad 3$$

onde

$$K(p) = \sum_{k=1}^N \frac{p_k^2}{2m_k} \quad 4$$

No *ensemble* canônico à temperatura T , cada estado $x \equiv (q, p)$ com o Hamiltoniano $H(q, p)$ é ponderado pelo fator de Boltzmann:

$$W_B(x; T) = e^{-\beta H(q, p)} \quad 5$$

onde o inverso da temperatura é definido por $\beta = 1/k_B T$ (k_B é a constante de Boltzmann). A energia cinética média à temperatura T é dada por

$$\langle K(p) \rangle_T = \left\langle \sum_{k=1}^N \frac{p_k^2}{2m_k} \right\rangle = \frac{3}{2} N k_B T \quad 6$$

O *ensemble* generalizado para o REM consiste em M cópias não interagentes (réplicas) do sistema original no *ensemble* canônico a M diferentes temperaturas T_m ($m = 1, \dots, M$). As réplicas são arranjadas de forma que haja sempre uma réplica em cada temperatura. Essa paridade garante que o índice i ($i = 1, \dots, M$) para réplicas é a permutação o índice m ($m = 1, \dots, M$) para temperaturas e vice-versa:

$$\begin{cases} i = i(m) \equiv f(m), \\ m = m(i) \equiv f^{-1}(i), \end{cases} \quad 7$$

onde $f(m)$ é a função de permutação de m e $f^{-1}(i)$ é sua inversa.

Vamos admitir $X = (x_1^{[i(1)]}, \dots, x_M^{[i(M)]}) = (x_{m(1)}^{[1]}, \dots, x_{m(M)}^{[M]})$ como sendo o estado no *ensemble* generalizado. Os sobrescritos e subscritos se referem à réplica e à temperatura, respectivamente. O estado X é especificado pelos M conjuntos de coordenada $q^{[i]}$ e momento $p^{[i]}$ dos N átomos da réplica i à temperatura T_m :

$$x_m^{[i]} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]})_m \quad 8$$

Pelo fato de as réplicas serem não interagentes, os fatores de ponderação para o estado X no *ensemble* generalizado são dados pelo produto dos fatores de Boltzmann por cada réplica (ou em cada temperatura):

$$W_{REM}(X) = \exp \left\{ - \sum_{i=1}^M \beta_{m(i)} H(q^{[i]}, p^{[i]}) \right\} = \exp \left\{ - \sum_{m=1}^M \beta_m H(q^{[i(m)]}, p^{[i(m)]}) \right\} \quad 9$$

onde $i(m)$ e $m(i)$ são as funções de permutação, equação 7.

Consideremos agora a troca de um par de réplicas no *ensemble* generalizado. Suponhamos a troca das réplicas i e j , com temperaturas T_m e T_n , respectivamente:

$$X = (\dots, x_m^{[i]}, \dots, x_n^{[j]}, \dots) \rightarrow X' = (\dots, x_m^{[j]'}, \dots, x_n^{[i]'}, \dots) \quad 10$$

onde i, j, m e n estão relacionados pelas funções de permutação dadas pela equação 7 e a troca de réplicas introduz uma nova função de permutação f' :

$$\begin{cases} i = f(m) \rightarrow j = f'(m), \\ j = f(n) \rightarrow i = f'(n). \end{cases} \quad 11$$

A troca de réplicas pode ser escrita com mais detalhes, da forma:

$$\begin{cases} x_m^{[i]} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]})_m \rightarrow x_m^{[j]'} \equiv (q^{[j]}, p^{[j]'})_m, \\ x_n^{[j]} \equiv (q^{[j]}, p^{[j]})_n \rightarrow x_n^{[i]'} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]'})_n, \end{cases} \quad 12$$

onde:

$$\begin{cases} p^{[i]'} \equiv \sqrt{\frac{T_n}{T_m}} p^{[i]}, \\ p^{[j]'} \equiv \sqrt{\frac{T_m}{T_n}} p^{[j]}, \end{cases} \quad 13$$

Este processo é equivalente à troca de pares de temperatura T_m e T_n pelas réplicas correspondentes i e j , como segue:

$$\begin{cases} x_m^{[i]} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]})_m \rightarrow x_n^{[i]'} \equiv (q^{[i]}, p^{[i]'})_n, \\ x_n^{[j]} \equiv (q^{[j]}, p^{[j]})_n \rightarrow x_m^{[j]'} \equiv (q^{[j]}, p^{[j]'})_m. \end{cases} \quad 14$$

Dessa forma, o que se faz é o reescalonamento uniforme das velocidades de todos os átomos nas réplicas pela raiz quadrada da média das duas temperaturas, de forma que a condição de temperatura equacionada anteriormente seja satisfeita.

Para que o processo de troca convirja para uma distribuição de equilíbrio, se faz necessária apenas a imposição da condição de equilíbrio sobre a probabilidade de transição $w(X' \rightarrow X)$:

$$W_{REM}(X)w(X \rightarrow X') = W_{REM}(X')w(X' \rightarrow X) \quad 15$$

Das equações 3, 4, 9 e 15, temos:

$$\begin{aligned} \frac{w(X \rightarrow X')}{w(X' \rightarrow X)} &= \exp \{ -\beta_m [K(p^{[j]'}) + E(q^{[j]})] - \beta_n [K(p^{[i]'} + E(q^{[i]})) \\ &\quad + \beta_m [K(p^{[i]}) + E(q^{[i]})] + \beta_n [K(p^{[j]}) + E(q^{[j]})] \}, \\ &= \exp \{ -\beta_m \frac{T_m}{T_n} K(p^{[j]}) - \beta_n \frac{T_n}{T_m} K(p^{[i]}) + \beta_m K(p^{[i]}) + \beta_n K(p^{[j]}) \\ &\quad - \beta_m [E(q^{[j]} - E(q^{[i]})) - \beta_n [E(q^{[i]}) - E(q^{[j]})] \} = \exp(-\Delta) \end{aligned} \quad 16$$

onde $\Delta \equiv [\beta_n - \beta_m](E(q^{[i]}) - E(q^{[j]}))$, e i, j, m e n se relacionam por meio da função de permutação antes da troca $i = f(m), j = f(n)$.

Esta condição pode ser satisfeita, por exemplo, pelo critério de Metrópolis:

$$w(X \rightarrow X') \equiv w(x_m^{[i]} | x_n^{[j]}) = \begin{cases} 1, & \text{se } \Delta \leq 0 \\ \exp(-\Delta), & \text{se } \Delta > 0 \end{cases} \quad 17$$

onde, na expressão $w(x_m^{[i]}|x_n^{[j]})$, se escreve explicitamente o par de réplicas (e temperaturas) a ser trocado. Mais ainda, é possível assumir que $\beta_1 < \beta_2 < \dots < \beta_M$, sem perda de generalidade. Assim, uma simulação que usa o REM é realizada com a alternância dos dois passos:

- Cada réplica em um *ensemble* canônico é simulada em uma temperatura determinada de forma simultânea e independente.
- Um par de réplicas, a temperaturas vizinhas tais como $x_m^{[i]}$ e $x_{m+1}^{[j]}$, tem probabilidade de troca $w(x_m^{[i]}|x_{m+1}^{[j]})$.

3.2.2 Determinação da Escala de Temperaturas (DENSCHLAG *et al.*, 2009)

Em simulações baseadas no REM, um dado intervalo de temperatura acarreta na determinação de N degraus (intervalos entre cada temperatura), que determinam, por sua vez, o número de réplicas. Os benefícios do método dependem da escolha de certos parâmetros. Após a escolha do intervalo de temperatura $[T_{\min}, T_{\max}]$, que deve ser coberto pela simulação, a forma ideal da distribuição das temperaturas ao longo das réplicas $[T_1 = T_{\min}, T_2, \dots, T_N = T_{\max}]$ é um passo importante. Assim, visando a diminuição do tempo de simulação das réplicas neste intervalo de temperatura e assumindo uma capacidade calorífica C constante para todo o sistema, é possível aplicar

$$N \approx 1 + 0,594\sqrt{C}\ln(T_{\max}/T_{\min}) \quad 18$$

para determinar o número de degraus na distribuição de temperatura. Na equação 18, a capacidade calorífica é dada em unidades da constante de Boltzmann k_B e se refere à energia potencial do sistema. A sugestão para a

determinação desses degraus $[T_i, i = 1, \dots, N - 1]$ para o dado intervalo de temperatura é

$$T_i = T_{\min}(T_{\max}/T_{\min})^{(i-1)/(N-1)} \quad 19$$

Geralmente, a partir da escolha da distribuição dada pela equação 19, se espera probabilidades de troca $P_{ac}(T_i, T_{i+1}) = P_{ac}(N)$ iguais ao longo de todo intervalo de temperatura.

Definindo a função

$$\alpha(N) \equiv (T_{\max}/T_{\min})^{1/(N-1)} \quad 20$$

podemos expressar a temperatura por

$$T_{i+1} = T_i \alpha(N) \quad 21$$

Logo, para um dado número de degraus entre as temperaturas, a razão T_{i+1}/T_i é a constante $\alpha(N)$. Para um dado intervalo de temperaturas e uma distribuição equidistante de porções de energia potencial, o que é típico para sistemas de solvente explícito de capacidade calorífica C constante, a média das probabilidades de aceitação é aproximadamente

$$P_{ac}(N) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_{x'}^{\infty} e^{(-x^2)} dx \left[\sqrt{C} \frac{\alpha(N) - 1}{\alpha(N) + 1} \right] \quad 22$$

onde $\frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_{x'}^{\infty} e^{(-x^2)} dx$ é a função complementar que determina o erro.

Em resumo, para certa distribuição no intervalo de temperatura $[T_{\min}, T_{\max}]$ dada pela exponencial descrita na equação 19, os degraus de temperatura T_i são unicamente dados por N . Assumindo a capacidade calorífica constante e uma distribuição homogênea da energia potencial, o

intervalo de temperatura fornece probabilidades médias de aceitação iguais, como visto na equação 22. Mais ainda, escalas de temperatura que obedecem as equações 19 e 22 são unicamente especificadas pela escolha tanto do número de degraus quanto pela probabilidade média de aceitação P_{ac} .

3.3 Análise de Componente Principal – *Principal Component Analysis* (PCA)

A análise de componente principal (PCA) é abundantemente usada porque é um método simples, não paramétrico, de extração de informações relevantes a partir de conjuntos de dados. A análise dos autovalores e autovetores, relacionados às amplitudes dos movimentos do sistema ao longo da trajetória, fornece um roteiro para a separação dos movimentos do sistema em termos de suas amplitudes de vibração no intuito de diminuir a complexidade dos resultados de dinâmica molecular.

Uma trajetória de dinâmica molecular contém as posições para cada configuração ao longo do tempo e, portanto, as correlações de todos os graus de liberdade do sistema em estudo. Para obter informações mais precisas sobre cada grau de liberdade do sistema é necessário descorrelacionar os dados gerados pela dinâmica molecular.

O método consiste em realizar uma análise estatística da trajetória obtida na simulação de dinâmica molecular. Como as informações sobre as posições dos átomos são tridimensionais, os dados estão correlacionados. Dessa forma, a covariância desses dados é útil para a obtenção da medida que descreve como as variações das médias de cada dimensão estão correlacionadas.

A covariância é sempre medida entre duas dimensões. Como os dados de dinâmica molecular possuem três dimensões, é comum medir a covariância entre duas dimensões por vez (xy, xz, yz). Uma maneira útil para a obtenção de todos os possíveis valores de covariância entre todas as dimensões é a criação da chamada matriz de covariância (SMITH, 2002):

$$M_{cov} = \begin{bmatrix} (x_1 - \langle x_1 \rangle)(x_1 - \langle x_1 \rangle) & (x_1 - \langle x_1 \rangle)(y_1 - \langle y_1 \rangle) & (x_1 - \langle x_1 \rangle)(z_1 - \langle z_1 \rangle) & (x_1 - \langle x_1 \rangle)(x_2 - \langle x_2 \rangle) & \cdot & (x_1 - \langle x_1 \rangle)(z_N - \langle z_N \rangle) \\ (y_1 - \langle y_1 \rangle)(x_1 - \langle x_1 \rangle) & (y_1 - \langle y_1 \rangle)(y_1 - \langle y_1 \rangle) & (y_1 - \langle y_1 \rangle)(z_1 - \langle z_1 \rangle) & (y_1 - \langle y_1 \rangle)(x_2 - \langle x_2 \rangle) & \cdot & \cdot \\ (z_1 - \langle z_1 \rangle)(x_1 - \langle x_1 \rangle) & (z_1 - \langle z_1 \rangle)(y_1 - \langle y_1 \rangle) & (z_1 - \langle z_1 \rangle)(z_1 - \langle z_1 \rangle) & (z_1 - \langle z_1 \rangle)(x_2 - \langle x_2 \rangle) & \cdot & \cdot \\ (x_2 - \langle x_2 \rangle)(x_1 - \langle x_1 \rangle) & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ (z_N - \langle z_N \rangle)(x_1 - \langle x_1 \rangle) & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & (z_N - \langle z_N \rangle)(z_N - \langle z_N \rangle) \end{bmatrix} \quad 23$$

No método PCA aplicado nas simulações computacionais, a matriz de covariância tem dimensão $3N \times 3N$, onde N é o número de átomos do sistema. A equação 23 é calculada para cada *frame* da simulação.

Os autovalores correspondentes ao conjunto de dados obtidos provêm do determinante da matriz resultante da diferença entre uma matriz unitária dos autovalores e a matriz de covariância dada pela equação 23.

$$\begin{bmatrix} \lambda_1 & & & & \\ & \lambda_2 & & & \\ & & \lambda_3 & & \\ & & & \cdot & \\ & & & & \cdot \\ & & & & & \lambda_{3N} \end{bmatrix} - M_{cov} = A \quad 24$$

Da relação dada pela equação 24 se obtém um conjunto de sistemas cuja solução fornece os autovalores (λ).

Tendo os autovalores, é possível calcular os autovetores:

$$M_{cov} \cdot \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ \vdots \\ \cdot \\ v_{3N} \end{bmatrix} = \lambda \cdot \begin{bmatrix} v_1 \\ v_2 \\ v_3 \\ \vdots \\ \cdot \\ v_{3N} \end{bmatrix} \quad 25$$

A equação 25 é resolvida para cada autovalor obtido e o conjunto de autovetores resultantes é organizado em matrizes.

O resultado desses cálculos é fornecido pelo GROMACS como função do tempo de simulação.

Usualmente, a maioria das flutuações posicionais está concentrada em movimentos correlatos num subespaço de poucos graus de liberdade, enquanto outros movimentos não tem uma representação significativa. Por isso, o próximo passo é organizar os autovalores em ordem decrescente, de forma que o primeiro autovalor corresponda ao maior desvio da posição média, o segundo tem flutuação menor e assim por diante até que a partir de algum autovalor (entre o 5º e o 10º) essas flutuações tendam a zerar na trajetória. A projeção da trajetória na direção destes autovalores nos dá as componentes principais.

A componente principal é um parâmetro que pode ser utilizado juntamente com o método dos histogramas para obter a superfície de energia livre.

3.4 Método de Análise dos Histogramas Ponderados – *Weighted Histogram Analysis Method (WHAM)*

O método de análise dos histogramas ponderados (WHAM) é uma técnica que combina dados de múltiplas simulações correlacionadas no intuito

de obter propriedades termodinâmicas do sistema. O WHAM é geralmente utilizado para obter o potencial de força média (*potential of mean force* – PMF) a partir de histogramas das trajetórias de simulações de dinâmica molecular (KUMAR *et al.*, 1992).

O WHAM pondera simulações executadas em diferentes temperaturas. De fato, uma das principais utilidades do WHAM é o cálculo da densidade de estados de um sistema sobre um amplo espectro de energias através da combinação de histogramas provenientes das trajetórias geradas por cada simulação (FERRENBURG; SWENDSEN, 1989).

A partir dos arquivos de trajetória obtidos pelas simulações utilizando o REM é possível determinar o valor do PMF do sistema à temperatura ambiente, de forma a expandir o intervalo de energia livre observável e determinar a estrutura das barreiras de energia livre que não são observáveis a partir de simulações que acontecem a uma única temperatura (SUGITA; OKAMOTO, 2000).

O PMF $W(\xi)$ ao longo de uma dada coordenada de reação ξ é um conceito chave nas modernas teorias da mecânica clássica de líquidos e sistemas moleculares (ROUX, 1995). A grandeza $W(\xi)$ é definida a partir da função de distribuição média $\langle \rho(\xi) \rangle$,

$$W(\xi) = W(\xi^*) - k_B T \ln \left[\frac{\langle \rho(\xi) \rangle}{\langle \rho(\xi^*) \rangle} \right] \quad 26$$

onde ξ^* e $W(\xi^*)$ são constantes arbitrárias. A função de distribuição média ao longo da coordenada ξ é obtida a partir de uma média ponderada de Boltzmann,

$$\langle \rho(\xi) \rangle = \frac{\int \delta(\xi'[R] - \xi) e^{-U(R)/k_B T} dR}{\int e^{-U(R)/k_B T} dR} \quad 27$$

onde $U(R)$ representa a energia total do sistema como função das coordenadas R , e $\xi'(R)$ é a função que depende de alguns graus de liberdade do sistema. $\xi'(R)$ pode ser, por exemplo, um ângulo, uma distância, ou uma função mais complicada do sistema cartesiano de coordenadas (KIRKWOOD, 1935). Em particular, propriedades conformacionais de equilíbrio ou a taxa de transição de processos dinâmicos ativos podem ser convenientemente expressas em termos da função dada pela equação 26. Por essas questões, o PMF é uma grandeza central em estudos computacionais de sistemas macromoleculares (CHANDLER, 1978).

É geralmente impraticável computar o PMF ou a função de distribuição dada pela equação 27 diretamente de uma simulação de dinâmica molecular de equilíbrio. A presença de barreiras de energia ao longo das coordenadas ξ , por exemplo, pode impedir uma amostragem acurada do espaço configuracional num tempo computacional razoável (TORRIE; VALLEAU, 1974; VALLEAU; TORRIE, 1977).

A ideia central do WHAM consiste na possibilidade de extrapolação de grandezas termodinâmicas de interesse a partir do cruzamento de dados obtidos de simulações feitas sob diferentes parâmetros. A metodologia do programa no qual o WHAM está implementado é combinar dados de todas as réplicas. Em sua essência, o programa faz apenas a generalização das equações da energia livre.

Como o programa faz extrapolações baseadas na estatística da combinação dos histogramas de cada réplica, a probabilidade de existir um estado com energia E é dada por

$$p(E) = \rho(E) \frac{e^{-\beta E}}{Z} \quad 28$$

onde $\beta = 1/k_B T$, $\rho(E)$ é a densidade de estados e Z é a função partição do sistema, desconhecida. Numa simulação executada a temperatura T , onde são realizadas n medidas independentes da energia total E , a probabilidade de existência de um estado com energia E pode, ainda, ser dada por

$$p(E) = \frac{N(E)}{n} \quad 29$$

onde $N(E)$ é o número de conformações do sistema com energia E , conhecido como histograma. A relação das equações 28 e 29,

$$\rho_i(E) = \frac{N_i(E)}{n_i} \frac{Z_i}{e^{-\beta_i E}} \quad 30$$

possibilita a determinação da densidade de estados em cada temperatura $T_i(\beta_i)$. A equação 30 tem sua acuracidade dependente da disposição dos histogramas $N(E)$. A sobreposição relativa destes histogramas permite obter boa cobertura do espaço de fases diminuindo a possibilidade da existência de conformações não visitadas.

A densidade de estados detentores de informação sobre o domínio de valores de energia E , envolve a realização do cálculo de médias sobre os histogramas $N_i(E)$ de cada temperatura. A determinação da média ponderada

de um conjunto qualquer de medidas x_i , de uma quantidade x de medidas, onde cada uma tem um erro σ_i associado tem sua melhor estimativa na forma

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i / \sigma_i^2}{\sum_j 1 / \sigma_j^2} \quad 31$$

ou seja, o desvio padrão para um conjunto de medidas é grande, de forma que o valor médio do conjunto entra na média com peso baixo (inversamente proporcional ao desvio padrão). Assumindo medidas independentes da energia do sistema, o erro $\Delta N_i(E)$ relativo ao histograma é uma função do histograma médio $\overline{N_i(E)}$ à temperatura $T_i(\beta_i)$, onde

$$\Delta N_i(E) = \sqrt{\overline{N_i(E)}} \quad 32$$

Assim, imaginemos um grande número de simulações a temperaturas diferentes, onde são realizadas n medidas de E em cada uma, formando um histograma a cada execução. A determinação da raiz quadrada da média dos histogramas é a estimativa correta de erro $\Delta N_i(E)$ em um dos histogramas. Desse modo, $\overline{n_i(E)}$ está relacionado com $\rho(E)$ da forma

$$\rho(E) = \frac{\overline{N_i(E)}}{n_i} \frac{Z_i}{e^{-\beta_i E}} \quad 33$$

Com a equação 31, onde o peso da média ponderada é $1/\sigma_i^2$, é possível obter um valor mais acurado de $\rho(E)$

$$\rho(E) = \frac{\sum_i \overline{N_i(E)} [N_i(E)/n_i] [Z_i / e^{-\beta_i E}]}{\sum_j \overline{N_j(E)}} = \frac{\sum_i N_i(E)}{\sum_j n_j \frac{e^{-\beta_j E}}{Z_j}} \quad 34$$

onde Z_j é a função partição do sistema em cada temperatura $T_j(\beta_j)$, que é uma quantidade desconhecida, o que torna a equação 34 pouco favorável. A função partição é dada por:

$$Z_k = \sum_E \rho(E) e^{-\beta_k E} = \sum_E \frac{\sum_i N_i(E)}{\sum_j n_j Z_j^{-1} e^{(\beta_k - \beta_j)E}} \quad 35$$

A implementação do método dos múltiplos histogramas consiste na solução iterativa da equação 35 por funções partição Z_k a cada inverso de temperatura β_k das simulações. Isto se faz por meio da estimativa de valores iniciais de Z_k , que são inseridos na equação 35 até que a função convirja para um fator de tolerância (NEWMAN; BARKEMA, 1999).

3.5 Parâmetros da Simulação

As simulações foram realizadas fazendo uso do pacote computacional GROMACS 4 – *Groningen Machine for Chemical Simulations* – (HESS *et al.*, 2008). O arquivo de coordenadas espaciais do peptídeo foi construído no programa MIFit – *Molecular Images Fit* – (MCREE, 2004) a partir da estrutura primária, depositada no banco de dados ExPASy/SwissProt – Expert Protein Analysis System – (GASTEIGER *et al.*, 2003; JAIN *et al.*, 2009) sob o código **P0C1Q4** (SOUZA *et al.*, 2005). A dinâmica teve como estrutura inicial o peptídeo estendido (Fig. 5), imerso em 1831 moléculas de água e 250 moléculas de Trifluoretanol (TFE), proporção volumétrica de 65% de água e 35% de TFE. No intuito de neutralizar a carga do sistema foram, ainda, inseridos dois íons de cloro.

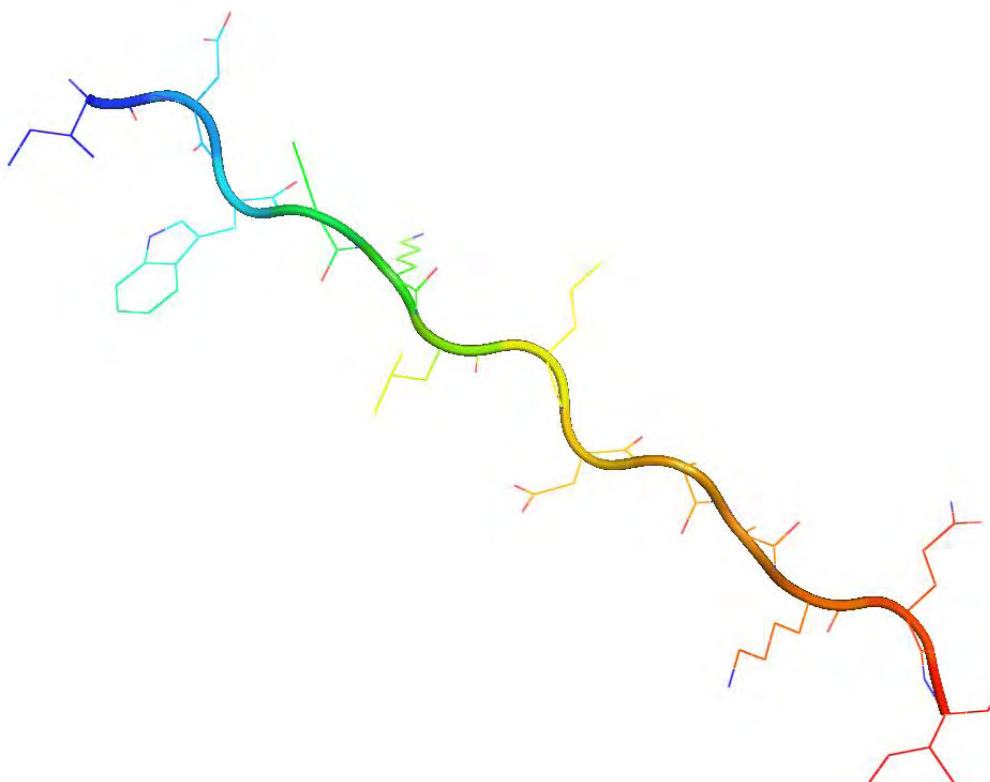


Fig. 5: Estrutura estendida utilizada na execução das simulações de dinâmica molecular. N-terminal em azul e C-terminal em vermelho. Figura gerada com o PyMol (DELANO, 2002).

O peptídeo teve suas três lisinas protonadas e o C-terminal amidado. O modelo de água utilizado foi o SPC – *Single Point Charge* – (BERENDSEN *et al.*, 1981) e as moléculas de TFE foram construídas a partir do modelo proposto por Fioroni (FIORONI *et al.*, 2000). Para restringir a geometria das moléculas de água foi empregado o algoritmo SETTLE (MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992). Para vincular todos os comprimentos de ligações foi usado o algoritmo LINCS (HESS *et al.*, 1997). As correções eletrostáticas foram feitas pelo algoritmo PME – *Particle Mesh Ewald* – com um raio de corte de 1.4 nm, no intuito de minimizar o tempo computacional da simulação. Derivado da soma de Ewald, o PME calcula no espaço de Fourier as interações de longo alcance que acontecem no espaço real (DARDEN *et al.*, 1993; ESSMANN *et al.*, 1995). O mesmo valor de raio de corte também foi usado nas interações de

van der Waals. A lista de vizinhos de cada átomo era atualizada a cada 10 passos da simulação de 20 fs cada.

O sistema em estudo foi contido por uma caixa cúbica com arestas de 45 Å. Foram executadas duas etapas de minimização de energia, uma através do algoritmo do gradiente conjugado – 2 ns – e outra através do algoritmo *Steepest Descent* – 2 ns. Após a etapa de minimização de energia, o sistema passou por uma normalização de pressão e temperatura, usando o integrador *Stochastic Dynamics* (SD) – 2 ns cada. O sistema com energia já minimizada e temperatura e pressão equilibradas passou por um passo de restrição de posição, usando o integrador *Molecular Dynamics* (MD) – 2 ns.

A partir deste *ensemble* foram geradas oito réplicas com número fixo de moléculas. A pressão e a temperatura, de cada réplica, foram determinadas, de forma que foram gerados *ensembles* NPT. Estes *ensembles* foram submetidos à dinâmica molecular de troca de réplicas em um computador com dois processadores Intel® Xeon® Processor E5410. As oito réplicas foram submetidas a simulações a temperaturas entre 280 K e 322 K, com intervalos de 6 K entre si, de 90 ns cada. A troca de réplicas aconteceu a cada mil passos de simulação de 20 fs. A simulação total foi de 720 ns.

4. Resultados e Discussão

O enovelamento de proteínas (*protein folding*) é um processo físico-químico através do qual a estrutura de uma proteína assume a sua configuração funcional (VOET; VOET, 1995).

A organização espacial da proteína é resultante do tipo de aminoácidos que a compõem e de como eles estão dispostos uns em relação aos outros. Dessa forma, o enovelamento é um processo que leva a macromolécula de um estado não enovelado à sua configuração tridimensional de menor energia livre (ANFINSEN *et al.*, 1954).

Modelos propostos a partir de testes indiretos indicam que o enovelamento do peptídeo Polybia-MPI é fundamental para que ocorra a interação com a bicamada lipídica, como discutido no capítulo 1.

Experimentos de Dicroísmo Circular (CD) do peptídeo solvatado numa mistura de água e TFE, (Fig. 6), indicam a curva característica, de acordo com o espectro padrão de CD (Fig. 7), de hélice α para concentrações de TFE próximas da concentração utilizada na simulação (DOS SANTOS CABRERA *et al.*, 2008).

Os dados de CD indicam ainda, nas curvas com menor amplitude de elipcidade, a formação de dímeros de hélice α , que imitam a formação de folhas β antiparalelas. Essa afirmativa pode ser feita a partir da observação da manutenção dos dois picos de elipcidade, em torno de 208 nm e 222 nm.

Para concentrações de TFE próximas à concentração utilizada na simulação, o percentual estimado, a partir dos dados de CD, de resíduos em hélice α é de 37,6 %.

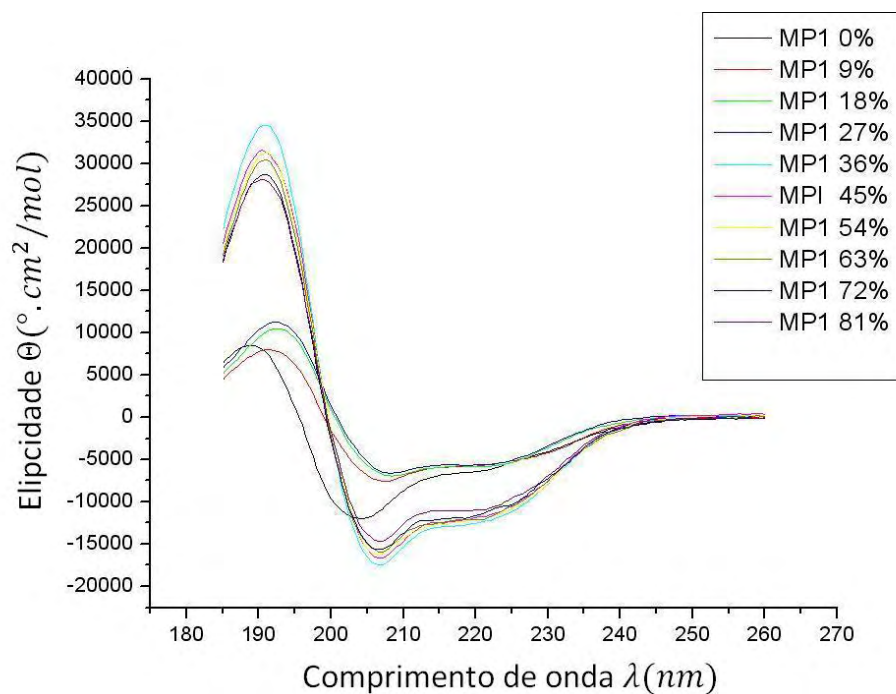


Fig. 6: Espectro de CD da amostra do peptídeo Polybia-MPI em diferentes concentrações de TFE.

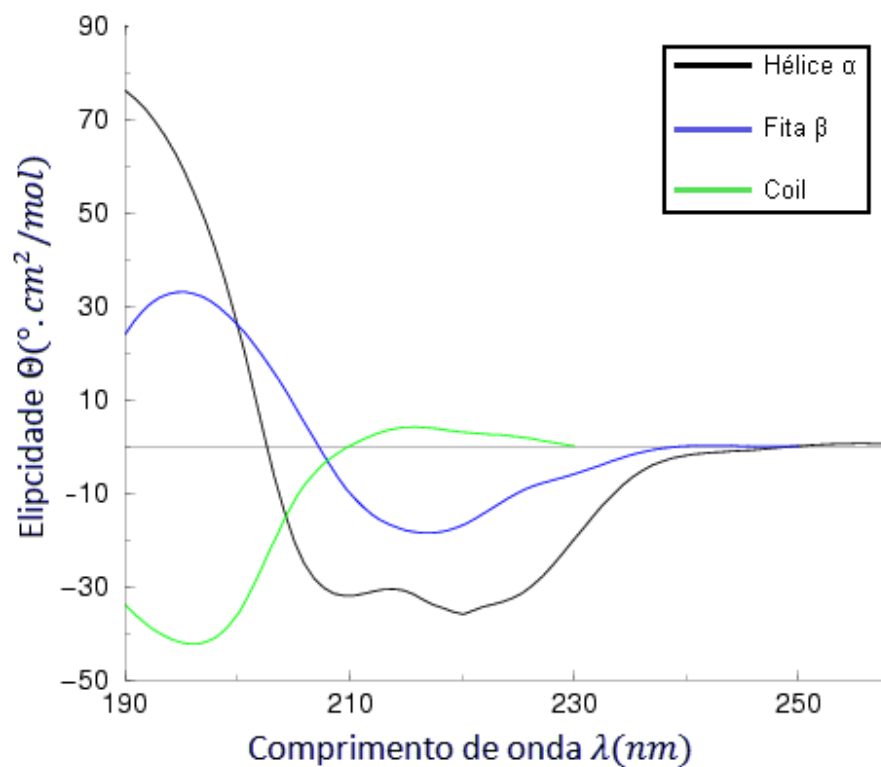


Fig. 7: Espectro característico de Dicroísmo Circular para cada tipo de estrutura secundária.

Misturas de água e TFE vem sendo utilizadas em experimentos de CD e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) com peptídeos, pois esse solvente é indutor de estrutura secundária em hélice α (LUO; BALDWIN, 1997). O TFE é um co-solvente anfipático, que se aglomera em solução aquosa, proporcionando um ambiente ao mesmo tempo hidrofóbico e hidrofílico ao peptídeo. O grupo polar OH do TFE pode formar ligações de hidrogênio com outras moléculas de TFE, com a água e com grupos polares do peptídeo, enquanto o grupo CF₃ protege (solvata) as regiões hidrofóbicas do peptídeo, mimetizando assim o ambiente de uma membrana lipídica.

A Dinâmica Molecular consiste na observação da evolução temporal do sistema em estudo. A análise das trajetórias fornece suporte para o entendimento e compreensão dos fatores que contribuem para a variabilidade e estabilidade conformacional do peptídeo.

A utilização do REM se mostrou bastante satisfatória, posto que a escala de temperaturas foi suficiente para a observação do processo de enovelamento e para o estudo da termodinâmica envolvida nesse processo. Esta afirmativa tem suporte na análise da disposição dos histogramas de energia de cada temperatura (Fig. 8). A sobreposição dos histogramas possibilita a utilização do WHAM no desenvolvimento de um estudo estatístico das trajetórias.

A análise feita por meio do PCA possibilitou, como esperado, a extrapolação de grandezas baseadas no PMF, tendo a estatística das trajetórias como suporte para a determinação dessas grandezas.

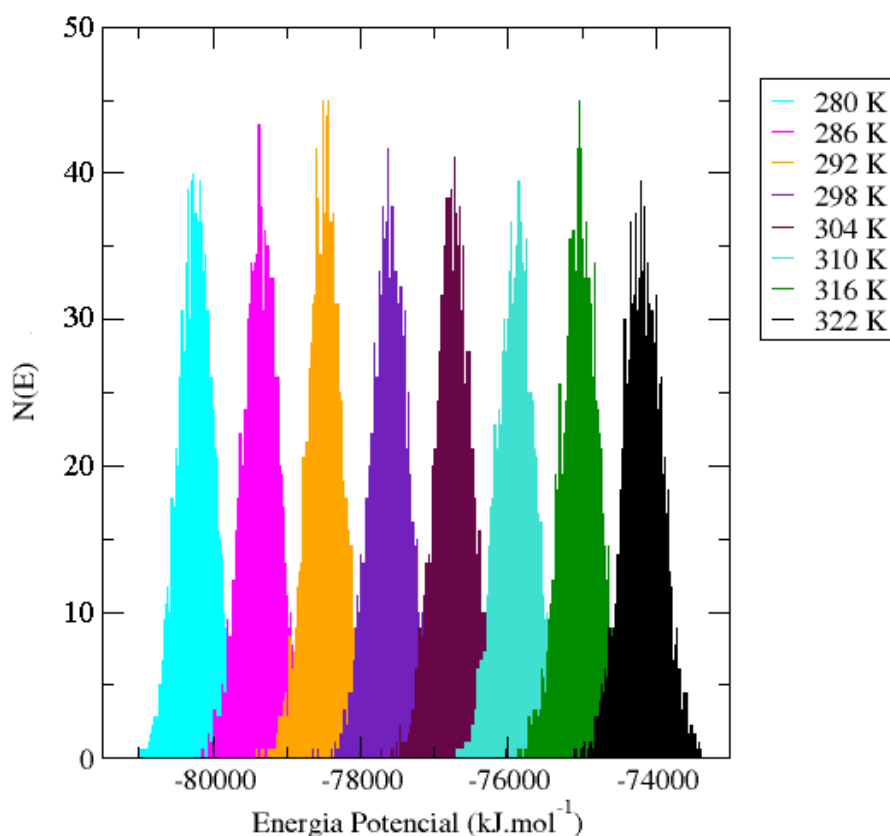


Fig. 8: Histogramas do número de configurações energéticas acessadas durante a simulação, $N(E)$, em função da energia potencial associada. Os oito histogramas correspondem, cada um, às trajetórias com temperaturas entre 280 K (energia potencial mais baixa) e 322 K (energia potencial mais alta). A sobreposição dos histogramas é o que permite a utilização do WHAM para o estudo estatístico das trajetórias.

As conformações do peptídeo ao longo da dinâmica podem ser visualizadas nos gráficos de padrões de estrutura secundária. Em todos os padrões de estrutura secundária é possível verificar a ocorrência de conformações em dobra/volta (Bend/Turn) no início da simulação. Após algum período, os resíduos próximos ao C-terminal adotam conformação em hélice α e essa conformação se mostra bastante estável ao longo da dinâmica. Na segunda metade da simulação, os resíduos próximos ao N-terminal começam a adotar conformação em hélice α , porém não tão estável quanto a porção de resíduos próxima ao C-terminal.

Durante a simulação, os resíduos Ile1 e Asp2 não apresentam organização estrutural definida, sugerindo o não enovelamento do resíduo Ile1,

o que é uma característica dos mastoparanos, como proposto anteriormente (HORI *et al.*, 2001). Foi, também, observada a estabilização eletrostática do resíduo Asp2 pelos grupos NH_3^+ do N-terminal e dos resíduos Lys4 e Lys5, conforme proposto anteriormente (DOS SANTOS CABRERA *et al.*, 2008).

É importante observar que o resíduo Asp8 não adota conformação diferente da conformação aleatória ou conformação em dobra durante toda simulação, o que também se deve à estabilização eletrostática do resíduo por conta da interação do átomo de oxigênio com os grupos NH_3^+ dos resíduos Lys4, Lys5 e Lys11. Essa interação entre os grupos catiônicos e o grupo polar do resíduo Asp8 acarreta na formação de uma conformação que tem o átomo O^- do resíduo Asp8 exposto ao solvente, favorecendo a interação de moléculas de água com a cadeia principal desse resíduo, conforme proposto anteriormente (DOS SANTOS CABRERA *et al.*, 2008).

O Polybia-MPI mostra resíduos em conformação de hélice α durante, aproximadamente, 35% do tempo de simulação.

As figuras de 9 a 16 apresentam os padrões de estrutura secundária para o conjunto de 8 trajetórias geradas na simulação, cobrindo um intervalo de temperaturas de 280 K a 322 K.

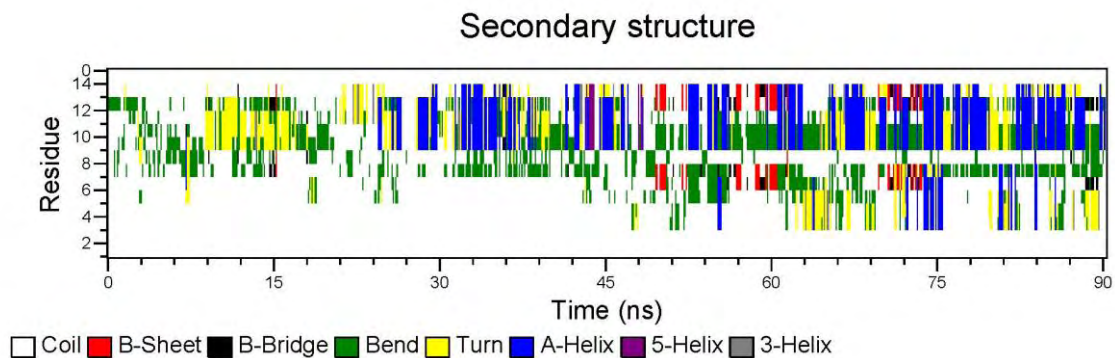


Fig. 9: Padrões de estrutura secundária para a temperatura de 280 K. Até algo em torno de 24 ns o peptídeo apresenta conformações em dobra/volta (*Bend/Turn*). Após esse período, é possível observar a ocorrência de resíduos em hélice α (*A-Helix*). Em torno dos 75 ns o peptídeo está com 11 dos seus 14 resíduos em hélice α .

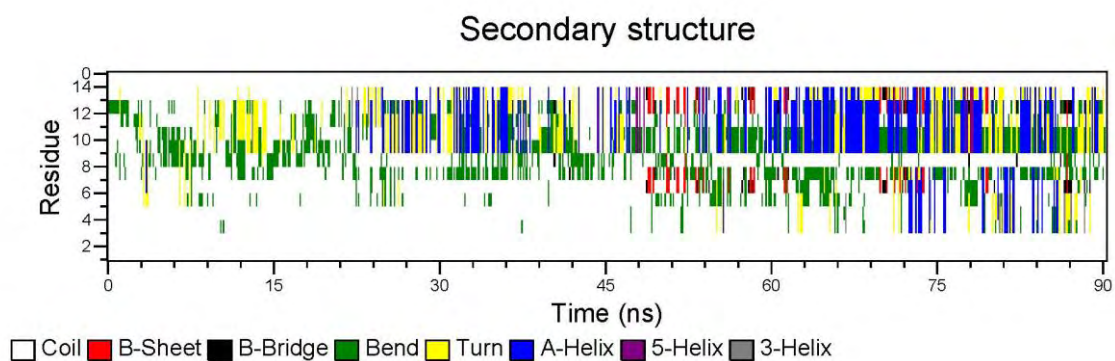


Fig. 10: Padrões de estrutura secundária para a temperatura de 286 K. As conformações ocorrem quase que nos mesmos instantes, porém tem um tempo de vida menor. Ainda é possível observar a ocorrência dos mesmos 11 resíduos em hélice α no último 1/4 da trajetória.

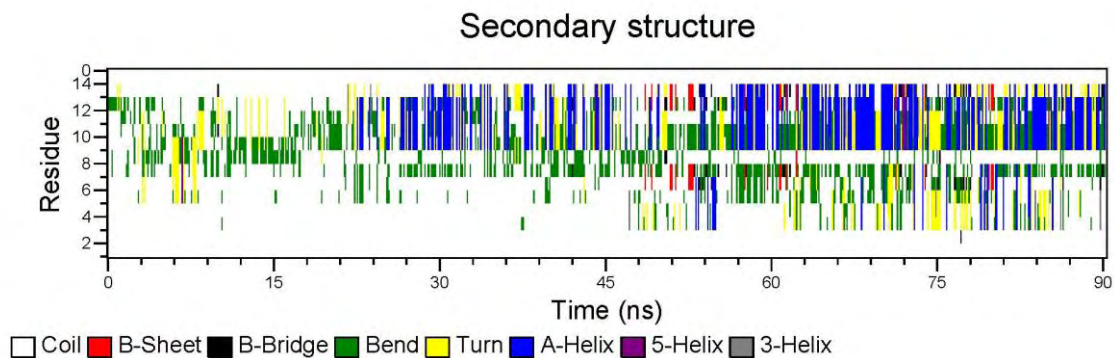


Fig. 11: Padrões de estrutura secundária para a temperatura de 292 K. Os resíduos entre 9 e 14 (Ala-Ala-Lys-Gln-Ile-Leu) apresentam a conformação em hélice α durante um período muito maior do que os outros resíduos, indicando a influência do grupo amida na estabilização conformacional do C-terminal do peptídeo.

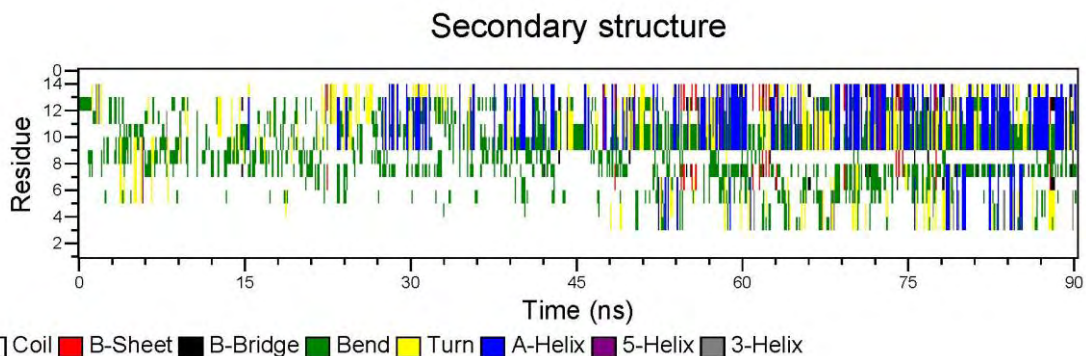


Fig. 12: Padrões de estrutura secundária para a temperatura de 298 K. O tempo de manutenção de todas as conformações é menor ainda, porém, a hélice α continua ocorrendo em 42,86% dos resíduos (6 resíduos) do peptídeo durante um período razoável da simulação.

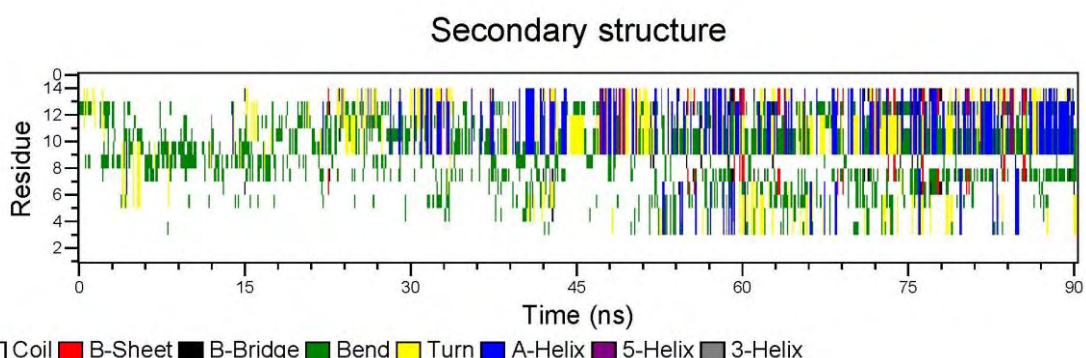


Fig. 13: Padrões de estrutura secundária para a temperatura de 304 K. A ocorrência da conformação aleatória (*Coil*) já é bem evidente a esta temperatura. Porém, existe ainda a ocorrência de resíduos em dobra/volta, resíduos em hélice α e alguns resíduos em folha β (*B-Sheet*).

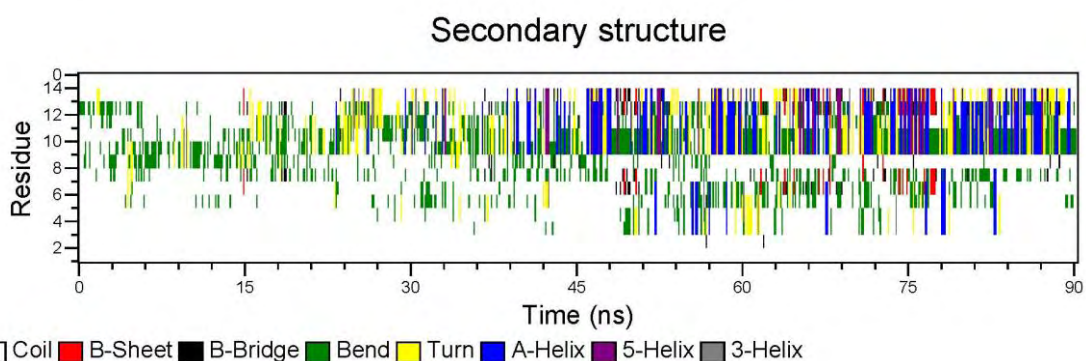


Fig. 14: Padrões de estrutura secundária para a temperatura de 310 K. A ocorrência de resíduos em folha β é bastante baixa. A estrutura predominante, porém, consiste nos resíduos em dobra/volta, o que não gera influência tão grande na conformação dos últimos 6 resíduos do peptídeo.

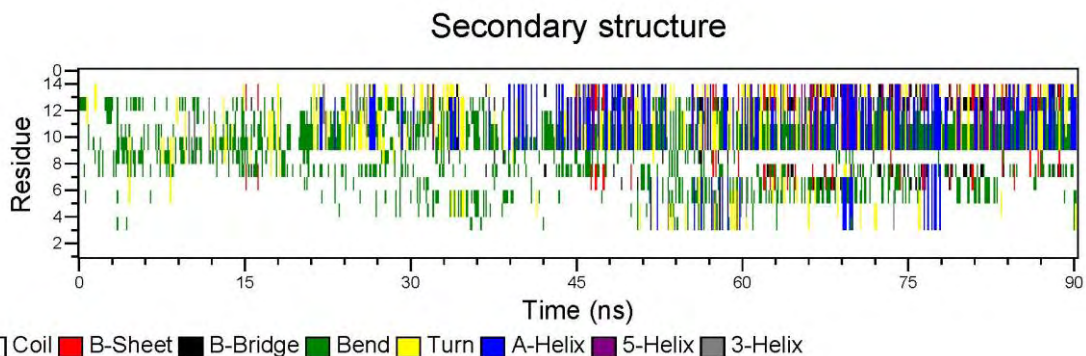


Fig. 15: Padrões de estrutura secundária para a temperatura de 316 K. Nos resíduos do N-terminal a ocorrência predominante é de conformações aleatórias, denotando assim a flexibilidade da região. Já os resíduos do C-terminal, pela influência do grupo amida, não tem flexibilidade tão grande, mantendo ligações entre seus resíduos durante quase toda simulação.

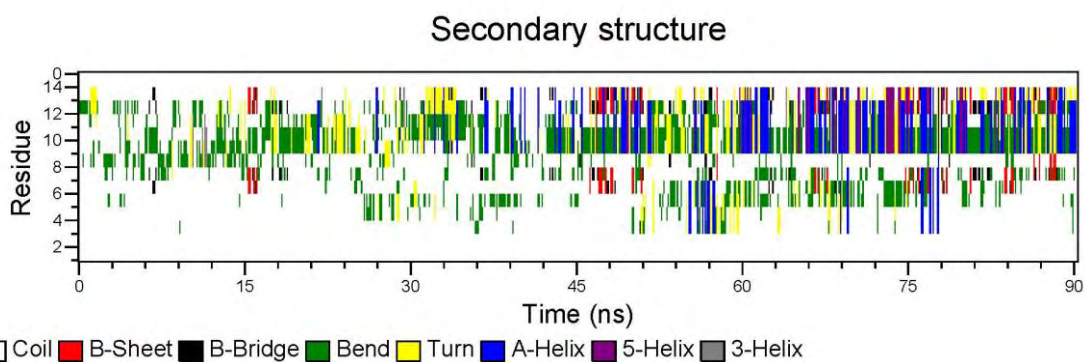


Fig. 16: Padrões de estrutura secundária para a temperatura de 322 K. O peptídeo continua apresentando baixo tempo de permanência em conformações não aleatórias. O resíduo de número 8 (Asp) não adotou uma conformação estável ao longo da dinâmica, ficando, na maior parte do tempo, em conformação aleatória, conformação de dobra (Bend) e assumindo durante alguns momentos a conformação em volta (Turn).

A superfície de energia livre do sistema pode ser obtida por meio do WHAM em função de alguns parâmetros, tais como RMSD e componentes principais. Para a construção da superfície de energia livre do sistema em estudo foram utilizadas as duas primeiras componentes principais (Fig. 17). Na figura são observados alguns mínimos de energia, um desses mínimos (A) é formado por estruturas parcialmente organizadas, com trechos de hélice α (Fig. 18 – A). Outro mínimo (B) é formado por estruturas também parcialmente organizadas, com trechos em folhas β (Fig. 18 – B). Os demais mínimos de energia observados repetem as configurações mostradas na Fig. 18, tendo

grande predominância de estruturas parcialmente organizadas com um ou dois trechos de hélice α .

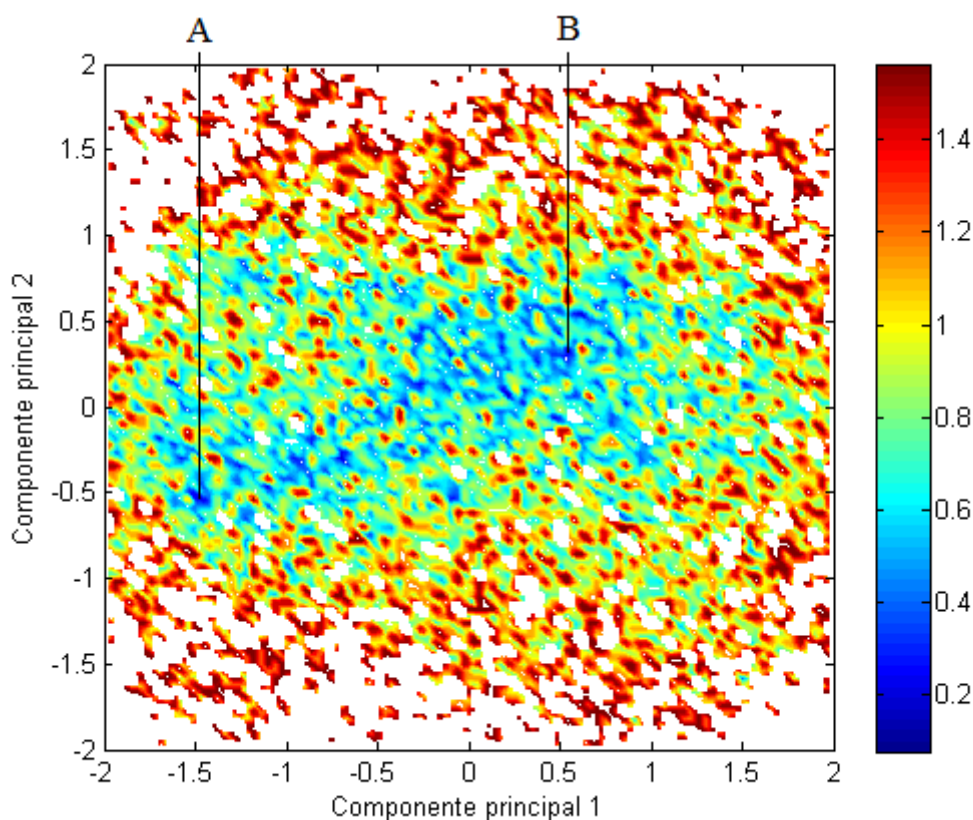


Fig. 17: Superfície de energia livre do sistema a 300 K em função das componentes principais 1 e 2. Um mínimo de energia livre, bastante evidente, (A) se aproxima do ponto -1,5 nm e -0,5 nm. O segundo mínimo de energia livre (B) se aproxima do ponto 0,5 nm e 0,3 nm. A barra de cores na lateral direita do padrão de energia livre mostra valores em kJ/mol.

Para a obtenção das conformações mencionadas anteriormente, os autovalores das componentes principais 1 e 2, encontrados em cada um dos mínimos, foram comparados com os autovalores das conformações adotadas durante as simulações. O que se faz é verificar quais estruturas tem autovalores iguais aos autovalores observados nos mínimos de energia livre do padrão de energia livre construído a partir das componentes principais 1 e 2.

Assim, a partir da trajetória de temperatura igual a 298 K, é possível verificar autovalores condizentes com as estruturas mostradas na Fig. 18.

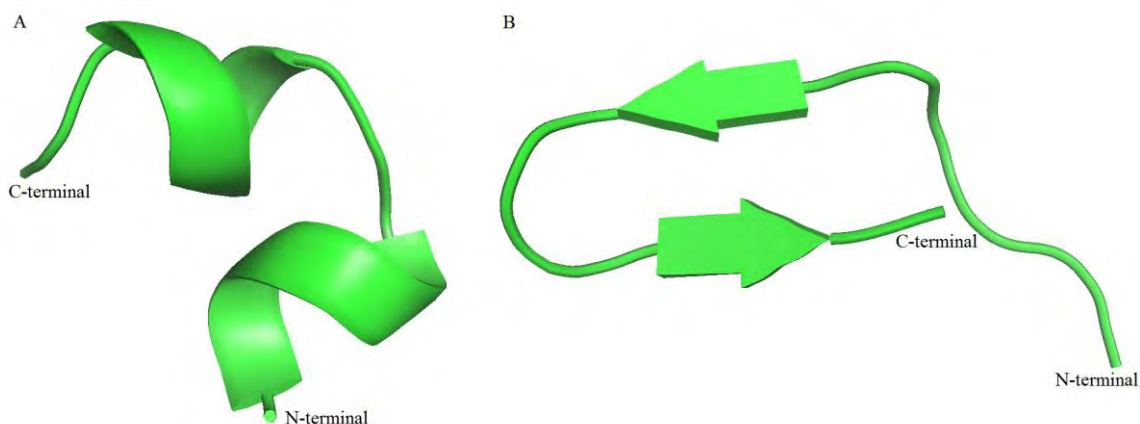


Fig. 18: Estruturas observadas nos mínimos de energia livre identificados na Fig. 16. A estrutura (A) consiste de 11 resíduos enovelados em hélice α , sendo 6 deles próximos ao C-terminal e os outros 5 próximos ao N-terminal e 3 em conformação aleatória. As duas hélices α são ligadas pelo resíduo Asp8. A estrutura (B) consiste de uma folha β antiparalela formada pelos resíduos Leu6, Leu7 e Asp8 (fita β superior, próxima ao N-terminal) e Lys11, Gln12 e Ile13 (fita β inferior, próxima ao C-terminal) ligadas pelas Ala9 e Ala10 que tem conformação em volta. Os resíduos restantes apresentam conformação aleatória. Figura gerada com o PyMol (DELANO, 2002).

A estrutura com trechos em hélice α é observada durante um tempo maior da simulação. A energia livre dessa conformação é inferior a 0,2 kJ/mol. Mesmo assim, não é possível afirmar que o mínimo de energia no qual se observa a conformação em questão é o mínimo global ou apenas mais um mínimo local, porém, a análise das conformações adotadas pelo peptídeo em toda simulação indica uma forte tendência do sistema à estruturação, mesmo que parcial, em hélice α .

A estrutura A da Fig. 18 é composta por duas hélices direitas (*right-handed helixes*) e um resíduo (Asp8) em conformação aleatória fazendo a ligação entre estas hélices.

Tomando a estrutura A da Fig. 18 como referência, foi feito o cálculo do RMSD em função do tempo para toda trajetória da réplica a 298 K (Fig. 19). Os resultados indicam uma propensão do sistema a adotar a conformação de referência ao longo da dinâmica. A constatação para esta afirmativa está na

inclinação negativa da reta de ajuste de curva (regressão linear), mostrada em vermelho, que tem coeficiente angular de $-2,6 \cdot 10^{-6} \text{ nm/s}$. O coeficiente angular da reta de ajuste de curva é evidenciado apenas para fins de comparação entre as Fig. 19 e 20.

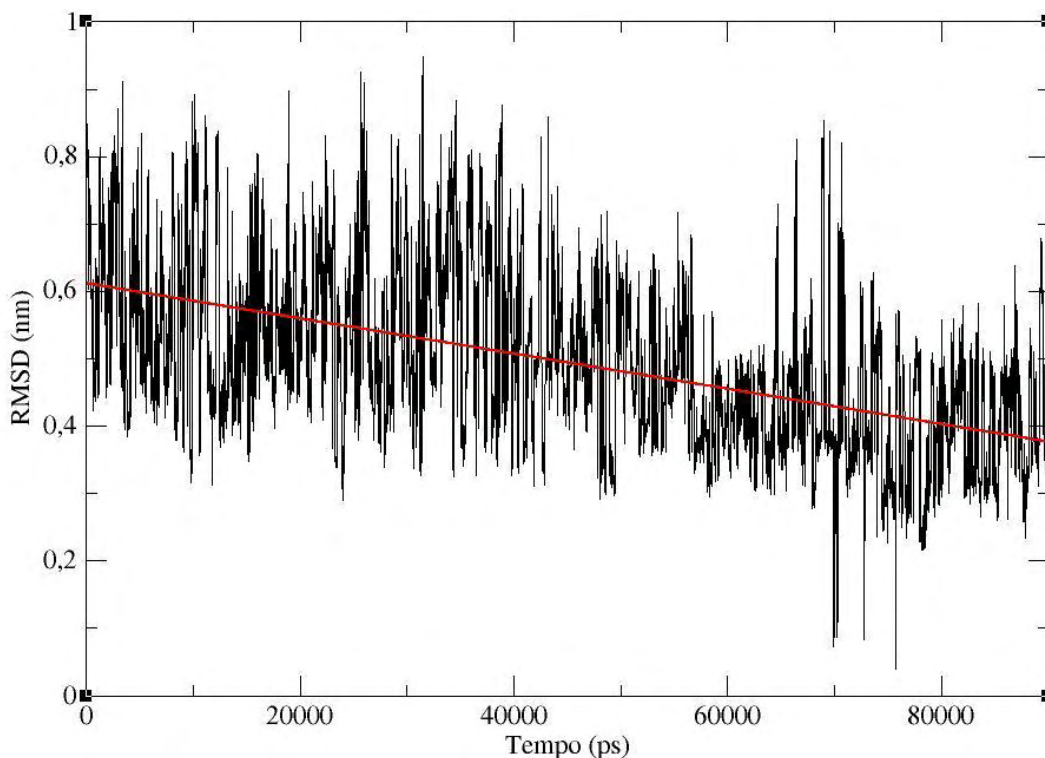


Fig. 19: RMSD em função do tempo. A inclinação negativa da reta de ajuste de curva, destacada em vermelho, indica uma propensão do sistema à adoção da conformação de referência (estrutura A da Fig. 18), observada em um dos mínimos do perfil de energia livre.

No intuito de dirimir eventuais dúvidas a respeito da possibilidade de formação da folha β observada em um dos mínimos de energia e sugerida por uma análise acidentalmente errônea dos dados de CD, o RMSD da trajetória de temperatura igual a 298 K em relação a esta estrutura também foi calculado.

A conformação em folha β ocorreu por conta do passeio aleatório entre diferentes estados energéticos. Como visto no capítulo sobre o método de troca de réplicas, a visitação ao maior número possível de possibilidades

conformacionais é o objetivo primeiro de ensaios de dinâmica molecular via *replica exchange*.

A existência de estruturas que adotaram a conformação em folha β em um dos mínimos de energia nos remete à ideia de que esta conformação pode ser a estrutura do peptídeo, mas esta afirmativa não é corroborada pelo restante das estruturas observadas na trajetória.

Nos padrões de estrutura secundária (Fig. 9 à Fig. 16) é possível verificar que a ocorrência da conformação em folha β não é tão frequente quanto a ocorrência da conformação em hélice α , o que corrobora os dados de CD minimizando a falsa ideia de formação de folha β . A trajetória com temperatura igual a 298 K mostra 4 resíduos enovelados em conformação de folha β durante menos de 2% do tempo de simulação.

É possível inferir que o peptídeo não tende à conformação em folha β a partir do cálculo do RMSD em função do tempo para a trajetória da réplica a 298 K, tomando a estrutura B da Fig. 18 como referência (Fig. 20). A constatação para esta afirmativa está na inclinação mais suave da reta de ajuste de curva (regressão linear), mostrada em vermelho, que tem coeficiente angular de $-4,3 \cdot 10^{-7} \text{ nm/s}$. Sendo esse coeficiente angular menor do que o coeficiente angular calculado na Fig. 19, é possível afirmar que existe uma maior tendência do sistema à adoção da estrutura A da Fig. 18 do que da estrutura B da Fig. 18.

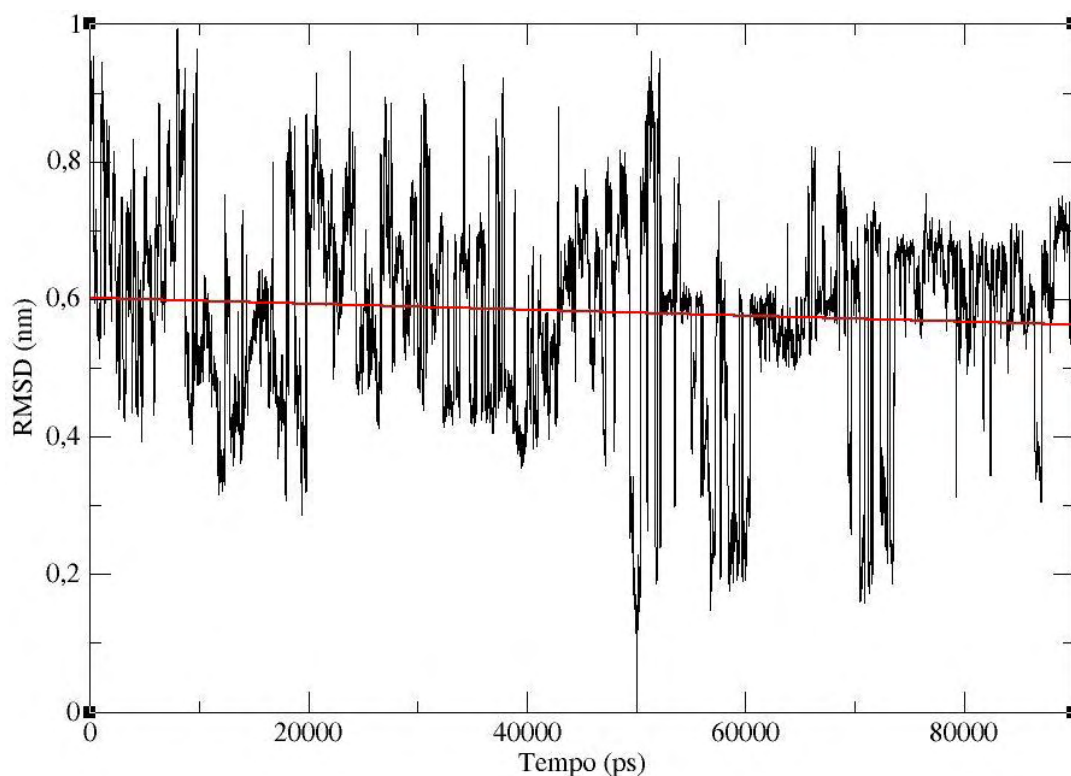


Fig. 20: RMSD em função do tempo. A inclinação da reta de ajuste de curva, destacada em vermelho, é, aproximadamente, seis vezes menor do que a inclinação da reta de ajuste de curva observada na Fig. 19, o que acarreta no descarte da possibilidade de adoção da estrutura de referência (estrutura B da Fig. 18) ao longo da dinâmica.

O volume total do peptídeo foi calculado para a trajetória com temperatura igual a 298 K e mostrou uma diminuição média de, aproximadamente, 6% em relação ao volume inicial. A dobra/volta na estrutura pode ser a maior influência na diminuição do volume do peptídeo (Fig. 21).

Foi feita, também, a determinação da área do peptídeo acessível ao solvente (Fig. 22), que corresponde à área removida de solvente devido à relação do peptídeo com ele mesmo. Ao se enovelar, o peptídeo se contrai, o que acarreta na diminuição da área acessível ao solvente, caracterizando assim a separação das porções hidrofóbicas e hidrofílicas. Como visto no capítulo sobre mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos, esta é a principal característica dos PAMs, a conformação em hélice α anfipática.

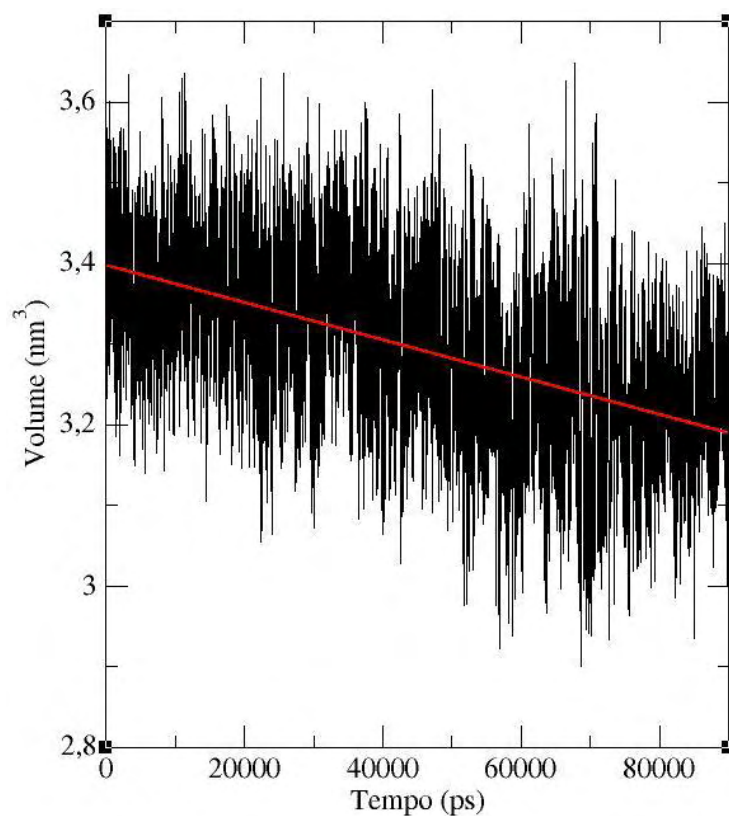


Fig. 21: Volume do peptídeo em função do tempo para a réplica a 298 K. A inclinação negativa da reta de ajuste de curva (regressão linear) indica uma diminuição no volume do peptídeo à medida que o sistema evolui no tempo.

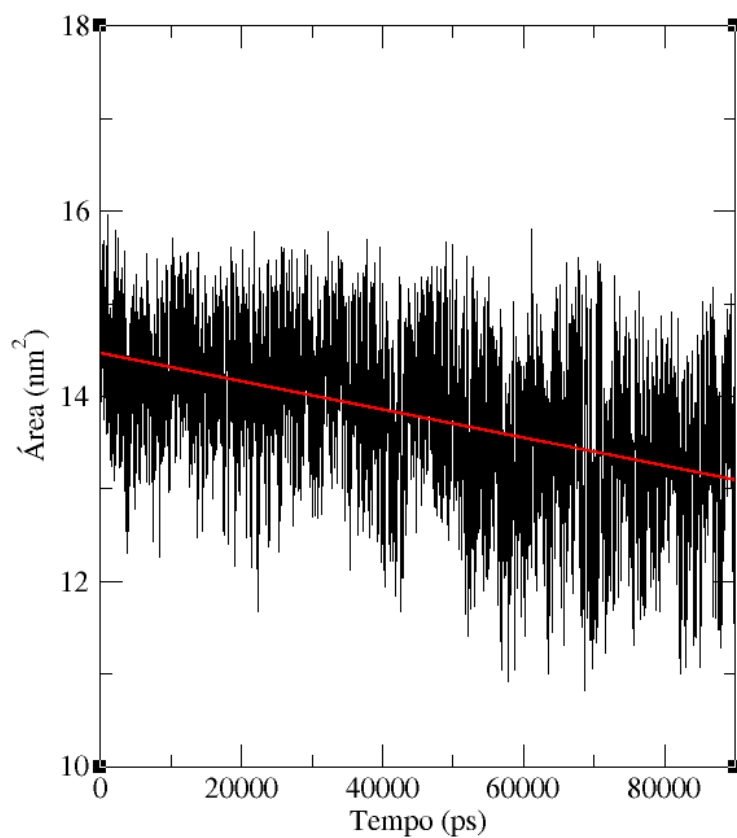


Fig. 22: Área do peptídeo acessível ao solvente em função do tempo para a réplica a 298 K. A inclinação negativa da reta de ajuste de curva (regressão linear) indica uma diminuição na área do peptídeo que fica exposta ao solvente à medida que o sistema evolui no tempo.

As constatações feitas a partir das análises do volume do peptídeo e de sua área acessível ao solvente são corroboradas pela análise do raio de giro da estrutura ao longo da simulação (Fig. 23). O raio de giro fornece uma ideia sobre o grau de compactação do sistema.

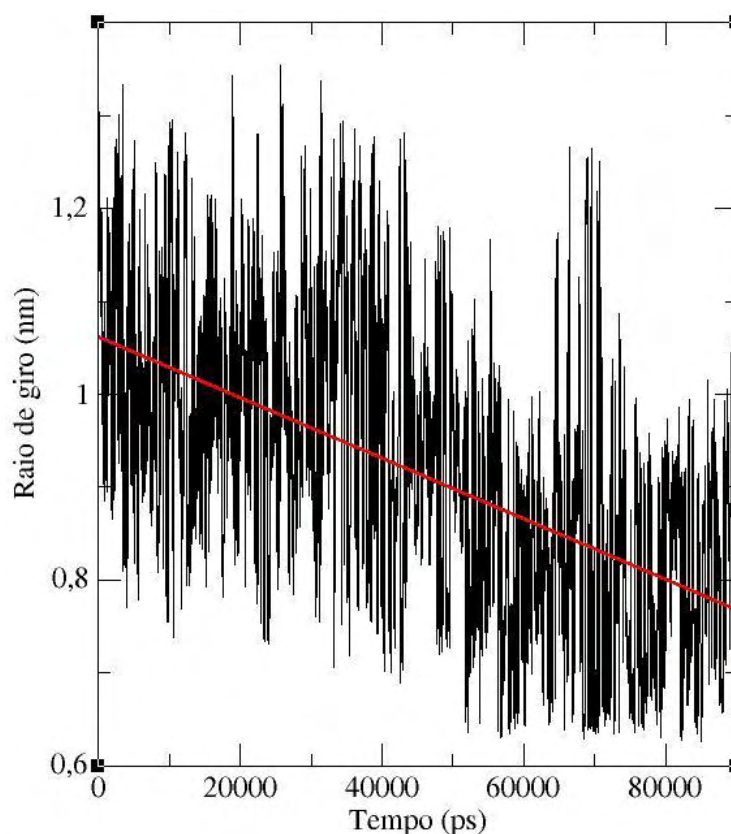


Fig. 23: Raio de giro do peptídeo em função do tempo. A inclinação negativa da reta de ajuste de curva (regressão linear) indica uma diminuição no raio de giro do peptídeo à medida que o sistema evolui no tempo.

A diminuição no raio de giro se dá por conta das ligações feitas pelos resíduos de aminoácidos ao longo da dinâmica. Ligações como pontes de hidrogênio colaboram para a diminuição do volume do sistema e, assim, aumentam o grau de compactação do peptídeo.

O número de pontes de hidrogênio cresce significativamente à medida que o sistema evolui (Fig. 24), chegando ao pico de 13 pontes entre os resíduos de aminoácidos. Estas ligações aumentam tanto a estabilidade do

sistema quanto seu grau de compactação e são ainda responsáveis pela manutenção da estabilidade de conformações estruturais, quaisquer que sejam.

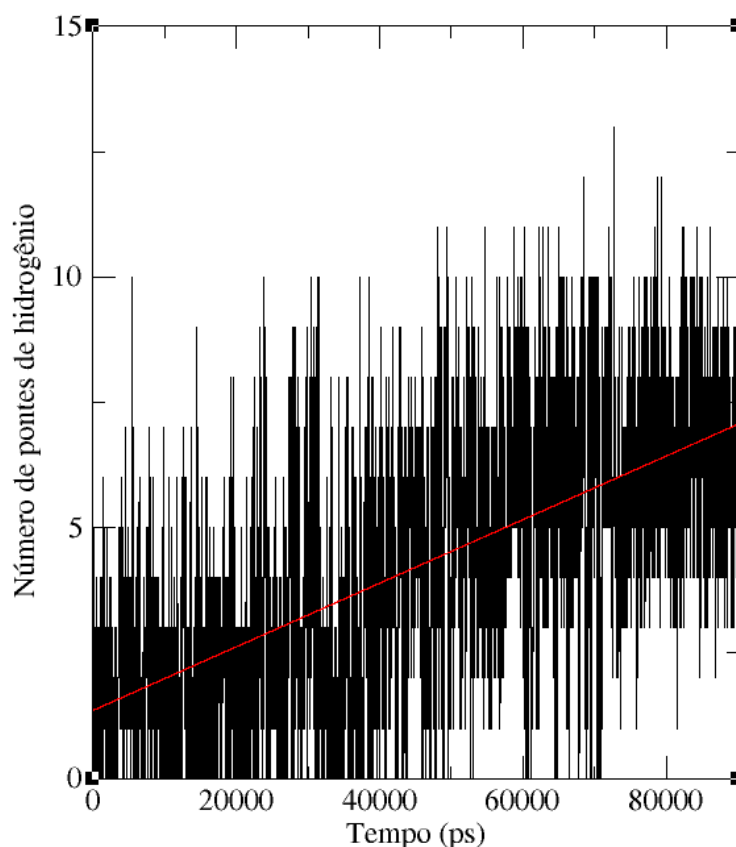


Fig. 24: Número de pontes de hidrogênio entre elementos das cadeias laterais em função do tempo. A inclinação positiva da reta de ajuste de curva (regressão linear) indica um aumento no número de pontes de hidrogênio feitas entre resíduos do peptídeo à medida que o sistema evolui no tempo.

Entretanto, as ligações responsáveis pela estruturação do peptídeo em hélice α são as pontes de hidrogênio formadas entre os grupamentos NH e CO da cadeia principal. O grupamento CO de cada aminoácido forma ponte de hidrogênio com o grupamento NH do aminoácido que está situado a quatro unidades adiante, na sequência linear, sendo que todos os grupamentos NH e CO formam pontes de hidrogênio numa hélice ideal.

O número de pontes de hidrogênio entre os grupamentos NH e CO da cadeia principal também cresce significativamente à medida que o sistema

evolui (fig. 25), chegando ao pico de 7 pontes de hidrogênio entre os grupamentos descritos.

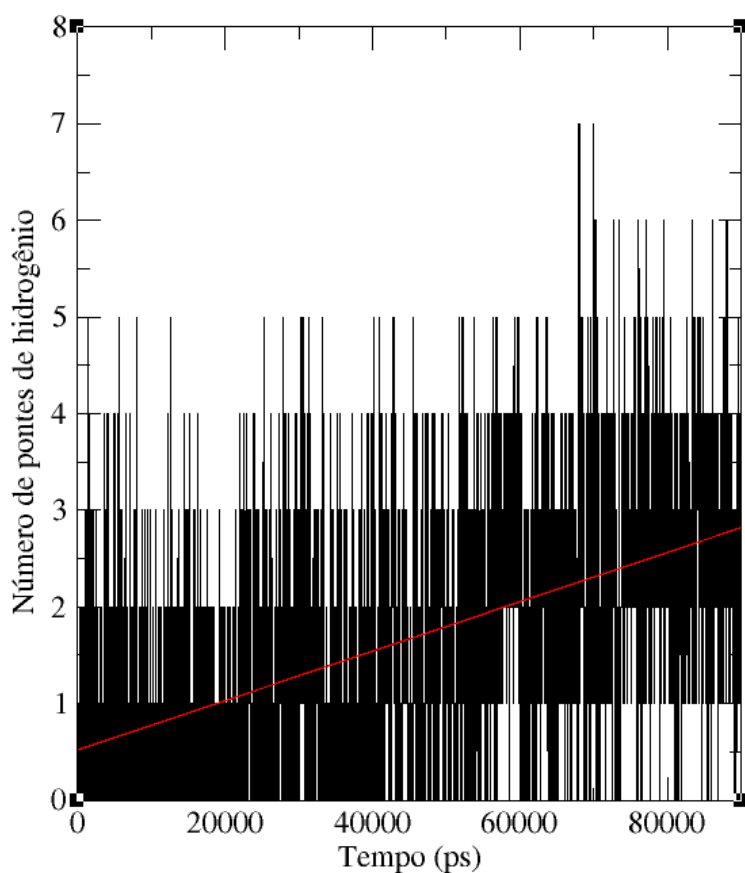


Fig. 25: Número de pontes de hidrogênio entre grupamentos NH e CO da cadeia principal em função do tempo. A inclinação positiva da reta de ajuste de curva (regressão linear) indica um aumento no número de pontes de hidrogênio feitas entre os grupamentos NH e CO da cadeia principal do peptídeo à medida que o sistema evolui no tempo.

Toda esta evolução conformacional, denotada pelo aumento no número de pontes de hidrogênio, diminuição do volume, do raio de giro e da área acessível ao solvente, acarreta na estruturação do peptídeo. Esta estruturação se deve, em parte, às condições do meio onde o peptídeo foi inserido para que ocorresse a simulação.

O meio de simulação, como visto anteriormente, continha uma mistura de água e TFE. No intuito de verificar a influência do TFE na conformação em hélice α do peptídeo, foi determinada a distribuição radial de TFE em torno dos

carbonos α de quatro resíduos equidistantes, Trp3, Leu6, Ala9 e Gln12 (Fig. 26) e, em seguida, a distribuição radial das moléculas de água em torno dos carbonos α dos mesmos resíduos (Fig. 27).

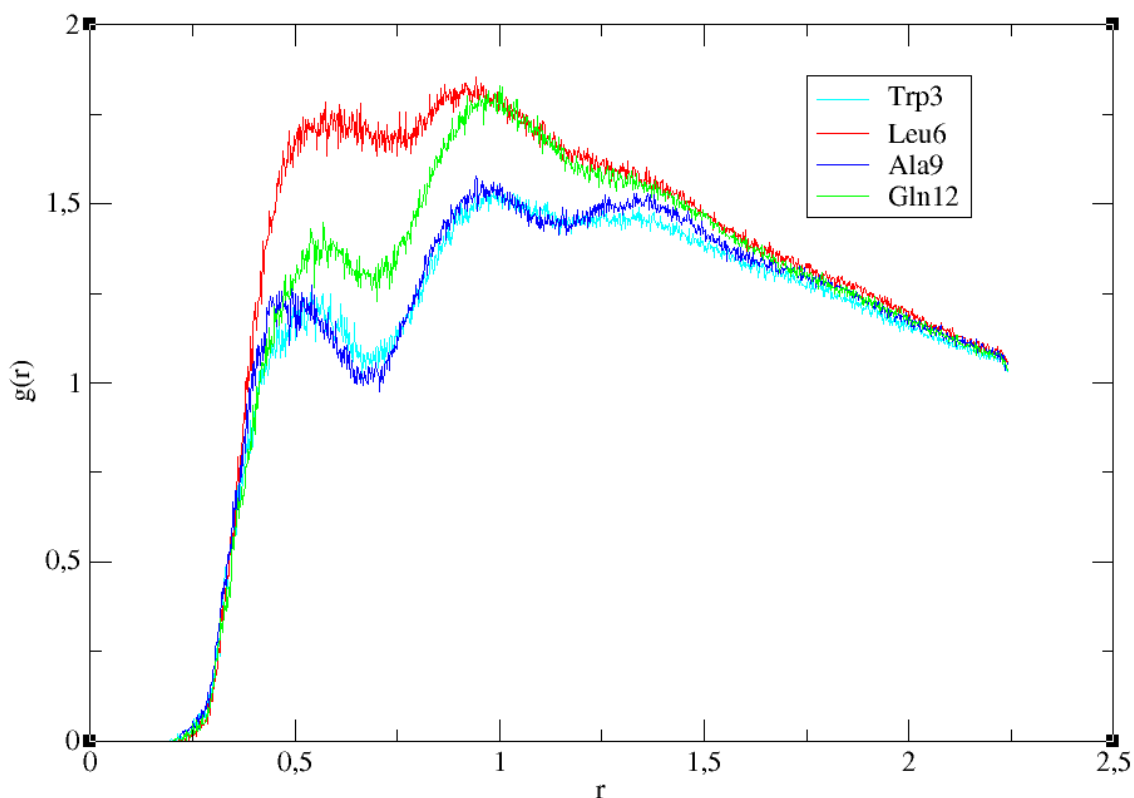


Fig. 26: Distribuição radial de TFE em torno dos carbonos α dos resíduos Trp3 (ciano), Leu6 (vermelho), Ala9 (azul) e Gln12 (verde).

A Fig. 26 mostra um número maior de moléculas de TFE a uma distância menor do carbono α da Leu6 em relação ao carbono α dos resíduos Trp3, Ala9 e Gln12. À distância $r \cong 0,5$ nm há uma concentração bem maior de TFE em torno da Leu6, quando se compara esse mesmo dado em relação aos outros resíduos. Este fato corrobora a ideia sobre a influência do TFE no enovelamento do peptídeo em hélice α , proposta por LUO e BALDWIN em 1997, pois o resíduo Leu6, mesmo afastado do grupo amida ligado ao C-terminal, permanece enovelado na conformação de hélice α durante um tempo maior do que os demais resíduos próximos ao N-terminal.

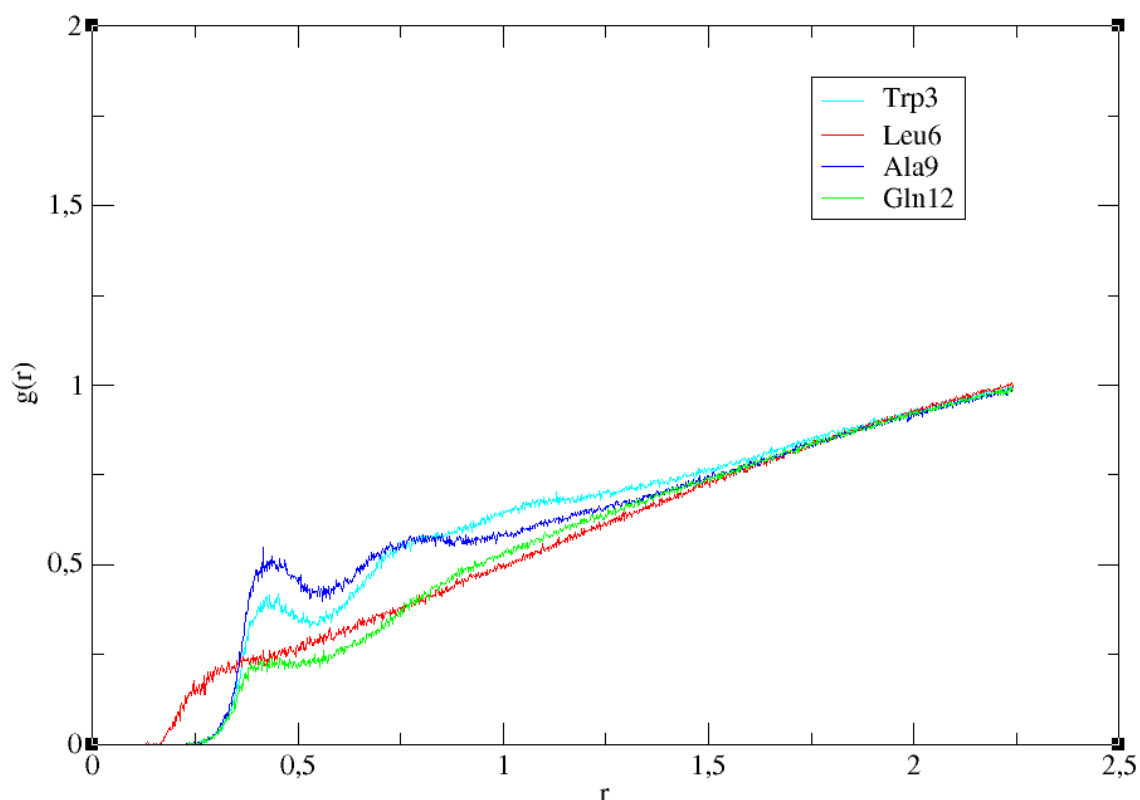


Fig. 27: Distribuição radial de moléculas de água em torno dos carbonos α dos resíduos Trp3 (ciano), Leu6 (vermelho), Ala9 (azul) e Gln12 (verde).

A Fig. 27 mostra uma quantidade menor de moléculas de água nas proximidades dos quatro resíduos destacados em relação ao número de moléculas de TFE. Esse fato corrobora a proposta de LUO e BALDWIN em 1997 sobre a blindagem oferecida pelo TFE em relação à água, facilitando a adoção da conformação em hélice α desses resíduos. Dessa forma, é possível constatar que, nas regiões próximas à cadeia principal, a probabilidade de se encontrar TFE é muito maior do que a de se encontrar água e, à medida que a região de interesse se afasta da cadeia principal, as probabilidades de se encontrar TFE e água vão se igualando, o que denota certa homogeneidade no sistema.

É possível, ainda, determinar o tempo de enovelamento do peptídeo a partir do estudo do processo de enovelamento. O processo de enovelamento

do peptídeo é descrito pelo estudo da dinâmica de enovelamento em que a progressiva formação de uma estrutura é dificultada por uma barreira de energia livre.

Parâmetros de ordem macroscópica tornam o acompanhamento da evolução do processo de enovelamento possível. A superfície de energia é determinada pela energia livre e pela entropia e o enovelamento é “uma competição” entre esses dois parâmetros (OLIVEIRA, 2007). À medida que a dinâmica evolui no tempo, gerando conformações que se deslocam energeticamente da parte mais alta para a parte mais baixa do perfil de energia livre, a entropia conformacional é reduzida. A variação da energia determina a forma como o peptídeo visita diferentes possibilidades energéticas até o estado enovelado. De forma aproximada, esse processo pode ser considerado como uma difusão (BRYNGELSON; WOLYNES, 1987; 1989).

O tempo de enovelamento, então, dependerá da rugosidade da superfície de energia livre e da dificuldade de superar a barreira termodinâmica de energia imposta por esta rugosidade.

A superfície de energia livre do sistema pode ser obtida por meio do WHAM também em função da primeira componente principal e do RMSD (fig. 28). A Fig. 28 mostra alguns mínimos com energia livre em torno de 2 kJ/mol e RMSD por volta de $0,05 \text{ nm}$ e outros mínimos com energia livre inferior a $0,2 \text{ kJ/mol}$ e RMSD em torno de $0,5 \text{ nm}$, denotando uma barreira energética a ser transposta entre as duas configurações (fig. 29).

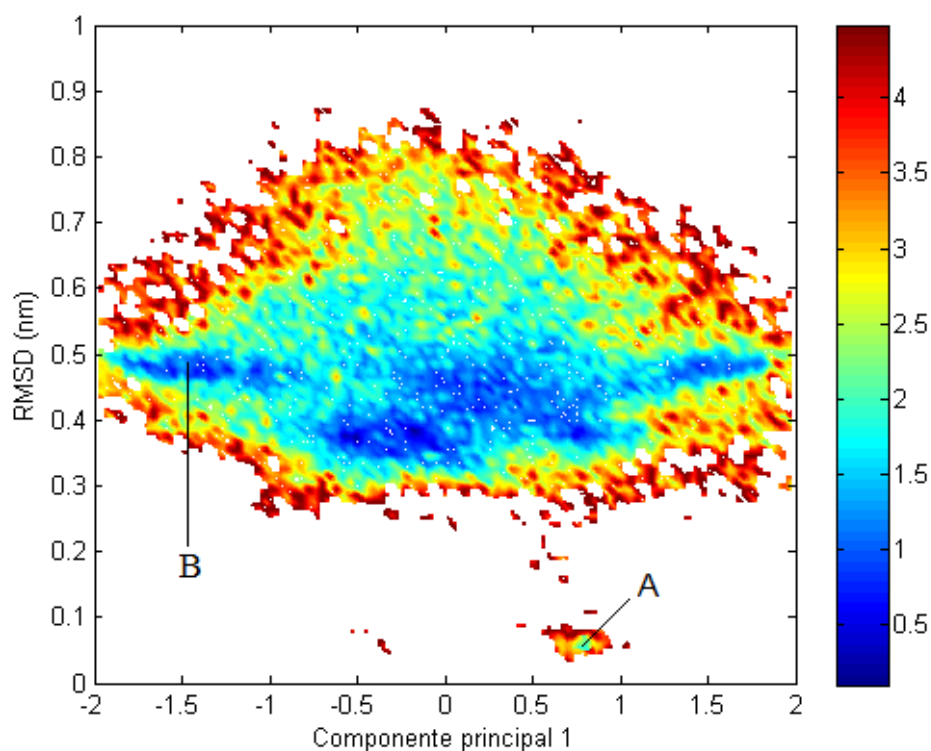


Fig. 28: Superfície de energia livre do sistema a 300 K em função da componente principal 1 e do RMSD. Algumas estruturas são observadas na região de RMSD em torno de $0,05 \text{ nm}$ e outras na região de RMSD em torno de $0,5 \text{ nm}$.

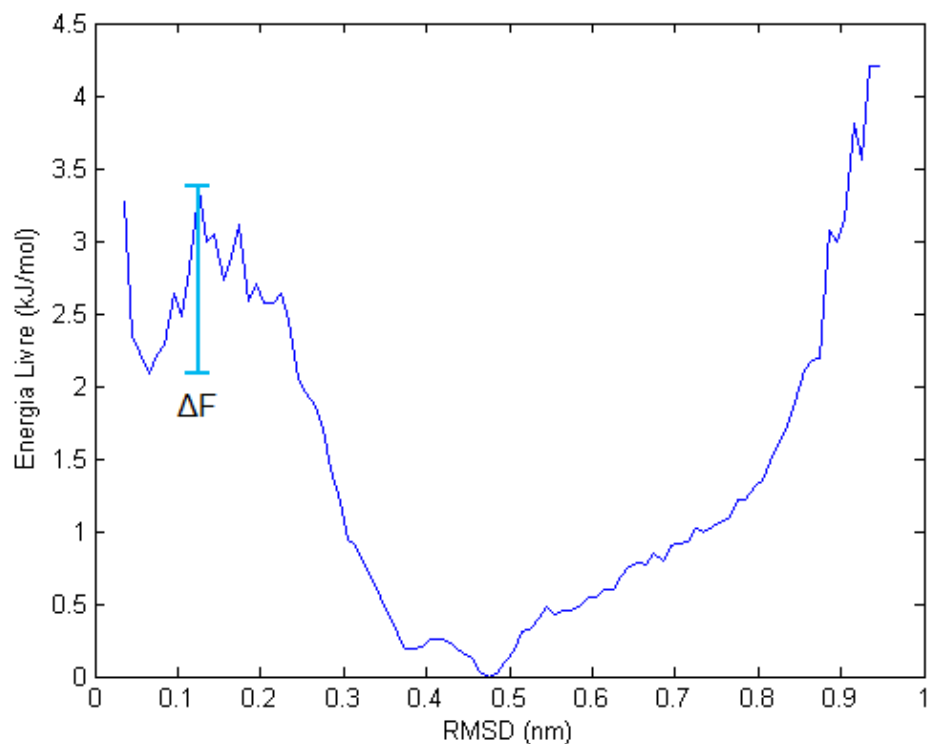


Fig. 29: Energia livre entre os estados desenovelado e enovelado. A barreira termodinâmica de energia livre ΔF é de aproximadamente $1,3 \text{ kJ/mol}$.

A rugosidade da superfície de energia em qualquer estágio do enovelamento decorre da existência de um grande número de barreiras entre

mínimos locais de energia, acarretando na diminuição da velocidade de enovelamento do peptídeo. As estruturas existentes em cada um desses mínimos locais, todavia, são correlacionadas, ou seja, mantêm uma memória da estrutura da qual foi gerada (fig. 30).

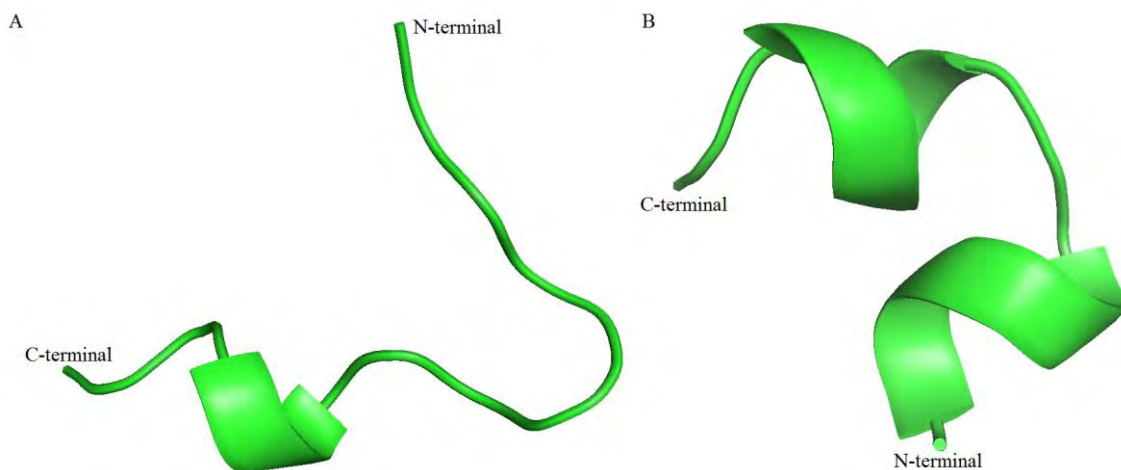


Fig. 30: Estruturas encontradas nos mínimos de energia mostrados nas fig. 28 e 29. A estrutura **A** é encontrada no primeiro mínimo ($RMSD = 0,09 \text{ nm}$) e a estrutura **B** é encontrada no segundo mínimo ($RMSD = 0,48 \text{ nm}$). Figura gerada com o PyMol (DELANO, 2002).

As estruturas são consideradas descorrelacionadas quando a correlação é igual a e^{-1} , posto que o decaimento é exponencial.

Uma forma de determinar o tempo de correlação (tempo necessário para que uma estrutura perca a “memória” da estrutura da qual foi gerada) é por meio da análise da correlação média entre as estruturas de toda a trajetória ao longo da dinâmica (fig. 31). O tempo de correlação é determinado a partir da equação de ajuste de curva. Para uma medida mais acurada, o ajuste de curva foi feito por meio de uma equação exponencial entre os instantes 0 ns e 40 ns .

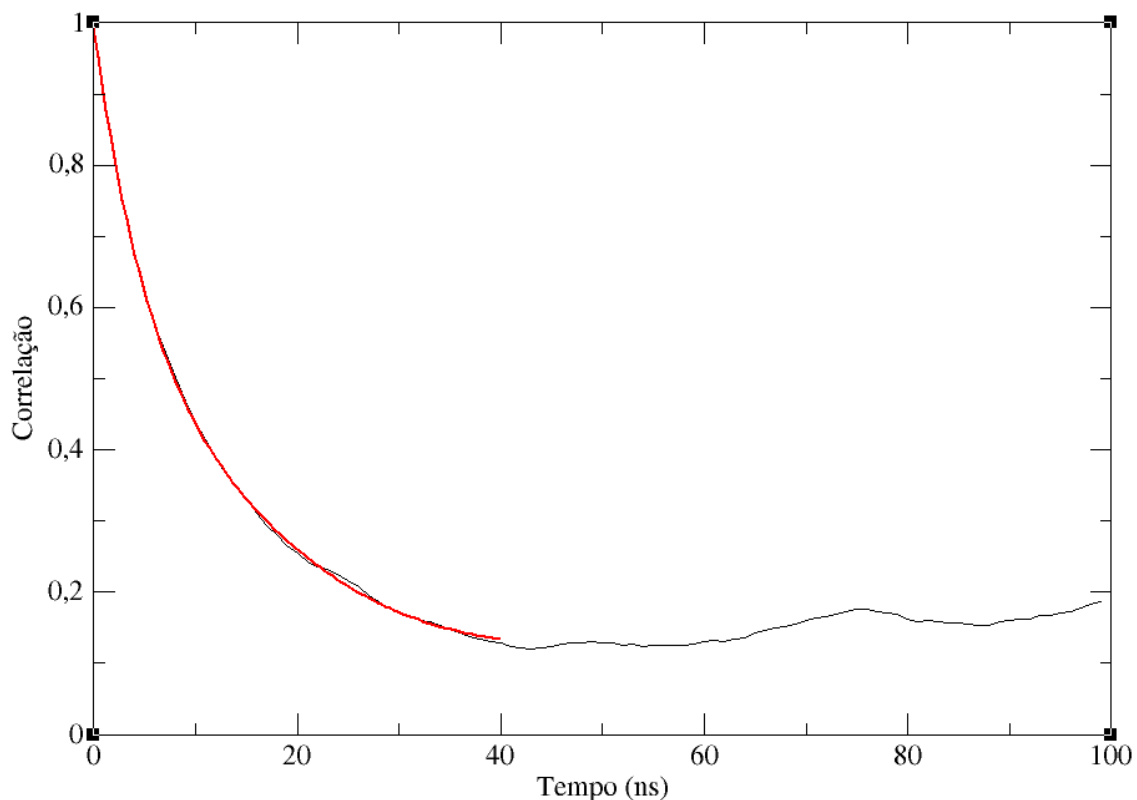


Fig. 31: Correlação entre estruturas em diferentes mínimos locais de energia ao longo do tempo. O tempo de correlação entre as estruturas (tempo de decaimento da função de correlação) é de 13 ns.

A correlação entre estados pode ser entendida em termos do coeficiente de difusão configuracional (BRYNGELSON; WOLYNES, 1987; 1989). O coeficiente de difusão configuracional (D) é determinado da seguinte forma:

$$D = \frac{\langle RMSD \rangle^2 - \langle RMSD^2 \rangle}{t_{corr}} \quad 36$$

onde as medidas de RMSD são feitas a partir de configurações do ensemble desenovelado durante toda simulação. Os valores de $\langle RMSD \rangle^2$ e $\langle RMSD^2 \rangle$ são, respectivamente, 1,56196 e 0,40929 e $t_{corr} = 13$ ns, de forma que D vale $0,08867 \text{ nm}^2 \cdot \text{ns}^{-1}$.

Assim, o tempo de transição ($\sigma_{transição}$) entre o estado desenovelado e o estado enovelado pode ser obtido por meio da adoção de uma coordenada de

reação, como, por exemplo, o raio de giro médio da conformação desenovelada (GARCIA; SANBONMATSU, 2001) que é igual a 1,06 nm. O $\sigma_{transição}$ é determinado da seguinte forma (WALDAUER *et al.*, 2010):

$$\sigma_{transição} = \frac{Rg^2}{D} e^{\frac{\Delta F}{KT}} \quad 37$$

onde $\Delta F = 1,3 \text{ kJ/mol}$, $K = 0,00831447 \text{ kJ/mol.K}$ e $T = 300 \text{ K}$.

O tempo de transição ($\sigma_{transição}$), tempo necessário para que o sistema deixe um estado relativamente estável na conformação desenovelada e acesse outro estado relativamente estável na conformação enovelada, é de, aproximadamente, 21,34 ns.

As análises apresentadas mostram, assim, o enovelamento do peptídeo, mesmo que parcial, em hélice α .

5. Conclusão

Neste trabalho foi apresentada a análise conformacional do peptídeo Polybia-MPI em mistura de água e TFE. O sistema foi analisado por meio de simulação por dinâmica molecular via *replica exchange* entre 280 K e 322 K.

A simulação por dinâmica molecular via *replica exchange* teve por objetivo a varredura do espaço conformacional entre as temperaturas citadas, no intuito de obter uma estatística que favorecesse a proposição da estrutura tridimensional do peptídeo Polybia-MPI. Os dados das simulações permitem os seguintes comentários:

1. A tendência à conformação helicoidal do peptídeo foi verificada e, a partir desta apreciação, é possível inferir que a estruturação da macromolécula é um processo energeticamente favorável.
2. Os mínimos de energia livre da trajetória do peptídeo estão mais espalhados ao longo da componente principal 1, indicando flutuações menores ao longo da componente principal 2, denotando maior ocorrência de movimentos de maior amplitude em relação a movimentos de menor amplitude, o que acarreta em estabilidade conformacional.
3. A estabilidade da conformação com trechos de hélice α , verificada ao longo da trajetória, possibilita a proposição de que esta conformação seja a estrutura tridimensional do peptídeo Polybia-MPI.

6. Referências Bibliográficas

ALDER, B. J.; WAINWRIGHT, T. E. Phase Transition for a Hard Sphere System. **The Journal of Chemical Physics**, v. 27, n. 5, p. 1208, 1957. AMER INST PHYSICS. Disponível em: <<http://link.aip.org/link/JCPSA6/v27/i5/p1208/s1&Agg=doi>>. .

ALDER, B. J.; WAINWRIGHT, T. E. Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 31, n. 2, p. 459-466, 1959. Disponível em: <<http://link.aip.org/link/JCPSA6/v31/i2/p459/s1&Agg=doi>>. .

ANDREU, D.; RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 415-433, 1998.

ANDREU, D.; UBACH, J.; BOMAN, A., *et al.* Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity. **FEBS Letters**, v. 296, n. 2, p. 190-194, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1733777>>. .

ANFENSEN, C. B.; REDFIELD, R. R.; CHOATE, W. L.; PAGE, J.; CARROLL, W. R. Studies on the gross structure, cross-linkages, and terminal sequences in ribonuclease. **The Journal of biological chemistry**, v. 207, n. 1, p. 201-10, 1954. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13152095>>. .

ARBUZOVA, A.; SCHWARZ, G. Pore-forming action of mastoparan peptides on liposomes: a quantitative analysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1420, n. 1-2, p. 139-152, 1999.

ARGIOLAS, A.; PISANO, J. J. Facilitation of phospholipase A2 activity by mastoparans, a new class of mast cell degranulating peptides from wasp venom. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 22, p. 13697-13702, 1983.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. V.; HERMANS, J. Interaction Models for Water in Relation To Protein Hydration. In: B. Pullman (Ed.); **Intermolecular Forces**. v. 11, p.331-338, 1981. D. Reidel Publishing Company.

BERG, B. A.; NEUHAUS, T. Multicanonical Ensemble: A New Approach to Simulate First-order Phase Transitions. **Physical Review Letters**, v. 68, n. 1, p. 9-12, 1992. American Physical Society. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/hep-lat/9202004>>. .

BOMAN, H. G.; AGERBERTH, B.; BOMAN, A. Mechanisms of action on Escherichia coli of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2978-2984, 1993.

BROGDEN, K A; DE LUCCA, A. J.; BLAND, J.; ELLIOTT, S. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for Pasteurella haemolytica. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 1, p. 412-416, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40248&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-50, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15703760>>. .

BROGDEN, KIM A; ACKERMANN, M.; MCCRAY, P. B.; TACK, B. F. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 5, p. 465-478, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857903001808>>. .

BRYNGELSON, J D; WOLYNES, P G. Spin-glasses and the statistical-mechanics of protein folding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**, v. 84, p. 7524-7528, 1987.

BRYNGELSON, JOSEPH D; WOLYNES, PETER G. Intermediates and Barrier Crossing in a Random Energy Model (with Applications to Protein Folding). , , n. 10, p. 6902-6915, 1989.

BULET, PHILIPPE; STÖCKLIN, R. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein and peptide letters**, v. 12, n. 1, p. 3-11, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15638797>>. .

BULET, PHILIPPE; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 169-184, 2004. John Wiley & Sons. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199962>>. .

CHANDLER, D. Statistical mechanics of isomerization dynamics in liquids and the transition state approximation. **The Journal of Chemical Physics**, v. 68, n. 6, p. 2959, 1978. AIP. Disponível em: <<http://link.aip.org/link/?JCPSA6/68/2959/1>>. .

CHEN, F.-Y.; LEE, M.-T.; HUANG, HUEY W. Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 2, p. 908-914, 2002. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11806932>>. .

CHEN, F.-Y.; LEE, M.-T.; HUANG, HUEY W. Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. **Biophysical Journal**, v. 84, n. 6, p. 3751-3758, 2003. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12770881>>. .

CHO, M. H.; TAN, Z.; ERNEUX, C.; SHEARS, S. B.; BOSS, W. F. The effects of mastoparan on the carrot cell plasma membrane polyphosphoinositide phospholipase C. **Plant Physiology**, v. 107, n. 3, p. 845-856, 1995.

CHUANG, C. C.; HUANG, W. C.; YU, H. M.; WANG, K. T.; WU, S. H. Conformation of Vespa basalis mastoparan-B in trifluoroethanol-containing aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1292, n. 1, p. 1-8, 1996.

CUDIC, M.; OTVOS, L. Intracellular targets of antibacterial peptides. **Current Drug Targets**, v. 3, n. 2, p. 101-106, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11958294>>. .

DARDEN, TOM; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089-10092, 1993. AIP. Disponível em: <<http://link.aip.org/link/JCPSA6/v98/i12/p10089/s1&Agg=doi>>. .

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. , 2002. DeLano Scientific. Disponível em: <<http://www.pymol.org>>. .

DENSCHLAG, R.; LINGENHEIL, M.; TAVAN, P. Optimal temperature ladders in replica exchange simulations. **Chemical Physics Letters**, v. 473, n. 1-3, p. 193-195, 2009. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2009.03.053>>. .

DOHTSU, K.; OKUMURA, K.; HAGIWARA, K.; PALMA, M S; NAKAJIMA, T. Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (Hymenoptera-Vespidae). **Natural Toxins**, v. 1, n. 5, p. 271-276, 1993.

DOS SANTOS CABRERA, M P; DE SOUZA, B M; FONTANA, R., *et al.* Conformation and lytic activity of eumenine mastoparan: a new antimicrobial peptide from wasp venom. **The journal of peptide research official journal of the American Peptide Society**, v. 64, n. 3, p. 95-103, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15317499>. .

DOS SANTOS CABRERA, MARCIA PEREZ; COSTA, S. T. B.; DE SOUZA, BIBIANA MONSON, *et al.* Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1. **European biophysics journal EBJ**, v. 37, n. 6, p. 879-891, 2008.

ENO, A. E. Pharmacological investigation of oedema induced by venom from the wasp *Polistes fuscatus*. **Toxicon official journal of the International Society on Toxinology**, v. 35, n. 12, p. 1691-1698, 1997.

ESSMANN, U.; PERERA, L.; BERKOWITZ, M. L., *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577-8593, 1995. AIP. Disponível em: <<http://link.aip.org/link/JCPSA6/v103/i19/p8577/s1&Agg=doi>>. .

FAHRNER, R. L.; DIECKMANN, T.; HARWIG, S. S., *et al.* Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. **Chemistry & Biology**, v. 3, n. 7, p. 543-550, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://biomednet.com/article/cm3707>>. .

FERRENBURG, A. M.; SWENDSEN, R. H. Optimized Monte Carlo data analysis. **Physical Review Letters**, v. 63, n. 12, p. 1195-1198, 1989. American Physical Society. Disponível em: <<http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.63.1195>>. .

FIORONI, M.; BURGER, K.; MARK, A. E.; ROCCATANO, D. A New 2,2,2-Trifluoroethanol Model for Molecular Dynamics Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 51, p. 12347-12354, 2000. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp002115v>>. .

FRIEDRICH, C. L.; ROZEK, A.; PATRZYKAT, A.; HANCOCK, R. E. Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 26, p. 24015-24022, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294848>>. .

GARCIA, A. E.; SANBONMATSU, K. Y. Exploring the energy landscape of a hairpin in explicit solvent. **Proteins**, v. 42, n. 3, p. 345-54, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/1097-0134\(20010215\)42:3<345::AID-PROT1001>3.0.CO;2-3](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0134(20010215)42:3<345::AID-PROT1001>3.0.CO;2-3)>. .

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C., *et al.* ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3784-3788, 2003. Disponível em: <<http://www.nar.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/gkg563>>. .

GEYER, C. J. Markov chain Monte Carlo maximum likelihood. In: E. M. Keramidas (Ed.); Computing Science and Statistics Proceedings of the 23rd Symposium on the Interface. **Anais...** . v. terface, p.156-163, 1991. MINNESOTA UNIV MINNEAPOLIS SCHOOL OF STATISTICS. Disponível em: <<http://www.intercag.org/labs/sabatti/Stat202c/geyer.pdf>>. .

GOUMON, Y.; STRUB, J. M.; MONIATTE, M., *et al.* The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. **The Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 235, n. 3, p. 516-525, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.t01-1-00516.x>>. .

HANCOCK, R. E.; DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 402-410, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10989307>>. .

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, HANS-GEORG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551-1557, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160061>>. .

HANSMANN, U. H. E.; OKAMOTO, Y. Generalized-ensemble Monte carlo method for systems with rough energy landscape. , 1997. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/cond-mat/9710306>>. .

HANSMANN, U. H. E.; OKAMOTO, Y. Tackling the protein folding problem by a generalized-ensemble approach with Tsallis statistics. **Brazilian Journal of Physics**, v. 29, n. 1, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-97331999000100017&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. .

HEIDARI, M.; HAMIR, A.; CUTLIP, R. C.; BROGDEN, KIM A. Antimicrobial anionic peptide binds in vivo to Mannheimia (Pasteurella) haemolytica attached to ovine alveolar epithelium. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, n. 1, p. 69-72, 2002.

HELLER, W. T.; WARING, A J; LEHRER, R. I., *et al.* Membrane thinning effect of the beta-sheet antimicrobial protegrin. **Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 139-145, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625488>>. .

HESS, B; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463-1472, 1997. Citeseer. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/48405/ABSTRACT>>. .

HESS, BERK; KUTZNER, C.; SPOEL, D. VAN DER; LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435-447, 2008. American Chemical Society. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ct700301q>>. .

HIGASHIJIMA, T.; UZU, S.; NAKAJIMA, T.; ROSS, E. M. Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 14, p. 6491-6494, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3129426>>. .

HIGASHIJIMA, T.; WAKAMATSU, K.; TAKEMITSU, M., *et al.* Conformational change of mastoparan from wasp venom on binding with phospholipid membrane. **FEBS Letters**, v. 152, n. 2, p. 227-230, 1983.

HIRAI, Y.; KUWADA, M.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T. A new mast cell degranulating peptide homologous to mastoparan in the venom of Japanese hornet (*Vespa xanthoptera*). **Chemical pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1945-1946, 1979.

HIRAI, Y.; UENO, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, H.; NAKAJIMA, T. A New Mast-Cell Degranulating Peptide, Polistes Mastoparan, in the Venom of Polistes-Jadwigae. **Biomedical ResearchTokyo**, v. 1, p. 185-187, 1980.

HIRAI, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, H., *et al.* A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. **Chemical pharmaceutical bulletin**, v. 27, n. 8, p. 1942-1944, 1979.

HORI, Y.; DEMURA, M.; IWADATE, M., *et al.* Interaction of mastoparan with membranes studied by ¹H-NMR spectroscopy in detergent micelles and by solid-state ²H-NMR and ¹⁵N-NMR spectroscopy in oriented lipid bilayers. **The Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 268, n. 2, p. 302-309, 2001.

HUANG, H W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. **Biochemistry**, v. 39, n. 29, p. 8347-8352, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913240>>. .

HUKUSHIMA, K.; NEMOTO, K. Exchange Monte Carlo Method and Application to Spin Glass Simulations. **Journal of the Physical Society of Japan**, v. 65, n. 6, p. 10, 1995. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/cond-mat/9512035>>. .

IRBÄCK, A.; PETERSON, C.; POTTHAST, F.; SANDELIN, E. Monte Carlo Procedure for Protein Design. **Physical Review E**, v. 58, n. 5, p. 7, 1997. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/cond-mat/9711092>>. .

JAIN, E.; BAIROCH, A.; DUVAUD, S., *et al.* Infrastructure for the life sciences: design and implementation of the UniProt website. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 136, 2009. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426475>>. .

JOHANSSON, J.; GUDMUNDSSON, G. H.; ROTTENBERG, M. E.; BERNDT, K. D.; AGERBERTH, B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 6, p. 3718-3724, 1998. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/273/6/3718>>. .

KATSU, T.; KUROKO, M.; MORIKAWA, T., *et al.* Mechanism of membrane damage induced by the amphipathic peptides gramicidin S and melittin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 983, n. 2, p. 135-141, 1989.

KATSU, T.; KUROKO, M.; MORIKAWA, T., *et al.* Interaction of wasp venom mastoparan with biomembranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1027, n. 2, p. 185-190, 1990.

KAVANAGH, K.; DOWD, S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 285-289, 2004. Disponível em: <<http://eprints.nuim.ie/archive/00000354/01/R03014.pdf>>. .

KILLIAN, J. A. Gramicidin and gramicidin-lipid interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1113, n. 3-4, p. 391-425, 1992.

KIRKWOOD, J. G. Statistical mechanics of fluid mixtures. **The Journal of Chemical Physics**, v. 3, n. 5, p. 300, 1935. \$abstract.copyright_name.value. Disponível em: <<http://link.aip.org/link/?JCPSA6/3/300/1>>. .

KLINKER, J. F.; HAGELÜKEN, A.; GRÜNBAUM, L., *et al.* Mastoparan may activate GTP hydrolysis by Gi-proteins in HL-60 membranes indirectly through interaction with nucleoside diphosphate kinase. **The Biochemical journal**, v. 304 (Pt 2, p. 377-383, 1994.

KONNO, K; HISADA, M.; FONTANA, R., *et al.* Anoplin, a novel antimicrobial peptide from the venom of the solitary wasp *Anoplius samariensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1550, n. 1, p. 70-80, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738089>>. .

KONNO, K.; HISADA, M.; ITAGAKI, Y., *et al.* Isolation and structure of pompilidotoxins, novel peptide neurotoxins in solitary wasp venoms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 250, n. 3, p. 612-616, 1998.

KONNO, K.; HISADA, M.; NAOKI, H., *et al.* Structure and biological activities of eumenine mastoparan-AF (EMP-AF), a new mast cell degranulating peptide in the venom of the solitary wasp (*Anterhynchium flavomarginatum micado*). **Toxicon official journal of the International Society on Toxinology**, v. 38, n. 11, p. 1505-1515, 2000.

KUMAR, S.; BOUZIDA, D.; SWENDSEN, R. H.; KOLLMAN, P. A.; ROSENBERG, J. M. The Weighted Histogram Analysis Method for Free-Energy Calculations on Biomolecules. I. The Method. , v. 13, n. 8, p. 1011-1021, 1992.

KUSUNOKI, H.; WAKAMATSU, K.; SATO, K.; MIYAZAWA, T.; KOHNO, T. G protein-bound conformation of mastoparan-X: heteronuclear multidimensional transferred nuclear overhauser effect analysis of peptide uniformly enriched with ¹³C and ¹⁵N. **Biochemistry**, v. 37, n. 14, p. 4782-4790, 1998.

LAI, R.; LIU, H.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. Identification and cloning of a trypsin inhibitor from skin secretions of Chinese red-belly toad *Bombina maxima*. **Comparative biochemistry and physiology Part B Biochemistry molecular biology**, v. 131, n. 1, p. 47-53, 2002.

LAZAREV, V. N.; STIPKOVITS, L.; BIRO, J., *et al.* Induced expression of the antimicrobial peptide melittin inhibits experimental infection by *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. **Microbes and infection Institut Pasteur**, v. 6, n. 6, p. 536-541, 2004.

LINSE, S.; DRAKENBERG, T.; FORSÉN, S. Mastoparan binding induces a structural change affecting both the N-terminal and C-terminal domains of calmodulin. A ¹¹³Cd-NMR study. **FEBS Letters**, v. 199, n. 1, p. 28-32, 1986.

LORENZI, C. C. B. Estudo estrutural de mastoparanos isolados de vespas solitárias. São José do Rio Preto, 2002. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

LUDTKE, S.; HE, K.; HUANG, H. Membrane thinning caused by magainin 2. **Biochemistry**, v. 34, n. 51, p. 16764-16769, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8527451>>. .

LUO, P.; BALDWIN, R. L. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. **Biochemistry**, v. 36, n. 27, p. 8413-21, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9204889>>. .

MALENCIK, D. A.; ANDERSON, S. R. High affinity binding of the mastoparans by calmodulin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 114, n. 1, p. 50-56, 1983.

MANDARD, N.; BULET, PHILIPPE; CAILLE, A.; DAFFRE, SIRLEI; VOVELLE, F. The solution structure of gomesin, an antimicrobial cysteine-rich peptide from the spider. **The Federation of European Biochemical Societies Journal**, v. 269, n. 4, p. 1190-1198, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856345>>. .

MARINARI, E.; PARISI, G.; RUIZ-LORENZO, J. Phase structure of the three-dimensional Edwards-Anderson spin glass. **Physical Review B**, v. 58, n. 22, p. 14852-14863, 1998. Disponível em: <<http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.58.14852>>. .

MATSUZAKI, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, n. 1-2, p. 1-10, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10590299>>. .

MCDOWELL, L.; SANYAL, G.; PRENDERGAST, F. G. Probable role of amphiphilicity in the binding of mastoparan to calmodulin. **Biochemistry**, v. 24, n. 12, p. 2979-2984, 1985.

MCREE, D. E. Differential evolution for protein crystallographic optimizations. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2276-2279, 2004.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952-962, 1992. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.540130805>>. .

NAKAJIMA, T.; YASUHARA, T.; UZU, S., *et al.* Wasp venom peptides; wasp kinins, new cytotoxic peptide families and their physico-chemical properties. **Peptides**, v. 6 Suppl 3, p. 425-430, 1985.

NEWMAN, M. E. J.; BARKEMA, G. T. **Monte Carlo Methods in Statistical Physics**. Oxford University Press, 1999.

OKANO, Y.; TAKAGI, H.; TOHMATSU, T., *et al.* A wasp venom mastoparan-induced polyphosphoinositide breakdown in rat peritoneal mast cells. **FEBS Letters**, v. 188, n. 2, p. 363-366, 1985.

OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 451-463, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10333737>>. .

PARK, N. G.; YAMATO, Y.; LEE, S.; SUGIHARA, G. Interaction of mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayers and its antimicrobial activity. **Biopolymers**, v. 36, n. 6, p. 793-801, 1995.

RAHMAN, A. Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon. **Physical Review**, v. 136, n. 2A, p. A405-A411, 1964. American Physical Society. Disponível em: <<http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.136.A405>>. .

RAHMAN, ANEESUR; STILLINGER, F. Propagation of sound in water. A molecular-dynamics study. **Physical Review A**, v. 10, n. 1, p. 368-378, 1974. Disponível em: <http://pra.aps.org/abstract/PRA/v10/i1/p368_1>. .

ROUX, B. The calculation of the potential of mean force using computer simulations. **Computer Physics Communications**, v. 91, p. 275-282, 1995.

SCHITTEK, B.; HIPFEL, R.; SAUER, B., *et al.* Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. **Nature Immunology**, v. 2, n. 12, p. 1133-1137, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694882>>. .

SCOTT, M. G.; YAN, H.; HANCOCK, R. E. Biological properties of structurally related alpha-helical cationic antimicrobial peptides. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 4, p. 2005-2009, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10085049>. .

SELSTED, M. E.; BROWN, D. M.; DELANGE, R. J.; HARWIG, S. S.; LEHRER, R. I. Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils. **The Journal of biological chemistry**, v. 260, n. 8, p. 4579-84, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3988726>>. .

SFORÇA, M. L.; OYAMA, S.; CANDURI, F., *et al.* How C-terminal carboxyamidation alters the biological activity of peptides from the venom of the eumenine solitary wasp. **Biochemistry**, v. 43, n. 19, p. 5608-5617, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15134435>>. .

SILIGARDI, G.; DRAKE, A. F. The importance of extended conformations and, in particular, the PII conformation for the molecular recognition of peptides. **Biopolymers**, v. 37, n. 4, p. 281-292, 1995.

SILVA, P. I.; DAFFRE, S; BULET, P. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33464-33470, 2000.

SMITH, L. I. A tutorial on principal components analysis. **Cornell University USA**, v. 51, p. 52, 2002. Cornell Univeristy. Disponível em: <http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf>. .

SOUZA, B. M.; MENDES, M. A.; SANTOS, L. D., *et al.* Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides**, v. 26, p. 2157-2164, 2005.

STEFFEN, H.; RIEG, S.; WIEDEMANN, I., *et al.* Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2608-2620, 2006.

STERN, A. S.; JONES, B. N.; SHIVELY, J. E.; STEIN, S.; UNDEFRIEND, S. Two adrenal opioid polypeptides: proposed intermediates in the processing of proenkephalin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 3, p. 1962-1966, 1981.

SUGITA, Y.; OKAMOTO, Y. Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding. **Chemical Physics Letters**, , n. November, p. 141-151, 1999.

SUGITA, Y.; OKAMOTO, Y. Replica-exchange multicanonical algorithm and multicanonical replica-exchange method for simulating systems with rough energy landscape. **Chemical Physics Letters**, v. 329, n. 3-4, p. 9, 2000. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/cond-mat/0009119>>. .

SUGITA, Y.; OKAMOTO, Y. Molecular mechanism for stabilizing a short helical peptide studied by generalized-ensemble simulations with explicit solvent. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 5, p. 3180-3190, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15749777>. .

SUKUMAR, M.; HIGASHIJIMA, T. G protein-bound conformation of mastoparan-X, a receptor-mimetic peptide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 30, p. 21421-21424, 1992.

SWENDSEN, R. H.; WANG, J.-S. Replica Monte Carlo Simulation of Spin-Glasses. **Physical Review Letters**, v. 57, n. 21, p. 2607-2609, 1986. American Physical Society. Disponível em: <<http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.57.2607>>. .

TESI, M.; VAN RENSBURG, E. J. J.; ORLANDINI, E.; WHITTINGTON, S. Knot probability for lattice polygons in confined geometries. **Journal of Physics A: Mathematical and General**, v. 27, p. 347-360, 1994. Institute of Physics Publishing. Disponível em: <<http://www.iop.org/EJ/abstract/0305-4470/27/2/019>>. .

TORRIE, GLENN M; VALLEAU, JOHN P. Monte Carlo free energy estimates using non-Boltzmann sampling: Application to the sub-critical Lennard-Jones fluid. **Chemical Physics Letters**, v. 28, n. 4, p. 578-581, 1974. Elsevier. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009261474801090>>. .

VALLEAU, J P; TORRIE, G M. A guide to Monte Carlo for statistical mechanics. 2. Byways. In: B. J. Berne (Ed.); **Statistical mechanics B Modern theoretical chemistry**. v. 6, p.169-194, 1977. Plenum.

VAN DER SPOEL, D.; SIMULATIONS, C. **Gromacs user manual**. The GROMACS development team, 2006.

VETTER, R. S.; VISSCHER, P. K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **International journal of dermatology**, v. 37, n. 7, p. 481-96, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9679688>>. .

VOET, D.; VOET, J. G. **BIOCHEMISTRY AND**. Wiley, 1995.

WAKAMATSU, K.; OKADA, A.; MIYAZAWA, T.; OHYA, M.; HIGASHIJIMA, T. Membrane-bound conformation of mastoparan-X, a G-protein-activating peptide. **Biochemistry**, v. 31, n. 24, p. 5654-5660, 1992.

WALDAUER, S. A.; BAKAJIN, O.; LAPIDUS, L. J. Extremely slow intramolecular diffusion in unfolded protein L. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 31, p. 13713-13717, 2010.

WANG, K.-R.; YAN, J.-X.; ZHANG, B.-Z., *et al.* Novel mode of action of polybia-MPI, a novel antimicrobial peptide, in multi-drug resistant leukemic cells. **Cancer Letters**, v. 278, n. 1, p. 65-72, 2009.

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

WEINGARTEN, R.; RANSNÄS, L.; MUELLER, H.; SKLAR, L. A.; BOKOCH, G. M. Mastoparan interacts with the carboxyl terminus of the alpha subunit of Gi. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 19, p. 11044-11049, 1990.

WHILES, J. A.; BRASSEUR, R.; GLOVER, K. J., *et al.* Orientation and effects of mastoparan X on phospholipid bicelles. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 1, p. 280-293, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11159401>>. .

WU, X. R.; MEDINA, J. J.; SUN, T. T. Selective interactions of UPIa and UPIb, two members of the transmembrane 4 superfamily, with distinct single transmembrane-domained proteins in differentiated urothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 50, p. 29752-29759, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8530366>>. .

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003. ASPET. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/55/1/27.full>>. .

YOUNT, N. Y.; WARING, ALAN J; GANK, K. D., *et al.* Structural correlates of antimicrobial efficacy in IL-8 and related human kinocidins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 3, p. 598-608, 2007.

ZASLOFF, M. Reconstructing one of nature's designs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 7, p. 236-238, 2000.

ZASLOFF, MICHAEL. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807545>>. .

ZHANG, L.; ROZEK, A.; HANCOCK, R. E. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 38, p. 35714-35722, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11473117>>. .