



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

NATÁLIA BUENO LEITE

Contribuição Eletrostática e Não Eletrostática na
Interação de Peptídeos Líticos com Membranas Modelo

São José do Rio Preto
2010

NATÁLIA BUENO LEITE

Contribuição Eletrostática e Não Eletrostática na Interação de Peptídeos Líticos com Membranas Modelo

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

Orientador: Prof. Dr. João Ruggiero Neto

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

São José do Rio Preto
2010

Leite, Natália Bueno.

Contribuição eletrostática e não eletrostática na interação de peptídeos
líticos com membranas modelo / Natália Bueno Leite. – São José do Rio
Preto : [s.n.], 2010.

76f. : il. ; 30 cm.

Orientador: João Ruggiero Neto

Co-Orientador: Márcia Perez dos Santos Cabrera

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

1. Biofísica. 2. Biologia molecular. 3. Peptídios. 4. Espectroscopia
de fluorescência. 5. Dicroísmo circular – Análise espectral. 6. Potencial
Zeta. I. Ruggiero Neto, João. II. Dos Santos Cabrera, Márcia Perez. II.
Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.3

NATÁLIA BUENO LEITE

**Contribuição Eletrostática e Não Eletrostática na Interação
de Peptídeos Líticos com Membranas Modelo**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Ruggiero Neto
Professor Titular
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho
Professor Associado
USP – São Carlos

Prof^a. Dr^a. Karin do Amaral Riske
Professora Adjunta
UNIFESP – São Paulo

São José do Rio Preto, 31 de agosto de 2010.

Agradecimentos

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

A todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Aos amigos pelas horas de estudos juntos e companheirismo.

Aos meus familiares, pelo amor, respeito e dedicação.

Ao Gabriel pelo amor, paciência e incentivo.

A CAPES pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Por fim, a Deus.

RESUMO

Peptídeos bioativos são de elevado interesse como substitutos de antibióticos convencionais já que alguns destes apresentam atividade antimicrobiana. Eles são predominantemente catiônicos e tem sido mostrado que sua atividade antimicrobiana é modulada por interações eletrostáticas, hidrofóbicas e por características elásticas das membranas, seu alvo. Neste trabalho analisou-se a importância da carga elétrica líquida (Q) e hidrofobicidade na interação de quatro peptídeos com membranas modelo de caráter aniônico e zwitteriônico utilizando medidas de potencial eletrocinético, dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência. Estes peptídeos denominados mastoparans apresentam carga líquida de +1 a +4, devido à presença de resíduos ácidos e básicos, foram extraídos do veneno de vespas, três dos quais de espécie nativa da biodiversidade nacional, mostraram intensa atividade antimicrobiana. Nos peptídeos com $Q = +1$ e +2 predomina o caráter hidrofóbico enquanto nos demais o caráter hidrofílico; o peptídeo com $Q = +4$ tem sua estrutura resolvida por NMR e devido à alta homologia entre essa sequência e dos demais se supõe que eles também sejam anfipáticos. A atividade lítica é caracterizada por uma razão $[P]/[L]$ crítica entre as concentrações totais de peptídeo e lipídeo, acima da qual ocorre um processo cooperativo de liberação de corante do interior das vesículas. A razão crítica, a eficiência do vazamento e a cooperatividade mostraram ser dependentes na densidade superficial de carga da vesícula e da carga líquida do peptídeo. Observaram-se razões $[P]/[L]$ críticas da ordem de sub-micromolar tanto em vesícula zwitteriônica quanto em vesícula aniônica. As curvas dose-resposta tornaram-se menos cooperativas com o aumento da carga líquida dos peptídeos, mostrando que a razão crítica aumenta com a carga. Os espectros de dicroísmo circular (CD) dos peptídeos, na presença de vesícula, apresentaram duas bandas em 208 nm e 222 nm características de estruturas helicoidais, enquanto apresentaram estruturas desordenadas em tampão. Em concentrações de peptídeo e lipídeo próximas da razão $[P]/[L]$ crítica, os espectros de CD apresentam os maiores teores helicoidais, que permanecem constantes com o aumento da concentração de lipídeo. As constantes aparentes de ligação dos peptídeos às membranas modelo foram calculadas através de titulações fluorimétricas e de medidas do potencial zeta das vesículas. Os espectros de emissão de fluorescência do triptofano para os quatro peptídeos, na presença das vesículas, mostraram significativo deslocamento espectral para o azul quando comparados com os respectivos espectros em tampão. As concentrações de

peptídeo para as quais ocorre a inversão do potencial zeta das vesículas foram proporcionais às cargas dos peptídeos. As constantes de ligação, em vesícula aniônica, determinadas através das variações espectrais de fluorescência e das medidas de potencial zeta, foram razoavelmente similares e inesperadamente maiores para o peptídeo de menor carga, indicando um equilíbrio entre as contribuições energética eletrostática e hidrofóbica, que são reforçadas pelos valores de energia livre calculados destes dados.

ABSTRACT

Bioactive peptides are of high interest as substitutes of conventional antibiotics since some of them present antimicrobial action. They are predominantly cationic and it has been shown that their antimicrobial activity is modulated by electrostatic interactions, hydrophobic contributions and the elastic features of the membranes they target. In this work we analyzed the importance of charge and hydrophobicity to the interaction of four peptides with anionic and zwitterionic model membranes using electrokinetics potential, circular dichroism and fluorescence spectroscopy. These peptides named mastoparans, have exhibit a net charge ranging from +1 to +4 due to the presence of acidic and basic residues, and three of them, extracted from the venom of wasps native of the Brazilian biodiversity showed intense antibacterial activity. The peptides with $Q = +1$ and $+2$, are hydrophobic and the other two are hydrophilic. Lytic activity of peptides, accessed by the release of fluorescent dye entrapped in lipid vesicles, showed sigmoid dose-response curves either in zwitterionic or in anionic vesicles with sub-micromolar threshold ratios. The lytic activity was characterized by a threshold $[P]/[L]$ value, above which cooperative dye release takes place. The threshold ratio, the leakage efficiency and cooperativity were found to be dependent on the vesicle surface charge density and on the peptide net charge. Roughly the threshold ratios increase with the peptide net charge and as the net charge increases the dose response curves become less cooperative. Circular dichroism spectra of the peptides in vesicles exhibit two negative dichroic bands at 222 and 208 nm characteristic of helical structure, while they were observed to be random coil in buffer. At peptide and lipid concentrations near the threshold ratio the CD spectra have the greatest helical content that remains constant even with further lipid addition. The apparent binding constants of the peptides to model membranes were evaluated from both fluorimetric titrations and zeta potential measurements. Trp fluorescence emission spectra of the four peptides, in the presence of vesicles, showed significant spectral blue shift compared with the respective spectra in buffer. Zeta potential measurements of anionic vesicles showed a monotonically increase of the potential with the peptide addition. Peptide concentrations required to the potential reversion were proportional to the peptide net charge. The binding constants in anionic vesicles determined from fluorescence spectral changes and from zeta potential measurements were reasonably similar and unexpectedly higher for the less

charged peptides indicating interplay between electrostatic and hydrophobic energetic contributions, which were reinforced by values of the free energies evaluated from these data.

ÍNDICE

<u>CAPÍTULO 1</u>	6
1.1 INTRODUÇÃO	6
1.2 OBJETIVOS	13
<u>CAPÍTULO 2</u>	14
2.1 MATERIAIS	14
2.2 MÉTODOS	16
2.2.1 <i>Preparação de Vesícula</i>	16
2.2.2 <i>Extravasamento monitorado por fluorimetria</i>	18
2.2.3 <i>Dicroísmo Circular (CD)</i>	20
2.2.4 <i>Titulações Fluorimétricas</i>	23
2.2.5 <i>Anisotropia de fluorescência do Triptofano</i>	28
2.2.6 <i>Experimento de supressão de emissão de fluorescência de Triptofano por acrilamida</i>	29
2.2.7 <i>Potencial Zeta (ζ)</i>	30
<u>CAPÍTULO 3</u>	34
<u>RESULTADOS</u>	34
3.1 <u>EXTRAVASAMENTO</u>	34
3.2 <u>DICROÍSMO CIRCULAR</u>	37
3.3 <u>TITULAÇÕES FLUORIMÉTRICAS</u>	40
3.4 <u>ANISOTROPIA DE FLUORESCÊNCIA DO TRIPTOFANO</u>	45
3.5 <u>SUPRESSÃO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO TRIPTOFANO POR</u> <u>ACRILAMIDA</u>	47
3.6 <u>POTENCIAL ZETA</u>	50
<u>CAPÍTULO 4</u>	54
4.1 <u>DISCUSSÃO</u>	54
<u>CAPÍTULO 5</u>	63
5.1 <u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	63
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	66
PUBLICAÇÃO ORIGINAL	

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA INTERAÇÃO PEPTÍDEO-LIPÍDEO (LOOCKWOOD, ET AL., 2003).	8
FIGURA 2: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA VISÃO TRANSVERSA DE UM PORO (VISTO DE FORMA EXPANDIDA) COM RAIO R EM UMA BICAMADA DE ESPESURA E. A ABERTURA DO PORO É DIRIGIDA PELA TENSÃO SUPERFICIAL, Σ , E É OPOSTA AO TERMO DE TENSÃO DE LINHA, T/R, (KARATEKIN ET AL., 2003).	9
FIGURA 3: ESQUEMA DA INTERAÇÃO PEPTÍDEO LIPÍDEO PARA O PEPTÍDEO TRANSPORTAN (YANDEK ET AL., 2007).	10
FIGURA 4: PROJEÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS QUATRO PEPTÍDEOS EM ESTUDO EM ESTRUTURAS HELICOIDAIS IDEAIS.	12
FIGURA 5: ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS FOSFOLIPÍDEOS EXTRAÍDOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO, AMBOS EXTRAÍDOS DE GEMA DE OVO FORAM ADQUIRIDOS DA AVANTI POLAR LIPIDS (ALABASTER, AL.USA). A) L-A-FOSFATIDILCOLINA, PC, DE CARÁTER ZWITTERIÔNICO. B) L-A-FOSFATIDIL-DL-GLICEROL, PG, DE CARÁTER ANIÔNICO.	15
FIGURA 6: ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS PARÂMETROS PRESENTES NA EQUAÇÃO SIGMOIDAL DE BOLTZMANN. A_1 É A MÍNIMA % VAZAMENTO, A_2 É A MÁXIMA % VAZAMENTO, x_0 É A $[P]/[L]$ EM UMA % VAZAMENTO = 50% DA % VAZAMENTO TOTAL E DX É O INTERVALO DO EIXO X CORRESPONDENTE A INCLINAÇÃO DA CURVA SIGMOIDAL E REPRESENTA UMA MEDIDA DO QUANTO A INTERAÇÃO É COOPERATIVA. BASEADO NOS DADOS OBTIDOS COM O PEPTÍDEO POLYBIA MP-3.	19
FIGURA7: PADRÕES DE ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR PARA ELEMENTOS DE ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS.	21
FIGURA 8: DIAGRAMA DE JABLONSKI ILUSTRANDO O PROCESSO ENVOLVIDO NA CRIAÇÃO DE UM ESTADO ELETRÔNICO EXCITADO SINGLETO POR ABSORÇÃO ÓPTICA E SUBSEQUENTE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA. OS ESTÁGIOS IDENTIFICADOS COMO 1, 2 E 3 SÃO EXPLICADOS NO TEXTO.	23
FIGURA 9: CURVAS DOSE RESPOSTA: % LIBERAÇÃO APÓS 10 MIN DE CONTATO COMO FUNÇÃO DA RAZÃO MOLAR PEPTÍDEO-LIPÍDEO ($[P]/[L]$). A – VESÍCULA ZWITTERIÔNICA A 100 μ M. VALORES $[P]/[L]$ CRÍTICOS SÃO 0,006 PARA O POLYBIA MP-3, 0,0085 PARA O POLYBIA MP-2, 0,0137 PARA O POLYBIA N2-MP-1 E 0,033 PARA MP-X. B – VESÍCULA ANIÔNICA A 100 μ M.	

VALORES $[P]/[L]$ CRÍTICOS SÃO 0,0055 PARA POLYBIA MP-3, 0,0084 PARA POLYBIA MP-2, 0,0079 PARA POLYBIA N2-MP-1 E 0,009 PARA MP-X. AS CURVAS CONTÍNUAS SÃO AJUSTES REALIZADOS COM A EQUAÇÃO SIGMOIDAL DE BOLTZMANN COM COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO SUPERIORES A 0,98.....	35
FIGURA 10: ESPECTROS DE CD DOS QUATRO PEPTÍDEOS EM VESÍCULAS PC, PCPG 70:30 E EM TAMPÃO TRIS 5MM H_3BO_3 , 1MM Na_2EDTA E 150MM NAF pH 7,5 A 25°C.	39
FIGURA 11: ESPECTRO DE EMISSÃO DO RESÍDUO TRIPTOFANO DO PEPTÍDEO MP-X A 5 MM, NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VESÍCULA ANIÔNICA, EXCITAÇÃO EM 285NM E PH 7,5 A 25°C. TAMPÃO 10MM TRIS/HCL, 1 mM EDTA, 0,15 NACL, pH 6,8 . COMPRIMENTO DE ONDA DE MÁXIMA EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NO TAMPÃO $\lambda_0 = 347nm$	40
FIGURA 12: DESLOCAMENTO ESPECTRAL DA EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO W COM O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEO DOS QUATRO PEPTÍDEOS A 5MM INCUBADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDEO ACIMA DE 40MM EM 10MM TRIS/HCL, 1 mM EDTA, 0,15 NACL, pH 7,5 A 25°C. A VESÍCULA ZWITTERIÔNICA. B VESÍCULA ANIÔNICA. PEPTÍDEO POLYBIA MP-3 REPRESENTADO PELO CÍRCULO EM VERMELHO, POLYBIA MP-2 REPRESENTADO PELO QUADRADO EM PRETO, POLYBIA N2-MP-1 REPRESENTADO PELO TRIÂNGULO PARA BAIXO EM VERDE E MP-X REPRESENTADO PELO TRIÂNGULO EM AZUL, ...	41
FIGURA 13: RAZÃO ENTRE OS VALORES DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA NA PRESENÇA DE VESÍCULA, I, E NA AUSÊNCIA, I_0 OBTIDAS DO ESPECTRO DE EMISSÃO DO TRIPTOFANO COM EXCITAÇÃO EM 285 NM EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE LIPÍDEO. PEPTÍDEO POLYBIA MP-3 REPRESENTADO PELO CÍRCULO EM VERMELHO, POLYBIA MP-2 REPRESENTADO PELO QUADRADO EM PRETO, POLYBIA N2-MP-1 REPRESENTADO PELO TRIÂNGULO PARA BAIXO EM VERDE E MP-X REPRESENTADO PELO TRIÂNGULO EM AZUL. A – VESÍCULA ZWITTERIÔNICA E B – VESÍCULA ANIÔNICA.	42
FIGURA 14: GRÁFICO $(E-1)$ VS. $(E-1)/C_L$ PARA OS PEPTÍDEOS EM VESÍCULAS PC, PCPG 70:30. A LINHA CONTÍNUA É DADA PELO AJUSTE FEITO COM A EQUAÇÃO 6 CUJA INCLINAÇÃO RESULTA NO PARÂMETRO DE AFINIDADE K_D/N , QUE REPRESENTA O RECÍPROCO DA PRIMEIRA CONSTATANTE DE ASSOCIAÇÃO CLÁSSICA PARA A INTERAÇÃO PEPTÍDEO-LIPÍDEO.	43
FIGURA 15: ANISOTROPIA DE FLUORESCÊNCIA DO W COM O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEO DOS CINCO PEPTÍDEOS A 5MM INCUBADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE	

<u>LIPÍDEO ACIMA DE 40MM EM 10MM TRIS/HCL, 1 mM EDTA, 0,15 NaCl, pH 7,5 A 25°C.</u>	
<u>COMPRIMENTO DE ONDA DE EXCITAÇÃO 285NM E DE EMISSÃO 350NM. A- VESÍCULA</u>	
<u>ZWITTERIÔNICA. B- VESÍCULA ANIÔNICA.</u>	46
FIGURA 16: <u>GRÁFICOS DE STERN-VOLMER DOS CINCO PEPTÍDEOS POLYBIA MP-3, MP-2, N2-MP-1</u>	
<u>E MP-X SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA DO TRIPTOFANO POR ACRILAMIDA EM TAMPÃO E NA</u>	
<u>PRESENÇA DE LUVs PC E PCPG. PEPTÍDEO A 5 mM E LIPÍDEO A 500 mM EM UM VOLUME DE</u>	
<u>1300 mL EM TAMPÃO 10 mM TRIS/HCL, 1 mM EDTA, 0,15 NaCl, pH 7,5 A 25°C. AS LINHAS</u>	
<u>CONTÍNUAS SÃO OS MELHORES AJUSTES OBTIDOS COM A EQUAÇÃO DE STERN-VOLMER PARA</u>	
<u>SUPRESSÃO ESTÁTICA (MATERIAIS E MÉTODOS).</u>	49
FIGURA 17: <u>MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS EM</u>	
<u>VESÍCULA PCPG 7030 A 40 MM. TAMPÃO 10MM TRIS/HCL, 1 mM EDTA, 0,15 NaCl, pH 7,5</u>	
<u>A 25°C</u>	50
FIGURA 18: <u>POTENCIAL ZETA TEÓRICO E EXPERIMENTAL EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE</u>	
<u>POLYBIA N2-MP-1 COM VESÍCULA PCPG A 25°C E CONCENTRAÇÃO FIXA EM 40MM.</u>	52

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1- CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DOS QUATRO PEPTÍDEOS ESTUDADOS. A CARGA ELÉTRICA LÍQUIDA, Q , A HIDROFOBICIDADE MÉDIA, $\langle H \rangle$ E O ÂNGULO DE FACE POLAR, Φ	14
TABELA 2- PARÂMETROS DO AJUSTE PELA EQUAÇÃO SIGMOIDAL DE BOLTZMANN, EQUAÇÃO 2, A_1 A MÍNIMA % VAZAMENTO, A_2 A MÁXIMA % VAZAMENTO, x_0 A $[P]/[L]$ EM UMA % VAZAMENTO = 50% DA % VAZAMENTO TOTAL E DX É O INTERVALO DO EIXO X CORRESPONDENTE A INCLINAÇÃO DA CURVA SIGMOIDAL E REPRESENTA UMA MEDIDA DO QUANTO A INTERAÇÃO É COOPERATIVA. VALORES DA RAZÃO MOLAR $[P]/[L]$ CRÍTICA,.....	36
TABELA 3- FRAÇÃO DE HÉLICE EM VESÍCULAS ANIÔNICA E ZWITTERIÔNICA A 100 mM, F_H , E EM CONCENTRAÇÃO DE SATURAÇÃO, $F_{H\infty}$	38
TABELA 4 - DADOS DE AFINIDADE DOS PEPTÍDEOS PELAS BICAMADAS LIPÍDICAS ANIÔNICA, PC, E ZWITTERIÔNICA, PCPG.....	44
TABELA 5 – CONSTANTES STERN-VOLMER NORMALIZADAS EM VESÍCULAS PC E PCPG.....	48
TABELA 6 - CONSTANTES DE ASSOCIAÇÃO APARENTE DA INTERAÇÃO PEPTÍDEO-LIPÍDEO OBTIDAS A PARTIR DO MODELO DE GOUY CHAPMANN.....	53
TABELA 7 - SEQUÊNCIA E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS PEPTÍDEOS ESTUDADOS. Q , A CARGA LÍQUIDA DO PEPTÍDEO, $\langle H \rangle$, HIDROFOBICIDADE MÉDIA POR RESÍDUO, OBTIDA DE ACORDO COM A ESCALA DE EISENBERG ET AL. (1984) PELA SOMA DOS RESÍDUOS HIDROFÓBICOS E, Φ , ÂNGULO DE FACE POLAR.....	54
TABELA 8- OS VALORES DE R^* CALCULADOS PELA RAZÃO ENTRE A TENSÃO DE LINHA NA BORDA DO PORO, Γ , E A TENSÃO DE SUPERFÍCIE EXERCIDA NA MEMBRANA PELO PEPTÍDEO, Σ , $R^* = \Gamma/\Sigma$ ONDE $\Sigma = K_A(A_P/A_L)X_B$, ONDE K_A É O MÓDULO DE EXPANSÃO DE ÁREA ($K_A = 240$ mN/m), A_P A ÁREA ESTIMADA PARA UM PEPTÍDEO (135 Å^2), A_L A ÁREA ESTIMADA PARA UM LIPÍDEO (68 Å^2) E X_B A FRAÇÃO DE PEPTÍDEO LIGADO À MONOCAMADA EXTERNA BICAMADA NA $[P]/[L]$ CRÍTICA, EQ. 23, E $\Gamma = 10$ pN DE ACORDO COM HUANG E COLABORADORES (2004).	56
TABELA 9 – RESULTADOS OBTIDOS POR ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR E ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA. RAZÃO $[P]/[L]$ CRÍTICA, FRAÇÃO DE ESTRUTURA HELICOIDAL EM CONCENTRAÇÃO DE SATURAÇÃO, $F_{H\infty}$, DESLOCAMENTO ESPECTRAL DOS PEPTÍDEOS NAS RAZÕES $[P]/[L]$ CRÍTICAS OBTIDOS DAS TITULAÇÕES FLUORIMÉTRICAS, $\Delta\lambda$, CONSTANTE APARENTE DE ASSOCIAÇÃO OBTIDA DAS TITULAÇÕES FLUORIMÉTRICAS, K_{AP} , RAZÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE FLUORESCÊNCIA OBTIDA DAS TITULAÇÕES FLUORIMÉTRICAS, I/I_0 E AS CONSTANTES DE STERN-VOLMER NORMALIZADAS, K_{SVI}/K_{SVT}	58
TABELA 10 – ENERGIA LIVRE PARA A INTERAÇÃO PEPTÍDEO-LIPÍDEO ATRAVÉS DA CONSTANTE APARENTE DE ASSOCIAÇÃO OBTIDA DAS MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA.....	62

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Peptídeos líticos, dentre eles os antimicrobianos, têm como um de seus alvos amplamente reconhecidos a fase lipídica da membrana celular (Wimley, 2010). Essa atividade está relacionada à desestruturação da membrana levando a lise da célula por um mecanismo, que não é ainda completamente compreendido. Os dois aspectos mais importantes da atividade lítica dos peptídeos são, a saber, a independência de receptores de membrana e, em alguns casos, a seletividade. Estes aspectos resultam da diferença entre a constituição lipídica das membranas de seres procariotos e eucariotos que foi conservada durante a evolução (Zasloff, 2002; Epand et al., 2006). A monocamada externa das membranas de seres eucariotos são constituídas por fosfolipídeos de caráter predominantemente zwitteriônico, e as membranas de procariotos são constituídas por fosfolipídeos de caráter aniônico. A independência do modo de ação em relação à presença de receptores na membrana dificulta ao microorganismo desenvolver mecanismos de resistência, conferindo a estes peptídeos um grande potencial para serem utilizados como substitutos de antibióticos convencionais. Como consequência, a procura por peptídeos que tenham a atividade antimicrobiana potencializada e que não sejam tóxicos a células de mamíferos tem aumentado significativamente nos últimos anos, em face ao crescimento do número de cepas resistentes aos antibióticos convencionais (Powers & Hancock, 2003; Yeaman & Yount, 2003, Sato & Feix 2006).

O mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos inicia-se com a atração entre os peptídeos e as membranas devido à interação eletrostática, que os leva ao contato com os fosfolipídeos da membrana. Neste contato, peptídeos que em solução possuem estruturas predominantemente desordenadas começa a estruturar-se de maneira a assumir uma conformação secundária de caráter anfipático, muitos dos quais helicoidais. A concentração de peptídeo na superfície da membrana aumenta à medida que outras moléculas de peptídeo são atraídas, ligam-se e enovelam-se, até alcançar uma concentração crítica, na qual a quantidade de peptídeos adsorvidos é aquela e que provoca a sua imersão na bicamada lipídica. Neste contato, os aminoácidos hidrofóbicos interagem com a região das cadeias acíclicas da bicamada e os resíduos polares e/ou carregados interagem com os grupos polares e/ou carregados da membrana (Matsuzaki et al., 1997; Dathe et al., 2001).

Três modelos foram propostos para descrever a permeabilização da membrana pelos peptídeos e estão esquematizados na figura 1 (Mátyus E., et. al, 2007). Todos estes modelos têm como etapa inicial a atração do peptídeo pela bicamada e a sua associação seguida de estruturação. O modelo denominado *Poro barril* considera que a face apolar do peptídeo em estrutura helicoidal anfipática interage com a região das cadeias acíclicas da membrana, enquanto a face polar do peptídeo forma um poro aquoso. Com isto, os grupos polares dos fosfolipídeos da membrana permanecem localizados na interface bicamada/meio aquoso. No entanto, este modelo tem como condição necessária que os peptídeos possuam comprimento adequado para atravessar o núcleo hidrofóbico da membrana (Yang et al., 2001).

No modelo denominado *Poro toroidal* ocorre a ligação dos peptídeos na membrana, de maneira que, as suas faces polares interagem com os grupos polares da bicamada lipídica. Esta interação provoca uma curvatura na membrana que dá origem à cavidade denominada de poro toroidal (Tossi et al., 2000; Leontiadou et al., 2006).

O mecanismo conhecido como *Carpete* considera, que os peptídeos acumulam-se por adsorção à bicamada, orientados paralelamente à sua superfície. Nesta adsorção, observa-se uma desorganização na estrutura da membrana, que possibilita a interação entre os resíduos polares do peptídeo e os grupos polares da membrana enquanto os resíduos apolares dos peptídeos interagem com a região apolar da membrana. No entanto, este modelo é observado apenas para altas concentrações de peptídeo e não implica que o peptídeo forme um canal transmembrânico estruturado (Oren & Shai, 1998).

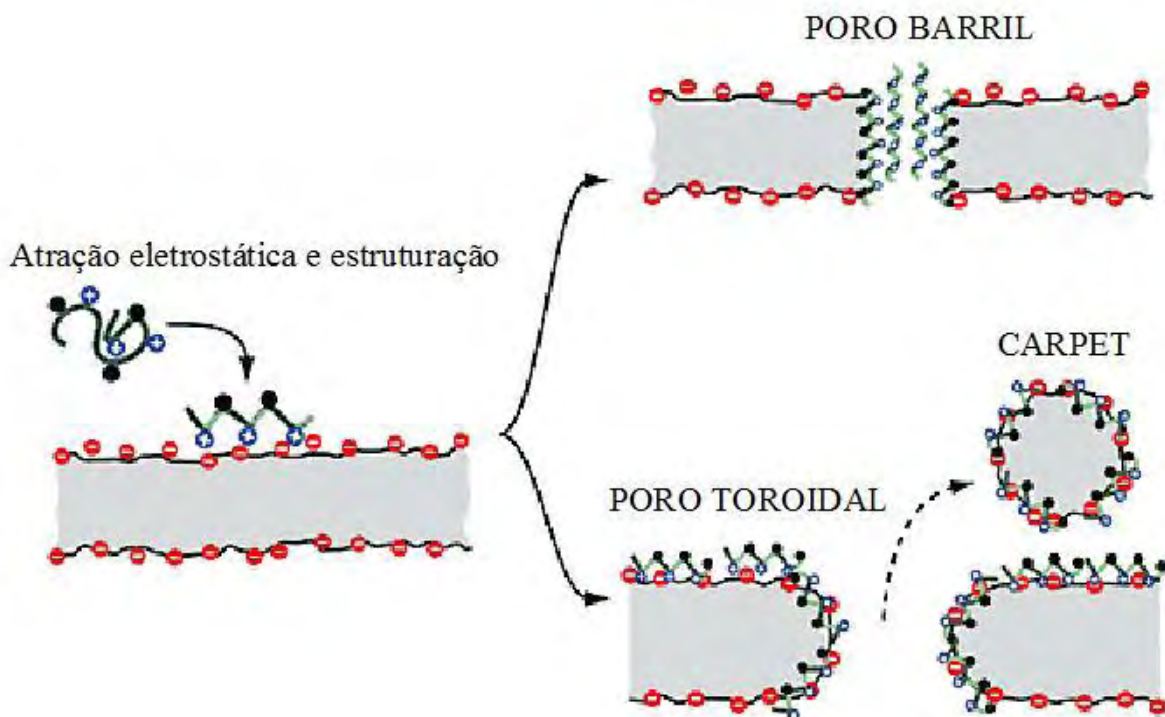


Figura 1: Esquema representativo da interação peptídeo-lipídeo (Loockwood, et al., 2003).

Brochard-Wyart e colaboradores (2000) estudaram a formação de poros espontâneos induzidos por estresse em vesículas gigantes, procurando entender as contribuições da tensão superficial e da tensão de linha. Resumidamente, um poro é o resultado de um excesso de tensão superficial na membrana, que pode ser criada tanto por forte iluminação, como por eletroporação ou adição de surfactantes. Poros transientes são abertos devido a um excesso de tensão superficial em relação à tensão de linha e se fecham quando esta supera a primeira como pode ser visto na figura 2. Esses conceitos desenvolvidos para o caso da formação de poro sob estresse luminoso foram estendidos para a análise do mecanismo da formação de poros pelos peptídeos antimicrobianos por Huang e colaboradores (2004); a tensão superficial é criada pela área adicional ocupada pelos peptídeos ligados na região das cabeças polares da monocamada externa; um efeito de afinamento da membrana observado foi atribuído à sobreposição das áreas deformadas, causada pela ligação de várias moléculas de peptídeos, um efeito de múltiplas moléculas (Lee et al., 2005); a inserção de peptídeos (perpendicularmente à superfície da membrana), a abertura do poro e o vazamento do conteúdo da vesícula reduzem a tensão superficial. A tensão de linha pode assim superar a tensão superficial reduzida e fechar o poro. A

concentração crítica para a formação do poro está correlacionada à curvatura espontânea dos lipídeos (Lee et al., 2005) e ao seu módulo de expansão de área (ou de compressibilidade) (Allende et al., 2005).

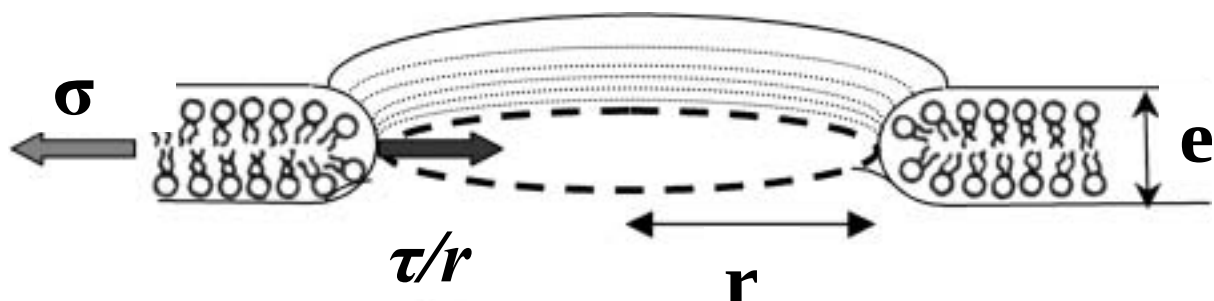


Figura 2: Esquema representativo da visão transversal de um poro (visto de forma expandida) com raio r em uma bicamada de espessura e . A abertura do poro é dirigida pela tensão superficial, σ , e é oposta ao termo de tensão de linha, τ/r , (Karatekin et al., 2003).

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

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

Dentre os peptídeos antimicrobianos, existem os peptídeos Mastoparanos, que são extraídos do saco de veneno de vespa social e fazem parte do sistema de defesa inato destes insetos. Eles são tetradecapeptídeos de caráter catiônico, ricos em resíduos básicos e hidrofóbicos, e formam estruturas helicoidais anfipáticas em ambientes adequados. Devido à quantidade e posicionamento dos resíduos básicos e hidrofóbicos esses peptídeos apresentam

atividade antimicrobiana, desgranuladora de mastócitos e hemolítica (Nakajima, 1986). O mecanismo de ação destes peptídeos ainda não é completamente conhecido. Matsuzaki e colaboradores (1996; 1999) propuseram o modelo toroidal para o peptídeo Mastoparano X, (MP-X) mostrando a evidência de “flip-flop” das moléculas de lipídeo. Recentemente, um mecanismo similar ao peptídeo transportan 10 foi proposto para o MP-X (Yandek et al., 2009). Neste modelo, representado pela figura 3, o monômero de peptídeo estrutura-se quando em contato com a superfície da bicamada lipídica. O acúmulo de peptídeo, pela adsorção na superfície da membrana, leva ao aumento de massa na monocamada externa. Isto resulta na perturbação da bicamada, possivelmente pelo stress local gerado na sua curvatura, aumentando a probabilidade de o peptídeo inserir-se transientemente. Desta maneira, este stress é aliviado através da inserção do peptídeo na bicamada e através da sua travessia para a monocamada interna. Este processo continua até que a concentração de peptídeo seja, aproximadamente, igual em ambos os lados (Yandek et al., 2007).

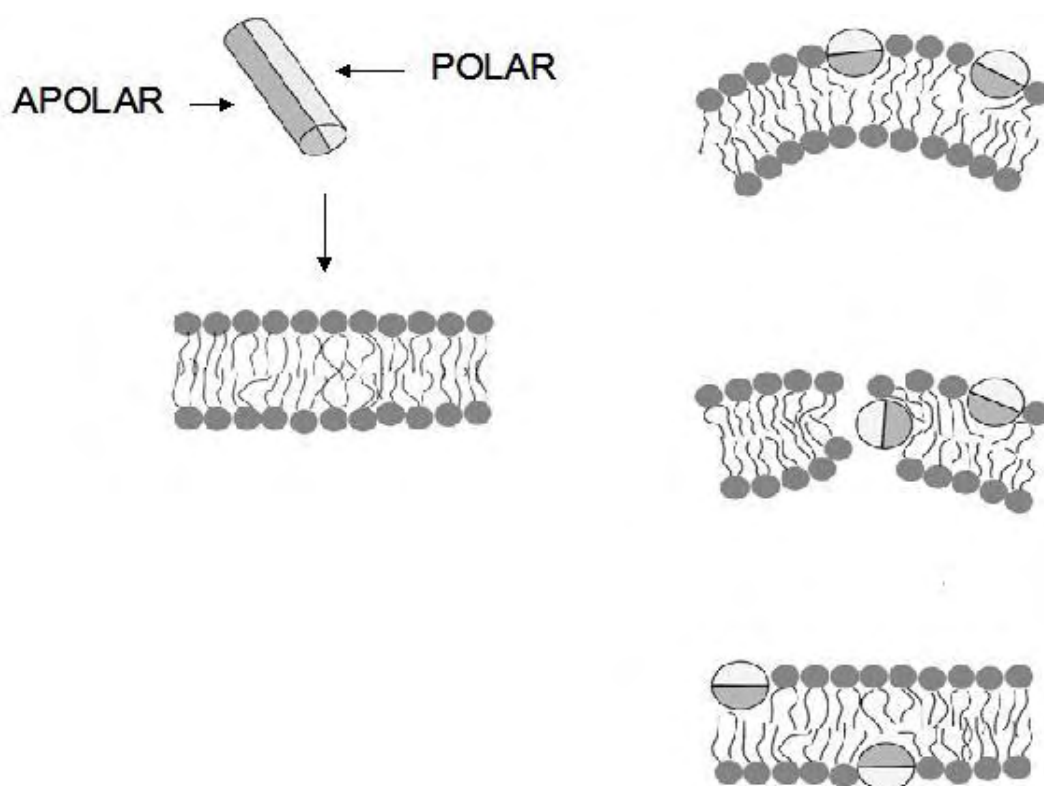


Figura 3: Esquema da interação peptídeo lipídeo para o peptídeo transportan 10. (Yandek et al., 2007).

Recentemente, uma nova família de peptídeos mastoparanos foi encontrada no extrato do veneno de uma vespa social nativa da biodiversidade brasileira denominada *Polybia Paulista* (Souza et al. 2005, Souza et al. 2009). Espectrometria de massa ESI revelou que além de lisinas estes peptídeos possuem resíduos ácidos, de tal maneira que em pH neutro eles apresentam diferentes cargas elétricas líquidas. O posicionamento dos resíduos ácidos e básicos em i e $i \pm 3$ ou $i \pm 4$ poderia favorecer a formação de ponte salina ou de hidrogênio (Marquese & Baldwin, 1989), possibilitando tanto a estabilização de estruturas helicoidais quanto à formação destas pontes com a cabeça polar dos grupos lipídicos (Pantos et al., 2008). Estes peptídeos apresentam desde pouca a moderada atividade hemolítica, desgranuladora de mastócitos e considerável atividade antimicrobiana (Souza et al. 2005, Souza et al. 2009). A maioria das suas atividades parece estar relacionada à interação peptídeo-lipídeo, e provavelmente modulada pelo caráter dos resíduos dos peptídeos como a carga elétrica líquida, a hidrofobicidade média, a propensão em formar estrutura helicoidal e o ângulo de face polar (Dathe e Wieprecht, 1999; Dathe et al., 2002). A carga elétrica líquida é dada pela soma da carga elétrica de cada resíduo, em pH 7. A hidrofobicidade média é dada pela média aritmética da hidrofobicidade intrínseca dos resíduos, de acordo com a escala de consenso de Eisenberg (Eisenberg et al., 1984) nesta escala o resíduo mais hidrofóbico é a isoleucina $\langle H \rangle = 0,73$ e o resíduo menos hidrofóbico é a arginina $\langle H \rangle = -1,76$. O ângulo de face polar é dado pelo ângulo compreendido pelos resíduos carregados na projeção da sequência peptídica em estrutura helicoidal ideal, figura 4.

Não existem informações sobre os mecanismos de ação destes peptídeos, e tão pouco, haviam sido realizados estudos biofísicos sobre eles. Desta forma, este trabalho teve o propósito de entender como suas características estruturais podem modular suas interações com bicamadas modelo. Com este intuito foram estudadas as interações de quatro peptídeos mastoparanos com vesículas constituídas por fosfolipídeos aniônicos e zwitteriônicos. Dois destes peptídeos foram extraídos de *Polybia paulista*, Polybia MP-3 e MP-2, um análogo sintético do Polybia MP-1 e o Mastoparano X foi extraído do veneno de vespa *xanthoptera*. As cargas elétricas líquidas destes peptídeos variam de +1 a +4, enquanto as hidrofobicidades médias variam de 0,08 a -0,11 e os ângulos de face polar variam de 60° a 120°. A interação peptídeo-lipídeo foi investigada por dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência e medidas de potencial eletrocinético. As atividades líticas dos peptídeos foram avaliadas por espectroscopia de fluorescência pelo vazamento de um marcador e as mudanças conformacionais induzidas pela interação com as

membranas modelo foram monitoradas por espectroscopia de dicroísmo circular. A afinidade e a inserção dos peptídeos nas vesículas foram avaliadas através de espectroscopia de fluorescência do triptofano, que é um resíduo intrinsecamente fluorescente presente na posição 3 de todos os peptídeos estudados. A ligação do peptídeo à bicamada foi monitorada por espectroscopia de fluorescência e por variações na mobilidade eletroforética das vesículas enquanto os peptídeos interagem com as bicamadas lipídicas. Estes dados foram quantificados de acordo com o proposto por Bashford et al. (1979) e pelo modelo de Gouy-Chapman (Verwey e Overbeek, 1948).

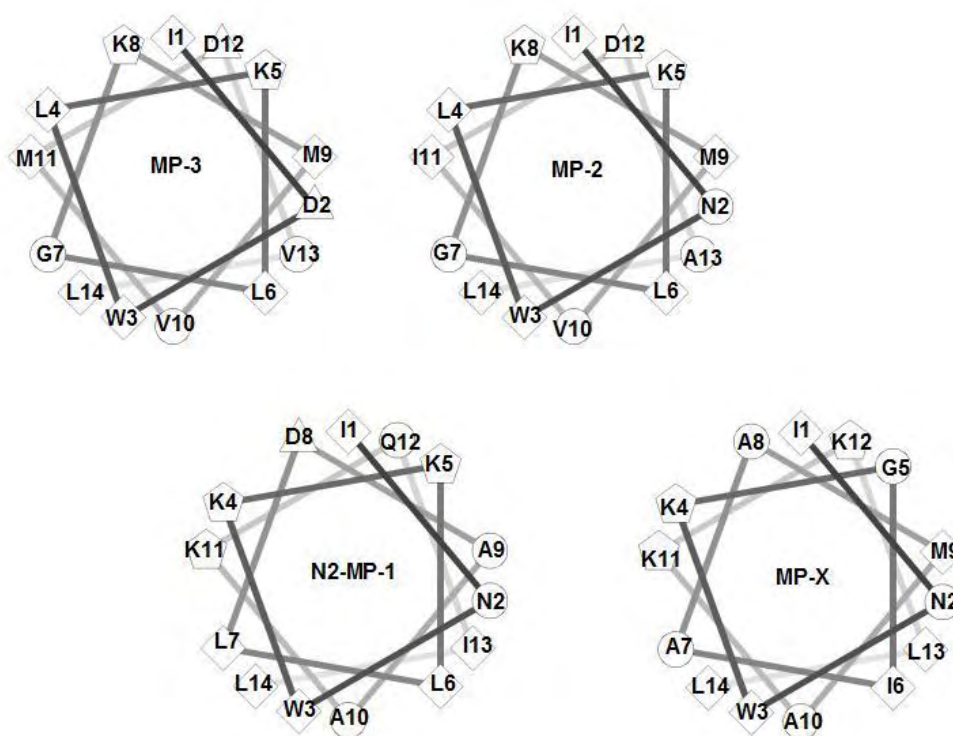


Figura 4: *Projeção da sequência dos quatro peptídeos em estudo em estruturas helicoidais ideais.*

1.2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é explorar, do ponto de vista experimental, como a estruturação e o mecanismo de atividade lítica destes peptídeos antimicrobianos são modulados pela composição lipídica da bicamada e pelas características estruturais dos peptídeos, como carga elétrica líquida e hidrofobicidade média.

CAPÍTULO 2

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Peptídeos Polybia MP-2, Polybia MP-3, o análogo sintético Polybia N2-MP-1 e Mastoparano X (MP-X) foram sintetizados pelo grupo do Prof. M. S. Palma do IB-UNESP-Campus de Rio Claro. As seqüências são mostradas na tabela 1 e a concentração dos peptídeos foi determinada espectrofotometricamente em 280 nm usando absorvidade molar do triptofano $\epsilon = 5580 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os lipídeos utilizados foram a L- α -fosfatidilcolina (PC) de natureza zwitteriônica e L- α -fosfatidil-DL-glicerol (PG) de natureza ácida, ambos extraídos de gema de ovo foram adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) e representados pela figura 5. Acrilamida, tampão Tris (hidroxidometilaminometano), Na₂EDTA, NaCl, NaF e clorofórmio foram adquiridos da Merck. Ácido bórico (H₃BO₃) adquirido da Reagen. Carboxifluoresceína da Sigma Chemical Co (S. Louis, MI, USA)

Tabela 1- Características estruturais dos quatro peptídeos estudados. A carga elétrica líquida, Q, a hidrofobicidade média, <H> e o ângulo de face polar, Φ .

		Q	<H>	Φ
Polybia MP-3	I D W L K L G K M V M D V L - NH ₂	+1	0,06	60
Polybia MP-2	I N W L K L G K M V I D A L - NH ₂	+2	0,08	60
Polybia N2-MP-1	I N W K K L L D A A K Q I L - NH ₂	+3	-0,11	120
MP-X	I N W K G I A A M A K K L L - NH ₂	+4	0,01	100

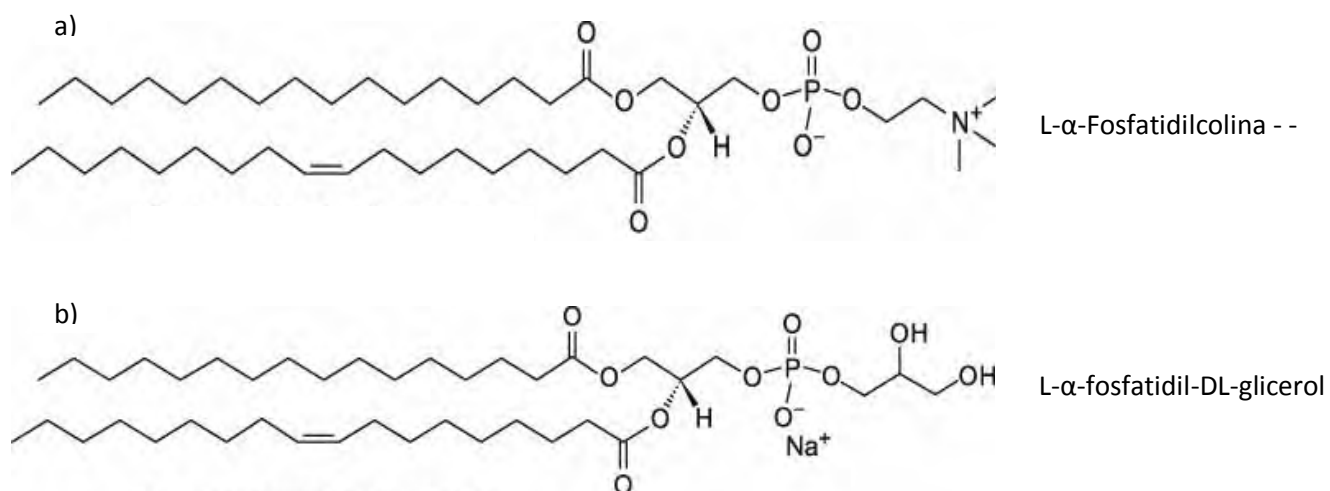


Figura 5: Estrutura dos principais fosfolípidos extraídos utilizados neste trabalho, ambos extraídos de gema de ovo foram adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). a) L-α-Fosfatidilcolina, PC, de caráter zwitteriônico. b) L-α-fosfatidil-DL-glicerol, PG, de caráter aniônico.

2.2 Métodos

2.2.1 Preparação de Vesícula

Vesículas compostas por L- α -fosfatidilcolina (PC) e pela mistura de 70%, de L- α -fosfatidilcolina com 30%, de L- α -fosfatidil-DL-glicerol mol/mol (PCPG 70:30) foram preparadas como segue.

Inicialmente deposita-se fosfolípido de uma solução de clorofórmio, numa determinada concentração, em tubos de ensaio de vidro com fundo arredondado. O solvente é então evaporado sob o fluxo de nitrogênio (N_2), que acarreta na formação de um filme fino nas paredes do fundo do tubo. O excesso de solvente foi retirado a vácuo durante 3 horas no mínimo. As bicamadas se reorganizam de modo a formarem vesículas multilamelares (MLVs) quando é adicionado tampão (Tris 5mM H_3BO_3 , 1mM Na_2EDTA , 150mM NaF, pH 7,5 para os experimentos de dicroísmo circular ou 10mM Tris/HCl, 1mM Na_2EDTA , 25mM Carboxifluoresceína em pH 7,5 para experimentos extravasamento ou 10mM Tris/HCl, 1mM Na_2EDTA , 150mM NaCl em pH 7,5 para os demais experimentos) a 25°C. A força iônica dos diferentes tampões é a mesma. O tubo foi então submetido à agitação em vórtex para deslocar as bicamadas que haviam sido empilhadas sobre as paredes do mesmo.

Para preparação de vesículas unilamelares grandes (LUVs) a suspensão foi submetida à extrusão (usando um extrusor Avanti Mini-Extruder), através de membrana dupla de polycarbonato de 0,4 μm , em um total de 6 extrusões, e posteriormente sob membrana dupla de polycarbonato 0,1 μm (Nuclepore Track-etch Membrane, Whatman Nuclepore, PCMB 19 mm 0,1 μm e 0,4 μm) por mais 11 extrusões. Vesículas contendo carboxifluoresceína são então separadas do excesso de marcador empregando-se coluna pd10 (GE Bioscience) Medidas de espalhamento dinâmico de luz realizadas com ZetaSizer Nano NS-90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), $\lambda = 633$ nm P = 4mW, revelaram suspensões de LUV homodispersas com diâmetro médio de 110-120 nm para uma série de preparações. Estas vesículas foram mantidas refrigeradas e utilizadas dentro de um período de 72 horas (dos Santos Cabrera, 2006).

Para preparação de vesículas unilamelares pequenas (SUVs) a suspensão foi submetida à agitação em sonicador de ponta de titânio (Sonicador Virsonic 475, Virtis Co., Inc., NY) em

baixa potência e em banho de água e gelo e sob fluxo de N₂. Ultra-som foi aplicado por aproximadamente 50 minutos. Para remover partículas de titânio a suspensão foi centrifugada em centrífuga de bancada (Eppendorf Centrifuge 5417C), durante 6 minutos e extrusada, através de membrana dupla de polycarbonato de 0,05µm, em um total de 11 extrusões. Medidas de espalhamento dinâmico de luz revelaram suspensões de SUV homodispersas com diâmetro médio de 70-90nm para uma série de preparações. Estas vesículas foram mantidas refrigeradas e utilizadas dentro de um período de 24 horas (dos Santos Cabrera, 2006).

As LUVs foram utilizadas na realização dos experimentos de extravasamento, titulação fluorimétrica, supressão de fluorescência do Triptofano (W) por acrilamida e medidas de potencial zeta enquanto as SUVs foram utilizadas na realização dos experimentos de dicroísmo circular para reduzir os efeitos de espalhamento de luz.

2.2.2 Extravasamento monitorado por fluorimetria

O espectrofluorímetro ISS PC1 (Urbana Champaign, IL,USA) foi utilizado para monitorar o processo de permeabilização de vesículas aniônica e zwitteriônica. A interação de peptídeos com vesículas, que contem carboxifluoresceína (CF), foi monitorada pelo aumento da fluorescência causado pela ruptura destas vesículas; a CF, quando em alta concentração, tem sua fluorescência auto-suprimida e fluoresce mais intensamente pela diluição que sofre ao ser liberada do interior das vesículas pela ação de peptídeos ou detergentes.

Uma alíquota de lipídeo é adicionada sob agitação contínua à cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm, contendo solução de peptídeo em diferentes concentrações em tampão Tris/HCl em pH 7,5 a 25°C. A razão molar entre as concentrações totais de peptídeo e lipídeo ([P]/[L]) variou de acordo com a liberação de corante para cada peptídeo em cada tipo de vesícula. A intensidade de emissão de fluorescência em 520 nm foi registrada em função do tempo, tendo sido excitada em 490 nm, utilizando fendas de excitação e emissão de 0,5nm. O tempo de coleta dos dados foi de 20 minutos para vesículas aniônicas e 30 minutos para vesículas zwitteriônicas.

A porcentagem de corante liberado foi determinada após intervalos de tempo regulares como 3min, 5min, 10min, 15min, 20min, 25min e 30min e foi calculada com a seguinte equação:

$$\% \text{ vazamento} = \frac{100 \cdot (I - I_0)}{I_{100} - I_0} \quad (1)$$

onde I é a intensidade de fluorescência medida, I_0 corresponde à intensidade de fluorescência das vesículas intactas e I_{100} é a intensidade de fluorescência após liberação total do conteúdo das vesículas, que é determinada pela adição de 20µL de solução 10% TRITON X-100.

A liberação de CF do interior da vesícula em função da razão [P]/[L] é caracterizada por um processo cooperativo (dos Santos Cabrera et al., 2008). Curvas dose resposta são obtidas traçando gráficos dos valores de % vazamento em função da razão [P]/[L]. Estas curvas possuem perfil sigmoidal e foram ajustadas pela equação sigmoidal de Boltzmann:

$$y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{\left(1 + \exp\left(\frac{x - x_0}{dx}\right)\right)} \quad (2)$$

onde y é dado pela % vazamento, x é a razão $[P]/[L]$, A_1 é a mínima % vazamento, A_2 é a máxima % vazamento, x_0 é a $[P]/[L]$ em uma % vazamento = 50% da % vazamento total e dx é o intervalo do eixo x correspondente a inclinação da curva sigmoidal e representa uma medida da cooperatividade da interação, como esquematizado pela figura 6.

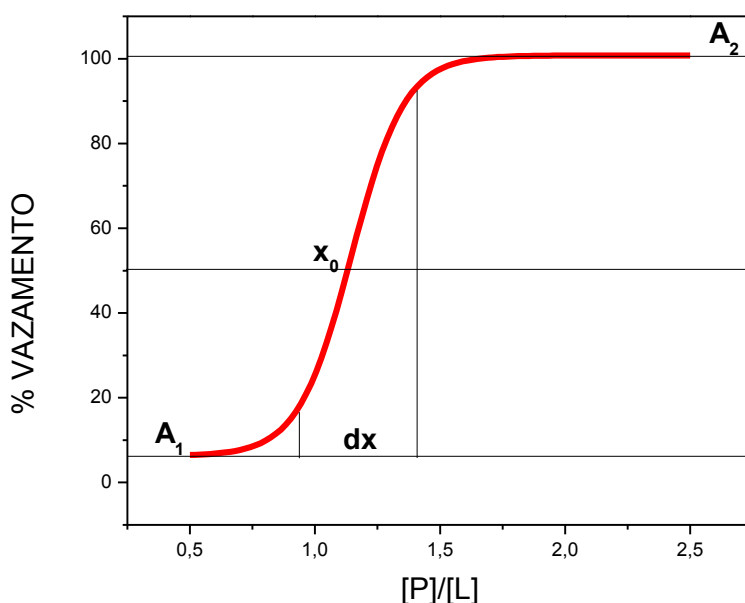


Figura 6: Esquema representativo dos parâmetros presentes na equação sigmoidal de Boltzmann. A_1 é a mínima % vazamento, A_2 é a máxima % vazamento, x_0 é a $[P]/[L]$ em uma % vazamento = 50% da % vazamento total e dx é o intervalo do eixo x correspondente a inclinação da curva sigmoidal e representa uma medida do quanto a interação é cooperativa. Baseado nos dados obtidos com o peptídeo Polybia MP-3.

2.2.3 Dicroísmo Circular (CD)

Dicroísmo circular é a diferença na absorção entre luz circularmente polarizada para a esquerda e luz circularmente polarizada para a direita. Este fenômeno ocorre quando uma molécula contém um ou mais cromóforos quirais, que são grupos absorvedores de luz cujas imagens espelho não se sobrepõem.

Espectroscopia de dicroísmo circular é uma técnica na qual uma molécula qualquer é analisada sobre uma faixa de comprimentos de onda e é muito utilizada para estudar moléculas quirais de todos os tipos e tamanhos fornecendo informações estruturais, termodinâmicas e cinéticas de macromoléculas, como proteínas e peptídeos. A aplicação mais importante está na análise de estruturas secundárias e como estas estruturas são sensíveis às interações com outras moléculas e às variações no ambiente como: temperatura e pH.

As medidas feitas na região do visível e do ultra-violeta do espectro eletromagnético monitoram transições eletrônicas, e caso a molécula de interesse contenha cromóforos quirais, um estado circularmente polarizado será absorvido e o sinal de dicroísmo circular sobre o correspondente comprimento de onda será diferente de zero. O sinal de dicroísmo circular pode ser positivo ou negativo dependendo da intensidade da luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita. Se a intensidade da luz circularmente polarizada para a esquerda for maior que para a direita então o sinal de dicroísmo circular é negativo.

Os espectros de CD no ultra-violeta distante (abaixo de 260 nm) podem ser usados para estimar a porcentagem de cada elemento estrutural secundário de uma proteína a partir dos padrões espectrais para cada um destes elementos como: hélice α , folha β e estruturas desordenadas, figura 7.

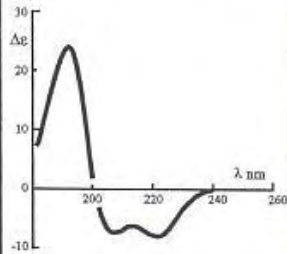
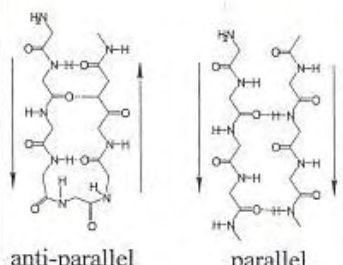
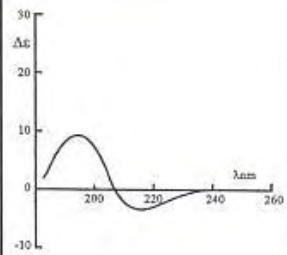
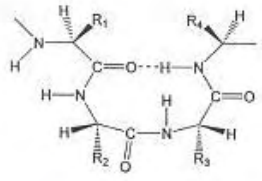
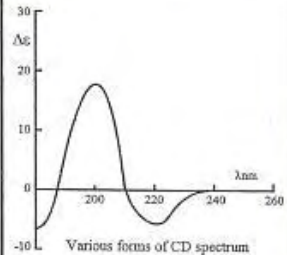
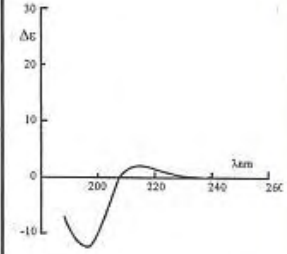
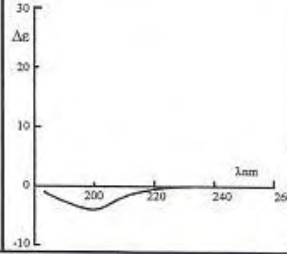
Protein conformation, shape and circular dichroism		
Conformation	Molecular Shape	CD Spectrum
α -helix (H-bonded)		
β -sheet parallel and anti-parallel (H-bonded)		
β -turn, (Type I,II,III,...) γ -turns Some turns not H- bonded in proteins		
Polyproline P_{II} helix 3_1 -helix (Left handed extended helix) (No intra-molecular H-bonds)		
Irregular (Disordered)		

Figura7: Padrões de espectro de dicroísmo circular para elementos de estruturas secundárias (Applied photophysics).

Os espectros de CD foram obtidos para os peptídeos a 20 μM na ausência e na presença de SUVs com caráter zwitteriônico e aniônico a 100 μM e a uma concentração de saturação do teor helicoidal. Os ensaios foram realizados a 25°C usando um espectropolarímetro Jasco-710 (Tokyo, Japão) e cubetas de quartzo de 0,5 cm de caminho óptico. Os espectros foram coletados, em 6 acumulações, no intervalo de comprimento de onda de 190 a 260 nm com velocidade de 20 nm/min, largura de banda 1,0 nm, tempo de resposta 1,0 s e resolução de 0,2 nm. As linhas de base foram obtidas com 7 acumulações.

Após descontar a linha de base e corrigir para diluição de volume, a elipticidade medida, $\theta(\text{mdeg})$ foi convertida em elipticidade molar média por resíduo $[\Theta](\text{deg cm}^2/\text{dmol})$ usando a equação $[\Theta] = 100 \theta/(\ell cn)$, onde ℓ o comprimento do caminho ótico em centímetros, c é a concentração do peptídeo em mM e n é o número de resíduos do peptídeo. A fração de α -hélice (f_H) foi calculada através da elipticidade média por resíduo em 222 nm, $[\Theta]_{222}^{\text{obs}}$ de acordo com Deber e Li (1995):

$$f_H = \frac{(\Theta_{222}^{\text{obs}} - \Theta_{222}^0)}{(\Theta_{222}^{100} - \Theta_{222}^0)} \quad (3)$$

onde $[\Theta]_{222}^0$ é zero e $[\Theta]_{222}^{100}$ é dada por:

$$\Theta_{222}^{100} = -39500 \left(1 - \frac{2,57}{n} \right) \quad (4)$$

n é o número de resíduos do peptídeo, $n = 14$ para os peptídeos utilizados neste trabalho.

2.2.4 Titulações Fluorimétricas

Fluorescência é o resultado de um processo em três estágios que ocorre em moléculas denominadas de fluoróforos, como o resíduo de triptofano presente em todos os peptídeos. Um marcador fluorescente é um fluoróforo projetado para se localizar dentro de uma região específica de um espécime biológico ou para responder a um estímulo. O processo responsável pela fluorescência desses marcadores e de outros fluoróforos é ilustrado por um simples diagrama de estados eletrônicos (diagrama de Jablonski) como mostra a Figura 8 (Haugland, 1996).

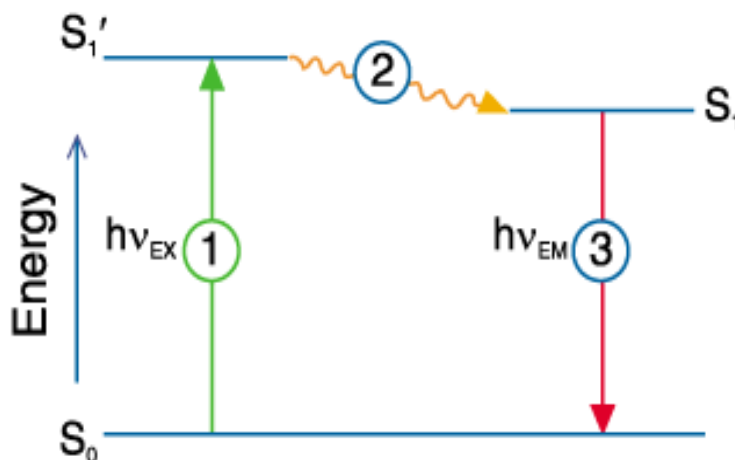


Figura 8: Diagrama de Jablonski ilustrando o processo envolvido na criação de um estado eletrônico excitado singleto por absorção óptica e subsequente emissão de fluorescência. Os estágios identificados como 1, 2 e 3 são explicados no texto.

No estágio 1 conhecido como excitação um fóton com energia $h\nu_{EX}$ proveniente de uma fonte externa como um laser é absorvido pelo fluoróforo, criando um estado eletrônico excitado (S_1'). No estágio 2 o estado excitado existe por um tempo finito (tipicamente $1-10 \times 10^{-9}$ segundos). Durante esse tempo o fluoróforo sofre mudanças conformacionais e também está sujeito a inúmeras possíveis interações com seu ambiente molecular. Estes processos têm 2

consequências importantes. Primeira, a energia de S_1' é parcialmente dissipada, resultando em um estado excitado relaxado (S_1) de onde a emissão fluorescente se origina. Segundo, nem todas as moléculas inicialmente excitadas pela absorção (Estágio 1) voltam ao estado fundamental (S_0) pela emissão de fluorescência. Outros processos tais como supressão por colisão, transferência de energia fluorescente e cruzamento intersistemas podem também despovoar S_1 . No estágio 3 um fóton com energia $h\nu_{EM}$ é emitido, retornando o fluoróforo ao estado fundamental S_0 .

O processo completo de fluorescência é cíclico, ou seja, o mesmo fluoróforo pode ser repetidamente excitado e detectado. Para moléculas poliatômicas em solução, como os peptídeos, as transições eletrônicas discretas representadas por $h\nu_{EX}$ e $h\nu_{EM}$ na Figura 8 são substituídas por espectros de energia bastante largos chamados de espectro de excitação de fluorescência e espectro de emissão de fluorescência, respectivamente. Estes espectros apresentam parâmetros como largura de banda e comprimento de onda de máxima excitação ou emissão, que são de importância particular para as aplicações de espectroscopia de fluorescência e monitoramento de fluoróforos.

Com a finalidade de obter as isotermas de associação do peptídeo em vesículas os experimentos de titulações fluorimétricas foram realizados através da adição de alíquotas de uma solução de vesícula a uma solução de peptídeo com concentração fixa ($C_P = 5\mu M$). Nestes experimentos, peptídeo e vesícula foram preparados em tampão 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 6,8. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. A temperatura foi mantida constante a 25°C. Os experimentos foram realizados em espectrofluorímetro PC1 – ISS Urbana Champaign, IL, EUA.

Efeitos de espalhamento de luz das vesículas foram corrigidos colocando polarizadores cruzados e nos feixes de emissão e excitação. Um polarizador é mantido perpendicular ao feixe de excitação e paralelo ao feixe de emissão (Ladokhin et al., 2000), e subtraindo-se o espectro obtido para cada concentração de lipídeo sem o peptídeo. As larguras das fendas de emissão e de excitação foram de 2 nm.

A cada adição de vesícula a intensidade de emissão de fluorescência de triptofano foi medida quando a amostra foi excitada em 285 nm e a emissão medida de 300 a 500 nm.

Através destes espectros foi possível calcular o deslocamento espectral ($\Delta\lambda$) para menores comprimentos de onda (*Blue Shift*):

$$\Delta\lambda_i = \lambda_0 - \lambda_i \quad (5)$$

onde λ_0 e λ_i são os comprimentos de onda dos picos dos espectros na ausência e na presença de cada concentração i de vesícula, respectivamente.

Para obter as constantes de associação utilizou-se um método de análise, que tem como base alterações ópticas observadas ao longo da titulação (Bashford et al., 1979). Para isto, a concentração do peptídeo foi mantida constante, enquanto a concentração de vesícula variou de 0 a 2000 μ M. Ou seja, uma concentração de lipídeo próxima da qual espera-se que todos os peptídeos estejam ligados às membranas modelo. Este procedimento foi utilizado para calcular a fração de peptídeo ligado em cada concentração de lipídeo através da seguinte razão:

$$\varepsilon = \frac{I}{I_0} \quad (6)$$

onde ε é a razão entre as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de concentrações crescentes de vesícula, I_0 e I , respectivamente.

Se todos os sítios de ligação são idênticos, como é o caso do sistema em análise, podemos definir um parâmetro ε_b . Este parâmetro é uma constante que caracteriza as propriedades espectrais do complexo membrana-peptídeo ligado e quando todos os peptídeos em solução estão associados às vesículas tem o mesmo valor de ε . Assim, podemos calcular a fração de peptídeo ligado, c , através da seguinte expressão:

$$I = I_0(1 - c) + I_0\varepsilon_b c \quad (7)$$

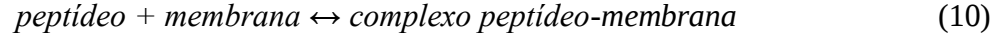
e utilizando a razão ε se tem:

$$\varepsilon = \frac{I}{I_0} = (1 - c) + \varepsilon_b c \quad (8)$$

Isolando a fração de peptídeo ligado se obtém:

$$c = \frac{(\varepsilon - 1)}{(\varepsilon_b - 1)} = \frac{(1 - \varepsilon)}{(1 - \varepsilon_b)} \quad (9)$$

A adsorção do peptídeo à membrana pode ser representada por:



Definindo que a concentração inicial de peptídeo é C_P , a concentração de lipídeo é C_L , o número de sítios de ligação por unidade de membrana é n , a concentração de sítios ocupados ao longo da titulação é b , a concentração de sítios ocupados é C_b e considerando que o número total de sítios é muito maior que o número de ligantes. É possível mostrar que a constante de dissociação é:

$$K_d = \frac{(C_P - C_b)nC_L}{C_B} \quad (11)$$

a fração de peptídeo ligado pode ser escrita também pela razão $\frac{C_b}{C_P}$ e através da equação 11 se tem:

$$c = 1 - \frac{K_d c}{nC_L} \quad (12)$$

substituindo a equação 9 na equação 12 se obtém:

$$\varepsilon - 1 = (\varepsilon_b - 1) - \frac{K_d(\varepsilon - 1)}{nC_L} \quad (13)$$

Como é possível inferir da equação 13, a inclinação do gráfico de $\varepsilon - 1$ vs. $(\varepsilon - 1)/C_L$ resulta em K_d/n , cujo inverso, n/K_d , é considerado como a constante de associação clássica para a interação peptídeo-lipídeo (Scatchard, 1949) e fornece uma base para comparar os vários peptídeos estudados (Bashford et al., 1979). Nenhuma manipulação foi feita com a finalidade de

separar o termo K_d/n pois este tipo de titulação foi usada para propósitos comparativos; este termo resulta em uma indicação de afinidade do peptídeo pela vesícula mais confiável que o parâmetro K_d (Bashford et al 1979).

2.2.5 Anisotropia de fluorescência do Triptofano

A anisotropia de fluorescência do resíduo triptofano, W, foi medida utilizando um espectrofluorímetro ISS modelo PC1 (Urbana, Champaign, IL, USA) com polarizadores Glan-Thompson. A anisotropia foi determinada por meio das componentes paralela e perpendicular da emissão quando o triptofano é excitado com feixe polarizado nestas direções. Os feixes de excitação e emissão foram fixados em 285 e 365 nm, e a largura de banda de 2 e 2 nm, respectivamente.

Anisotropia de fluorescência é dada pela equação a seguir:

$$r = (F_{\parallel} - GF_{\perp}) / (F_{\parallel} + 2GF_{\perp}) \quad (14)$$

onde $F_{\parallel}$ é a intensidade de fluorescência paralela ao plano de excitação, $F_{\perp}$ é a componente perpendicular ao mesmo plano e G é o fator para correção de artefatos instrumentais (Lakowicz, 1999).

2.2.6 Experimento de supressão de emissão de fluorescência de Triptofano por acrilamida

Reações de supressão de fluorescência dão informações sobre a acessibilidade do supressor ao resíduo de W na cadeia peptídica que é uma sonda intrínseca. Alterações no ambiente do peptídeo ao interagir com diferentes bicamadas lipídicas podem ser acompanhadas através das mudanças na acessibilidade da acrilamida ao resíduo de W.

Sucessivas alíquotas de uma solução de acrilamida em água a 2,77 M foram adicionadas a uma solução de peptídeo a 5 μ M em tampão Tris/HCl 10mM contendo 1 mM de EDTA e 150 mM de NaCl, pH 7,5, na ausência e na presença de 500 μ M de fosfolipídeos. Espectros de emissão de fluorescência de W foram registrados entre 308 e 450 nm, com excitação em 285 nm e a 25°C. Os espectros obtidos foram corrigidos pelo fator de diluição e foi descontada a contribuição do espalhamento de luz a partir de uma titulação da suspensão de vesículas com acrilamida na ausência de peptídeo. Os dados foram analisados de acordo com a equação de Stern-Volmer para supressão colisional:

$$F_0 / F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (15)$$

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

$$F_0 / F = 1 + K_{sv}[Q] \exp(V[Q]) \quad (16)$$

cujo V é uma constante de supressão estática (Eftink e Ghiron 1976).

2.2.7 Potencial Zeta (ζ)

O potencial zeta para as vesículas, na ausência e presença de peptídeos incorporados, foram determinados por meio da mobilidade eletroforética usando Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.), em pH 7,5 a $25^\circ\text{C} \pm 0,2$. As soluções tinham concentração de vesícula constante, 40 μM em PCPG 70:30, variando a concentração de peptídeo em um intervalo que permitiu observar a inversão de potencial e de carga da vesícula. Foram utilizadas celas capilares em forma de U com eletrodo de ouro e volume de 1,0 mL (DTS1060).

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

$$\zeta = \frac{\eta u_E}{\varepsilon \varepsilon_0} \quad (17)$$

onde η é a viscosidade da fase aquosa ($\eta = 0,8872$ cP), ε_0 é a permissividade do vácuo e ε é a constante dielétrica do meio aquoso ($\varepsilon = 80$).

As curvas de potencial zeta versus concentração de peptídeos foram analisadas pelo modelo de Gouy Chapmann (Verwey & Overbeek, 1948) utilizando a estratégia descrita por Beshiaschivili e Seelig (1990) e Kloczek e Seelig (2009).

De acordo com este modelo o peptídeo e a espécie iônica em solução são adsorvidos à bicamada lipídica, com uma constante de adsorção aparente, K_{ap} , através da isoterma de adsorção de Langmuir. A bicamada, supostamente, é constituída de fosfolipídeos neutros como fosfatidilcolina (zwiteriônicos (PC)) e uma fração X_{PG} de fosfolipídeos ácidos (fosfatidilglicerol (PG)). Neste trabalho o eletrólito suporte é o NaCl. Os íons de sódio (Na^+) são particionados entre a bicamada e a solução. Considerando que a constante de associação do sódio pelo grupo fosfato seja K_{Na} e que a fração destes íons ligados à bicamada seja X_{Na} pode-se escrever que:

$$X_{Na} = \frac{K_{Na} \cdot C_{M,Na}}{(1 + K_{Na} C_{M,Na})} \quad (18)$$

onde $C_{M,Na}$ é a concentração de sódio sob a influência do potencial eletrostático da bicamada. Se a concentração de sódio na solução é C_{Na} então $C_{M,Na}$ é dado por:

$$C_{M,Na} = C_{Na} \exp\left(-\frac{\psi_0 F_0}{RT}\right) \quad (19)$$

na qual F_0 é a constante de Faraday, R é a constante dos gases, T a temperatura absoluta e ψ_0 é o potencial na superfície da membrana.

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

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

$$\sigma = \left(\frac{e}{A_L}\right) \frac{-X_{PG}(1 - X_{Na}) + z_{ef} \cdot X_B}{1 + (A_P/A_L) \cdot X_B} \quad (20)$$

onde e é a carga elementar, A_P e A_L são a área do peptídeo e do lipídeo, respectivamente, que estabelecem contato durante a interação. O termo $(A_P/A_L) \cdot X_B$ leva em conta a penetração do peptídeo na bicamada.

A equação 20 possui duas incógnitas, a carga efetiva do peptídeo z_{ef} e o potencial eletrostático na superfície. Uma segunda relação independente entre σ e ψ_0 é dada pela equação de Grahame (Grahame, 1947):

$$\sigma = (2000 \cdot \epsilon \epsilon_0 RT)^{\frac{1}{2}} \sum_i \left[C_{i,eq} \exp\left(\frac{-z_i F \psi(x)}{RT}\right) - 1 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (21)$$

onde $C_{i,eq}$ é a concentração molar do i -ésimo eletrólito, R é a constante dos gases e $\psi(x)$ o potencial da vesícula a uma distância x da sua superfície.

A densidade superficial de carga depende da concentração e da carga dos ligantes que estão sendo adsorvidos pela membrana. O modelo de Gouy Chapman pode ser utilizado para retratar a interação entre peptídeos líticos e membranas modelo (Klocek et al., 2009).

As equações (20) e (21) podem ser combinadas para determinar z_{ef} e ψ_0 . A solução entretanto, pode não ser única, para isso é importante a comparação do potencial na superfície com o obtido de medidas do potencial zeta. A relação entre o potencial zeta (ζ) e o potencial na superfície (ψ_0) é dada por:

$$\zeta = \psi_0 \exp(-\kappa \cdot d_\zeta) \quad (22)$$

onde κ é o parâmetro de Debye e d_ζ a posição do plano de cisalhamento em relação à bicamada ($d_\zeta \approx 2 \text{ \AA}$) (Stankowski, 1991).

O valor negativo do potencial na superfície ψ_0 acarreta aumento da concentração de peptídeos na interface e a concentração imediatamente acima do plano de associação pode ser dada por

$$C_{PM} = C_F \exp\left(\frac{-z_{ef} F_0 \psi_0}{RT}\right) \quad (23)$$

onde C_F é a concentração de peptídeo distante do plano (“bulk”).

Para determinar a constante de adsorção dos peptídeos à bicamada levando em conta as contribuições eletrostáticas e não eletrostáticas, utilizou-se a seguinte expressão:

$$K_p = \frac{X_B}{C_{PM}} \quad (24)$$

onde X_B é a fração de peptídeo ligado à bicamada e dado por $X_B = C_{PepLigado}/C_{Lipideo}$.

Para determinar o valor de X_B foi feito um programa computacional que a partir dos valores obtidos das medidas de potencial zeta com o aumento da concentração de peptídeo, calcula a densidade superficial de carga pelas equações 20 e 21. Quando essas equações são satisfeitas, simultaneamente, conhecemos as variáveis necessárias

para obter a constante de ligação, que são X_B , z_{ef} , C_F e as variáveis dependentes dessas grandezas.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Extravasamento

A permeabilização de vesícula tem sido utilizada para explorar a atividade lítica de peptídeos bioativos cujas funções como atividade antimicrobiana e hemolítica são centradas na fase lipídica. É aceito que os constituintes da membrana celular agem como uma barreira seletiva para a ação dos peptídeos (Matsuzaki et al., 1999a). Desta maneira, como os lipídeos aniônicos são preponderantes na camada externa da membrana de seres procariotos e lipídeos zwitteriônicos são mais abundantes em membranas de mamíferos (Yeaman e Yount, 2003; Zasloff, 2002) foram utilizados neste trabalho PC como lipídeo zwitteriônico e PCPG 70:30 como aniônico para simular membranas de mamíferos e bactérias, respectivamente.

A liberação de corante fluorescente induzida pelos quatro peptídeos estudados foi monitorada pelo aumento da fluorescência. As curvas dose resposta mostradas na figura 9 são sigmóides ajustadas pela equação sigmoidal de Boltzmann, cujos parâmetros estão dispostos da tabela 2, para a interação de peptídeo tanto com vesícula zwitteriônica quanto com vesícula aniônica. Estas curvas caracterizam um processo cooperativo e representam a porcentagem de liberação de CF como função da razão entre as concentrações molares de peptídeo e de lipídeo, $[P]/[L]$. A atividade lítica pode ser quantificada por um valor $[P]/[L]$ crítico, acima do qual ocorre um processo intenso de liberação de corante. Neste valor crítico, a eficiência e a cooperatividade da liberação de CF pareceu ser dependente da carga líquida do peptídeo e da densidade superficial de carga da vesícula, devido à diferença na constituição lipídica. Em vesículas zwitteriônicas, foi observado que a razão $[P]/[L]$ aumenta com a carga líquida do peptídeo enquanto as curvas dose resposta se tornam menos cooperativas. Em vesículas aniônicas, o comportamento parece ser similar àquele observado para vesículas zwitteriônicas. As curvas dose resposta para os peptídeos de carga +1 e +2 são caracterizadas por baixas razões $[P]/[L]$ críticas, que são um pouco maiores que àquelas encontradas em vesículas eletricamente neutras. Por outro lado os peptídeos mais carregados +3 e +4 apresentam valores menores para vesícula aniônica quando comparados com os valores obtidos para vesículas zwitteriônicas.

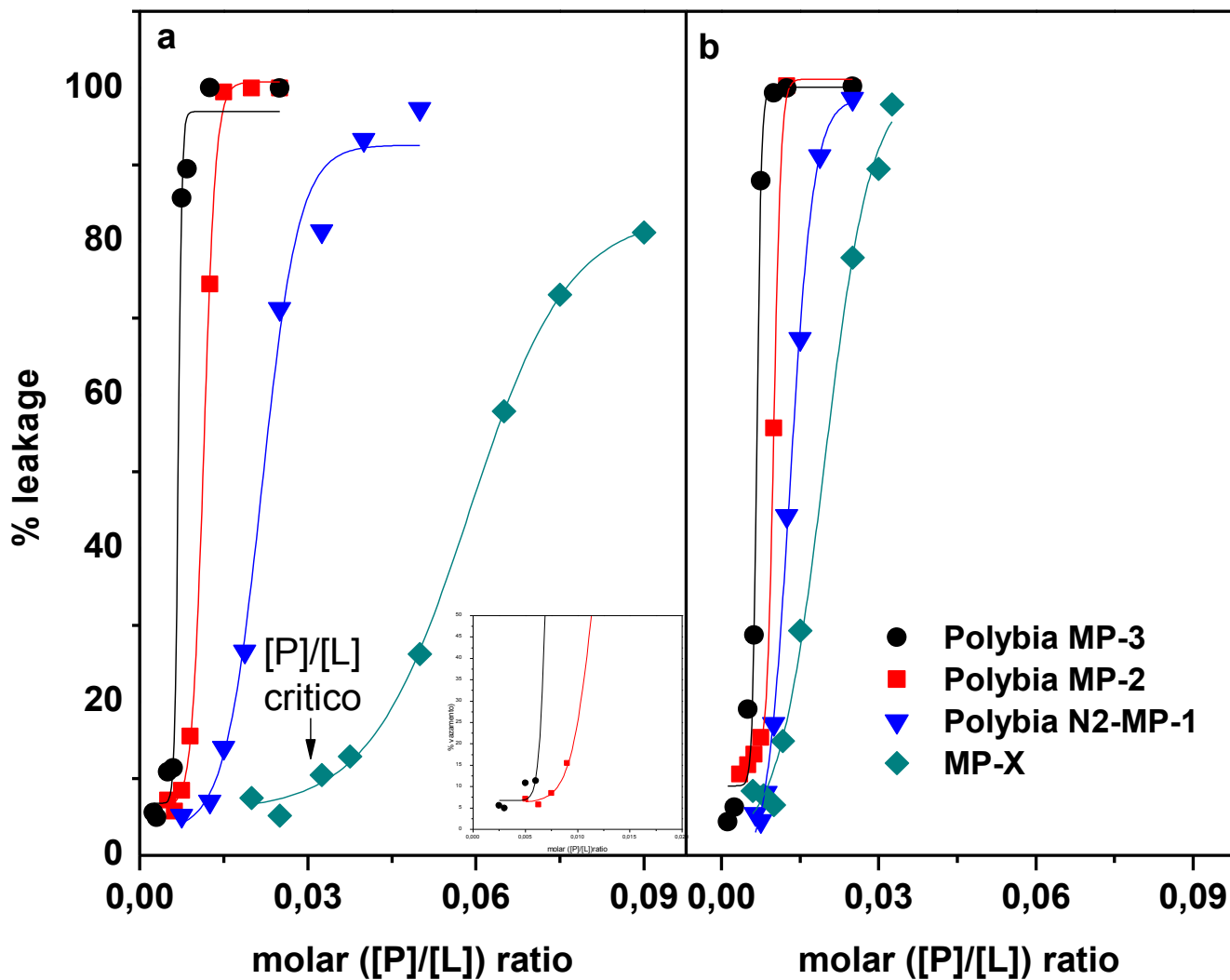


Figura 9: Curvas dose resposta: % liberação após 10 min de contato como função da razão molar peptídeo-lipídeo ([P]/[L]). a – vesícula zwitteriônica a 100 μM. Valores [P]/[L] críticos são 0,006 para o Polybia MP-3, 0,0085 para o Polybia MP-2, 0,0137 para o Polybia N2-MP-1 e 0,033 para MP-X. b – vesícula aniônica a 100 μM. Valores [P]/[L] críticos são 0,0055 para Polybia MP-3, 0,0084 para Polybia MP-2, 0,0079 para Polybia N2-MP-1 e 0,009 para MP-X. As curvas contínuas são ajustes realizados com a equação sigmoidal de Boltzmann com coeficientes de correlação superiores a 0,98.

Tabela 2- Parâmetros do ajuste pela equação sigmoidal de Boltzmann, equação 2, A_1 a mínima % vazamento, A_2 a máxima % vazamento, x_0 a $[P]/[L]$ em uma % vazamento = 50% da % vazamento total e dx é o intervalo do eixo x correspondente a inclinação da curva sigmoidal e representa uma medida do quanto a interação é cooperativa. Valores da razão molar $[P]/[L]$ crítica.

	Q	A_1		A_2		$x_0 (10^{-3})$		$dx (10^{-3})$		$[P]/[L]$ crítico (10^{-3})	
		PC	PCPG	PC	PCPG	PC	PCPG	PC	PCPG	PC	PCPG
Polybia MP-3	+1	6,8	9,0	97,0	100,0	6,9	6,8	0,3	0,4	6,0	5,5
Polybia MP-2	+2	6,3	12,1	100,0	100,0	11,5	10,0	1,1	0,7	8,5	8,4
Polybia N2-MP-1	+3	3,0	2,1	92,6	99,0	21,8	13,0	3,3	2,2	13,7	7,9
MP-X	+4	5,7	2,0	83,5	100,0	58,8	19,6	8,8	4,4	33,0	9,0

3.2 Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular (CD) em tampão apresentaram uma banda de intensidade negativa posicionada em torno de 200 nm, característica de uma estrutura secundária desordenada, enquanto os espectros dos peptídeos em SUVs apresentaram duas bandas de intensidade negativa posicionadas em 222 e 208 nm, como mostrado pela figura 10, sendo este padrão de espectro característico de estruturas helicoidais. O conteúdo de hélice α , na presença de lipídeo a 100 μM e a uma concentração de saturação, é mostrado na tabela 3 e parece ser dependente da carga líquida dos peptídeos, pois, em vesícula zwitteriônica a 100 μM , o teor de hélice diminui com o aumento da carga líquida dos peptídeos. Nesta condição, o peptídeo MP-X apresentou teor helicoidal que representa aproximadamente 90% do teor na condição de saturação enquanto os demais apresentaram pouco mais de 50%. Em vesícula aniônica, nesta mesma razão peptídeo-lipídeo ($P/L=0,2$), foi observado maior teor de hélice que em vesícula eletricamente neutra, com exceção do peptídeo de carga líquida +2. Isto sugere que a indução de hélice é modulada pela interação eletrostática entre as cabeças polares dos lipídeos e os resíduos carregados nos peptídeos. Além disto, o peptídeo Polybia MP-2, de maneira intrigante, apresentou 35% da fração de hélice da condição de saturação, enquanto os demais apresentaram valores superiores a 50%.

Tabela 3- Fração de hélice em vesículas aniônica e zwitteriônica a 100 μM , f_H e em concentração de saturação, $f_{H\infty}$.

Polybia MP-3	I D W L K L G K M V M D V L - NH₂			
Polybia MP-2	I N W L K L G K M V I D A L - NH₂			
Polybia N2-MP-1	I N W K K L L D A A K Q I L - NH₂			
MP-X	I N W K G I A A M A K K L L - NH₂			
	PC		PCPG	
	f_H	$f_{H\infty}$	f_H	$f_{H\infty}$
Polybia MP-3	0,30	0,44	0,54	0,55
Polybia MP-2	0,33	0,48	0,18	0,51
Polybia N2-MP-1	0,21	0,30	0,30	0,59
MP-X	0,12	0,14	0,41	0,52

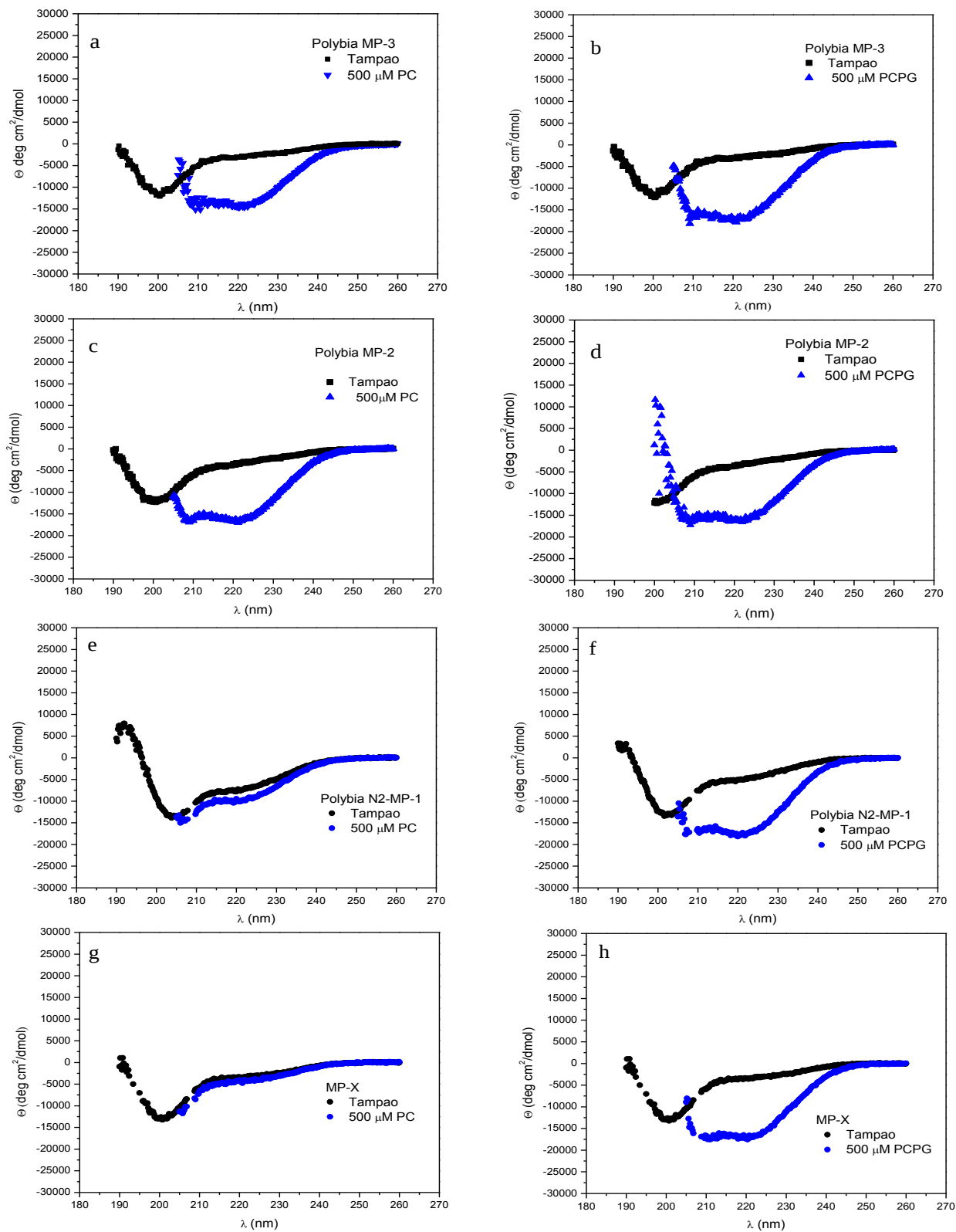


Figura 10: Espectros de CD dos quatro peptídeos em vesículas PC, PCPG 70:30 e em Tampão Tris 5mM H₃BO₃, 1mM Na₂EDTA e 150mM NaF pH 7,5 a 25°C.

3.3 Titulações Fluorimétricas

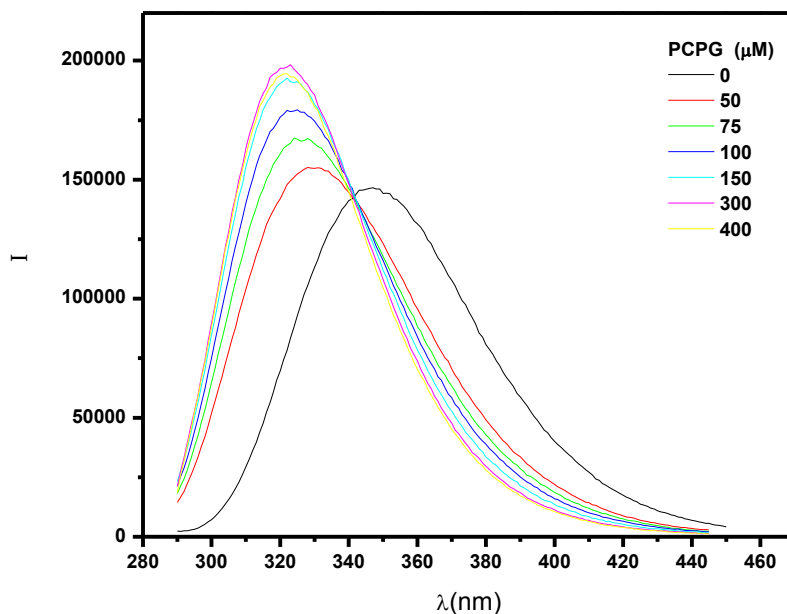


Figura 11: Espectro de emissão do resíduo triptofano do peptídeo MP-X a $5 \mu\text{M}$, na ausência e na presença de diferentes concentrações de vesícula aniônica, excitação em 285nm e pH 7,5 a 25°C . Tampão 10mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,15 NaCl, pH 6,8 . Comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência no tampão $\lambda_0 = 347\text{nm}$.

Espectros de emissão do triptofano (W) para os quatro peptídeos foram coletados na ausência e na presença de concentrações crescentes de vesículas PC e PCPG. Isto foi feito com a finalidade de avaliar a afinidade de cada peptídeo pelas membranas modelo utilizadas.

O comprimento de onda de máxima emissão de fluorescência dos peptídeos em tampão variou de 348 a 346 nm. Isto indica que este resíduo está em um ambiente altamente polar. No entanto o espectro de emissão de fluorescência, na presença de vesículas, mostrou significativo deslocamento espectral para menores comprimentos de onda como pode ser observado na Figura 11, sugerindo que o resíduo triptofano move-se para um ambiente de menor polaridade, que poderia ser a região das cadeias acílicas da bicamada lipídica.

Na Figura 12a e b os deslocamentos espectrais, ou seja, as diferenças entre as posições dos picos do espectro de emissão do W foram dispostas em gráfico em função da concentração total de lipídeo. Em vesícula zwitteriônica, o maior deslocamento espectral foi observado para os peptídeos de menor carga líquida, sugerindo que o acesso ao ambiente menos polar e

provavelmente a afinidade dos peptídeos por vesícula neutra decresce com a carga elétrica líquida do peptídeo.

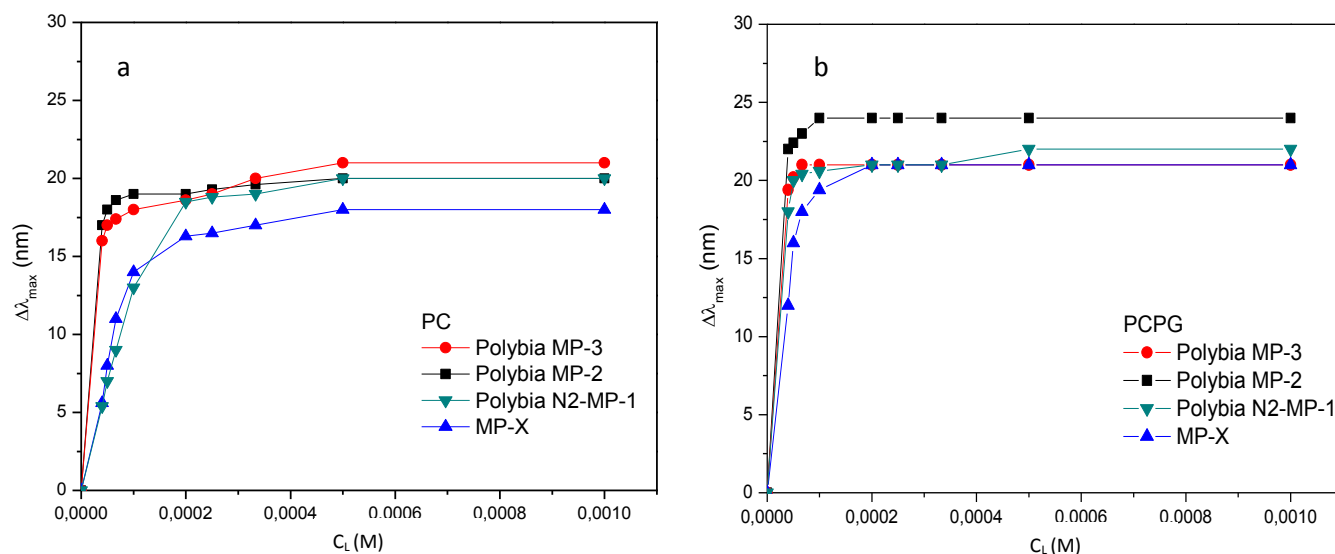


Figura 12: Deslocamento espectral da emissão de fluorescência do W com o aumento da concentração de lipídeo dos quatro peptídeos a $5\mu\text{M}$ incubados com diferentes concentrações de lipídeo acima de $40\mu\text{M}$ em 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, $0,15\text{ NaCl}$, $\text{pH } 7,5$ a 25°C . a Vesícula Zwitteriônica. b Vesícula aniônica. Peptídeo Polybia MP-3 representado pelo círculo em vermelho, Polybia MP-2 representado pelo quadrado em preto, Polybia N2-MP-1 representado pelo triângulo para baixo em verde e MP-X representado pelo triângulo em azul.

Procurando quantificar a afinidade dos peptídeos pelas bicamadas lipídicas foram utilizados os valores das intensidades máximas dos espectros na presença de vesícula, I , e na ausência, I_0 .

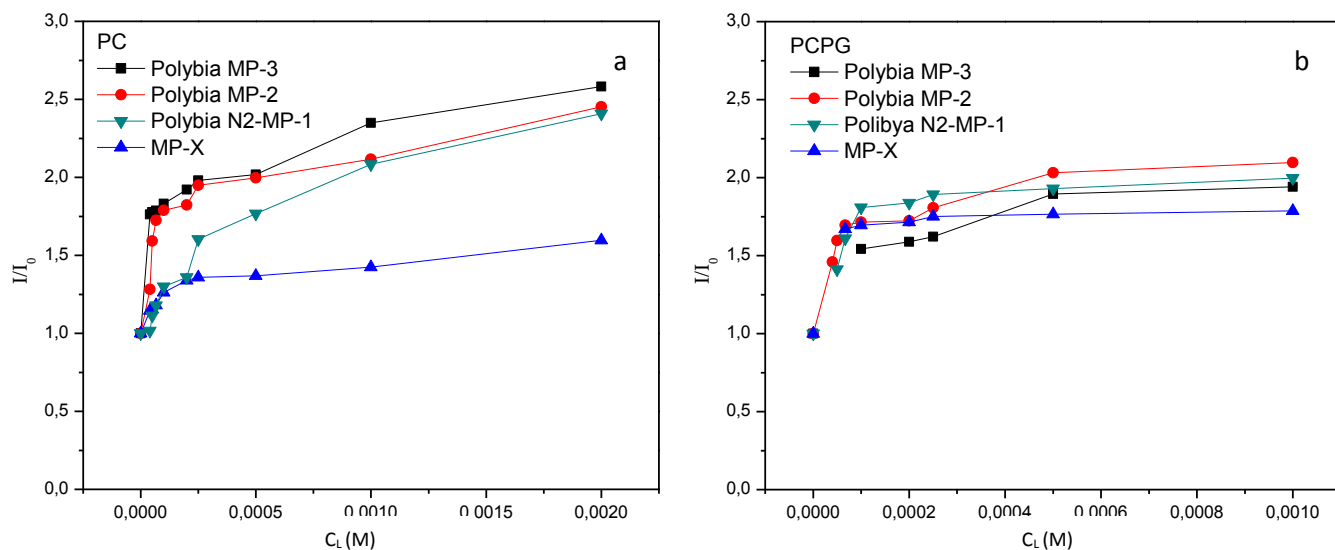


Figura 13: Razão entre os valores de intensidade de fluorescência na presença de vesícula, I , e na ausência, I_0 obtidas do espectro de emissão do triptofano com excitação em 285 nm em função da concentração total de lipídeo. Peptídeo Polybia MP-3 representado pelo círculo em vermelho, Polybia MP-2 representado pelo quadrado em preto, Polybia N2-MP-1 representado pelo triângulo para baixo em verde e MP-X representado pelo triângulo em azul. a – vesícula zwitteriônica e b – vesícula aniônica.

A razão entre estes valores ($\varepsilon = I/I_0$) foi usada na equação 13 (Materiais e Métodos) para construir um gráfico $(\varepsilon-1)$ vs. $(\varepsilon-1)/m$ como mostrado pela Figura 14. A reta foi obtida do melhor ajuste dos pontos usando o método dos mínimos quadrados.

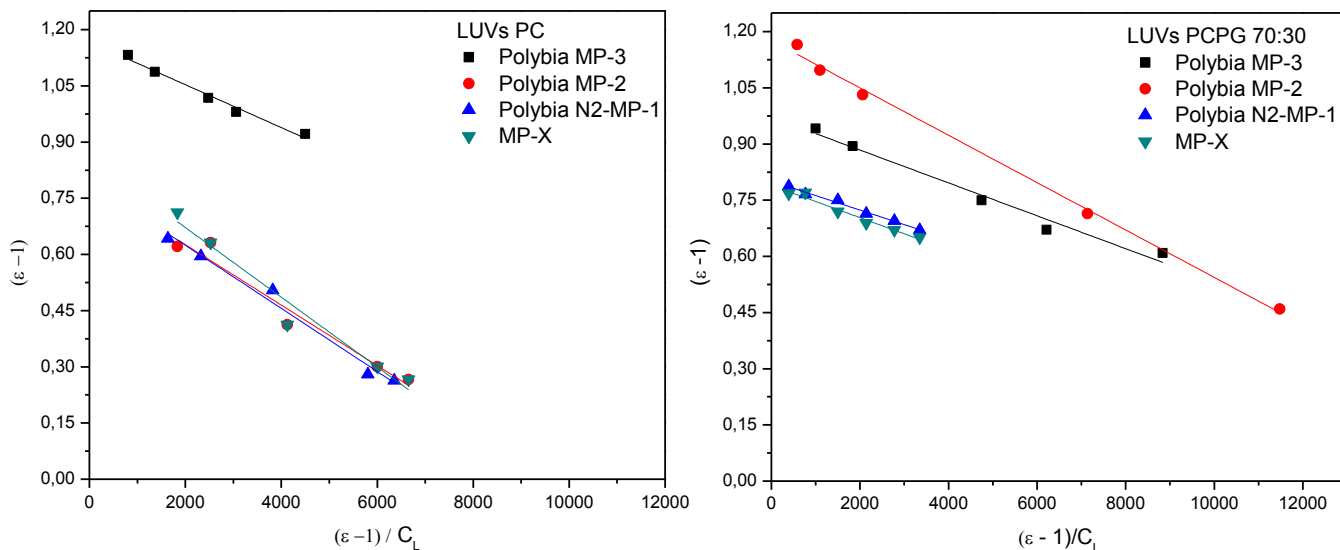


Figura 14: Gráfico $(\varepsilon-1)$ vs. $(\varepsilon-1)/C_L$ para os peptídeos em vesículas PC, PCPG 70:30. A linha contínua é dada pelo ajuste feito com a equação 6 cuja inclinação resulta no parâmetro de afinidade K_d/n , que representa o recíproco da primeira constante de associação clássica para a interação peptídeo-lipídeo.

De acordo com a equação 13 a inclinação fornece a razão entre a constante de dissociação e o número de lipídeos por peptídeo, ou seja, o número de sítios de ligação. Para MP-X em PCPG foi obtida $K_d/n = 0,039 \pm 0,003$ mM. O inverso deste valor foi referido simplesmente como constante de associação aparente, que resultou em 26000 M^{-1} coerente com a literatura que apresenta um valor de 22500 M^{-1} em vesículas PCPS 90:10 (Schwarz e Reiter, 2001). Este procedimento foi realizado para os quatro peptídeos e os dados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Dados de afinidade dos peptídeos pelas bicamadas lipídicas aniônica, PC, e zwitteriônica, PCPG.

	K_d/n (mM)		ε_b		K_{ap} (10^3 M^{-1})	
	PC	PCPG	PC	PCPG	PC	PCPG
Polybia MP-3	0,057±0,003	0,044±0,003	1,97	2,17	17,5±8,0	23,0±1,7
Polybia MP-2	0,080±0,001	0,047±0,002	2,18	1,79	12,5±0,1	21,3±0,9
Polybia N2-MP-1	0,086±0,003	0,040±0,003	1,80	1,79	11,6±0,4	25,0±1,7
MP-X	0,092±0,003	0,039±0,003	1,79	1,86	10,8±0,3	26,0±1,4

Na tabela 4 são mostrados os valores dos parâmetros de afinidade K_d/n e K_{ap} para cada peptídeo. Quanto menor é o parâmetro de afinidade do peptídeo pela bicamada lipídica, K_d/n , maior é a constante de associação aparente K_{ap} . Em vesículas zwitteriônicas, os peptídeos menos carregados e com maior hidrofobicidade média apresentam maior K_{ap} . Este resultado está em bom acordo com os dados já apresentados. Isto ocorre tanto pela menor repulsão eletrostática na acomodação desses peptídeos na bicamada eletricamente neutra quanto pela hidrofobicidade média, sugerindo que esta interação seja dirigida pela interação hidrofóbica. Em vesículas aniônicas, observamos valores maiores de K_{ap} quando comparamos com os valores obtidos em vesículas zwitteriônicas, indicando que o processo de associação dos peptídeos à bicamada é significativamente influenciado pelas interações eletrostáticas. Nas vesículas aniônicas a tendência é de K_{ap} crescer com a carga líquida do peptídeo, evidenciando a importância da componente eletrostática, entretanto, a comparação entre os valores de K_{ap} para Polybia MP-3 e MP-2, com cargas +1, +2, sugere que além da interação eletrostática outros aspectos tais como, resíduo ácido extra em MP-3 e distribuição de cargas são importantes para modular a afinidade.

3.4 Anisotropia de Fluorescência do Triptofano

Os experimentos foram realizados para medir a anisotropia de fluorescência do triptofano, r , em função da concentração total de lipídeo, e os resultados estão mostrados em forma de gráfico nas Figuras 15a e b. De maneira geral, estes resultados confirmam a interação entre os peptídeos e as membranas modelo, pois, na ausência de vesícula observaram-se valores de anisotropia da ordem de 0,01 indicando que o peptídeo em solução possui rápida difusão rotacional Browniana. No entanto, na presença de vesícula este valor aumenta continuamente mostrando que o peptídeo e, conseqüentemente, o resíduo triptofano tem sua mobilidade limitada. Este resultado sugere que há interação entre o peptídeo e a membrana modelo, pois, o triptofano migra para um ambiente mais anisotrópico. Em vesícula aniônica, os valores de r aumentam com a carga elétrica líquida de cada peptídeo, sugerindo restrição de movimento do W, pela bicamada, e coerente com o maior teor helicoidal e maior estruturação observados para todos os peptídeos nesse tipo de ambiente. Em vesícula zwitteriônica, observou-se para os peptídeos com menor carga líquida que o aumento de r pode ser devido tanto à estruturação desses peptídeos, como demonstrado pelos dados de CD, quanto à interação peptídeo-lipídeo, como indicado pelas constantes de associação. Intrigantemente, para os peptídeos com maior carga líquida e mais hidrofílicos observou-se os maiores valores de anisotropia e menor teor de hélice (tabela 3). Isto poderia sugerir que esses peptídeos estariam interagindo com a região das cadeias acíclicas da bicamada; no entanto, o menor teor de hélice, as menores constantes de associação e o menor deslocamento espectral de MP-X se opõem a essa possibilidade. Esses resultados, aparentemente contraditórios, indicam que outros fatores que afetam o microambiente do W e ligados à solvatação desse resíduo estão presentes, como verificou-se nos experimentos de supressão de fluorescência de triptofano por acrilamida (tabela 5).

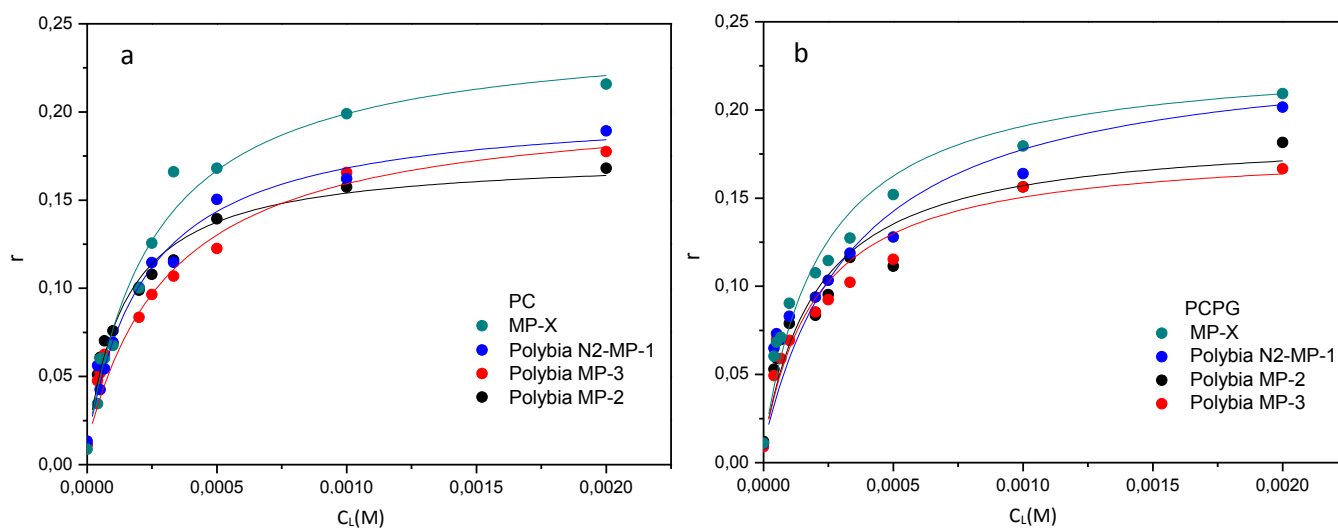


Figura 15: Anisotropia de fluorescência do W com o aumento da concentração de lipídeo dos cinco peptídeos a $5\mu\text{M}$ incubados com diferentes concentrações de lipídeo acima de $40\mu\text{M}$ em 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, $0,15\text{ NaCl}$, pH 7,5 a 25°C . Comprimento de onda de excitação 285nm e de emissão 350nm . a- vesícula zwitteriônica. b- vesícula aniônica.

3.5 Supressão de Emissão de Fluorescência do Triptofano por Acrilamida

Os experimentos de supressão de emissão fluorescência do triptofano foram realizados com a finalidade de quantificar a extensão da penetração dos peptídeos na região hidrofóbica da bicamada. A acrilamida foi usada como um supressor para a fluorescência do triptofano e a perda da intensidade de fluorescência devido à adição deste supressor foi analisada por meio de gráficos de Stern-Volmer, mostrados na Figura 16. Considerando a faixa de concentração do supressor utilizada, os gráficos de Stern-Volmer não se apresentaram lineares, sugerindo que não existe um processo de supressão colisional, mas sim de supressão estática. Isto pode ser atribuído à presença de moléculas de acrilamida vizinhas ao triptofano quando este é excitado (Eftink e Ghiron, 1976). Os valores das constantes de Stern-Volmer foram obtidos de duas formas: pelo ajuste linear utilizando a equação 15 e pelo ajuste não linear como mostrado pela figura 16, utilizando a equação 16. Este último apresentou coeficiente de correlação superior ao ajuste linear e as constantes obtidas apresentaram melhor correlação com os dados obtidos no conjunto dos experimentos. As constantes de Stern-Volmer na presença de vesículas mostraram que a bicamada protege parcialmente o fluoróforo, W, do supressor. Com a finalidade de comparar os dados de supressão, as constantes de Stern-Volmer para cada peptídeo (K_{SVL}) em vesículas foram normalizadas pelos respectivos valores em tampão (K_{SVT}) e os resultados são mostrados na tabela 5. Desde que a acrilamida seja acessível a todos os resíduos de triptofano em solução, com exceção daqueles que são protegidos na fase lipídica da bicamada (Mishra et al. 1994), estas constantes normalizadas representam a fração da intensidade de fluorescência residual depois da incorporação do fluoróforo na bicamada e estima a afinidade do peptídeo pelo lipídeo de maneira qualitativa: quanto menor o valor, mais protegido o fluoróforo está e maior é a afinidade. Apesar da similaridade destes parâmetros é possível notar que os resíduos W destes peptídeos foram incorporados às bicamadas de maneira particular dependendo da sua constituição lipídica (zwitteriônica ou aniônica). Os valores das constantes normalizadas sugerem a mesma ordem de afinidade observada dos valores das constantes de associação obtidos por fluorescência. Os diferentes valores das K_{SV} para os peptídeos em tampão revelam que a solvatação do resíduo de W não é a mesma, embora nesse meio todos os peptídeos apresentem-se não estruturados conforme dados de CD. Curiosamente o peptídeo de maior carga, MP-X, e o de menor carga, Polybia MP-3, apresentam respectivamente, a menor e a maior K_{SVT} . Esses fatos mostram que os

resultados aparentemente contraditórios obtidos nos experimentos de anisotropia de fluorescência de W apenas refletem características do ambiente desse resíduo quando ele se encontra pouco associado às bicamadas lipídicas.

Tabela 5 – Constantes Stern-Volmer normalizadas em vesículas PC e PCPG.

	Q	K_{SVT}	K_{SVL}/K_{SVT} em PC	K_{SVL}/K_{SVT} em PCPG
Polybia MP-3	+1	16,8 ± 0,6	0,26 ± 0,02	0,25 ± 0,02
Polybia MP-2	+2	14,0 ± 0,3	0,32 ± 0,03	0,27 ± 0,03
Polybia N2-MP-1	+3	14,6 ± 0,3	0,29 ± 0,03	0,21 ± 0,03
MP-X	+4	11,4 ± 0,1	0,49 ± 0,03	0,22 ± 0,02

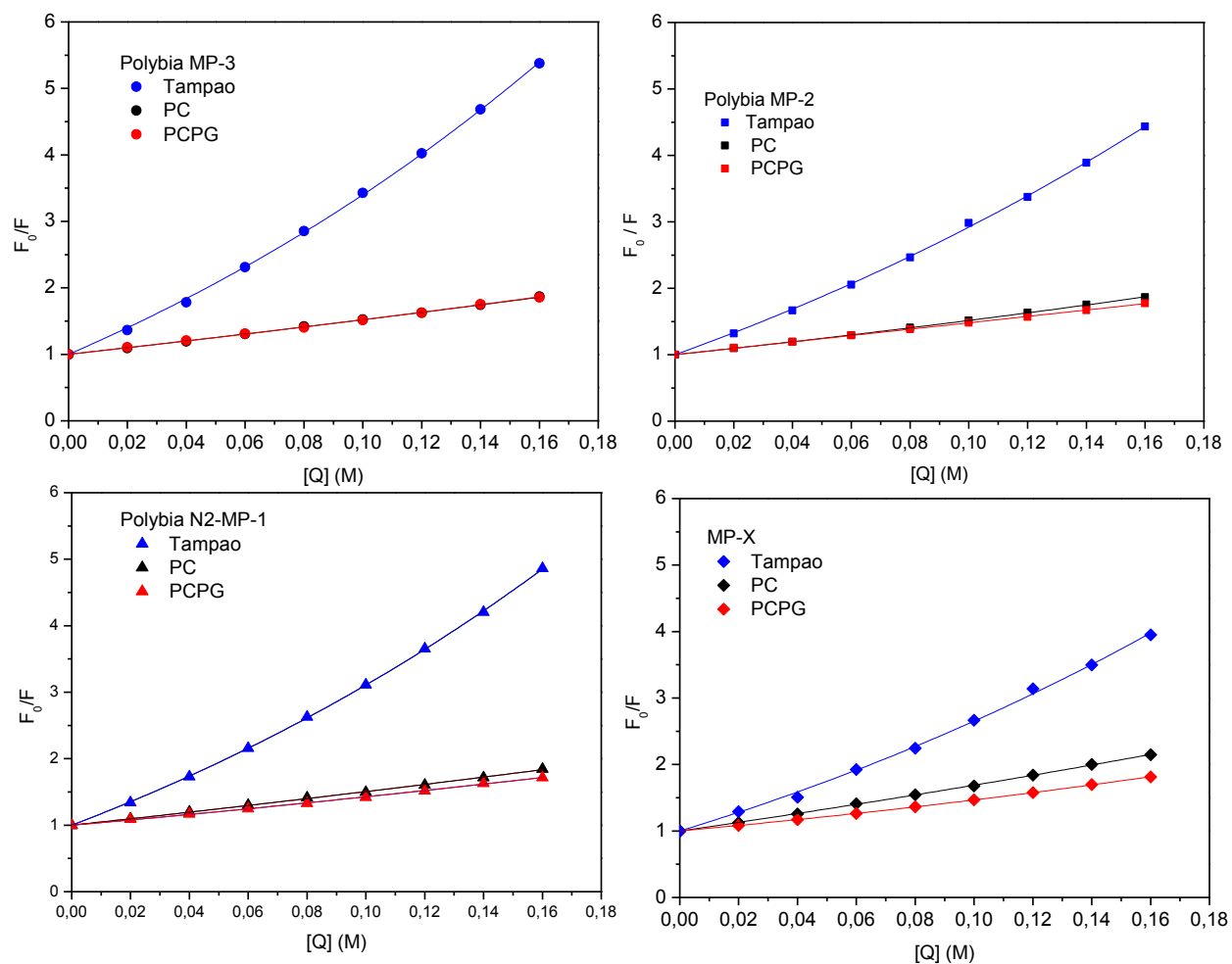


Figura 16: Gráficos de Stern-Volmer dos cinco peptídeos Polybia MP-3, MP-2, N2-MP-1 e MP-X supressão da fluorescência do triptofano por acrilamida em tampão e na presença de LUVs PC e PCPG. Peptídeo a $5 \mu\text{M}$ e lipídeo a $500 \mu\text{M}$ em um volume de $1300 \mu\text{L}$ em tampão 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, $0,15 \text{ NaCl}$, pH 7,5 a 25°C . As linhas contínuas são os melhores ajustes obtidos com a equação de Stern-Volmer para supressão estática (Materiais e Métodos).

3.6 Potencial Zeta

A associação dos peptídeos em vesículas PCPG também foi monitorada através das medidas de potencial zeta. A associação dos peptídeos induziu aumento no potencial zeta da vesícula até ocorrer a sua inversão como mostrado na figura 17. Como era esperada, a concentração de peptídeo necessária para a inversão do potencial da vesícula é menor quanto maior a sua carga elétrica líquida do peptídeo. Entretanto, as razões entre estas concentrações e as cargas não são as mesmas sugerindo que há uma ordem de afinidade que depende não somente da carga do peptídeo. Na ausência de peptídeo o valor do potencial zeta para a vesícula aniônica é $-30,0 \pm 0,3\text{mV}$ e corresponde ao potencial elétrico entre a vesícula e a solução devido à interação das bicamadas com os íons de NaCl.

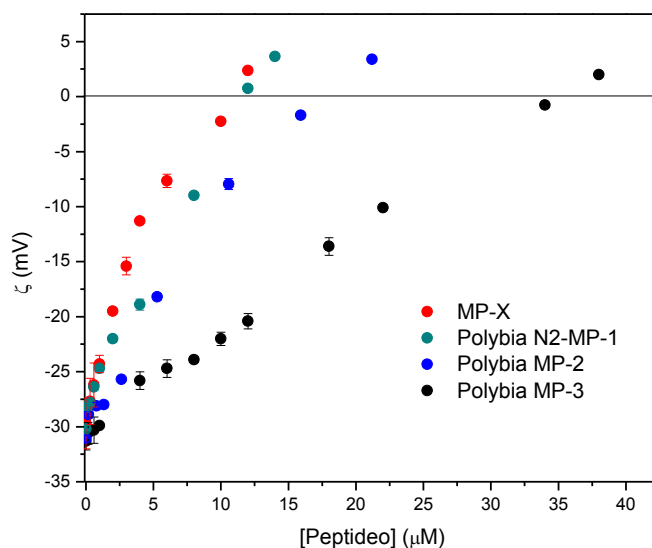


Figura 17: Medidas de potencial zeta em função da concentração dos peptídeos em vesícula PCPG 7030 a $40 \mu\text{M}$. Tampão 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, $0,15 \text{NaCl}$, pH 7,5 a 25°C

Utilizando o modelo de Gouy Chapman, como descrito em Materiais e Métodos e o protocolo proposto por Beschiaschvili e Seelig (1990), foi possível determinar a constante de associação aparente (K_{ap}) e o valor da carga efetiva (z_{ef}) dos peptídeos para a interação com

membrana modelo aniônica. Os resultados estão na tabela 6. O algoritmo utilizado nestes cálculos tem como entrada os valores de potencial zeta obtidos experimentalmente em função da concentração dos peptídeos (C_P) e da concentração de lipídeo (C_L). Os valores de potencial zeta são convertidos em potencial de superfície de acordo com a equação 22 reescrita da seguinte forma

$$\psi_0 = \frac{\zeta}{\exp(-\kappa d_\zeta)} \quad (25)$$

onde κ é o inverso do comprimento de Debye e d_ζ é a posição da camada de cisalhamento na qual o potencial zeta é medido e nos cálculos foi considerado estar a 2Å da superfície da vesícula. Combinando a expressão 24 com a lei de conservação das massas, $C_P = C_F + X_B C_L$ podemos escrever:

$$C_P = C_F + X_B C_L = C_F + K_{ap} C_F C_L \quad (26)$$

O algoritmo procura valores de K_{ap} e z_{ef} , que satisfaçam esta equação. Com estes valores é possível calcular a densidade de carga superficial através das equações 20 e 21. Os valores de K_{ap} e z_{ef} encontrados que igualam, numericamente, as equações 20 e 21 são armazenados. Alternativamente pode-se utilizar os valores de K_{ap} e de X_B calculados através da equação 26 para estimar C_{PM} e usando a equação 23 para obter o potencial zeta utilizando a equação 25. A comparação entre os valores teóricos de potencial zeta e os valores medidos experimentalmente é utilizada para avaliar o processo de busca das incógnitas na determinação de K_{ap} e z_{ef} , já que pode existir mais de um conjunto de soluções.

Na figura 18 são mostrados os gráficos de potencial zeta experimental e o teórico em função da concentração total de peptídeo, para o Polybia N2-MP-1. Os demais parâmetros para este peptídeo são apresentados na tabela 5. A partir desta figura podemos observar um bom acordo entre os valores experimentais e teóricos indicando que a solução obtida por Gouy-Chapman é adequada para o sistema em questão. Esta verificação foi feita para os quatro peptídeos e a mesma concordância foi observada.

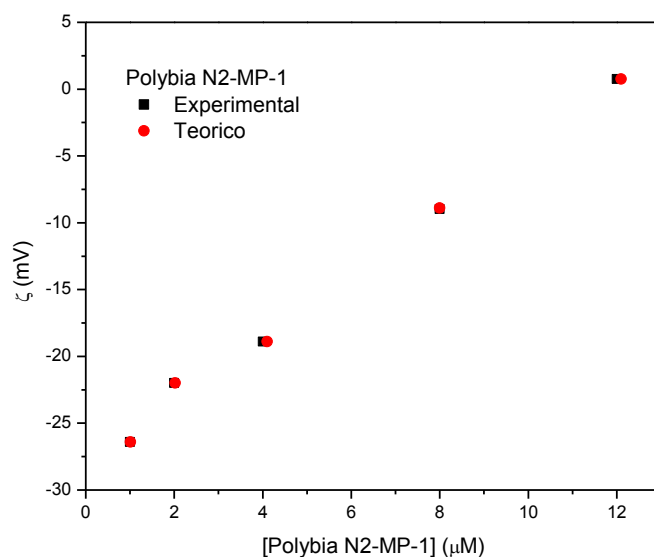


Figura 18: Potencial zeta teórico e experimental em função da concentração de Polybia N2-MP-1 com vesícula PCPG a 25°C e concentração fixa em 40μM.

Tabela 5 - Valores de C_M , X_B , K_{ap} , C_F , potencial zeta, z_{ef} e densidade superficial de carga, σ , para o Polybia N2-MP-1 em vesícula PCPG 7030 obtidos através da solução obtida do modelo de Gouy-Chapman.

C_M (μM)	X_B (10^{-3})	K_{ap} (M^{-1})	C_F (μM)	ζ (mV)	z_{ef}	$ \sigma $ (mC/m ²)
0,90	24,3	27000	0,003	-26,4	2,69	33,7
1,74	46,9	27000	0,121	-22,0	2,41	19,5
3,08	83,1	27000	0,676	-18,9	1,59	8,19
5,27	142,0	27000	2,310	-8,90	1,84	39,5
5,58	150,0	27000	5,970	0,75	1,79	30,2

Os valores das constantes de associação aparente e da carga efetiva para os cinco peptídeos foram obtidos de acordo com este procedimento e são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Constantes de associação aparente da interação peptídeo-lipídeo obtidas a partir do modelo de Gouy Chapmann.

Peptídeo	$K_{ap} (M^{-1})$	z_{ef}
Polybia MP-3	29200±500	0,7±0,12
Polybia MP-2	22900±300	1,6±0,3
Polybia N2-MP-1	27000±400	2,2±0,5
MP-X	29400±200	2,7±0,3

Os valores das constantes de associação aparente são da mesma ordem de grandeza que as constantes de associação encontradas através das titulações fluorimétricas. A carga efetiva é menor que a carga líquida nominal, isto é uma consequência do método de análise utilizado (Arbuzova e Schwarz, 1999) e foi atribuída a descrição simplista do sistema, pelo modelo de Gouy-Chapman, que não considera efeitos importantes como exclusão de volume (Stankowski, 1991).

CAPÍTULO 4

4.1 Discussão

Tabela 7 - Sequência e características Físico-Químicas dos peptídeos estudados. Q, a carga líquida do peptídeo, <H>, hidrofobicidade média por resíduo, obtida de acordo com a escala de Eisenberg et al. (1984) pela soma dos resíduos hidrofóbicos e, Φ , ângulo de face polar.

Polybia MP-3	I D W L K L G K M V M D V L - NH₂			
Polybia MP-2	I N W L K L G K M V I D A L - NH₂			
Polybia N2-MP-1	I N W K K L L D A A K Q I L - NH₂			
MP-X	I N W K G I A A M A K K L L - NH₂			
	Polybia MP-3	Polybia MP-2	Polybia N2-MP-1	MP-X
Q	+1	+2	+3	+4
<H>	0.06	0.08	-0.10	0.01
Φ	60	60	120	100

No presente trabalho, foram utilizados quatro peptídeos da família dos mastoparanos com carga elétrica líquida variando de +1 a +4 cujas seqüências e características físico-químicas e estruturais são apresentadas na tabela 7. O mecanismo de ação de três destes peptídeos não é completamente conhecido, entretanto para o peptídeo MP-X dois mecanismos de ação diferentes foram propostos: poro toroidal, (Matsuzaki et al., 1996) e mecanismo similar ao transportan, que é um peptídeo construído para penetrar membranas celulares (CPP) proposto recentemente por Yandek et al. (2009). Observações do nosso grupo mostraram que existem intervalos de valores de concentração de peptídeo, [P], nos quais diferentes modos de atividade lítica podem ser observados: em concentrações da ordem de micromolar não se observa liberação de marcador fluorescente induzida pelo peptídeo Anoplin, no entanto, nesta mesma concentração observa-se condutividade iônica. Acontece que os poros formados por Anoplin são menores que o diâmetro do marcador (dos Santos Cabrera et al., 2008a). No caso do peptídeo Polybia MP-1, em concentração da ordem de micromolar, observam-se curvas sigmoidais caracterizadas por liberação controlada de marcadores (dos Santos Cabrera et al., 2008b). A atividade lítica intensa, característica de ruptura de membrana (modelo carpete) é observada em concentrações mais altas

da ordem 10^{-5} a 10^{-4} M.

A razão crítica entre as concentrações molares do peptídeo e do lipídeo $[P]/[L]$ foi utilizada para quantificar a atividade destes peptídeos nos dois tipos de vesícula. Este parâmetro mostrou que os peptídeos Polybia MP-3 e MP-2 apresentam valores de razão $[P]/[L]$ crítica baixos independentemente do caráter da vesícula e o que é mais importante, surpreendentemente, em concentração submicromolar na qual outros peptídeos não apresentaram liberação de marcador fluorescente. Além disso, a razão $[P]/[L]$ crítica para o Polybia MP-3 em vesícula aniônica foi praticamente a mesma que em vesícula zwitteriônica, assim como para o MP-2. Os peptídeos mais carregados apresentaram menor razão $[P]/[L]$ em vesícula aniônica que em vesícula zwitteriônica, sugerindo que suas cargas contribuíram de maneira a favorecer a interação peptídeo-lipídeo aniônico. Com o intuito de estimar o tamanho dos poros formados pelos peptídeos, foi feito o cálculo do raio de um poro na razão $[P]/[L]$ crítica para os quatro peptídeos nos dois tipos de vesícula. O raio de um poro, na concentração limite para desencadear o processo cooperativo de liberação de corante, é dado por $R^* = \gamma/\sigma$ onde σ é a tensão de superfície exercida na membrana pelo peptídeo, que é dada por $\sigma = K_a(A_p/A_L)(P/L)$, onde K_a é o módulo de expansão de área ($K_a = 240$ mN/m), A_p a área estimada para um peptídeo ($135 \text{ \AA}^2$), A_L a área estimada para um lipídeo ($68 \text{ \AA}^2$) e X_B a fração de peptídeo ligado à monocamada externa na $[P]/[L]$ crítica e γ é a tensão de linha na borda do poro ($\gamma = 10$ pN) de acordo com Huang e colaboradores (2004). X_B foi calculado de acordo com a equação 24 utilizando a definição de X_B e as constantes aparentes de associação obtidas dos experimentos de titulação fluorimétrica. Os valores de raio obtidos estão mostrados na tabela 9. Estes valores estão correlacionados à atividade lítica em vesículas, indicando que os peptídeos, que apresentam maior atividade lítica, como os Polybia MP-3 e MP-2 teriam poros de maior diâmetro comparado com a dimensão da carboxifluoresceína com 1 nm (dos Santos Cabrera et al., 2008), portanto, quanto maior o poro formado pela interação peptídeo-lipídeo, maior é a porcentagem de corante liberado.

Tabela 8- Os valores de R^* calculados pela razão entre a tensão de linha na borda do poro, γ , e a tensão de superfície exercida na membrana pelo peptídeo, σ , $R^* = \gamma/\sigma$ onde $\sigma = K_a(A_P/A_L)X_B$, onde K_a é o módulo de expansão de área ($K_a = 240$ mN/m), A_P a área estimada para um peptídeo ($135 \text{ \AA}^2$), A_L a área estimada para um lipídeo ($68 \text{ \AA}^2$) e X_B a fração de peptídeo ligado à monocamada externa bicamada na [P]/[L] crítica, eq. 23, e $\gamma = 10$ pN de acordo com Huang e colaboradores (2004).

	Polybia MP-3		Polybia MP-2		Polybia N2-MP-1		MP-X	
	PC	PCPG	PC	PCPG	PC	PCPG	PC	PCPG
$X_B (10^{-3})$	3,81	3,83	4,72	5,73	7,36	5,64	15,6	6,50
σ (mN/m)	1,81	1,83	2,25	2,73	3,50	2,69	7,4	3,1
$R^*(nm)$	5,52	5,46	4,44	3,66	2,86	3,72	1,35	3,23

Entretanto, de acordo com Wimley (2010) um único poro aquoso de 1nm de diâmetro esvaziaria completamente uma vesícula em décimos de segundos e o que geralmente observamos é um extravasamento incompleto em dezenas de minutos. Essa análise sugere que na [P]/[L] crítica ocorre uma destruição total da integridade da bicamada de algumas vesículas, enquanto outras ainda permanecem pouco afetadas. Esse ponto de vista foi recentemente demonstrado em experimentos com o peptídeo Gomesina em vesículas gigantes (Domingues et al., 2010) e é consistente com o comportamento denominado “tudo-ou-nada” ou até mesmo com o modelo carpete também observado em experimentos com LUVs. A rapidez e a forma como a bicamada se recuperará (ou não) do desequilíbrio de carga, área e tensão superficial gerados pela adsorção de moléculas de peptídeos que dirigem as falhas da estrutura da bicamada determinarão a forma como o extravasamento se dará, gradual ou “tudo-ou-nada”. Uma parte das vesículas recobra o equilíbrio pela destruição total e outra pela translocação de peptídeos e lipídeos simultaneamente, sem causar extravasamento (Wimley, 2010). Assim, os valores de R^* calculados na [P]/[L] crítica, e mostrados na tabela 8, podem estar refletindo esse tipo de comportamento e não o tamanho de cada poro individualmente.

Ensaios de dicroísmo circular possibilitaram avaliar a extensão da mudança conformacional dos peptídeos em diferentes ambientes como: tampão, vesículas zwitteriônica e aniônica. Utilizando uma razão [P]/[L] baixa, de aproximadamente $[20 \text{ \mu M}] / [500 \text{ \mu M}] = 0,04$, observou-se saturação nos espectros de dicroísmo circular. Nesta condição, foi visto que o conteúdo de hélice em vesícula aniônica é significativamente maior que em zwitteriônica (tabela 3) sugerindo que a interação eletrostática é um dos fatores moduladores da mudança

conformacional. No entanto, com exceção do peptídeo MP-X ($Q = +4$) os peptídeos apresentam um ou dois resíduos ácidos, que em determinadas posições na sequência podem contribuir com o aumento da estabilidade da estrutura em hélice como proposto por Marqusee e Baldwin (1989). Através de uma série de experimentos, eles observaram que a conformação helicoidal é estabilizada por pontes de hidrogênio e/ou salinas entre uma cadeia lateral de caráter ácido na posição i e cadeias laterais de caráter básico como o $i \pm 3$ ou $i \pm 4$ vizinho. Desta forma, a presença de resíduos ácidos nas posições 2 e 8, inter-espaçados por lisinas nas posições 4 e/ou 5, como os Polybia MP-3 e MP-2, favoreceriam a formação de pontes de hidrogênio ou salina entre estas cadeias laterais estabilizando a conformação helicoidal. O mesmo acontece com o peptídeo Polybia N2- MP-1, que possui um resíduo ácido na posição 8 e lisinas como seus terceiros e quartos vizinhos mais próximos. Além da posição relativa de resíduos ácidos e básicos, a hidrofobicidade média do peptídeo e o tamanho de sua face polar (tabela 7) são fatores que também podem contribuir para a estabilização de estruturas helicoidais. Em vesícula zwitteriônica, o peptídeo Polybia MP-2 possui pouco maior teor de hélice α que o MP-3, aparentemente contrariando a observação de Marqusee e Baldwin. Entretanto, a hidrofobicidade média deve ser levada em conta, assim como a propensão intrínseca dos resíduos em formar estrutura helicoidal. Desta forma a maior fração de hélice observada para Polybia MP-2 em vesícula eletricamente neutra deve ter origem na hidrofobicidade média do peptídeo ($\langle H \rangle = 0,08$). Em vesícula aniônica, entretanto, o peptídeo menos carregado e que possui o resíduo ácido extra, na presença de $100 \mu\text{M}$ de lipídio apresenta um conteúdo helicoidal praticamente idêntico ao valor máximo, indicando que o efeito estabilizador da possível ponte de hidrogênio ou salina é mais evidente em vesícula aniônica. Polybia N2-MP-1 com carga líquida $+3$, apresenta a maior fração de hélice em vesícula aniônica, que pode ser devido à carga líquida e à posição do resíduo ácido em sua sequência que possui duas lisinas nas posições $i - 4$ e $i + 4$. O peptídeo mais carregado dentre os estudados, o MP-X, possui três resíduos básicos e apresenta a menor quantidade de hélice em vesícula eletricamente neutra, isto pode ser atribuído a sua carga elétrica líquida e a ausência de resíduos ácidos, que promove a repulsão eletrostática e conseqüentemente o baixo teor helicoidal em vesícula zwitteriônica enquanto favorece a formação de hélice em vesícula aniônica.

Tabela 9 – Resultados obtidos por espectroscopia de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência. Razão [P]/[L] crítica, fração de estrutura helicoidal em concentração de saturação, f_{∞} , deslocamento espectral dos peptídeos nas razões [P]/[L] críticas obtidos das titulações fluorimétricas, $\Delta\lambda$, constante aparente de associação obtida das titulações fluorimétricas, K_{ap} , razão entre as intensidades de fluorescência obtida das titulações fluorimétricas, I/I_0 e as constantes de Stern-Volmer normalizadas, K_{SVL}/K_{SVT} .

	Polybia MP-3		Polybia MP-2		Polybia N2-MP-1		MP-X	
	PC	PCPG	PC	PCPG	PC	PCPG	PC	PCPG
[P]/[L] crítica	0.006	0.0055	0.0085	0.0084	0.0137	0.0079	0.03	0.009
f_{∞}	0,44	0,54	0,48	0,51	0,30	0,59	0,14	0,52
$\Delta\lambda$	21	21	20	24	20	20	15	21
K_{ap}	17500	23000	12500	16000	11600	25000	1080 0	26000
I/I_0	2,35	1,94	2,00	2,03	1,77	1,61	1,30	1,77
K_{SVL}/K_{SVT}	0,26	0,25	0,32	0,27	0,29	0,21	0,49	0,22

A ligação do peptídeo à bicamada foi monitorada por meio da variação da intensidade de emissão de fluorescência e do deslocamento espectral do triptofano nos dois tipos de vesículas. O deslocamento espectral aumenta com a concentração de lipídeo e atinge um patamar em concentração alta de lipídeo. Os valores do deslocamento espectral nas concentrações de lipídeo que correspondem aos valores de razão [P]/[L] crítica, onde a atividade lítica tem início são mostrados na tabela 9; esses valores são praticamente iguais aos valores obtidos ao final da titulação. Em vesícula zwitteriônica o deslocamento espectral aumentou de maneira mais acentuada para os peptídeos Polybia MP-3 e MP-2 do que para os demais, enquanto que em vesícula aniônica o aumento em $\Delta\lambda$ foi semelhante para todos os peptídeos com exceção do MP-X. Para as concentrações altas de lipídeo que correspondem aos valores das razões [P]/[L] críticas, mostradas na tabela 9, pode-se observar o mesmo deslocamento espectral para todos os peptídeos em vesícula zwitteriônica, com exceção do MP-X que apresentou deslocamento menor. O mesmo pode ser observado para vesículas aniônicas com exceção de Polybia MP-2 para o qual o deslocamento espectral foi maior. Numa tentativa de compreender as diferenças observadas neste parâmetro, foram realizados alguns experimentos nos quais o desnaturante hidrocloreto de guanidina (HG), a 6M, foi adicionado à solução de peptídeo livre e na presença

de bicamada em diferentes razões $[P]/[L]$. Este agente caotrópico promove a desnaturação do peptídeo, competindo pelas ligações de hidrogênio. Foi observado que para uma razão $[P]/[L] \sim 0,1$ os deslocamentos para Polybia MP-3 e MP-2 que eram $\Delta\lambda \sim 19$ e 18 respectivamente, passaram a ser $\Delta\lambda \sim 2$ após a adição de guanidina; enquanto em razões da ordem da razão crítica encontrada nos experimentos de atividade lítica ($[P]/[L] \sim 0,005$) o deslocamento para estes peptídeos que era de $\Delta\lambda \sim 22$ manteve-se em $\Delta\lambda \sim 15$ após a adição de guanidina. Estes resultados mostram que em menores razões P/L os peptídeos formam ligações de hidrogênio mais estáveis e em maior quantidade com os grupos cabeça dos fosfolipídeos e, com isso, menos susceptíveis à competição com o agente HG, do que são possíveis em altas razões P/L; além disso, na formação dessas ligações de hidrogênio moléculas de água são excluídas tornando o ambiente do resíduo W menos polar. É importante esclarecer que o desnaturante não induziu mudança nas posições dos picos de emissão dos peptídeos em tampão indicando que os peptídeos não apresentam agregação ou interação intercadeia.

As constantes de Stern-Volmer normalizadas indicam a fração da acessibilidade do resíduo W ao supressor em uma razão $[P]/[L] = 0,01$. Os valores de K_{SVL}/K_{SVT} para os peptídeos, em vesícula zwitteriônica e em vesícula aniônica, variam entre 0,21 e 0,49 sugerindo que os peptídeos são protegidos pela bicamada lipídica, mas não completamente.

Outro aspecto importante nas interações peptídeo-lipídeo é a possibilidade de ocorrerem interações com as caudas de hidrocarbonetos dos fosfolipídeos. Zhao et al. (2001 e 2002) determinaram com auxílio de fosfolipídeos brominados nas caudas ou da sonda DPH que peptídeos como Temporin L, Indolicidin e Magainina interagem com a região das caudas. Temporin L e Indolicidin são peptídeos com 13 resíduos na cadeia, de hidrofobicidade semelhante à Polybia MP-2, mas com 3 cargas positivas, enquanto Magainina tem 23 resíduos na cadeia, caráter hidrofílico e carga líquida +3. Encontraram que Temporin L está há cerca de 0,8 nm do centro da bicamada (ou seja a 0,7 nm da região das cabeças) e que Indolicidin e Magainina em altas razões P/L (0,02 a 0,20) afetam a anisotropia da sonda DPH que se localiza no centro hidrofóbico da bicamada. No caso dos peptídeos deste estudo não se observaram quaisquer efeitos na anisotropia da sonda DPH (dados mostrados em outro trabalho do grupo). Esse fato aliado aos resultados obtidos nos experimentos de anisotropia do W e de supressão de fluorescência de W por acrilamida sugerem que Polybia MP-3, Polybia MP-2, Polybia N2- MP-1 e MP-X interagem com a região das cabeças dos fosfolipídeos e/ou com a interface entre essa

região e a das cadeias de hidrocarbonetos seu mecanismo de ação estaria mais próximo daquele descrito pelo modelo da atividade interfacial (Wimley, 2010).

As constantes de associação aparente, obtidas dos experimentos de titulação fluorimétrica mostrados na tabela 9, indicam que em vesícula zwitteriônica a afinidade do peptídeo diminui com o aumento da carga líquida. Além da carga, a hidrofobicidade parece ter um papel importante na afinidade, os peptídeos com maior hidrofobicidade média apresentam maiores valores de K_a . Isto sugere que a ligação peptídeo-lípido zwitteriônico não é dirigida por interações eletrostáticas, mas sim pela interação hidrofóbica. Em vesícula aniônica os peptídeos mais carregados e mais hidrofílicos possuem maiores constantes de associação que os demais. Surpreendentemente, o peptídeo menos carregado Polybia MP-3 apresentou afinidade por vesícula aniônica comparável àquelas observadas para os peptídeos mais carregados, enquanto que para MP-2 foi aproximadamente 30% menor que o MP-3. Este resultado é compatível com a expressiva atividade antimicrobiana destes dois peptídeos em microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos (Souza, et al., 2009). Os valores das constantes de associação em vesícula aniônica são maiores que as constantes encontradas para vesículas eletricamente neutras, evidenciando a preferência dos peptídeos por bicamadas aniônicas independentemente das características intrínsecas dos peptídeos.

O acúmulo pela adsorção de peptídeos na superfície da membrana modelo pôde ser avaliado em medidas de potencial zeta. O caráter catiônico dos peptídeos não poderia resultar em outra situação já que a superfície membranar é eletricamente neutra ou aniônica. As constantes de associação foram encontradas pela análise dos dados experimentais utilizando modelo de Gouy-Chapman em vesículas aniônicas. Estas constantes são da mesma ordem de grandeza que as encontradas pela titulação fluorimétrica, mas de maneira intrigante a afinidade do peptídeo menos carregado, Polybia MP-3, em vesícula aniônica é uma das maiores e é comparável àquelas observadas para os peptídeos, que possuem maior carga líquida. Além da constante aparente de adsorção, a utilização desta técnica permite avaliar a contribuição da energia livre eletrostática na interação peptídeo-lípido aniônico, e esta contribuição foi utilizada para estimar a energia livre hidrofóbica nesta interação.

A energia livre de adsorção ΔG_{ads} calculada com a constante de partição aparente (K_{ap}) peptídeo-bicamada aniônica é:

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

onde RT é a energia térmica e o fator 55,5 é a concentração molar da água que corrige para contribuições do solvente.

A contribuição eletrostática na adsorção dos peptídeos na bicamada pode ser calculada reescrevendo a equação 23:

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

onde C_M e C_F são obtidos da análise dos dados experimentais de potencial zeta usando o modelo de Gouy-Chapman. As energias livres eletrostáticas mostradas na tabela 10 variam de $-0,3$ a $-1,9$ kcal/mol e refletem a contribuição eletrostática para a interação de adsorção podendo ser adicionada à energia livre de adsorção para calcular a contribuição não eletrostática.

A adsorção destes peptídeos em vesículas lipídicas é seguida da estruturação do peptídeo e da sua inserção na bicamada, como indica os resultados de dicroísmo circular, deslocamento espectral e a proteção da supressão. A energia livre para a formação de estrutura helicoidal pode ser estimada da fração de hélice (f_α) medida dos experimentos de CD.

$$\Delta G_{H^\infty} = n f_{H^\infty} G_{fr} \quad (29)$$

onde n é o número de resíduos, G_{fr} é a energia livre de enovelamento por resíduo, que foi estimada por Ladokhin e White (1999) e White e Wimley (1999) ser $-0,4$ kcal/mol por resíduo. Este valor foi estimado das energias de transferência de hélices transmembranares e proteínas de membrana. Utilizando as frações de hélice α , f_α , na condição de saturação na equação 29, encontra-se que a estruturação do peptídeo reduz a energia livre de $-2,8$ Kcal/mol para o Polybia MP-2 e de $-3,0$ kcal/mol para o MP-X.

A contribuição da energia livre hidrofóbica foi calculada como abaixo:

$$\Delta G_{HYD} = \Delta G_{ads} - \Delta G_{el} - \Delta G_{fold} \quad (30)$$

A energia livre hidrofóbica está relacionada às contribuições energéticas remanescentes do processo estruturação-partição, e tem como origem às interações fracas estabelecidas no contato peptídeo-lipídeo, a imobilização do peptídeo e o distúrbio na bicamada causado pelo peptídeo. É válido notar que a interação peptídeo-lipídeo é dirigida pela contribuição hidrofóbica

e que a comparação entre as energias livres de adsorção mostra que elas dependem não somente da hidrofobicidade, mas também da carga elétrica líquida do peptídeo. A tabela 10 mostra os valores destas componentes energéticas para os quatro peptídeos em bicamada aniônica. Nesta tabela pode-se observar que o peptídeo menos carregado Polybia MP-3 ($Q = +1$) e o mais carregado MP-X ($Q = +4$) com hidrofobicidades 0,06 e 0,01 respectivamente, apresentam os maiores valores de energia livre de adsorção sugerindo que a menor carga líquida do Polybia MP-3 foi compensada pela elevada hidrofobicidade na interação com vesícula aniônica, assim como para o peptídeo Polybia MP-2 com hidrofobicidades 0,08 e $Q=+2$. Entretanto, os valores das energias livres hidrofóbicas calculados desta maneira não parecem estar correlacionados com a hidrofobicidade média dos peptídeos, como seria esperado. A ordem observada na energia hidrofóbica, diminuindo com o aumento da carga líquida está refletindo a ordem observada para a componente eletrostática, sugerindo que o processo de interação peptídeo-lípido seja mais complexo do que o hipotizado ao calcular as componentes energéticas. Entretanto, os valores de energia hidrofóbica são da mesma ordem de grandeza das energias calculadas para transferir os peptídeos da água para octanol usando o programa Mpex (Jayasinghe et al., 2009). A diferença entre as energias hidrofóbicas do Polybia MP-3 e MP-2 de $\sim 1,0$ kcal/mol pode ser devida à formação de ponte de hidrogênio entre as cadeias laterais de ácido aspártico e lisina.

Tabela 10 – Energia livre para a interação peptídeo-lípido através da constante aparente de associação obtida das medidas de potencial zeta.

	ΔG_{ads} (Kcal/mol)	ΔG_{el} (Kcal/mol)	ΔG_{fold} (Kcal/mol)	ΔG_{HYD} (Kcal/mol)
Polybia MP-3	-8,5	-0,3	-3,1	-5,1
Polybia MP-2	-8,3	-1,3	-2,8	-4,2
Polybia N2-MP-1	-8,4	-1,6	-3,3	-3,5
MP-X	-8,5	-1,9	-3,0	-3,6

CAPÍTULO 5

5.1 Considerações Finais

Neste trabalho, foram estudadas as interações de quatro peptídeos com vesículas aniônica e zwitteriônica. Os peptídeos que apresentam menor carga elétrica líquida são aqueles que possuem maior hidrofobicidade média, enquanto os peptídeos que possuem maior carga são hidrofílicos.

Através dos experimentos de extravasamento, observou-se que os peptídeos com menor carga elétrica possuem as maiores atividades líticas tanto em vesícula zwitteriônica quanto em vesícula aniônica. Além disto, os resultados para estes peptídeos foram praticamente os mesmos para os dois tipos de vesícula. Isto sugere que a interação eletrostática não foi a principal moduladora desta interação.

Os ensaios de dicroísmo circular possibilitaram avaliar o grau de estruturação dos peptídeos quando estes interagem com bicamadas lipídica. Em vesícula zwitteriônica, os peptídeos menos carregados e mais hidrofóbicos apresentaram maior teor helicoidal que os demais. Isto sugere que esta interação peptídeo-lipídeo zwitteriônico não é modulada especialmente pela interação eletrostática, mas também pela interação hidrofóbica. Em vesícula aniônica, observou-se que todos peptídeos apresentaram maior teor helicoidal que em vesícula eletricamente neutra, sugerindo que a interação eletrostática influenciou de maneira significativa na estruturação destes peptídeos em baixa razão $[P]/[L]$. Os experimentos de titulação fluorimétrica forneceram resultados como o deslocamento espectral e as constantes aparentes de associação, que possibilitam avaliar a afinidade dos peptídeos pelas bicamadas lipídicas. A partir destes dados foi possível notar que os peptídeos menos carregados possuem elevada afinidade por vesícula zwitteriônica e aniônica. Enquanto os peptídeos mais carregados possuem menor afinidade por vesícula zwitteriônica e afinidade elevada por vesícula aniônica assim como foi visto pelos dados de dicroísmo circular e atividade lítica.

A variação do potencial da superfície das membranas modelo pela interação com os peptídeos foi monitorada pelas medidas de potencial zeta. Estas medidas mostraram que a concentração de peptídeo necessária para a inversão do potencial da vesícula é menor quanto maior a sua carga elétrica líquida. Entretanto, as razões entre estas concentrações e as cargas não

são as mesmas sugerindo que há uma ordem de afinidade que depende não somente da carga do peptídeo. Para isto foi feita a análise destes dados utilizando o modelo de Gouy-Chapmann com a finalidade de encontrar as constantes de associação aparente. Estas constantes são da mesma ordem de grandeza que aquelas encontradas por titulação fluorimétrica e mostram que os peptídeos com menor carga possuem elevada afinidade por vesícula aniônica, assim como os experimentos anteriores. Neste contexto, foi feito o cálculo das energias livres que contribuem para a interação peptídeo-lipídeo. Os valores de energia livre eletrostática aumentaram com a carga elétrica, enquanto os valores de energia livre hidrofóbica aumentaram com a hidrofobicidade média dos peptídeos. No entanto, as contribuições da interação eletrostática são menores que as encontradas para a interação hidrofóbica, independentemente da carga dos peptídeos. Através das curvas de potencial zeta e dos valores das contribuições energéticas das interações eletrostática e hidrofóbica foi possível concluir que a interação eletrostática é fundamental para atrair o peptídeo à superfície da bicamada, mas a principal interação, responsável pela sua ligação à bicamada, é a interação hidrofóbica.

Alguns modelos de interação peptídeos-bicamadas mais discutidos na literatura estabelecem a formação de poros. No caso do modelo tábua de barril verificado para o peptídeo Alameticina os peptídeos interagem entre si lateralmente e formam poros semelhantes a aquele das proteínas de canais iônicos. O modelo toroidal, em tese compatível com peptídeos de cadeia curta e com um comportamento cooperativo como observamos neste trabalho, pelo qual a segregação existente na membrana entre suas regiões polares e não polares é rompida, não foi até o presente estabelecido para peptídeos antimicrobianos, segundo Wimley (2010). Por outro lado no modelo de mecanismo carpete ou no detergente a existência da estrutura de um poro não é um requisito. Recentemente outros modelos ou variações dos anteriores foram propostos para como o de Bechinger e Lohner (2006, 2009) baseado nas formas moleculares e em descrições da interação feitas a partir de diagramas de fase, o de Epanand e colaboradores (2010) que considera formação de aglomerados de fosfolipídeos induzidos pela presença dos peptídeos e que o extravasamento ocorreria pela existência de defeitos nas fronteiras entre fases, o de Almeida e Pokorny (2009) baseado em constantes de ligação, inserção e perturbação de bicamadas e o de Wimley (2010) denominado modelo de atividade interfacial.

Analisando os resultados obtidos à luz desse último modelo, observamos as seguintes correlações: os peptídeos mais eficientes na atividade lítica são também os menos seletivos; há

um importante equilíbrio entre resíduos hidrofóbicos e polares carregados; os peptídeos ligam-se às bicamadas, são imperfeitos na segregação de seus resíduos polares e apolares como mostram nas projeções helicoidais (Figura 4) e o fato de que o teor helicoidal mal ultrapassar 50%. Essa “anfipaticidade imperfeita” facilitaria acomodar o peptídeo na bicamada e o extravasamento de solutos polares ocorreria porque eles seriam carregados através da bicamada juntamente com moléculas de peptídeo e lipídeo quando a estrutura perturbada da bicamada fosse formada. E ainda, quando as constantes aparentes de associação são semelhantes, verificamos um comportamento semelhante na atividade lítica. Em outros trabalhos do grupo utilizando microscopia de vesículas gigantes observamos também a segregação de porções lipídicas.

Em suma, foi visto que as características estruturais dos peptídeos como a carga elétrica líquida, a hidrofobicidade média, o tamanho da face polar e a posição dos resíduos ácidos, básicos e hidrofóbicos assim como a constituição lipídica das membranas modelo influenciam de diferentes maneiras na interação peptídeo-lipídeo podendo potencializá-la ou não.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allende, D.; Simon, S.A.; McIntosh, T.J. Melittin-induced bilayer leakage depends on lipid material properties: evidence for toroidal pores, *Biophys. J.*, 88 (2005) 1828-1837.

Applied Photophysics. Chirascan TM Circular Dichroism Spectrometer. Disponível em <<http://www.photophysics.com/chirascan.php>>. Acesso em: 20 agosto 2010.

Arbuzova, A.; Schwarz, G. Pore-forming action of mastoparan peptides on liposomes: a quantitative analysis, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1420 (1999) 139-152.

Bashford, C.L.; et al. The behavior of oxonol dyes in phospholipids dispersions, *Biophys. J.*, 25 (1979) 63-85.

Bechinger, B. and Lohner, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1758 (2006) 1529-1539.

Bechinger, B. Rationalizing the membrane interactions of cationic amphipathic antimicrobial peptides by their molecular shape. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14. (2009) 349-355.

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

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

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

Dathe, M.; Wieprecht, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1462 (1999) 71-87.

Dathe, M.; Nikolenko, H.; Meyer, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge, *FEBS Lett.*, 50 (2001) 146-150.

Dathe, M.; Meyer, J.; Beyermann, M.; Maul, B.; Hoischen, C.; Bienert, M. General aspects of peptide selectivity towards lipid bilayers and cell membranes studied by variation of the structural parameters of amphipathic helical model peptides, *Biochim. Biophys. Acta* 1558 (2) (2002) 171-186.

Deber, C.M. and Li, S-C. Peptides in membranes: Helicity and hydrophobicity, *Biopolymers* 37 (1995) 295-318.

Domingues, T.M.; Riske, K.A.; Miranda, A. Revealing the lytic mechanism of the antimicrobial peptide Gomesin by observing giant unilamellar vesicles, *Langmuir* 26(13) 2010 11077-11084.

Dos Santos Cabrera, M.P. Estudos da conformação e atividade lítica de peptídeos antimicrobianos de vespas, *Tese de Doutorado, PG Biofísica Molecular - UNESP: S. José do Rio Preto* (2006).

Dos Santos Cabrera, M.P.; Arcisio-Miranda, M.; Broggio Costa, S.T.; Konno, K.; Ruggiero, J.R.; Procopio, J.; Ruggiero Neto J. Study of the mechanism of action of anoplin, a helical antimicrobial decapeptide with íon channel-like activity, the role of the amidated C- terminus, *J. Pept. Sci.*, 14 (2008) 661–669.

Dos Santos Cabrera, M.P.; Costa, S.T.B.; de Souza, B.M.; Palma, M.S.; Ruggiero, J.R.; Ruggiero Neto, J. Selectivity in the mechanism of action of antimicrobial mastoparan peptide Polybia-MP1, *Eur Biophys J.*, 37 (2008b) 879-891.

Eftink, M.R. and Ghiron C.A. Fluorescence quenching of indole and model micelle systems, *Phys. Chem. J.*, 80 (5) (1976) 486-493.

Eisenberg, D.; Schwarz, E.; Komaromy, M.; Wall, R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot, *J. Mol. Biol.*, 179 (1984). 125-142.

Epand, R. F.; Schmitt, M. A.; Gellman, S. H.; Epand, R. M. Role of membrane lipids in the mechanism of bacterial species selective toxicity by two alpha/beta-antimicrobial peptides, *Biochim Biophys Acta*, 1758 (2006) 1343-1350.

Epand, R. F.; Maloy, W. L.; Ramamoorthy, A.; Epand, R. M. Probing the "charge cluster mechanism" in amphipathic helical cationic antimicrobial peptides. *Biochemistry*, 49 (2010) 4076-4084.

Grahame, D.C. The electrical double layer theory of electrocapillarity, *Chem. Rev.*, 41 (1947) 441–501.

Haugland, R.P. The handbook of fluorescent probes and research chemicals. 6. ed. Spencer. Eugene, USA (1996).

Heller, W.T.; Waring, A.J.; Lehrer, R.I.; Harroun, T.A.; Weiss, T.M.; Yang, L.; Huang, H.W. Membrane thinning effect of the β -sheet antimicrobial protegrin, *Biochemistry*, 39 (2000) 139-145.

Huang, H.W.; Chen, F.Y.; Lee, M.T. Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes, *Phys. Rev. Lett.*, 92 (2004) 198-304.

Jayasinghe, S.; et al. Membrane Protein explorer, Disponível em <http://blanco.biomol.uci.edu/mpex/>. Acesso em: 15 agosto 2010.

Karatekin, E.; Sandre, O.; Guitouni, H.; Borgui, N.; Puech, P.H.; Brochard-Wyart, F. Cascades of Transient Pores in Giant Vesicles: Line Tension and Transport, *Biophys. J.*, 84 (2003) 1734–1749.

Klocek, G.; Schulthess, T.; Shai, Y.; Seelig, J. Binding to lipid bilayers aggregation and pore formation, *Biochem.*, 48 (2009) 2586-2596.

Ladokhin, A.S. and White S.H. Folding of amphipathic α -helices on membranes: energetics of helix formation by melittin, *J. Mol. Biol.*, 285 (1999) 235-245.

Ladokhin, A.S.; Jayasinghe, S.; White, S.H. How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Anal Biochem.*, 285 (2000) 235-245.

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

Lee, M.T.; Hung, W.C.; Chen, F.Y.; Huang H.W. Many-body effect of antimicrobial peptides: on the correlation between lipid's spontaneous curvature and pore formation., *Biophys. J.*, 89 (2005) 4006-4016.

Leontiadou, H.; Mark, A. E.; Marrink, S. J. Antimicrobial peptides in action, *J. AM. CHEM.* 128 (2006) 12156-12161.

Loockwood, N.A.; Mayo, K. H. The future for antiniotics: Bacterial-Membrane desintegrators, *Drugs Future* 28 (2003) 911-23.

Marqusee, S.; Baldwin, R.L. Helix stabilization by Glu-... Lys⁺ salt bridges in short peptides of de novo design, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 84 (1989) 8898-8902.

Matsuzaki, K.; Yoneyama, S.; Murase, O.; Miyajima, K. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation, *Biochemistry*, 35(1996) 8450-8456.

Matsuzaki, K.; Yoneyama, S.; Miyajima, K. Pore formation and translocation of Melittin, *Biophys. J.*, 73(1997) 831-838.

Matsuzaki, K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides, *Biochim. Biophys. Acta*, 1376 (1998) 391-400.

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

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

Mátyus, E.; Kandt, C.; Tieleman, P. Computer Simulation of Antimicrobial Peptides, *Current Medicinal Chemistry*, 14 (2007) 2789-2798.

Mishra, V.K.; Palgunashari, M.N.; Segrest, J. Anantharamaiah G.M., Interactions of synthetic peptides analogs of class A amphipathic helix with lipids, *J. Biol. Chem* 269 (1994) 7185-7191.

Nakajima, T.; Uzu, S.; Wakamatsu, K.; Saito, K.; Miyazawa, T.; Yasuhara, T.; Tsukamoto, Y.; Fujino, M. Amphiphilic peptides in wasp venom, *Biopolymers*, 25 (1986) S115-S121.

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

Pantos, A.; Tsogas, I.; Paleos, C.M. Guanidinium group: A versatile moiety inducing transport and multicompartimentalization in complementary membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 811-823.

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

Puech, P.H.; Borghi, N.; Karatekin, E.; Brochard-Wyart, F. Line thermodynamics: adsorption at a membrane edge, *Phys. Rev. Lett.*, 90 (2003) 128304.

Sato, H. and Feix J.B. Peptide-membrane interactions and mechanism of membrane destruction by amphipathic-helical antimicrobial peptides, *Biochim. Biophys. Acta*, 1758 (2006) 1245-1256.

Scatchard, G. The effect of ligand heterogeneity on the Scatchard Plot. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51 (1949) 660-672.

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

Souza, B.M.; Mendes, M.A.; Santos, L.D.; Marques, M.R.; César, L.M.; Almeida, R.N.; Pagnocca, F.C.; Konno, K.; Palma, M.S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*, *Peptides*, 26(11) (2005) 2157-2164.

Souza, B.M.; Silva, A.R.; Santos, L.D.; Resende, V.M.F.; Arcuri, H.A.; dos Santos Cabrera, M.P.; Ruggiero Neto, J.; Palma, M.S. Characterization of two novel polyfunctional mastoparan peptides from the venom of social wasp *Polybia paulista*, *Peptides*, 30 (2009) 1387-1395.

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

Tossi, A.; Sandri, L.; Giangaspero, A. Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides, *Biopolymers*, 55 (2000) 4-30.

Verwey, E.J.W. and Overbeek, J.T.H. Theory of the stability of lyophobic colloids, *Dover Publications, INC. Mineola, New York* (1948).

White, S.H. and Wimley, W.C. Membrane protein folding and stability: Physical principles, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 28 (1999) 310-365.

Wimley, W.C. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model, *ACS Chem. Biol.*, (2010).

Yandek, L.E.; Pokorny, A.; Floren, A.; Knoelke, K.; Langel, U.; Almeida, P.F. Mechanism of the cell-penetrating peptide tp 10 permeation of lipid bilayers, *Biophys. J.*, 92 (2007) 2434-2444.

Yandek, L.E.; Pokorny, A.; Almeida, P.F. Wasp mastoparan follow the same mechanism as the cell-penetrating peptide transportan 10, *Biochemistry* 48 (2009) 7342-7351.

Yang, L.; Thad, A. H.; Thomas, M. W.; Lai, D.; Huang, H. Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores, *Biophys J.*, 81 (2001) 1475-1485.

Yeaman, M. R.; Yount, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol*, 55 (2003) 27-55.

Zhao, H. X.; Mattila, J.P.; Holopainen, J.M.; Kinnunen, P.K.J. Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin, *Biophysical Journal*, 81(5) (2001) 2979–2991.

Zhao, H. X.; Rinaldi, A. C.; Di Giulio, A.; Simmaco, M.; Kinnunen, P. K. J. Interactions of the antimicrobial peptides temporins with model membranes. Comparison of temporin B and temporin L. *Biochemistry* **41** (2002) 4425-4436.

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, 415 (2002) 389-95.

PUBLICAÇÃO ORIGINAL

Leite, N.B.; Costa, L.C.; Alvares, D.S.; dos Santos Cabrera, M.P.; Souza, B.M.; Palma, M.S.; Ruggiero Neto, J, The effect of acidic residues and amphipathicity on the lytic activities of mastoparan peptides studied by fluorescence and CD spectroscopy, *Amino Acids* DOI 10.1007/s00726-010-0511-9.