

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal

Estratégias para prospecção e predição de peptídeos bioativos

Guilherme Dotto Brand

Orientador: Carlos Bloch Jr

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade de Brasília como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Biológicas, área de concentração:
Biologia Animal.

Brasília-DF, 2007

**Dedico essa tese ao meu pai, céu,
e à minha mãe, terra.**

Agradecimentos

Agradeço imensamente à minha família. Meu pai, Zeno, é um sonhador, que logo cedo em sua vida viu um futuro longe de onde nasceu. Minha mãe, Isabel, foi e continua sendo a referência e centro de estabilidade de todos nós. Ambos criaram um ambiente familiar muito saudável, onde sempre encontrei, junto com meus irmãos Eduardo e Tatiana, condições e apoio. Muitas vezes precisei de todos eles, às vezes física e às vezes mentalmente. Saibam que reconheço todo o esforço de vocês, os amo e admiro. Essa tese não seria possível sem vocês.

Ao amigo, antes de professor, doutor, ou qualquer outro título, Carlos Bloch Jr, meu orientador e desorientador pessoal e científico. Ele criou e mantém o laboratório de espectrometria de massa acreditando nas capacidades individuais. Sempre encontrei nele todo o incentivo, integridade e comprometimento não só com o trabalho, mas com a vida. Ele é a minha referência de condução de um grupo de pesquisa. Me sinto honrado ao chamá-lo de amigo.

Aos atuais colegas do laboratório de espectrometria de massa, cujos nomes faço questão de citar: Jorge, Maura, Luciano, Bia, Mariana, Lindomar, Karlinha, Flávio “Baiano”, Saulo “Iety”, “Sifu”, Carol, Renato, Natália, Marcelo “Bemque”, Riba e aos membros honorários Steffan e Tobias. Todos eles são responsáveis por ótimas discussões sobre os mais diversos assuntos e também pelos inesquecíveis “fuás”. Também não posso deixar de citar antigos membros do laboratório que embora estejam trabalhando em outros lugares, ainda estão presentes: Zé Roberto, Vlad, Natasha, Dani, Fernandinha, Darlan, Fred “tá ligado”, “Bilú” e “Jandeco”. O Zé merece um agradecimento mais do que especial por ter sido/ser e um grande companheiro científico e um grande amigo.

À Roberta, porque cada capítulo dessa tese carrega junto várias histórias pessoais, e ela esteve presente em todas elas. Ela sempre me deu apoio, carinho e oportunidades de aprender. Ela estará comigo eternamente.

Às minhas amigas revisoras Mariana e Beatriz, por terem tornado essa tese legível.

Aos meus amigos que nada têm a ver com ciência.

À todos os colaboradores que tornaram esse trabalho possível.

Aos meus amigos da graduação em biologia, que compartilharam comigo uma das melhores épocas da minha vida: “Bilú”, “Jandeco”, “Batatinha”, “Baiano”, “Dudu” e muitos outros cujos nomes não citei por desleixo mas que me ajudaram de forma direta ou indireta.

Ao pessoal do laboratório de biofísica química em Glasgow-UK: aos alunos “Asia”, Kevin, Katrina, Rona, “Rosie”. Agradecimentos especiais ao Prof. Alan Cooper por ter me aceitado em seu laboratório e não ter medido esforços para permitir a realização do meu trabalho. Também agradeço à linda Sra. Margaret Nutley, a quem devo o aprendizado da parte prática de calorimetria e muitas conversas “sobre o tempo” e sorrisos.

Aos meus amigos do departamento de química em Glasgow: Louis, Calver, Marta e os agregados Mike e Johnny. Estas pessoas, junto com o pessoal da escola de artes, Mikael, Pia, Jochen e Sofia foram a minha família no Reino Unido.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Recursos Genéticos e Biotecnologia por permitir o uso das instalações.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq) pelo apoio financeiro durante a parte do meu doutorado executado no Brasil.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de executar parte das pesquisas no exterior por meio de bolsa de doutorado sanduíche.

Índice

Tabela de aminoácidos, constantes e abreviaturas	ix
Lista de figuras e tabelas	xii
Resumo	3
Abstract	5
Prefácio	7
	Página
Capítulo 1. Prospecção de peptídeos relacionados à bradicinina (BRPs) da secreção cutânea de <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i> (Amphibia)	9
1.1. Introdução	10
1.1.1. Sistema cinina-caliceína	10
1.1.2. Receptores de bradicinina	12
1.1.3. Ação de bradicinina mediada por receptores	13
1.1.4. Análogos de bradicinina em venenos	15
1.1.5. Justificativa e objetivos específicos	17
1.2. Material e métodos	19
1.3. Resultados	23
1.3.1. Purificação dos BRPs e análise de estrutura primária	23
1.3.2. Análise de modificações pós-traducionais	28
1.3.3. Detecção de BRPs na pele de <i>P. hypochondrialis</i> e sua distribuição espacial	33
1.3.4. Determinação da atividade biológica de [Val] ¹ , [Hyp] ² , [Thr] ⁶ -bradicinil-QS	34
1.4. Discussão	38
1.5. Referências bibliográficas	42
	Página
Capítulo 2. Novas dermaseptinas de <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i> (Amphibia)	44

2.1. Introdução	45
2.1.1. Peptídeos antimicrobianos em anfíbios	45
2.1.2. Dermaseptinas	46
2.1.3. Justificativa e objetivos específicos	53
2.2. Material e métodos	54
2.3. Resultados	58
2.3.1. Purificação dos peptídeos	58
2.3.2. Seqüenciamento e alinhamento	60
2.3.3. Obtenção de imagens por Espectrometria da Massa (IMS)	62
2.3.4. Isolamento e seqüenciamento dos clones de cDNA que codificam DS hypo 01.	64
2.3.5. Atividade antimicrobiana	66
2.3.6. Atividade anti- <i>Leishmania amazonensis</i>	66
2.3.7. Ensaios de Ressonância Plasmônica de Superfície	68
2.3.8. Efeito de DS hypo 01 em leucócitos e análise de parâmetros hematológicos	69
2.4. Discussão	71
2.5. Referências bibliográficas	75

	Página
Capítulo 3. Categorização funcional de peptídeos membrano-ativos	79
3.1. Introdução	80
3.1.1. Membranas plasmáticas e biomiméticas	80
3.1.2. Interação de peptídeos antimicrobianos com membranas	92
3.1.3. Justificativa e objetivos específicos	107
3.2. Material e métodos	108
3.2.1. Métodos	108
3.2.2. Materiais	112
3.3. Resultados	116
3.3.1. Peptídeos	116
3.3.2. Peptídeos membrano-ativos antimicrobianos	117

3.3.3. Peptídeos membrano-ativos não antimicrobianos	128
3.3.4. Relação entre tamanho das vesículas e extravasamento de carboxifluoresceína	132
3.4. Discussão	133
3.5. Referências bibliográficas	143

	Página
Capítulo 4. Termodinâmica da interação vesícula fosfolipídica/peptídeo	149
4.1. Introdução	150
4.1.1. Termodinâmica da interação fosfolipídeo/peptídeo por ITC	150
4.1.2. Modelo de partição em superfícies	151
4.1.3. Características eletrostáticas de membranas	154
4.1.4. Aplicação do modelo de partição em superfície para o estudo da adsorção de peptídeos membrano-ativos com bicamadas lipídicas	157
4.1.5. Termodinâmica da estruturação em α -hélice	161
4.1.6. Justificativa e objetivos específicos	161
4.2. Material e métodos	163
4.3. Resultados	166
4.3.1. Peptídeos	166
4.3.2. Peptídeos que se ajustaram ao modelo de partição em superfície	167
4.3.3. Peptídeos que não se ajustaram ao modelo de partição em superfície	172
4.3.4. Peptídeos cujo comportamento desvia do previsto pelo modelo de partição em superfície	176
4.3.5. Fenômenos secundários à adsorção fosfolipídeo/peptídeo	178
4.4. Discussão	182
4.5. Referências bibliográficas	190
Conclusão e perspectivas	193

Anexos	195
Anexo 1. Brand <i>et al.</i> 2006	196
Anexo 2. Brand <i>et al.</i> 2006	207
Anexo 3. Trabalhos em co-autoria	217

Tabela de aminoácidos

Aminoácido	Símbolo de uma letra	Símbolo de três letras	Massa monoisotópica
Ácido aspártico	D	Asp	115.026
Ácido glutâmico	E	Glu	129.042
Alanina	A	Ala	71.0371
Arginina	R	Arg	156.101
Asparagina	N	Asp	114.042
Cisteína	C	Cys	103.009
Fenilalanina	F	Phe	147.068
Glicina	G	Gli	57.0214
Glutamina	Q	Gln	128.058
Histidina	H	His	137.058
Isoleucina	I	Iso	113.084
Leucina	L	Leu	113.084
Lisina	K	Lys	128.094
Metionina	M	Met	131.040
Prolina	P	Pro	97.052
Serina	S	Ser	87.032
Tirosina	Y	Tyr	163.063
Treonina	T	Thr	101.047
Triptofano	W	Trp	186.079
Valina	V	Val	99.0684

Constantes

Constante dos gases ideais, $R = 8,31 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ou $1,98 \text{ cal. K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$

Constante de Faraday, $F_0 = 96485,33 \text{ C.mol}^{-1}$

Carga elementar do elétron, $e = -1.6 \times 10^{-19} \text{ C}$

Área dos peptídeos, $A_p = 150 \text{ \AA}^2$

Área da seção transversal dos fosfolipídeos, $A_l = 70 \text{ \AA}^2$

Permissividade do vácuo, $\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} \text{ C}^2.(\text{J.m})^{-1}$

Constante dielétrica da água, $\epsilon_r = 78$

Abreviaturas

BRPs – peptídeos relacionados à bradicinina, do inglês *bradykinin-related peptides*

BK – bradicinina, do inglês *bradykinin*

HMWK – cininogênio de alta massa molecular, do inglês *high molecular weight kininogen*

LMWK – cininogênio de baixa massa molecular, do inglês *low molecular weight kininogen*

GPCRs – receptores acoplados à proteínas-G, do inglês *G protein-coupled receptors*

BPPs – peptídeos potencializadores de bradicinina, do inglês *bradykinin potentiating peptides*

ACE – enzima conversora de angiotensina, do inglês *angiotensin converting enzyme*

PTM – modificação pós-traducional, do inglês *post-translational modification*

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*

TFA – ácido trifluoroacético, do inglês *trifluoroacetic acid*

RPC – cromatografia de fase reversa, do inglês *reverse phase chromatography*

MALDI – dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês *matrix assisted laser desorption/ionization*

MS – espectrometria de massa, do inglês *mass spectrometry*

IMS – geração de imagens por espectrometria de massa, do inglês *imaging mass spectrometry*

TOF – tempo de voo, do inglês *time of flight*

ESI – ionização por eletro-spray, do inglês *electron spray ionization*

CapLC – cromatografia líquida capilar, do inglês *capillary liquid chromatography*

API – ionização à pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure ionization*

CHO – ovários de porquinho da índia, do inglês *chinese hamster ovaries*

AMPs – peptídeos antimicrobianos, do inglês *antimicrobial peptides*

DS – dermaseptina

CD – dicroísmo circular, do inglês *circular dichroism*

MIC – concentração inibitória mínima, do inglês *minimal inhibitory concentration*

LUVs – vesículas grandes unilamelares, do inglês *large unilamellar vesicles*
DMPC – 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina
DMPG – 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-glicerol
DMPE – 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-etanolamina
SPR – ressonância plasmônica de superfície, do inglês *surface plasmon resonance*
SUVs – vesículas unilamelares pequenas, do inglês *small unilamellar vesicles*
DSC – calorimetria diferencial exploratória, do inglês *differential scanning calorimetry*
ITC – calorimetria de titulação isotérmica, do inglês *isothermal titration calorimetry*
 χ – conformação de peptídeos
Q – carga nominal de peptídeos
H – hidrofobicidade de peptídeos
 M_H – momento hidrofóbico de peptídeos
A – anfifilicidade de peptídeos
 θ – ângulo polar de peptídeos
CPPs – peptídeos penetradores de células, do inglês *cell-penetrating peptides*
MLVs – vesículas multi-lamelares, do inglês *multi lamellar vesicles*
CF – 5,6-carboxifluoresceína
POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

Índice de figuras

Capítulo 1.	Página
Figura 1.1. Gene do cininogênio é traduzido em cininogênio de baixa massa molecular (LMWK) e em cininogênio de alta massa molecular (HMWK).	10
Figura 1.2. Estrutura primária da bradicinina e das regiões de clivagem enzimática.	11
Figura 1.3. Fracionamento do extrato total de <i>P. hypochondrialis</i> .	24
Figura 1.4. Seqüenciamento <i>de novo</i> de [Thr] ⁶ -bradicinina e [Hyp] ³ -bradicinina. A. Seqüenciamento de [Thr] ⁶ -bradicinina, [M+H] ⁺ = 1074.58 Da e B. [Hyp] ³ -bradicinina, [M+H] ⁺ = 1076.60 Da.	26
Figura 1.5. Seqüenciamento <i>de novo</i> de [Val] ¹ ,[Thr] ⁶ -Bradicinina e [Val] ¹ ,[Hyp] ² ,[Thr] ⁶ -Bradicinina.	27
Figura 1.6. Seqüenciamento <i>de novo</i> de [Val] ¹ ,[Hyp] ² ,[Thr] ⁶ -bradicinil-QS, [Val] ¹ ,[Thr] ⁶ -bradicinil-QS e [Val] ¹ ,[Hyp] ² ,[Thr] ⁶ -bradicinil-Q.	29
Figura 1.7. Seqüenciamento <i>de novo</i> de [Val] ¹ ,[Hyp] ² ,[Thr] ⁶ -bradicinil-VD e [Val] ¹ ,[Hyp] ² ,[Thr] ⁶ -bradicinil-VD.	30
Figura 1.8. Seqüenciamento <i>de novo</i> de [Thr] ⁶ -filocinina, [Hyp] ³ -filocinina e filocinina, todas sulfatadas.	31
Figura 1.9. Determinação de hidroxiprolinação.	32
Figura 1.10. Determinação de sulfação em [Hyp] ³ -filocinina.	35
Figura 1.11. Análise de imagens por MALDI da pele de <i>P. hypochondrialis</i> .	36
Figura 1.12. Atividade biológica de [Val] ¹ ,[Hyp] ² ,[Thr] ⁶ -bradicinil-QS.	37
Capítulo 2.	Página
Figura 2.1. Estrutura do cDNA de peptídeos da família das dermaseptinas	46
Figura 2.2. Representação em fitas da estrutura do peptídeo DS 01.	49
Figura 2.3. Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato total de <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i> .	58
Figura 2.4. Purificação analítica de dermaseptinas e seus espectros de massa	59
Figura 2.5. Seqüenciamento <i>de novo</i> de dermaseptinas.	61
Figura 2.6. Imagens por MALDI IMS da pele de <i>P. hypochondrialis</i> .	63
Figura 2.7. Seqüência de nucleotídeos do cDNA precursor da dermaseptina DS hypo 01 de <i>P. hypochondrialis</i> .	65

Figura 2.8. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos precursores de membros da família das dermaseptinas.	66
Figura 2.8. Bioensaios anti- <i>L. amazonensis</i> .	67
Figura. 2.9. Mensurações de ressonância plasmônica de superfície (SPR) da interação de DS 01 e DShypo 01 com membranas modelos de DMPC.	69

Capítulo 3	Página
Figura 3.1. Esquema fundamental dos fosfolipídeos, usando como exemplo a molécula de di-miristoil-fosfatidilcolina (DMPC)	80
Figura 3.2. Representação de di-miristoil-fosfatidilglicerol (DMPG)	81
Figura 3.3. Carga residual de cada fosfolipídeo de acordo com o pH.	81
Figura 3.4. Variabilidade de estruturas de membrana	82
Figura 3.5. Diferentes ambientes encontrados em uma bicamada lipídica.	84
Figura 3.6. Transição de fase em membranas. Detalhe da diferença de organização entre o estado de gel (β), mais ordenado, para o estado líquido-cristalino (α), menos ordenado. Também o esquema de transição de fase $P'_\beta \rightarrow L\alpha$ mostrando a temperatura (T_m) e a entalpia de transição (ΔH) característicos para cada fosfolipídeo.	85
Figura 3.7. Gráfico da área do pico da transição $P'_\beta \rightarrow L\alpha$ versus a concentração de detergentes iônicos.	87
Figura 3.8. Arquitetura comparativa de membranas de microorganismos e membranas eritrocitárias humanas.	90
Figura 3.9. Desenho esquemático de membranas de bactérias. A. Gram-negativas e B. Gram-positivas.	91
Figura 3.10 Interdepêndencia entre os fatores físico-químicos para a atividade de peptídeos antimicrobianos.	94
Figura 3.11. Relação entre momento hidrofóbico (M_H) e hidrofobicidade (H) de alguns peptídeos antimicrobianos.	96
Figura 3.12. Modelo do mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos.	101
Figura 3.13. Modelo SMH de ação de peptídeos antimicrobianos.	103
Figura 3.14. Alvos intra-celulares de peptídeos antimicrobianos.	105
Figura 3.15. Desenho básico do calorímetro de titulação isotérmica (ITC).	108
Figura 3.16. Diagrama de funcionamento de um calorímetro diferencial exploratório.	111
Figura 3.17. Interação de DS 01 com LUVs.	119
Figura 3.18. Termogramas de calorimetria de titulação diferencial (DSC)	

mostrando o efeito da incorporação de crescentes quantidades de Nattererina K no comportamento termotrópico de LUVs de DMPC/DMPG (2:1) e DMPC (as relações molares estão no gráfico). Em detalhe a área abaixo do pico de transição $P'_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ em função da incorporação de peptídeo.	121
Figura 3.19. Extensão de extravasamento de CF em função da adição de peptídeos membros do grupo 1.	122
Figura 3.20. Interação de HSP1 com LUVs.	124
Figura 3.21. Espectros de dicroísmo circular (CD) de peptídeos	125
Figura 3.22. Interação de PS-2 com LUVs.	127
Figura 3.23. Interação de penetratina com LUVs.	129
Figura 3.24. Interação de intra 4 com LUVs.	130
Figura 3.25. Interação de intra 2 com LUVs.	131
Figura 3.26. Relação entre o extravasamento de CF e a intensidade do pico de espalhamento de luz em LUVs de DMPC/DMPG (2:1) para peptídeos membros do grupo 1 (DS 01 e nattererina K), grupo 2 (HSP1), grupo 3 (PS-2) e grupo 4 (intra 4).	132
Figura 3.27. Conjuntos formados pelo agrupamento de moléculas com propriedades físico-químicas (MM = massa molecular, HM = momento hidrofóbico, pI = ponto isoelétrico) semelhantes.	135
Figura 3.28. Diagrama de distribuição e categorização funcional dos peptídeos avaliados	139
Capítulo 4.	Página
Figura 4.1. Partição da droga imunossupressora ciclosporina A (Cya) em SUVs de fosfatidilcolina.	152
Figura 4.2. Equilíbrio de partição de nisina Z modificado pela atração eletrostática.	154
Figura 4.3. Características eletrostáticas de membranas.	155
Figura 4.4. Calorimetria de titulação de uma solução de SUVs (POPC/POPG (75:25), $c_L^0 = 15,5$ mM) com uma solução de magainina 2 amida (203 μ M).	158
Figura 4.5. Calorimetria de titulação de uma solução de magainina 2 amida (6,6 μ M) com uma solução de SUVs (POPC/POPG (75:25), $c_L = 27,86$ mM) a 30°C.	159
Figura 4.6. Traços calorimétricos da titulação de intra 2 a 20 μ M em tampão (20mM Fosfato-NaOH, pH 7,4) a 25 °C com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) ($c_L^0 = 15,4$ mM).	168
Figura 4.7. A. Traços calorimétricos da titulação de intra 2 a 20 μ M em tampão (20mM Fosfato-NaOH, pH 7,4) a 25 °C com LUVs de DMPC (12 mM) e de DMPC/DMPG (2:1) (15,4 mM).	170

Figura 4.8. A. Traços calorimétricos da titulação de PS 2 a 20 μ M em tampão (20mM Fosfato-NaOH, pH 7,4) a 25 °C com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) (8 mM).	173
Figura 4.9. Traços calorimétricos da interação entre PS 2 e vesículas fosfolipídicas.	175
Figura 4.10. Traços calorimétricos integrados e estrutura secundária da titulação de A. nattererina K com LUVs de DMPC. C. DS 01 com LUVs de DMPC. Traços calorimétricos integrados da titulação de B. nattererina K com LUVs de DMPC/DMPG (2:1). D. DS 01 com LUVs de DMPC/DMPG (2:1). Em vermelho estão as porcentagens de hélice calculadas pela $[\theta_{222}]$ na titulação em cada caso.	177
Figura 4.11. Espalhamento de luz em função da relação molar entre peptídeos e fosfolipídeos.	179
Figura 4.12. Variação dos traços calorimétricos em função da concentração inicial de peptídeo ($c_{0,pep}$).	181
Figura 4.13. Estado de cargas no modelo de partição em superfície.	186
Figura 4.14. Ilustração das primeiras injeções de vesículas fosfolipídicas em peptídeos com atividade surfactante.	189

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Diversidade de BRPs encontrados na secreção de anfíbios.	16
Tabela 1.2. BRPs na secreção cutânea de <i>P. hypochondrialis</i>	25
Tabela 2.1. Dermaseptinas em bancos de dados de peptídeos até o ano de 2005	47
Tabela 2.2. Alinhamento múltiplo de seqüências de <i>P. hypochondrialis</i> e DSs de <i>P. bicolor</i> .	62
Tabela 2.3. Atividade antimicrobiana da Dshypo 01.	67
Tabela 2.4. Contagem diferencial de células sanguíneas humanas (%). DShypo 01 incubado por 60 min.	70
Tabela 2.5. Análise de parâmetros hematológicos em sangue periférico humano. DShypo 01 incubado por 60 min.	70
Tabela 3.1. Propriedades físico-químicas de peptídeos antimicrobianos divididos de acordo com seus microorganismos alvo.	99
Tabela 3.2. Seqüências peptídicas e algumas de suas características físico-químicas computadas	116
Tabela 4.1. Seqüências peptídicas e algumas de suas características físico-químicas	

computadas.	166
Tabela 4.2. Parâmetros obtidos pelo modelo de partição de superfície para a titulação de intra 2 com LUVs de DMPC/DMPG (2:1).	171
Tabela 4.3. Parâmetros termodinâmicos da interação de peptídeos com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) avaliado à $c_{eq} \cong 1 \mu\text{M}$.	172

Resumo

Os capítulos um e dois tratam da prospecção de peptídeos bioativos da secreção de *Phyllomedusa hypochondrialis*. Mais especificamente, o primeiro aplica técnicas proteômicas, principalmente espectrometria de massa, para o estudo de peptídeos relacionados à bradicinina (BRPs). Estes estavam presentes tanto na secreção solúvel quanto em fragmentos dissecados de pele do anfíbio. Dezoito BRPs, assim como suas modificações pós-traducionais, foram caracterizados por seqüenciamento MS/MS *de novo* e experimentos de geração de imagens por MALDI em um fragmento de pele. Essas moléculas tiveram alta similaridade de seqüência com as cininas plasmáticas de alguns mamíferos e répteis. Tamanha diversidade de moléculas dentro da mesma família peptídica e pertencendo a mesma espécie pode estar relacionada à especializações funcionais desses peptídeos a uma variedade de receptores correspondentes em diferentes predadores. Também um novo análogo, [Val]¹, [Thr]⁶-bradicinil-Gln, Ser teve sua atividade biológica detectada em culturas celulares expressando o receptor de bradicinina humana B₂ e em preparações de íleo de porquinho-da-índia.

O capítulo dois descreve a mesma aproximação metodológica para o estudo de peptídeos antimicrobianos da família das dermaseptinas. As estruturas primárias dessas moléculas, nomeadas de DShypo 01, 02, 03, 04, 06 e 07 foram obtidas por experimentos MS/MS *de novo*, degradação de Edman e seqüenciamento de cDNA. O quinto peptídeo foi o mesmo DS 01 de *Phyllomedusa oreades*, previamente descrito pelo nosso grupo. A maioria dos peptídeos purificados do extrato cutâneo total de *P. hypochondrialis* pôde ser diretamente localizada e mapeada em um fragmento de pele dorsal usando técnicas de obtenção de imagens por espectrometria de massa. Comparações foram feitas entre peptídeos e drogas comerciais com relação à suas atividades antimicrobianas e contra *Leishmania amazonensis*. Também foram executados estudos comparativos dos efeitos líticos em células do sangue de mamíferos e da interação com vesículas de DMPC por ressonância plasmônica de superfície.

Os capítulos três e quatro tratam do estudo da interação de peptídeos membrano-ativos com membranas modelo, com ênfase em sua categorização em grupos e predição de atividade. Para tal, dezessete peptídeos membrano-ativos foram sintetizados e tiveram

suas interações com vesículas unilamelares de DMPC e de DMPC/DMPG (2:1 mol/mol) estudadas por uma série de técnicas biofísicas. Estas técnicas permitiram a dissecação das interações entre peptídeos e membranas em termos de sua interação inicial, grau de inserção em membranas e indução de extravasamento de marcadores fluorescentes. Por esta aproximação, ficou clara a existência de no mínimo cinco sub-grupos funcionais de peptídeos membrano-ativos, sendo três desses grupos compostos por antimicrobianos, um de peptídeos penetradores de células e mais um de peptídeos membrano-ativos capazes unicamente de adsorção em membranas. Também as relações estrutura e função são revistas de acordo com esta nova perspectiva.

O capítulo quatro descreve a determinação de parâmetros termodinâmicos para a adsorção do mesmo grupo de dezessete peptídeos em vesículas fosfolipídicas. Para tal, as isotermas de interação obtidas por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram analisadas pelo método de partição em superfície. Esse método é capaz de extrair das isotermas uma constante de afinidade intrínseca ao peptídeo (K_p), a qual exclui efeitos eletrostáticos, além de uma constante de afinidade aparente (K_{app}). Somente quatro dos dezessete peptídeos tiveram isotermas passíveis de ajuste com extração de parâmetros verossímeis. Esses peptídeos tiveram interação primariamente eletrostáticas com membranas, conforme classificado no capítulo três. As causas do não ajuste das isotermas de interação para alguns peptídeos foram discutidas em detalhe e relacionadas ao seu mecanismo de interação específico.

Abstract

Chapters one and two deal with the isolation and identification of bioactive peptides from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. The first chapter demonstrates the use of proteomic techniques, mainly mass spectrometry, for the study of bradykinin related peptides (BRPs) present in the amphibian's secretion and freshly dissected skin fragments. Eighteen BRPs, along with their post-translational modifications, were characterized in the secretion by *de novo* MS/MS sequencing and direct MALDI imaging experiments on the frog skin. These molecules revealed strong sequence similarities to the main plasma kinins of mammals and reptiles. Such a diversity of molecules, within the same peptide family, belonging to a single amphibian species may be related to functional specializations of these peptides and a variety of corresponding receptors that might be present in a number of different predators. Also, a novel analog, [Val]¹, [Thr]⁶-bradykinyl-Gln, Ser had its biological activity positively detected in cell culture expressing the human bradykinin B₂ receptor and in guinea pig ileum preparations.

Chapter two describes the same methodological approach to the study of antimicrobial peptides from the dermaseptin family. The primary structures of these molecules, named DShypo 01, 02, 03, 04, 06, and 07, were determined by *de novo* MS/MS experiments, Edman degradation, and cDNA sequencing. The fifth peptide was found to be precisely the same DS 01 from *Phyllomedusa oreades*, previously described by our group. The majority of the peptides purified from the crude skin secretion could be directly localized and mapped onto a freshly dissected dorsal skin fragment using mass spectrometry-imaging techniques. Comparisons between peptides and commercial drugs on their antibacterial and anti-*Leishmania amazonensis* efficiencies, associated with peptide lytic effects on mammalian blood cells and surface plasmon resonance interaction studies on immobilized DMPC vesicles, were also performed.

Chapters three and four describe the study of membrane-active peptides with model membranes, emphasizing their categorization and bioactivity prediction. Seventeen membrane-active peptides were synthesized and had their interaction with DMPC and DMPC/DMPG (2:1 mol/mol) large unilamellar vesicles studied by a series of

biophysical techniques. These techniques allowed the dissection of the interaction of peptides with membranes in terms of their initial recognition, degree of insertion in the bilayer and induction of fluorescent dye leakage. This approach made clear the existence of at least five functional groups of membrane-active peptides, three of them composed of antimicrobial molecules, one of cell-penetrating peptides and one of peptides only capable of adsorption. Also, structural and functional relationships relevant to the interaction of peptides and membranes were re-evaluated according to this new perspective.

Chapter four deals with the extraction of thermodynamical parameters from the adsorption of the same group of seventeen peptides into phospholipid vesicles. For such, interaction isotherms were obtained by isothermal titration calorimetry (ITC) and analyzed by the surface partition method. This method is capable of estimating an intrinsic affinity constant (K_p), that excludes electrostatic effects, as well as an apparent affinity constant (K_{app}). Membrane adsorption of only four out of seventeen peptides resulted in isotherms capable of adjustment to the surface partition model. These peptides had interactions mainly driven by electrostatic effects, as categorized in chapter three. The reasons for the incapacity to fit the isotherms were discussed and related to specific peptide mechanisms.

Prefácio

Grandes saltos conceituais em ciência são infreqüentes, porém são eles que guiam a exploração de novos espaços e a quebra de paradigmas. A máxima de Albert Einstein: “não se pode resolver um problema com a mesma mentalidade que o criou”, refere-se à esta necessidade de novas perspectivas ao abordar velhos problemas. Inovações requerem um novo conjunto de conceitos, os quais nem sempre possuem conexões claras com o corpo de conceitos em vigência. A sedimentação e a aceitação destas inovações podem levar anos, e requerem a aplicação minuciosa do método científico. A ciência descritiva e a ciência investigativa relacionam-se de forma complexa neste processo. Às vezes a descrição de novos componentes torna necessária a elaboração de conceitos mais abrangentes. Também por vezes são necessárias somente novas perspectivas sobre um problema. Essa tese trabalha tanto na consolidação quanto na proposição de um novo conjunto de conceitos, a qual pode resultar em um pequeno salto conceitual.

Quando Charles Darwin cunhou o termo “luta pela sobrevivência”, provavelmente não vislumbrava a pertinência deste princípio em diferentes escalas da natureza. A percepção de que os organismos travam batalhas, mesmo que de maneira metafórica, substituiu a concepção de uma natureza harmoniosa defendida pelos naturalistas da época. Assim, este termo foi o resultado da observação de uma série de interações intra e inter-específicas cuja escala estava limitada à percepção visual. A instrumentação científica evoluiu muito desde então, e agora podemos ver que a competição entre alguns organismos é muitas vezes sutil.

Os capítulos 1 e 2 do presente trabalho são consequência do salto conceitual dado por Charles Darwin, e são pequenas contribuições à consolidação do conjunto de conceitos que integra a biologia contemporânea, chamados de evolução. O capítulo 1 versa sobre a diversidade de peptídeos relacionados à bradicinina (BRPs) isolados a partir da secreção cutânea do anfíbio *Phyllomedusa hypochondrialis*. Acredita-se que estes peptídeos possuem função defensiva contra diferentes predadores do reino animal e sua variabilidade estrutural indica especificidade para sub-famílias de receptores codificados por diferentes organismos.

O capítulo 2, de forma análoga ao primeiro, discorre sobre a caracterização estrutural de peptídeos da família das dermaseptinas presentes na pele do mesmo anfíbio. Estes também são parte de um sistema de defesa químico e constituem uma fração do sistema imune inato de anfíbios da sub-família *Phyllomedusinae*. Peptídeos desta família são capazes de prevenir as infecções cutâneas causadas por microorganismos oportunistas de diversas naturezas. Ambos os trabalhos atestam, mesmo que de forma incompleta, a complexidade das relações entre os organismos e os diferentes níveis em que ocorrem.

O capítulo 3 é de conteúdo um pouco mais ambicioso que seus antecessores. Desde a descoberta da bombinina em 1970, considerado o primeiro peptídeo antimicrobiano isolado da secreção cutânea de anfíbios, um grande esforço têm sido dispensado na caracterização de novas moléculas. Estes esforços foram e continuam sendo válidos para a determinação tanto da variabilidade de suas estruturas primárias quanto do seu espectro de ação. Porém, mesmo após décadas de intensa pesquisa neste campo, não há um conjunto de conceitos conexos capazes de definir e prever moléculas com atividade antimicrobiana. Parte disso se dá pela falta de integração deste conhecimento. O capítulo 3, “categorização funcional de peptídeos membrano-ativos” tem como pretensão realizar este pequeno salto conceitual, mesmo que de forma embrionária.

Também a identificação e dissecação das forças responsáveis pela interação de peptídeos membrano-ativos com membranas pode ajudar a discernir as características essenciais à essas interações. Esse é o tema central do capítulo 4, o qual trata de maneira quantitativa a adsorção de peptídeos em membranas.

Capítulo 1

**Prospecção de peptídeos relacionados à bradicinina (BRPs) da secreção cutânea de
Phyllomedusa hypochondrialis (Amphibia)**

1.1. Introdução

1.1.1. Sistema cinina-caliceína

A. Mamíferos

As cininas são oligopeptídeos vasodilatadores que contém o nonapeptídeo bradicinina (BK) como parte de sua seqüência. Estas possuem diferentes efeitos fisiológicos em mamíferos, incluindo a regulação da pressão sangüínea, funções renais e cardíacas, sendo também associadas a complicações hipertensivas e inflamatórias (Regoli e Barabe 1980). A produção de BKs entra em ação a partir da ativação do fator XII (fator de Hageman) presente no sangue. A ativação desse fator pode dar-se por injúria ou mesmo artificialmente por partículas de vidro. O fator de Hageman, por sua vez, ativa a enzima pré-caliceína plasmática gerando subseqüentemente BK a partir da degradação do cininogênio de alta massa molecular (HMWK) (figura 1.1). A BK é rapidamente degradada, principalmente na circulação pulmonar, pela ação da carboxipeptidase N (cininase I), da enzima conversora de angiotensina (cininase II) e da endopeptidase 24.11 (figura 1.2). Em humanos, o cininogênio pode sofrer *splicing* alternativo (processamento pós-transcricional do RNAm) gerando o cininogênio de baixa massa molecular (LMWK), o qual é substrato da caliceína glandular ou tecidual, gerando lisil-bradicinina ($[Lys]^0$ -BK), molécula também conhecida por calidina (Campbell 2000). Ao entrar na circulação sangüínea essa molécula é rapidamente convertida em BK pela ação de aminopeptidases (Figura 1.1).

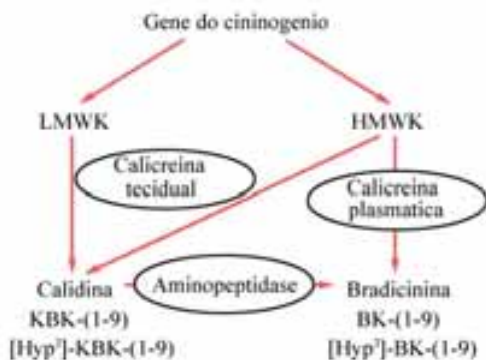


Figura 1.1. Gene do cininogênio é traduzido em cininogênio de baixa massa molecular (LMWK) e em cininogênio de alta massa molecular (HMWK), os quais são degradados

pelas calicreínas tecidual e plasmática dando origem à calidina e à bradicinina, respectivamente. Retirado e modificado de (Regoli e Barabe 1980).

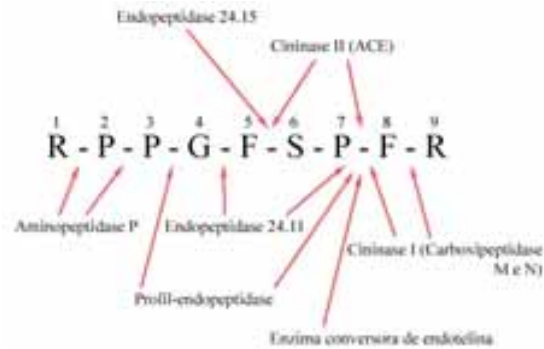


Figura 1.2. Estrutura primária da bradicinina e das regiões de clivagem enzimática. Retirado e modificado de (Regoli e Barabe 1980).

B. Répteis

O tratamento do plasma sanguíneo de alguns crocodilianos e quelônios com partículas de vidro e inibidores de cininase gera um extrato com habilidade de contrair o útero isolado de rato, indicando que o sangue desses animais possui componentes análogos aos do sistema cinina-caliceína de mamíferos (Conlon 1999). Alguns trabalhos demonstraram que a treonina-6 bradicinina ($[Thr]^6$ -BK) pode ser isolada do sangue de répteis em grande quantidade e reforçam esta hipótese (Araujo *et al.* 1996; Conlon 1999).

A existência de um sistema cinina-caliceína em serpentes não foi demonstrada inequivocamente, pois a adição de partículas de vidro em seus plasmas sanguíneos não gerou peptídeos com atividade detectável em bioensaios farmacológicos convencionais (preparações de musculatura lisa de mamíferos) (Regoli e Barabe 1980). Porém, demonstrou-se que a incubação do plasma de *Bothrops jararaca* com tripsina gera um peptídeo hipotensivo capaz de contrair sua própria musculatura uterina, mas inativo em preparações de mamíferos (Conlon 1999). Estes resultados demonstram que serpentes e mamíferos possuem cininas estrutural e funcionalmente diferentes. Acredita-se também que as serpentes não possuam um componente análogo ao fator XII, proteína cuja ativação com partículas de vidro deflagra a cascata de produção de cininas em mamíferos (Conlon 1999). Outros estudos relatam que a obtenção de peptídeos com atividade hipotensora em colubrídeos e viperídeos foi possível apenas pela desnaturação por calor e

digestão das proteínas plasmáticas com tripsina, gerando valina-1, treonina-6 bradicinina ([Val]¹,[Thr]⁶-BK) (Galli *et al.* 2005). Tratamento similar com o plasma sanguíneo de lagartos revelou que alguns deles, como o lagarto monitor (*Varanus grayi*), apresentam [Thr]⁶-BK como principal cinina plasmática, enquanto outros apresentam ainda análogos como leucina-2, treonina-6 bradicinina ([Leu]²,[Thr]⁶-BK) (Conlon 1999).

C. Anfíbios

O tratamento do plasma sanguíneo de anuros com partículas de vidro e tripsina não foi capaz de gerar moléculas com atividade constritora. Porém, quando calicreína de mamífero foi adicionada ao plasma de salamandras, angiotensinas foram geradas, mas sem formar nenhuma molécula da família das BK (Conlon 1999). Trabalhos mais recentes demonstraram que o peptídeo fenilalanina-1, isoleucina-2, treonina-6-bradicinina ([Phe]¹,[Ile]²,[Thr]⁶-BK) pode ser isolado do plasma de algumas salamandras, mas não está claro se o mesmo provém da clivagem de uma proteína como o cininogênio (Li *et al.* 1998; Conlon 1999).

1.1.2. Receptores de bradicinina

Atualmente, são conhecidos dois receptores de bradicinina em mamíferos, os receptores B₁ e B₂. Porém, existem evidências de que o receptor B₂ é, na verdade, um grupo heterogêneo. Este é expresso em situações fisiológicas normais, tendo como agonistas as cininas, enquanto a expressão do receptor B₁ está associada a injúrias teciduais e/ou mediante interação com endotoxinas bacterianas (Couture *et al.* 2001). O receptor B₁ possui maior afinidade por cininas degradadas por enzimas plasmáticas (e.g. des-Arg⁹-bradicinina) que pela própria BK. Ambos pertencem a família de receptores acoplados a proteínas-G (GPCRs), com sete hélices transmembrânicas (Bockaert e Pin 1999). Ambos GPCRs têm provável homologia por compartilharem 36% de identidade de estrutura primária (Bockaert e Pin 1999). Os efeitos de sua ativação são inúmeros, dependendo do tipo celular no qual se encontram, podendo ir da via clássica, com ativação da proteína cinase-C e o decorrente aumento da concentração intracelular de

Ca^{2+} , até a ativação de algumas enzimas Map-quinase (Couture *et al.* 2001). O receptor B_2 está envolvido na fase inicial da resposta dolorosa e inflamatória, enquanto o receptor B_1 está envolvido na fase aguda, sendo sua expressão persistente no sítio da inflamação (Couture *et al.* 2001). Esses receptores estão também envolvidos na reação hiperalgésica, modulando a sensibilidade dos nocirreceptores a estímulos térmicos e mecânicos. Sua ativação leva à secreção de prostaglandinas, citocinas e óxido nítrico. Os receptores B_1 e B_2 são expressos nas membranas plasmáticas de neurônios sensores, células endoteliais e células do sistema imune, como mastócitos (Couture *et al.* 2001).

Somente dois receptores de BKs foram descritos em animais não-mamíferos, sendo todos também da família das GPCRs. Um deles é o receptor de treonina-6, leucina-8 bradicinina ($[\text{Thr}]^6, [\text{Leu}]^8\text{-BK}$), conhecida como ornitocinina, clonado de *Gallus gallus* (Schroeder *et al.* 1997). Este receptor possui 49% de identidade com o receptor B_2 de mamíferos e tem afinidade por ornitocinina somente e não por BK. Peixes, como *Danio rerio* também têm um receptor ortólogo ao receptor B_2 , compartilhando com ele 35% de identidade de estrutura primária. Esse GPCR tem afinidade em concentrações nanomolares pelo análogo de BK encontrado na truta, ($[\text{Arg}]^0, [\text{Trp}]^5, [\text{Leu}]^8\text{-BK}$), por ornitocinina e até afinidade residual por BK (Duner *et al.* 2002).

1.1.3. Ação de bradicinina mediada por receptores

Em mamíferos, a geração de BK e de $[\text{Lys}]^0\text{-BK}$ resulta em vasodilatação devido ao decréscimo de resistência arteriolar, aumento da permeabilidade vascular, broncoconstrição e contração da musculatura lisa gastrointestinal e uterina. Sua ação também estimula a secreção renal de eletrólitos, ativação dos neurônios sensitivos primários aferentes, secreção de citocinas, e possivelmente a indução de efeitos mitogênicos (Conlon 1999).

A. Ações no sistema cardiovascular

A ação de cininas, em especial BK, é bastante complexa. Numerosos estudos indicam que ela varia de acordo com a espécie em estudo, o órgão sob observação, a dose

de cinina aplicada e interferência de outras substâncias vasoativas (Regoli e Barabe 1980). A administração endovenosa ou intra-arterial de BK induz uma queda reversível da pressão sanguínea decorrente da vasodilatação arteriolar e do decréscimo da resistência periférica (Regoli e Barabe 1980). Essa resposta é mediada primariamente pelo receptor B₂ e envolve a liberação de óxido nítrico e prostaglandinas (Couture *et al.* 2001). O mesmo receptor é responsável pela contração da musculatura lisa longitudinal de íleos de porquinhos-da-índia e de gatos, bioensaios “clássicos” na caracterização de novos análogos (Regoli e Barabe 1980). BK pode induzir tanto dilatação quanto constrição de arteríolas, sendo que a primeira é predominante em ensaios conduzidos *in vivo* (Regoli e Barabe 1980; Couture *et al.* 2001).

B. Inflamação

Existem evidências convincentes de que o cininogênio é degradado logo após injúria a tecidos (Couture *et al.* 2001). São as cininas resultantes as responsáveis por modular grande parte dos eventos em um processo inflamatório, como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma, migração celular e hiperalgesia (Couture *et al.* 2001). Cininas participam não só da fase aguda do processo inflamatório, mas também das fases tardias, devido à diminuição de sua taxa de degradação causada pelo aumento do pH local. O receptor B₂ é o responsável pela maioria dos efeitos farmacológicos relacionados a processos inflamatórios dirigidos por BKs, ao menos nas fases iniciais. Acredita-se que em fases tardias estes são dessensibilizados enquanto a síntese do receptor B₁ é induzida (Regoli e Barabe 1980; Couture *et al.* 2001)

C. Dor

As cininas formadas após injúria ou trauma tecidual em um processo inflamatório estão entre os mediadores algogênicos endógenos mais potentes conhecidos até o momento (Couture *et al.* 2001). Esses peptídeos participam diretamente na transmissão da dor ao ativarem neurônios sensitivos primários aferentes do tipo A δ e fibras C

(Couture *et al.* 2001). BKs amplificam a sensibilização da região devido a sua interação com outros mediadores inflamatórios. Assim como nos processos inflamatórios, os receptores B₂ estão envolvidos nas fases iniciais da indução de hiperalgesia, enquanto os receptores B₁ estão novamente associados à hiperalgesia persistente (Regoli e Barabe 1980; Couture *et al.* 2001).

1.1.4. Análogos de bradicinina em venenos

Devido ao importante papel fisiológico desempenhado pelo sistema cinin-caliceína, vários animais venenosos e peçonhentos adquiriram moléculas capazes de influir em seu equilíbrio. A síntese de peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) é muito comum em serpentes e em alguns escorpiões (Hayashi e Camargo 2005). Estes atuam aumentando o tempo de vida média das bradicininas no plasma sanguíneo ao impedirem sua degradação por enzimas, como a enzima conversora de angiotensina (ACE). Ao longo dos anos, várias dessas moléculas foram descritas em serpentes como *B. jararaca* e *B. insularis*, servindo como modelo para o desenho de uma nova geração de drogas com potencial no tratamento da hipertensão (Fernandez *et al.* 2004).

Outra estratégia bastante comum em animais peçonhentos é o acúmulo e inoculação de doses supra-fisiológicas de BRPs, como pode ser observado em vespas. A picada de vespas induz inchaço, avermelhamento, edema e dor intensa (Chen *et al.* 2002).

A. Diversidade de peptídeos relacionados à bradicinina na pele de anfíbios.

O primeiro BRP da secreção cutânea de anfíbios foi isolado de *Rana temporaria* em 1965. Isso ocorreu não muito após a descoberta do hormônio em mamíferos, em 1949, pelo pesquisador brasileiro Maurício Rocha e Silva. A partir de então, vários BRPs foram descritos, muitos deles isolados da secreção de anfíbios (tabela 1.1). Moléculas dessa família foram isoladas de espécies de diversos continentes, como África, América, Oceania e Europa (Conlon 1999). Assim, acredita-se que o gene precursor dos BRPs estava presente no ancestral dos anfíbios mesmo antes da deriva dos continentes, constituindo um caso evolutivamente análogo ao dos peptídeos antimicrobianos

(Vanhoye *et al.* 2003). É geralmente aceito que estas moléculas, na secreção cutânea de anfíbios, possuem alto valor adaptativo. Porém, nenhum estudo de nocaute dos genes que codificam BRPs foi feito até o presente momento. A inexistência comprovada de um sistema cinina-caliceína em anfíbios, assim como a insensibilidade de preparações de sua musculatura lisa aos BRPs em sua pele, indicam que estes possuem uma função distinta da regulação de funções cardiovasculares endógenas. BRPs são reconhecidos como parte de um sistema de defesa contra predadores, que inclui a síntese de vários outros análogos de hormônios (Conlon 1999).

Tabela 1.1. Diversidade de BRPs encontrados na secreção de anfíbios.

[Ala] ³ ,[Thr] ⁶ -BK	RPAGFTPFR
[Val] ¹ ,[Thr] ³ ,[Thr] ⁶ -BK	VPTGFTPFR
BK	RPPGFSPFR
Des-Arg ⁹ -BK	RPPGFSPF
[Hyp] ³ -BK	RP(Hyp)GFSPFR
[Hyp] ³ -des-Arg ⁹ -BK	RP(Hyp)GFSPF
[Thr] ⁶ -BK	RPPGFTPFR
[Hyp] ³ ,[Thr] ⁶ -BK	RP(Hyp)GFTPFR
Bradicinil-VD	RPPGFSPFRVD
[Val] ¹ ,[Thr] ⁶ -BK	VPPGFTPFR
Ranacinina O	RPPGFSPFRGKFH
Maximacinina	DLPKINRKGP RPPGFSPFR
Filocinina	RPPGFSPFRIY (S ₀₃ H)
[Hyp] ³ -filocinina	RP(Hyp)GFSPFRIY (S ₀₃ H)
[Thr] ⁶ -filocinina	RPPGFTP FRIY (S ₀₃ H)
[Hyp] ³ ,[Thr] ⁶ -filocinina	RP(Hyp)GFTP FRIY (S ₀₃ H)
Bradicinil-IA	RPPGFSPFRIA
Bradicinil-IAPASTL	RPPGFSPFRIAPASTL
Bradicinil-IAPASIL	RPPGFSPFRIAPASIL
Ranacinina N	RPPGFSPFRVAPAS
IR-Bradicinil-LR	IRRPPGFSPLR
IR-Bradicinil-LRIA	IRRPPGFSPLRIA
AGIR-Bradicinil-LR	AGIRRPPGFSPLR
AGIR-Bradicinil-LRIA	AGIRRPPGFSPLRIA
GVIPLL-BK	GVIPLL RPPGFSPFR

AR-10	APVPGLSPFR
AV-12	APVPGLSPFRVV
Bombinacina M	DLPKINRKGPRPPGFSPFR

Seqüências obtidas a partir de busca por bradicininas no banco de dados *Swiss-prot* (<http://www.expasy.org>) até o ano de 2007.

O peptídeo filocinina foi isolado pela primeira vez da secreção cutânea do anfíbio sul-americano *Phyllomedusa rhodei* em 1966, pelo grupo do Dr. Vittorio Erspamer, (Erspamer 1994). Durante anos, a presença de BRPs em anfíbios do gênero *Phyllomedusa* ficou restrita às filocininas, provavelmente por serem as cininas majoritariamente expressas. Soma-se a isto a carência de técnicas com poder analítico capaz de detecção de moléculas menos abundantes. As filocininas possuem um C-terminal estendido com relação à BK, caracterizando-se por um resíduo de tirosina freqüentemente sujeito à sulfação. O papel do grupo sulfato na atividade biológica de filocininas ainda é controverso, já que a forma sulfatada tem atividade de mesma magnitude ou de potência superior ou inferior de até três vezes quando comparada à forma não-sulfatada (Chen e Shaw 2003).

1.1.5. Justificativa e objetivos específicos

A prospecção de moléculas bioativas atingiu um novo nível com o desenvolvimento das técnicas proteômicas, principalmente da espectrometria de massa. A resolução e sensibilidade dos equipamentos aceleraram o processo de obtenção de seqüências peptídicas e assim mudaram o foco de investigação de moléculas individuais para famílias, como no caso dos BRPs. Embora já tenha sido postulado que a variedade de BRPs na pele de anfíbios seja consequência da variedade de predadores com que cohabitam (Conlon 1999), isto nunca foi demonstrado. A contribuição deste trabalho é determinar a variabilidade de BRPs na secreção cutânea de *P. hypochondrialis*, e assim oferecer elementos que contibuem para esta hipótese. Dado este cenário, os objetivos específicos do presente trabalho são:

- Isolar e identificar o maior número possível de BRPs da secreção cutânea de *P. hypochondrialis*;
- Testar a capacidade e resolução dos espectrômetros de massa de identificar e discernir modificações pós-traducionais (PTMs) freqüentes em BRPs;
- Identificar BRPs em um fragmento de pele de *P. hypochondrialis* pela técnica de obtenção de imagens por espectrometria de massa (MALDI-imaging);
- Testar a capacidade de contração de musculatura lisa e interação com receptores de BK de no mínimo um dos BRPs identificados.

1.2. Material e métodos

A. Coleta da secreção cutânea. Espécimes adultos de *Phyllomedusa hypochondrialis* de ambos os sexos foram coletados nas regiões do Paranã e de Balsas, ambas no estado do Tocantins. O número de licença do IBAMA para coleta é 097/96-DIFAS e o número do processo é 0637/91 A.C.

B. Purificação dos peptídeos. A secreção cutânea foi obtida pela estimulação elétrica branda (6-9 V) das glândulas granulares da pele de *P. hypochondrialis* e coletada em água filtrada (Millex 0,45 µm) como um extrato solúvel. Este foi então filtrado em papel de filtro de fibra de celulose, congelado e liofilizado (Centrivap concentrator, Labconco, Kansas City, MO). O extrato total foi re-solubilizado em 0,1 % ácido trifluoroacético/água (por volume) e fracionado em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Shimadzu Co., Kyoto, Japan) usando uma coluna semi-preparativa de fase reversa Vydac 218TP510 (C₁₈) (10 mm/250 mm) equilibrada com 0,1 % TFA com gradiente de 0,1 % TFA em acetonitrila em um fluxo de 2,5 mL.min⁻¹. A absorbância da amostra foi monitorada a 216 e 280 nm e as frações foram coletadas manualmente. Frações contendo peptídeos de interesse foram re-cromatografadas usando as colunas Vydac 218TP54 (C₁₈), Source 5 RPC ST 4,6 mm/150 mm (poliestirno/divinil benzeno) e µRPC ST 4,6 mm/100 mm (ambas GE Healthcare, Waukesha, WI) utilizando gradientes otimizados.

C. Degradação de EDMAN. Sequenciamento automático N-terminal das BKs foi feito no sequenciador de proteínas e peptídeos PPSQ-23 (Shimadzu Co.) seguindo as instruções do fabricante.

D. Alinhamento de seqüências. Buscas de similaridade das BKs foram feitas utilizando o programa FASTA 3 do ExPasy Molecular Server (www.expasy.net). Alinhamentos dos grupos de seqüências foram feitos utilizando as ferramentas de alinhamento múltiplo do CLUSTAL W, disponíveis no programa BioEdit v. 7.0.4.1 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

E. Geração de imagens por espectrometria de massa de dessecção/ionização de matriz assistida por laser (MALDI - IMS). A pele dorsal de *P. hypochondrialis* foi dissecada e fragmentos de 1-2 mm² foram secadas à temperatura ambiente sob um slide de vidro durante 10 minutos antes da análise por IMS. Fragmentos de tecido foram posicionados de forma que o lúmen das glândulas pudesse ser visualizado sem seccionamento. Imagens de microscopia de luz foram capturadas, e com o auxílio de um fórceps, os fragmentos de tecido foram diretamente ligados à placa de MALDI por uma fita adesiva dupla face. Após isso, gotas (0,5 µL) de ácido α -cyano-4-hydroxicinâmico foram aplicadas. Após a secagem à condição ambiente, perfis moleculares dos íons foram obtidos usando um espectrômetro Voyager DE STR MALDI-TOF/MS (ABI, Framingham, MA). Varreduras automáticas foram realizadas usando o software MALDI MS Imaging Tool. O laser pulsado de N₂ foi usado para varrer a superfície da amostra em passos de 50 µm. Espectros globais foram gerados a partir de espectros individuais obtidos dando quinze tiros em cada posição. O 'software' de análise funcional de imagens BioMap 3x foi utilizado para a geração mapas de íons baseados na sua intensidade dos componentes moleculares na amplitude de 1000 a 1700 para a análise de bradicininas e de 2000-3500 para dermaseptinas. Perfis de co-localização foram gerados usando o software BioMap.

F. Análise por espectrometria de massa (MS) e seqüenciamento *de novo*. Peptídeos foram analisados por MALDI-TOF MS e MS/MS usando um espectrômetro ABI 4700 Proteomics Analyzer com óptica TOF-TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA). As amostras foram misturadas com uma solução saturada de matriz ácido α -cyano-4-hydroxicinâmico em acetonitrila e TFA a 3 % (5/1 v/v) e aplicadas em uma placa de MALDI. Os espectros em modo MS e MS/MS foram obtidos no modo refletor com calibração externa, usando a mistura de calibração 4700 Standard kit (Applied Biosystems). O seqüenciamento *de novo* dos peptídeos foi realizado através da fragmentação do precursor, usando N₂ como gás indutor de dissociação; a pressão da célula de colisão foi mantida em $2,8 \times 10^{-6}$ torr. Análises por ionização eletrospray (ESI) foram realizadas em um espectrômetro de massa Q-TOF Ultima API (Waters,

Manchester, UK) operando em modo W. Uma mistura de água/metanol/ácido acético (50/50/0,1) enriquecida pela amostra foi aplicada a um fluxo de $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. As voltagens de cone e do capilar foram ajustadas para 2,8 kV e 30 V, respectivamente. Para os experimentos de MS/MS, a voltagem da célula de colisão foi ajustada entre 30 e 70 eV. Experimentos de CapLC (Waters, Manchester, UK) foram feitos em uma coluna microbore Symmetry[®] C₁₈ 5 μm (0.32 mm /150 mm) a um fluxo constante de $1\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ em um gradiente de 5 a 100% de reagente B em 400 minutos. Fases móveis foram uma mistura de água/acetonitrila/TFA nas proporções de 90/10/0,1 e 10/90/0,1, para os reagentes A e B, respectivamente. A detecção das massas foi realizada em modo ESI+ em um Q-ToF Ultima API operando em modo W pelo método de aquisição DDA Survey.

G. Determinação da sulfatação de [Hyp]³-filocinina. O peptídeo [Hyp]³-filocinina foi incubado com D₂O/CD₃OD/CD₃COOD (50/50/0,1) por 10 minutos, tempo suficiente para a troca completa de H/D (dados não mostrados). Experimentos MS/MS foram conduzidos usando os parâmetros previamente descritos para análise no espectrômetro de massa Q-ToF Ultima API.

H. Síntese do peptídeo [Val]¹,[Thr]⁶-Bradicinil-QS. O peptídeo Val-Hyp-Pro-Gly-Phe-Thr-Pro-Phe-Arg-Gln-Ser foi sintetizado manualmente de acordo com a estratégia padrão Boc/Bzl (Barany & Merrifield 1980; Atherton & Sheppard 1989). A resina Boc (Bzl)-Ser-PAM foi usada como suporte sólido e os grupos protetores de cadeia lateral utilizados foram: Bzl (para Thr e Ser) e Tos (Arg). Após a purificação em HPLC, a homogeneidade dos peptídeos foi comprovada por HPLC analítico (Waters), espectrometria de massa em um sistema RP-HPLC/MS (Micromass) e análise de aminoácidos (Biochrom 20 Plus, GE Healthcare).

I. Cultura de células e transfecções. Células de ovário de cobaia (CHO) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e crescidas em ambiente contendo 5% de CO₂. O plasmídeo usado para a expressão do receptor B₂ foi permanentemente transfectado para as células CHO usando lipofectina[®] (Life Technologies, Gaithersburg, MD), conforme instruções do

fabricante. Células transformadas foram selecionadas através da adição de G418 (500 mg.mL⁻¹) em DMEM.

J. Análise microfisiométrica da interação de [Val]¹,[Thr]⁶-Bradicinil-QS e BK com receptores B₂. Células expressando o receptor B₂ foram transferidas para 'transwells' feitos de membranas de policarbonato com 12 mm de diâmetro e 3 mm de poro (5 x 10⁵ células/poço). Um microfisiômetro (Molecular Devices, Sunnyvale CA, U.S.A.) foi utilizado para a mensuração da taxa de acidificação do microambiente extracelular devido à atividade metabólica celular (Chen *et al.* 2000; Santos *et al.* 2004). Células nos 'transwells' foram permeadas com meio DMM, pH 7,4 contendo 0,1% de BSA e 44,4 mmol.L⁻¹ de NaCl com uma bomba peristáltica alternando ciclos de permeação a 100 µL.min⁻¹ (100s) e pausas (20s). Durante a estimulação, o meio foi trocado por DMEM contendo as BRPs em concentrações que variaram de 10⁻⁹ M a 10⁻⁵ M. Experimentos foram realizados em quadruplicata e as curvas dose-resposta geradas foram analisadas por meio de regressão não-linear usando o 'software' PRISM 3.02 (Graph-Pad Software, San Diego, CA, U.S.A.).

K. Ensaio com musculatura lisa. Cobaias fêmea (*Cricetulus griseus*) foram mortas por decapitação (procedimento de acordo com o Comitê de Ética Animal da Escola Paulista de Medicina) e a porção terminal de 20 cm do íleo foi removida e lavada em solução tirodo (NaCl 137 mmol.L⁻¹, KCl 2,7 mmol.L⁻¹, CaCl₂ 1,4 mmol.L⁻¹, MgCl₂ 0,5 mmol.L⁻¹, NaHCO₃ 12 mmol.L⁻¹, NaH₂PO₄ 0,4 mmol.L⁻¹ e d-glicose 5,6 mmol.L⁻¹). Segmentos de 3 cm foram cortados e montados em câmaras de 5 mL contendo a solução de tirodo e borbulhada com uma mistura gasosa de 95% de O₂ e 5% of CO₂. Após um período de equilíbrio de 2 h, respostas isométricas foram gravadas com a adição de BK e [Val]¹,[Thr]⁶-Bradicinil-QS entre 10⁻⁹ M a 10⁻⁵ M por meio de um sistema de registro de contratilidade (Hewlett-Packard FTA-100) e um potenciômetro (ECB RB-102). Os experimentos foram realizados em duplicata e as curvas dose-resposta geradas foram analisadas através de regressão não-linear usando o software PRISM 3.02 (Graph-Pad Software, San Diego, CA, U.S.A.).

1.3. Resultados

1.3.1. Purificação dos BRPs e análise de estrutura primária. Extrato total da secreção cutânea de *P. hypochondrialis* foi fracionado por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) em uma coluna semi-preparativa. Em paralelo, parte do extrato foi utilizado para experimentos de CapLC/Q-TOF para a complementação dos estudos de identificação/seqüenciamento das moléculas. Frações contendo BRPs estão indicadas em ambos os cromatogramas resultantes da análise em HPLC e CapLC (Figuras 1.3A e 1.3B, respectivamente). Frações cromatográficas com tempos de retenção característicos a peptídeos da família das BKs foram analisados de forma mais minuciosa. Novos análogos foram seqüenciados *de novo* por espectrometria de massa (MS/MS) e também tiveram suas frações cromatográficas sujeitas à purificação até homogeneidade para o seqüenciamento via degradação N-terminal e confirmação de modificações pós-traducionais (PTMs). As seqüências foram categorizadas de acordo com sua similaridade estrutural com as principais BKs do plasma sanguíneo de alguns grupos de animais (Conlon 1999), e estão listadas na tabela 1.2.

A. Análogos de BK de mamíferos. Os peptídeos [Thr]⁶-BK, [Hyp]³-BK, e [Hyp]³,[Thr]⁶-bradicinina, com [M+H]⁺ = 1074,57, 1076,56 Da, e 1090,60 Da (não mostrado), respectivamente, foram identificados (figura 1.4). Esses foram agrupados, junto com o BRP truncado des-Arg-[Thr]⁶-BK, [M+H]⁺ = 918,50 Da (não mostrado) sob o nome de bradicininas de mamíferos.

B. Análogos [Val]¹,[Thr]⁶-BK, ou BKs de serpentes. Os BRPs [Val]¹,[Thr]⁶-BK, [M+H]⁺ = 1017,57 Da, e sua forma clivada, des-Arg-[Val]¹,[Thr]⁶-BK, [M+H]⁺ = 861,47 Da e também [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-BK, [M+H]⁺ = 1033,58 Da foram identificados na secreção de *P. hypochondrialis* (figura 1.5). Enquanto o primeiro já havia sido descrito como a principal cinina no plasma sanguíneo de algumas serpentes e na secreção cutânea de algumas anfíbios, como *Rana nigromaculata*, essa é a primeira vez que uma forma hidroxiprolinada, como [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-BK, é descrita (Conlon 1999).

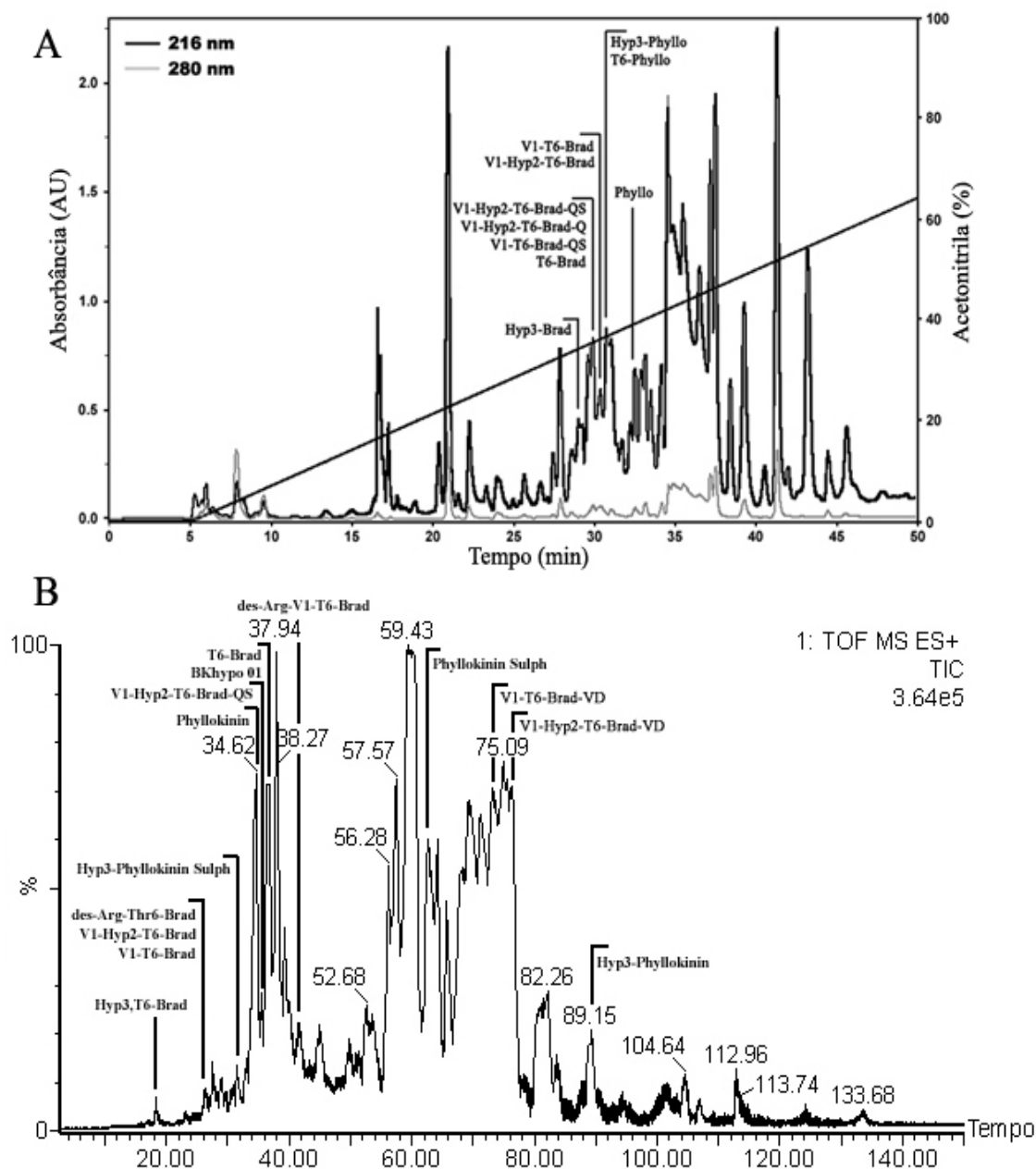


Figura 1.3. Fracionamento do extrato total de *P. hypochondrialis*. **A.** A amostra foi injetada (250 μ L) em uma coluna C_{18} Vydac 218TP510 equilibrada com TFA a 0,1%. Eluição foi feita usando uma solução de acetonitrila/TFA 0,1% em um fluxo de 2,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. A linha reta retrata a variação da concentração de acetonitrila. A absorbância foi monitorada simultaneamente em dois comprimentos de onda (216 and 280 nm). **B.** Cromatograma de CapLC/MS do extrato total da secreção cutânea em modo survey, usando um gradiente linear de 5-100% de solvente B em 140 minutos. Em ambos experimentos, as BRPs encontradas e as frações correspondentes estão indicadas

Tabela 1.2. BRPs na secreção cutânea de *P. hypochondrialis*

Análogos de BK	Sequência	Massa monoisotópica
[Thr] ⁶ -Brad	R P P G F T P F R	1074,58
Des-Arg-[Thr] ⁶ -Brad	R P P G F T P F	918,48
[Hyp] ³ -Brad	R P <u>P</u> G F S P F R	1076,60
[Hyp] ³ ,[Thr] ⁶ -Brad	R P <u>P</u> G F T P F R	1090,62
[Val]¹,[Thr]⁶ BKs		
[Val] ¹ ,[Thr] ⁶ -Brad	V P P G F T P F R	1017,55
Des-Arg-[Val] ¹ ,[Thr] ⁶ -Brad	V P P G F T P F	861,45
[Val] ¹ ,[Hyp] ² ,[Thr] ⁶ -Brad	V <u>P</u> P G F T P F R	1033,58
[Val] ¹ ,[Thr] ⁶ -Bradicinil-QS	V P P G F T P F R Q S	1232,64
[Val] ¹ ,[Hyp] ² ,[Thr] ⁶ - Bradicinil -Q	V <u>P</u> P G F T P F R Q	1161,64
[Val] ¹ ,[Hyp] ² ,[Thr] ⁶ - Bradicinil I-QS	V <u>P</u> P G F T P F R Q S	1248,67
[Val] ¹ ,[Thr] ⁶ - Bradicinil -VD	V P P G F T P F R V D	1231,74
[Val] ¹ ,[Hyp] ² ,[Thr] ⁶ - Bradicinil -VD	V <u>P</u> P G F T P F R V D	1247,74
Filocininas		
Filocinina	R P P G F S P F R I Y	1336,72
Filocinina sulfatada	R P P G F S P F R I Y (HSO ₃)	1416,68
[Thr] ⁶ - Filocinina	R P P G F T P F R I Y	1350,73
[Thr] ⁶ – Filocinina sulfatada	R P P G F T P F R I Y (HSO ₃)	1430,70
[Hyp] ³ - Filocinina	R P <u>P</u> G F S P F R I Y	1352,75
[Hyp] ³ – Filocinina sulfatada	R P <u>P</u> G F S P F R I Y (HSO ₃)	1432,71

* Prolinas sublinhadas (P) indicam que as mesmas encontram-se hidroxiladas.

Vários análogos que apresentam similaridade de seqüência com BKs de serpentes mas com extensões C-terminais foram descritos pela primeira vez, e estão listados abaixo. Os espectros de MS/MS obtidos a partir da fragmentação de [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradicinil-QS, [M+H]⁺ = 1248,62 Da, [Val]¹,[Thr]⁶-bradicinil-QS, [M+H]⁺ = 1232,63 Da e [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradicinil-Q, [M+H]⁺ = 1161,60 Da estão demonstrados na figura 1.6. Outras formas extendidas, como [Val]¹,[Thr]⁶-bradicinil-VD, [M+H]⁺ = 1231,74 Da, e [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradicinil-VD, [M+H]⁺ = 1247,74 também estão presentes (Figura 1.7).

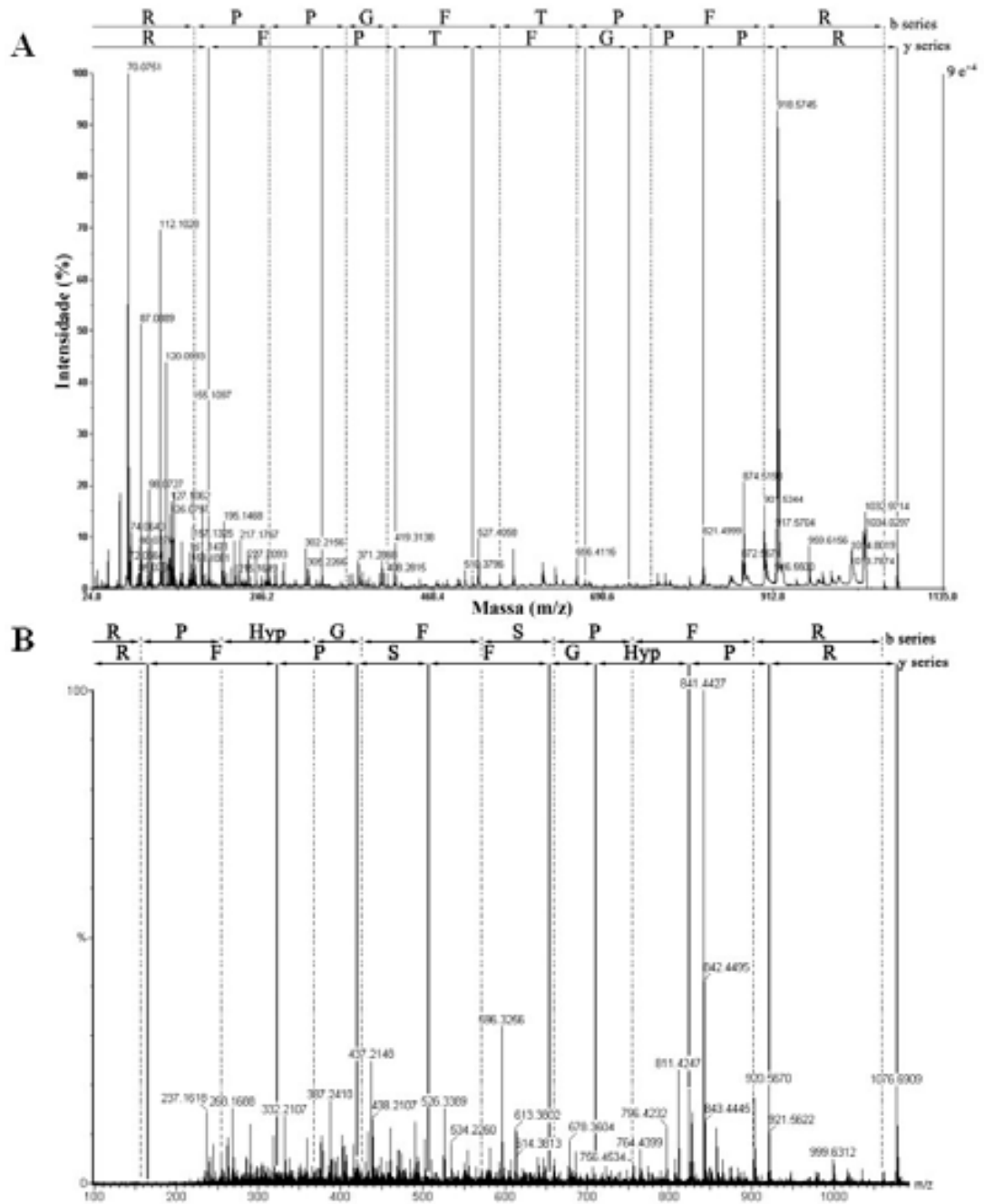


Figura 1.4. Seqüenciamento *de novo* de [Thr]⁶-bradycinina e [Hyp]³-bradycinina. A. Seqüenciamento de [Thr]⁶-bradycinina, [M+H]⁺ = 1074.58 Da e B. [Hyp]³-bradycinina, [M+H]⁺ = 1076.60 Da. Os fragmentos permitiram o reconhecimento completo das séries de ions y e b. As seqüências peptídicas usando o código de uma letra estão indicadas na parte superior de cada gráfico.

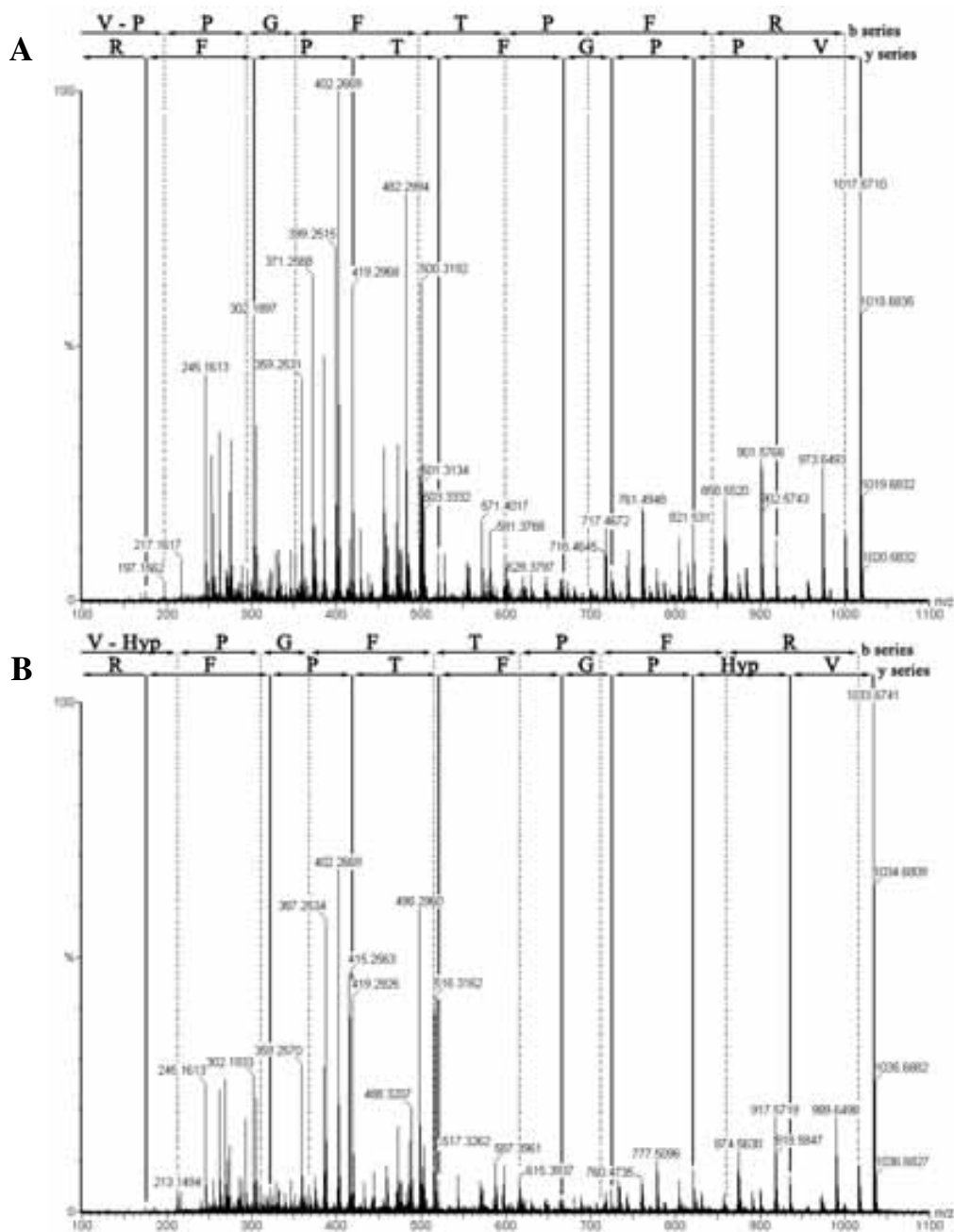


Figura 1.5. Seqüenciamento *de novo* de [Val]¹,[Thr]⁶-Bradicinina e [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-Bradicinina. **A.** Seqüenciamento de [Val]¹,[Thr]⁶-Bradicinina, [M+H]⁺ = 1017,55 Da e **B.** [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-Bradicinina, [M+H]⁺ = 1033,58 Da. Os fragmentos permitiram o reconhecimento completo das séries de íons y e b. As seqüências peptídicas usando o código de uma letra estão indicadas na parte superior de cada gráfico.

C. Filocininas. *P. hypochondrialis* também sintetiza e secreta alguns dos análogos de filocininas encontrados em outros Phyllomedusíneos. O espectro de MS/MS para os peptídeos filocinina, $[M+H]^+ = 1416,70$ Da, $[Hyp]^3$ -Filocinina, $[M+H]^+ = 1432,69$ Da, e $[Thr]^6$ -Filocinina, $[M+H]^+ = 1430,70$ Da, todos em suas formas O-sulfatadas estão demonstrados na Figura 1.8 (Erspamer *et al.* 1985; Chen e Shaw 2003).

1.3.2. Análise de modificações pós-traducionais.

A. Hidroxiprolina. Resíduos de hidroxiprolina possuem uma massa monoisotópica quase indistingüível dos resíduos de leucina/isoleucina (113,048 Da e 113,084 Da, respectivamente), e estas diferenças não podem ser resolvidas nas séries de íons principais (séries y e b). Assim, sua discriminação neste estudo foi embasada na análise monoisotópica dos principais íons imônios obtidos na fragmentação de cada peptídeo. A figura 1.9A demonstra que se considerarmos o principal imônio de prolina ($[M+H]^+ = 70,072$) como referência, imônios de hidroxiprolina apresentarão massa experimental de $[M+H]^+ = 86,070$ Da (calculada, $[M+H]^+ = 86,061$ Da), enquanto imônios de leucina/isoleucina têm uma massa experimental de $[M+H]^+ = 86,110$ Da (calculada, $[M+H]^+ = 86,097$ Da). Há ainda uma notável diferença na intensidade dos íons, indicando uma maior estabilidade do imônio de hidroxiprolina. A figura 1.9B esquematiza o seqüenciamento por degradação de EDMAN do peptídeo $[Val]^1, [Hyp]^2, [Thr]^6$ -bradicinil-QS, usado como modelo. Fica claro que o tempo de retenção para o segundo resíduo difere do esperado para resíduos de prolina ou leucina/isoleucina, gerando um resíduo de aminoácido que não consta nos padrões. Este pico foi identificado como resultante da derivatização da hidroxiprolina (Steen e Mann 2002).

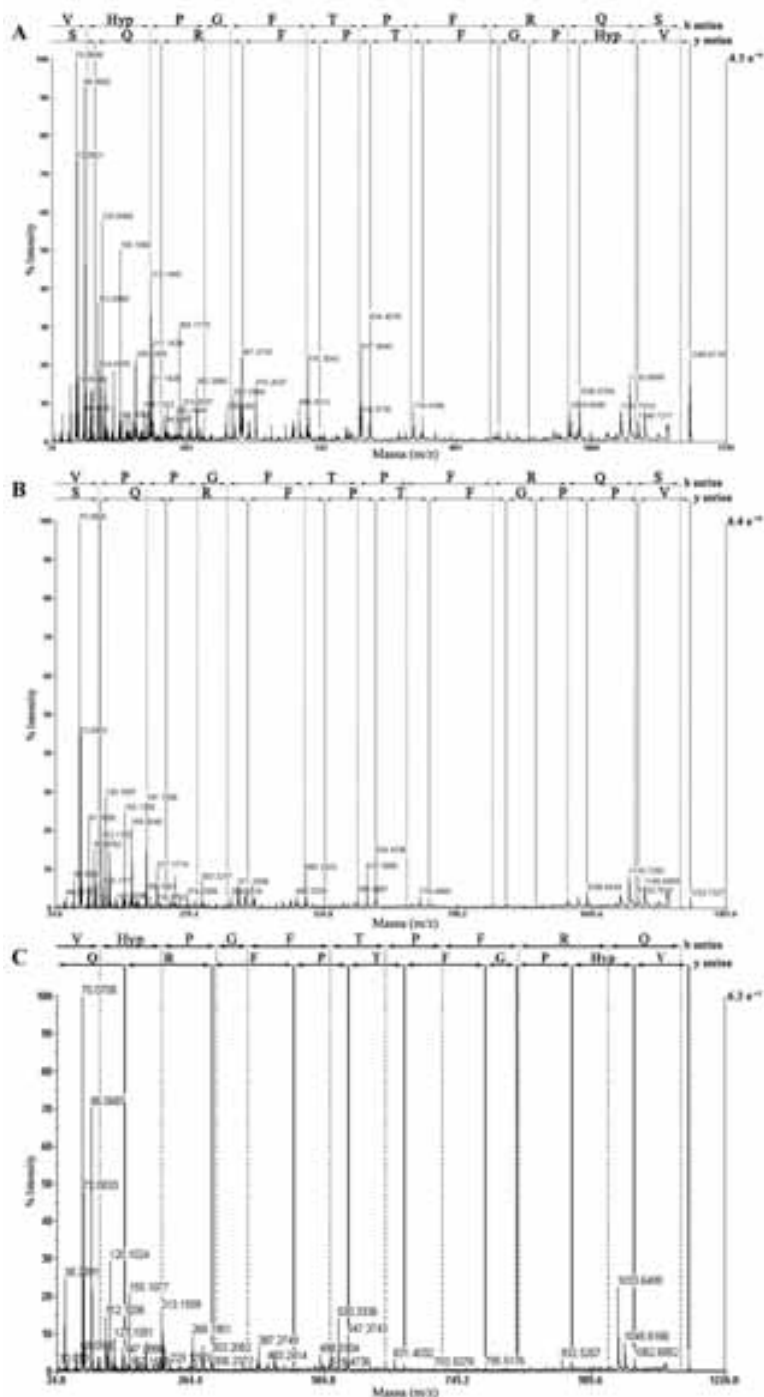


Figura 1.6. Sequenciamento *de novo* de [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradycinin-QS, [Val]¹,[Thr]⁶-bradycinin-QS e [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradycinin-Q. **A.** Sequenciamento de [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradycinin-QS, [M+H]⁺ = 1248,67 Da, **B.** [Val]¹,[Thr]⁶-bradycinin-QS, [M+H]⁺ = 1232,64 Da e **C.** [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradycinin-Q, [M+H]⁺ = 1161,64 Da. Os fragmentos permitiram o reconhecimento completo das séries de íons y e b. As seqüências peptídicas usando o código de uma letra estão indicadas na parte superior.

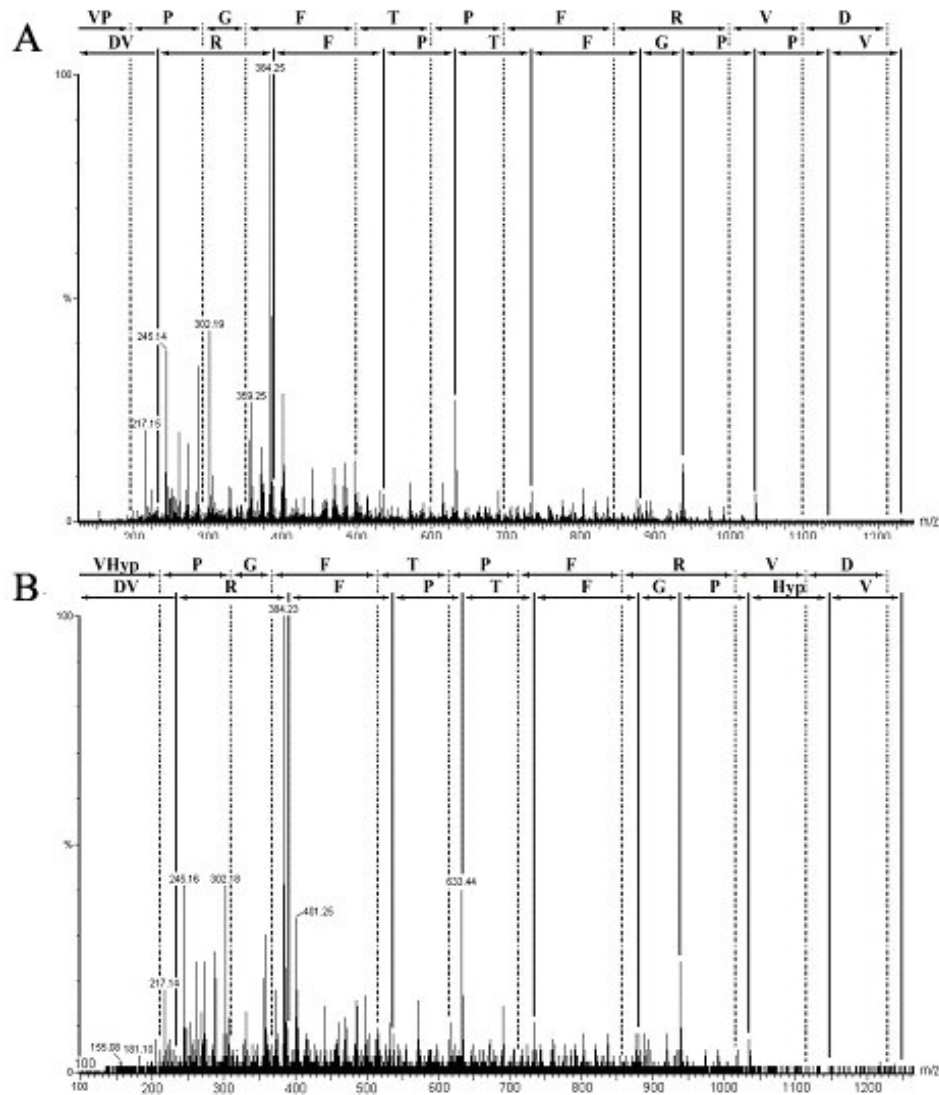


Figura 1.7. Sequenciamento *de novo* de [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradicinil-VD e [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradicinil-VD. A. Sequenciamento de [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradicinil-VD, [M+H]⁺ = 1231,74 Da, B. [Val]¹,[Thr]⁶-bradicinil-VD, [M+H]⁺ = 1247,74 Da. Os fragmentos permitiram o reconhecimento completo das séries de íons y e b. As seqüências peptídicas usando o código de uma letra estão indicadas na parte superior.

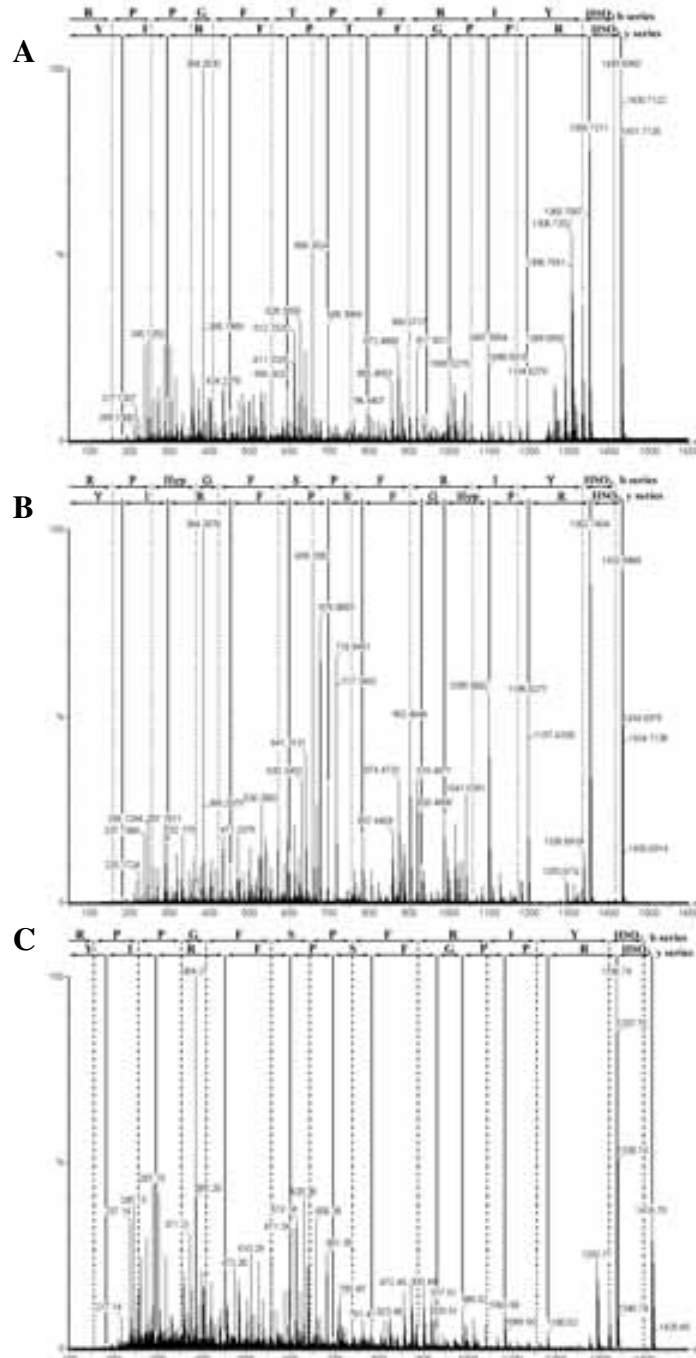


Figura 1.8. Sequenciamento *de novo* de [Thr]⁶-filocinina, [Hyp]³-filocinina e filocinina, todas sulfatadas. A. Sequenciamento de [Thr]⁶-filocinina, [M+H]⁺ = 1430,70 Da, B. [Hyp]³-filocinina, [M+H]⁺ = 1432,71 Da e C. Filocinina, [M+H]⁺ = 1416,68 Da. Os fragmentos permitiram o reconhecimento completo das séries de íons y e b. As seqüências peptídicas usando o código de uma letra estão indicadas na parte superior.

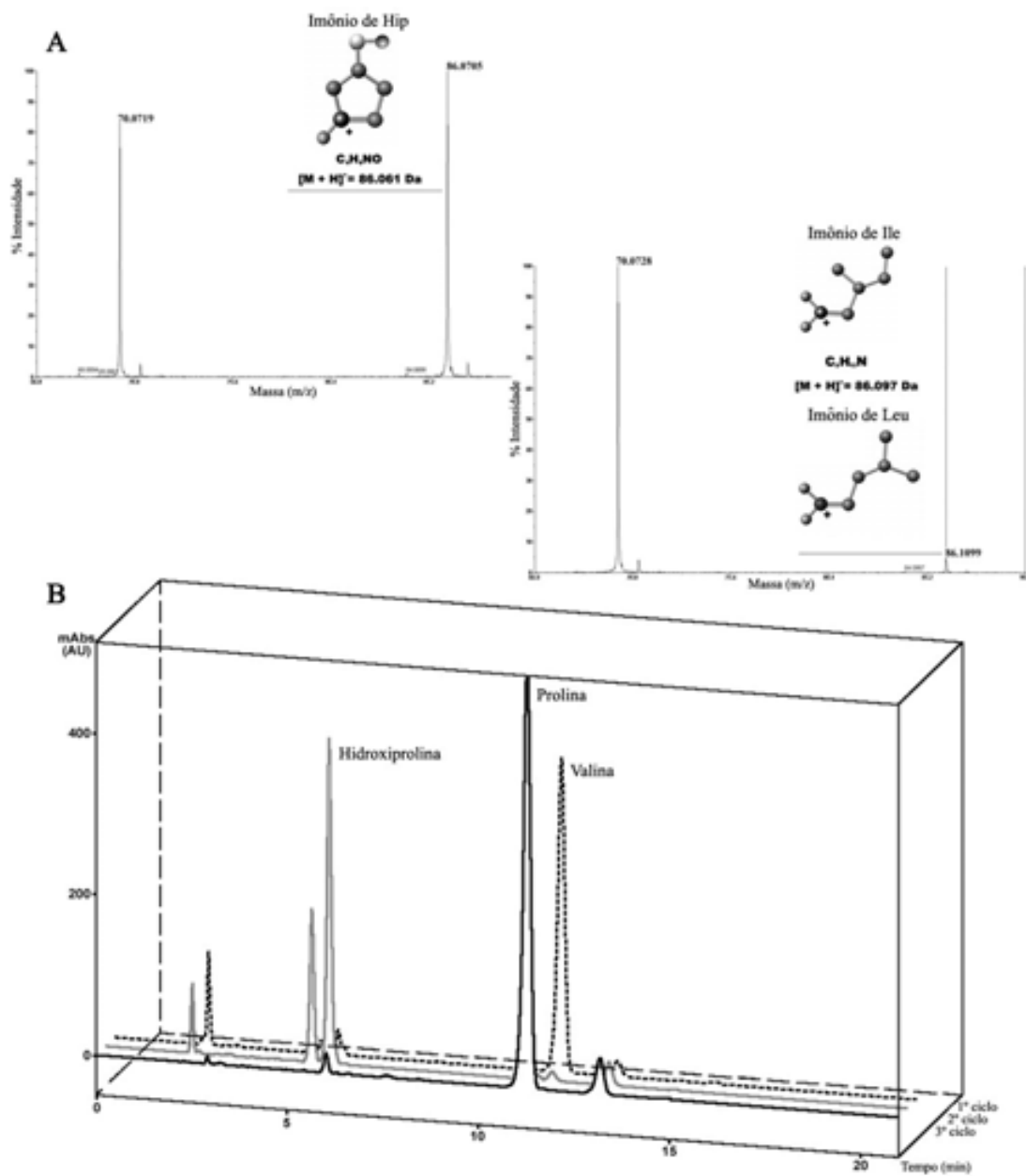


Figura 1.9. Determinação de hidroxiprolinação. **A.** Espectro de massa demonstrando que os resíduos de leucina/isoleucina (imônios = $[M+H]^+_{\text{calc}} = 86,097 \text{ Da}$ e $[M+H]^+_{\text{exp}} = 86,109 \text{ Da}$) e hidroxiprolina (imônios = $[M+H]^+_{\text{calc}} = 86,061 \text{ Da}$ e $[M+H]^+_{\text{exp}} = 86,070 \text{ Da}$) podem ser distinguidos em BRPs pela análise de massa dos imônios. **B.** Degradação N-terminal dos 3 primeiros resíduos do peptídeo $[\text{Val}]^1, [\text{Hyp}]^2, [\text{Thr}]^6$ -bradykinyl-QS, demonstrando que a hidroxiprolina derivatizada possui um tempo de retenção distinto de outros resíduos presentes em padrões.

B. Sulfatação de filocininas. Resíduos de tirosina sulfatados (acréscimo de $[M+H]^+ = 79,957$ Da) e fosforilados ($[M+H]^+ = 79,966$ Da) são comuns em proteínas, porém infreqüentes em peptídeos, existindo somente em alguns hormônios (Chen e Shaw 2003). Apesar de ter ocorrência identificável por MS, sua distinção não pode ser feita pela fragmentação peptídica convencional, pois suas massas divergem somente em mili Daltons. A figura 1.10 ilustra uma estratégia baseada em MS, distinta de metodologias convencionais como FT-IR e espectroscopia de RMN, para a discriminação entre sulfatação e fosforilação usando o peptídeo $[Hyp]^3$ -filocinina como modelo (Steen *et al.* 2001; Kanakubo e Isobe 2004). Esta estratégia tem base na diferença de massa ($[M+H]^+ = 79,95$ Da) obtida na fragmentação da molécula monocarregada de $[Hyp]^3$ -filocinina em relação a sua forma não sulfatada, comparada com as mesmas diferenças quando são utilizados solventes deuterados ($[M+D]^+ = 79,96$ Da). Caso essas diferenças de massa fossem resultantes da perda do grupo fosforil, haveria o acréscimo de 1 Da, correspondente a incorporação de um átomo de deutério. Já o grupamento sulfonil não troca átomos com o solvente, permanecendo a mesma diferença independente do isótopo em questão (Kanakubo e Isobe 2004).

1.3.3. Detecção de BRPs na pele de *P. hypochondrialis* e sua distribuição espacial.

Metodologias convencionais de caracterização molecular como cromatografia e espectrometria de massa requerem que as amostras sejam homogeneizadas antes de sua análise. Assim, informações morfológicas e fisiológicas relevantes podem perder-se no processo. Outros métodos, como hibridização e imunohistoquímica retêm aspectos morfológico-funcionais, mas não permitem análises em larga escala. A técnica de imagens por espectrometria de massa (IMS) da pele de anfíbios introduz a possibilidade de obter espectros de íons moleculares em condições próximas às nativas. O baixo grau de manipulação do material biológico torna a técnica adequada ao estudo de componentes de baixa massa molecular e suas possíveis PTMs (Schwartz *et al.* 2003; Chaurand *et al.* 2004). Um fragmento de pele dorsal de um espécime de *P. hypochondrialis* foi dissecado, conforme representado nas figuras 1.11A e 1.11B. O mesmo fragmento foi montado em uma placa de MALDI e espectros foram obtidos na área indicada (Figura 1.11B, caixa verde). A soma dos espectros pontuais forma o espectro global (Figura 1.11C) dos

componentes detectados na faixa de massa dos BRPs ($m/z = 1000-1700$ Da). A figura 1.11C demonstra que a técnica de IMS foi capaz de detectar grande parte das filocininas descritas, provavelmente por estas representarem a maior parte das cininas em *P. hypochondrialis*. Contudo, ela falhou em análogos menos concentrados. Fica evidente que filocininas estão presentes, mesmo em condições nativas, nas formas sulfatada e não sulfatada. Nota-se que essa não é uma regra, já que $[\text{Val}]^1, [\text{Hyp}]^2, [\text{Thr}]^6$ -bradicinil-QS foi predominantemente encontrado em sua forma hidroxiprolinada enquanto o peptídeo $[\text{Val}]^1, [\text{Thr}]^6$ -bradicinil-QS não foi detectado. Perfis de distribuição espacial de BRPs foram gerados para relacionar a ocorrência de peptídeos em determinadas áreas da pele. A relação entre a posição das glândulas e a expressão protéica é demonstrada pela superposição da figura 1.11D, a qual é uma magnificação da área analisada por IMS (uma figura de microscopia de luz). A figura 1.11E é o co-registro entre a imagem de microscopia de luz e a localização por MALDI IMS de uma molécula de $m/z = 6121$, usada como referência. As figuras 1.11F-N mostram a distribuição espacial de todas as BRPs detectadas no fragmento de pele. Percebe-se que filocininas sulfatadas e não sulfatadas possuem perfis espaciais em parte sobrepostas, indicando que estas são sintetizadas pelas mesmas glândulas.

1.3.4. Determinação da atividade biológica de $[\text{Val}]^1, [\text{Hyp}]^2, [\text{Thr}]^6$ -bradicinil-QS. $[\text{Val}]^1, [\text{Hyp}]^2, [\text{Thr}]^6$ -bradicinil-QS sintético e BK humana ativaram o receptor B_2 expresso em cultura e produziram contração de musculatura lisa em preparações de porquinho-da-índia de forma dose-dependente (Figura 1.12). Em ambos os ensaios, a BK de mamíferos foi aproximadamente duas ordens de magnitude mais potente que o análogo encontrado em *P. hypochondrialis*. Enquanto BK induziu 50% de aumento na taxa de acidificação do meio na concentração de aproximadamente 10^{-8} M, $[\text{Val}]^1, [\text{Hyp}]^2, [\text{Thr}]^6$ -bradicinil-QS teve o mesmo efeito somente na concentração de 10^{-7} M. Já em preparação de íleo de porquinho-da-índia, BK produziu 50% de contração na concentração de 3×10^{-8} M, enquanto o análogo sintético produziu o mesmo efeito somente quando cem vezes mais concentrado (3×10^{-6} M). Isto indica que a afinidade de $[\text{Val}]^1, [\text{Hyp}]^2, [\text{Thr}]^6$ -bradicinil-QS pelos receptores B_2 é residual e resultante da identidade de estrutura primária compartilhada com BK.

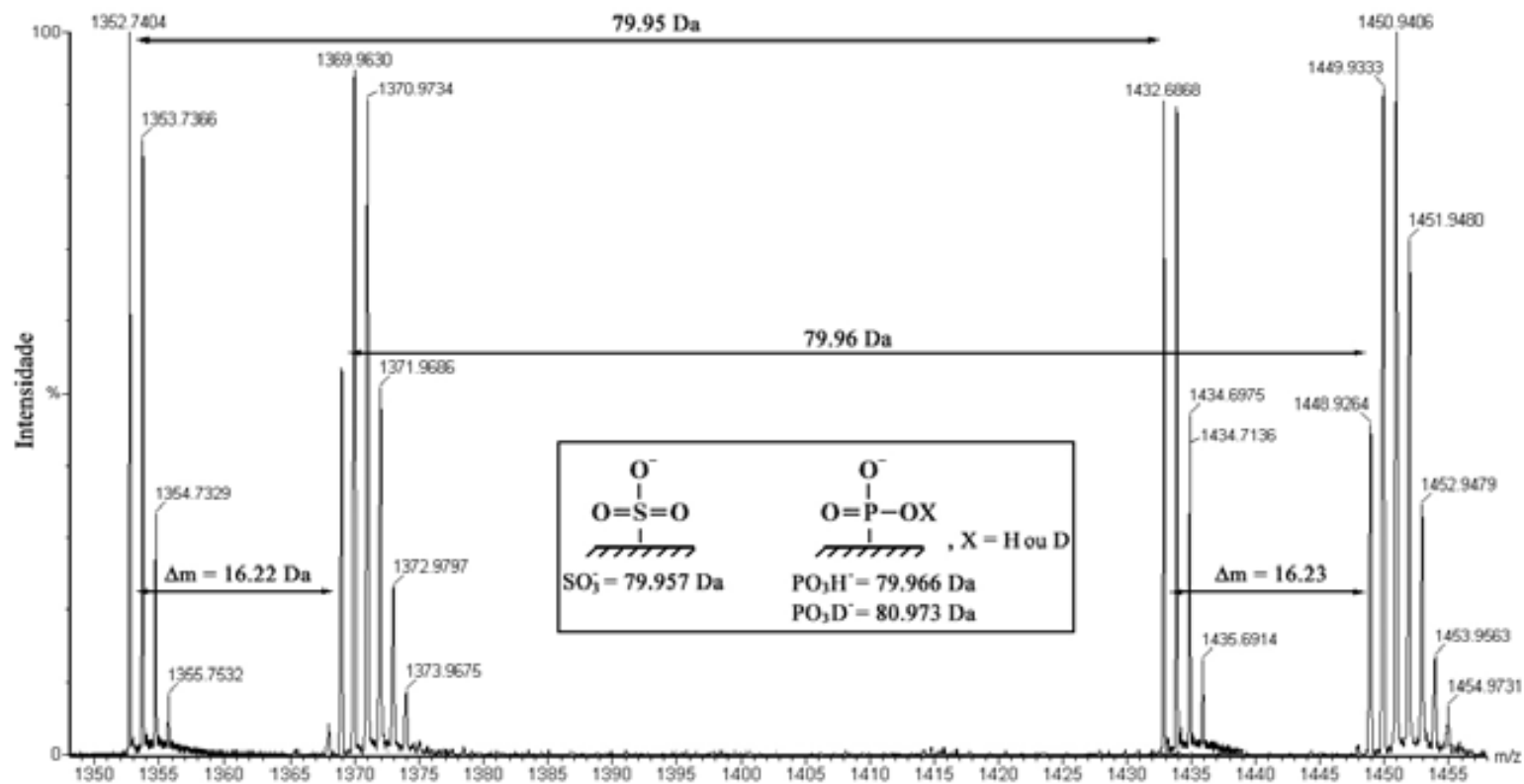


Figura 1.10. Determinação de sulfatação em [Hyp]³-filocinina. Fragmentação do íon precursor de $[M+H]^+ = 1432,68$ Da gera um pico em $[M+H]^+ = 1352,74$ Da, correspondente a perda de 79,95 Da. Usando solventes deuterados, [Hyp]³-filocinina incorpora 16,23 Da, resultando em $[M+D]^+ = 1448,93$ Da, que gera um pico a 79,96 Da de distância do primeiro ($[M+D]^+ = 1368,96$ Da) quando fragmentado. A permanência da diferença de massa de 79,96 Da corresponde a uma sulfatação, pois grupos fosforil são incrementados em 1 Da quando deuterados.

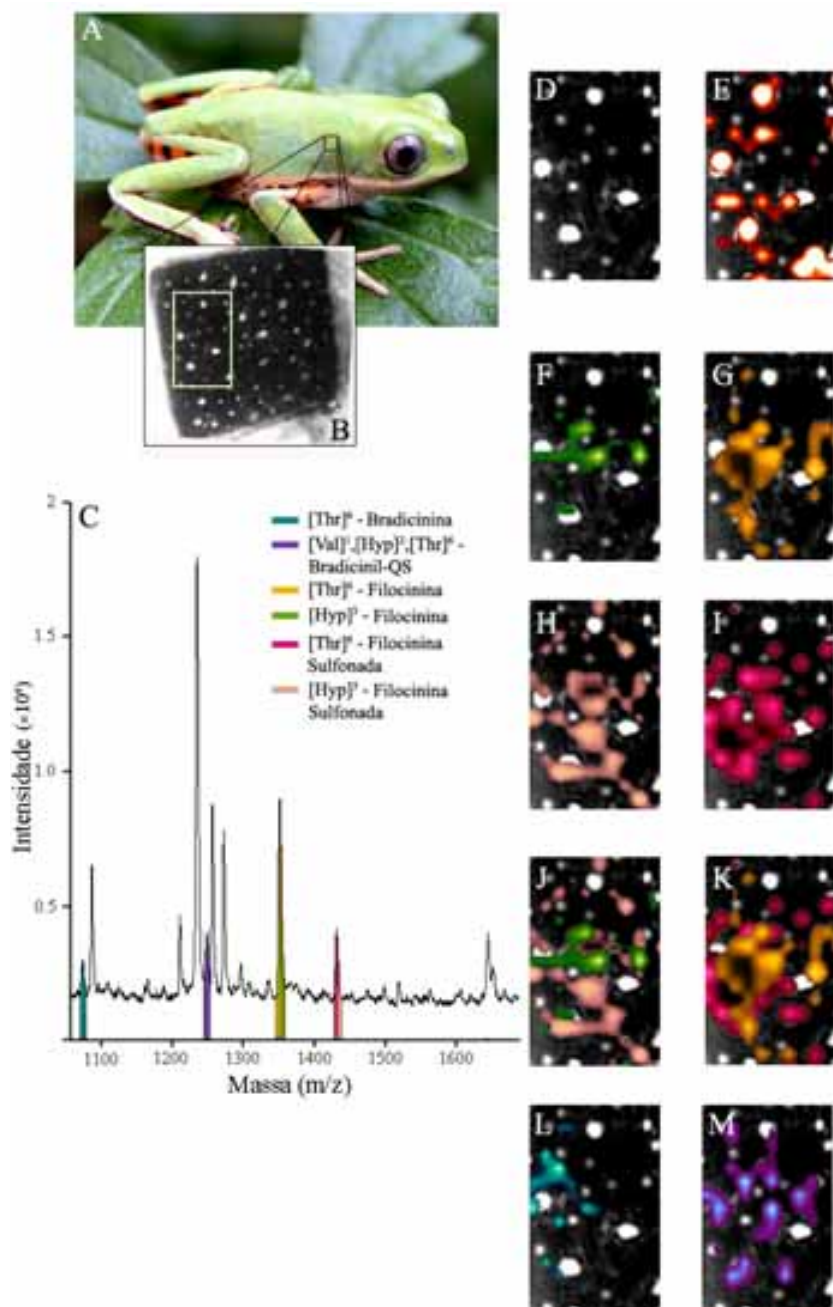


Figura 1.11. Análise de imagens por MALDI da pele de *P. hypochondrialis*. A. Espécime adulto de *P. hypochondrialis*. B. Micrografia de luz de um pequeno fragmento de pele onde a área cuja imagem foi construída está indicada. C. Espectro global dos íons detectados; aqueles identificados como BRPs são indicados. D. Magnificação da área que analisada. E. Co-localização de glândulas e da molécula marcadora (m/z = 6121 Da) usada para o alinhamento espacial das BRPs. Imagens espectrais de massa de F. [Hyp]³-filocinina, G. [Thr]⁶-filocinina, H. [Hyp]³-filocinina sulfatada, I. [Thr]⁶-filocinina sulfatada, J. [Hyp]³-filocinina + [Hyp]³-filocinina sulfatada, K. [Thr]⁶-filocinina + [Thr]⁶-filocinina sulfatada, L. [Thr]⁶-bradicinina e M. [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradicinil-QS.

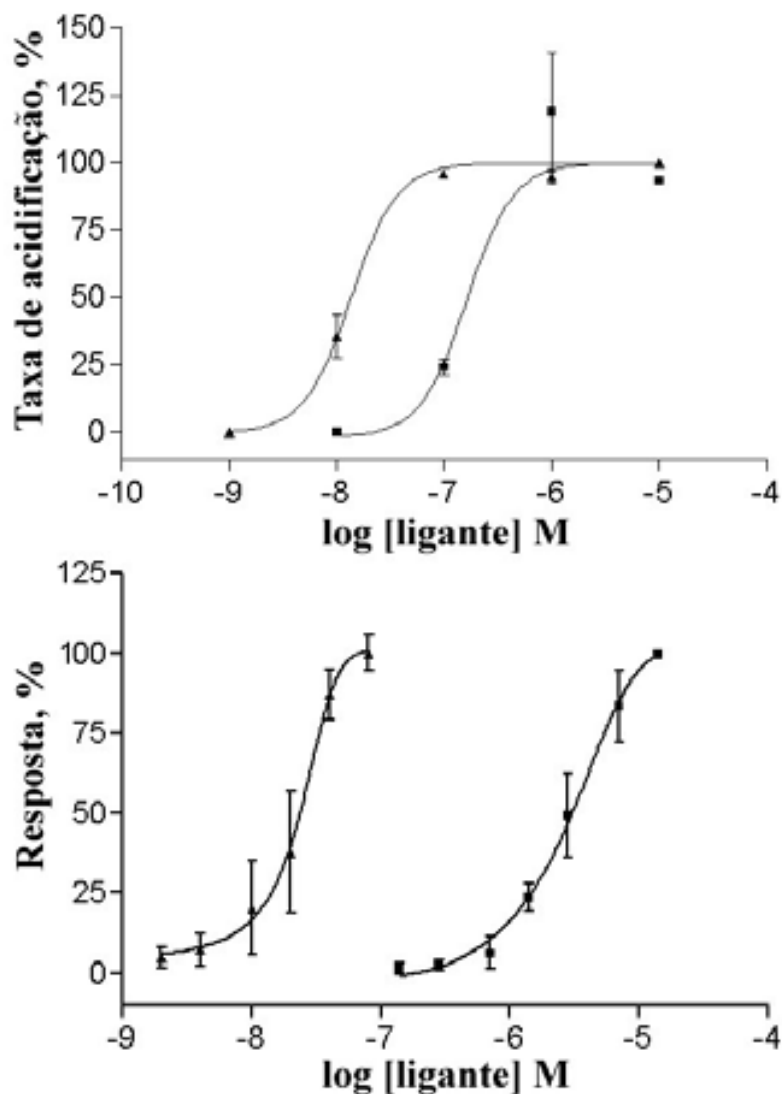


Figura 1.12. Atividade biológica de [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradiceptin-QS. Curvas dose-resposta para BK (▲) e para [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradiceptin-QS (■). **A.** Taxa de acidificação do meio em cultura de células CHO expressando o receptor B₂ de BK e **B.** Contração de musculatura lisa em preparações de íleo de porquinho-da-índia.

1.4. Discussão

Secreções de anfíbios são a mais rica fonte de moléculas bioativas dentre os vertebrados, principalmente as de natureza peptídica (Erspamer *et al.* 1985). Atualmente, reconhece-se que a maior parte dessa miríade de moléculas tem função defensiva, tanto contra microorganismos quanto contra predadores. Peptídeos relacionados à bradicinina (BRPs) são capazes de alterar funções fisiológicas vitais de animais vertebrados (Regoli e Barabe 1980). Sabe-se porém, que cada grupo de vertebrados possui um conjunto diferente de cininas ativas em sua circulação sanguínea, e receptores específicos a estas (Conlon 1999). O presente trabalho procurou identificar, por espectrometria de massa, todo o conjunto de BRPs produzidas e secretadas por *Phyllomedusa hypochondrialis*. Seu objetivo é fornecer elementos que ajudem a elucidar a hipótese de que anfíbios possuem moléculas com diferenciação funcional para os predadores que convivem em um mesmo habitat (Conlon 1999).

As BRPs foram classificadas de acordo com sua similaridade às principais cininas plasmáticas de vertebrados. Moléculas que compartilham similaridade com BK, especialmente aquelas tendo um resíduo de arginina no N-terminal, foram nomeadas de bradicininas de mamíferos (Conlon 1999). Entre estas [Thr]⁶-bradicinina destaca-se por ser comum em secreções de anfíbios e também por ser a principal cinina plasmática de crocodilianos, quelônios e lagartos varanídeos. Assim, esta cinina possui identidade estrutural com BK, porém funcionalidade variada (Conlon 1999; Chen *et al.* 2002). BKs com o motivo [Val]¹,[Thr]⁶ e extensões C-terminais foram agrupadas sob o nome de bradicininas de serpentes, devido a [Val]¹,[Thr]⁶-bradicinina ser a principal cinina plasmática de viperídeos, como *Crotalus atrox* (Conlon 1999; Galli *et al.* 2005). A diversidade de BRPs análogos aos de serpentes na secreção cutânea de *P. hypochondrialis* sugere uma variedade compatível de predadores. Porém, o real significado biológico dessa diversidade ainda é desconhecido e deve ser futuramente avaliado. Todas as filocininas encontradas em Phyllomedusíneos estavam também presentes em *P. hypochondrialis*, com exceção de [Hyp]³,[Thr]⁶-filocinina. Assim como em outras espécies de anfíbios do mesmo gênero, peptídeos dessa família constituem as cininas mais abundantes (Erspamer *et al.* 1985; Chen e Shaw 2003).

Cininas representaram valiosos modelos da aplicação de espectrometria de massa para a rápida e inequívoca determinação de hidroxiprolinação e sulfatação em peptídeos. Para tais fins, a metodologia de MS possui vantagens sobre outros métodos de seqüenciamento, como a construção de bibliotecas de cDNA e a degradação de Edman. Infelizmente, apesar dos padrões de fragmentação peptídica serem informativos em vários sentidos, estes são freqüentemente complexos de interpretar, especialmente se incluem modificações pós-traducionais. Os dados demonstraram que resíduos de hidroxiprolina podem ser distingüidos de resíduos de leucina/isoleucina em cininas em um único experimento de MS/MS. Este procedimento deve ser conduzido com cautela, pois peptídeos que possuem ambos resíduos em sua estrutura primária devem apresentar uma população mista de imônios, impossibilitando diferenciação. A hidroxilação de prolinas possui diferentes funções em proteínas, as quais podem variar do aumento da estabilidade estrutural até a detecção de oxigênio (Steen e Mann 2002; Mann e Jensen 2003). Sua alta ocorrência em cininas é comumente atribuída a alterações de afinidade a seus ligantes, apesar disso nunca ter sido diretamente demonstrado. Experimentos de MS também permitiram a discriminação de outras modificações isóbaras, como fosforilação e sulfatação. Peptídeos de secreções de anfíbios podem apresentar identidade com hormônios de mamíferos, compartilhando até mesmo suas PTMs. Esse é o caso do hormônio coleocistocinina (CCK) e as ceruleínas encontradas em anfíbios do gênero *Litoria* (Conlon 1999).

PTMs em peptídeos estão freqüentemente correlacionadas a eventos regulatórios, gerando demanda na identificação e determinação de seu perfil espacial *in situ*, com o mínimo de manipulação da amostra. Populações mistas de moléculas modificadas pós-traducionalmente e não-modificadas no mesmo extrato biológico são comuns, e resta a pergunta se estas consistem realmente em populações diferentes, com funções distintas, ou se são simplesmente o sub-produto de artefatos técnicos. A aplicação da metodologia de obtenção de imagens por espectrometria de massa (IMS), a qual gera perfis moleculares e mapas bi-dimensionais de íons diretamente da superfície de seções teciduais delgadas, deve gerar grandes inovações nessa área (Schwartz *et al.* 2003). A figura 1.11C do presente estudo demonstra que presença ou ausência de sulfatação em filocininas não é um artefato resultante das condições de armazenamento, conforme dito

anteriormente para essas moléculas em *P. sauvagei* (Chen e Shaw 2003). O presente estudo indica que estas moléculas são encontradas em ambas as formas quando ionizadas diretamente da pele de *P. hypochondrialis*. Assumindo que as filocininas de *P. hypochondrialis* têm a mesma estrutura gênica das de *P. sauvagei*, a qual consiste em um único precursor, conclui-se que, ou a sulfação de filocininas é facultativa, ou pode ser naturalmente perdida já na pele do anfíbio. A correlação entre a distribuição espacial de filocininas sulfatadas e não-sulfatadas é somente moderada, indicando que algumas regiões podem não apresentar a maquinaria para a sulfação, reforçando a primeira hipótese. Esta hipótese é também reforçada pela aparente presença de especialização tecidual, conforme observado por microscopia de luz, e/ou seletividade na secreção das outras BRPs.

A atividade do peptídeo [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradicinil-QS com relação a BK esteve consistente com a menor atividade de análogos com a substituição Val¹ em preparações musculares de mamíferos (Figura 1.12B) (Regoli e Barabe 1980). O mesmo análogo também teve menor grau de ativação de receptores B₂ expressos em culturas de célula CHO (Figura 1.12A). Isto deve-se ao efeito da substituição Arg → Val, pois estudos de substituição de alaninas demonstraram que Arg¹, Pro², Gly⁴, Phe⁵, Pro⁷, Phe⁸ e Arg⁹ são cruciais para a ativação de musculatura lisa de mamíferos (Regoli e Barabe 1980). Acredita-se atualmente, que a diversidade de BRPs na secreção cutânea de *P. hypochondrialis* seja o reflexo da variabilidade de predadores com os quais esses cohabitam (Conlon 1999). Conseqüentemente, a semelhança do peptídeo [Val]¹,[Hyp]²,[Thr]⁶-bradicinil-QS com as principais cininas plasmáticas de colubrídeos e crotalídeos indica que a atividade biológica de análogos de estrutura correlata seriam corretamente avaliados se comparados com [Val]¹,[Thr]⁶-BK em preparações de musculatura lisa de serpentes.

O presente trabalho demonstrou o uso de técnicas proteômicas para a descrição da diversidade de BRPs na secreção cutânea de *P. hypochondrialis*. Este também comprovou que cada espécime desse anfíbio secreta o mínimo de 18 BRPs, as quais se assemelham às principais cininas circulantes em vertebrados de diversos grupos. A aplicação de espectrometria de massa para a determinação de modificações pós-traducionais em cininas consagrou a eficiência desta metodologia. A localização espacial

de moléculas por espectrometria de massa diretamente da pele de anfíbios inaugura uma nova forma de compreensão da expressão de moléculas em tecidos sem o auxílio de moléculas marcadoras.

1.5. Referências bibliográficas

- Atherton, E., Sheppard, R.C. In "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach", I.L.R. Press; Oxford, 1989.
- Araujo, M. S., R. Andreotti, M. Tiaen, V. Nunes, M. L. Oliva, M. Sampaio, O. Iimura, K. Shimamoto, N. Ura e C. Sampaio (1996). "Caiman crocodilus yacare plasma kininogen detection." Immunopharmacology **32**(1-3): 82-4.
- Barany, G., Merrifield, R.B. "The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology." Gross E., Meienhofer, J. (eds). Academic Press, New York, 1980
- Bockaert, J. e J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." EMBO J **18**(7): 1723-9.
- Brand, G. D., F. C. Krause, L. P. Silva, J. R. Leite, J. A. Melo, M. V. Prates, J. B. Pesquero, E. L. Santos, C. R. Nakaie, C. M. Costa-Neto e C. Bloch, Jr. (2006). "Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*." Peptides **27**(9): 2137-46.
- Campbell, D. J. (2000). "Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides." Braz J Med Biol Res **33**(6): 665-77.
- Chaurand, P., S. A. Schwartz, D. Billheimer, B. J. Xu, A. Crecelius e R. M. Caprioli (2004). "Integrating histology and imaging mass spectrometry." Anal Chem **76**(4): 1145-55.
- Chen, R., Y. V. Mukhin, M. N. Garnovskaya, T. E. Thielen, Y. Iijima, C. Huang, J. R. Raymond, M. E. Ullian e R. V. Paul (2000). "A functional angiotensin II receptor-GFP fusion protein: evidence for agonist-dependent nuclear translocation." Am J Physiol Renal Physiol **279**(3): F440-8.
- Chen, T., D. F. Orr, A. J. Bjourson, S. McClean, M. O'Rourke, D. G. Hirst, P. Rao e C. Shaw (2002). "Novel bradykinins and their precursor cDNAs from European yellow-bellied toad (*Bombina variegata*) skin." Eur J Biochem **269**(18): 4693-700.
- Chen, T. e C. Shaw (2003). "Cloning of the (Thr6)-phyllokinin precursor from *Phyllomedusa sauvagei* skin confirms a non-consensus tyrosine O-sulfation motif." Peptides **24**(8): 1123-30.
- Conlon, J. M. (1999). "Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates." Regul Pept **79**(2-3): 71-81.
- Couture, R., M. Harrisson, R. M. Vianna e F. Cloutier (2001). "Kinin receptors in pain and inflammation." Eur J Pharmacol **429**(1-3): 161-76.
- Duner, T., J. M. Conlon, J. P. Kukkonen, K. E. Akerman, Y. L. Yan, J. H. Postlethwait e D. Larhammar (2002). "Cloning, structural characterization and functional expression of a zebrafish bradykinin B2-related receptor." Biochem J **364**(Pt 3): 817-24.
- Erspamer, V., P. Melchiorri, G. Falconieri Erspamer, P. C. Montecucchi e R. de Castiglione (1985). "Phyllomedusa skin: a huge factory and store-house of a variety of active peptides." Peptides **6** Suppl 3: 7-12.
- Erspamer, V. (1994) *Amphibian Biology*, Heatwole, H., Ed Surrey Beaty & Chpping Northon, voll cap 09, pp178-350.

- Fernandez, J. H., G. Neshich e A. C. Camargo (2004). "Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs." Genet Mol Res **3**(4): 554-63.
- Galli, G. L., N. Skovgaard, A. S. Abe, E. W. Taylor, J. M. Conlon e T. Wang (2005). "Cardiovascular actions of rattlesnake bradykinin ([Val1,Thr6]bradykinin) in the anesthetized South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(2): R456-65.
- Hayashi, M. A. e A. C. Camargo (2005). "The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme." Toxicon **45**(8): 1163-70.
- Kanakubo, A. e M. Isobe (2004). "Differentiation of sulfate and phosphate by H/D exchange mass spectrometry: application to isoflavone." J Mass Spectrom **39**(11): 1260-7.
- Li, Z., S. M. Secor, V. A. Lance, M. A. Masini, M. Vallarino e J. M. Conlon (1998). "Characterization of bradykinin-related peptides generated in the plasma of six sarcopterygian species (African lungfish, amphiuma, coachwhip, bullsnake, gila monster, and Gray's monitor)." Gen Comp Endocrinol **112**(1): 108-14.
- Mann, M. e O. N. Jensen (2003). "Proteomic analysis of post-translational modifications." Nat Biotechnol **21**(3): 255-61.
- Regoli, D. e J. Barabe (1980). "Pharmacology of bradykinin and related kinins." Pharmacol Rev **32**(1): 1-46.
- Santos, E. L., J. B. Pesquero, L. Oliveira, A. C. Paiva e C. M. Costa-Neto (2004). "Mutagenesis of the AT1 receptor reveals different binding modes of angiotensin II and [Sar1]-angiotensin II." Regul Pept **119**(3): 183-8.
- Schroeder, C., H. Beug e W. Muller-Esterl (1997). "Cloning and functional characterization of the ornithokinin receptor. Recognition of the major kinin receptor antagonist, HOE140, as a full agonist." J Biol Chem **272**(19): 12475-81.
- Schwartz, S. A., M. L. Reyzer e R. M. Caprioli (2003). "Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation." J Mass Spectrom **38**(7): 699-708.
- Steen, H., B. Kuster, M. Fernandez, A. Pandey e M. Mann (2001). "Detection of tyrosine phosphorylated peptides by precursor ion scanning quadrupole TOF mass spectrometry in positive ion mode." Anal Chem **73**(7): 1440-8.
- Steen, H. e M. Mann (2002). "Analysis of bromotryptophan and hydroxyproline modifications by high-resolution, high-accuracy precursor ion scanning utilizing fragment ions with mass-deficient mass tags." Anal Chem **74**(24): 6230-6.
- Vanhoye, D., F. Bruston, P. Nicolas e M. Amiche (2003). "Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain." Eur J Biochem **270**(9): 2068-81.

Capítulo 2

Novas dermaseptinas de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia)

2.1. Introdução

2.1.1. Peptídeos antimicrobianos em anfíbios

Organismos pertencentes à classe Amphibia (amphi = ambos, bios = ambientes) utilizam como substrato, em alguma parte do seu ciclo de vida, tanto a água como a terra. Assim, adaptaram-se por milhões de anos à hostilidade destes ambientes, principalmente aos microorganismos, com os quais interagem em todas as fases de suas vidas. Anfíbios possuem formas eficientes de controle do crescimento de microorganismos oportunistas em sua pele (Erspamer 1994). Suas secreções cutâneas são constituídas por várias moléculas com função defensiva, entre elas peptídeos antimicrobianos (AMPs), os quais fazem parte de seu sistema imune inato. Estes peptídeos são produzidos por glândulas dermais e secretados de forma holócrina caso o animal venha a sofrer estresse ou injúria (Lacombe *et al.* 2000; Brand *et al.* 2002). Além disso, a presença de microorganismos no ambiente pode ser um estímulo para sua secreção, por alguma via de sinalização ainda desconhecida (Mangoni *et al.* 2001). Estimativas recentes indicam que cada anuro secreta entre 10-20 peptídeos antimicrobianos, resultando em aproximadamente 100.000 moléculas entre os 5.000 anfíbios (Nicolas *et al.* 2003). Estas moléculas variam em tamanho, seqüência, carga, hidrofobicidade, estrutura tridimensional e espectro de ação, diferindo também entre anfíbios de diferentes famílias, gêneros, espécies e até sub-espécies. Anfíbios da sub-ordem Neobatrachia são a maior fonte de AMPs, e até o presente treze famílias distintas foram identificadas com base em similaridades de seqüência (Duda *et al.* 2002). Sabe-se que esses peptídeos são derivados de um precursor de aproximadamente 150 milhões de anos e que atualmente, os genes que os codificam, apresentam um padrão de regiões conservadas e hipermutáveis (Duda *et al.* 2002; Vanhoye *et al.* 2003). A região conservada é a parte que corresponde ao peptídeo sinal e também à chamada região acídica, enquanto a parte hipermutável é a que codifica o peptídeo com atividade biológica em si (figura 2.1). Postula-se também que tamanha variabilidade é conseqüência de processos mutagênicos localizados, possivelmente pelo funcionamento de uma enzima DNA polimerase análoga à DNAPol V, de *E. coli*. A hipervariabilidade de seqüências, assim como a forma de diversificação, podem ser parte

de um mecanismo evolutivo que provém anfíbios de máxima proteção contra uma ampla gama de microorganismos. Tal hipótese é reforçada pela ação sinérgica de peptídeos antimicrobianos, os quais têm uma potência 10-100 vezes superior quando juntos (Mor *et al.* 1994; Vanhoye *et al.* 2003).

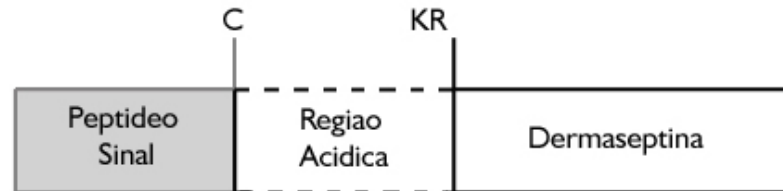


Figura 2.1. Estrutura do cDNA de peptídeos da família das dermaseptinas.

2.1.2. Dermaseptinas

A. Diversidade

A família das dermaseptinas é atualmente composta por mais de 30 moléculas isoladas da secreção cutânea de anfíbios da sub-família Phyllomedusinae (tabela 2.1). Apesar de ser uma das famílias mais representativas dentro do conjunto de peptídeos antimicrobianos, o número de moléculas descritas é pequeno quando comparado ao todo. Cada indivíduo possui aproximadamente 12 membros dessa família em sua secreção, correspondendo a uma das famílias de moléculas mais abundantes. Constituem também grande parte do peso seco do exsudato. A quantidade e variabilidade de estrutura de peptídeos dessa família em Phyllomedusíneos indica seu valor adaptativo. Assim como para outros peptídeos antimicrobianos, a hipervariabilidade de estrutura primária, mesmo com a manutenção de um motivo característico, indica diferenciação de função e especialização de moléculas para diferentes microorganismos (Mor *et al.* 1994). Membros desta família são geralmente ativos contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras, protozoários, embora com especificidades variáveis (Hernandez *et al.* 1992; De Lucca *et al.* 1998; Brand *et al.* 2002). Análise da estrutura gênica demonstra que há um alto grau de conservação estrutural nas regiões prepro e acídica, enquanto a região que codifica o peptídeo varia amplamente (Fleury *et al.* 1998; Amiche *et al.* 1999; Vanhoye *et al.* 2003).

Tabela 2.1. Dermaseptinas em bancos de dados de peptídeos até o ano de 2005

Peptídeo	Seqüência	Organismo de origem
Dermadistinctina Q1 (DD Q1)	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLVGAES	<i>Phyllomedusa distincta</i>
Dermadistinctina Q2 (DD Q2)	GLWSKIKEAAKTAGLMAMGFVNDMV	<i>Phyllomedusa distincta</i>
Dermadistinctina K (DD K)	GLWSKIKAAAGKEAAKAAKAAAGKAALNAVSEAV	<i>Phyllomedusa distincta</i>
Dermadistinctina L (DD L)	ALWKTLLKNVGAAGKAALNAVTDVMNQ	<i>Phyllomedusa distincta</i>
Dermadistinctina M (DD M)	ALWKTMLKKLGTMLHAGKAAFCAAADTISQ	<i>Phyllomedusa distincta</i>
Precursor de dermatoxina	SLGSFLKGVGTTLASVGVKVVSDQFGKLLQAGQ	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Precursor de dermaseptina AA-1-1	SLGSFMKGVGKGLATVGVKIVADQFGKLEA	<i>Agalychnis annae</i>
Precursor de dermaseptina PD-1-5	SLGSFMKGVGKGLATVGVKIVADQFGKLEA	<i>Pachymedusa dacinicolor</i>
Dermaseptina B1	AMWKDVLKKIGTVLHAGKAAALGAVADTISQ	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Dermaseptina 1	ALWKTMLKKLGTMLHAGKAAALGAAADTISQGTQ	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>
Precursor de dermaseptina AA-2-5	GLVSGLLNTAGLLGDLGSLGSLSG	<i>Agalychnis annae</i>
Dermaseptin PD-2-2 precursor	ALWKTLLKKVGVAGKAVLNAVTDNMANQNEQ	<i>Pachymedusa dacinicolor</i>
Dermaseptina B2	GLWSKIKEVGEAAKAAKAAAGKAAALGAVSEAV	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Dermaseptina 2	ALWFTMLKKLGTMLHAGKAAALGAAANTISQGTQ	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>
Precursor de dermaseptina AA-3-1	SLWSKIKEMAATAGKAAALNAVTDGMVNV	<i>Agalychnis annae</i>
Precursor de dermaseptina PD-3-3	GMWSKIKNAGKAAKASKKAAGKAAALGAVSEAL	<i>Pachymedusa dacinicolor</i>
Dermaseptina B3	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLVGAES	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Dermaseptina 3	ALWKNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLVGAES	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>
Precursor de dermaseptina AA-3-3	GMFTNMLKGIGKLAGQAALGAVKTLA	<i>Agalychnis annae</i>
Precursor de dermaseptina PD-3-6	GVVTDLLNTAGLLGNLVGSLSG	<i>Pachymedusa dacinicolor</i>
Dermaseptina B4	ALWKDILKNVGAAGKAVLNTVTDVMVNV	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Dermaseptina 4 (DS IV)	ALWMTLLKKVLAALNAVLVGGANA	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>
Precursor de dermaseptina AA-3-4	GMWGSLLKGVATVVKHVLPHALSSQQS	<i>Agalychnis annae</i>
Precursor de dermaseptina PD-3-7	LLGDLLGQTSKLVNDLTDVGSIV	<i>Pachymedusa dacinicolor</i>
Dermaseptina B5	GLWNKIKEAASKAAGKAAALGFVNEMV	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Dermaseptina 5 (DS V)	GLWSKIKTAGKSVAKAAKAAVKAVTNAV	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>
Precursor de dermaseptin AA-3-6	GMWSTIRNVGKSAKAAALPAKAAALGAISEAV	<i>Agalychnis annae</i>
Dermaseptina B6	ALWKDILKNAGKAAALNEINQLVNV	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Precursor de dermaseptin DRG1(Dermaseptin 1)	GLWSNIKTAGKEAAKAAALKAAGKAAALGAVTDAV	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Precursor de dermaseptin DRG2(Dermaseptin 2)	GLWSKIKEAGKAAALTAAGKAAALGAVSDAV	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Precursor de dermaseptin DRG3(Dermaseptin 3)	ALWKTIKAGAGKMGISLAKNLLGSQAQPES	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Dermaseptina 01 (DS 01)	GLWSTIKQKGEAAIAAKAAAGQAALGAL	<i>Phyllomedusa oreades</i>
Precursor de phylloxina	GWMSKIASGIGTFLSGMQQ	<i>Phyllomedusa bicolor</i>
Precursor de dermaseptina SI	ALWKTMLKKLGTMLHAGKAAALGAAADTISQGTQ	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>
Precursor de dermaseptina sVIII	ALWKTMLKKLGTVALHAGKAAALGAAADTISQ	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>
Precursor de dermaseptina sVII	GLWKSLLKNVGAAGKAALNAVTDVMVNV	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>
Precursor de dermaseptina sVI	GLWSKIKTAGKAAKAAKAAAGKAAALNAVSEAI	<i>Phyllomedusa sauvagei</i>

Seqüências obtidas a partir de busca por dermaseptinas no banco de dados *Swiss-prot* (<http://www.expasy.org>) e nos artigos referendados no presente documento.

B. Estrutura

Peptídeos da família das dermaseptinas possuem de 24 a 34 resíduos de aminoácido, e apresentam, quase em sua totalidade, um resíduo de triptofano na 3ª posição N-terminal, embora substituições deste por metionina ou valina já tenham sido descritas (Mor *et al.* 1994; Brand *et al.* 2002). Existem outros peptídeos que apresentam o mesmo ancestral gênico das dermaseptinas, a exemplo das phylloxinas, o que torna a definição dessas moléculas por sua estrutura primária mais complexa (Pierre *et al.* 2000; Chen *et al.* 2005).

As dermaseptinas possuem carga positiva líquida que varia de 2 a 5, com maior frequência de resíduos de lisina (K) que de arginina (R) ou histidina (H). Prevalência de resíduos de lisina sobre outros positivamente carregados também é comum a todos os peptídeos antimicrobianos. Para resíduos hidrofóbicos de cadeia linear, são mais frequentes leucina (L), isoleucina (I), alanina (A) e valina (V) (Antimicrobial peptide database - <http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic.php>). Em relação a outros peptídeos antimicrobianos, as dermaseptinas não demonstram extremos de hidrofobicidade, quando o parâmetro é computado para todo o peptídeo (Dathe e Wieprecht 1999). Apresentam porém, consistentemente, motivos hidrofóbicos em torno de seis resíduos na região média da cadeia polipeptídica. O momento hidrofóbico (M_H) dos membros dessa família é próximo a 1, havendo separação de cargas e assim anfifilicidade (para uma definição de momento hidrofóbico, consultar página 95). Contudo, quando comparados à totalidade de AMPs, nota-se que esse M_H é pequeno, indicando baixa segregação relativa de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos. Acredita-se que o ótimo de atividade antimicrobiana em função das propriedades físico-químicas não esteja em seus extremos (Gaidukov *et al.* 2003; Rotem *et al.* 2006). Uma explicação detalhada dos parâmetros físico-químicos de peptídeos antimicrobianos pode ser encontrada no capítulo 3.

Experimentos de dicroísmo circular (CD), assim como de ressonância magnética nuclear (NMR), demonstram uma tendência à estruturação em α -hélice ao entrar em contato com solventes orgânicos, vesículas fosfolipídicas ou micelas de detergentes (Lequin *et al.* 2003; Castiglione-Morelli *et al.* 2005; Lequin *et al.* 2006). O grupo de peptídeos antimicrobianos que obtém caráter anfifílico a partir de sua estruturação em α -hélice é o mais comum, e as dermaseptinas são um exemplo clássico (Dennison *et al.* 2005). O grau de estruturação varia entre os peptídeos na porcentagem final de hélice e no grau de estruturação em função da concentração de agente helicogênico (Pouny *et al.* 1992). Apesar de saber-se que o grau de estruturação secundária está correlacionado à atividade antimicrobiana dos peptídeos, nenhum estudo foi capaz de apontar correlação simples entre ambas grandezas (Dathe e Wieprecht 1999).



Figura 2.2. Representação em fitas da estrutura do peptídeo DS 01. Estruturação em α -hélice de DS 01, estudada por RMN, ao interagir com micelas de SDS. As regiões N e C terminais estão representadas. Retirado e modificado de Castiglione-Morelli *et al.* 2005.

Modificações pós-traducionais em membros dessa família são incomuns, com exceção de carboxiamidação do C-terminal da cadeia polipeptídica (Shalev *et al.* 2002). Estas ocorrem em mais da metade dos membros já descritos, e o sinal para tal processamento já foi identificado na estrutura gênica (Fleury *et al.* 1998; Brand *et al.* 2006). Esta modificação altera a distribuição eletrônica da molécula, substituindo a carga negativa do carboxilato (COO^-) pelo grupamento neutro carboxiamida (NH_2^+). Acredita-se que seu principal efeito seja a modulação da atividade biológica dos peptídeos pela estabilização da estrutura em α -hélice, por prover uma ponte de hidrogênio adicional (White e Wimley 1999; Shalev *et al.* 2002). O papel da amidação na atividade de outras moléculas antimicrobianas já foi demonstrado variar de nulo à redução ou aumento de atividade biológica, porém nenhum estudo foi realizado diretamente com DSs (Yeaman e Yount 2003).

Alguns trabalhos relatam que a porção N-terminal das dermaseptinas estrutura-se ao interagir com membranas mesmo quando peptídeos são sintetizados truncados (Mor e Nicolas 1994; Feder *et al.* 2000). Análogos do peptídeo dermaseptina S4, de *Phyllomedusa sauvagei*, foram gerados e estudados com relação à sua capacidade de estruturação comparativa ao peptídeo nativo (Kustanovich *et al.* 2002). Esse estudo demonstrou que os análogos $\text{K}_4\text{S}_4(1-16)\text{a}$ e $\text{K}_4\text{S}_4(1-13)\text{a}$, compostos somente dos 16 e 13 primeiros resíduos, respectivamente, apresentam grau de estruturação compatível com o peptídeo nativo (Kustanovich *et al.* 2002). Análogos compostos somente da porção C-terminal não tiveram o mesmo comportamento. Acredita-se também que a porção N-terminal da molécula seja fundamental para a manutenção da atividade (Mor e Nicolas 1994).

Peptídeos antimicrobianos pertencentes ao sistema imune inato devem necessariamente ser solúveis, porém capazes de interagir com membranas de microorganismos (Yeaman e Yount 2003). O ajuste de solubilidade é dado pela hidrofobicidade, propriedade que deve ser mantida dentro de limites. Moléculas muito hidrofóbicas tendem a agregar e sair de solução, enquanto que moléculas demasiadamente hidrofílicas não são capazes de interagir com a região apolar de membranas (Tossi *et al.* 2000). A formação de agregados em dermaseptinas, apesar de sua hidrofobicidade moderada, já foi demonstrada por espalhamento de luz (LS) e pela supressão de sinal do fluoróforo conjugado, rodamina (Feder *et al.* 2000). A formação de agregados é termodinamicamente favorável devido ao ganho entrópico decorrente da exposição de resíduos hidrofílicos e enterramento dos hidrofóbicos dentro de complexos moleculares de tamanho indefinido. Experimentos com dermaseptina S4 e com seus análogos indicam que o grau de agregação está positivamente correlacionado com a ausência de seletividade (Feder *et al.* 2000; Kustanovich *et al.* 2002). A seletividade de um peptídeo normalmente é dada como a razão entre sua concentração inibitória mínima (MIC) para determinado microorganismo e a concentração capaz de induzir lise em eritrócitos (Feder *et al.* 2000). Peptídeos pouco seletivos são microbicidas e induzem lise de eritrócitos em concentrações próximas, portanto têm índice de seletividade próximo a 1 (Feder *et al.* 2000). Dermaseptina S4 apresenta-se majoritariamente agregada e é pouco potente contra microorganismos, porém bastante hemolítica. Já análogos não agregados revertem o quadro, com alta atividade antimicrobiana e baixa hemólise (Feder *et al.* 2000). Devido o pequeno grupo de moléculas testado, essa constatação não pode ser elevada à regra para todo o conjunto de dermaseptinas.

C. Atividade biológica

Dermaseptinas são geralmente citadas como exemplos de peptídeos com potente atividade antimicrobiana, de amplo espectro e de alta seletividade (Tossi *et al.* 2000). Isto pode ser dito regra para essa família de peptídeos desconsiderando exceções, como a dermaseptina S4 (Mor *et al.* 1994). Uma avaliação quantitativa dentro do grupo das DSs para a determinação de tendências na relação entre as propriedades físico-químicas e

atividade a partir dos dados da literatura sofre de restrições. A maioria dos testes antimicrobianos é executado pelo método de microdiluição e determinação de MIC, conforme previamente descrito (Bulet *et al.* 1991). Porém, dentre outros problemas, este teste sofre da falta de padronização de inóculo inicial do microorganismo, o qual possui influência direta e fundamental na determinação do MIC. Fica assim impossível comparar dermaseptinas em termos de potência utilizando-se os dados atualmente disponíveis.

- **Antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana contra o fungo *Aspergillus fumigatus* foi a primeira a ser identificada quando a primeira dermaseptina foi isolada no início da década de 90 (Mor *et al.* 1991). A partir daí a lista de microorganismos suscetíveis aumentou bastante, incluindo bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, Gram-negativas, como *Escherichia coli*, além de outros fungos, não só do gênero *Aspergillus* (Mor *et al.* 1991; Mor *et al.* 1994; De Lucca *et al.* 1998). Assim, ficou evidente que tais peptídeos apresentam espectro de ação amplo, não direcionado a estruturas pontuais de determinados microorganismos (Mor *et al.* 1994). Porém, a atividade de um mesmo peptídeo para uma ampla gama de microorganismos pode variar de unidades de micromolar à inatividade, conforme demonstrado para as dermaseptinas de *P. sauvagei* (Mor *et al.* 1994; Brand *et al.* 2002; Lequin *et al.* 2006). Os mesmos testes executados com misturas de dermaseptinas comprovaram que o efeito da combinação de várias delas é maior do que a da soma das partes, demonstrando sinergismo (Mor *et al.* 1994).

- **Hemolítica**

A maior parte das dermaseptinas não apresenta atividade hemolítica nas concentrações próximas ao MIC, conforme demonstrado para DS 01, para as dermaseptinas S, de *P. sauvagei* e dermaseptinas b, de *P. bicolor* (Mor *et al.* 1994; Mor *et al.* 1994; Brand *et al.* 2002). A exceção mais conhecida e mais estudada é dermaseptina S4 (Feder *et al.* 2000). A alta taxa de hemólise e a ineficiência como

antimicrobiano aumentaram o interesse em suas propriedades físico-químicas. Hoje acredita-se que o principal motivo de sua baixa seletividade seja seu alto grau de agregação em solução (Feder *et al.* 2000). Dentre as moléculas seletivas, Brand e colaboradores demonstraram que DS 01 é capaz de discriminar entre células de *Trypanosoma cruzi* e de eritrócitos na mesma mistura de sangue, sendo efetivo contra o primeiro e inerte contra o segundo (Brand *et al.* 2002). Também foi demonstrado que não há alterações estruturais detectáveis nos eritrócitos após a incubação com esse peptídeo, tanto por microscopia de luz quanto por microscopia de força atômica. Além disso, DS 01 não causou lise em nenhuma das células sanguíneas, conforme revelado por citometria de fluxo (Brand *et al.* 2002).

- **Anti-protozoária**

Dermaseptinas são eficientes agentes anti-protozoários. *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas em forma tripomastigota foi suscetível a uma série de moléculas, tais quais DS 01, e DD K e DD L (Brand *et al.* 2002). Porém o exemplo mais interessante de atividade anti-protozoária vem de dermaseptina S3, capaz de matar formas intra-eritrocíticas de *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária, sem causar lise celular em hemácias (Ghosh *et al.* 1997).

- **Anti-viral**

A atividade mais recentemente descrita para peptídeos antimicrobianos é a inibição de infecções virais. Foi demonstrado que dermaseptina S4, e principalmente análogos de menor toxicidade, são capazes de inibir a infecção por HIV-1 em culturas de células epiteliais de endométrio e de células T *in vitro* (Lorin *et al.* 2005). As concentrações utilizadas foram em escala nanomolar, sub-líticas para atividade antimicrobiana. Também a infecção de células dermais pelo vírus simples da herpes 1, foi inibida pelas dermaseptinas (s1-s5) (Belaid *et al.* 2002). Acredita-se que o mecanismo de ação seja diretamente na partícula viral, já que o peptídeo S4, o mais potente, só foi efetivo nas fases infectivas, ao contrário do aciclovir, droga controle (Lorin *et al.* 2005).

Assim como para microorganismos, a inibição de infecção das células dermais por vírus é papel do sistema imune inato. Chinchar e colaboradores demonstraram que vários peptídeos de anfíbios e de peixes têm atividade anti-viral, e que essa não é exclusiva às dermaseptinas (Chinchar *et al.* 2004).

2.1.3. Justificativa e objetivos específicos

Embora bancos de dados de peptídeos antimicrobianos contenham informações sobre a estrutura primária de mais de 500 moléculas até o ano de 2007 (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), o uso efetivo destas como fármacos ainda não é uma realidade. A aplicação de peptídeos como agentes sistêmicos depende da compreensão de suas características essenciais. Mesmo que se registrem progressos na identificação e compreensão destas características, poucos dados conclusivos foram obtidos. Assim, até que as propriedades físico-químicas de peptídeos antimicrobianos sejam compreendidas por completo, a identificação de novas seqüências gerará novas possibilidades. Dermaseptinas são moléculas com ação potente e seletiva, e por isso ocupam uma posição de destaque entre antimicrobianos. Dado este cenário, os objetivos específicos deste trabalho são:

- Identificar e seqüenciar novas moléculas antimicrobianas da família das dermaseptinas em *P. hypochondrialis*
- Testar a atividade antimicrobiana e anti-protozoária de no mínimo uma dermaseptina
- Determinar o perfil de expressão das dermaseptinas em um fragmento de pele de *P. hypochondrialis*
- Determinar a afinidade de dermaseptinas por membranas modelo pela técnica de ressonância plasmônica de superfície com objetivo de compreender suas interações com membranas de microorganismos.

2.2. Material e métodos

*** A metodologia de purificação e seqüenciamento de dermaseptinas é a mesma apresentada no capítulo 1, e portanto nos limitaremos a relatar o que não é compartilhado.**

A. Coleta da secreção cutânea. Referir-se ao mesmo tópico na seção material e métodos do capítulo 1 (página 19).

B. Purificação dos peptídeos. Referir-se ao mesmo tópico na seção material e métodos do capítulo 1 (página 19).

C. Degradação de EDMAN (página 19). Referir-se ao mesmo tópico na seção material e métodos do capítulo 1.

D. Alinhamento de seqüências (página 19). Referir-se ao mesmo tópico na seção material e métodos do capítulo 1.

E. Geração de Imagens por MALDI (IMS). Referir-se ao mesmo tópico na seção material e métodos do capítulo 1 (página 20).

F. Espectrometria de massa e seqüenciamento *de novo*. Referir-se ao mesmo tópico na seção material e métodos do capítulo 1 (página 20).

G. Atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana do peptídeo DShypo 01 foi investigada contra *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 43300 (American Type Culture Collection). Os microorganismos foram cultivados em cultura estacionária a 37°C e então transferidos para o meio líquido de cultura Mueller-Hinton (National Comitee for Clinical Laboratory standards) no qual os testes foram feitos. Os testes de inibição do crescimento bacteriano foram feitos conforme descrito (Bulet *et al.* 1991). O peptídeo foi dissolvido e diluído oito vezes em meio Mueller-Hinton, sendo sua

concentração máxima de $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O inóculo inicial de bactérias foi de $2,5 \times 10^8$ cfu.mL⁻¹ (0,5 na escala McFarland). O volume final foi de 200 μL , sendo 100 μL do peptídeo testado e os outros 100 μL do inóculo. O experimento foi feito em cultura estacionária a 37°C e as medidas espectrofotométricas foram feitas 12 horas após a incubação. A concentração inibitória mínima (MIC) foi calculada a partir da densidade óptica ($A_{595\text{nm}}$) e é o resultado de três medidas independentes. Antibióticos convencionais (amoxicilina, imipinem, ceftazidima e trimethoprim) tiveram seus MICs determinados para as duas bactérias testadas por análise bioquímica automática (Vitek, bioMerieux Inc.).

H. Teste anti-Leishmania. *Leishmania amazonensis* foi isolada de lesões cutâneas de camundongos e mantida em forma promastigota a 26°C em meio RPMI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) contendo 10 % de soro fetal bovino inativado, 200 U de penicilina.mL⁻¹ e 200 mg de estreptomicina.mL⁻¹. As células foram coletadas na fase log tardia, ressuspensas em meio de cultura, contadas na câmara de Neubauer e ajustadas a concentração de 2×10^7 células.mL⁻¹. Os peptídeos foram então adicionados às culturas na faixa de concentração de 1 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e incubados a 26°C. Após 2 e 6 horas de incubação, os parasitas foram contados e comparados ao controle. Desaparecimento ou imobilidade dos parasitas foi considerado como efeito das drogas. Os experimentos foram feitos em triplicatas. Antimoniato de meglumina (glucantima) foi usado como droga referência.

I. Confeção de vesículas grandes unilamelares (LUVs). 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DMPC) foi comprado da Avanti Polar Lipids. Cinco miligramas foram determinados gravimetricamente, dissolvidos em clorofórmio a 1 mg.mL⁻¹ e secados em um rota-evaporador até a formação de um filme lipídico, deixado posteriormente sob vácuo por 4 horas. O filme foi ressuspendido em 5 mL de tampão (20 mM de fosfato de sódio, 150 mM de NaCl, pH 7,4, filtrado e degaseificado) e agitado. Após 30 minutos, a suspensão foi passada por uma membrana de policarbonato de 100 nm por 19 vezes com o auxílio do mini-extrusor da Avanti Polar Lipids (Abdiche e Myszka 2004).

J. Mensurações de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) e análise dos dados.

Um 'chip sensor' L1 foi acoplado a um biosensor Biacore 3000 e hidratado em tampão (20 mM de fosfato de sódio, 150 mM de NaCl, pH 7,4, filtrado e degaseificado) durante a noite. Antes do uso, a superfície do 'chip sensor' foi condicionada pela injeção de 10 µL de 100 mM de HCl/isopropanol (50/50 v/v) a um fluxo de 20 µL.min⁻¹. Em seqüência, o fluxo foi ajustado para 2 µL.min⁻¹ e LUVs de DMPC foram injetadas por 600s. Logo após, o fluxo foi ajustado para 50 µL.min⁻¹ e 25 µL de uma solução de 10 mM de NaOH foi injetado para a remoção de vesículas fracamente ligadas à superfície do 'chip sensor'. O fluxo foi novamente alterado para 10 µL.min⁻¹ e séries de concentrações de DShypo 01 e DS 01, de 0,625 a 10 µM, foram injetadas por 300 segundos, tendo sua dissociação observada por outros 600 segundos. Para os experimentos de monitoramento de interação inespecífica, as soluções de LUVs de DMPC foram substituídas pelo tampão em questão. Os dados foram 'plotados' usando os softwares BIAEvaluation v3.1 e CLAMP (Myszka e Morton 1998).

K. Contagem de leucócitos e análise dos parâmetros hematológicos. Dados adquiridos de acordo com o International Council for Standardization in Haematology Guidelines para a análise do efeito das drogas nas células sanguíneas e do NCCLS para a referência dos parâmetros leucocitários. Sangue venoso foi coletado em cubetas Sarstedt (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) com K2-EDTA como anticoagulante. Todas as amostras foram guardadas em temperatura ambiente e analisadas 4 horas após a coleta. Contagem de leucócitos (WBC) e parâmetros hematológicos foram feitos conforme descrito (Sachse *et al.* 1999). Alíquotas de sangue humano foram incubadas com DShypo 01 a 37°C durante 30 e 60 minutos. A concentração final do peptídeo em solução foi de 42,3 µM. Contagem total dos parâmetros foi feita em 200 µL de sangue utilizando o citômetro de fluxo automático Cell-Dyn 3500 SC/SL (Abbott Labs., Abbott Park, IL). Os dados obtidos são o resultado de três medidas independentes.

L. Clonagem do cDNA. Após da coleta da secreção cutânea, a pele de um espécime de *P. hypochondrialis* foi cirurgicamente extraída e imediatamente congelada em nitrogênio líquido. O tecido da pele foi então pulverizado com um mortar e quatro alíquotas de

aproximadamente 100 mg do pó resultante foram utilizadas para a extração total do RNA usando Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e a quantidade do RNA foi verificada por eletroforese em um gel de agarose e por análise espectrofotométrica, respectivamente. Um µg de RNA total foi usado como molde para a síntese da primeira fita de cDNA, usando o kit Superscript Reverse Transcriptase (Invitrogen). Após 2 horas, a reação foi terminada pela adição de 100 µL de tampão tricina (Tricina-KOH – pH 8,5 a 10 mM, 1mM EDTA). Reações 3'-RACE foram realizadas a partir do resultado da síntese da 2ª fita de cDNA usando como oligonucleotídeos, PPS-2(5' ATGGCTTTCCTGAARAARTCBCTTTTYCTTGTATTATTTCTCGG3'), desenhado a partir de um peptídeo sinal conservado previamente descrito, e também com o oligonucleotídeo reverso, NOT-1-REV (5'-TCGCGAGCGGCCGCCCTTTTT-3'), presente no oligonucleotídeo oligo-DT usado na síntese da primeira fita de cDNA. Os parâmetros dos ciclos de reação foram os seguintes: 94°C/30 s e 72°C/120 s; 25 ciclos de 94°C/30 s e 68°C/180 s. Os resultados dos PCR foram separados e visualizados por eletroforese em um gel de agarose 1 %. Os fragmentos de DNA de 300-400 pb foram excisados do gel e purificados utilizando o kit Wizard SV Gel Clean-up System (Promega). Os fragmentos purificados foram usados em uma reação de ligação usando o sistema de vetor pGEM-T Easy Vector System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Após a diálise da mistura, alíquotas foram usadas para a transfecção em *E. coli* (DH5α). O plaqueamento foi feito usando placas LB-seletivas e os clones positivos foram transferidos para uma placa de 96 poços. Reações de PCR foram feitas usando um termociclador MJ PTC-100 (MJ Research Inc). O seqüenciamento foi realizado usando o método de terminação de cadeia dideoxi em um sistema ABI Prism® 3700 DNA Analyzer com terminador BigDye™ e polímero POP-5™ (Applied Biosystems) usando o software de análise de seqüências 'Lasergene® sequence analysis software' (DNASTAR, Inc.).

2.3. Resultados

2.3.1. Purificação dos peptídeos. O fracionamento do extrato total de *Phyllomedusa hypochondrialis* foi realizado por HPLC em uma coluna de fase reversa e gerou mais de 50 frações, podendo estas conter um ou mais compostos (figura 2.3); aquelas contendo os peptídeos de interesse foram submetidas a RP-HPLC em colunas analíticas de fase reversa (figuras 2.4A, D, F, H e J). A análise monoisotópica da massa de tais peptídeos, assim como a avaliação de seu grau de pureza estão demonstradas nas figuras 2.4B (DSHypo 01, $[M+H]^+$ = 2409,41 Da), 2.4C (DSHypo 02, $[M+H]^+$ = 2868,36 Da), 2.4E (DSHypo 03, $[M+H]^+$ = 3352,96 Da), 2.4G (DSHypo 04, $[M+H]^+$ = 3236,84 Da), 2.4I (DSHypo 05 = DS 01 (Brand *et al.* 2002), $[M+H]^+$ = 2793,76 Da), e 2.4J (DSHypo 06, $[M+H]^+$ = 3252,96 Da).

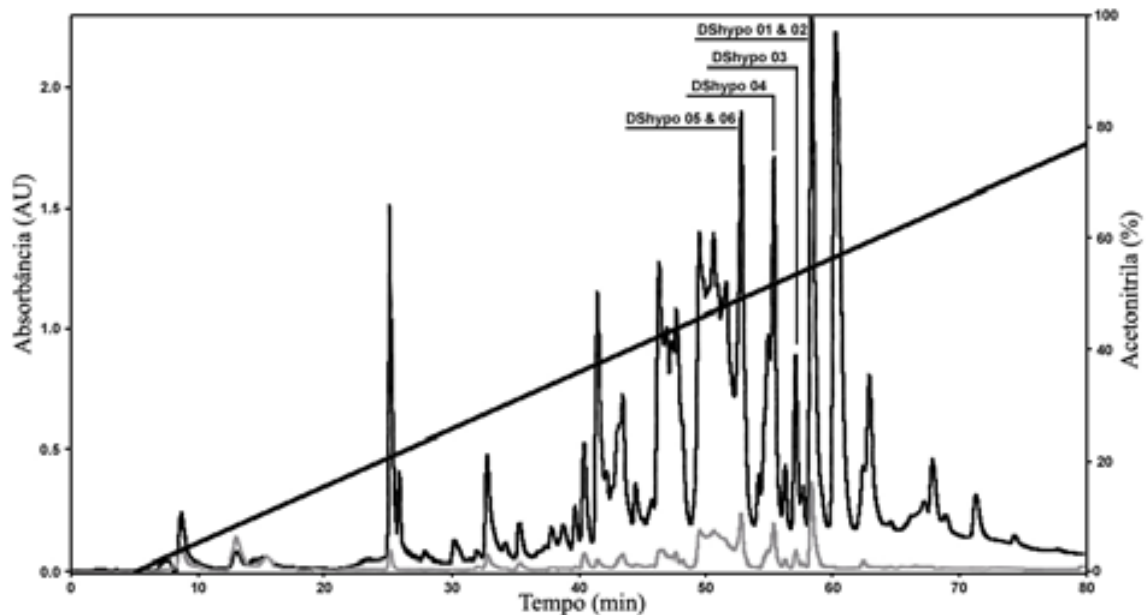


Figura 2.3. Perfil cromatográfico do fracionamento do extrato total de *Phyllomedusa hypochondrialis*. As frações de interesse (DS 01 = DShypo 05 & DShypo 06, DShypo 04, DShypo 03, e DShypo 02 & 01) foram eluídas a 48,3, 48,9, 56,4 e 58,3% de acetoneitrila/0,1% TFA, respectivamente. O experimento foi monitorado a 216 nm (linha negra) e 280 nm (linha cinza).

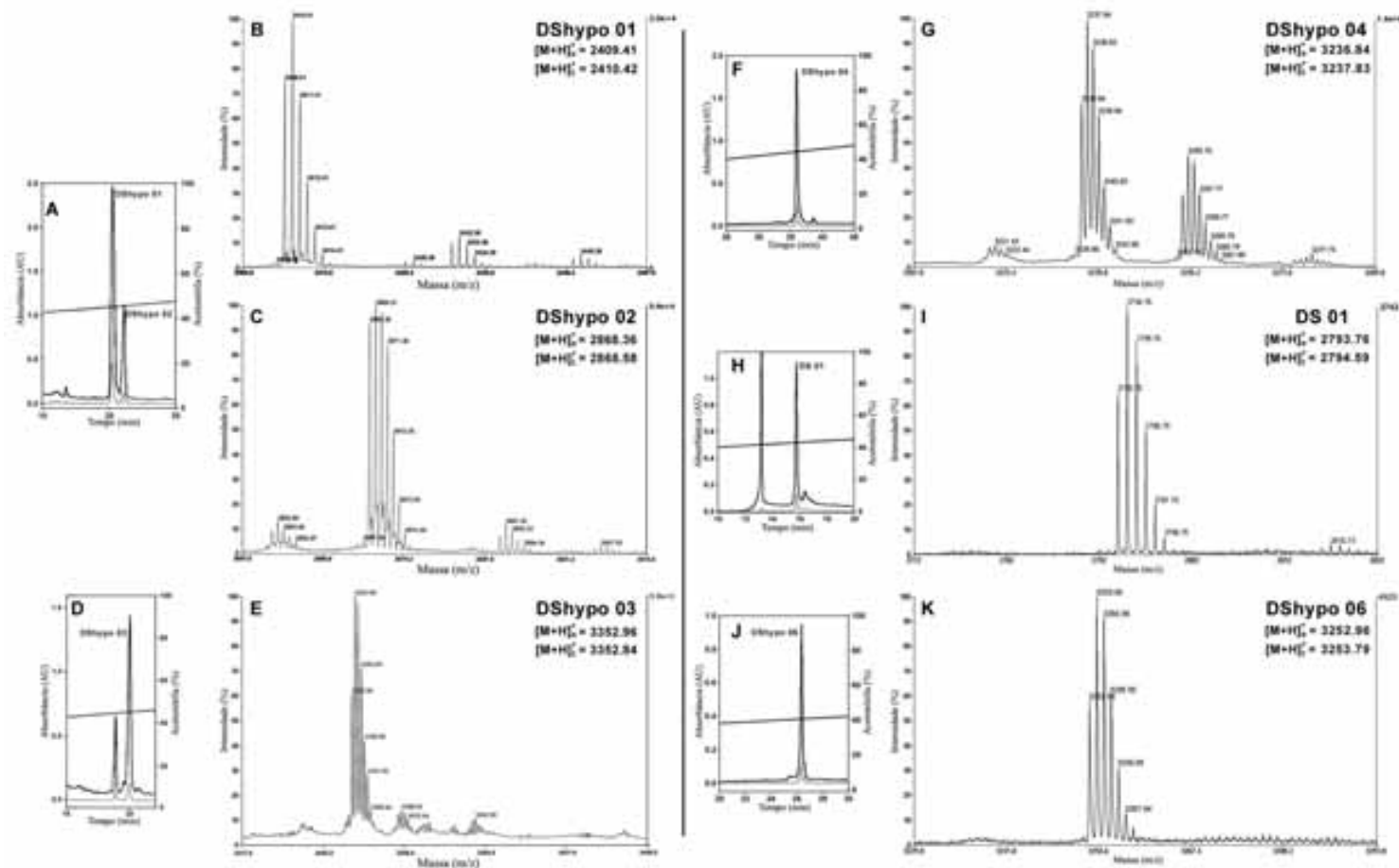


Figura 2.4. Purificação analítica de dermaseptinas. Estágio final de purificação das frações (A. DShypo 01 & 02; D. DShypo 03; F. DShypo 04; H. DS 01; J, DShypo 06) foi realizado em colunas analíticas de RP-HPLC. Espectros de massa MALDI-TOF das frações contendo B. DShypo 01 ($[M+H]^+ = 2409,41$ Da), C. DShypo 02 ($[M+H]^+ = 2868,36$ Da), E. DShypo 03 ($[M+H]^+ = 3352,96$ Da), G. DShypo 04 ($[M+H]^+ = 3236,84$ Da), I. DS 01 ($[M+H]^+ = 2793,76$ Da) e K. DShypo 06 ($[M+H]^+ = 3252,96$ Da). $[M+H]^+_t$ = massa monoisotópica teórica. $[M+H]^+_e$ = massa monoisotópica experimental.

2.3.2. Seqüenciamento e alinhamento. Os peptídeos de $[M+H]^+ = 2793,76$ Da e $[M+H]^+ = 3208,63$ Da foram purificados em um simples passo cromatográfico, fragmentados por MS/MS e identificados como DS 01, descrito previamente, e a molécula nova DShypo 07 (figura 2.5) (Brand *et al.* 2002). Informações complementares para a determinação dos resíduos isóbaros, de Leu/Ile e Lys/Gln foram obtidos via seqüenciamento N-terminal por degradação de Edman. Todas as outras moléculas foram submetidas à purificação até a homogeneidade e seqüenciamento por degradação de Edman automatizada, e reveladas como pertencentes à família das dermaseptinas. As massas monoisotópicas calculadas para os peptídeos DShypo 01, DS 01, DShypo 04 e DShypo 06 revelaram uma discrepância de aproximadamente $-0,98$ Da quando comparadas às massas experimentais. A diferença entre as massas moleculares experimentais e calculadas revela carboxiamidação na porção C-terminal desses peptídeos, modificação pós-traducional comum em DSs (Mor *et al.* 1994; Brand *et al.* 2002).

As DSs encontradas na secreção cutânea de *P. hypochondrialis* apresentaram alta identidade com outras DSs isoladas da secreção cutânea de *Phyllomedusa bicolor*, conforme descrito na tabela 2.2 (Daly *et al.* 1992). DShypo 01, DS 01, DShypo 04, DShypo 06 e DShypo 07 possuem 50% de identidade, calculada pela seqüência consenso, com o precursor de adenoregulina; DShypo 02 é 75,8% idêntica à DS B IV, enquanto DShypo 03 é 82,3% idêntica à DS B I (Mor *et al.* 1994). À luz desses dados, pode inferir-se que *P. hypochondrialis* e *P. bicolor* compartilham um ancestral recente em comum. Em adição, os genes que codificam Dshypo 01, DS 01, Dshypo 04, Dshypo 06 e Dshypo 07 em *P. hypochondrialis* são provavelmente ortólogos do precursor de adenoregulina em *P. bicolor*, e o mesmo parece ser verdade também para Dshypo 02 e o precursor da dermaseptina B IV e Dshypo 03 e o precursor de dermaseptina B I. Estas moléculas foram depositadas no banco de dados Swiss-prot com os números: DShypo 01 (P84596), DShypo 02 (P84597), Dshypo 03 (P84598), DShypo 04 (P84599), DS 01 (P84600), DShypo 06 (P84601), and DShypo 07 (P84880).

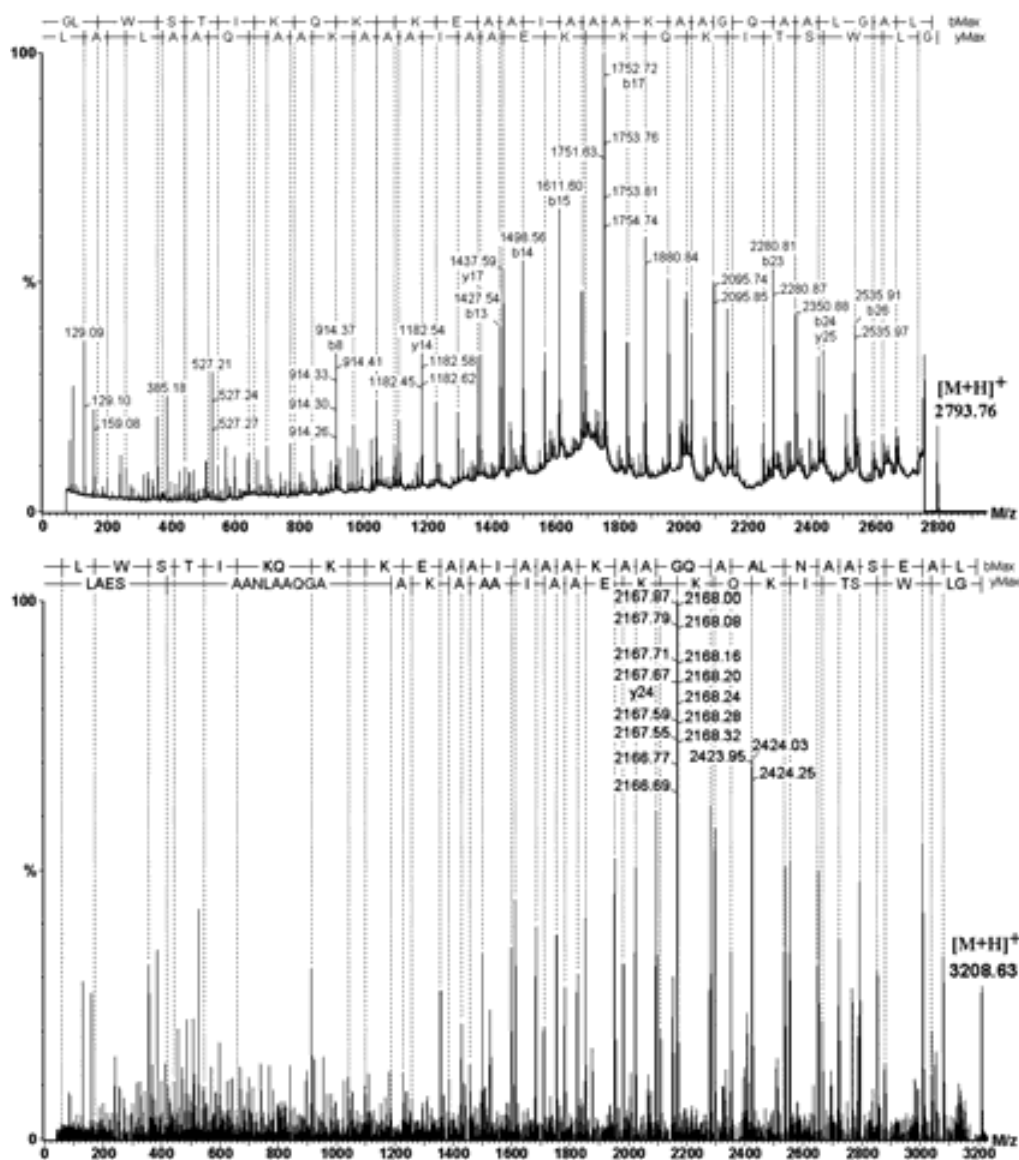


Figura 2.5. Seqüenciamento *de novo* de dermaseptinas. A. DS 01 $[M+H]^+ = 2793,76$ Da e B. DS Shypo 07 $[M+H]^+ = 3208,63$ Da em um Bruker Ultraflex II no modo LIFT. Os fragmentos observados permitiram a identificação completa dos íons das séries y e b. A seqüência peptídica pelo código de uma letra seguindo as séries y e b é mostrada na parte superior do gráfico.

Tabela 2.2. Alinhamento múltiplo de seqüências de *P. hypochondrialis* e DSs de *P. bicolor*.

Peptídeos	Estrutura primária
DS hypo 01	GLWSTIKNVGKEAAIA-----AGKAALG-----AL-NH2
DS 01	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGQAALG-----AL-NH2
ADR precursor (<i>P. bicolor</i>)	GLWSKIKKEVVGKEAAKAAAKAAGKAALG-----AV
DS hypo 04	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGKAVLNAASEAL-NH2
DS hypo 06	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGQAVLNSASEAL-NH2
DS hypo 07	GLWSTIKQKGKEAAIAAAKAAGQAALNSASEAL-NH2
DS hypo 02	GLWKSLLKNVGVAAAGKAALNAVTDMVNQ
DS B IV Prec. (<i>P. bicolor</i>)	ALWKDILKNVGVAAAGKAVLNTVTDMVNQ
DS hypo 03	ALWKDVLKKIGTVALHAGKAAFCAAADTISQGS
DS B I Prec. (<i>P. bicolor</i>)	AMWKDVLKKIGTVALHAGKAALGAVADTISQGS

Alinhamentos foram realizados usando o software 'CLUSTAL V Multiple Sequence Alignment' com penalidade fixa para 'gaps'. 'Gaps' (-) foram introduzidos para maximizar a similaridade entre peptídeos.

2.3.3. Obtenção de imagens por Espectrometria da Massa (IMS). A figura 2.6A ilustra um espécime adulto de *P. hypochondrialis* do qual um fragmento de pele dorsal foi coletado, seccionado e analisado por microscopia de luz (figura 2.6B). A análise por IMS *in situ* da área delineada pelo quadrado da figura 2.6B permitiu a detecção concomitante dos íons correspondentes à cinco DSs (figuras 2.6 C-G) encontradas no dorso de um único espécime. Há um perfil espacial de co-localização discreto entre pares de íons detectados nas imagens espectrais, conforme demonstrado nas figuras 2.6 H-Q. Levando em consideração as DSs descritas no presente estudo, somente DS 01 e DS hypo 07 não foram detectadas pela varredura de massa (figura 2.6 R).

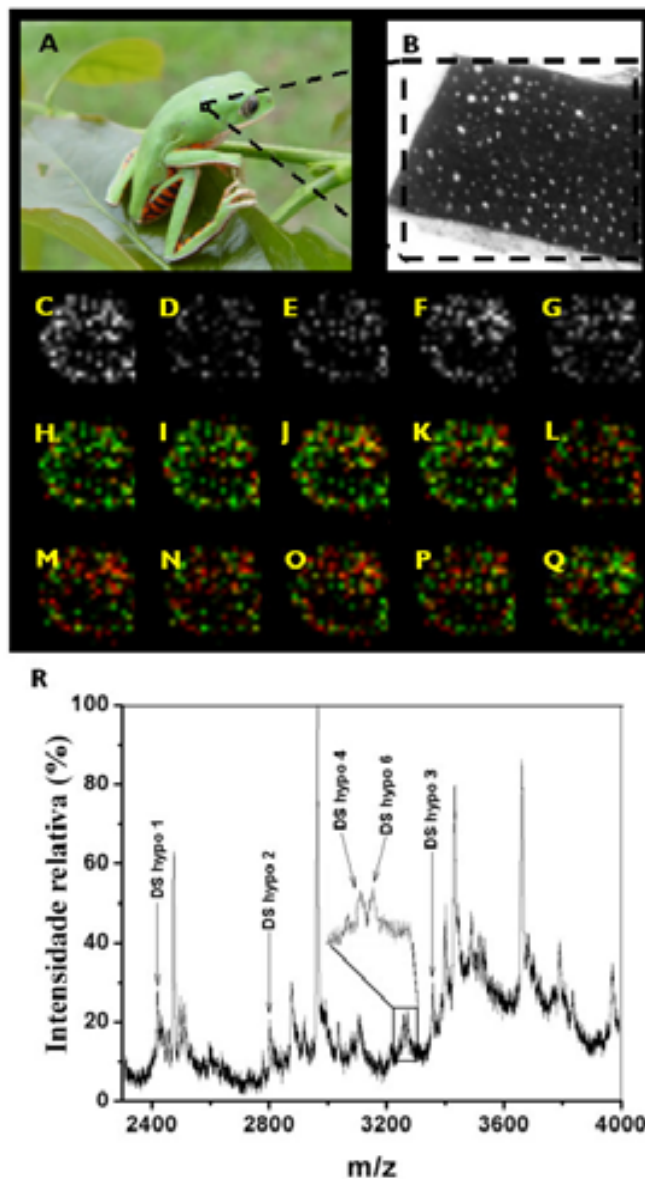


Figura 2.6. Imagens por MALDI IMS da pele de *P. hypochondrialis*. **A.** Espécime adulto de *P. hypochondrialis*. **B.** Micrografia de luz de um pequeno fragmento da pele (1,4 x 1 mm). **C-G.** Imagens espectrais de íons correspondendo às massas de $[M+H]^+$ de DShypo 01, DShypo 02, DShypo 03, DShypo 04 e DShypo 05, respectivamente. **H-Q.** Perfil de co-localização de DShypo 01+DShypo 02, DShypo 01+DShypo 03, DShypo 01+DShypo 04, DShypo 01+DShypo 06, DShypo 02+DShypo 03, DShypo 02+DShypo 04, DShypo 02+DShypo 06, DShypo 03+DShypo 04, DShypo 03+DShypo 06 e DShypo 04+DShypo 06, respectivamente. Áreas em amarelo correspondem às áreas nas quais foram encontrados ambos os íons.

2.3.4. Isolamento e seqüenciamento dos clones de cDNA que codificam DShypo 01.

cDNA completo de DShypo 01 foi clonado e seqüenciado (figura 2.7A). A seqüência deduzida de aminoácidos dos polipeptídeos precursores contém um peptídeo sinal em potencial para a translocação na membrana do retículo endoplasmático (resíduos 1-22) terminando em um resíduo de cisteína. A seqüência sinal é seguida imediatamente por uma pró-região acídica contendo 23 resíduos com um par de resíduos básicos (Lys22-Arg23) em sua porção C-terminal. As regiões que codificam preprodermaseptinas são quase idênticas, exceto pelo peptídeo maduro, indicando que a grande diversidade de DSs foi gerada por eventos de duplicação gênica a partir de um ancestral comum (Vanhoye *et al.* 2003). A figura 2.8 mostra que a região acídica pode ser alinhada com 22 resíduos superpostos (86% de identidade posicional de aminoácidos), enquanto os pro-segmentos acídicos de 22-23 resíduos são alinhados com 78% de identidade posicional (figura 2.8).

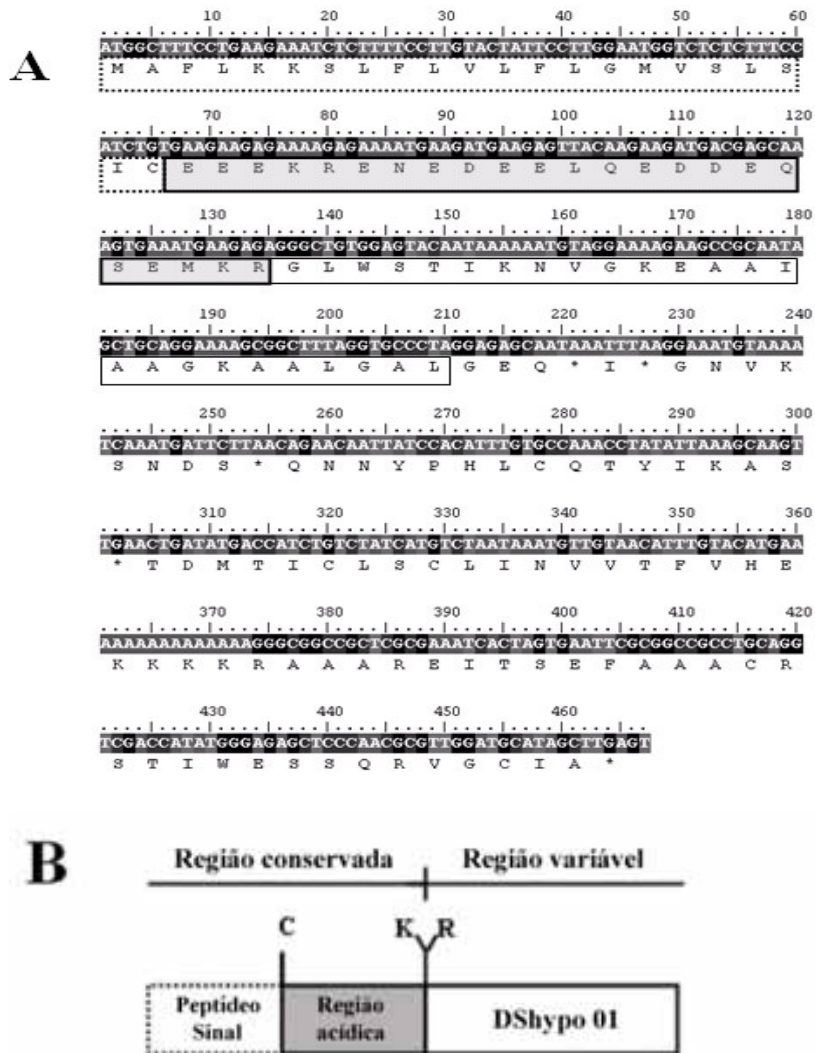


Figura 2.7. Seqüência de nucleótidos do cDNA precursor da dermaseptina DShypo 01 de *P. hypochondrialis*. **A.** O peptídeo sinal (caixa pontilhada), região acídica (caixa cinza), peptídeo maduro processado (caixa sólida) e 'stop codons' (asteriscos) são indicados. **B.** Representação esquemática do precursor de Dshypo 01.

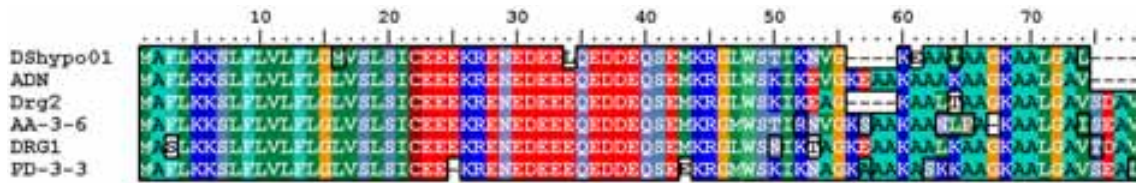


Figura 2.8. Alinhamento das seqüências de aminoácidos dos precursores de membros da família das dermaseptinas. Preprodermaseptina de DS hypo 01 (*P. hypochondrialis*), preproadenoregulina (*P. bicolor*), preprodermaseptina Drg2 (*P. sauvagei*), preprodermaseptina AA-3-6 (*Agalychnis annae*), preprodermaseptina Drg1 (*P. bicolor*), e preprodermaseptina PD-3-3 (*P. danicolor*), incluindo o preptídeo sinal (resíduos 1–22), a pro-peça ácida e o sítio de clivagem Lys-Arg. ‘Gaps’ (-) foram introduzidos para maximizar a similaridade de seqüências.

2.3.5. Atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana do peptídeo DS hypo 01 foi testada contra a bactéria gram-positiva *S. aureus*, e a gram-negativa *E. coli* e comparada com antibióticos convencionais, conforme descrito na tabela 2.3. O peptídeo possui uma atividade distinta entre os microorganismos, tendo uma concentração inibitória mínima (MIC) de 26,5 μM para o primeiro e de 6,6 μM para o segundo. Estes dados estão em consonância com as teorias que indicam diferenciações funcionais entre DSs (Mor *et al.* 1994).

2.3.6. Atividade anti-*Leishmania amazonensis*. Ensaios revelaram que ambos DS 01 e DS hypo 01 são potentes agentes contra a forma promastigota de *L. amazonensis* (figura 2.9). As figuras 2.9A e 2.9B ilustram que quando ambas moléculas são incubadas com as células do protozoário por 2 ou 6 horas na concentração de 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, induzem lise em quase 100% das células. Pode-se observar também que em concentrações de 5 a 20 $\mu\text{g/ml}$ as diferenças entre a potência das DSs descritas e a droga controle (glucantima) não foram significativas. Porém, na faixa de concentração de 30 a 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ambas DSs possuem atividade significativamente maior.

Tabela 2.3. Atividade antimicrobiana da Dshypo 01.

Bactérias	MIC (μM) ^a				
	Dshypo 01	Amoxicilina	Imipinem	Ceftazidima	Trimetopin
S. aureus ATCC 43300	26,5	NDA ^b	NDA ^b	NDA ^b	175
E. coli ATCC 25922	6,6	17	35	40	80

^a MIC, concentração inibitória mínima requerida para a inibição total do crescimento celular em meio líquido.

^b NDA, atividade não detectável.

As análises foram realizadas de acordo com as recomendações do National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) . Os experimentos foram realizados em triplicata.

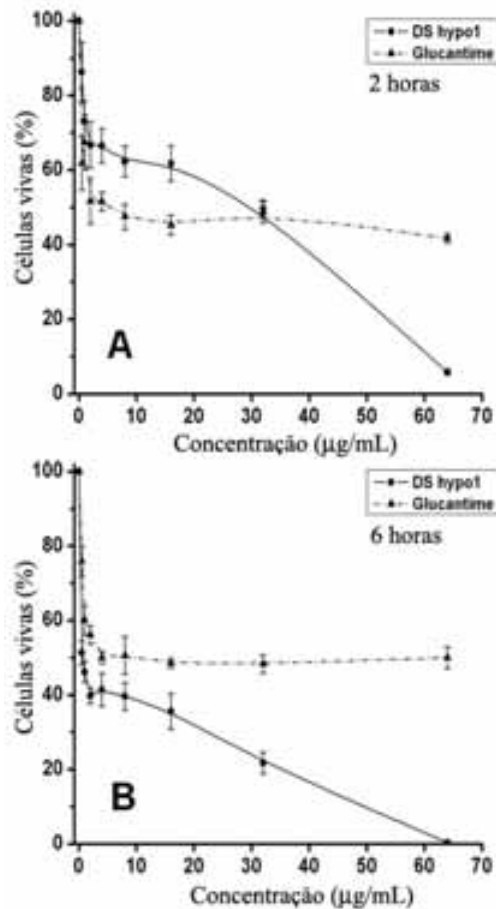


Figura 2.9. Bioensaios anti-*L. amazonensis*. Atividade lítica de DShypo 01, DS 01, e glucantima contra formas promastigota de *L. amazonensis* crescidas em meio RPMI em diferentes tempos de incubação, 2 (A) e 6 horas (B).

2.3.7. Ensaios de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). LUVs de DMPC foram imobilizadas em um 'chip sensor' L1 e acopladas em um instrumento Biacore 3000. Em seqüência, peptídeos foram injetados em uma série de concentrações de 0,625 a 10 μ M, resultando nos sensorgramas da figura 2.10A para DS 01 e 2.10B para DShypo 01. Nota-se que as curvas de ambos os sensorgramas apresentam aumento de sinal com o aumento da concentração de peptídeo e interações que tendem ao equilíbrio dinâmico. Pela diferença de intensidade do sinal de SPR, pode-se assumir que DShypo 01 possui maior afinidade por LUVs de DMPC do que DS 01. Com o objetivo de excluir possíveis interações inespecíficas entre peptídeos catiônicos e a superfície do chip L1, composta por dextrana negativamente carregada, injeções das DSs nas mesmas condições das previamente descritas foram executadas sobre o chip nu. As relações dose-resposta das interações de DS 01 e DShypo 01 com superfícies de LUVs de DMPC e chips nus estão descritas nas figuras 2.10C e D, respectivamente. Estas figuras deixam claro que ambos os peptídeos interagem significativamente com a camada de dextrana, e que esta interação em determinadas concentrações é até mesmo maior do que para superfícies com vesículas imobilizadas.

Estudos mais aprofundados, com variação do nível de captura de LUVs e a subsequente injeção de DS 01 a 10 μ M são representados como sensorgrama e na relação dose-resposta derivada (figuras 2.10E e 2.10F). Estas figuras reforçam a idéia de que para este caso, os sinais de SPR são na verdade a soma de interações específicas e inespecíficas.

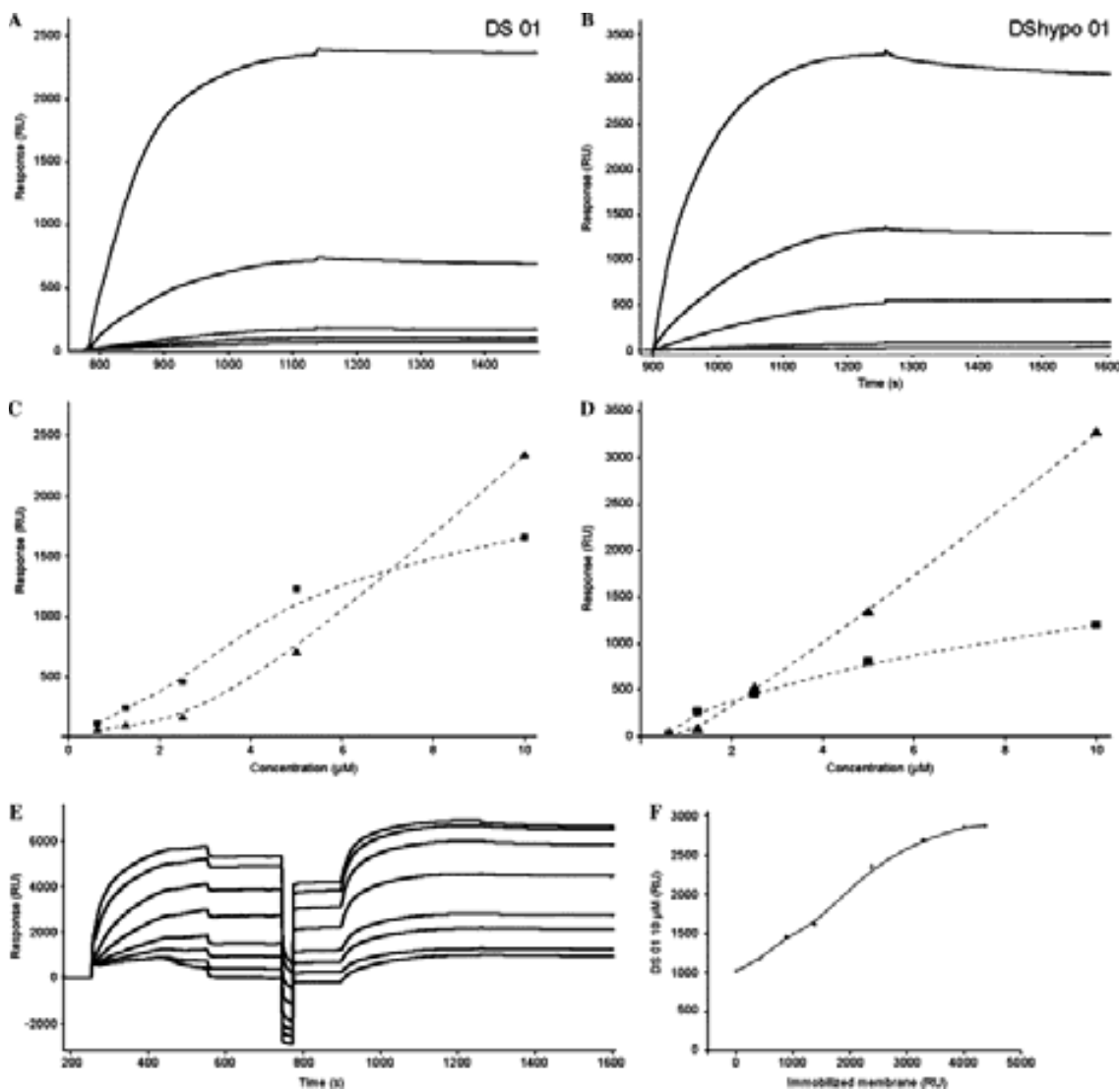


Figura. 2.9. Mensurações de ressonância plasmônica de superfície (SPR) da interação de DS 01 e DS hypo 01 com membranas modelo de DMPC. **A.** Injeções de DS 01 nas concentrações de 0,625 a 10 μM sobre uma superfície de LUVs de DMPC immobilizadas. **B.** Injeções de DS hypo 01 nas mesmas condições. **C.** Relação dose-resposta da interação de DS 01 com LUVs de DMPC immobilizadas (\blacktriangle) e em um chip L1 nu (\blacksquare). **D.** Relação dose-resposta da interação de DS hypo 01 com LUVs de DMPC immobilizadas (\blacktriangle) e em um chip L1 nu (\blacksquare). **E.** Injeção de DS 01 a 10 μM sobre uma superfície de LUVs de DMPC em diferentes níveis de captura (de 1000-3000 RU de membrana immobilizada). **F.** Capacidade de interação de DS 01 com superfícies de DMPC em função dos níveis de captura de lipídeos.

2.3.8. Efeito de DS hypo 01 em leucócitos e análise de parâmetros hematológicos.

DS hypo 01 não apresentou atividade detectável contra células sanguíneas. A tabela 2.4 descreve a contagem total de células de uma amostra de sangue incubada com DS hypo 01

a $64 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($53 \mu\text{M}$) e do controle, no qual o sangue foi submetido ao mesmo tratamento exceto a adição do peptídeo. Análise comparativa dos grupos demonstra que não há diferenças significativas entre as populações do grupo controle e do grupo experimental para todos os tipos celulares examinados. As análises de parâmetros hematológicos não revelaram diferença para o volume plaquetário médio, hematócrito, hemoglobina livre, volume corpuscular médio e contagem total de hemácias (tabela 2.5).

Tabela 2.4. Contagem diferencial de células sanguíneas humanas. DShypo 01 incubado com sangue por 60 min.

Células sanguíneas	Solução salina (controle)	DShypo 01 (53μM)
Leucócitos	$3,73 \pm 0,00$	$4,05 \pm 0,20$
Neutrófilos	$1,64 \pm 0,00$	$1,73 \pm 0,00$
Linfócitos	$1,72 \pm 0,00$	$1,96 \pm 0,00$
Monócitos	$0,23 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,00$
Eosinófilos	$0,02 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$
Basófilos	$0,03 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$

Dados são expressos como uma média aritmética da contagem celular (\pm desvio padrão)

Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram determinadas usando o teste t de Student ($P < 0,05$).

Tabela 2.5. Análise de parâmetros hematológicos em sangue periférico humano. DShypo 01 incubado com sangue por 60 min.

Parâmetros hematológicos	Solução salina (controle)	DShypo 01 (53μM)
Plaquetas (k/mL)	$306,70 \pm 4,40$	$298,66 \pm 1,80$
MPV (fL)	$9,00 \pm 0,00$	$9,09 \pm 0,20$
HCT (%)	$41,71 \pm 0,10$	$42,03 \pm 0,00$
HGB (g/dL)	$3,40 \pm 0,00$	$3,40 \pm 0,00$
MCV (fL)	$90,91 \pm 0,00$	$90,76 \pm 0,30$
MCH (pg)	$32,22 \pm 0,10$	$31,90 \pm 0,10$
RBC (k/mL)	$16,52 \pm 0,20$	$15,93 \pm 0,20$

MPV, volume plaquetário médio, HCT, hematócrito, HGB, hemoglobina livre no sangue, MCV, volume corpuscular médio, MCH, hemoglobina corpuscular média, RBC, glóbulos vermelhos. Os dados são expressos como uma média aritmética (\pm desvio padrão).

2.4. Discussão

A secreção de anfíbios contém uma miríade de peptídeos biologicamente ativos, alguns destes com características estruturais primárias em comum com peptídeos regulatórios endógenos de vertebrados e outros ainda com atividade antimicrobiana (Duda *et al.* 2002). Os últimos são uma esperança no tratamento de doenças emergentes causadas por microorganismos resistentes a antibióticos convencionais (Boman 1995). Peptídeos pertencentes à família das DSs são comuns às glândulas granulares de anfíbios da subfamília Phyllomedusinae e têm atividade contra alguns microorganismos resistentes, além de protozoários causadores de enfermidades como doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e malária (*Plasmodium falciparum*) (Ghosh *et al.* 1997; Brand *et al.* 2002). Da secreção cutânea de *P. hypochondrialis* foram isolados sete peptídeos da família das DSs, fornecendo novas alternativas para a elaboração de fármacos (tabela 2.2). Estes foram purificados e tiveram sua estrutura primária elucidada.

A homogeneização do extrato cutâneo dos anfíbios que precede sua análise faz com que se perca toda a informação dos padrões de expressão das moléculas. Técnicas como imunohistoquímica e de hibridização *in situ* já foram utilizadas com tal propósito, porém dificuldades inerentes a essas fizeram com que poucos estudos fossem executados (Nagalla *et al.* 1994; Lacombe *et al.* 2000). Estudos de IMS são capazes não só de apontar o perfil espacial de determinadas moléculas em determinados órgãos, mas também de sondar sua co-localização (figura 2.9). Nesse trabalho foi demonstrado que a presença das DSs não está restrita à regiões definidas da pele, como glândulas. Contudo, existe compartimentação espacial de tipos específicos de DSs, já que áreas grandes de co-localização não foram detectadas. Acredita-se então que subtipos específicos de glândulas serosas sejam responsáveis pela produção e armazenamento de membros específicos de DSs.

Dos peptídeos estudados, somente DS_{hypo} 01 estava suficientemente concentrado para a condução de ensaios antimicrobianos. Este demonstrou, nos ensaios realizados, atividade semelhante a moléculas já descritas (tabela 2.3) (Mor *et al.* 1994; Brand *et al.* 2002; Leite *et al.* 2005). Sua ação microbicida foi mais evidente na bactéria gram-negativa *E.coli* do que na gram-positiva *S. aureus*, conforme tabela 2.3. Acredita-se que

bactérias gram-negativas sejam mais suscetíveis a peptídeos citolíticos em geral do que bactérias gram-positivas e fungos, provavelmente devido a espessura da parede celular. Os microorganismos aqui testados são importantes agentes patogênicos oportunistas envolvidos em sérios problemas de saúde humana e animal. *E. coli* é um dos principais causadores de males relacionados à segurança alimentar, enquanto infecções oportunistas por *S. aureus* são comuns em pacientes com sistema imune supresso. *S. aureus* também causa doenças supurativas, envenenamento por comida e doenças de pele (Bobin-Dubreux *et al.* 2001).

A estrutura gênica das DSs foi estudada por meio do seqüenciamento do cDNA precursor do polipeptídeo DShypo 01. Este possui estrutura tripartida com um peptídeo sinal, uma pró-região acídica que termina com dois aminoácidos básicos consecutivos (Lys-Arg) e uma seqüência progenitora de dermaseptina (figura 2.7A). Prepro-dermaseptinas apresentam um grau notável de conservação de seus peptídeo-sinais (Vanhoye *et al.* 2003). O cDNA codificador de DShypo 01 apresenta o tripeptídeo Gly-Glu-Gln logo após a região do peptídeo maduro. O processamento desses precursores expõe um resíduo de Gly extra que deve servir de doador de amida para o C-terminal da DS (Zasloff 1987; Mor *et al.* 1991). A alta similaridade geral entre genes de dermaseptinas indica que esses surgem a partir do processo de duplicação de um precursor comum e subsequente diferenciação (Vanhoye *et al.* 2003). O anfíbio *P. hypochondrialis* possui uma ampla distribuição espacial, abrangendo o Brasil, partes da Argentina, Colômbia, Bolívia e Paraguai. Tamanha distribuição geográfica deve ser ligada à plasticidade gênica para a geração de novos peptídeos antimicrobianos, já que esses são parte importante de seu sistema imune inato.

Microorganismos do gênero *Leishmania* causam doenças que apresentam formas clínicas variadas, incluindo a leishmaniose cutânea, muco-cutânea hiperérgica e anérgica difusa. *L. amazonensis* já foi isolada de pacientes com leishmaniose visceral e dérmica pós-kalazar (Barral-Netto *et al.* 1996). As drogas recomendadas para seu tratamento são antimônios pentavalentes, como a glucantima, os quais apresentam toxicidade renal e cardíaca (Barral-Netto *et al.* 1996). Existem outras drogas comercialmente disponíveis, como anfotericina B, aminosidinas e pentamidina, porém todas estas possuem restrições com relação às suas aplicações. Estas devem ser administradas por via parenteral,

resultando em tratamentos longos e custosos, além de possuírem citotoxicidade caracterísitca (Escobar *et al.* 2001; Plock *et al.* 2001). Testes de atividade antimicrobiana contra a forma promastigota de *L. amazonensis* demonstraram que as dermaseptinas DShypo 01 e DS 01, em concentração acima de 10 μ M, são agentes microbicidas mais potentes até mesmo que a droga controle glucantima (figura 2.9). Existem vários compostos leishmanicidas em desenvolvimento, porém um com a capacidade de curar completamente infecções ainda não foi descoberto (Mikus *et al.* 2000; Delorenzi *et al.* 2002).

A elaboração de novas drogas a partir do arcabouço de peptídeos antimicrobianos requer a compreensão das características essenciais que dirigem a afinidade dessas estruturas por membranas. Com esse objetivo, foram analisadas, utilizando a técnica de SPR, a interação entre os peptídeos DS 01 e Dshypo 01 e bicamadas modelo de DMPC. Esta técnica não forneceu dados válidos, devido aos sinais obtidos nos sensorgramas serem a soma de interações específicas com as LUVs e inespecíficas com a camada de dextrana (figura 2.10). A interação inespecífica é resultado da atração eletrostática entre peptídeos antimicrobianos catiônicos e camadas de dextrana carboximetiladas. Esta interação não é exclusiva aos peptídeos estudados, já que dermaseptina B2 já tinha sido demonstrada interagir com a camada de dextrana de 'chips CM5' não derivatizados (Noinville *et al.* 2003). Já que não existe nenhum modelo que considere tais sinais de interação, nenhum dado numérico foi extraído indicando que estudos desta natureza devem ser conduzidos por outras técnicas.

A utilidade do peptídeo DShypo 01 para o tratamento de enfermidades emergentes depende também de sua ação seletiva contra os microorganismos e ausência de toxicidade para as células do hospedeiro. Testes com células sangüíneas de mamíferos demonstram que DShypo 01 não induz hemólise considerável em concentrações de até 53 μ M, a qual é muito superior às concentrações em que este é efetivo contra microorganismos (tabela 2.3). Apesar da ausência de hemólise ser de suma importância para um novo medicamento que se propõe a tratar infecções sistêmicas, o mesmo também deve ser inativo contra leucócitos. Os resultados demonstraram que DShypo 01, assim como o DS 01, não é capaz de alterar as freqüências das populações de células sangüíneas (Brand *et al.* 2002).

Portanto, o efeito lítico das DSs parece estar restrito a microorganismos patogênicos já que estas não induzem danos detectáveis a células de mamíferos. Os aspectos que guiam essa especificidade parecem estar codificados na carga positiva inerente a esses peptídeos e em suas características conformacionais assim como na composição de membrana das células alvo. O estudo de moléculas selecionadas naturalmente como agentes antimicrobianos deve prover novidades nas relações entre estrutura e função e assim ajudar no desenho de moléculas com real valor terapêutico.

2.5. Referências bibliográficas

- Abdiche, Y. N. e D. G. Myszka (2004). "Probing the mechanism of drug/lipid membrane interactions using Biacore." Anal Biochem **328**(2): 233-43.
- Amiche, M., A. A. Seon, T. N. Pierre e P. Nicolas (1999). "The dermaseptin precursors: a protein family with a common preproregion and a variable C-terminal antimicrobial domain." FEBS Lett **456**(3): 352-6.
- Barral-Netto, M., R. L. Von Sohsten, M. Teixeira, W. L. dos Santos, M. L. Pompeu, R. A. Moreira, J. T. Oliveira, B. S. Cavada, E. Falcoff e A. Barral (1996). "In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*." Acta Trop **60**(4): 237-50.
- Belaid, A., M. Aouni, R. Khelifa, A. Trabelsi, M. Jemmali e K. Hani (2002). "In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1." J Med Virol **66**(2): 229-34.
- Bobin-Dubreux, S., M. E. Reverdy, C. Nervi, M. Rougier, A. Bolmstrom, F. Vandenesch e J. Etienne (2001). "Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate *Staphylococcus aureus* susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative." Antimicrob Agents Chemother **45**(1): 349-52.
- Boman, H. G. (1995). "Peptide antibiotics and their role in innate immunity." Annu Rev Immunol **13**: 61-92.
- Brand, G. D., J. R. Leite, S. M. de Sa Mandel, D. A. Mesquita, L. P. Silva, M. V. Prates, E. A. Barbosa, F. Vinecky, G. R. Martins, J. H. Galasso, S. A. Kuckelhaus, R. N. Sampaio, J. R. Furtado, Jr., A. C. Andrade e C. Bloch, Jr. (2006). "Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia)." Biochem Biophys Res Commun **347**(3): 739-46.
- Brand, G. D., J. R. Leite, L. P. Silva, S. Albuquerque, M. V. Prates, R. B. Azevedo, V. Carregaro, J. S. Silva, V. C. Sa, R. A. Brandao e C. Bloch, Jr. (2002). "Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells." J Biol Chem **277**(51): 49332-40.
- Bulet, P., S. Cociancich, J. L. Dimarcq, J. Lambert, J. M. Reichhart, D. Hoffmann, C. Hetru e J. A. Hoffmann (1991). "Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family." J Biol Chem **266**(36): 24520-5.
- Castiglione-Morelli, M. A., P. Cristinziano, A. Pepe e P. A. Temussi (2005). "Conformation-activity relationship of a novel peptide antibiotic: structural characterization of dermaseptin DS 01 in media that mimic the membrane environment." Biopolymers **80**(5): 688-96.
- Chen, T., B. Walker, M. Zhou e C. Shaw (2005). "Dermatoxin and phylloxin from the waxy monkey frog, *Phyllomedusa sauvagei*: cloning of precursor cDNAs and structural characterization from lyophilized skin secretion." Regul Pept **129**(1-3): 103-8.
- Chinchar, V. G., L. Bryan, U. Silphadaung, E. Noga, D. Wade e L. Rollins-Smith (2004). "Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides." Virology **323**(2): 268-75.

- Daly, J. W., J. Caceres, R. W. Moni, F. Gusovsky, M. Moos, Jr., K. B. Seamon, K. Milton e C. W. Myers (1992). "Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10960-3.
- Dathe, M. e T. Wieprecht (1999). "Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells." Biochim Biophys Acta **1462**(1-2): 71-87.
- De Lucca, A. J., J. M. Bland, T. J. Jacks, C. Grimm e T. J. Walsh (1998). "Fungicidal and binding properties of the natural peptides cecropin B and dermaseptin." Med Mycol **36**(5): 291-8.
- Delorenzi, J. C., L. Freire-de-Lima, C. R. Gattass, D. de Andrade Costa, L. He, M. E. Kuehne e E. M. Saraiva (2002). "In vitro activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*." Antimicrob Agents Chemother **46**(7): 2111-5.
- Dennison, S. R., J. Wallace, F. Harris e D. A. Phoenix (2005). "Amphiphilic alpha-helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships." Protein Pept Lett **12**(1): 31-9.
- Duda, T. F., Jr., D. Vanhoye e P. Nicolas (2002). "Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides." Mol Biol Evol **19**(6): 858-64.
- Ersparmer, V. (1994) Amphibian Biology, Heatwole, H., Ed Surray Beaty & Chpping Northon, voll cap 09, pp178-350.
- Escobar, P., V. Yardley e S. L. Croft (2001). "Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice." Antimicrob Agents Chemother **45**(6): 1872-5.
- Feder, R., A. Dagan e A. Mor (2000). "Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity." J Biol Chem **275**(6): 4230-8.
- Fleury, Y., V. Vouille, L. Beven, M. Amiche, H. Wroblewski, A. Delfour e P. Nicolas (1998). "Synthesis, antimicrobial activity and gene structure of a novel member of the dermaseptin B family." Biochim Biophys Acta **1396**(2): 228-36.
- Gaidukov, L., A. Fish e A. Mor (2003). "Analysis of membrane-binding properties of dermaseptin analogues: relationships between binding and cytotoxicity." Biochemistry **42**(44): 12866-74.
- Ghosh, J. K., D. Shaool, P. Guillaud, L. Ciceron, D. Mazier, I. Kustanovich, Y. Shai e A. Mor (1997). "Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis." J Biol Chem **272**(50): 31609-16.
- Hernandez, C., A. Mor, F. Dagger, P. Nicolas, A. Hernandez, E. L. Benedetti e I. Dunia (1992). "Functional and structural damage in *Leishmania mexicana* exposed to the cationic peptide dermaseptin." Eur J Cell Biol **59**(2): 414-24.
- Kustanovich, I., D. E. Shalev, M. Mikhlin, L. Gaidukov e A. Mor (2002). "Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin S4 derivatives." J Biol Chem **277**(19): 16941-51.

- Lacombe, C., C. Cifuentes-Diaz, I. Dunia, M. Auber-Thomay, P. Nicolas e M. Amiche (2000). "Peptide secretion in the cutaneous glands of South American tree frog *Phyllomedusa bicolor*: an ultrastructural study." Eur J Cell Biol **79**(9): 631-41.
- Leite, J. R., L. P. Silva, M. I. Rodrigues, M. V. Prates, G. D. Brand, B. M. Lacava, R. B. Azevedo, A. L. Bocca, S. Albuquerque e C. Bloch, Jr. (2005). "Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus." Peptides **26**(4): 565-73.
- Lequin, O., F. Bruston, O. Convert, G. Chassaing e P. Nicolas (2003). "Helical structure of dermaseptin B2 in a membrane-mimetic environment." Biochemistry **42**(34): 10311-23.
- Lequin, O., A. Ladram, L. Chabbert, F. Bruston, O. Convert, D. Vanhoye, G. Chassaing, P. Nicolas e M. Amiche (2006). "Dermaseptin S9, an alpha-helical antimicrobial peptide with a hydrophobic core and cationic termini." Biochemistry **45**(2): 468-80.
- Lorin, C., H. Saidi, A. Belaid, A. Zairi, F. Baleux, H. Hocini, L. Belec, K. Hani e F. Tangy (2005). "The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro." Virology **334**(2): 264-75.
- Mangoni, M. L., R. Miele, T. G. Renda, D. Barra e M. Simmaco (2001). "The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms." FASEB J **15**(8): 1431-2.
- Mikus, J., M. Harkenthal, D. Steverding e J. Reichling (2000). "In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*." Planta Med **66**(4): 366-8.
- Mor, A., M. Amiche e P. Nicolas (1994a). "Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin." Biochemistry **33**(21): 6642-50.
- Mor, A., K. Hani e P. Nicolas (1994b). "The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms." J Biol Chem **269**(50): 31635-41.
- Mor, A., V. H. Nguyen, A. Delfour, D. Migliore-Samour e P. Nicolas (1991). "Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin." Biochemistry **30**(36): 8824-30.
- Mor, A. e P. Nicolas (1994). "The NH₂-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity." J Biol Chem **269**(3): 1934-9.
- Myszka, D. G. e T. A. Morton (1998). "CLAMP: a biosensor kinetic data analysis program." Trends Biochem Sci **23**(4): 149-50.
- Nagalla, S. R., B. J. Barry e E. R. Spindel (1994). "Cloning of complementary DNAs encoding the amphibian bombesin-like peptides Phe₈ and Leu₈ phyllolitorin from *Phyllomedusa sauvagei*: potential role of U to C RNA editing in generating neuropeptide diversity." Mol Endocrinol **8**(8): 943-51.
- Nicolas, P., D. Vanhoye e M. Amiche (2003). "Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides." Peptides **24**(11): 1669-80.
- Noinville, S., F. Bruston, C. El Amri, D. Baron e P. Nicolas (2003). "Conformation, orientation, and adsorption kinetics of dermaseptin B2 onto synthetic supports at aqueous/solid interface." Biophys J **85**(2): 1196-206.

- Pierre, T. N., A. A. Seon, M. Amiche e P. Nicolas (2000). "Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors." Eur J Biochem **267**(2): 370-8.
- Plock, A., W. Sokolowska-Kohler e W. Presber (2001). "Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania Spp.*" Exp Parasitol **97**(3): 141-53.
- Pouny, Y., D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas e Y. Shai (1992). "Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes." Biochemistry **31**(49): 12416-23.
- Rotem, S., I. Radziszewsky e A. Mor (2006). "Physicochemical properties that enhance discriminative antibacterial activity of short dermaseptin derivatives." Antimicrob Agents Chemother **50**(8): 2666-72.
- Sachse, C., Jahns-Streubel, G., Henkel, E. (1999) Evaluation of leucocyte differential counts from the Cell Dyn 3000 hematology analyzer. Lab. Hematol. **5**, 137-148.
- Shalev, D. E., A. Mor e I. Kustanovich (2002). "Structural consequences of carboxyamidation of dermaseptin S3." Biochemistry **41**(23): 7312-7.
- Tossi, A., L. Sandri e A. Giangaspero (2000). "Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides." Biopolymers **55**(1): 4-30.
- Vanhoye, D., F. Bruston, P. Nicolas e M. Amiche (2003). "Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain." Eur J Biochem **270**(9): 2068-81.
- White, S. H. e W. C. Wimley (1999). "Membrane protein folding and stability: physical principles." Annu Rev Biophys Biomol Struct **28**: 319-65.
- Yeaman, M. R. e N. Y. Yount (2003). "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance." Pharmacol Rev **55**(1): 27-55.
- Zasloff, M. (1987). "Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(15): 5449-53.

Capítulo 3

Categorização funcional de peptídeos membrano-ativos

3.1. Introdução

3.1.1. Membranas plasmáticas e biomiméticas

A. Fosfolipídeos

A demarcação da extensão física de um organismo, assim como a manutenção da condição de não-equilíbrio com seu ambiente, são atribuídas nas células à estruturas denominadas membranas plasmáticas (New 1990). Estas são compostas fundamentalmente por fosfolipídeos, principalmente os glicerídicos, os quais possuem como estrutura geral um grupamento “cabeça”, um corpo de glicerol e duas caudas de ácidos graxos (figura 3.1) (New 1990). Os ácidos graxos estão ligados aos carbonos 1 e 2 do glicerol, enquanto o terceiro carbono liga-se ao fosfato, formando ácido fosfatídico (New 1990). O grupamento fosfato está freqüentemente ligado a álcoois também polares, de fundamental importância nas propriedades físico-químicas destas moléculas. As caudas de ácidos graxos compõem a parte apolar dos fosfolipídeos, conferindo a estas moléculas uma natureza anfifílica.

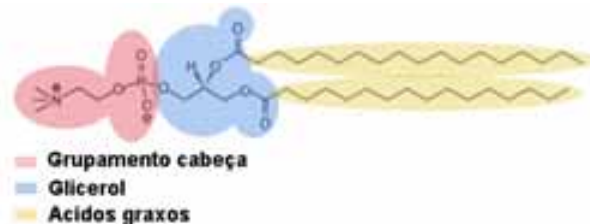


Figura 3.1. Esquema fundamental dos fosfolipídeos, usando como exemplo a molécula de di-miristoil-fosfatidilcolina (DMPC)

Diferentes fosfolipídeos conferem às membranas diversas características, principalmente de acordo com o grupamento químico ligado ao fosfato, o comprimento e grau de insaturação de ácidos graxos (Huang e Li 1999). Os fosfolipídeos mais comuns na natureza são a fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (figura 3.2) (PG) e fosfatidiletanolamina (PE).

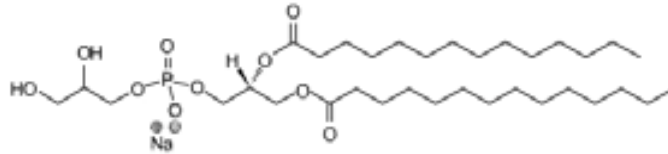


Figura 3.2. Representação de di-miristoil-fosfatidilglicerol (DMPG)

Grupamentos cabeça variam em seu estado de protonação, conforme demonstrado na figura 3.3. Em pH fisiológico, fosfatidilcolina (PC) e fosfatidilglicerol (PG), os dois fosfolípeos relevantes a esse trabalho, apresentam-se neutro e com carga -1, respectivamente.

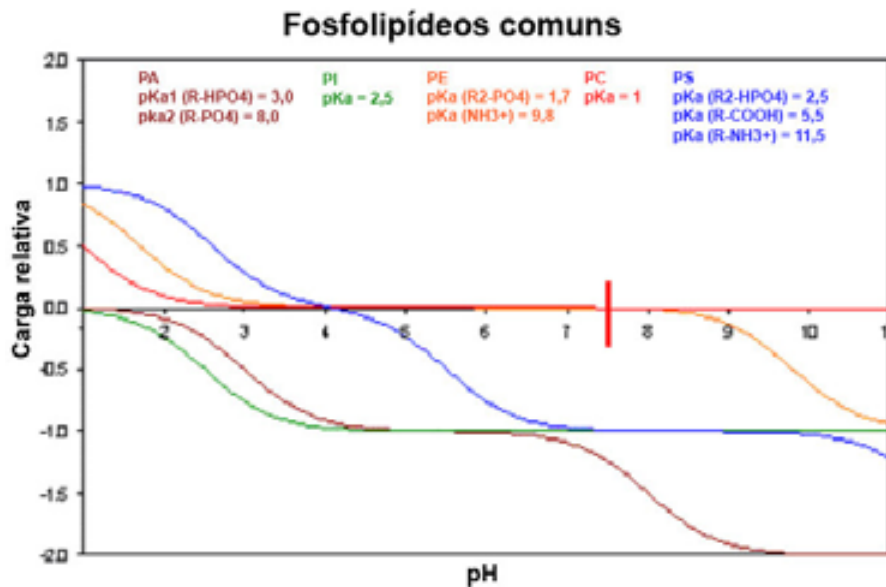


Figura 3.3. Carga residual de cada fosfolípido de acordo com o pH. R e R2 servem para diferenciar o carbono onde os grupos estão ligados. Retirado e modificado de (<http://www.avantilipids.com/PhospholipidPKA.html>).

B. De fosfolípeos a membranas

Ao serem expostos a solventes aquosos, fosfolípeos organizam-se espontaneamente e acabam por formar estruturas que podem variar de acordo com as condições em que esse processo ocorre (New 1990). Isto se deve basicamente ao caráter anfifílico destas moléculas, polares em seu grupamento cabeça e alifáticas em sua cauda de ácidos graxos (New 1990; Gennis 1989). Energeticamente, este processo ocorre

devido ao efeito hidrofóbico, dominado pelo ganho entrópico relacionado à liberação da água de solvatação de grupamentos apolares (Gennis 1989).

Fosfolipídeos diferem de outras moléculas anfifílicas, como detergentes, porque sua estruturação em bicamadas lipídicas é favorável à formação de estruturas micelares. Essas estruturas variam de acordo com a concentração de fosfolipídeo, temperatura, pH e força iônica do solvente (Gennis 1989). Algumas das estruturas possíveis estão representadas na figura 3.4. Bicamadas tendem a ser mais estáveis devido à existência de duas cadeias de ácidos graxos, as quais conferem aos fosfolipídeos uma forma tubular. Já detergentes tendem a formar micelas, por apresentarem uma estrutura mais próxima a um cone (New 1990). A estruturação de bicamadas fosfolipídicas em vesículas, ou lipossomos, ocorre porque extremidades abertas de membrana são energeticamente desfavoráveis (New 1990). Assim, bicamadas selam essas extremidades mediante formação de esferas com um compartimento aquoso interno (Figura 3.4).

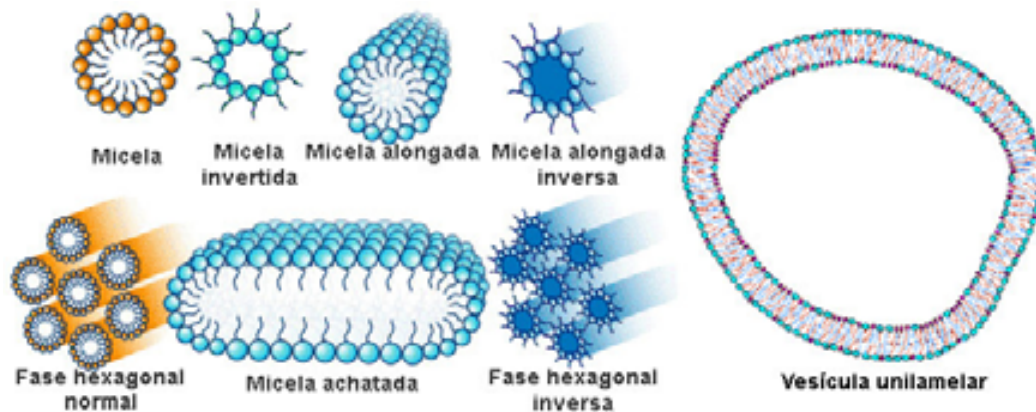


Figura 3.4. Variabilidade de estruturas de membrana

Lipossomos podem ser confeccionados em diferentes tamanhos e diferentes maneiras de acordo com a metodologia utilizada. As formas mais comuns de preparo são por meio da sonicação de um filme fosfolipídico hidratado por um sonificador de ponta, ou pela extrusão em membranas de policarbonato (New 1990; Gennis 1989). Lipossomos preparados por sonicação possuem dimensões variáveis de 20 a 80 nm e são denominados vesículas unilamelares pequenas (SUVs). A aplicação desta metodologia resulta em vesículas com dispersão considerável de diâmetro em torno da média devido à falta de controle no processo de sonicação (New 1990). Já a confecção de lipossomos por

extrusão permite maior controle no tamanho das vesículas, e menor dispersão em torno da média. A extrusão de vesículas se dá pela passagem forçada de fosfolípidos hidratados por membranas de policarbonato com poros de tamanho uniforme (New 1990). As estruturas mais comumente estudadas são conhecidas por vesículas unilamelares grandes (LUVs), as quais são obtidas a partir de extrusão em membranas de policarbonato de 100 nm.

O modelo de Singer e Nicolson, proposto em 1972, trata a bicamada lipídica como um solvente neutro de duas dimensões onde proteínas e lipídeos difundem-se livremente no plano da membrana (Singer e Nicolson 1972). Atualmente, este modelo foi expandido. Sabe-se hoje que a difusibilidade dos fosfolípidos é limitada, e as células são como mosaicos de domínios fosfolipídicos, conhecidos como 'lipid rafts' (Simons e Ikonen 1997). Estas diferenças locais de composições lipídicas são mantidas ativamente pelo citoesqueleto e apresentam diferentes características e funcionalidades (Jacobson e Dietrich 1999). O conceito da membrana como um solvente apolar bidimensional também foi desenvolvido com o reconhecimento de que estas estruturas são heterogêneas. Membranas são compostas de uma região interfacial hidrofílica, populada por água de solvatação e pelo grupamento cabeça dos fosfolípidos até as carboxilas que compõem o início dos ácidos graxos (figura 3.5) (White e Wimley 1998). As regiões de interface correspondem a 50% da espessura de uma bicamada, o que mostra que membranas não devem ser tratadas como uma fase de hidrocarbonetos que separa duas fases aquosas (White e Wimley 1998). As regiões de interface são ricas em possibilidades de interações inespecíficas com moléculas membrano-ativas.

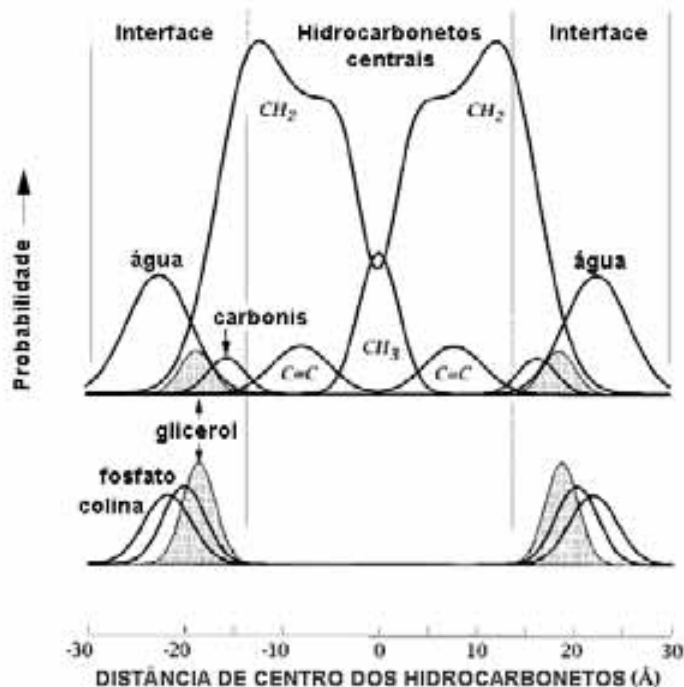


Figura 3.5. Diferentes ambientes encontrados em uma bicamada lipídica. Curvas podem ser interpretadas como uma curva de probabilidade de cada um dos grupos químicos. Retirado e modificado de White e Wimley 1998.

C. Transição de fases de fosfolipídeos

Uma das conseqüências do empacotamento dos ácidos graxos no centro da bicamada lipídica é a mudança abrupta de suas propriedades físicas em uma pequena amplitude de temperatura. Bicamadas ou lamelas (L) possuem estruturas ordenadas a baixas temperaturas, com consistência de gel (β) e cadeias de ácidos graxos principalmente em conformação *trans*, estabilizadas por forças de van der Waals (Huang e Li 1999). Quando se adiciona energia suficiente para sobrepor a barreira composta pelas interações de baixa distância entre as cadeias de hidrocarbonetos, ocorre um aumento de mobilidade rotacional entre ligações carbono-carbono (Huang e Li 1999). Esta transição permite conformações mais desordenadas, aumentando assim a fluidez da membrana (Huang e Li 1999). A esse estado, atribui-se o nome de líquido-cristalino (α). Esta transição, referida como $P'_{\beta} \rightarrow L\alpha$, ocorre de forma cooperativa, com temperatura de transição (T_m) e variação de entalpia (ΔH) específicas para cada fosfolipídeo. Estes

parâmetros podem ser estimados por meio da calorimetria exploratória diferencial (DSC) (Huang e Li 1999).

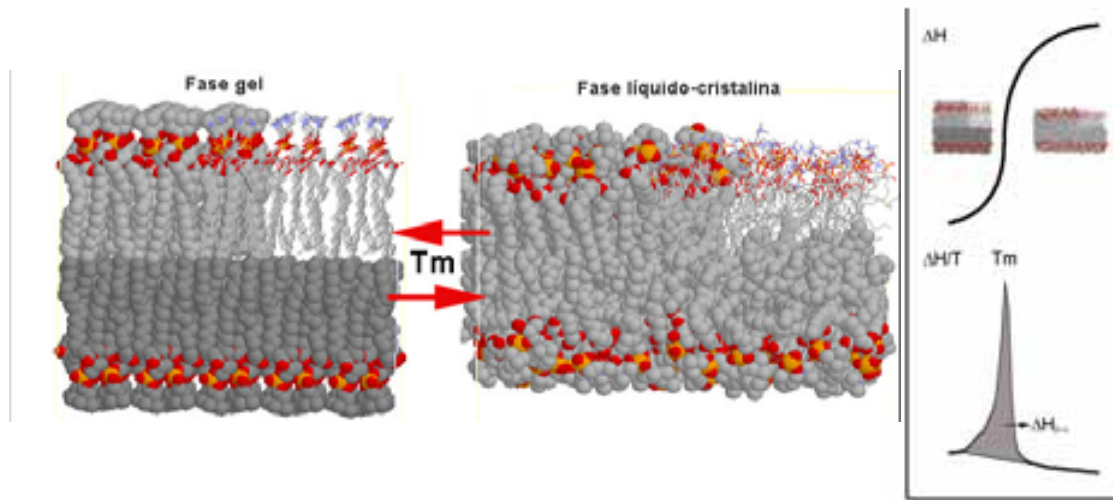


Figura 3.6. Transição de fase em membranas. Detalhe da diferença de organização entre o estado de gel (β), mais ordenado, para o estado líquido-cristalino (α), menos ordenado. Também o esquema de transição de fase $P'_\beta \rightarrow L\alpha$ mostrando a temperatura (T_m) e a entalpia de transição (ΔH) característicos para cada fosfolípido.

A composição da membrana, o solvente e o pH afetam a energia, a cooperatividade e a temperatura de transição, conforme mensurados por calorimetria exploratória diferencial (Huang e Li 1999; Epand 2007). Também a incorporação de moléculas membrano-ativas influencia a transição de fase $P'_\beta \rightarrow L\alpha$ de forma particular, fornecendo informações sobre seu modo de interação (Jain e Wu 1977).

D. Influência de moléculas membrano-ativas no perfil térmico da transição de fase de membranas fosfolipídicas

Membranas são alvo de uma série de compostos de interação específica ou inespecífica. A incorporação de tais compostos pode ser estudada de várias formas, e uma delas é pelo efeito da adsorção de moléculas na transição de fase entre os estados de gel e líquido cristalino ($P'_\beta \rightarrow L\alpha$) de membranas (Sturtevant 1982). A adsorção de moléculas é capaz de alterar as propriedades da transição de fase de membranas fosfolipídicas de forma particular ao modo de interação (Jain e Wu 1977).

Fisicamente, interações entre as cadeias de ácidos graxos das bicamadas possuem transições ordem-desordem de longa distância, estendendo-se por várias unidades de fosfolipídeos (Jain e Wu 1977). A incorporação de compostos exógenos causa uma alteração no modo de empacotamento das cadeias dos hidrocarbonetos, influenciando em sua ordem. Em uma bicamada no estado de gel, o movimento de uma cadeia de ácido graxo é transmitido às cadeias próximas, e assim a todas as outras unidades vizinhas (Jain e Wu 1977).

A incorporação de várias classes de moléculas em membranas já foi estudada, tais como solventes orgânicos, ácidos graxos, esteróis (colesterol), sondas fluorescentes e peptídeos antimicrobianos (Erand e Sturtevant 1981; Matsuzaki *et al.* 1998; Mannock *et al.* 2006). Tais moléculas são capazes de aumentar ou diminuir a estabilidade de vesículas fosfolipídicas, fenômenos observados por alterações no T_m (Erand e Sturtevant 1981). A partição de moléculas exógenas também é capaz de induzir a formação de subdomínios, observado por múltiplos T_m 's, ou de abolir a transição de fase pela diminuição do ΔH (Jain e Wu 1977). Domínios são formados devido a assimetrias na incorporação de moléculas, o que pode gerar regiões de membrana onde há segregação de partes ricas e pobres de moléculas exógenas (Erand 2007). Isto acarreta na observação de múltiplos T_m 's. Acredita-se que a qualidade e quantidade dos efeitos estejam correlacionados com a profundidade de penetração de moléculas. As porções metil e metileno das membranas encontram-se em uma condição de relativa desordem comparadas aos grupamentos fosfato, imobilizados por suas interações com a água de solvatação. Assim, solventes orgânicos que interagem exclusivamente com as regiões hidrofóbicas internas levam a alterações discretas nos parâmetros da transição. De especial interesse é o efeito de surfactantes na transição $P'_\beta \rightarrow L\alpha$, pois esses diminuem a entalpia de transição conforme interagem com membranas (figura 3.7) (Jain e Wu 1977). Acredita-se que isto seja o reflexo da partição de detergentes por toda a extensão dos fosfolipídeos, dado seu caráter também anfifílico.

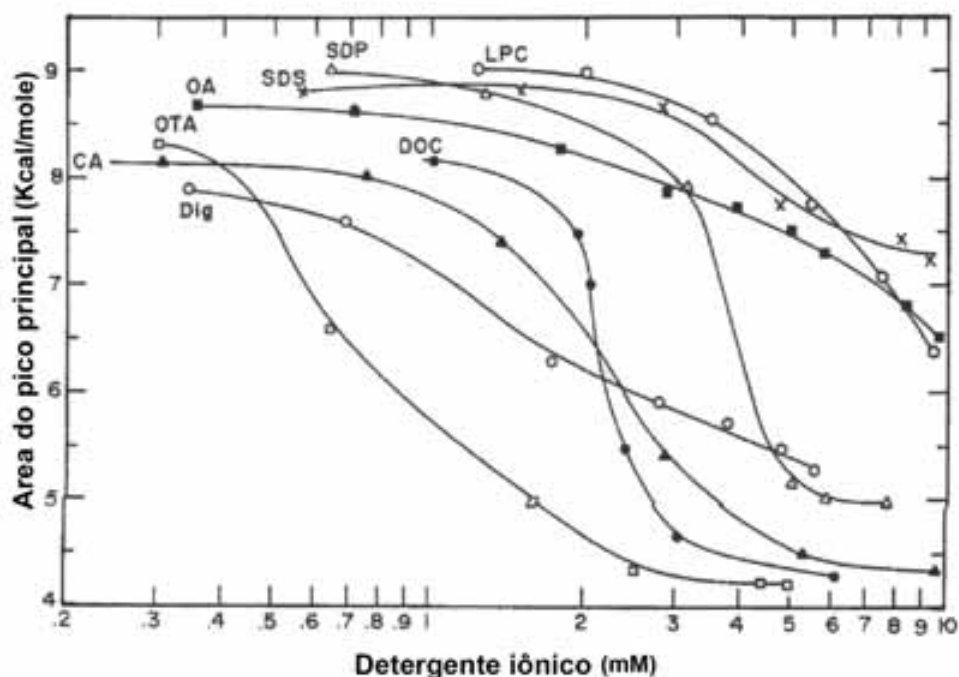


Figura 3.7. Gráfico da área do pico da transição $P'_\beta \rightarrow L\alpha$ versus a concentração de detergentes iônicos. Cloreto de dodecil piridina (LPC), sódio dodecil fosfato (SDP), sódio dodecil sulfato (SDS) octadecil amina (OA), cloreto de octadecil-trimetilamônio (OTA), ácido deoxicólico (DOC), ácido cólico (CA), digitonina (Dig). Retirado e modificado de Jain e Wu 1977

A incorporação de proteínas também acarreta em uma série de efeitos na principal transição de fase de fosfolipídeos. Segundo McElhaney 1986, proteínas associadas às membranas podem ser classificadas em três grupos de acordo com sua interação com bicamadas fosfolipídicas (Papahadjopoulos *et al.* 1975; McElhaney 1986; Prenner *et al.* 1999).

Grupo 1: proteínas solúveis, em geral positivamente carregadas e de posição periférica com relação à membrana. Têm interação quase que exclusiva com fosfolipídeos carregados negativamente. Induzem aumento tanto na temperatura quanto na entalpia da transição principal de fase enquanto decrescem sua cooperatividade minimamente. Acredita-se que estas interagem quase que exclusivamente eletrostaticamente com os grupamentos polares dos fosfolipídeos.

Grupo 2: também positivamente carregadas mas relativamente menos hidrossolúveis e com interação mais pronunciada com fosfolipídeos aniônicos que

zwiteriônicos, apesar de interagirem com os últimos. Geralmente diminuem a temperatura, entalpia e cooperatividade da transição moderadamente mesmo em concentrações relativamente altas. Proteínas do *grupo 2* interagem com a cabeça polar e gliceróis por interações eletrostáticas, mas também interagem minimamente com as cadeias de hidrocarbonetos (McElhaney 1986).

Grupo 3: proteínas relativamente insolúveis, integrais de membrana que interagem igualmente bem com fosfolipídeos aniônicos e zwiteriônicos. O efeito de sua incorporação em membranas é reduzir moderadamente a temperatura de transição, porém induzem marcadamente uma redução da entalpia e cooperatividade da transição. Proteínas desse grupo penetram toda a extensão da bicamada interagindo tanto eletrostaticamente com sua região polar quanto com os hidrocarbonetos centrais através de interações de van der Waals e hidrofóbicas.

Peptídeos antimicrobianos naturais ou sintéticos também apresentam efeitos análogos na transição de fases de membranas, dependendo de sua composição. Gramicidina S, um peptídeo cíclico produzido por *Bacillus subtilis*, induziu diminuição no T_m de vesículas de DMPC e de DMPG, porém só causou diminuição na entalpia da transição de fase $P'_{\beta} \rightarrow L\alpha$ em vesículas de composição aniônica (Prenner *et al.* 1999). Os autores julgaram este efeito como análogo a proteínas pertencentes ao *grupo 2*, reconhecendo as alterações como moderadas (Prenner *et al.* 1999). Essa classificação carece de um número significativo de exemplos, pois o grupo de peptídeos estudados desta maneira é ainda pequeno. A extensão do decréscimo da entalpia de transição de fase está relacionada de forma complexa à hidrofobicidade dos peptídeos e ao seu momento hidrofóbico (Prenner *et al.* 2007).

Recentemente, os peptídeos aureína 1.2, citropina 1.1 e maculatina 1.1, todos eles de anfíbios australianos do gênero *Litoria*, tiveram suas influências no perfil térmico de vesículas multilamelares de DMPE, DMPC e DMPG investigadas (Seto *et al.* 2007). Todos os peptídeos tiveram influência no T_m e na entalpia da transição de fase para vesículas compostas de DMPC e de DMPG, porém não foram capazes de particionar em membranas de DMPE (Seto *et al.* 2007). DMPC e DMPE são neutros em pH fisiológico, enquanto DMPG possui carga -1. Estes peptídeos foram categorizados também como pertencentes ao *grupo 2* de proteínas, residindo na interface das membranas, com

interações primariamente eletrostáticas com os grupamentos polares das membranas, porém com interações hidrofóbicas com as cadeias de ácido graxo (Seto *et al.* 2007). Maculatina 1.1 demonstrou a maior influência na transição de fase das membranas entre os peptídeos estudados.

E. Composição de membranas em organismos

Organismos variam em relação à sua composição de membrana. Na natureza, estas são constituídas não somente pelos fosfolipídeos previamente apresentados, mas também por outras moléculas como esteróides, proteínas, glicoproteínas, entre outras (figura 3.8) (Gennis 1989). A porcentagem relativa de biomoléculas pode variar em cada organismo de acordo com seu estágio de desenvolvimento e acesso a recursos, sendo mantida ativamente dentro de limites (Blom *et al.* 2001).

De modo geral, membranas de microorganismos possuem alto conteúdo de fosfatidilglicerol, cardiolipina (CL) e fosfatidilserina e tendem a ser eletronegativas. Já membranas compostas de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e colesterol são geralmente eletrostaticamente neutras, e são comuns em células eucarióticas (Yeaman e Yount 2003). Esta diferença de composição é reconhecida como uma das bases da seletividade de peptídeos antimicrobianos (Tossi *et al.* 2000; Brand *et al.* 2002; Yeaman e Yount 2003). As macroestruturas de membrana também diferem entre organismos. Tamanha complexidade dificulta a obtenção de conclusões físicas detalhadas sobre a interação de moléculas membrano-ativas com microorganismos, tornando necessário o uso de modelos.

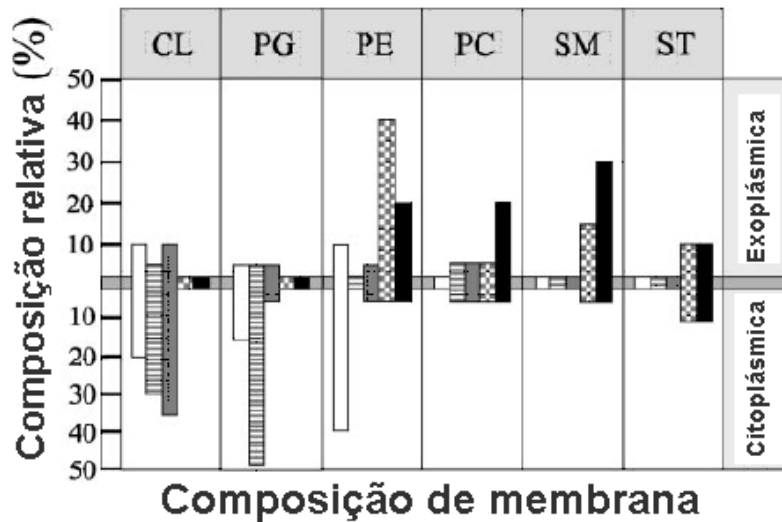


Figura 3.8. Arquitetura comparativa de membranas de microorganismos e membranas eritrocitárias humanas. As barras representam cada um dos tipos celulares, sendo a aberta de *Escherichia coli*, a de linhas horizontais *Staphylococcus aureus*, a sombreada de *Bacillus subtilis*, xadrez de *Candida albicans* e a sólida de eritrócitos humanos. CL= cardiolipina, PG=fosfatidilglicerol, PE=fosfatidiletanolamina, PC= fosfatidilcolina, SM=sfingomielina e ST=esteróides (colesterol ou ergosterol).

F. Membranas de microorganismos

Membranas biológicas têm como base uma estrutura fluida formada por fosfolipídeos, porém com uma série de peculiaridades estruturais. Bactérias podem ser divididas em Gram-positivas e Gram-negativas, de acordo com sua coloração pelo reagente de Gram. Este reagente possui afinidade pela camada de peptidoglicana, espessa em bactérias Gram-positivas e delgada em Gram-negativas (Madigan *et al.* 2000). Esta camada é formada pelos açúcares ácido N-acetil-murâmico e N-acetil-glicosamina, ligados de forma $\beta(1-4)$, e interconectados por resíduos de aminoácidos (Madigan *et al.* 2000). A camada de peptidoglicana tem função estrutural e confere rigidez à parede celular bacteriana. Alguns autores acreditam que em alguns casos a especificidade vista nos peptídeos antimicrobianos em testes de determinação de concentração inibitória mínima (MIC), esteja mais relacionada a estas estruturas do que às diferenças de composição fosfolipídica de membrana (Feder *et al.* 2000).

Bactérias Gram-negativas: possuem uma segunda membrana denominada de membrana externa (figura 3.9A). Esta é constituída por uma dupla camada lipoprotéica

de lipopolissacarídeos (LPSs), principalmente lipídeo A. São os LPSs as moléculas responsáveis pela indução de choques sépticos, causando mortalidade em humanos em até 50% dos casos, e por isso recebem o nome geral de endotoxinas (Madigan *et al.* 2000). Sabe-se que peptídeos antimicrobianos interagem fortemente com LPSs, sendo esta uma das estratégias de defesa bacteriana (Allende e McIntosh 2003). LPSs da camada externa de bactérias Gram-negativas são determinantes na atividade diferencial de peptídeos antimicrobianos, influenciando na potência relativa com relação a bactérias Gram-positivas.

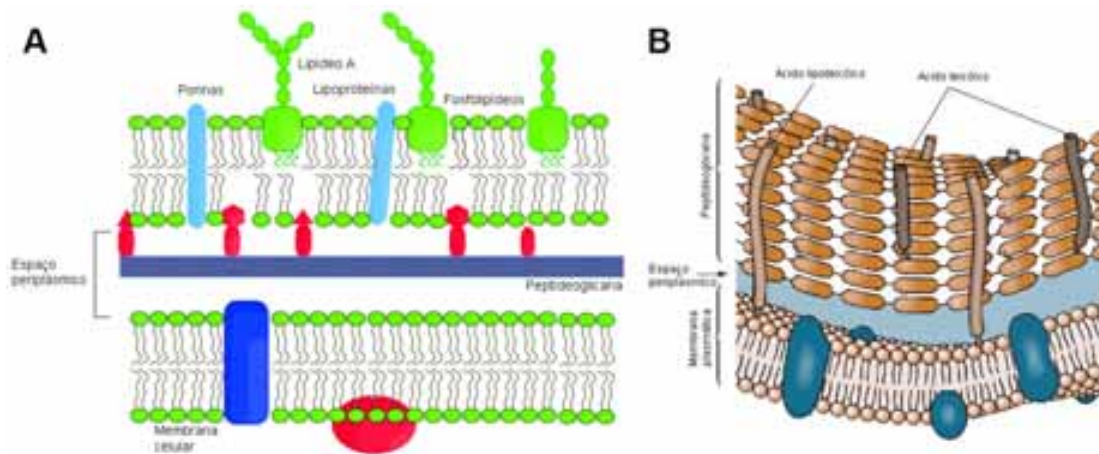


Figura 3.9. Desenho esquemático de membranas de bactérias. A. Gram-negativas e B. Gram-positivas. Retirado e adaptado de <http://www.palaeos.com/Kingdoms/Prokaryotes/Images/GramPosCellEnvelope.gif> e http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/images/book_4/chapter_2/2-43.gif.

Bactérias Gram-positivas: possuem de 40-90% do seu peso seco de peptidoglicano. Muitas bactérias possuem ácidos teicóicos, polímeros de ribitol-fosfato ou de glicerol-fosfato. Podem estar ligados covalentemente à camada de peptidoglicano ou a lipídeos de membrana, denominados então de ácidos lipoteicóicos (Madigan *et al.* 2000). Constituem uma rede bastante densa que limita o acesso de moléculas de alta massa à suas membranas. Influenciam a atuação de peptídeos antimicrobianos tanto na inibição de sua aproximação quanto à indução de lise, mecanismo de ação comum a muitos deles (Yeaman e Yount 2003).

3.1.2. Interação de peptídeos antimicrobianos com membranas

A. Atividade antimicrobiana versus atividade em membranas biomiméticas

A redução do sistema peptídeo antimicrobiano/microorganismo é comumente feito pela confecção de membranas de composição fosfolipídica compatível com as das células alvo, porém sem suas macro-estruturas. A investigação das interações destas com peptídeos em solvente tamponado permite uma avaliação comparativa entre peptídeos por permitir maior controle sobre os fatores da interação. Uma variedade de técnicas biofísicas foi utilizada para esse propósito, gerando dados complementares; calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e calorimetria diferencial exploratória (DSC) (Wenk e Seelig 1998; Epanand *et al.* 2003), espectroscopia de fluorescência (Mor *et al.* 1994), dicroísmo circular (CD) (Leite *et al.* 2007) e ressonância plasmônica de superfície (SPR) (Gaidukov *et al.* 2003), entre outras. A última demonstrou ser muito promissora durante a última década, e assim como a calorimetria, possui a vantagem de não derivar de nenhum efeito secundário à interação. A adsorção de peptídeos antimicrobianos em membranas é analisada pelo acúmulo de massa na superfície de um 'chip sensor', gerando gráficos de dose-resposta. Porém, a aplicabilidade do método de SPR é restrita devido interações inespecíficas entre os peptídeos catiônicos e o suporte das membranas, composto por dextrana (Brand *et al.* 2006). A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma das metodologias mais difundidas e apresenta algumas vantagens, como o uso de bicamadas fosfolipídicas na forma de vesículas em solução, ou seja, sem movimentação restrita (Seelig 1997). Outra vantagem é a existência de modelos matemáticos para a interpretação dos dados. Seelig e colaboradores desenvolveram um método para a conversão do calor trocado na titulação em isothermas de adsorção. Este método é capaz de discriminar a interação em uma constante de partição eletrostática e outra hidrofóbica (Wieprecht *et al.* 2000; Seelig 2004). A principal desvantagem é que o calor de interação pode ter diversas origens, principalmente em um sistema complexo, cuja interação leva a reestruturações e rearranjos tanto nos peptídeos quanto nas membranas (Wieprecht *et al.* 1999; Silva *et al.* 2007).

A correlação entre dados obtidos com membranas modelo depende também da compreensão do papel das macro-estruturas de membrana de células bacterianas (Dathe e Wieprecht 1999; Yeaman e Yount 2003). Diversos modelos para a invasão, permeabilização e lise de células bacterianas foram propostos, e são, em geral, específicos para o tipo de macro-estrutura de membrana. Quando interagindo com bactérias Gram-negativas, peptídeos antimicrobianos catiônicos agem primariamente nos lipopolissacarídeos da membrana externa, por apresentarem carga negativa. Esta interação causa expansão da membrana e deslocamento de íons de Mg^{2+} e Ca^{2+} , de fundamental importância para a estabilização desta estrutura (Dennison *et al.* 2005). No caso de bactérias Gram-positivas, os principais sítios de interação de peptídeos catiônicos são os ácido teicóico e lipoteicóico e os grupos carboxílicos dos resíduos de aminoácidos da camada de peptidoglicano. Para ambos os tipos de classes bacterianas, a interação inicial com as superfícies externas das bactérias leva à passagem dos peptídeos antimicrobianos pela camada de peptidoglicana com subsequente ligação à superfície externa aniônica da membrana citoplasmática (Yeaman e Yount 2003; Dennison *et al.* 2005).

Geralmente, existe uma correlação entre dados obtidos com membranas biomiméticas e testes antimicrobianos em cultura, apesar do papel complexo desempenhado pelas camadas externas de células bacterianas. Segundo Papo e colaboradores, peptídeos mais capazes de se ligar-se e permeabilizar membranas *in vitro* também têm atividade antimicrobiana mais pronunciada (Papo e Shai 2003). Peptídeos não-hemolíticos interagem com membranas negativamente carregadas mais pronunciadamente que com membranas neutras. Já peptídeos não-seletivos apresentam o mesmo grau de interação com ambos os tipos de membranas. Dessa forma, dados obtidos com membranas biomiméticas correlacionam-se com a atividade bactericida de peptídeos antimicrobianos em algum grau. Porém, nenhuma comparação em ampla escala foi feita com várias estruturas e não se sabe se esta afirmação pode ser estendida a todo conjunto de peptídeos antimicrobianos.

B. Relação estrutura/função em peptídeos antimicrobianos

Nessa seção, várias características físico-químicas relevantes à interação de peptídeos antimicrobianos com membranas e à sua seletividade serão consideradas em tópicos distintos. Esses parâmetros são conformação (χ), carga nominal (Q), hidrofobicidade (H), momento hidrofóbico (M_H), anfifilicidade (A) e ângulo polar (θ). Estes fatores são interdependentes, conforme a representação da figura 3.10.

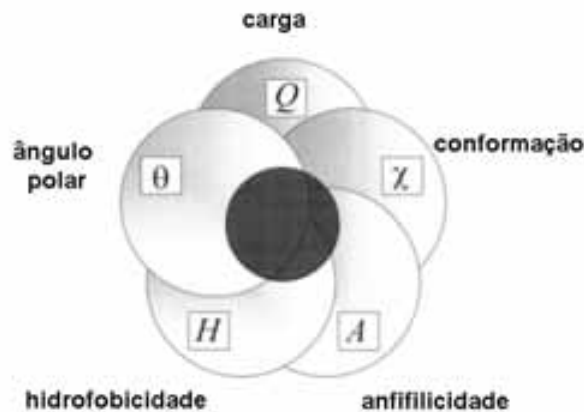


Figura 3.10 Interdependência entre os fatores físico-químicos para a atividade de peptídeos antimicrobianos. Extraído e modificado de Yeaman e Yount 2003.

Conformação (χ) – peptídeos antimicrobianos diferem amplamente em seqüência, porém dividem-se em dois conjuntos bastante marcantes em termos de estrutura secundária: os que se estruturam em α -hélice e os que se estruturam em folha- β (Jenssen *et al.* 2006). Peptídeos antimicrobianos em α -hélice são abundantes em fluidos extracelulares de insetos e anfíbios. São geralmente de conformação randômica em solução aquosa, estruturando-se ao entrar em contato com solventes orgânicos ou membranas plasmáticas (Yeaman e Yount 2003). A inserção de resíduos de prolina ou de d-aminoácidos em suas estruturas primárias é capaz de romper com a estruturação em α -hélice (Papo e Shai 2004). Normalmente, este tipo de modificação leva à inocuidade contra células bacterianas, demonstrando o papel crucial da estrutura secundária para a manutenção da atividade.

Peptídeos em folha- β são bastante variáveis em termos de estrutura primária, porém são conservados em sua composição anfifílica. Para esse tipo de peptídeo, resíduos

distantes em estrutura primária são aproximados em estrutura terciária e assim geram separação de cargas (Dennison *et al.* 2005). Vários deles são ricos em cisteína, tais como as defensinas (Braff e Gallo 2006). Assim como para peptídeos em α -hélice, a ruptura da estrutura secundária em peptídeos em folhas- β acarreta mudanças dramáticas em atividade, freqüentemente levando o peptídeo à inocuidade.

Algumas estruturas diferentes destas também já foram identificadas, como por exemplo, peptídeos ricos em prolina e arginina e também a indolicidina, rica em triptofano, os quais formam estruturas helicoidais de poli-prolina tipo II. Estas também apresentam certo grau de anfifilicidade (Dennison *et al.* 2005).

Anfifilicidade e momento hidrofóbico (M_H) – quase todos os peptídeos antimicrobianos apresentam algum grau de estruturação em sua interação com membranas. Normalmente decorre dessa interação a separação de uma face hidrofóbica e de uma hidrofílica de carga positiva. Pode-se obter um caráter anfifílico por meio de diferentes conformações protéicas, sendo a mais elegante a formação de hélice. A periodicidade de resíduos polares e apolares é de 3-4 resíduos, estrutura ótima para sua separação em faces opostas. Segundo Yeaman e Yount, a extensão de estruturação secundária possui efeito na interação com membranas neutras e em menor grau com membranas carregadas negativamente (Yeaman e Yount 2003). Um alto grau de anfifilicidade é normalmente correlacionado com aumento de toxicidade para células compostas de fosfolípídeos neutros (Dathe e Wieprecht 1999). Contudo, nenhum estudo sistemático relacionando M_H e indução de extravasamento de um marcador fluorescente em LUVs chegou a resultados conclusivos (Dathe e Wieprecht 1999). Também não existe relação conclusiva entre M_H e atividade antimicrobiana, mensurada pela determinação de MICs para cada peptídeo.

A anfifilicidade de uma seqüência reflete o grau de polarização de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos, atributo de descrição desafiadora (Yeaman e Yount 2003). Um dos parâmetros passíveis de cálculo *in silico* é o momento hidrofóbico (M_H), o qual é definido pela soma dos vetores de hidrofobicidade de cada resíduo de aminoácido normalizado para uma α -hélice perfeita (Eisenberg 1984). Lewis e colaboradores demonstraram que o M_H de peptídeos compostos de resíduos de leucina e alanina têm influência em seu tempo de retenção em colunas de fase reversa em HPLC (Lewis *et al.*

2007). Este dado revela que mesmo quando interage com substratos relativamente simples, como os hidrocarbonetos da matriz de colunas cromatográficas, o agrupamento de resíduos modifica a hidrofobicidade nominal do peptídeo como um todo (Lewis *et al.* 2007). Para o conjunto de peptídeos estudados, o M_H teve correlação direta com seu grau de estruturação secundária em solução e em membranas. Estima-se que o M_H seja ainda mais determinante nessas interações que a hidrofobicidade da seqüência em si (Fernandez-Vidal *et al.* 2007). Fernández-Vidal e colaboradores observaram uma correlação direta entre a energia livre de interação (ΔG) e o M_H de um grupo de peptídeos de mesma hidrofobicidade (Fernandez-Vidal *et al.* 2007). As moléculas estudadas continham apenas resíduos de leucina, glutamina e alanina. Não é possível inferir se essa relação se mantém para o conjunto de peptídeos antimicrobianos como um todo, pois o próprio estudo aponta desvios.

Denisson e colaboradores demonstraram correlação negativa entre M_H e hidrofobicidade em peptídeos antimicrobianos, indicando a existência de equilíbrio entre estas grandezas (Dennison *et al.* 2005). Dathe e Wieprecht demonstram que peptídeos antimicrobianos tendem a ter alto momento hidrofóbico e hidrofobicidade moderada. A figura 3.11 mostra a distribuição de peptídeos no gráfico de Eisenberg, e demonstra que embora moléculas antimicrobianas tenham ampla distribuição, agrupam-se em regiões de hidrofobicidade moderada e M_H relativamente altos (Tossi *et al.* 2000).

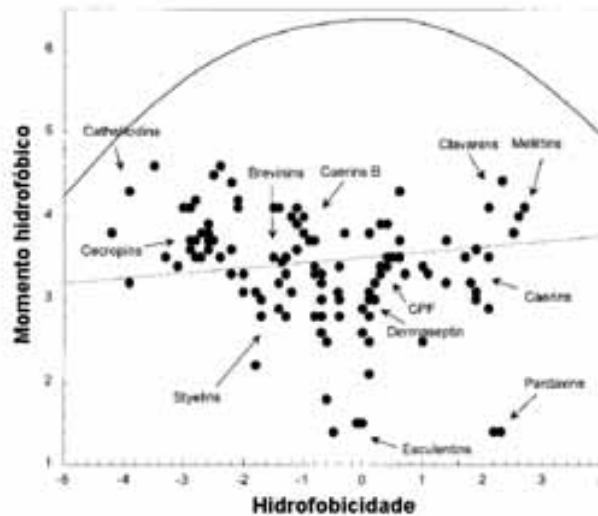


Figura 3.11. Relação entre momento hidrofóbico (M_H) e hidrofobicidade (H) de alguns peptídeos antimicrobianos. Retirado e modificado de Tossi *et al.* 2000

Hidrofobicidade (H) – reflete a capacidade intrínseca a uma seqüência peptídica de particionar-se entre uma fase aquosa polar e uma fase apolar. Devido à região central apolar das membranas, acredita-se que hidrofobicidade tenha forte papel modulador na interação de peptídeos com membranas (Dathe e Wieprecht 1999). Resíduos hidrofóbicos correspondem a aproximadamente 50 % do total em uma seqüência, com variações na faixa de 10 % (Tossi *et al.* 2000; Yeaman e Yount 2003). A hidrofobicidade é mantida dentro de limites porque peptídeos antimicrobianos que participam do sistema de defesa inato dos organismos devem ser solúveis o suficiente para permanecer em solução e ao mesmo tempo interagir com regiões hidrofóbicas das membranas (Dathe e Wieprecht 1999).

O efeito da hidrofobicidade sobre a atividade antimicrobiana de peptídeos registrou um avanço na década de 1990 a partir de uma série de trabalhos (Mee *et al.* 1997; Wieprecht *et al.* 1997). Wieprecht e colaboradores demonstraram que análogos de magainina de maior hidrofobicidade que o precursor possuem diferença discreta em sua interação com LUVs de PG. Contudo, a afinidade dos peptídeos por vesículas mistas de PC/PG (3:1) e de PC cresce conforme aumenta sua hidrofobicidade. Outros estudos confirmam que o aumento de hidrofobicidade tem pouca ou nenhuma correlação com a atividade antimicrobiana, porém tem impacto direto na atividade hemolítica (Kwon *et al.* 1998; Ohmori *et al.* 1998). Estudos com membranas modelo reforçam a idéia de que membranas enriquecidas com fosfolípídeos de carga negativa tornam-se menos sensíveis às modificações em hidrofobicidade dos peptídeos (Dathe e Wieprecht 1999).

Dennison e colaboradores apontam a inexistência de uma relação quantitativa simples entre concentração inibitória mínima (MIC) e hidrofobicidade para todo o conjunto de peptídeos antimicrobianos. Os autores tentaram dividir os peptídeos em grupos funcionais, reconhecendo que diferentes organismos alvo podem representar diferentes pressões seletivas. Mesmo assim, nenhuma correlação foi encontrada (Dennison *et al.* 2005).

Ângulo polar (θ) – o ângulo polar é uma medida de proporção relativa da faceta polar *versus* a faceta apolar de uma α -hélice (Uematsu e Matsuzaki 2000). Em um peptídeo hipotético em que uma das faces é composta exclusivamente por resíduos hidrofóbicos e

outra por resíduos carregados, o ângulo polar é de 180° (Yeaman e Yount 2003). Acredita-se que o ângulo polar tenha influência direta no grau de penetração do peptídeo na membrana e na estrutura dos poros transmembrânicos (Dathe e Wieprecht 1999). Até mesmo regras relativas à forma de inserção e mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos em função do ângulo polar foram propostas, porém rejeitadas mais tarde (Brasseur 1991).

Em vários estudos, ângulos polares menores - e assim maior superfície hidrofóbica - estão associados com maior capacidade de perturbação de membranas (Dathe *et al.* 1997; Uematsu e Matsuzaki 2000). Uematsu e Matsuzaki utilizaram peptídeos modelo, um com ângulo polar de 100° e outro de 180° , para demonstrar que quanto menor o ângulo polar maior as taxas de permeabilização, translocação e taxa de formação de poros. Porém, apesar de formarem poros em taxas mais altas, estes colapsavam também mais rapidamente, indicando novamente a necessidade de equilíbrio (Uematsu e Matsuzaki 2000).

Carga (Q) – uma das características mais óbvias de peptídeos antimicrobianos é sua carga líquida e são várias as tentativas de modular sua atividade pela alteração desta. A maior parte das moléculas descritas até hoje apresenta carga líquida de 2 a 9. Costuma-se referir tanto à carga nominal de peptídeos antimicrobianos quanto ao seu ponto isoelétrico (pI). Cationicidade é importante para a atração inicial de peptídeos antimicrobianos à membranas negativamente carregadas de bactérias e outros microorganismos. (Yeaman e Yount 2003). Essa eletroafinidade mútua é dita fundamental para a ação antimicrobiana diferencial, tendo papel na seletividade de moléculas antimicrobianas. Sabe-se também que o potencial de membrana de microorganismos é 50 % maior em células procarióticas em relação às células de mamíferos. Este potencial eletroquímico age de maneira eletroforética para a concentração de cargas positivas, como peptídeos antimicrobianos, na superfície de microorganismos (Yeaman e Yount 2003).

Com base nessas considerações, não é surpreendente que exista uma forte correlação entre cationicidade e atividade antimicrobiana (Dathe *et al.* 1997; Matsuzaki *et al.* 1997). Porém esta relação não é linear, sendo às vezes direta, indireta ou inversa

(Yeaman e Yount 2003). Sabe-se que aumento de carga em peptídeos com domínios bem formados de hélice hidrofóbica, assim como magainina 2, aumenta sua potência antimicrobiana e também sua seletividade (Dathe e Wieprecht 1999). Este aumento de atividade é observado até uma carga ótima a partir da qual ocorre redução de potência antimicrobiana. Acredita-se que esta redução de atividade devido ao excesso de carga seja por causa de interações improdutivoas com componentes de membrana. Outra consequência do excesso de cargas é a redução de helicidade devido à repulsões de carga (Dathe e Wieprecht 1999).

C. Sobre propriedades físico-químicas e atividade de peptídeos antimicrobianos

A tabela 3.1 foi compilada por Dennison e colaboradores e lista os parâmetros físico-químicos de 161 peptídeos depositados em bancos de dados (Dennison *et al.* 2005). Nela, fica evidente a variabilidade natural das propriedades físico-químicas de peptídeos antimicrobianos. Os autores criaram grupos funcionais de acordo com os microorganismos contra os quais os peptídeos tiveram atividade antimicrobiana, reconhecendo a atuação de diferentes pressões seletivas. Contudo, nenhuma correlação entre carga (Q), hidrofobicidade (H), anfifilicidade e momento hidrofóbico (M_H), ângulo polar (θ) e atividade antimicrobiana foi encontrada (Dennison *et al.* 2005). Normalmente, atribui-se a isso a dificuldade de modificação sistemática individual dos parâmetros (Dathe e Wieprecht 1999). Porém, está claro que quando peptídeos antimicrobianos são analisados como um grupo homogêneo, nenhuma relação entre estrutura e função é válida.

Tabela 3.1. Propriedades físico-químicas de peptídeos antimicrobianos divididos de acordo com seus microorganismos alvo. O número entre parênteses corresponde à media (extraído e modificado de Dennison *et al.* 2005).

Organismos alvo	Número de α -AMPs	Faixa de MICs (μ M)	Faixa de massa molecular (kDa)	Faixa de comprimento (resíduos)	Faixa de carga líquida	Faixa de pI	Faixa do arco hidrofóbico ($^{\circ}$)
G+	8	7,8-40 (15,6)	2,2-4,3 (3,3)	21-43 (31,4)	-5 a +4	4,2 a 9,8	100-180 (135)

G-	8	0,04-140 (17,7)	1,7-2,6 (2,3)	19-27 (23,9)	+1 a +3	9,0 a 11,1	220-260 (232)
G+,G-	103	0,2-40 (7,9)	1,2-7,4 (3,5)	10-68 (32,7)	-1 a +16	6,7 a 12,4	40-300 (161)
G+,G-,F	42	0,04-140 (14,5)	1,4-4,9 (2,9)	13-46 (27,3)	0 a 10	5,6 a 12,7	40-240 (161)

G+ = bactérias Gram-positivas

G- = bactérias Gram-negativas

F = fungos

D. Mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos

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

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

A interação inicial entre peptídeos antimicrobianos e a membrana plasmática é decorrente de atração eletrostática. Esta atração é devido o caráter catiônico dos peptídeos e a alta frequência de fosfolípidos aniônicos em membranas de microorganismos. O resultado dela é o aumento da concentração local de peptídeo em uma camada imediatamente superior às vesículas (tópico desenvolvido no capítulo 4).

O restante do mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos, que diz respeito à inserção em membranas e ao recrutamento de novas moléculas, é mais heterogêneo. Dois mecanismos foram inicialmente propostos para peptídeos em α -hélice, conhecidos pelos nomes de 'Carpet-like' e 'barrel-stave' (Shai 2002). Atualmente, um mecanismo conjuntamente proposto por Shai, Matsuzaki e Huang (SMH) parece ter suplantado os outros devido à sua aplicabilidade a um maior grupo de moléculas (Zasloff 2002). Uma crítica à busca por mecanismos de ação, assim como a proposição de um mecanismo mais geral, foi feito por Bechinger e Lohner, denominado de 'detergent-like' (Bechinger e Lohner 2006).

Modelo 'Barrel-stave'

Esse modelo prevê a formação de canais transmembrânicos/poros por feixes de hélices anfifílicas. As regiões hidrofóbicas dos peptídeos permanecem em contato com a membrana enquanto as regiões hidrofílicas formam um poro aquoso, que permite o fluxo de solvente e pequenas moléculas (Shai 2002). Após a atração eletrostática dos peptídeos, acredita-se que a permeabilização proceda da seguinte forma: 1) Monômeros ligam-se à membrana e estruturam-se em α -hélice. 2) Os monômeros reconhecem-se na superfície da membrana mesmo em baixas densidades. 3) As hélices inserem-se na porção hidrofóbica da membrana e 4) Há um recrutamento adicional de monômeros que aumentam o diâmetro do poro. A etapa crucial para que peptídeos antimicrobianos permeabilizem membranas de acordo com este modelo é a interação entre monômeros na superfície da membrana e sua inserção, já que a adoção de uma conformação transmembrana para um monômero é quase sempre desfavorável (Shai 2002).

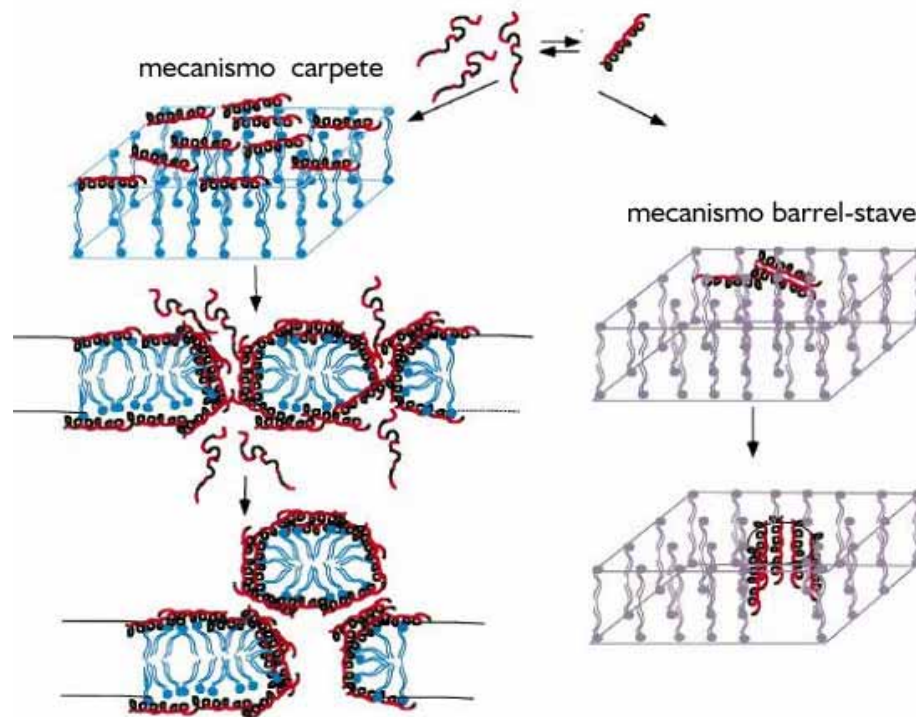


Figura 3.12. Modelo do mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos. Retirada e modificada de Shai 2002.

Modelo 'Carpet-like'

Nesse modelo, os peptídeos antimicrobianos estão em contato com o grupamento cabeça dos fosfolipídeos durante todo o processo de permeabilização. Os peptídeos são adsorvidos na superfície da membrana recobrimo-a à maneira de um carpete. A permeabilização ocorre somente quando monômeros atingem alta concentração em toda a superfície celular (figura 3.12). Os peptídeos permanecem na região de interface das membranas, em conformação perpendicular, não entrando em contato com as caudas dos fosfolipídeos. Os quatro passos propostos são: 1) Ligação dos monômeros aos grupamentos cabeça dos fosfolipídeos; 2) Alinhamento dos monômeros na superfície da membrana de forma que sua face hidrofílica fique em contato com os grupamentos cabeça dos fosfolipídeos; 3) Reorientação dos resíduos hidrofóbicos em direção a região hidrofóbica da membrana; 4) Desintegração da membrana pelo rompimento de sua curvatura, etapa a qual pode ser precedida da formação de poros transientes (Shai 2002).

Modelo Shai-Matsuzaki-Huang (SMH)

Esse modelo propõe que a interação de peptídeos com membranas causa deslocamento dos fosfolipídeos e, assim, uma alteração da estrutura da membrana. Decorrem destas alterações estruturais nas membranas a entrada de peptídeos para o interior das células (Zaslouff 2002). O diferencial deste modelo com relação aos anteriores está no reconhecimento de membranas como porções ativas na interação, responsivas à adsorção de peptídeos. Huang demonstrou que a ligação de moléculas na face externa de membranas gera sua expansão relativa à face interna, criando tensões (Huang 2006). A adsorção assimétrica de moléculas na membrana gera aproximação dos grupamentos fosfato de fosfolipídeos em faces opostas, fenômeno conhecido como achatamento de membrana (Chen *et al.* 2002; Chen *et al.* 2003; Huang 2006). O fenômeno de achatamento de membrana prossegue com a adsorção de moléculas em conformação perpendicular à membrana até um limite, onde não é mais energeticamente favorável

acomodá-las desta maneira. A partir deste ponto, ocorre uma transição de conformação com a formação de poros (Lee *et al.* 2004).

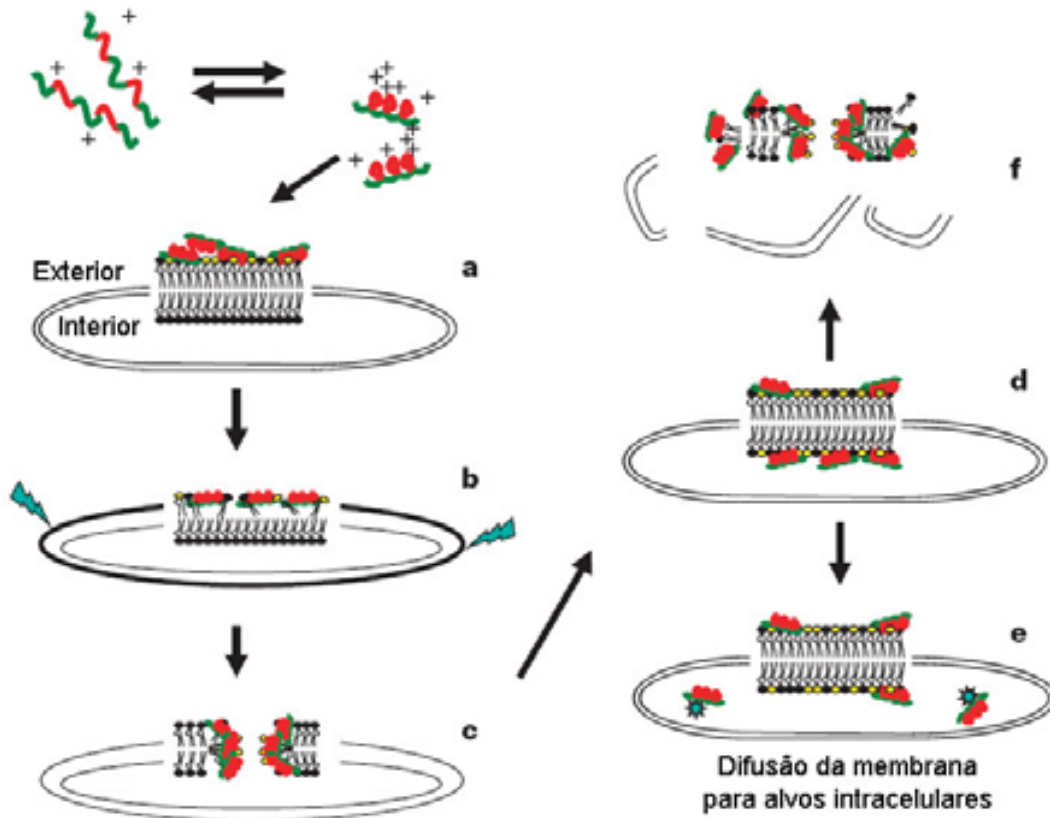


Figura 3.13. Modelo SMH de ação de peptídeos antimicrobianos. Um peptídeo em α -hélice é representado. **A.** Recobrimento em forma de carpete da face externa da membrana. **B.** Integração do peptídeo na membrana e achatamento de sua face externa. A área da face externa expande-se em relação à interna (apontado pelas flechas). **C.** Transição de fase e formação de poros transitentes. **D.** Transporte de peptídeos e fosfolípidos para a face interna da membrana. **E.** Difusão dos peptídeos para alvos internos (em alguns casos). **F.** Colapso da membrana em fragmentos e ruptura física da membrana celular do alvo. Fosfolípidos ácidos possuem grupamento "cabeça" amarelos enquanto neutros são representados em preto. Nos peptídeos estão representadas em vermelho os resíduos positivos e em verde os resíduos hidrofóbicos. Retirado e modificado de Zasloff 2002.

Modelo 'detergent-like'

Rigorosamente, o modelo 'detergent-like' não pode ser considerado ao mesmo nível dos anteriores, uma vez que considera a ação de peptídeos antimicrobianos como casos específicos do fenômeno de detergentência (Bechinger e Lohner 2006). Representa o

mecanismo de aplicação mais geral para a atividade de moléculas anfifílicas em membranas e fundamenta-se a partir do efeito causado por sua intercalação em bicamadas lipídicas (Bechinger e Lohner 2006). Embora detergentes possam ter efeito neutro ou mesmo resultar na estabilização de membranas modelo, aberturas podem formar-se temporariamente (Bechinger e Lohner 2006). O aumento da concentração do detergente leva à desintegração das membranas, e assim como os peptídeos antimicrobianos, acabam por causar a perda da barreira física, dissipação do gradiente eletroquímico e perda de componentes citoplasmáticos. O modelo de ação 'detergent-like' não está em contradição com os modelos propostos acima, mas os inclui. Na verdade, tanto a formação de poros quanto a acumulação de peptídeos na forma de carpete, podem ser considerados casos especiais, onde as condições são tais que esses tipos de supra-estruturas moleculares são observadas em um diagrama de fase muito mais complexo (Bechinger e Lohner 2006). Sua vantagem está no reconhecimento de que é uma tarefa tediosa argüir sobre o mecanismo de ação correto para cada peptídeo, quando na verdade todos eles podem ocorrer dependendo das condições experimentais (Bechinger e Lohner 2006)

E. Mecanismos de indução de morte celular

O grupo de peptídeos antimicrobianos não é diverso só em suas propriedades físico-químicas e em seus mecanismos de ação, mas também no que diz respeito aos seus alvos (Brogden 2005). Dentre os peptídeos antimicrobianos, os que desestabilizam estruturas de membrana são os mais numerosos, porém não correspondem à totalidade. Existe uma série destes que possuem alvos intracelulares e funcionalidade dupla, capazes de desestabilizar membranas e em concentrações sub-líticas alterar funções metabólicas vitais (Patrzykat *et al.* 2002). Na verdade, muitos dos peptídeos com ação em membrana podem interferir no metabolismo de microorganismos de forma ainda desconhecida, já que esta faceta de sua interação foi pouco estudada (Brogden 2005).

Acredita-se que os primeiros passos da interação entre peptídeos e membranas, como a atração eletrostática, sejam comuns a todas as moléculas, independentemente do seu mecanismo de ação. A partir de sua adsorção, peptídeos com alvos intracelulares tendem a atravessar a membrana, causando nestas poucas alterações estruturais. Exemplo

disso é a buforina II, que age inibindo síntese protéica ligando-se ao DNA de bactérias (Kobayashi *et al.* 2004). Já peptídeos com ação em membrana tendem a desestabilizá-las, por meio dos mecanismos anteriormente descritos. A heterogeneidade de alvos é uma das explicações da falta de correlação entre propriedades físico-químicas e atividade antimicrobiana (Dennison *et al.* 2005). Assim, a categorização de peptídeos antimicrobianos em sub-grupos funcionais de acordo com sua forma de interação com membranas é indispensável, pois só assim será possível determinar as propriedades essenciais às suas interações.

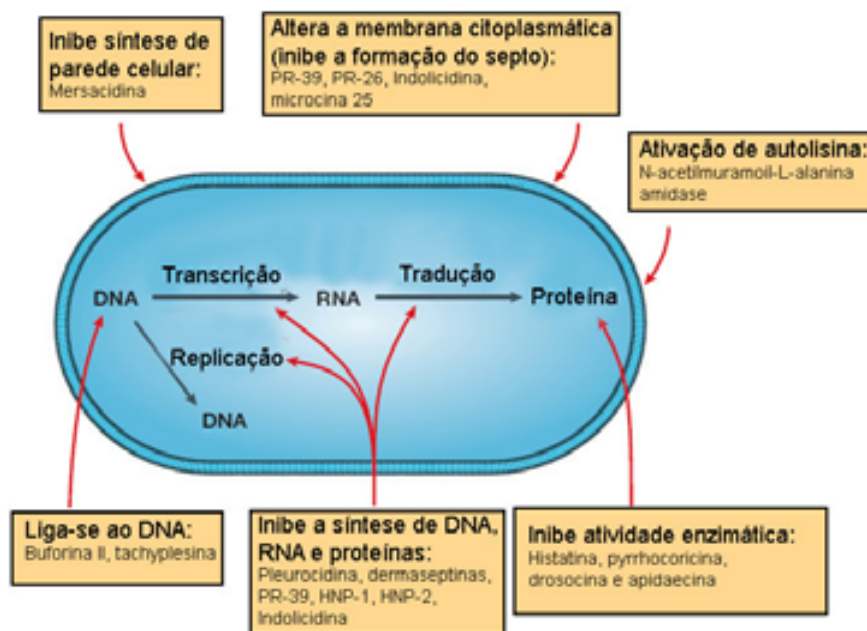


Figura 3.14. Alvos intra-celulares de peptídeos antimicrobianos. Retirado e adaptado de Brogden 2005.

F. Peptídeos antimicrobianos e peptídeos penetradores em células (CPPs)

O limite de definição entre peptídeos antimicrobianos e peptídeos penetradores em células (CPPs) até o momento é nebuloso. Postula-se que todo CPP é um antimicrobiano em potencial e que todo antimicrobiano é um CPP em potencial (Henriques *et al.* 2006). Isto porque alguns CPPs em limites superiores de concentração apresentam atividade perturbadora de membrana e tornam-se permeabilizadores (Palm *et al.* 2006). Já alguns peptídeos antimicrobianos em concentrações sub-líticas são capazes

de atingir alvos citoplasmáticos mesmo antes de induzir permeabilização de membrana (Henriques *et al.* 2006). A dificuldade de distinção entre estes grupos não é só funcional, mas também estrutural, já que ambos são compostos de cadeias polipeptídicas catiônicas com propriedades físico-químicas semelhantes. As metodologias de estudo divergem com relação aos sistemas alvo. CPPs são normalmente estudados por grupos interessados na translocação de moléculas em células de mamíferos, enquanto a ação de antimicrobianos é avaliada em microorganismos (Henriques *et al.* 2006). A aplicação das mesmas técnicas para seu estudo, e assim sua comparação como forma de compreensão do mecanismo de ação de moléculas membrano-ativas é recente.

O mecanismo de ação de CPPs é controverso, e acredita-se na existência de duas vias principais: permeabilização direta da membrana e uma via endocítica. Esta última ganhou atenção a partir de 2003, e são várias as evidências de que CPPs podem ser internalizados por via pinocítica (Fischer *et al.* 2005). Porém, mesmo sua ação por via endocítica requer translocação pelas paredes de endossomos de pH ácido. Sendo assim, CPPs deverão interagir fisicamente com membranas no mínimo em uma etapa em seu processo de internalização,.

A interação de CPPs com membranas é semelhante à de peptídeos antimicrobianos, o que permitiu rápido avanço na compreensão dos parâmetros físico-químicos responsáveis (Fischer *et al.* 2005). Acredita-se que essa interação siga três passos essenciais, os quais não contém informação mecanística. Qualquer um dos mecanismos previamente descritos para a ação de peptídeos antimicrobianos pode ser também extrapolado para CPPs.

1. Associação do CPP com a membrana
2. Permeabilização da membrana
3. Liberação do CPP no citosol.

Acredita-se que uma das diferenças cruciais entre CPPs e peptídeos antimicrobianos esteja na ausência de formação de poros por parte dos primeiros (Fischer *et al.* 2005; Henriques *et al.* 2006). CPPs como penetratina e oligoarginina são considerados menos tóxicos que a maioria dos antimicrobianos, e acredita-se este fato à

não formação de poros em sua internalização. Porém, até mesmo esta barreira têm se tornado cada vez mais tênue, com o reconhecimento de que a internalização é uma das fases da interação dos peptídeos membrano-ativos com membranas, a qual é seguida pela atividade antimicrobiana (Fischer *et al.* 2005).

3.1.3. Justificativa e objetivos específicos

Peptídeos antimicrobianos são estruturalmente diversos. Bancos de dados, como o Antimicrobial Peptide Database (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>), dispõem de mais de 500 moléculas de diferentes estruturas primárias e diferentes fontes biológicas. Análise destas seqüências peptídicas demonstra que não há somente um arcabouço básico capaz de definir e assim prever sua atividade. O rótulo “peptídeos antimicrobianos” é dado à moléculas com ação bactericida detectável em testes de determinação de MIC, os quais detectam morte de microorganismos independentemente da causa, que pode ser a lise de membranas ou uma série de outros alvos (Brogden 2005). Moléculas com diferentes sítios de ação obedecerão à diferentes pressões estruturais. Mesmo os peptídeos que interagem com membranas podem ter mecanismos distintos, conforme demonstrado por Shai 2002 . Membranas são compostas de interfaces carregadas e de centros hidrofóbicos, apresentando oportunidade para uma série de interações inespecíficas. Assim, moléculas podem interagir com membranas por forças distintas, e assim produzir efeitos diferenciados. Sabe-se que o conjunto de peptídeos antimicrobianos compartilha características físico-químicas, porém Dennison e colaboradores demonstraram que a aplicação destes parâmetros ao conjunto de peptídeo antimicrobianos é infrutífera. Dado este cenário, os objetivos específicos do presente trabalho são:

- Desenvolver metodologia capaz de identificar sub-conjuntos de peptídeos dentro do grupo de peptídeos membrano-ativos
- Classificar peptídeos membrano-ativos em grupos funcionais
- Obter informações mecanísticas relevantes sobre a interação de peptídeos e membranas
- Ampliar o modelo
- Testar a capacidade preditiva do modelo

3.2. Material e métodos

3.2.1. Métodos

Calorimetria de titulação isotérmica

Uma seringa controlada por computador injeta um pequeno volume de uma solução contendo δn_j^0 moles de uma substância química j em uma célula calorimétrica (o superescrito 0 é utilizado em δn_j^0 para indicar que esta quantidade representa a quantidade molar total da substância j na célula experimental). Com a adição da molécula j , ocorre uma mudança $d\xi$ na extensão da reação química. O calorímetro registra o calor decorrente da reação, q , que pode ser exo- ou endotérmico. Dois comentários são importantes, um é que reações atérmicas não são observáveis e o outro é que a extração de dados quantitativos a partir dos traços calorimétricos requer o uso de modelos matemáticos (Ladbury e Chowdhry 1998).

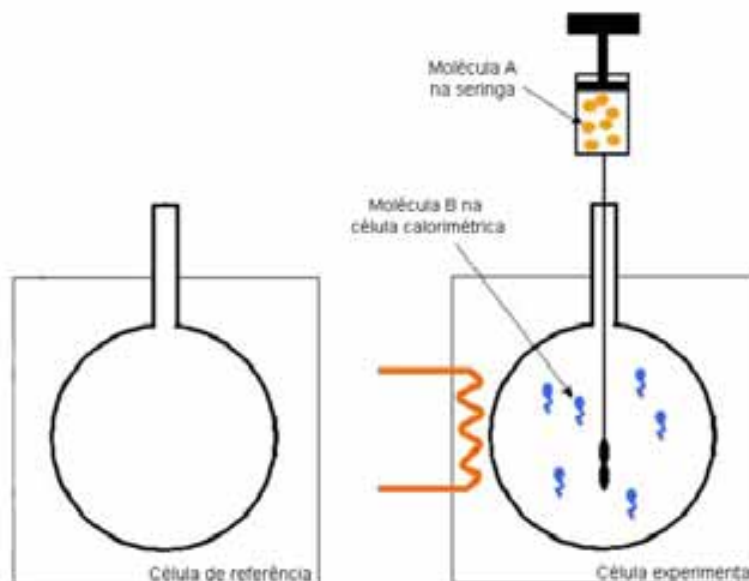


Figura 3.15. Desenho básico do calorímetro de titulação isotérmica (ITC). Um sistema contendo uma célula calorimétrica de referência e outra experimental é isolado do ambiente por uma jaqueta térmica. A célula experimental é carregada com a molécula B, a ser titulada com uma molécula A por meio de injeções discretas em um sistema em agitação constante. Ambas as células possuem termopares e estão conectadas por uma resistência. A titulação de A em B induz troca de calor (q) na célula experimental devido

mudança na extensão da reação química ($d\xi$). Diferenças de temperatura entre as células referência e experimental são equilibradas passivamente com a doação de calor (q) da jaqueta térmica para a célula experimental e assim ocorre a extinção da diferença de temperatura.

O princípio físico do calorímetro de titulação isotérmica (ITC) é demonstrável a partir da primeira lei da termodinâmica. De acordo com ela, a mudança de energia interna (dE) em um sistema fechado que sofre uma mudança de volume (V) a uma pressão p , é dado pela equação:

$$dE = q - p.dV \quad (1)$$

onde E é a energia interna do sistema.

Por definição, a entalpia é dada por:

$$H = E + p.V \quad (2),$$

A entalpia (H), energia interna (E) e volume (V) são funções de estado, portanto a mudança de entalpia (ΔH) entre os estados I e II é independente do caminho e da taxa de alteração.

Da derivação da equação (2), obtém-se:

$$dH = dE + p.dV + V.dp \quad (3)$$

Juntando com a equação (1):

$$dH = q + V.dp \quad (4)$$

Num sistema à pressão constante:

$$dH = q \quad (5)$$

Um calorímetro isobárico mede q e assim obtemos diretamente a mudança de entalpia, dH . O estado termodinâmico de um sistema pode ser definido por um conjunto de variáveis independentes. O conjunto mais prático é o de temperatura-pressão-composição:

$$H = H(T, p, \xi) \quad (6),$$

que pode ser desenvolvido da seguinte forma:

$$dH = \left(\frac{\delta H}{\delta T}\right)_{p,\xi}.dT + \left(\frac{\delta H}{\delta p}\right)_{T,\xi}.dp + \left(\frac{\delta H}{\delta \xi}\right)_{T,p}.d\xi \quad (7),$$

que à pressão e temperatura constante se torna:

$$dH = \left(\frac{\delta H}{\delta \xi}\right)_{T,p} \cdot d\xi \quad (8),$$

Juntando as equações 5 e 8, e dividindo pelo número de moles da substância j injetados em cada tempo x , obtém-se a equação fundamental da calorimetria de titulação isotérmica:

$$\frac{q}{dn_j^0} = \left(\frac{\delta H}{\delta \xi}\right)_{T,p} \cdot \left(\frac{d\xi}{dn_j^0}\right) \quad (9)$$

Os modelos servem para relacionar dn_j^0 com $d\xi$. A partir dessas grandezas obtém-se as constantes de interação (K_0), relacionado à energia livre de Gibbs (ΔG) por:

$$\Delta G = -RT \ln K_0 \quad (10)$$

Utilizando-se da terceira lei da termodinâmica, é possível a obtenção da mudança de entropia (ΔS), pela fórmula:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (11)$$

Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

Calorimetria diferencial exploratória (DSC) é uma técnica que mede a quantidade de calor necessário para estabelecer uma diferença de temperatura próxima a zero entre uma substância e um material inerte de referência. Esta condição é mantida durante um período em que ambos os materiais estão sujeitos a regimes idênticos de temperatura em um ambiente aquecido ou resfriado a uma taxa controlada (Ladbury e Chowdhry 1998).

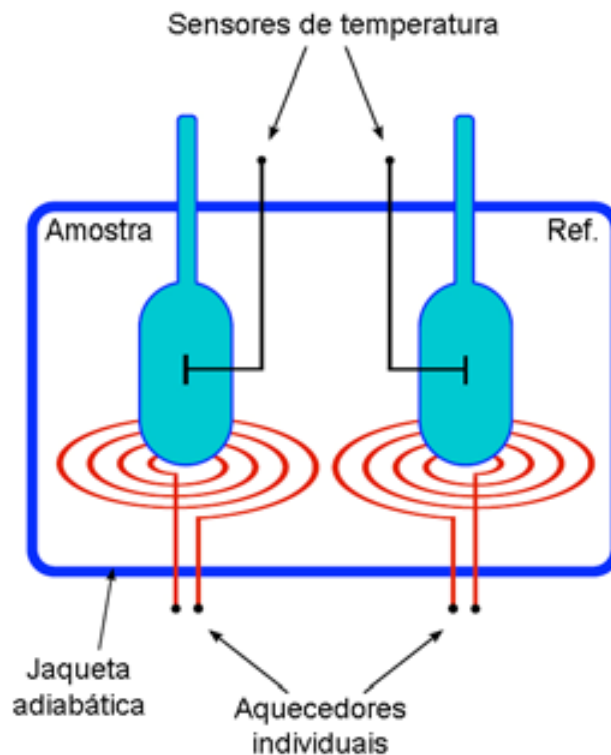


Figura 3.16. Diagrama de funcionamento de um calorímetro diferencial exploratório. Duas células termossensíveis, uma de referência e outra contendo o material a ser analisado, são isoladas por uma jaqueta adiabática. Ambas as células estão sujeitas ao mesmo regime de variação de temperatura (normalmente na escala de $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) a partir de aquecedores individuais, de forma que a energia pode ser mensurada. Sensores de temperatura verificam a temperatura dentro das células. Quando ocorre uma diferença de temperatura entre a célula de referência e a experimental, calor em excesso é doado ou recebido pela jaqueta adiabática para a primeira, de forma a manter a diferença de temperatura sempre próxima a zero.

Em um instrumento de DSC, a amostra e a referência inerte são aquecidas independentemente, mantendo em ambas uma temperatura idêntica. Se a amostra é uma solução ou suspensão, o material de referência é o solvente correspondente. Quando ocorre um processo físico-químico iniciado por aquecimento na célula experimental, o sistema controlador responde aumentando ou reduzindo o suprimento de calor nessa célula para igualar sua temperatura à da célula referência. O dado produzido pelo calorímetro é o excesso de potência (ΔP), apresentado em função da temperatura.

O instrumento de DSC registra o excesso de potência (ΔP), o tempo t e a temperatura T . Assim, o excesso de calor q , requerido para a mudança de temperatura e a

diferença de capacidade térmica, ΔC_p (à pressão constante p) entre a célula de referência e experimental são computados.

$$q = \int^{t+\Delta t} \Delta P(t') \cdot dt' \cong \Delta P \cdot \Delta t$$

também,

$$\Delta C_p = \left(\frac{q}{\delta T} \right)_p \cong \frac{q}{\Delta T} = \left(\frac{\Delta P}{\left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)} \right)$$

3.2.2. Materiais

A. Peptídeos – Foram obtidos a partir de síntese em fase sólida: DS 01 de *Phyllomedusa oreades* e Dshypo 03 e 06 de *P. hypochondrialis* (Brand *et al.* 2002; Brand *et al.* 2006). As nattererinas R e K, de *Physalaemus nattereri* (dados não publicados) e as filoseptinas PS-1,-2 e -3, todas de *P. hypochondrialis* (Leite *et al.* 2005). Também foram sintetizados HSP1, de *Hypsiboas punctata* e o peptídeo ainda não publicado phyllomelitina, de *P. hypochondrialis* (Prates *et al.* 2004). O peptídeo análogo de hyposina foi seqüenciado também da secreção cutânea de *P. hypochondrialis* (dados não publicados). Os peptídeos penetradores de células (CPPs) penetratina e tat-peptide também foram adquiridos a fim de determinar possíveis diferenças de mecanismo de ação com relação aos peptídeos antimicrobianos (Fischer *et al.* 2005). Os peptídeos da série intra foram desenhados a partir de buscas no banco de dados Swiss-Prot por proteínas abundantes em diversos organismos. O peptídeo intra-1 é um segmento de Histona H2A de vegetais, como *Vitis vinifera* e *Oryza sativa*. Já o peptídeo intra-2 é um segmento altamente conservado da subunidade maior da proteína ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxidase presente em mais de 200 espécies de vegetais. Intra-3 foi obtido a partir do precursor de proteína antimicrobiana CAP18 de *Oryctolagus cuniculus* e intra 4 do interferon α -1 de *Bos taurus*, ambos animais mamíferos. Todos os peptídeos tiveram pureza e seqüência avaliadas por espectrometria de massa. As seqüências peptídicas podem ser conferidas na seção de resultados.

B. Vesículas lipídicas – Fosfolipídeos quantificados gravimetricamente, DMPC e DMPC/DMPG (2/1 p/p), foram ressuspensos em clorofórmio e metanol (3/1 v/v) em uma concentração de 10 mg.mL^{-1} e secados em um rota-evaporador até a formação de um filme lipídico em um balão de fundo redondo. O filme foi então deixado por 3 horas sob vácuo para a evaporação do solvente remanescente. O filme fosfolipídico foi dissolvido em 1 mL de tampão (fosfato de sódio 20mM, pH 7,4) e agitado manualmente até a formação de uma solução turva, composta de vesículas multi lamelares (MLVs). Alternativamente, a ressuspensão do filme em tampão pode ser feita no próprio rota-evaporador com a manutenção do banho em uma temperatura superior ao T_m dos fosfolipídeos. As MLVs foram reduzidas e transformadas em vesículas grandes e unilamelares (LUVs) ao passá-las 19 vezes por uma membrana de 100 nm de policarbonato (Mini-extrusor Avanti, Avanti, AL) a uma temperatura acima do T_m dos fosfolipídeos (temperatura mantida a 30°C). A concentração dos fosfolipídeos foi estimada pelo ensaio colorimétrico que envolve a complexação de fosfolipídeos e ferrotiocianato de amônio (Stewart 1980). As amostras foram re-extrudadas 30 minutos antes de serem utilizadas nos experimentos, e foram reaproveitadas em no máximo 5 dias.

C. Experimentos de extravasamento de 5,6-carboxifluoresceína (CF) – Os filmes fosfolipídicos foram gerados e ressuspensos em 1 mL de 20 mM de CF em tampão (fosfato de sódio 20mM, pH 7,4). As amostras foram então congeladas em N_2 líquido e degeladas cinco vezes para aumentar a eficiência de encapsulamento de CF, e extrudadas conforme mencionado no item B. O marcador fluorescente não encapsulado foi separado em uma coluna de filtração em gel de 5 mL (Sephadex G-100) a uma temperatura abaixo do T_m dos fosfolipídeos para prevenir seu extravasamento (15°C). As medições de liberação de CF foram feitas em um aparelho FluoroMax 2 (SPEX, NJ) 10 minutos após a adição do peptídeo nas concentrações desejadas. A célula fluorimétrica foi também mantida a 15°C e as aferições foram feitas a esta temperatura. O sinal fluorescente é o resultado do relaxamento da auto-supressão do marcador hidrofílico CF, presente em concentrações altas no interior das vesículas. A excitação foi ajustada para o comprimento de onda de 480 nm e a emissão foi lida por meio de uma varredura de 450-

650 nm em incrementos de 1nm com tempo de integração de 0,5 s. Dados de extravasamento foram lidos a 510 nm. As fendas (‘slits’) foram ajustadas para 3nm (excitação e emissão). Triton X-100 foi utilizado para promover a lise completa dos lipossomos e a porcentagem de CF extravasado foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$CF(\text{extravasado}) = \frac{(I_{\text{amostra}} - I_{\text{tampão}})}{(I_{\text{tritonX-100}} - I_{\text{tampão}})}$$

D. Dicroísmo circular – Experimentos de dicroísmo circular foram conduzidos em um espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco International Co. Ltd., Tokyo, Japão). Os peptídeos foram dissolvidos a 20 μM em tampão (fosfato de sódio 20mM, pH 7,4). A adição de LUVs foi feita a partir de soluções estoque de aproximadamente 15 mM e sua concentração foi corrigida para o cálculo das relações molares. As aferições de dicroísmo circular foram feitas no alcance espectral de 180-260 nm e os resultados são a média de três varreduras à temperatura ambiente em uma célula de 0,2 cm. Após a subtração do sinal de dicroísmo circular do solvente, foi calculado o conteúdo de α -hélice em relação à uma α -hélice perfeita, resultando em uma medição de helicidade percentual (Kelly *et al.* 2005).

$$\text{Helicidade (\%)} = \frac{([\theta]_{222}(\text{amostra}) - [\theta]_{222}(\text{branco}))}{-30300}$$

E. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) – as mensurações de ITC foram feitas em um aparelho VP-ITC (MicroCal, Northampton, MA). Antes do uso, as soluções foram degaseificadas a vácuo. Em cada experimento, 10 μL de peptídeo na faixa de 40 a 200 μM foi injetado na célula experimental, de volume 1,4337 mL, que continha originalmente fosfolipídeos a aproximadamente 200 μM . Experimentos controle foram realizados para determinar o calor de diluição dos peptídeos. Todos os experimentos foram realizados a uma temperatura de 25°C. Nenhum dado quantitativo relativo ao ΔH de interação foi deduzido, já que a célula calorimétrica não conta com um excesso de lipídeos. A estimativa de ΔH requer a titulação completa do fosfolipídeo, o que não ocorreu em todos os casos.

F. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) – termogramas foram obtidos em um VP-DSC (MicroCal, Northampton, MA) em um intervalo de 10 a 40 °C à uma taxa de varredura de 60°C.h⁻¹. Termogramas controle, obtidos com tampão, foram subtraídos de todos os dados. A entalpia molar foi obtida pela subtração do termograma controle, normalização dos sensogramas pela concentração de fosfolípídeo, determinação da linha de base (‘linear connect’) e integração da área sob o pico de transição.

3.3. Resultados

3.3.1. Peptídeos

Diversos peptídeos membrano-ativos foram sintetizados, purificados até a homogeneidade e tiveram sua pureza avaliada por espectrometria de massa (dados não mostrados). Estes foram escolhidos com o objetivo de amostrar a diversidade de parâmetros físico-químicos dentre peptídeos membrano-ativos, reconhecendo a existência de no mínimo duas classes gerais de moléculas: os peptídeos antimicrobianos (AMPs) e os peptídeos penetradores em células (CPPs). Dos 17 peptídeos estudados, 10 deles têm atividade antimicrobiana comprovada, tais quais DS 01 e a filoseptina PS-1, com dados já publicados (Brand *et al.* 2002; Leite *et al.* 2005). As concentrações inibitórias mínimas (MICs) para DShypo 03 e 06, PS-2 e PS-3 e os peptídeos nattererina R e K, e a phyllomelitina ainda não foram publicados, embora estas moléculas possuam atividade antimicrobiana (determinações de MIC em andamento). Já os peptídeos penetratina e tat-peptide são experimentalmente capazes de causar permeabilização de membranas sem indução de lise celular, o que os caracteriza como CPPs (Fischer *et al.* 2005). Os peptídeos da série intra, assim como o análogo de hyposina nunca foram estudados neste sentido.

Tabela 3.2. Sequências peptídicas e algumas de suas características físico-químicas computadas

Peptídeo	Sequência	MW	pI	Zp	HM*
DS 01	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL-NH2	2793,59	10,00	+ 3	0,95
DShypo 06	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAVLNSASEAL-NH2	3252,79	9,53	+ 2	0,79
DShypo 03	ALWKDVLKKIGTVALHAGKAAFCAAADTISQGGG	3352,84	9,53	+ 3	1,95
Nattererina R	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINRFSPQPQ	3207,80	10,00	+ 3	1,13
Nattererina K	GLKDMIKNLAKEAAVLAGAVINKFSPQPQ	3179,80	9,83	+ 3	1,13
PS 1	FLSLIPHAINAVSAIAKHN-NH2	2015,14	8,76	+ 3	2,68
PS 2	FLSLIPHAINAVSTLVHVF-NH2	2115,17	7,02	+ 3	3,65
PS 3	FLSLIPHAINAVSALANHG-NH2	1944,07	6,92	+ 2	2,83
HSP1	GILDAIKAIKAAG	1311,80	8,59	+ 1	3,46
Filomelitina	LPSIVSVWKQKLL-NH2	1509,94	10,00	+ 2	2,36
Intra 1	KAGLQFPVGRIFRFLK	1801,10	12,02	+ 4	1,51
Intra 2	FKALRALREDLRIPTSYIK	2403,42	10,27	+ 3	0,83

Intra 3	FRNKIKEKLLKKIGQKIQGF	2303,41	10,68	+ 6	1,86
Intra 4	LAKRRVLTLLRQLRRVSPSS	2349,47	12,60	+ 6	0,39
Análogo de hyposina	LRPAILVRVKGKGL	1520,02	12,02	+ 4	3,08
Penetratina	RQIKIWFQNRMKWKK	2246,30	12,31	+ 6	0,11
Tat peptide	GRKKRRQRRRPPQ	1719,06	12,70	+ 8	0,43

MW = massa molecular monoisotópica

pI = ponto isoelétrico

Zp = carga teórica

HM = momento hidrofóbico

Estes peptídeos membrano-ativos foram sujeitos a um conjunto de experimentos que compreende a análise de sua interação inicial com membranas por calorimetria de titulação isotérmica (ITC), seu grau de inserção em membranas por calorimetria diferencial exploratória (DSC) e a capacidade dos peptídeos de induzir extravasamento de um marcador fluorescente. A partir dos respectivos resultados, peptídeos foram subdivididos em grupos funcionais.

3.3.2. Peptídeos membrano-ativos antimicrobianos

A. Grupo 1 – Composto por peptídeos das famílias das dermaseptinas e nattererinas. A figura 3.17A mostra os traços calorimétricos da interação de DS 01, peptídeo modelo para este grupo, com vesículas grandes unilamelares (LUVs) compostas de DMPC e de DMPC/DMPG (2:1). As injeções de peptídeo produzem reações exotérmicas que formam um padrão complexo, não ajustável pelos modelos de interação atualmente disponíveis. Experimentos controle foram executados com a injeção de peptídeo em tampão, liberando constantes $\sim 0,2 \mu\text{cal}$ por injeção, o que indica inexistência de diluição de agregados (dados não mostrados). Os traços calorimétricos integrados demonstram que as quantidades de calor liberadas na interação de DS 01 com membranas de DMPC e de DMPC/DMPG (2:1) são quase equivalentes. O grau de perturbação do peptídeo DS 01 na transição de fase $P'_{\beta} \rightarrow L\alpha$ da membrana pode ser visto na figura 3.17B. A temperatura de transição (T_m) tanto para vesículas de DMPC quanto de DMPC/DMPG (2:1) foi de $23,4^{\circ}\text{C}$. Percebe-se que a incorporação de concentrações crescentes de DS 01 não altera o T_m e nem induz a formação de múltiplos picos de transição. O efeito mais aparente é a diminuição da cooperatividade de transição pra ambos os tipos de vesículas, identificada

por um alargamento do pico (figuras 3.17A e B). Apesar da diminuição de cooperatividade, somente LUVs de DMPC/DMPG (2:1) tiveram redução no ΔH de transição de fase $P'\beta \rightarrow L\alpha$ (figura 3.17C). Para vesículas enriquecidas com DMPG, a incorporação de $\sim 1/33$ peptídeo/lipídeo (mol/mol) de DS 01 reduz a entalpia de transição a somente 20% da original (figura 3.17B). Essa redução de entalpia, exclusiva para LUVs de DMPC/DMPG (2:1), correlaciona-se qualitativamente à indução de lise de carboxifluoresceína (CF) (figura 3.17C). O extravasamento de CF foi de 90% em uma proporção de 1/100 peptídeo/lipídeo em LUVs de DMPC/DMPG (2:1) e não atingiu 50% para LUVs de DMPC na faixa testada (8/100 peptídeo/lipídeo). A titulação de DS 01 com LUVs de ambas as composições induz forte estruturação em α -hélice, conforme mostrado na figura 3.21A para LUVs de DMPC/DMPG (2:1). A estrutura secundária se estabiliza em 90% de helicidade a uma concentração de 300 μM de vesículas (figura 3.21A).

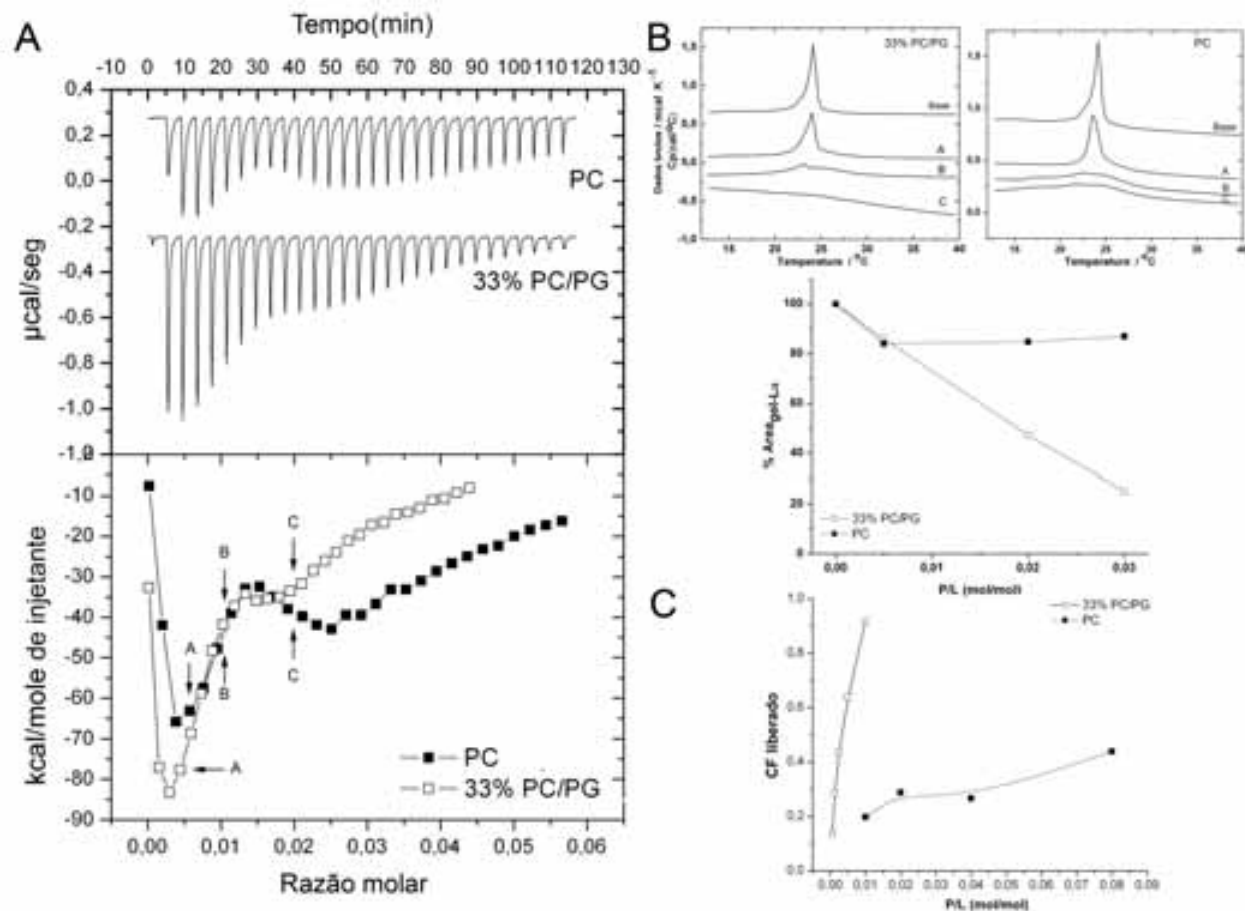


Figura 3.17. Interação de DS 01 com LUVs. A. Traços calorimétricos da titulação de LUVs de DMPC e DMPC/DMPG (2:1) com DS 01 em injeções de 10 μL – LUVs de DMPC/DMPG (2:1) a 201 μM , DMPC a 156 μM e DS 01 a 40 μM . B. Termogramas de DSC mostrando o efeito da incorporação de crescentes quantidades de DS 01 no comportamento termotrópico das membranas, assim como a redução na área do pico de transição $P'_\beta \rightarrow L_\alpha$. C. Extensão de extravasamento de CF em função da adição de DS 01 em LUVs de ambas composições.

DShypo 03, DShypo 06 e as nattererinas R e K apresentaram comportamento similar ao de DS 01, interagindo com vesículas de ambas as composições, porém induzindo reações menos exotérmicas que DS 01 em LUVs de DMPC (dados não mostrados). Fator comum e marcante a todos eles é a diminuição da cooperatividade de transição $P'_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ acompanhada da redução de entalpia de transição para LUVs de DMPC/DMPG (2:1). A figura 3.18 mostra os termogramas obtidos para a interação de nattererina K com o mesmo conjunto de LUVs, e ilustra o comportamento análogo ao de DS 01 (figura 3.17B). Este efeito é compatível com o de detergentes e com o de proteínas relativamente insolúveis integrais de membrana (McElhaney 1986; Prenner *et al.* 1999). A relação entre a diminuição no ΔH de transição de fase em LUVs de DMPC/DMPG (2:1) e a indução de extravasamento de CF parece manter-se para todos os peptídeos desse grupo (figura 3.19). Também como registrado para DS 01, nenhum destes peptídeos induziu redução de ΔH em LUVs de DMPC ou extravasamento de CF significativo em LUVs desta composição (figura 3.19). Além de todas estas semelhanças funcionais, todos os peptídeos desse grupo estruturaram-se em hélice em porcentagens compatíveis ao interagir com vesículas fosfolipídicas de ambas as composições (dados não mostrados).

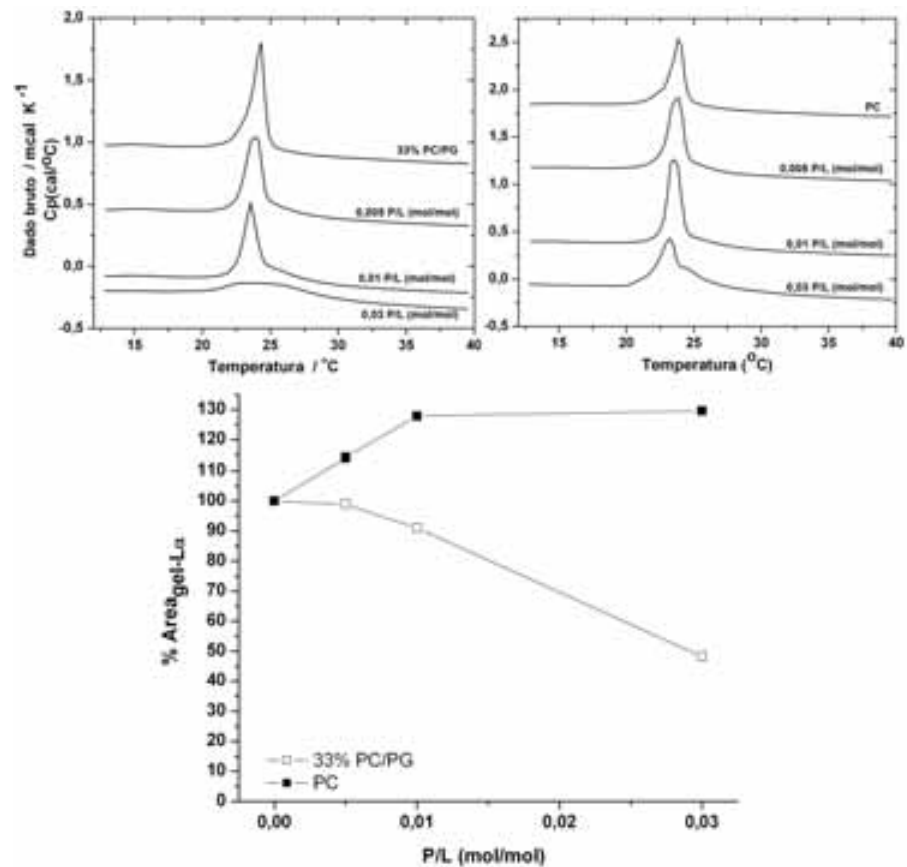


Figura 3.18. Termogramas de calorimetria de titulação diferencial (DSC) mostrando o efeito da incorporação de crescentes quantidades de Nattererina K no comportamento termotrópico de LUVs de DMPC/DMPG (2:1) e DMPC (as relações molares estão no gráfico). Em detalhe a área abaixo do pico de transição $P'_\beta \rightarrow L_\alpha$ em função da incorporação de peptídeo.

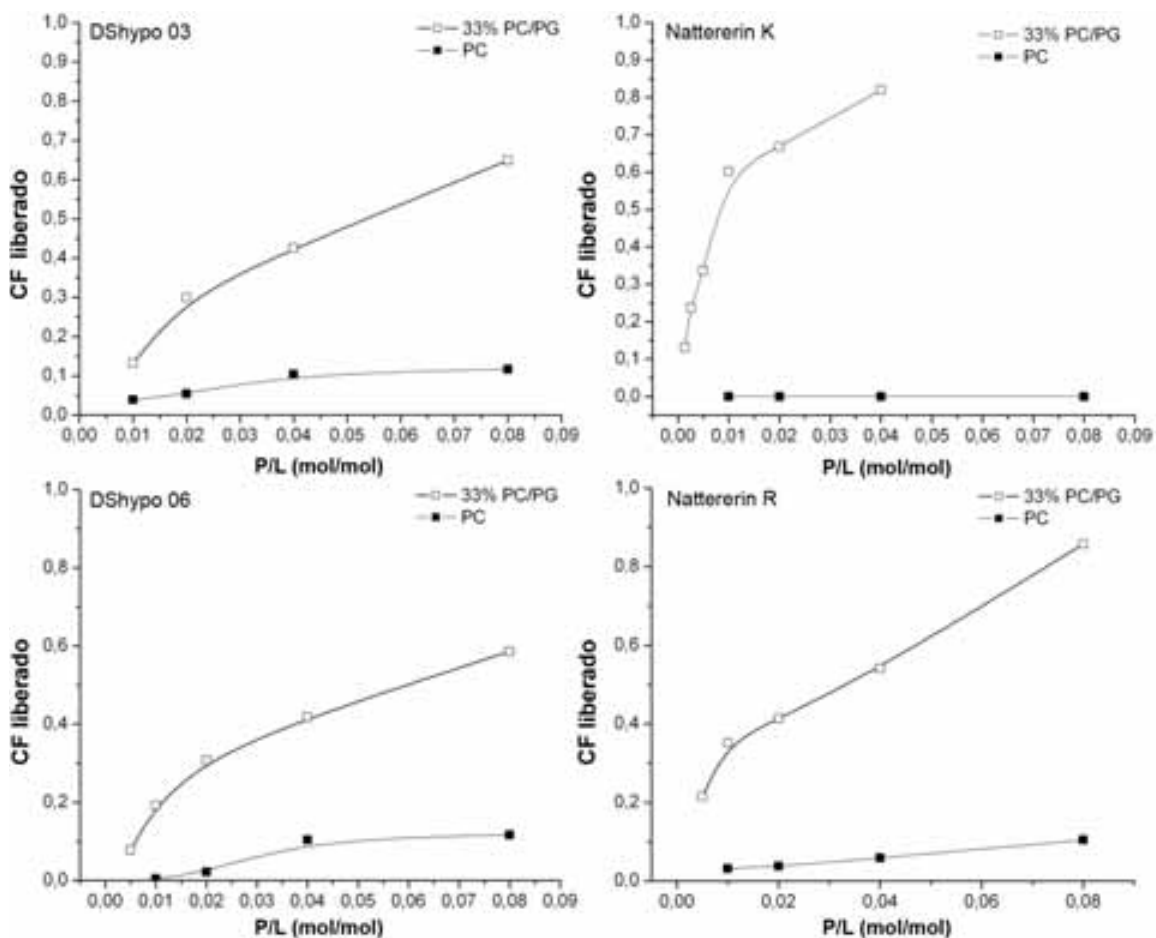


Figura 3.19. Extensão de extravasamento de CF em função da adição de peptídeos membros do grupo 1. DS hypo 03, DS hypo 06, Nattererina K e Nattererina R em LUVs de DMPC/DMPG (2:1) (□) e de DMPC (■).

B. Grupo 2 – Esse grupo é composto pelos peptídeos HSP1 e filomelitina. Não induzem troca de calor em sua titulação com LUVs de DMPC, indicando a necessidade de um potencial de membrana negativo para sua adsorção (figura 3.20A). O efeito de HSP1 na transição de fase $P'_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ de LUVs de DMPC/DMPG (2:1) causa diminuição do T_m (de 23,9 para 21,5 °C) e alteração na cooperatividade da transição, porém não induz redução no ΔH (figura 3.20B). A incorporação de peptídeos do grupo 2 em membranas enriquecidas com DMPG induziu uma transição principal de fase de dois componentes, com uma endoterma de maior cooperatividade, à temperatura mais baixa, superimposta à uma endoterma menos cooperativa. A indução de transição de fase com dois ou mais

componentes é comum a várias moléculas membrano-ativas (Prenner *et al.* 1999; Lambros e Rahman 2004). Peptídeos do grupo 2 não possuem efeito algum na transição de fase de vesículas de DMPC, causando extravasamento de CF exclusivamente em LUVs de DMPC/DMPG (2:1) (Figura 3.20C). Ambos HSP1 e filomelitina em relação molar de 8/100 (peptídeo/lipídeo) são capazes de induzir liberação de aproximadamente 50% de CF em vesículas aniônicas (figura 3.20C). Dados de dicroísmo circular demonstram que membros desse grupo compartilham com os peptídeos do grupo 1 um alto grau de estruturação em α -hélice ao entrar em contato com membranas, mas diferentemente dos primeiros, somente com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) (figura 3.21F e G).

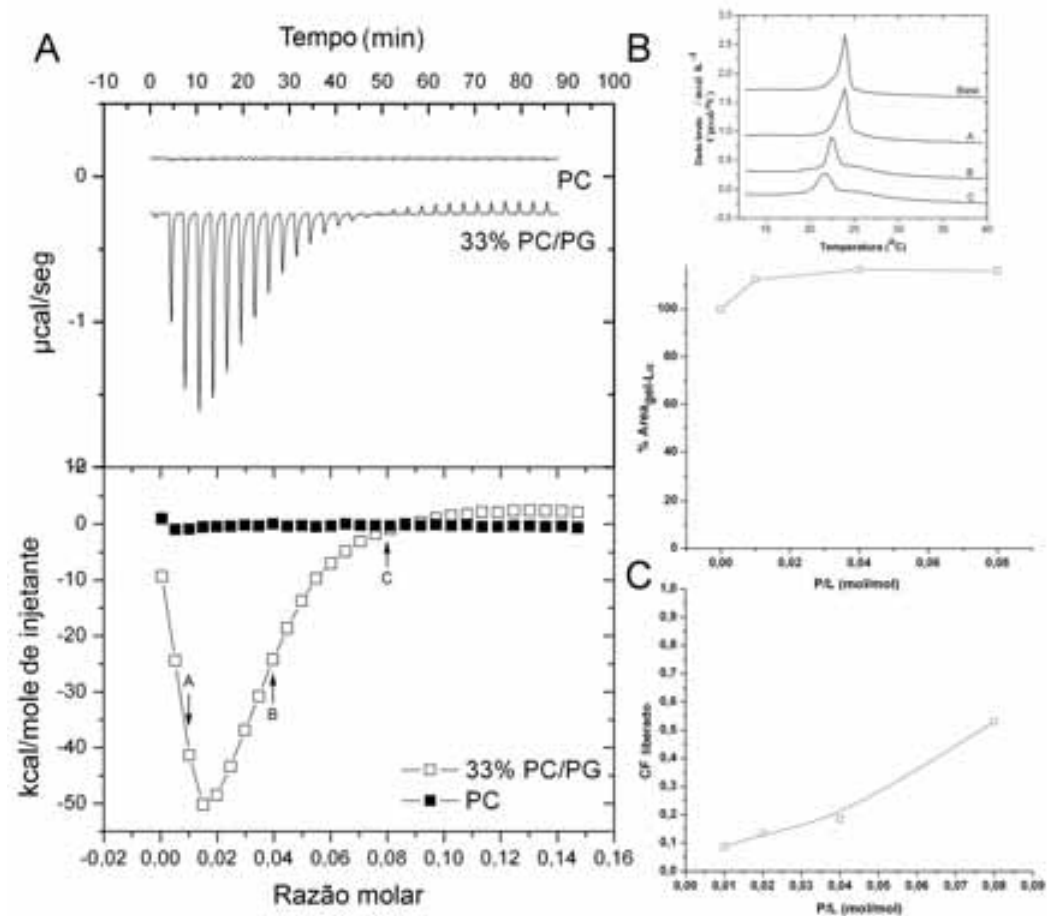


Figura 3.20. Interação de HSP1 com LUVs. A. Traços calorimétricos da titulação de LUVs de DMPC e DMPC/DMPG (2:1) com HSP1 em injeções de $10\mu\text{L}$ – LUVs de DMPC/DMPG (2:1) e de DMPC a $150\mu\text{M}$ e HSP1 a $100\mu\text{M}$. B. Termogramas de calorimetria de titulação diferencial (DSC) mostrando o efeito da incorporação de crescentes quantidades de HSP1 no comportamento termotrópico de LUVs de DMPC/DMPG (2:1), assim como a redução na área do pico de transição $P'_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$. C. Extensão de extravasamento de CF em função da adição de HSP1 em LUVs de DMPC/DMPG (2:1).

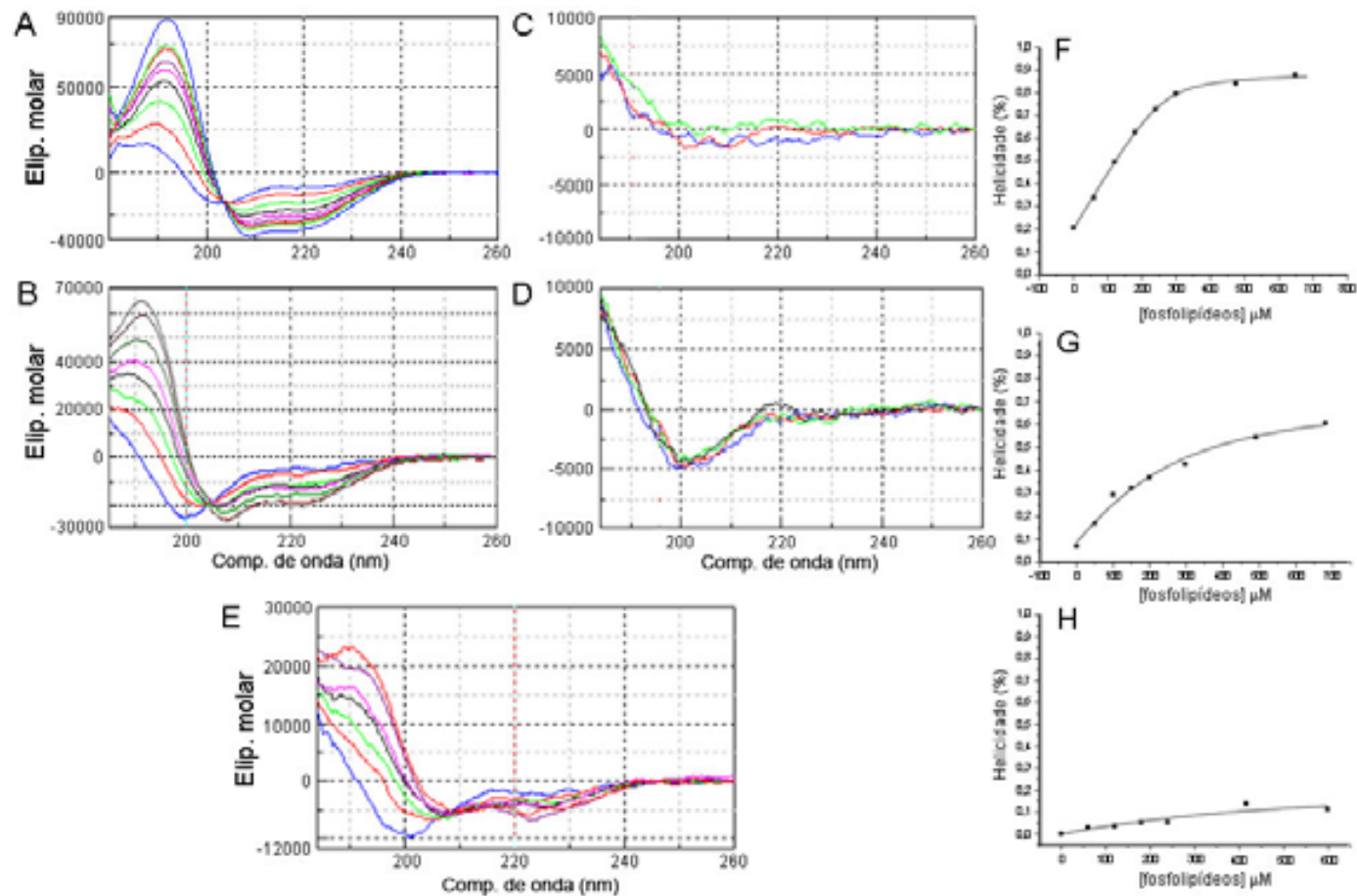


Figura 3.21. Espectros de dicroísmo circular (CD) dos peptídeos **A.** DS 01, **B.** HSP1, **C.** Intra 2, **D.** Intra 4, **E.** PS-2, em tampão fosfato e na presença de concentrações crescentes de LUVs de DMPC/DMPG (2:1). Em detalhe o conteúdo de hélice avaliada pela $[\theta]_{222}$ em função da adição de LUVs de DMPC/DMPG (2:1) para **F.** DS 01, **G.** HSP1 e **H.** PS-2. A concentração de todas as moléculas foi mantida em 20 μM e o efeito de diluição corrigido.

C. Grupo 3 – Peptídeos da família das filoseptinas (PS-1,-2,-3) e o peptídeo análogo de hyposina formam esse grupo, uma vez que também compartilham atividades antimicrobianas. As injeções de PS-2, peptídeo modelo, produzem reações exotérmicas em LUVs de DMPC/DMPG (2:1), e em menor extensão em LUVs de DMPC (figura 3.22A). Julgando pela quantidade de calor liberado, as titulações indicam afinidades variáveis por vesículas neutras, na ordem PS-3 > PS-2 > PS-1 > análogo de hyposina (dados não mostrados). A incorporação de PS-2 em LUVs de DMPC/DMPG (2:1) induz redução do T_m e de cooperatividade da transição $P'_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ (figura 3.22B). Foram observados os mesmos efeitos qualitativos no comportamento termotrópico da transição principal de fase para LUVs de DMPC (dados não mostrados). O comportamento termotrópico de PS-2 é comum aos outros membros do grupo. A exemplo dos peptídeos do grupo 2, nenhuma destas moléculas induziu redução do ΔH de transição (figura 3.22B). Apesar de dados da literatura demonstrarem a capacidade microbicida dos membros desse grupo, a indução do extravasamento de CF não pôde ser totalmente correlacionada com a atividade antimicrobiana por ação membranolítica (dados não mostrados). Enquanto PS-3 induz efetivamente o extravasamento de CF em vesículas de ambas as composições, o análogo de hyposina foi inativo. Comparados aos membros dos grupos 1 e 2, possuem os menores níveis de estruturação secundária. Cálculos de helicidade atestam para até 30% de ordenação na região de saturação de ligante (figura 3.21E e 3.21H). PS-3 foi uma exceção e estruturou-se também ao ser titulado com LUVs de DMPC (dados não mostrados).

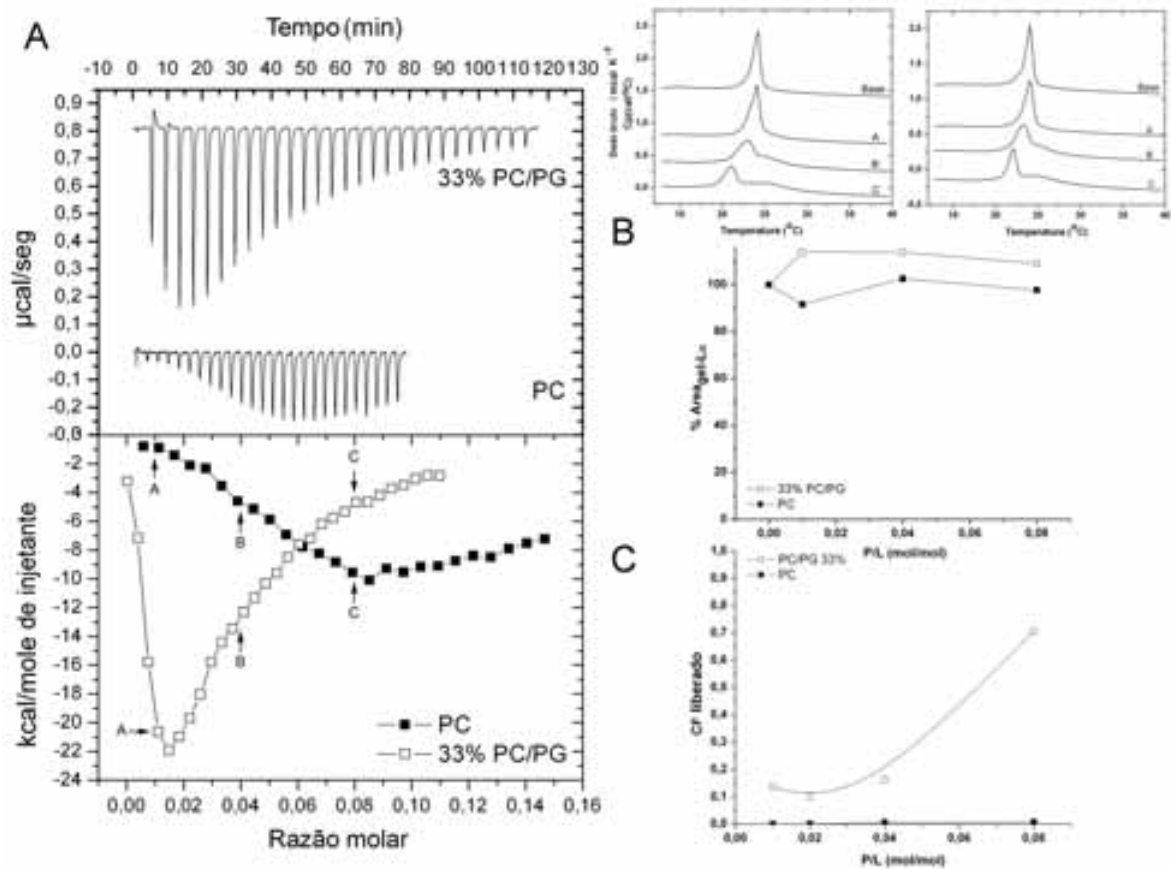


Figura 3.22. Interação de PS-2 com LUVs. A. Traços calorimétricos da titulação de LUVs de DMPC e DMPC/DMPG (2:1) com PS-2 em injeções de $10\mu\text{L}$ – LUVs de DMPC/DMPG (2:1) a $201\mu\text{M}$, de DMPC a $144\mu\text{M}$ e PS-2 a $100\mu\text{M}$. B. Termogramas de calorimetria de titulação diferencial (DSC) mostrando o efeito da incorporação de crescentes quantidades de PS-2 no comportamento termotrópico LUVs das membranas. C. Extensão de extravasamento de CF em função da adição de PS-2 em LUVs de ambas as composições.

3.3.3. Peptídeos membrano-ativos não antimicrobianos

Grupo 4 – Grupo composto por penetratina (figura 3.23A) e pelos peptídeos intra 3 e intra 4 (figura 3.24A), os dois últimos devido a atividades compatíveis com penetradores de membrana (CPP-like). Estes não apresentam atividade antimicrobiana *in vitro* em condições fisiológicas (experimentos em execução). De acordo com os traços calorimétricos da figura 3.23A e 3.24A, interagem exclusivamente com membranas carregadas negativamente. A titulação de LUVs de DMPC/DMPG (2:1) com peptídeos desse grupo atinge níveis de saturação precoce quando comparado às titulações dos membros dos demais. Isto deve ocorrer devido à neutralização do potencial de membrana negativo, condição aparentemente necessária à sua interação. Alteram o comportamento termotrópico de LUVs negativamente carregadas de forma compatível com os membros dos grupos 2 e 3, sem alterar o comportamento de LUVs de DMPC. Característico a estes peptídeos é o fato de causarem extravasamento de CF em LUVs de DMPC/DMPG (2:1) exclusivamente, em baixas relações molares, mesmo não apresentando atividade antimicrobiana detectável (figuras 3.23C e 3.24C). Penetratina induz 50% de lise a uma relação molar de 1/100 peptídeo/lipídeo, enquanto que intra 4 precisa de somente 0,3/100 peptídeo/lipídeo para produzir o mesmo efeito. Nenhum dos membros desse grupo estruturou-se ao ser titulado com LUVs de ambas as composições (figura 3.21C e D).

B. Grupo 5 – composto pelos peptídeos intra 1, intra 2 (figura 3.25) e tat-peptide. Assim como membros dos grupos 2 e 4, os traços calorimétricos demonstram interação exclusiva com LUVs enriquecidas de DMPG, conforme exemplificado para intra 2 (figura 3.25A). Qualitativamente, têm o mesmo efeito no comportamento termotrópico de membranas dos membros dos grupos 2, 3 e 4, também exclusivo para LUVs de DMPC/DMPG (2:1), conforme mostrado para o peptídeo intra 2 (figura 3.25B). Assim como os membros do grupo 4, estes não se estruturam em hélice ao serem titulados com LUVs (figura 3.25C). Intra 2 não induz extravasamento de CF nas concentrações testadas, corroborando com os dados obtidos para os outros membros desse grupo (figura 3.25C).

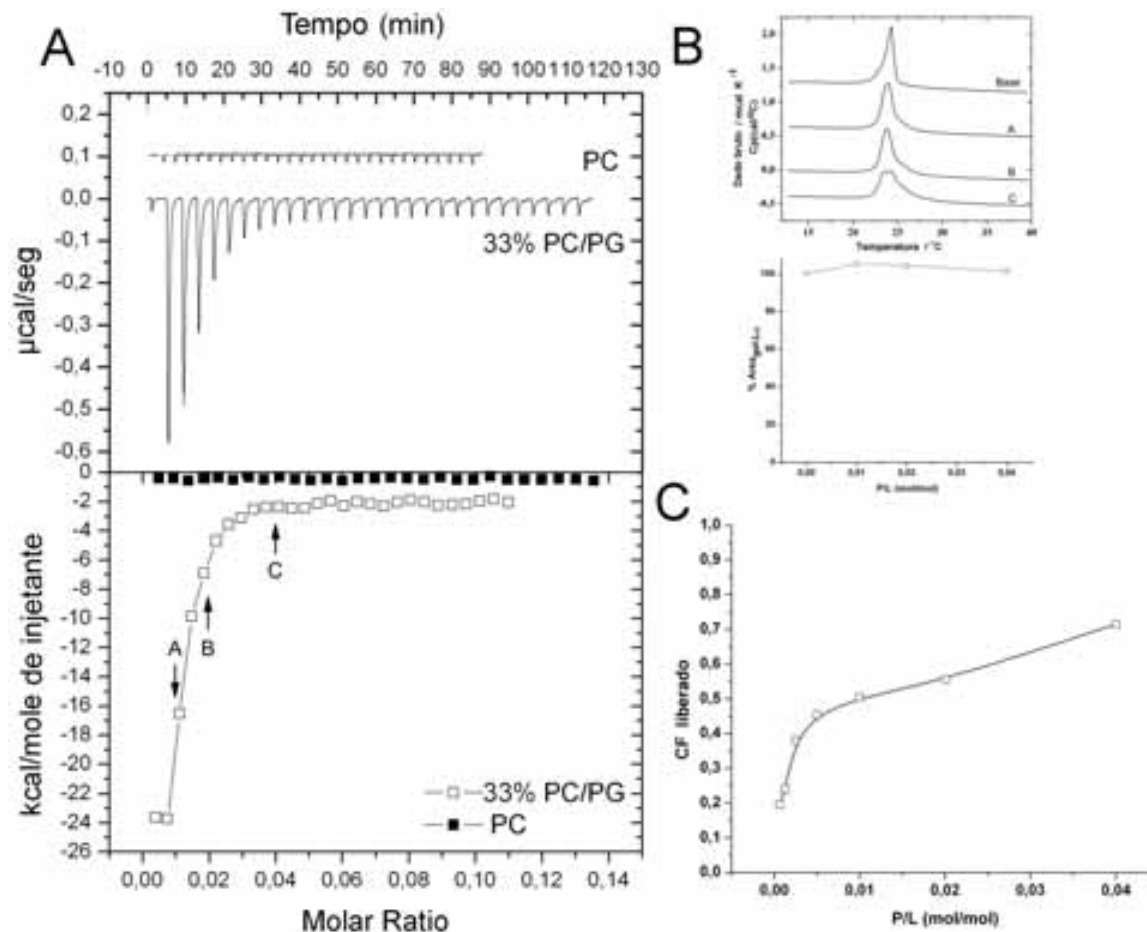


Figura 3.23. Interação de penetratina com LUVs. **A.** Traços calorimétricos da titulação de LUVs de DMPC e DMPC/DMPG (2:1) com penetratina em injeções de 10 μL – LUVs de DMPC/DMPG (2:1) a 201 μM , de DMPC a 163 μM e penetratina a 100 μM . **B.** Termogramas de calorimetria de titulação diferencial (DSC) mostrando o efeito da incorporação de crescentes quantidades de penetratina no comportamento termotrópico LUVs de DMPC/DMPG (2:1). **C.** Extensão de extravasamento de CF em função da adição de penetratina em LUVs de DMPC/DMPG (2:1).

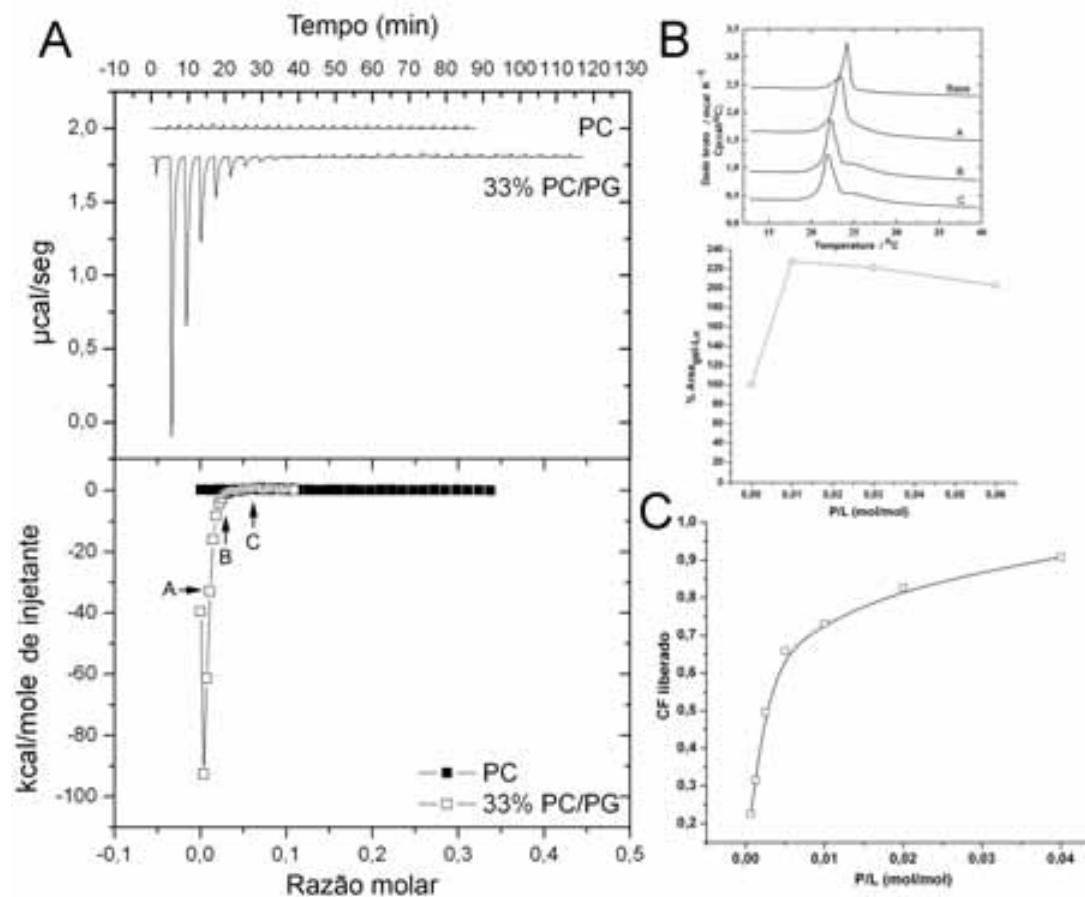


Figura 3.24. Interação de intra 4 com LUVs. A. Traços calorimétricos da titulação de LUVs de DMPC e DMPC/DMPG (2:1) com intra 4 em injeções de $10\mu\text{L}$ – LUVs de DMPC/DMPG (2:1) a $201\mu\text{M}$, de DMPC a $131\mu\text{M}$ e penetratina a $100\mu\text{M}$. B. Termogramas de calorimetria de titulação diferencial (DSC) mostrando o efeito da incorporação de crescentes quantidades de intra 4 no comportamento termotrópico LUVs de DMPC/DMPG (2:1). C. Extensão de extravasamento de CF em função da adição de intra 4 em LUVs de DMPC/DMPG (2:1).

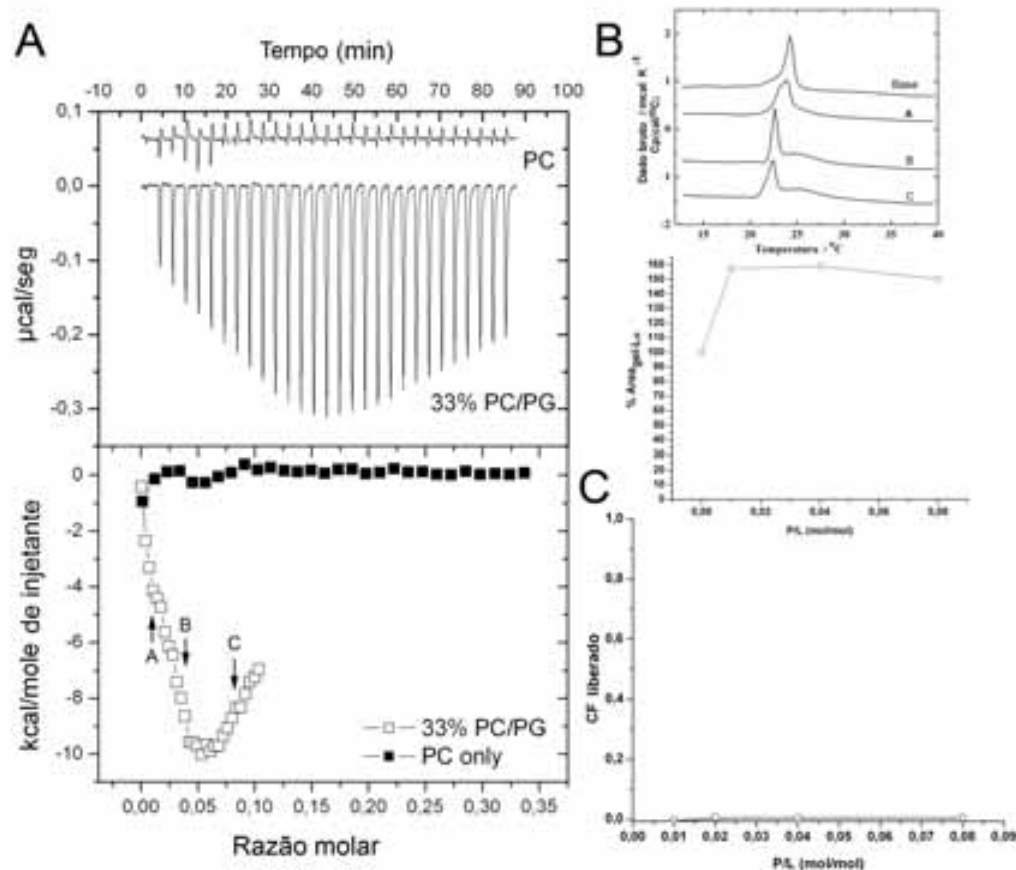


Figura 3.25. Interação de intra 2 com LUVs. **A.** Traços calorimétricos da titulação de LUVs de DMPC e DMPC/DMPG (2:1) com intra 2 em injeções de 10 μ L – LUVs de DMPC/DMPG (2:1) a 213 μ M, de DMPC a 131 μ M e intra 2 a 100 μ M e 200 μ M, respectivamente. **B.** Termogramas de calorimetria de titulação diferencial (DSC) mostrando o efeito da incorporação de crescentes quantidades de intra 2 no comportamento termotrópico LUVs de DMPC/DMPG (2:1). **C.** Extensão de extravasamento de CF em função da adição de intra 2 em LUVs de DMPC/DMPG (2:1).

3.3.4. Relação entre tamanho das vesículas e extravasamento de carboxifluoresceína

Peptídeos representativos de seus grupos e capazes de induzir lise em LUVs de DMPC/DMPG (2:1) tiveram a extensão de seu extravasamento de CF correlacionado com o espalhamento de luz da amostra. A figura 3.26 demonstra que peptídeos do grupo 1, os mesmos capazes de reduzir a entalpia de transição $P'_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$, apresentam também uma relação linear entre a quantidade de CF extravasado e o tamanho das partículas em solução (DS 01 e nattererina K). É interessante ver que peptídeos dos grupos 2, 3 e 4, representados por HSP1, PS 2 e intra 4, respectivamente, não tiveram o mesmo comportamento. Estes induziram lise sem alterar o tamanho das vesículas, o que indica um mecanismo distinto dos primeiros (figura 3.26). Por outro lado, DS 01 possui os dois fenômenos dissociados para LUVs de DMPC, para os quais o extravasamento ocorre independentemente do tamanho da partícula (dados não mostrados). Estes dados indicam mecanismos de lise dependentes da composição fosfolipídica das membranas (Bechinger e Lohner 2006).

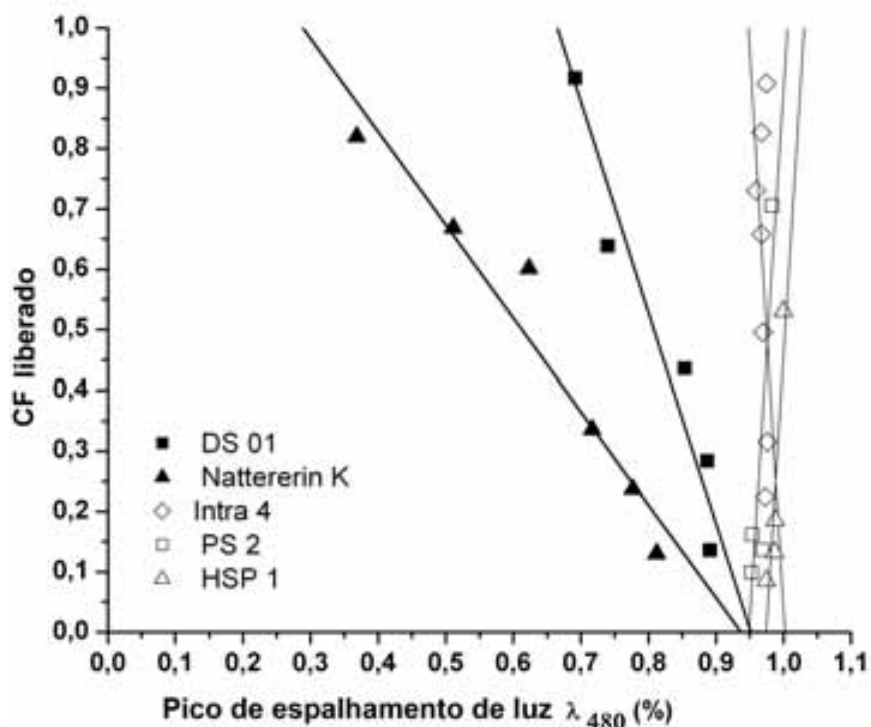


Figura 3.26. Relação entre o extravasamento de CF e a intensidade do pico de espalhamento de luz em LUVs de DMPC/DMPG (2:1) para peptídeos membros do grupo 1 (DS 01 e nattererina K), grupo 2 (HSP1), grupo 3 (PS-2) e grupo 4 (intra 4).

3.4. Discussão

O presente trabalho pretende investigar a existência de categorias funcionais em peptídeos membrano-ativos e a partir disso elaborar um possível arcabouço metodológico capaz de predizê-las. Para tal, foram escolhidas inicialmente propriedades físico-químicas relevantes às suas interações, discriminantes para cada grupo. Tal problema tem sido estudado pela geração de análogos de determinadas seqüências com variações singulares em propriedades como momento hidrofóbico, cationicidade, helicidade, entre outras (Dathe e Wieprecht 1999; Yeaman e Yount 2003). Estes estudos são conhecidos pela sigla QSAR (quantitative structure-activity relationships) e partem da premissa de que existe certa homogeneidade entre os grupos de peptídeos antimicrobianos. Normalmente, destes estudos derivam-se regras para moldes específicos de seqüências, sendo essas extrapoladas à totalidade (Matsuzaki *et al.* 1997; Mee *et al.* 1997; Hilpert *et al.* 2006). A atividade de cada peptídeo é reconhecidamente uma função complexa de suas propriedades físico-químicas (Yeaman e Yount 2003). Porém, o que se verifica até o momento é uma literatura fragmentada que chama atenção para características particulares de moléculas e tem se mostrado ineficiente na determinação de suas características essenciais. Como uma tentativa de aproximar-se das características essenciais de peptídeos antimicrobianos, foi sintetizado e avaliado um amplo espectro de moléculas membrano-ativas. Para tal, desenvolveu-se uma metodologia com base em calorimetria de titulação isotérmica (ITC), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular (CD). Esta metodologia foi capaz de detalhar a interação em termos de ligação à membrana, o grau de inserção do peptídeo e a indução de lise. Além disso, a estrutura secundária decorrente da interação foi avaliada. LUVs compostas de DMPC e DMPC/DMPG (2:1) foram utilizadas, as últimas como modelo de células bacterianas. Utilizando-se dessas técnicas, os 17 peptídeos deste trabalho foram categorizados não em termos estruturais, mas funcionais.

Peptídeos do grupo 1 incluem os antimicrobianos das famílias das dermaseptinas e nattererinas. Membros desse grupo interagem com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) e de DMPC, conforme revelado pela integração dos traços calorimétricos da figura 3.17A. A fonte desse calor não é definida, podendo resultar de vários eventos moleculares, como a

interação superficial de cargas e/ou rearranjos organizacionais de membrana induzidos pela presença e/ou inserção dos peptídeos (Huang 2006). Assim, embora o calor trocado possa ser quantitativamente conservado, sua fonte pode diferir. Consideraremos que para o mesmo peptídeo, o mesmo grau de interação/perturbação induz a liberação da mesma quantidade de calor, independentemente da composição de membrana. A figura 3.17A mostra que DS 01 interage de forma complexa com ambos os tipos de membrana com o mesmo padrão de troca de calor, independente do potencial de membrana. A atração eletrostática entre membranas negativamente carregadas e peptídeos catiônicos sempre foi considerada um dos pilares na distinção entre células bacterianas e de mamíferos, sendo o acúmulo na superfície das primeiras a etapa crucial, decorrendo em internalização e lise celular (Zaslouff 2002; Yeaman e Yount 2003; Huang 2006). Também a análise da estrutura secundária desse peptídeo demonstra que ambas as composições de membrana são capazes de induzir helicoidização, aproximadamente na mesma proporção (figura 3.21A e dado não mostrado). Esse comportamento de acúmulo e estruturação em LUVs de ambas composições é comum a todos os membros desse grupo (dados não mostrados). Dados de calorimetria diferencial exploratória (figuras 3.17B e 3.18) e de extravasamento de CF (figuras 3.17C e 3.19) indicam que a atividade lítica para diferentes composições de membrana é mais determinante na etapa de inserção que no acúmulo em superfície, contrário a literatura.

A característica mais marcante desse grupo, distinguindo-o dos demais, é a alteração que causam no perfil termotrópico de LUVs de DMPC/DMPG (2:1), a qual consiste na redução do ΔH da transição $P'_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ (figuras 3.17B e 3.18). Acredita-se que as diferenças qualitativas e quantitativas causadas no efeito termotrópico de membranas, mais evidentes nessa transição, resultem da localização dos solutos nas diferentes porções da bicamada lipídica ao longo de seu eixo transversal (Jain e Wu 1977). O efeito causado pelo grupo 1 de peptídeos é comum a moléculas que interagem com ambas as interfaces polar e apolar das membranas, tal como alguns detergentes iônicos e proteínas integrais de membrana (Papahadjopoulos *et al.* 1975; McElhaney 1986; Prenner *et al.* 1999). Reconhecemos este como um “efeito surfactante” (Bechinger e Lohner 2006). Outras moléculas membrano-ativas, tais como a melitina e a anfotericina B demonstram comportamento semelhante (Fournier *et al.* 1998; Abrunhosa *et al.* 2005). É importante

observar que moléculas que agem dessa forma não constituem a totalidade de peptídeos antimicrobianos, e nem que isso esteja relacionado a seletividade dos mesmos. DS 01 é bactericida a aproximadamente 6 μM e é incapaz de induzir hemólise significativa, enquanto dados preliminares indicam que as nattererinas são hemolíticas e menos potentes como agentes antimicrobianos (Brand *et al.* 2002). Mesmo assim, peptídeos de ambas famílias, dermaseptinas e nattererinas, foram classificados no mesmo grupo.

Peptídeos do grupo 1 induziram extravasamento de CF de forma quase equivalente e exclusiva para vesículas compostas de DMPC/DMPG (2:1) (figura 3.17C e 3.19). Também o “efeito detergente” foi exclusivo a estas, indicando que a internalização e a estabilização dos peptídeos pode estar ligada à descontinuações induzidas por DMPG na matriz de interação de pontes de hidrogênio entre os grupos colina e fosfato do DMPC (Pasenkiewicz-Gierula *et al.* 1999). Também ‘lipid rafts’ ricas em DMPG podem influir neste comportamento (Bagatolli 2006). Moléculas deste grupo caracterizaram-se por um momento hidrofóbico (M_H) de aproximadamente 1, ponto isoelétrico (pI) entre 9-10 e massa molecular (MM) de 2700 a 3300 Da (figura 3.27), porém nem os limites desse grupo e nem a consistência do conjunto são conhecidos.

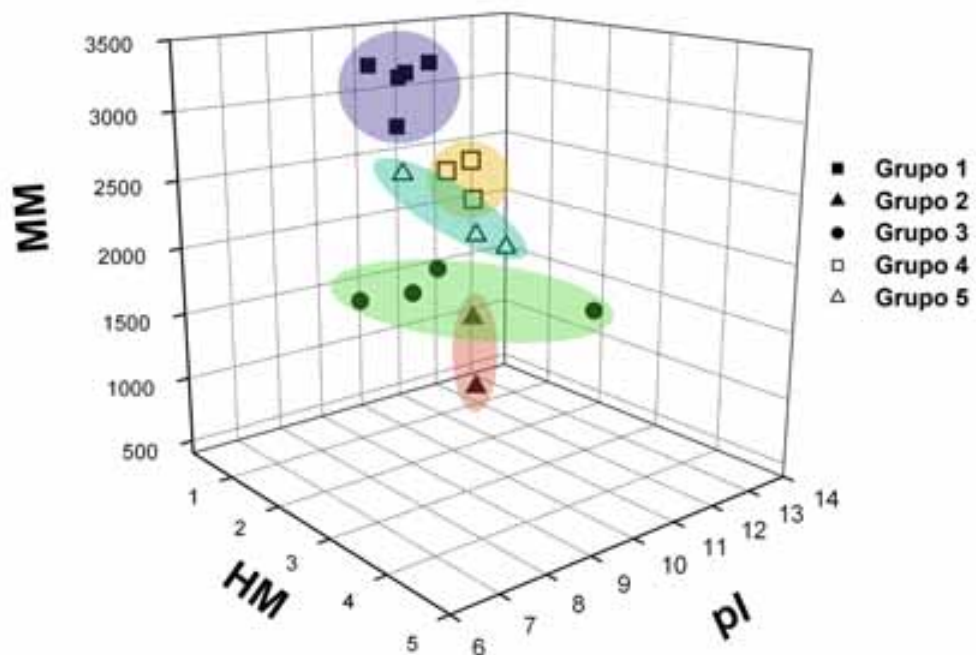


Figura 3.27. Conjuntos formados pelo agrupamento de moléculas com propriedades físico-químicas (MM = massa molecular, HM = momento hidrofóbico, pI = ponto isoelétrico) semelhantes.

Peptídeos do grupo 2 interagem quase que exclusivamente com membranas enriquecidas com DMPG, conforme demonstrado para HSP1 na figura 3.20A. Este comportamento é típico à vários peptídeos antimicrobianos e vale-se do potencial de membrana ($\Delta\phi$) de microorganismos, que é aproximadamente 50% superior ao das células de mamíferos (Yeaman e Yount 2003). Filomelitina, o outro membro do grupo, libera pouco calor ao interagir com LUVs de DMPC, porém induz hemólise (dados em aquisição). Isto indica que vesículas compostas somente de DMPC provavelmente não capturam as características essenciais de membranas de eritrócitos, naturalmente mais complexas. A significativa porcentagem de α -hélice para HSP1 e filomelitina, dissociada do “efeito surfactante”, demonstra que a estruturação decorrente do contato com membranas não deve levar necessariamente à estabilização de estruturas transmembrana. Seu efeito no comportamento termotrópico de LUVs de DMPC/DMPG (2:1) é comum a uma série de moléculas, a exemplo de gramicidina S, a qual induz uma transição de fase complexa (Prenner *et al.* 1999). Uma transição de fase de dois picos sobrepostos, com um componente mais e outro menos cooperativo, indica a presença de domínios de membrana (Lambros e Rahman 2004). Esses domínios são comumente interpretados como assimetrias na incorporação de peptídeos, e indicam que LUVs densamente populadas por peptídeos coexistem com LUVs menos densas (Lambros e Rahman 2004). Tal assimetria é previsível devido a interação exclusiva de alguns peptídeos com LUVs de potencial de membrana negativo (Figura 3.20A). Segundo McElhaney 1986, esse padrão de alteração no comportamento termotrópico de membranas é comum a proteínas que interagem exclusivamente com fosfolipídeos negativamente carregados, e indica uma interação superficial, somente entre cargas (Prenner *et al.* 1999). Membros do grupo 2 possuem pIs compatíveis aos dos membros do grupo anterior, porém diferem amplamente em suas MMs (1300-1500) e M_{HS} (2-4), indicando que os antimicrobianos de menor massa molecular escolhidos para o presente estudo são mais anfifílicos.

O grupo 3 é composto pelas filoseptinas e pelo análogo de hyposina. Possuem as mesmas características do grupo 2, principalmente no que diz respeito ao seu efeito no comportamento termotrópico de membranas (figura 3.22B), com a diferença de apresentarem baixo grau de estruturação secundária (figura 3.21E e H). Este é o grupo com maior variabilidade de atividade, principalmente em sua interação com LUVs de

DMPC (figura 3.22A). Titulações de vesículas eletricamente neutras com peptídeos desse grupo mostram uma gradação de troca de calor na ordem PS-3>PS-2>PS-1>análogo de hyposina, sendo que não houve interação detectável para o último (dados não mostrados). Também a indução de extravasamento de CF em LUVs de DMPC/DMPG (2:1) segue esta ordem (dados não mostrados). Interessantemente, PS-3 induz maior extravasamento de CF em LUVs de DMPC do que em LUVs enriquecidas com DMPG, demonstrando que um potencial de membrana negativo dificulta sua atividade lítica. Possível explicação está no pI dos membros desse grupo, que vai de 6,92 para PS-3 a 12,02 para o análogo de hyposina, indicando que seu grau de ionização reduz o coeficiente de partição em membranas neutras (Zhang *et al.* 2007).

O grupo 4, assim como o grupo 5, é composto por moléculas membrano-ativas que não apresentam atividade antimicrobiana. Peptídeos do grupo 4 são tentativamente chamados de peptídeos penetradores de células (CPPs) e análogos, tendo como referência o padrão de atividade da penetratina (figura 3.23A). Acredita-se que CPPs ajam tanto por uma via endocítica quanto se translocando diretamente pela membrana por meio de mecanismos parecidos com o de antimicrobianos, porém sem a formação de poros (Fischer *et al.* 2005). Membros desse grupo também apresentaram interação exclusiva com LUVs de DMPC/DMPG (2:1), conforme demonstrado pelas figuras 3.23A e 3.24A. Os traços calorimétricos indicam uma alta afinidade dos peptídeos por membranas negativamente carregadas, que ao saturarem dos mesmos têm suas cargas neutralizadas e deixam de interagir. Seu efeito no comportamento termotrópico de membranas é semelhante ao dos membros dos grupos 2 e 3, comuns à proteínas que interagem somente superficialmente (figuras 3.23B e 3.24B) (Prenner *et al.* 1999). De acordo com a literatura, a estrutura secundária da penetratina pode variar com as condições experimentais de desestruturada, a α -hélice e a folha β (Persson *et al.* 2004; Fischer *et al.* 2005). Contrariamente ao trabalho de Persson e colaboradores a penetratina não se estruturou ao interagir com as LUVs de DMPC/DMPG (2:1) (dado não mostrado) (Persson *et al.* 2004). Assim como a penetratina, nenhum dos peptídeos desse grupo se estruturou ao entrar em contato com as LUVs, conforme exemplificado para intra 4 na figura 3.21D.

Penetratina, intra 4 e intra 3 foram capazes de gerar extravasamento de CF em concentrações compatíveis à de peptídeos antimicrobianos (figuras 3.23C e 3.24C). Resultados prévios mostraram que a penetratina, assim como outros CPPs, foi incapaz de induzir lise significativa em LUVs de DOPC/DOPG (60:40) (Thoren *et al.* 2005). O extravasamento de CF observado no presente trabalho é provável reflexo do comprimento da cadeia apolar dos fosfolipídeos utilizados (12 carbonos saturados), comparado com os da literatura (18 carbonos saturados). Assim, a espessura relativa da membrana é menor, o que facilita a translocação de moléculas hidrofílicas incapazes de estabilizar estruturas transmembrana. Devido ao status de CPP da penetratina, extravasamento de CF dissociado de atividade antimicrobiana é provavelmente devido sua translocação direta através de membranas (Fischer *et al.* 2005). Os dados sugerem que a translocação ocorre de forma rápida sem estabilização de estruturas transmembrânicas, contrário dos peptídeos do grupo 1 (comparar figuras 3.23B e 3.24B com figura 3.17B). É possível que a translocação dos peptídeos gere defeitos de curto tempo de vida na membrana, capazes de extravasar solutos hidrofílicos como CF. Estes dados são consistentes com a pequena desestabilização relativa de membranas observada por Binder e Lindblom 2003. Estruturalmente, estes peptídeos tiveram pIs de 10 a 13, decorrente de suas altas cargas nominais positivas (6-8) com M_{HS} próximos a 1. Possuem também hidrofiliicidade no nível superior dos peptídeos estudados, devido a alta porcentagem relativa de resíduos carregados positivamente.

O grupo 5 é populado por peptídeos somente membrano-ativos, passíveis de adsorção, mas que não geraram nenhum efeito mensurável de translocação e nem de atividade antimicrobiana (MICs em determinação). A figura 3.25A demonstra que a exemplo dos peptídeos do grupo 4, os membros desse grupo (intra 1, intra 2 e tat-peptide) apresentam interação exclusiva com LUVs de DMPC/DMPG (2:1), porém com liberação de menores quantidades de calor. A inclusão de tat-peptide, um reconhecido CPP nesse grupo atende ao presente modelo, e está em consonância com o fato de que esse tem afinidade maior por glicosaminoglicanas do que por fosfolipídeos zwitteriônicos ou mesmo aniônicos (Fischer *et al.* 2005). Há relatos de que esse mesmo peptídeo não possua atividade penetradora em LUVs, porém é capaz de transpor membranas em vesículas gigantes (GUVs) (Fischer *et al.* 2005). Seu efeito no comportamento

termotrópico das vesículas foi qualitativamente parecido com o dos grupos 2 a 4, indicando interações predominantemente eletrostáticas, e portanto, superficiais (figura 3.25B). Estes peptídeos não induzem extravasamento de CF (figura 3.25C). Em relação às suas propriedades físico-químicas, possuem pIs entre 10 a 12, M_{HS} em torno de 1 e uma grande quantidade de resíduos catiônicos, formando uma nuvem de moléculas quase indistinta com as do grupo 4.

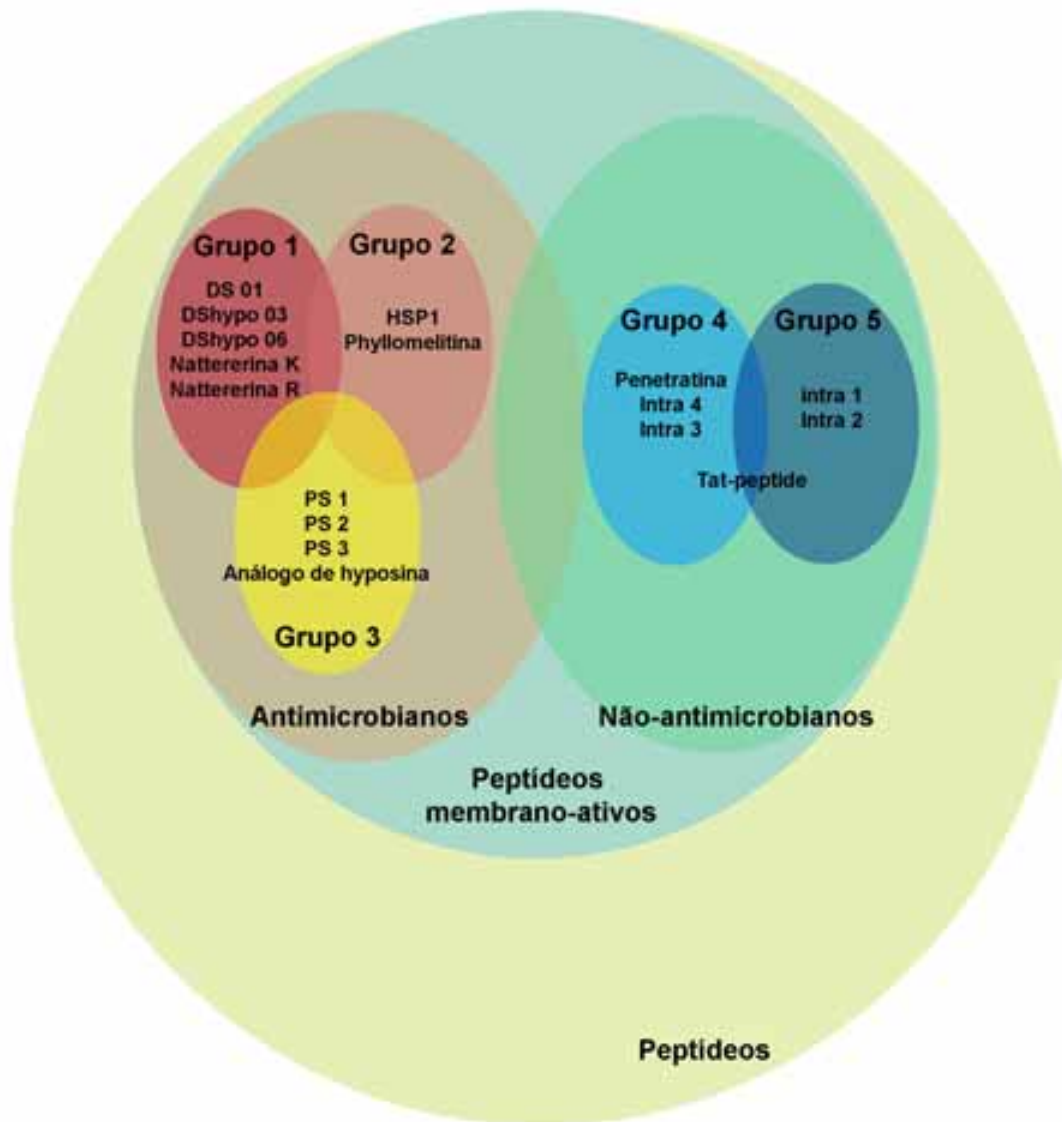


Figura 3.28. Diagrama de distribuição e categorização funcional dos peptídeos avaliados

Sobre peptídeos membrano-ativos, antimicrobianos e suas relações físico-químicas

A busca pelas características essenciais nas interações de peptídeos antimicrobianos com membranas mudou o paradigma de que estas consistem em um simples fenômeno de partição de moléculas hidrofóbicas entre um solvente polar e um apolar bi-dimensional, como membranas (Singer e Nicolson 1972). Se por um lado a visão de membranas cresceu em complexidade, também os peptídeos deixaram de ser simples solutos cuja única característica relevante é a hidrofobicidade. A grande diversidade de estruturas primárias de peptídeos antimicrobianos levou ao reconhecimento de que, embora distintos em seqüência, estes convergem em propriedades físico-químicas pré-determinadas. Dennison e colaboradores tentaram buscar tendências nestas propriedades pelo agrupamento de peptídeos antimicrobianos de acordo com seus microorganismos alvo (Dennison *et al.* 2005). Apesar de uma série de trabalhos mostrarem influência direta de propriedades físico-químicas para seqüências específicas, este estudo revelou que quando peptídeos antimicrobianos são considerados como um conjunto, o papel de nenhuma destas propriedades fica evidente. Três razões são prontamente evidentes: (1) a comparação de MICs entre diversos estudos sofre do problema da falta de padronização. Testes para determinação de MIC dependem de vários fatores, principalmente do inóculo inicial, que ao variar 1000 vezes causa uma variação em torno de 10 vezes no MIC (dados não mostrados). Assim, tais tendências podem estar mascaradas pela falta de parâmetro para julgar as atividades relativas. (2) Falha no reconhecimento e agrupamento de peptídeos que agem de forma diferente, e portanto dependem de forma diferente de suas propriedades, que ao serem considerados em conjunto com outras moléculas, têm suas individualidades desconsideradas. (3) Tais tendências são encontradas somente para variantes de uma seqüência, de forma que propriedades físico-químicas se relacionam discretamente para cada seqüência, e portanto não existem regras gerais entre elas. O terceiro caso indica imprevisibilidade, e parece extrema devido o desenho experimental de moléculas com atividade antimicrobiana pela análise de padrões identificados em moléculas naturais (Appelt *et al.* 2007; Radzishovsky *et al.* 2007). É na categorização de peptídeos que será possível a distinção de grupos funcionais (figura 3.28).

A presente abordagem foi capaz de distinguir no mínimo 3 grupos de peptídeos antimicrobianos, diferenciando o grupo 1 dos demais devido o “efeito surfactante” (figura 3.27). A figura 10 ilustra a correlação entre o extravasamento de CF e a diminuição do pico de espalhamento de luz, medido no mesmo comprimento de onda em que a amostra foi excitada (480 nm). Isto indica que a diminuição do tamanho das partículas em solução é um mecanismo de ação em comum entre eles, enquanto membros dos grupos 2 e 3 e até mesmo CPPs e CPPs-like são capazes de extravasamento de CF dissociado de alterações no tamanho das vesículas. Porém, não fica evidente um paralelo com os mecanismos de ação de peptídeos antimicrobianos já descritos, como o mecanismo carpete ou a formação de poros (Shai 2002)

Dentre as características físico-químicas analisadas que diferem os peptídeos do grupo 1 dos demais antimicrobianos estão primariamente suas massas moleculares e seus momentos hidrofóbicos (ver tabela 1 e figura 3.27). A exemplo do trabalho de Dennison e colaboradores, não foi possível achar nenhuma distinção entre os pIs dos grupos de peptídeos estudados (Dennison *et al.* 2005). Membros do grupo 1 possuem número de resíduos, e conseqüentemente massas moleculares, superiores à média de α -hélices em segmentos transmembrana de proteínas, que é de aproximadamente 18 resíduos (Hildebrand *et al.* 2004). Estes segmentos apresentam, assim como os peptídeos do grupo 1, M_H próximo a 1 (dados não mostrados). Tal fato também sugere que essas moléculas podem ser estabilizadas, mesmo que transitoriamente, na forma de segmentos transmembrana, o que é corroborado pelos dados de DSC (figuras 3.17B e 3.18). Já peptídeos dos grupos 2 e 3 possuem massas moleculares menores, e por conseguinte menor tamanho, e não são capazes de estabelecerem-se como segmentos transmembrana. Comum a membros desses grupos são seus M_{HS} 2 a 3 vezes maiores que os dos membros do grupo 1, mesmo que os peptídeos do grupo 3 não se estruturam marcadamente. O M_H é apontado em vários casos como propriedade ainda mais determinante que hidrofobicidade na modulação da interação de peptídeos com matrizes apolares e membranas (White e Wimley 1998). Lewis e colaboradores demonstraram que o M_H de peptídeos compostos somente de resíduos de alanina e leucina aumentavam o tempo de retenção desses em coluna, divergindo da relação linear dada pela hidrofobicidade somente (Lewis *et al.* 2007). É tentador concluir que uma maior anfifilicidade seja uma

das características essenciais de peptídeos antimicrobianos de massa molecular menor do que a necessária para a estabilização de segmentos transmembrana. O papel desta seria aumentar a hidrofobicidade relativa do peptídeo, mais baixa devido o menor número de resíduos. Porém, a comparação entre estes grupos não pode ser feita de forma absoluta. Segundo uma série de trabalhos, o aumento no M_H nos peptídeos levaria a um aumento na permeabilização das membranas, sendo o efeito desse ainda mais pronunciado em membranas zwitteriônicas do que carregadas negativamente (Yeaman e Yount 2003). Esta relação não se mantém em uma simples comparação entre membros do grupo 1 e os demais.

Peptídeos do grupo 4, ou CPPs, possuem a massas moleculares comparáveis às dos antimicrobianos dos grupos 2 e 3, porém com um maior número de cargas nominais, e assim um pI mais elevado (tabela 1 e figura 3.27). Elas diferem também em seu M_H , que é menor do que 1. Não existe uma fronteira muito clara entre CPPs e peptídeos membrano-ativos, de forma que as três dimensões analisadas talvez não sejam suficiente para sua distinção.

A categorização de peptídeos em grupos devido suas propriedades físico-químicas reduz a informação contida em sua sequência a somente três dimensões, podendo incorrer em erros caso essas não sejam escolhidas apropriadamente (figura 3.27). Assim, prevemos que em alguns casos, peptídeos com propriedades físico-químicas próximas podem não apresentar atividade compatível com seu grupo. Os peptídeos antimicrobianos analisados nesse trabalho são produto de um processo de seleção natural, e é provável que sua funcionalidade convirja também por esse motivo. A expansão desse modelo pela geração de moléculas *de-novo* com propriedades físico-químicas correlatas e avaliação de sua atividade em relação ao seu grupo será essencial para determinar sua capacidade preditiva.

3.5. Referências bibliográficas

- Abrunhosa, F., S. Faria, P. Gomes, I. Tomaz, J. C. Pessoa, D. Andreu e M. Bastos (2005). "Interaction and lipid-induced conformation of two cecropin-melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition." J Phys Chem B **109**(36): 17311-9.
- Allende, D. e T. J. McIntosh (2003). "Lipopolysaccharides in bacterial membranes act like cholesterol in eukaryotic plasma membranes in providing protection against melittin-induced bilayer lysis." Biochemistry **42**(4): 1101-8.
- Appelt, C., A. K. Schrey, J. A. Soderhall e P. Schmieder (2007). "Design of antimicrobial compounds based on peptide structures." Bioorg Med Chem Lett **17**(8): 2334-7.
- Bagatolli, L. A. (2006). "To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy." Biochim Biophys Acta **1758**(10): 1541-56.
- Bechinger, B. e K. Lohner (2006). "Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides." Biochim Biophys Acta **1758**(9): 1529-39.
- Blom, T. S., M. Koivusalo, E. Kuismanen, R. Kostianen, P. Somerharju e E. Ikonen (2001). "Mass spectrometric analysis reveals an increase in plasma membrane polyunsaturated phospholipid species upon cellular cholesterol loading." Biochemistry **40**(48): 14635-44.
- Braff, M. H. e R. L. Gallo (2006). "Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier." Curr Top Microbiol Immunol **306**: 91-110.
- Brand, G. D., J. R. Leite, S. M. de Sa Mandel, D. A. Mesquita, L. P. Silva, M. V. Prates, E. A. Barbosa, F. Vinecky, G. R. Martins, J. H. Galasso, S. A. Kuckelhaus, R. N. Sampaio, J. R. Furtado, Jr., A. C. Andrade e C. Bloch, Jr. (2006). "Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia)." Biochem Biophys Res Commun **347**(3): 739-46.
- Brand, G. D., J. R. Leite, L. P. Silva, S. Albuquerque, M. V. Prates, R. B. Azevedo, V. Carregaro, J. S. Silva, V. C. Sa, R. A. Brandao e C. Bloch, Jr. (2002). "Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells." J Biol Chem **277**(51): 49332-40.
- Brasseur, R. (1991). "Differentiation of lipid-associating helices by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations." J Biol Chem **266**(24): 16120-7.
- Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nat Rev Microbiol **3**(3): 238-50.
- Chen, F. Y., M. T. Lee e H. W. Huang (2002). "Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin." Biophys J **82**(2): 908-14.
- Chen, F. Y., M. T. Lee e H. W. Huang (2003). "Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation." Biophys J **84**(6): 3751-8.

- Dathe, M. e T. Wieprecht (1999). "Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells." Biochim Biophys Acta **1462**(1-2): 71-87.
- Dathe, M., T. Wieprecht, H. Nikolenko, L. Handel, W. L. Maloy, D. L. MacDonald, M. Beyermann e M. Bienert (1997). "Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides." FEBS Lett **403**(2): 208-12.
- Dennison, S. R., J. Wallace, F. Harris e D. A. Phoenix (2005). "Amphiphilic alpha-helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships." Protein Pept Lett **12**(1): 31-9.
- Eisenberg, D. (1984). "Three-dimensional structure of membrane and surface proteins." Annu Rev Biochem **53**: 595-623.
- Eband, R. F., N. Umezawa, E. A. Porter, S. H. Gellman e R. M. Eband (2003). "Interactions of the antimicrobial beta-peptide beta-17 with phospholipid vesicles differ from membrane interactions of magainins." Eur J Biochem **270**(6): 1240-8.
- Eband, R. M. (2007). "Detecting the presence of membrane domains using DSC." Biophys Chem **126**(1-3): 197-200.
- Eband, R. M. e J. M. Sturtevant (1981). "A calorimetric study of peptide-phospholipid interactions: the glucagon-dimyristoylphosphatidylcholine complex." Biochemistry **20**(16): 4603-6.
- Feder, R., A. Dagan e A. Mor (2000). "Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity." J Biol Chem **275**(6): 4230-8.
- Fernandez-Vidal, M., S. Jayasinghe, A. S. Ladokhin e S. H. White (2007). "Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity." J Mol Biol **370**(3): 459-70.
- Fischer, R., M. Fotin-Mleczek, H. Hufnagel e R. Brock (2005). "Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides." ChemBiochem **6**(12): 2126-42.
- Fournier, I., J. Barwicz e P. Tancrede (1998). "The structuring effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a differential scanning calorimetry study." Biochim Biophys Acta **1373**(1): 76-86.
- Gaidukov, L., A. Fish e A. Mor (2003). "Analysis of membrane-binding properties of dermaseptin analogues: relationships between binding and cytotoxicity." Biochemistry **42**(44): 12866-74.
- Gennis, R.B. Biomembranes: molecular structure and function. Springer Verlag, New York, 1989.
- Henriques, S. T., M. N. Melo e M. A. Castanho (2006). "Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they?" Biochem J **399**(1): 1-7.
- Hildebrand, P. W., R. Preissner e C. Frommel (2004). "Structural features of transmembrane helices." FEBS Lett **559**(1-3): 145-51.
- Hilpert, K., M. R. Elliott, R. Volkmer-Engert, P. Henklein, O. Donini, Q. Zhou, D. F. Winkler e R. E. Hancock (2006). "Sequence requirements and an optimization strategy for short antimicrobial peptides." Chem Biol **13**(10): 1101-7.

- Huang, C. e S. Li (1999). "Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids." Biochim Biophys Acta **1422**(3): 273-307.
- Huang, H. W. (2006). "Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity." Biochim Biophys Acta **1758**(9): 1292-302.
- Jacobson, K. e C. Dietrich (1999). "Looking at lipid rafts?" Trends Cell Biol **9**(3): 87-91.
- Jain, M.K. e Wu, N.M. (1977) Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer. J. Membrane Biol. **34**, 157-201.
- Jenssen, H., P. Hamill e R. E. Hancock (2006). "Peptide antimicrobial agents." Clin Microbiol Rev **19**(3): 491-511.
- Kelly, S. M., T. J. Jess e N. C. Price (2005). "How to study proteins by circular dichroism." Biochim Biophys Acta **1751**(2): 119-39.
- Kobayashi, S., A. Chikushi, S. Tougu, Y. Imura, M. Nishida, Y. Yano e K. Matsuzaki (2004). "Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2." Biochemistry **43**(49): 15610-6.
- Kwon, M. Y., S. Y. Hong e K. H. Lee (1998). "Structure-activity analysis of brevinin 1E amide, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*." Biochim Biophys Acta **1387**(1-2): 239-48.
- Ladbury, J.E. e Chowdry, B.Z. Biocalorimetry: applications of calorimetry in the biological sciences. John Wiley & sons. West Sussex, 1998.
- Lambros, M. P. e Y. E. Rahman (2004). "Effects of cyclosporin A on model lipid membranes." Chem Phys Lipids **131**(1): 63-9.
- Lee, M. T., F. Y. Chen e H. W. Huang (2004). "Energetics of pore formation induced by membrane active peptides." Biochemistry **43**(12): 3590-9.
- Leite, J. R., G. D. Brand, L. P. Silva, S. A. Kuckelhaus, W. R. Bento, A. L. Araujo, G. R. Martins, A. M. Lazzari e C. Bloch, Jr. (2007). "Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.
- Leite, J. R., L. P. Silva, M. I. Rodrigues, M. V. Prates, G. D. Brand, B. M. Lacava, R. B. Azevedo, A. L. Bocca, S. Albuquerque e C. Bloch, Jr. (2005). "Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus." Peptides **26**(4): 565-73.
- Lewis, R. N., F. Liu, R. Krivanek, P. Rybar, T. Hianik, C. R. Flach, R. Mendelsohn, Y. Chen, C. T. Mant, R. S. Hodges e R. N. McElhaney (2007). "Studies of the minimum hydrophobicity of alpha-helical peptides required to maintain a stable transmembrane association with phospholipid bilayer membranes." Biochemistry **46**(4): 1042-54.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms. Prentice-Hall, New Jersey, 2000.
- Mannock, D. A., R. N. Lewis e R. N. McElhaney (2006). "Comparative calorimetric and spectroscopic studies of the effects of lanosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes." Biophys J **91**(9): 3327-40.

- Matsuzaki, K., A. Nakamura, O. Murase, K. Sugishita, N. Fujii e K. Miyajima (1997). "Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge." Biochemistry **36**(8): 2104-11.
- Matsuzaki, K., K. Sugishita, N. Ishibe, M. Ueha, S. Nakata, K. Miyajima e R. M. Epanand (1998). "Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2." Biochemistry **37**(34): 11856-63.
- McElhaney, R. N. (1986). "Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems." Biochim Biophys Acta **864**(3-4): 361-421.
- Mee, R. P., T. R. Auton e P. J. Morgan (1997). "Design of active analogues of a 15-residue peptide using D-optimal design, QSAR and a combinatorial search algorithm." J Pept Res **49**(1): 89-102.
- Mor, A., M. Amiche e P. Nicolas (1994). "Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin." Biochemistry **33**(21): 6642-50.
- New, R.R.C. Liposomes: a practical approach. IRL press, Oxford, 1990.
- Ohmori, N., T. Niidome, T. Hatakeyama, H. Mihara e H. Aoyagi (1998). "Interaction of alpha-helical peptides with phospholipid membrane: effects of chain length and hydrophobicity of peptides." J Pept Res **51**(2): 103-9.
- Palm, C., S. Netzereab e M. Hallbrink (2006). "Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects." Peptides **27**(7): 1710-6.
- Papahadjopoulos, D., M. Moscarello, E. H. Eylar e T. Isac (1975). "Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes." Biochim Biophys Acta **401**(3): 317-35.
- Papo, N. e Y. Shai (2003). "Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes?" Peptides **24**(11): 1693-703.
- Papo, N. e Y. Shai (2004). "Effect of drastic sequence alteration and D-amino acid incorporation on the membrane binding behavior of lytic peptides." Biochemistry **43**(21): 6393-403.
- Pasenkiewicz-Gierula, M., Y. Takaoka, H. Miyagawa, K. Kitamura e A. Kusumi (1999). "Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: A molecular dynamics simulation study." Biophys J **76**(3): 1228-40.
- Patrzykat, A., C. L. Friedrich, L. Zhang, V. Mendoza e R. E. Hancock (2002). "Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **46**(3): 605-14.
- Persson, D., P. E. Thoren, P. Lincoln e B. Norden (2004). "Vesicle membrane interactions of penetratin analogues." Biochemistry **43**(34): 11045-55.
- Prates, M. V., M. L. Sforca, W. C. Regis, J. R. Leite, L. P. Silva, T. A. Pertinhez, A. L. Araujo, R. B. Azevedo, A. Spisni e C. Bloch, Jr. (2004). "The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran *Hyla punctata*." J Biol Chem **279**(13): 13018-26.
- Prenner, E. J., R. N. Lewis, L. H. Kondejewski, R. S. Hodges e R. N. McElhaney (1999). "Differential scanning calorimetric study of the effect of the antimicrobial peptide

- gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol lipid bilayer membranes." Biochim Biophys Acta **1417**(2): 211-23.
- Radzishewsky, I. S., S. Rotem, D. Bourdetsky, S. Navon-Venezia, Y. Carmeli e A. Mor (2007). "Improved antimicrobial peptides based on acyl-lysine oligomers." Nat Biotechnol **25**(6): 657-9.
- Seelig, J. (1997). "Titration calorimetry of lipid-peptide interactions." Biochim Biophys Acta **1331**(1): 103-16.
- Seelig, J. (2004). "Thermodynamics of lipid-peptide interactions." Biochim Biophys Acta **1666**(1-2): 40-50.
- Seto, G. W., S. Marwaha, D. M. Kobewka, R. N. Lewis, F. Separovic e R. N. McElhaney (2007). "Interactions of the Australian tree frog antimicrobial peptides aurein 1.2, citropin 1.1 and maculatin 1.1 with lipid model membranes: Differential scanning calorimetric and Fourier transform infrared spectroscopic studies." Biochim Biophys Acta.
- Shai, Y. (2002). "Mode of action of membrane active antimicrobial peptides." Biopolymers **66**(4): 236-48.
- Silva, L. P., J. R. Leite, G. D. Brand, W. B. Regis, A. C. Tedesco, R. B. Azevedo, S. M. Freitas e C. Bloch, Jr. (2007). "Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Liposomes fusion and/or lysis investigated by fluorescence and atomic force microscopy." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.
- Simons, K. e E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.
- Singer, S. J. e G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-31.
- Stewart, J.C.M. (1980). Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. Anal. Biochem. 104, 10-14.
- Sturtevant, J. M. (1982). "A scanning calorimetric study of small molecule-lipid bilayer mixtures." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(13): 3963-7.
- Thoren, P. E., D. Persson, P. Lincoln e B. Norden (2005). "Membrane destabilizing properties of cell-penetrating peptides." Biophys Chem **114**(2-3): 169-79.
- Tossi, A., L. Sandri e A. Giangaspero (2000). "Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides." Biopolymers **55**(1): 4-30.
- Uematsu, N. e K. Matsuzaki (2000). "Polar angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: a model peptide study." Biophys J **79**(4): 2075-83.
- Wenk, M. R. e J. Seelig (1998). "Magainin 2 amide interaction with lipid membranes: calorimetric detection of peptide binding and pore formation." Biochemistry **37**(11): 3909-16.
- White, S. H. e W. C. Wimley (1998). "Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces." Biochim Biophys Acta **1376**(3): 339-52.
- Wieprecht, T., O. Apostolov, M. Beyermann e J. Seelig (1999). "Thermodynamics of the alpha-helix-coil transition of amphipathic peptides in a membrane environment: implications for the peptide-membrane binding equilibrium." J Mol Biol **294**(3): 785-94.

- Wieprecht, T., O. Apostolov, M. Beyermann e J. Seelig (2000). "Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa: thermodynamic and mechanistic aspects." Biochemistry **39**(2): 442-52.
- Wieprecht, T., M. Dathe, M. Beyermann, E. Krause, W. L. Maloy, D. L. MacDonald e M. Bienert (1997). "Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes." Biochemistry **36**(20): 6124-32.
- Yeaman, M. R. e N. Y. Yount (2003). "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance." Pharmacol Rev **55**(1): 27-55.
- Zaslhoff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature **415**(6870): 389-95.
- Zhang, J., T. Hadlock, A. Gent e G. R. Strichartz (2007). "Tetracaine-membrane interactions: effects of lipid composition and phase on drug partitioning, location, and ionization." Biophys J **92**(11): 3988-4001.

Capítulo 4

Termodinâmica da interação vesícula fosfolipídica/peptídeo

4.1. Introdução

4.1.1. Termodinâmica da interação fosfolípídeo/peptídeo por ITC

A termodinâmica da interação peptídeo-membrana é um amplo campo que pode ser estudado por uma série de técnicas (Beschiaschvili e Seelig 1991; Seelig 2004; Hitz *et al.* 2006). Estudos desta natureza têm base na extração de uma constante de afinidade K_o que é convertida em energia livre de interação por $\Delta G = -RT \cdot \ln K_o$. No presente caso, diz-se que peptídeos são adsorvidos em membranas, já que o termo interação é utilizado para pares moleculares específicos. A termodinâmica da adsorção é acessível ao relacionar a constante de afinidade K_o em função da temperatura (T) por meio das relações de van't Hoff. Estas relações são capazes de deduzir a entalpia de interação ΔH , porém para que sejam aplicáveis, a entalpia de adsorção deve manter-se constante em função da temperatura, o que, para interações peptídeo/membrana, não se verifica. A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é capaz de fornecer ΔH e K_o simultaneamente, sem a incorporação de marcadores moleculares tais quais fluoróforos (Seelig *et al.* 1993; Seelig 1997; Seelig 2004). O calor de adsorção obtido por ITC pode ser convertido nas isotermas de interação conforme explicado na seção material e métodos. Como resultado, obtém-se o grau de interação (X_b) entre n_p peptídeos com uma membrana composta de n_L^o lipídeos. O comportamento de X_b em função da concentração de peptídeo é a função usada para a determinação de modelos de adsorção.

$$X_b = \frac{n_p}{n_L^o} \text{ (mol/mol) (1)}$$

O modelo para interpretação das isotermas de interação resultantes foi desenvolvido por Joachim Seelig, originalmente para a adsorção de análogos de somatostatina (Beschiaschvili e Seelig 1990). Este é conhecido como modelo de partição em superfícies, e tem sido utilizado para uma série de moléculas membrano-ativas. Decorre dele uma termodinâmica dissociada em uma constante de afinidade intrínseca do peptídeo por membranas (K_p) e outra aparente (K_{app}), sendo que a primeira desconsidera efeitos eletrostáticos (Seelig 1997). Este tipo de correção só é aplicada quando

necessário, de forma que o caso mais simples é a adsorção de moléculas não-carregadas em membranas neutras.

4.1.2. Modelo de partição em superfícies

A. Partição de moléculas eletricamente neutras

Moléculas eletricamente neutras não possuem carga (z_p) e sua adsorção em vesículas de potencial de membrana também neutro (φ_o) não necessita de correções. A ausência de fenômenos eletrostáticos faz com que a concentração de moléculas disponíveis para a adsorção em membranas (c_m), em qualquer momento da titulação, seja a concentração do composto livre (c_{eq}). A titulação de Ciclosporina A (CyA) a 7,3 μM com SUVs de POPC está representada na figura 4.1. Cada injeção de vesículas (10 μL) remove uma fração de CyA da solução, liberando calor (h_i), que decresce de valor com o progresso da titulação. Os traços calorimétricos podem ser convertidos para a isoterma de interação conforme descrito na seção material e métodos. A figura 4.1 demonstra que a relação entre o grau de peptídeo adsorvido em membrana (X_b) e a concentração de peptídeo livre é linear, podendo ser descrita da forma:

$$X_b = K_o c_{eq} \quad (2)$$

A constante de interação K_o é dada a partir da regressão linear entre X_b e C_{eq} . Neste caso $K_o = 2000 \text{ M}^{-1}$.

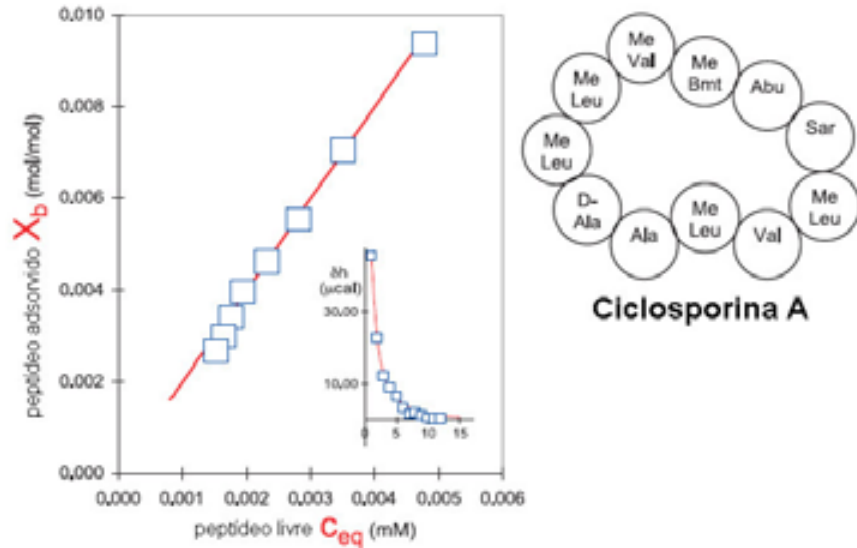


Figura 4.1. Partição da droga imunossupressora ciclosporina A (Cya) em SUVs de fosfatidilcolina. Vesículas lipídicas ($c_L^0 = 37,7$ mM) foram tituladas em uma solução de CyA ($7,3 \mu\text{M}$) e os calores da reação, Δh_i , foram obtidos em função do número de injeção (pequeno inserto). O calor de titulação foi convertido em grau de interação ($X_b = n_{CyA,b}/n_L^0$) como função da concentração de CyA em equilíbrio, c_{eq} . Uma linha reta foi obtida de acordo com $X_b = K_0 c_{eq}$. Os parâmetros foram $\Delta H^0 = 12,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $K_0 = 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Schote *et al.* 2002). Figurada retirada e editada de Seelig 2004.

O sistema acima constitui uma idealização, já que a maior parte das moléculas membrano-ativas e das bicamadas lipídicas carrega cargas em condições fisiológicas (Seelig 2004). Assim, torna-se necessário o estudo dos efeitos eletrostáticos na interação entre membranas e solutos.

B. Partição de solutos eletricamente carregados

Peptídeos membrano-ativos interagem com membranas de acordo com um misto de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, forças que não são aditivas (Ladokhin e White 2001). A figura 4.2 mostra a titulação de nisina Z, que possui carga +4 a pH 7,4, com vesículas de POPC/POPG. Quando os dados calorimétricos são convertidos no grau de interação X_b , a equação 2 não é mais capaz de descrevê-los, já que K_0 decresce com o aumento da concentração de peptídeo (figura 4.2). Isto se deve ao enfraquecimento da atração eletrostática causada pela adsorção de peptídeos de carga positiva à superfície das membranas (Seelig 1997; Seelig 2004). A adsorção de moléculas positivamente

carregadas pode até mesmo tornar um potencial de membrana originalmente negativo, de $\varphi_o \sim -50$ mV para membranas de POPC/POPG (3:1) a pH 7,4, em positivo. A correção do efeito de cargas dá-se pelo cálculo da concentração de peptídeo em uma camada imediatamente superior à membranas, que é diferente da concentração em equilíbrio ($c_m \neq c_{eq}$). A partir de uma análise como esta, é possível distinguir uma constante de partição intrínseca ao peptídeo (K_p), a qual exclui qualquer efeito eletrostático (Seelig 2004). É comum que moléculas tenham constantes de interação aparentes K_{app} , as quais incluem o efeito eletrostático, da ordem de 10^3-10^5 M⁻¹, porém K_p 's entre 1 e 2 M⁻¹ (Seelig *et al.* 1993; Wenk e Seelig 1998; Breukink *et al.* 2000). K_p é obtido pela conversão da concentração de peptídeo em solução (c_{eq}) em concentração de peptídeo na superfície das membranas (c_m), a qual resulta em uma função linear modificada. O coeficiente angular desta reta é o coeficiente de adsorção K_p (figura 4.3). Esta constante, para o caso de nisina Z, é de 1,8 M⁻¹. Estes dados revelam que a interação de nisina Z com membranas eletrostaticamente carregadas é de natureza quase que puramente eletrostática. Assim, a partição de solutos eletricamente carregados obedece à seguinte equação:

$$X_b = K_p c_m \quad (3)$$

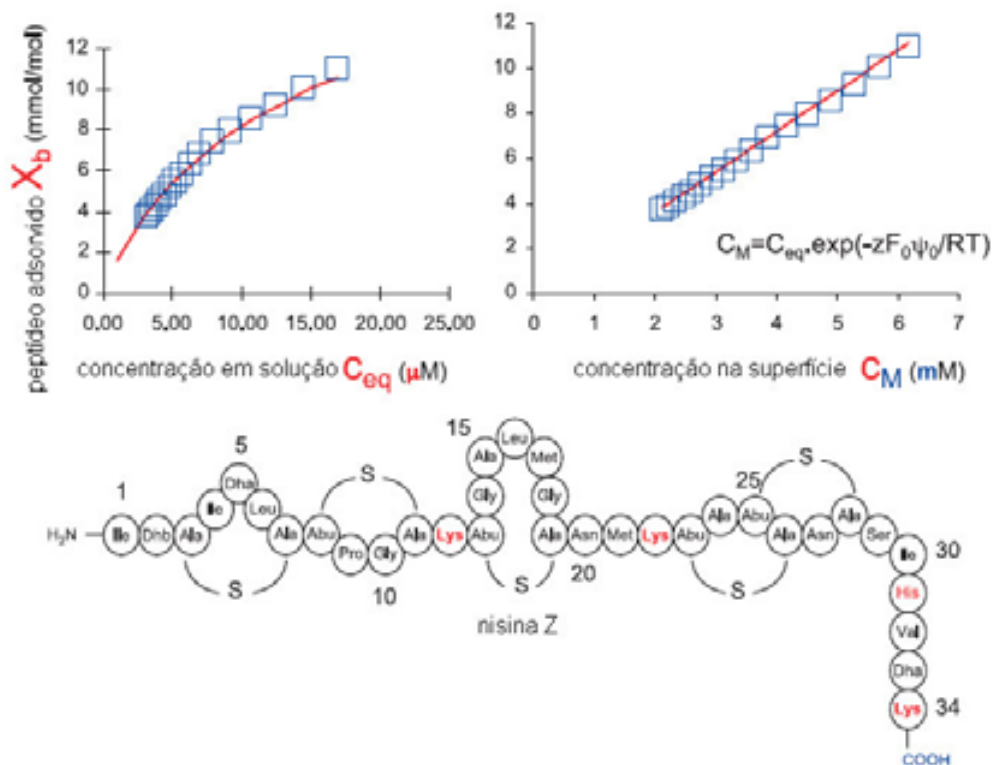


Figura 4.2. Equilíbrio de partição de nisina Z em vesículas de POPC/POPG modificado pela atração eletrostática. Calorimetria de titulação isotérmica foi usada para mensurar a interação do lantibiótico nisina Z com membranas de composição POPC/POPG (3:1). Nisina Z tem carga elétrica ajustada de $z_p = +3,5$ e é atraída eletrostaticamente à superfície de membranas. A concentração de nisina Z na superfície (c_m) calculada pela teoria de Gouy-Chapman é maior que a concentração de peptídeo livre c_{eq} . Acima os gráficos com o grau de interação ($X_b = n_{nsnZ,b}/n_L^0$) em função de c_{eq} e de c_m . Para o último, uma linha reta é obtida e a adsorção pode ser descrita por um equilíbrio de partição. Na equação acima, c_{eq} é concentração de nisina Z em solução, z_p sua carga, ϕ_0 o potencial de superfície das vesículas, F_0 a constante de Faraday, R a constante dos gases e T a temperatura em Kelvin. Os parâmetros termodinâmicos para essa interação foram $K_p = 1,8 \text{ M}^{-1}$ e $\Delta H = -8,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ a 28°C .

O cálculo da concentração de peptídeo na camada imediatamente superior à membrana (c_m) pode ser feito a partir da concentração de peptídeo em solução (c_{eq}) pela aplicação da teoria de Gouy-Chapman (McLaughlin 1989).

4.1.3. Características eletrostáticas de membranas

Helmholtz, um dos ilustres biofísicos do século XIX, observou que cargas fixas em uma superfície atraem contra-íons de uma fase aquosa. Notou também que estas

superfícies, junto com seus contra-íons, formavam uma bicamada “eletricamente carregada” de espessura muito pequena, porém não nula. Um grande avanço foi feito por Gouy e independentemente por Chapman, os quais utilizaram a equação de Poisson para descrever a atração eletrostática dos contra-íons à superfície, e a relação de Boltzmann para descrever a tendência estatística dos mesmos a se difundir da região de maior concentração (figura 4.3) (McLaughlin 1989). Estes pesquisadores consideraram várias simplificações, tais como cargas na superfície das membranas de forma contínua, e não discreta; fase aquosa como um meio de constante dielétrica uniforme e íons na fase aquosa como cargas pontuais. Apesar de tantas simplificações, suas equações foram e continuam sendo utilizadas com sucesso em vários sistemas, tais como em bicamadas lipídicas.

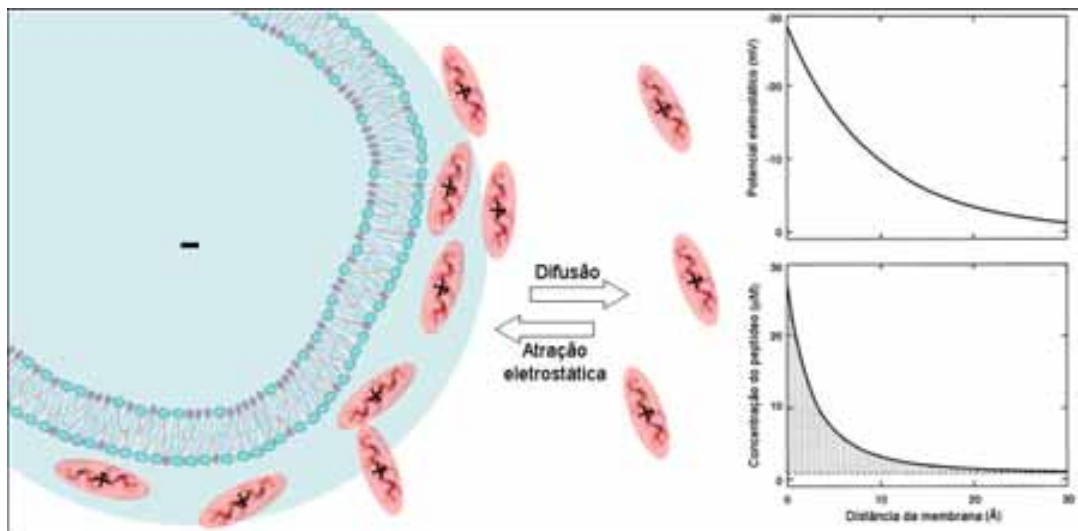


Figura 4.3. Características eletrostáticas de membranas. Membranas negativamente carregadas atraem contra-íons de carga oposta de acordo com sua concentração em solução (c_{eq}), sua carga (z_p) e o potencial de superfície das membranas (ϕ_0). Os contra-íons tendem a dissipar-se de acordo com a energia térmica. Os insertos referem-se a um caso hipotético, mostrando como a concentração de um cátion segue o potencial eletrostático em função da distância da membrana, mostrando como se constrói um gradiente de contra-íons.

Esta teoria é capaz de corrigir a concentração do contra-íon, que pode ser tanto um cátion quanto um peptídeo antimicrobiano, para aquela encontrada na superfície das membranas, c_m . Quando há um potencial eletrostático entre os cátions (peptídeos) e as superfícies (membranas), a concentração de contra-íons em solução será diferente da

concentração na superfície de membranas ($c_m \neq c_{eq}$). Assim, caso o potencial de superfície da membrana seja negativo ($\varphi_o < 0$), ocorre atração para partículas de carga positiva, e repulsão para potencial de membrana positivo ($\varphi_o > 0$). A equação que descreve tal comportamento está descrita abaixo:

$$c_m = c_{eq}^{-z_p F_o \varphi_o / RT} \quad (4)$$

onde z_p = é a carga “real” do peptídeo, que difere da teórica e é um parâmetro a ser ajustado, F_o é a constante de Faraday ($F_o = 96485,33 \text{ C.mol}^{-1}$), R a constante dos gases ($R = 8,31 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), T a temperatura em Kelvin e φ_o o potencial de superfície da membrana (Seelig 1997).

Estas equações podem ser usadas para o caso específico de peptídeos membrano-ativos catiônicos como contra-íons e de superfícies como vesículas fosfolipídicas aniônicas. Neste caso, o potencial de superfície (φ_o) em membranas não pode ser mensurado diretamente, porém pode ser calculado a partir da densidade de cargas na superfície (σ). Esta é dada pela seguinte equação:

$$\sigma = \frac{e}{A_l} \left(\frac{-X_{PG}(1-f_{Na}) + z_p(X_b)}{1 + \left(\frac{A_p}{A_l}\right)X_b} \right) \quad (5)$$

onde e é a carga elementar do elétron ($-1.6 \times 10^{-19} \text{ C}$), X_{PG} é a fração de PG na membrana, z_p a carga do peptídeo, A_p a área do peptídeo (neste trabalho 150 \AA^2 independente do tamanho do peptídeo) e A_l é a seção transversal da área do fosfolipídeo ($\approx 70 \text{ \AA}^2$). f_{Na} é a fração de íons de Na^+ que neutralizam as cargas negativas das moléculas de PG (Seelig 1997).

A fração de íons de Na^+ ligados aos grupamentos negativos das membranas fosfolipídicas pode também ser estimada com a seguinte expressão,

$$f_{Na} = \frac{K_{Na} c_{Na}^{(-\varphi_o F_o RT)}}{1 + K_{Na} c_{Na}^{(-\varphi_o F_o RT)}} \quad (6)$$

onde $K_{Na} = 0,6 \text{ M}^{-1}$ (Eisenberg *et al.* 1979) e c_{Na} é a concentração de Na^+ em solução.

Independentemente,

$$\sigma^2 = 2000 \varepsilon_0 \varepsilon_r RT \sum_i c_i (e^{-z_i F_o \varphi_o / RT} - 1) \quad (7)$$

A equação número 7 é conhecida como a equação de Gouy-Chapman e provê a ligação quantitativa entre a densidade de cargas (σ) e o potencial de superfície de membranas (φ_o). ϵ_0 é a permissividade do vácuo ($\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \cdot (\text{J} \cdot \text{m})^{-1}$), ϵ_r é a constante dielétrica da água ($\epsilon_r = 78$ foi o valor usado), c_i é a concentração do eletrólito i (McLaughlin 1989; Seelig 1997). O rearranjo dessa equação em função de φ_o leva à seguinte expressão, usada para os cálculos:

$$\varphi_o = -\frac{RT}{F_o} \ln \left[\frac{1}{c_1 e^{z_1} + c_2 e^{z_2}} \left(\frac{\sigma^2}{2000 \epsilon_o \epsilon_r RT} + (c_1 + c_2) \right) \right] \quad (8)$$

Na equação 8, c_1 é a concentração do cátion Na^+ , e c_2 a concentração do ânion PO_4^{2-} , ambos presentes no tampão da interação.

4.1.4. Aplicação do modelo de partição em superfície para o estudo da adsorção de peptídeos membrano-ativos com bicamadas lipídicas

A adsorção de várias moléculas membrano-ativas em vesículas fosfolipídicas já foi analisada pelo modelo de partição em superfície, inclusive peptídeos antimicrobianos e peptídeos penetradores em células. É instrutivo observar mais alguns exemplos.

A. Peptídeos antimicrobianos

Alguns peptídeos antimicrobianos, tais quais magainina 2 amida, PGLa e dicintaurina tiveram suas isotermas de adsorção em vesículas fosfolipídicas estudadas (Wenk e Seelig 1998; Wieprecht *et al.* 2000; Bringezu *et al.* 2007). Tomaremos o caso da magainina 2 amida como exemplo (Wenk e Seelig 1998). É comum a este tipo de análise a determinação da entalpia de interação (ΔH) em um experimento separado. A figura 4.4 mostra a injeção de magainina 2 amida em uma suspensão de vesículas unilamelares pequenas (SUVs) de POPC/POPG (75:25). Os traços calorimétricos integrados mostram uma entalpia de adsorção constante no intervalo, $\Delta H = -16,7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (figura 4.4) (Wenk e Seelig 1998). Este valor foi considerado constante mesmo nos experimentos de

titulação de fosfolipídeos em peptídeo, os quais levaram à determinação das isotermas de interação.

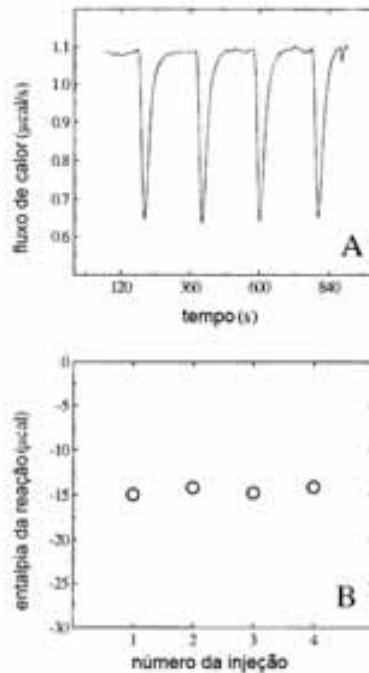


Figura 4.4. Calorimetria de titulação de uma solução de SUVs (POPC/POPG (75:25), $c_L^0 = 15,5$ mM) com uma solução de magainina 2 amida ($203 \mu\text{M}$). Alíquotas de $4 \mu\text{L}$ da solução de peptídeo foram adicionadas a solução de fosfolipídeos. O tampão usado foi Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM. **A.** Traços calorimétricos da interação. **B.** Traços calorimétricos integrados, revelando a entalpia de cada injeção. Retirado e adaptado de Wenk e Seelig 1998.

Em um segundo experimento, a isoterma de interação de magainina 2 amida com SUVs de POPC/POPG (75:25) foi determinada. Experimentos de injeção de fosfolipídeos em peptídeos fornecem além da entalpia de adsorção, isotermas a partir das quais as constantes de afinidade podem ser obtidas. Assim, uma solução de magainina 2 amida ($c_p^0 = 6,6 \mu\text{M}$) foi colocada na célula calorimétrica, enquanto a seringa foi carregada com uma suspensão de fosfolipídeos ($c_L^0 = 27,86$ mM) (figura 4.5). O tampão utilizado foi Tris 10 mM, pH 7,4 com 100 mM de NaCl. A entalpia de interação determinada pela titulação de fosfolipídeos em peptídeos foi de $\Delta H = -17,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, valor próximo ao determinado por injeção de peptídeo em fosfolipídeos (Wenk e Seelig 1998). A aplicação do modelo de partição em superfície para as isotermas de adsorção de magainina 2 amida em SUVs eletronegativas resultou em um bom ajuste. A afinidade intrínseca do peptídeo

pelas vesículas foi $K_p = 50 \text{ M}^{-1}$, para uma carga efetiva do peptídeo $z_p = +3,7$, enquanto a afinidade aparente avaliada a $1 \text{ }\mu\text{M}$ de peptídeo livre foi $K_{app} = 1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Wenk e Seelig 1998). Estes dados indicam que é o acúmulo de magainina 2 amida na superfície das membranas que induz sua adsorção, já que a afinidade intrínseca do peptídeo é baixa. Assim, a adsorção deste peptídeo em membranas é devido a lei de ação de massas, e só ocorre porque $c_m > c_{eq}$. Encontrou-se, nestas condições, um $\Delta G = -4,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, e já que $\Delta H = -17,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, conclui-se que essa interação é dirigida pelo termo entálpico, indicando um efeito hidrofóbico “não-clássico”, comum em interações de moléculas com membranas (Wenk e Seelig 1998; Wieprecht *et al.* 1999; Wieprecht *et al.* 2000). Isto demonstra que o efeito hidrofóbico, caracterizado por um termo entrópico positivo ($\Delta S > 0$) e de entalpia próxima à zero, não é capaz de explicar a adsorção de peptídeos em membranas. É o efeito hidrofóbico que dirige a partição de solutos hidrofóbicos em solventes de mesma natureza, e sua não aplicação ao sistema peptídeo/membrana atesta a complexidade do último (White e Wimley 1998). Os autores do trabalho demonstraram que aumentos na concentração de peptídeo na célula calorimétrica induzem isotermas de interação não previstas pelo modelo de partição em superfície (Wenk e Seelig 1998).

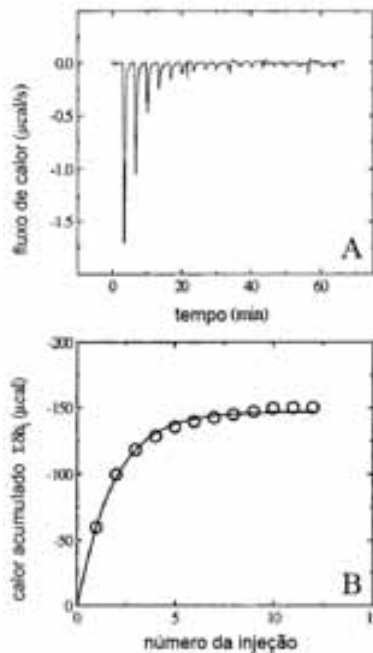


Figura 4.5. Calorimetria de titulação de uma solução de magainina 2 amida ($6,6 \text{ }\mu\text{M}$) com uma solução de SUVs (POPC/POPG (75:25), $c_L = 27,86 \text{ mM}$) a 30°C . O tampão usado foi Tris 10 mM , pH 7,4, NaCl 100 mM . A. Cada pico corresponde à injeção de 10

μL da solução de peptídeos. **B.** Calor acumulado da titulação. A linha sólida foi calculada pelo modelo de partição em superfície.

A partição de magainina 2 amida com vesículas neutras (POPC) também foi analisada pelo modelo de partição em superfície. Experimentos de titulação de peptídeo em lipídeo em condições iguais às descritas previamente resultaram em um $\Delta H = -18,7$ kcal.mol⁻¹. Titulações de SUVs de POPC em peptídeo geraram as isothermas de interação, cujo ajuste revelou uma alta constante de afinidade intrínseca de $K_p = 7,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ a $z_p = +3$. Esperava-se pouca interação deste peptídeo com vesículas neutras, já que a afinidade intrínseca do peptídeo (K_p) por vesículas aniônicas foi de 50 M^{-1} (Wieprecht *et al.* 1999). Porém, os autores explicaram a maior afinidade intrínseca deste peptídeo por vesículas neutras pelo grau de enterramento das cadeias laterais de magainina 2 amida (Wieprecht *et al.* 1999). Eles acreditam que a atração eletrostática entre o peptídeo e os fosfolipídeos aniônicos inibe sua inserção em domínios mais internos da membrana, restringindo-os à posições periféricas (Wieprecht *et al.* 1999).

B. Peptídeos penetradores de células (CPPs)

Tanto penetratina quanto tat-peptide tiveram suas isothermas de adsorção analisadas pelo modelo de partição em superfície. O CPP tat-peptide foi titulado com SUVs de POPC/POPG (75:25) e teve um K_{app} de aproximadamente $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ em uma série de experimentos com variações de condições (Ziegler *et al.* 2003). O K_p deste mesmo peptídeo foi de $1-10 \text{ M}^{-1}$, e a entalpia de interação foi ΔH de aproximadamente -1 kcal.mol⁻¹ (Ziegler *et al.* 2003). Penetratina também teve sua interação com LUVs de DOPC/DOPG (60:40) estudada por esse modelo, resultando em um K_p de aproximadamente 80 M^{-1} (Persson *et al.* 2003).

É interessante ressaltar que todos os peptídeos estudados por esta metodologia acabam por ter interações dominadas por componentes eletrostáticos (Wieprecht *et al.* 2000; Wieprecht *et al.* 2000; Persson *et al.* 2003; Ziegler *et al.* 2003). É pouco provável que não sejam distinguíveis grupos de peptídeos que interagem somente com a interface das membranas de peptídeos dos que interagem tanto com a interface quanto com o núcleo hidrofóbico. O capítulo 3 aponta para heterogeneidade funcional em peptídeos

membrano-ativos. É possível que a falta de distinção entre grupos de peptídeos encontrada na literatura possa ser resultado de restrições das condições experimentais a intervalos onde o modelo de partição em superfície é aplicável. As isotermas de interação são normalmente obtidas a partir da titulação de peptídeo em concentração abaixo de 10 μM com vesículas em concentrações na faixa de 20-30 mM. Assim, trabalha-se sempre com excesso molar de vesículas em função de peptídeos, deixando-se de observar possíveis transições de fase do sistema em função da relação molar entre as biomoléculas.

4.1.5. Termodinâmica da estruturação em α -hélice

Peptídeos normalmente encontram-se randomicamente estruturados em solvente aquoso. A formação de α -hélice neste tipo de ambiente é desfavorável devido o excesso molar de água, o que desfavorece a formação de pontes de hidrogênio intramoleculares (Wieprecht *et al.* 1999). A partição de peptídeos em solvente orgânico ou em membranas plasmáticas leva à sua estruturação, um processo que pode ser mensurado calorimetricamente. Várias tentativas de determinar a energia envolvida na transição entre estrutura randômica e hélice chegaram à conclusão de que este processo é dominado por um fator entálpico e oposto pela entropia (Scholtz e Baldwin 1992; Wieprecht *et al.* 1999). Valores típicos são $\Delta H_{hélice} = -0,9$ a $-1,3$ kcal.mol⁻¹ por resíduo e $\Delta S_{hélice} = -2,5$ a $-4,6$ cal.mol⁻¹.K⁻¹ por resíduo (Wieprecht *et al.* 1999). Magainina 2 amida, assim como três análogos com substituições de resíduos de d-aminoácidos adjacentes, foram sintetizados e tiveram suas interações com vesículas fosfolipídicas analisadas pelo modelo de partição em superfície (Wieprecht *et al.* 1999). Concluiu-se que para estas moléculas, 50% da energia livre de interação é devido à formação de hélice (Wieprecht *et al.* 1999). Para magainina 2 amida, o $\Delta H_{hélice} = -0,7$ kcal.mol⁻¹ por resíduo e $\Delta S_{hélice} = -1,9$ cal.mol⁻¹.K⁻¹ por resíduo, enquanto $\Delta G_{hélice} = -0,14$ kcal.mol⁻¹ por resíduo. Estes dados são aplicáveis somente a esse conjunto de peptídeos, já que o mesmo trabalho aponta que estas regras não são capazes de descrever a energética de helicoidização decorrente da adsorção de outros peptídeos em vesículas fosfolipídicas.

4.1.6. Justificativa e objetivos específicos

Calorimetria de titulação isotérmica é a metodologia mais difundida no estudo de interações entre peptídeos e membranas. Esta técnica é capaz de fornecer constantes de afinidade assim como a termodinâmica da interação entre peptídeos e membranas em uma simples titulação. Porém, embora este modelo seja capaz de discernir entre as diferentes forças envolvidas na interação de peptídeos com membranas, ele não discerne entre os diferentes grupos de peptídeos membrano-ativos, seus modos e graus de interação. Dado este cenário, temos como objetivos específicos do presente capítulo:

- Determinar a termodinâmica de interação de 17 diferentes peptídeos com LUVs de DMPC e DMPC/DMPG (2:1)
- Aplicar o modelo de partição em superfície
- Interpretar os dados e discutir a adequação do modelo para descrever estas interações.

4.2. Material e métodos

* A metodologia de confecção de vesículas, de dicróismo circular e dos experimentos de espectroscopia de fluorescência são as mesmas apresentadas no capítulo 3.

A. Peptídeos – Referir-se à seção de mesmo nome no capítulo 3 (página 112).

B. Vesículas lipídicas – Referir-se à seção de mesmo nome no capítulo 3 (página 113)

B. Dicróismo circular – Referir-se à seção de mesmo nome no capítulo 3 (página 114)

C. Experimentos de espalhamento de luz – Conforme descrito na seção “Experimentos de extravasamento de 5,6-carboxifluoresceína (CF)” no capítulo 3 (página 113).

D. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC) – as mensurações de ITC foram feitas em um aparelho VP-ITC (MicroCal, Northampton, MA). Antes do uso, as soluções foram degaseificadas à vácuo. Em cada experimento, uma solução de peptídeo de aproximadamente 20 μM foi titulada com uma solução de fosfolipídeos a aproximadamente 10 mM numa célula experimental de 1,4337 mL. Foram programadas 29 injeções de 10 μL de fosfolipídeos até a saturação completa dos peptídeos. Experimentos controle foram realizados para determinar o calor de diluição, tanto para experimentos de injeção de peptídeo em fosfolipídeos quanto de fosfolipídeos em vesículas. Todos os experimentos foram conduzidos a uma temperatura de 25 °C.

E. Conversão dos traços calorimétricos em isothermas de interação – Denotando-se o calor de interação da k ésima injeção como Δh_k , e $\sum_1^k \Delta h_k$ o calor cumulativo das primeiras k injeções e $\sum_k^n \Delta h_k$ o calor total de interação, podemos calcular o calor molar da interação ΔH ,

$$\Delta H = \sum_1^n \Delta h_k / n^{\circ}_{\text{pep}} \quad (9)$$

onde n_{pep}^o é dado por $c_{pep}^o \cdot V_{cel}$, que correspondem à concentração total de peptídeo e o volume da célula, respectivamente. n_{pep}^o por si é a quantidade molar de peptídeo na célula após n injeções. Pode-se, então obter a isoterma de interação a partir da relação,

$$X_p^{(i)} = \frac{n_{p,b}^{(i)}}{n_{pep}^o} = \frac{\sum_{k=1}^i \Delta h_k}{\Delta H V_{cel} c_{pep}^o} \quad (10)$$

onde $n_{p,b}^{(i)}$ é a concentração molar de peptídeo adsorvido após i injeções, n_{pep}^o é a concentração molar final de peptídeo e c_{pep}^o é a concentração inicial de peptídeo. $\sum_{k=1}^i \Delta h_k$ é a soma do calor de interação das primeiras i injeções. $X_p^{(i)}$ se aproxima de 1 ao final da titulação, já que todos os peptídeos estarão adsorvidos.

A concentração de peptídeo livre pode ser calculada de acordo com a fórmula:

$$c_f^{(i)} = f_{dil}^{(i)} c_{pep}^o [1 - X_p^{(i)}] \quad (11)$$

Um fator de diluição ($f_{dil}^{(i)}$) deve ser levado em consideração para calcular a concentração de peptídeo real, já que a injeção de vesículas também aumenta o volume final.

$$f_{dil}^{(i)} \approx \frac{V_{cel}}{V_{cel} + iV_{inj}} \quad (12)$$

sendo V_{inj} o volume injetado em cada passo da titulação.

A concentração de fosfolipídeos em cada passo da titulação pode ser obtida por meio da seguinte formula,

$$c_l^{(i)} = \left(\frac{V_{inj}}{V_{tot}^{(i)}}\right) c_l^o + c_l^{i-1} \quad (13)$$

onde $V_{tot}^{(i)}$ é o volume total da célula após i injeções e c_l^{i-1} é a concentração de fosfolipídeos presente na célula após $i-1$ injeções. Somente 50% dos fosfolipídeos estão na face externa, e assim, acessíveis em vesículas grandes unilamelares (LUVs), e isso foi levado em conta no cálculo da relação molar (X_b).

A partir da concentração de peptídeo adsorvido $n_{p,b}^{(i)}$ e da concentração de fosfolipídeos $c_l^{(i)}$ em cada passo da titulação, pode-se obter o grau de interação, definido por,

$$X_b^{(i)} = \frac{n_{p,b}^{(i)}}{c_l^{(i)} \gamma} \quad (14)$$

onde γ é a fração da concentração de fosfolipídeo acessível ao peptídeo. Para LUVs, a concentração total de fosfolipídeos que compõem a camada externa das vesículas é 0,5, aumentando para 0,6 para SUVs

A isoterma de interação é obtida plotando-se $X_b^{(i)}$ em função de $c_f^{(i)}$, e K_{app} pode ser obtido sem fazer uso de qualquer modelo, sendo necessária somente a escolha de uma concentração como referência.

F. Cálculo dos parâmetros termodinâmicos – A energia livre de interação é calculada por:

$$\Delta G = \Delta G_{el} + \Delta G_p \quad (15)$$

onde ΔG_{el} é a contribuição eletrostática da energia livre de interação, e ΔG_p é a contribuição das interações hidrofóbicas.

ΔG_{el} é dado por:

$$\Delta G_{el} = -RT \left(\ln \left(\frac{c_m}{c_{eq}} \right) \right) \quad (16)$$

E ΔG_p é dado por:

$$\Delta G_p = -RT (\ln 55,5 K_p) \quad (17)$$

O termo 55,5 corrige a contribuição crática da água (55,5 M para água líquida), já que a concentração do peptídeo em solução é medida em mols por litro, enquanto na fase da membrana ela é dada em mols de peptídeo por mols de fosfolipídeo (Gilson *et al.* 1997; Wenk e Seelig 1998).

A entropia de interação (ΔS) foi calculada de acordo com:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (18)$$

4.3. Resultados

4.3.1. Peptídeos. Os 17 peptídeos testados tiveram comportamentos heterogêneos com relação à sua adsorção em membranas. Nem todas as isotermas de titulação foram passíveis de ajuste, nem mesmo por modelos simples de interação. Para alguns peptídeos, a extensão da reação ($d\xi$) foi incompatível com a quantidade de mols de peptídeo injetada (dn_j^0), o que indica a existência de fenômenos outros que a partição de peptídeos em membranas. Neste grupo enquadram-se as moléculas DS 01, DShypo 06 e 03 e as nattererinas K e R, todas elas do grupo 1 de peptídeos membrano-ativos, conforme classificados no capítulo 3 (ver tabela 4.1). Algumas outras moléculas particionaram-se em membranas de acordo com o previsto pelo modelo de partição em superfície, gerando isotermas passíveis de ajuste por diferentes modelos. Todos os peptídeos que se adequaram ao modelo interagiram exclusivamente com vesículas aniônicas compostas de DMPC/DMPG (2:1), o que indica forte influência de forças eletrostáticas. Intra 2 é utilizado como exemplo.

Tabela 4.1. Seqüências peptídicas e algumas de suas características físico-químicas computadas.

Peptídeo	Seqüência	MW	pI	Zp	HM*	H
DS 01	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAALGAL-NH ₂	2793,59	10,00	3	0,95	-1,13
DShypo 06	GLWSTIKQKGKEAAIAAKAAGQAVLNSASEAL-NH ₂	3252,79	9,53	2	0,79	-1,52
DShypo 03	ALWKDVLKKGITVALHAGKAAFCAAADTISQGG	3352,84	9,53	3	1,95	-0,85
Nattererin R	GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINRFSPQPQ	3207,80	10,00	3	1,13	-1,28
Nattererin K	GLKDMIKNLAKEAAVKLAGAVINKFSPQPQ	3179,80	9,83	3	1,13	-1,28
PS 1	FLSLIPHAINAVSAIAKH-NH ₂	2015,14	8,76	3	2,68	0,76
PS 2	FLSLIPHAINAVSTLVHNF-NH ₂	2115,17	7,02	3	3,65	2,17
PS 3	FLSLIPHAINAVSALANHG-NH ₂	1944,07	6,92	2	2,83	1,22
HSP1	GILDAIKAIKAAG	1311,80	8,59	1	3,46	-0,2
Phyllomelitin	LPSIVSWVKQKLL-NH ₂	1509,94	10,00	2	2,36	1,6
Intra 1	KAGLQFPVGRIARFLK	1801,10	12,02	4	1,51	-0,06
Intra 2	FKALRALRLEDLRIPTSYIK	2403,42	10,27	3	0,83	-0,42
Intra 3	FRNKIKEKLLKIGQKIQGF	2303,41	10,68	6	1,86	-2,44
Intra 4	LAKRRVLTLLRQLRRVSPSS	2349,47	12,60	6	0,39	-1,36
Hyposin analog	LRPAILVRVKGKGL	1520,02	12,02	4	3,08	0
Penetratin	RQIKIWFQNRMRKWKK	2246,30	12,31	6	0,11	-2,35
Tat peptide	GRKKRRQRRPPQ	1719,06	12,70	8	0,43	-7,29

MW = massa molecular monoisotópica
pI = ponto isoelétrico
Zp = carga teórica
HM = momento hidrofóbico

4.3.2. Peptídeos que se ajustaram ao modelo de partição em superfície. Somente quatro peptídeos tiveram dados compatíveis com a teoria de partição em superfície, sendo eles Intra 1 e 2 e os CPPs tat-peptide e penetratina. Intra 2 foi escolhido como modelo para o grupo. Os traços calorimétricos da titulação de Intra 2 a 20 μM por injeções de alíquotas de 10 μL de LUVs de DMPC/DMPG (2:1) ($c_L^0 = 15,4 \text{ mM}$) na temperatura de 25 $^\circ\text{C}$ estão representados na figura 4.6. Cada injeção de vesículas produz um calor de reação exotérmico que decresce em magnitude com injeções consecutivas, como esperado para reações que obedecem às leis de ação de massa. Experimentos controle foram realizados pela injeção de LUVs em tampão, com a liberação de constantes h_{dil} de aproximadamente - 0,38 μcal por injeção. Este é o calor de diluição de vesículas, e todas as titulações de LUVs em peptídeo foram ajustadas pela sua subtração. O ajuste desta isoterma de interação com um modelo que prevê somente um sítio de interação, obtido no pacote de softwares da Microcal fornece o valor de $K = 3,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (figura 4.6). Este valor de K é somente um K_{app} , pois desconsidera que esta interação seja decorrente da soma de efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos. Uma maior resolução pôde ser obtida ao analisar os dados pelo modelo de partição em superfície.

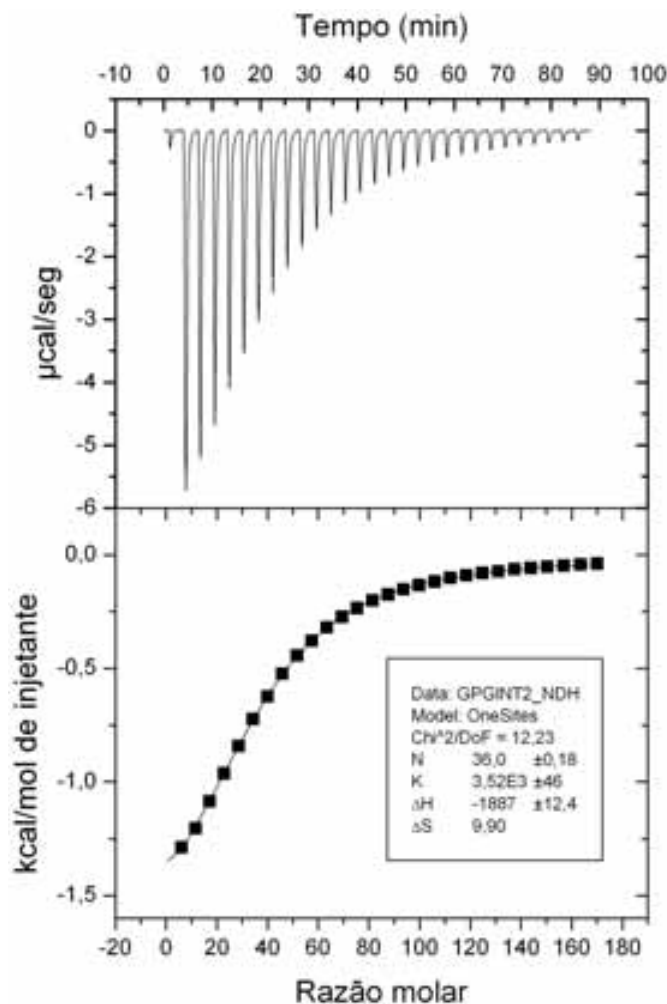


Figura 4.6. Traços calorimétricos da titulação de intra 2 a 20 μM em tampão (Fosfato 20mM, pH 7,4) a 25 $^{\circ}\text{C}$ com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) ($c_L^0 = 15,4 \text{ mM}$). Cada pico corresponde à injeção de alíquotas de 10 μL da suspensão de lipídeos na célula calorimétrica contendo intra 2. O gráfico abaixo mostra os traços calorimétricos integrados. A linha contínua é o ajuste da isoterma ao modelo de interação que prevê um sítio de interação do pacote de 'softwares' da Microcal.

A figura 4.7 mostra novamente a titulação de intra 2 com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) e com uma solução a 12 mM de LUVs de DMPC. A injeção de LUVs eletricamente neutras em intra 2 produz um calor h_i constante de aproximadamente - 0,4 μcal , muito próximo ao h_{dil} . Isto demonstra que intra 2 necessita de potencial de membrana negativo ($\phi_b < 0$) para interação, em consenso com os dados do capítulo 3. Assim, somente a isoterma de interação de intra 2 com vesículas aniônicas pôde ser ajustada ao modelo de partição em superfícies. A condição específica deste modelo é que a adsorção do peptídeo

esteja linearmente relacionada à sua concentração numa camada imediatamente superior a membrana (c_m) e não à concentração do peptídeo em solução (c_{eq}). C_m depende de (i) concentração de peptídeo livre (c_{eq}), (ii) carga “real” do peptídeo em solução (z_p) e (iii) do potencial de membrana (ϕ_o), conforme equação 4 (página 156). O peptídeo intra 2 possui carga teórica $z = +3$ e vesículas de DMPC/DMPG (2:1) têm potencial de membrana negativo, levando à um $c_m > c_{eq}$. A isoterma de adsorção fornece c_{eq} e a carga do peptídeo é parâmetro de ajuste, já que esta em tampão é frequentemente diferente da teórica (Seelig *et al.* 1993; Persson *et al.* 2003; Bringezu *et al.* 2007). O potencial de superfície (ϕ_o) das vesículas pode ser obtido pelas relações de Gouy-Chapman, conforme equação 8 (página 157), e deve ser recalculado em cada ponto da titulação (McLaughlin 1989). Os valores numéricos para cada um dos parâmetros calculados para a adsorção de intra 2 em LUVs de DMPC/DMPG (2:1) podem ser vistos na tabela 4.2. A conversão de c_{eq} em c_m gera a isoterma descrita na figura 4.7C, cuja regressão linear revela a constante de adsorção intrínseca do peptídeo (K_p). O valor $K_p=1 \text{ M}^{-1}$ para intra 2 demonstra que o fator hidrofóbico tem discreta participação na interação, dominada pelo componente eletrostático. Decorrem deste coeficiente de partição os parâmetros termodinâmicos $\Delta G = -6,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $\Delta H = -55,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $\Delta S = -162 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ listados na tabela 4.3. Da energia livre de interação, 2/3 são função do componente eletrostático ($\Delta G_{el} = -4,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $\Delta G_h = -2,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$). A ausência de interação de intra 2 com vesículas neutras corrobora o domínio de forças eletrostáticas.

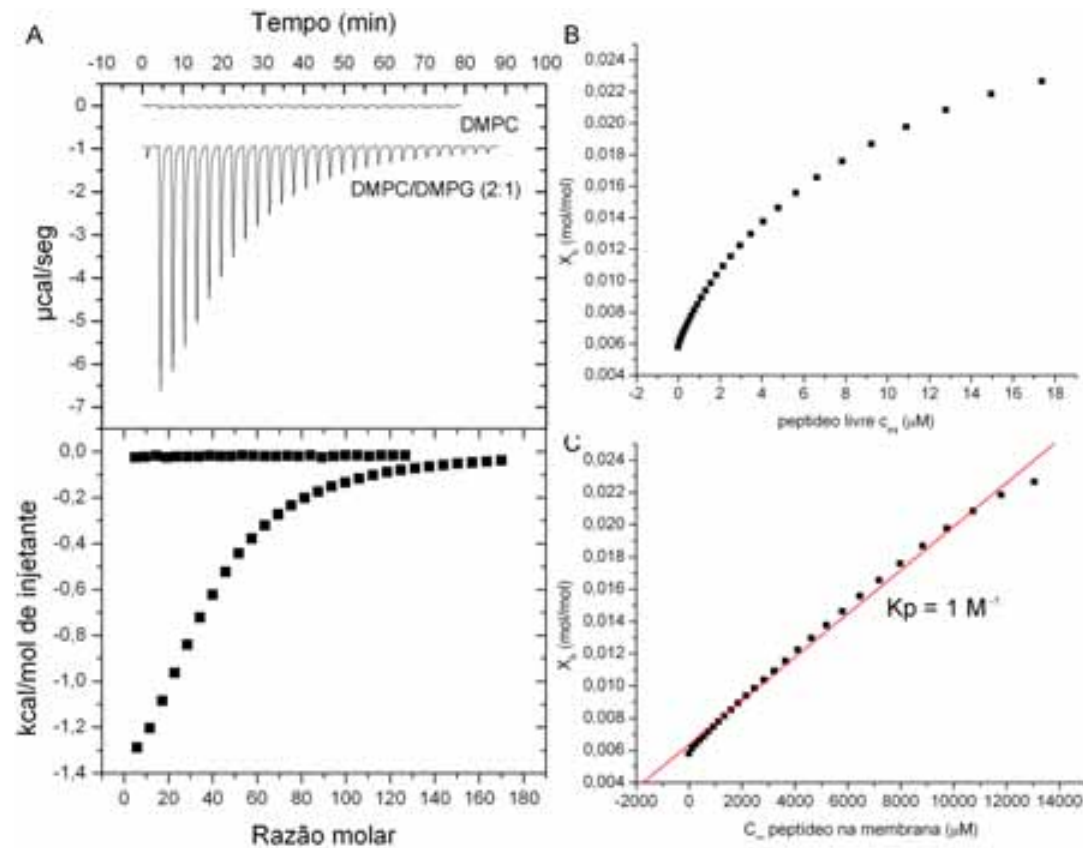


Figura 4.7. A. Traços calorimétricos da titulação de intra 2 a 20 μM em tampão (20mM Fosfato, pH 7,4) a 25 °C com LUVs de DMPC (12 mM) e de DMPC/DMPG (2:1) (15,4 mM). Cada pico corresponde à injeção de alíquotas de 10 μL da suspensão de lipídeos na célula calorimétrica contendo intra 2. O gráfico abaixo mostra os traços calorimétricos integrados. B. Relação entre a quantidade de peptídeo adsorvido na membrana (X_b) em função da concentração de peptídeo livre em solução (c_{eq}). C. Quantidade de peptídeo adsorvido (X_b) em função da concentração de peptídeo na camada imediatamente superior à membrana (c_m), calculada pela aplicação da teoria de Gouy-Chapman. A linha reta é resultado da regressão linear dos dados, e fornece a constante de adsorção intrínseca ao peptídeo (K_p).

Tabela 4.2. Parâmetros obtidos pelo modelo de partição de superfície para a titulação de intra 2 com LUVs de DMPC/DMPG (2:1).

C_{eq} (μM)	C_m (μM)	σ (mCi/m^2)	ϕ_o (mV)	f_{Na}	X_b (mol/mol)
17,38	13055,33	-45,40	-58,60	0,19	0,0227
14,96	11802,61	-45,79	-59,04	0,19	0,0219
12,80	10736,57	-46,28	-59,58	0,19	0,0208
10,89	9749,70	-46,80	-60,16	0,20	0,0198
9,24	8832,66	-47,34	-60,74	0,20	0,0187
7,83	7986,51	-47,87	-61,31	0,21	0,0176
6,63	7186,44	-48,38	-61,85	0,21	0,0166
5,63	6465,14	-48,87	-62,37	0,21	0,0156
4,78	5802,27	-49,33	-62,85	0,22	0,0146
4,06	5185,70	-49,76	-63,29	0,22	0,0138
3,46	4625,38	-50,16	-63,70	0,22	0,0130
2,95	4112,46	-50,53	-64,07	0,22	0,0122
2,52	3644,95	-50,87	-64,41	0,23	0,0116
2,15	3220,50	-51,18	-64,72	0,23	0,0109
1,83	2830,28	-51,46	-65,01	0,23	0,0104
1,55	2476,18	-51,73	-65,27	0,23	0,0098
1,31	2150,03	-51,97	-65,51	0,23	0,0094
1,10	1851,79	-52,19	-65,73	0,24	0,0089
0,92	1583,90	-52,40	-65,93	0,24	0,0085
0,76	1342,79	-52,59	-66,12	0,24	0,0081
0,63	1120,39	-52,77	-66,29	0,24	0,0078
0,50	914,51	-52,93	-66,45	0,24	0,0075
0,39	727,43	-53,09	-66,60	0,24	0,0072
0,29	554,75	-53,23	-66,74	0,24	0,0069
0,21	399,93	-53,36	-66,87	0,24	0,0066
0,13	254,92	-53,49	-66,99	0,25	0,0064
0,06	121,26	-53,61	-67,10	0,25	0,0061
0,00	0,00	-53,78	-67,27	0,25	0,0058

c_{eq} = concentração de peptídeo livre
 c_m = concentração de peptídeo na membrana
 σ = densidade de cargas na superfície da membrana
 ϕ_o = potencial de superfície de membrana
 f_{Na} = fração de sódio ligado aos fosfatos
 X_b = relação molar entre fosfolipídeos/peptídeo

Também outros peptídeos como intra 1, tat-peptide e penetratina foram titulados com LUVs de DMPC e de DMPC/DMPG (2:1) e a exemplo de intra 2 todos tiveram interação exclusiva com vesículas negativamente carregadas. O modelo de partição em superfície teve bom ajuste aos dados também para estas moléculas. Os parâmetros

termodinâmicos derivados do modelo estão descritos na tabela 4.3, e demonstram a predominância do efeito eletrostático para esses peptídeos. Estes dados estão em consonância com os de calorimetria diferencial exploratória apresentados no capítulo 3, os quais demonstram que estas moléculas se localizam na interface da membrana, sem interagir com a porção hidrofóbica.

Tabela 4.3. Parâmetros termodinâmicos da interação de peptídeos com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) avaliado à $c_{eq} \cong 1 \mu\text{M}$.

Peptídeo	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔG_{el} (kcal.mol ⁻¹)	ΔG_p (kcal.mol ⁻¹)	z_p	K_p (M ⁻¹)	K_{app} (M ⁻¹)
Intra 2	-6,8	-55,3	-162	-4,4	-2,4	2,9	1	$3,5 \times 10^3$
Intra 1	-11,5	-21,7	-34	-6,0	-5,5	1,7	210	$1,9 \times 10^4$
Penetratina	-9,5	-34,1	-83	-5,8	-3,7	2,6	9	$1,0 \times 10^4$
Tat-pep	-5,7	-14,3	-29	-5,4	-0,3	4,5	0,03	$1,5 \times 10^3$

A energia livre de interação foi calculada por $\Delta G = \Delta G_{el} + \Delta G_p$, onde $\Delta G_{el} = -RT (\ln(c_m/c_{eq}))$ e $\Delta G_p = -RT \ln(55,5K_p)$. Ambos foram avaliados à $c_{eq} \sim 1 \mu\text{M}$.

4.3.3. Peptídeos que não conformam com o modelo de partição em superfície.

Embora o modelo tenha sido aplicado com sucesso para a adsorção de algumas moléculas, os parâmetros obtidos não foram verossímeis, o que indica que seu uso deve ser feito com cautela. Os dados abaixo são da interação de PS 2 com vesículas fosfolipídicas eletricamente negativas (figura 4.8). Com o ajuste das isotermas de interação ao modelo, obtém-se que PS 2 possui carga efetiva $z_p = + 2,2$ no tampão e que a afinidade intrínseca do peptídeo à membrana, excluindo o efeito eletrostático é $K_p = 38 \text{ M}^{-1}$ (figura 4.8C). Destes valores, obtém-se que $\Delta G = - 10,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $\Delta H = -26,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $\Delta S = -54 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$, valores próximos aos obtidos para os peptídeos relatados na tabela 4.3. A dissociação da energia livre de Gibbs em seus componentes elétrico e hidrofóbico revela que $\Delta G_{el} = -5,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $\Delta G_h = -4,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Segue desse raciocínio que a interação do peptídeo PS 2 em LUVs é dependente também das altas concentrações de moléculas na camada imediatamente superior à membrana (c_m).

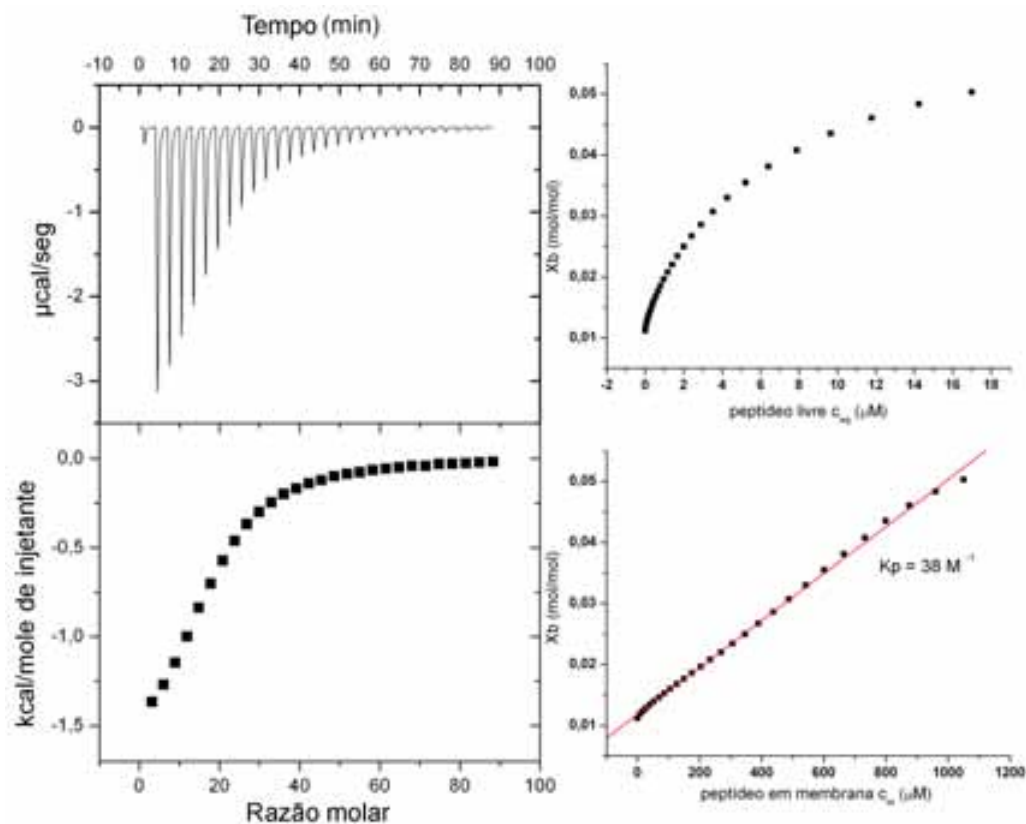


Figura 4.8. A. Traços calorimétricos da titulação de PS 2 a $20 \mu\text{M}$ em tampão (20mM Fosfato, pH 7,4) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) (8 mM). Cada pico corresponde à injeção de alíquotas de $10 \mu\text{L}$ da suspensão de lipídeos na célula calorimétrica contendo PS 2. O gráfico de baixo mostra os traços calorimétricos integrados. B. Relação entre a quantidade de peptídeo adsorvido na membrana (X_b) em função da concentração de peptídeo livre em solução (c_{eq}). C. Quantidade de peptídeo adsorvido (X_b) em função da concentração de peptídeo na camada imediatamente superior à membrana (c_m), calculada pela aplicação da teoria de Gouy-Chapman. A linha reta é resultado da regressão linear dos dados, e fornece a constante de adsorção intrínseca ao peptídeo (K_p).

A figura 4.9B demonstra as isotermas de interação do peptídeo PS 2 com ambas vesículas de DMPC e de DMPC/DMPG (2:1). Embora o ajuste da teoria com vesículas negativamente carregadas indique que a interação depende fortemente da atração eletrostática, a titulação do mesmo peptídeo com LUVs de DMPC, as quais são eletricamente neutras, gera isotermas praticamente idênticas (figura 4.9B). Numericamente, a constante de afinidade aparente (K_{app}) de PS 2 por vesículas neutras e negativamente carregadas é de $8,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, e de $1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. É interessante observar que no sistema inverso, quando soluções de LUVs são tituladas com PS 2, injeções de peptídeo liberam mais calor ao interagir com vesículas eletricamente negativas (figura 4.9A). A seletividade de adsorção do peptídeo por vesículas eletricamente negativas parece perder-se nas condições em que as isotermas foram adquiridas.

A teoria de partição em superfície também considera o acúmulo de peptídeo na superfície de partículas neutras e a reversão de suas cargas para positivas. Decorre daí um potencial de superfície (φ_o) positivo e crescente que diminui a afinidade relativa de outras moléculas de carga positiva. O ajuste da titulação de PS 2 com DMPC revela um $K_p = 1172 \text{ M}^{-1}$. Esta situação é semelhante a da magainina 2 amida, cuja titulação com LUVs neutras resultou em $K_p = 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, enquanto a titulação com vesículas negativamente carregadas resultou em $K_p = 50 \text{ M}^{-1}$ (Wieprecht *et al.* 1999). Os autores interpretaram os dados à luz do modelo, o qual indica que a afinidade intrínseca dos peptídeos por vesículas negativamente carregadas é menor do que por vesículas neutras. Assim, caso não houvesse atração eletrostática entre magainina e análogos por vesículas eletricamente negativas, sua afinidade seria menor do que para vesículas eletricamente neutras (Wieprecht *et al.* 1999).

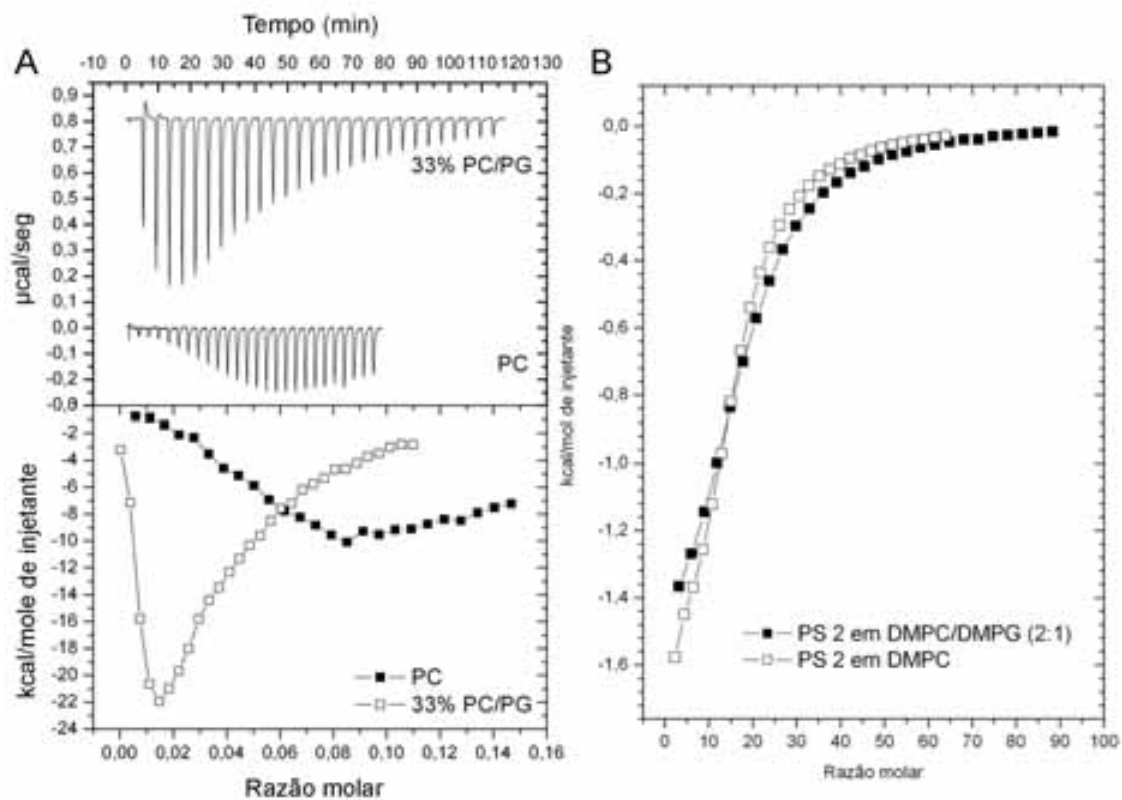


Figura 4.9. Traços calorimétricos da interação entre PS 2 e vesículas fosfolipídicas.
A. Traços calorimétricos da titulação de LUVs de DMPC e DMPC/DMPG (2:1) com PS-2 em injeções de 10µL – LUVs de DMPC/DMPG (2:1) a 201 µM de DMPC a 144 µM e PS-2 a 100 µM. **B.** Traços calorimétricos integrados da titulação de PS 2 a 20 µM com vesículas de DMPC (11,58 mM) e de DMPC/DMPG (2:1) (8mM).

4.3.4. Peptídeos cujo comportamento desvia do previsto pelo modelo de partição em superfícies. O ajuste de modelos de interação aos traços calorimétricos das titulações entre peptídeos e vesículas fosfolipídicas segue uma série de premissas. Uma delas determina que a quantidade de calor liberada em cada uma das injeções de vesículas seja proporcional à quantidade de peptídeo adsorvida, ou seja, à extensão da reação ($d\xi$). Para algumas interações, como para *intra 2* e *PS 2*, isto é verdade. Cada injeção de LUVs remove uma fração de peptídeos da solução, liberando h_i de calor. Esta quantidade de calor se aproxima de zero ($Q \rightarrow 0$) com o deslocamento da reação pela injeção de vesículas fosfolipídicas ($d\xi \rightarrow 0$). Porém, algumas das moléculas estudadas não seguem esse padrão.

Os traços calorimétricos integrados da titulação de nattererina K e DS 01 com LUVs estão ilustrados na figura 4.10, assim como seu grau de estruturação em α -hélice. Os dados mostram que a interação de LUVs de DMPC e de DMPC/DMPG (2:1) com estes peptídeos gera reações exotérmicas com afinidades próximas para LUVs eletricamente neutras e LUVs negativamente carregadas, julgando-se pela aparência das isotermas de interação. A característica mais marcante e particular desse grupo de peptídeos são as primeiras injeções de vesículas. As figuras 4.10B, C e D mostram que os primeiros traços calorimétricos possuem um padrão diferenciado, em que injeções seguintes liberam maior quantidade de calor que as anteriores. Tal padrão indica uma segunda fonte de calor, o que torna modelos que consideram somente a interação peptídeo/membrana incompletos. As mesmas interações foram analisadas por dicroísmo circular e revelaram que em vários casos as curvas do conteúdo de hélice das moléculas em função da razão molar entre fosfolipídeo e peptídeo não acompanham as isotermas do calorímetro (figura 4.10, linha cinza). Isto mostra que mesmo após a estruturação dos peptídeos, que é decorrente de sua interação com bicamadas lipídicas, o sistema ainda não se encontra em equilíbrio. A concordância entre as curvas de estruturação em hélice e a isoterma de titulação foi particular à interação de alguns peptídeos antimicrobianos, tais quais nattererina K, com vesículas neutras (figura 4.10A).

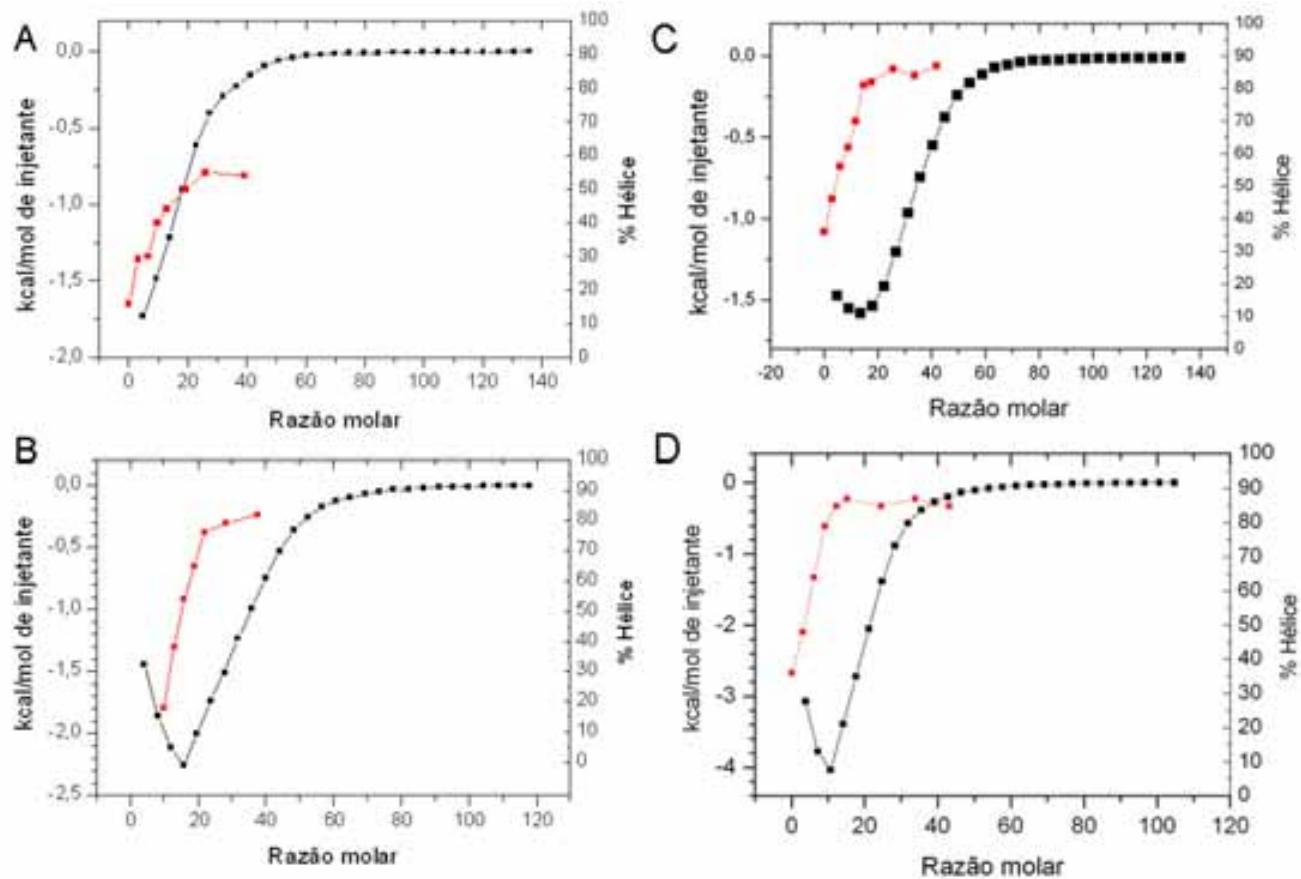


Figura 4.10. Traços calorimétricos integrados e estrutura secundária da titulação de **A.** nattererina K com LUVs de DMPC. **C.** DS 01 com LUVs de DMPC. Traços calorimétricos integrados da titulação de **B.** nattererina K com LUVs de DMPC/DMPG (2:1). **D.** DS 01 com LUVs de DMPC/DMPG (2:1). Em cinza estão as porcentagens de hélice calculadas pela $[\theta_{222}]$ na titulação em cada caso.

4.3.5. Fenômenos secundários à adsorção fosfolipídeo/peptídeo. Evidências experimentais apontam para outras fontes de calor além da simples adsorção do peptídeo em vesículas para determinados pares moleculares. Isto indica a existência de interações secundárias entre complexos de peptídeos e vesículas fosfolipídicas. Interessantemente, esse comportamento foi comum a peptídeos pertencentes ao grupo 1 de moléculas, conforme classificado no capítulo 3. Dados de DSC demonstraram que peptídeos do grupo 1 foram capazes de perturbar a ordem de vesículas fosfolipídicas compostas de DMPC/DMPG (2:1) e não tiveram o mesmo efeito nas compostas somente do fosfolipídeo neutro DMPC. Este efeito foi consistente com a diminuição do espalhamento de luz causado por alguns peptídeos em LUVs de composição aniônica, enquanto LUVs de fosfolipídeos neutros mantiveram-se íntegras (figura 4.11). Sabe-se que peptídeos antimicrobianos são capazes de alterar o tamanho de vesículas fosfolipídicas, induzindo sua agregação, assim como fusão ou diminuição de seu volume, dependendo das condições experimentais (Abrunhosa *et al.* 2005; Silva *et al.* 2007). A figura 4.11 mostra que os peptídeos DS 01 e nattererina K são capazes de diminuir o tamanho das vesículas de DMPC/DMPG (2:1) já na razão de 1 peptídeo para cada 200 fosfolipídeos (equivalente a uma razão molar de 0,005 P/L mol/mol). Nattererina K diminui o tamanho das LUVs a menos de 40% na relação de 1 peptídeo para cada 25 fosfolipídeos. As titulações fosfolipídeo em peptídeo tiveram nas primeiras injeções razões molares da ordem de 1 peptídeo para cada 3 moléculas de fosfolipídeo (0,33 P/L mol/mol) (figura 4.10). Isto indica que nestas relações molares, alterações no tamanho de vesículas constituíram um segundo processo termodinâmico superimposto à simples adsorção do peptídeo à membrana. Este processo é dependente da relação molar entre peptídeos e fosfolipídeos, e é análogo à indução de formação e destruição de micelas mistas de fosfolipídeos e surfactantes (Wenk e Seelig 1997).

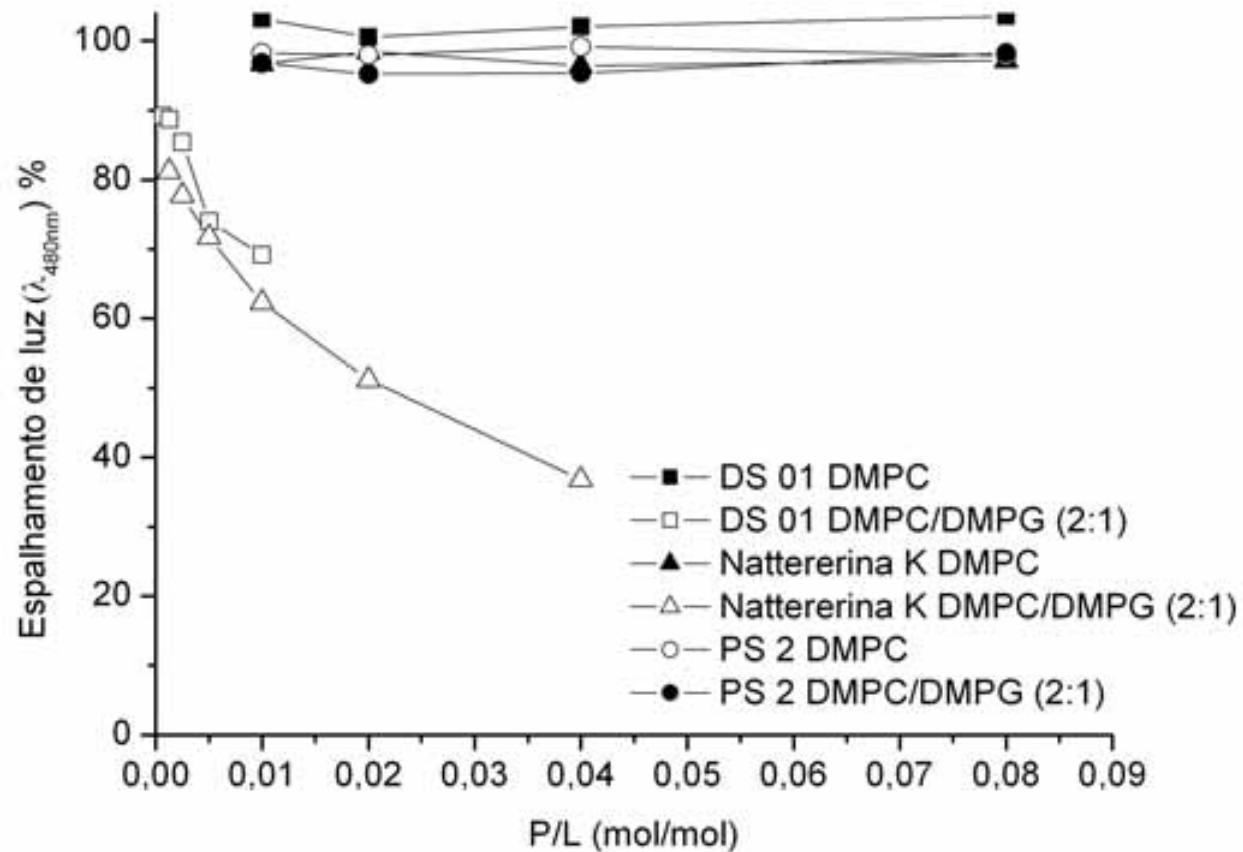


Figura 4.11. Espalhamento de luz em função da relação molar entre peptídeos e fosfolipídeos. Uma solução de LUVs de 100 nm de diâmetro foi excitada a 480 nm e sua emissão foi lida a 90° no mesmo comprimento de onda, experimento capaz de verificar o espalhamento de luz pelas partículas em solução.

A importância da relação molar fosfolípido/peptídeo nos parâmetros termodinâmicos foi estudada por meio da variação da concentração dos peptídeos na célula calorimétrica seguida de sua titulação completa com LUVs neutras e também aniônicas. A figura 4.12A mostra os traços calorimétricos derivados da titulação do peptídeo nattererina K em diferentes concentrações iniciais ($c_p^0 = 20, 15$ e $8 \mu\text{M}$) com LUVs de DMPC/DMPG (2:1). Fica evidente que o padrão formado pelos traços calorimétricos difere com o aumento da concentração desse peptídeo. A titulação de nattererina K a $8 \mu\text{M}$ gerou isotermas cujos picos h_i decrescem com injeções consecutivas. Quando se altera a c_p^0 para $20 \mu\text{M}$, as primeiras injeções liberam menos calor que as seguintes até um ponto de saturação, a partir do qual a interação procede normalmente. Também outros peptídeos tiveram titulações com padrão semelhante, no qual o ΔH é somente aparente e variável em função da concentração inicial do peptídeo (figura 4.12B). Desta forma, é inútil falar sobre um ΔH único e constante para essas interações ou até mesmo determiná-lo pela injeção de soluções diluídas de peptídeo em soluções concentradas de fosfolípido. Entalpia de interação variável é uma das características comuns à interação de detergentes com membranas, tais quais octyl-glucosídeo (Wenk e Seelig 1997). Esses dados demonstram variação da entalpia de reação em função da concentração inicial de peptídeo na célula (figura 4.12B). Interessantemente, são os traços calorimétricos das primeiras injeções de LUVs as que mais variam com alterações na concentração inicial de peptídeo, conforme se percebe na figura 4.12A.

É improvável que estes desvios de comportamento sejam resultantes da estruturação de peptídeos em α -hélice, embora este processo certamente constitua ainda outra fonte de calor nas titulações. Nattererina K vai de 10 % de conteúdo de hélice em solvente aquoso até 50% ao ser titulado com LUVs de DMPC, enquanto sua titulação com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) induz até 90% de estruturação (figura 4.10A e B). Porém, desvios do comportamento previsto só ocorreram quando nattererina K foi titulada com LUVs aniônicas.

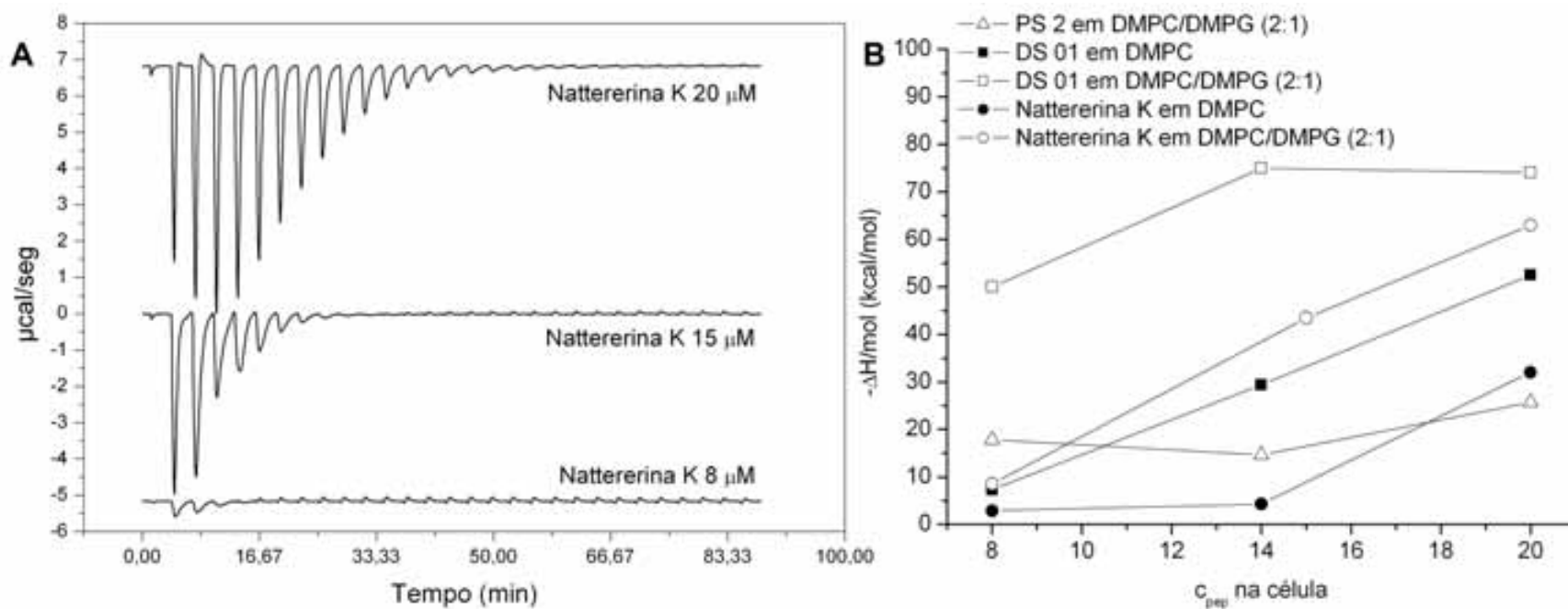


Figura 4.12. Variação dos traços calorimétricos em função da concentração inicial de peptídeo ($c_{0,pep}$). **A.** Traços calorimétricos da titulação do peptídeo nattererina K com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) a 20, 15 e 8 μM . **B.** Relação entre a entalpia de interação ajustada por mols de peptídeo ($-\Delta H \cdot \text{mol}^{-1}$) em função da concentração de peptídeo na célula calorimétrica (c_{pep}), mostrando uma dependência do calor de adsorção em função das condições experimentais.

4.4. Discussão

A termodinâmica da interação entre peptídeos e membranas depende da natureza química dos fosfolípidos assim como dos peptídeos envolvidos, podendo diferir radicalmente com mínimas variações no sistema. Reconhece-se que diferentes regras são aplicáveis a peptídeos com localização transmembrana e peptídeos que residem somente na interface (Seelig 2004). Várias técnicas biofísicas foram aplicadas para avaliar tais interações, cada uma fornecendo dados de acordo com seu escopo. Porém, a mais informativa e mais utilizada é a calorimetria de titulação isotérmica, e é para ela que encontramos a metodologia mais recente e completa de análise de dados (Seelig 1997; Persson *et al.* 2004; Seelig 2004). O modelo de partição em superfície foi desenvolvido a partir do reconhecimento de que a interação de proteínas com lípidos envolve tanto forças hidrofóbicas como eletrostáticas, as quais podem ser até opostas em determinados casos (Ladokhin e White 2001). Uma simples constante de equilíbrio de partição é insuficiente para o estudo de interações com membranas, pois terá efeitos eletrostáticos e hidrofóbicos embutidos nos mesmos dados numéricos, o que pode obscurecer o mecanismo físico de interação (Beschiaschvili e Seelig 1990). O modelo de partição em superfícies foi originalmente desenvolvido para explicar a interação de análogos de somatostatina de diferentes cargas nominais com vesículas de composição aniônica no início da década de 1990 (Beschiaschvili e Seelig 1990). Este encontrou amplo campo de aplicação na análise da interação de peptídeos antimicrobianos e penetradores de células com vesículas, resultando em diversos trabalhos. O presente estudo pretende verificar a validade do modelo de partição em superfície para uma ampla gama de peptídeos, na tentativa de obtenção de constantes de interação coerentes com o que se entende de suas estruturas.

A maior parte dos peptídeos estudados não apresentou isotermas de interação compatíveis com o modelo de partição em superfície. Dentre os que concordaram com o modelo, o peptídeo Intra 2 foi escolhido como exemplo. Intra 2, peptídeo derivado da subunidade maior da proteína ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxidase, teve sua interação com LUVs de DMPC e de DMPC/DMPG (2:1) estudada (figura 4.7). Este interagiu somente com vesículas de potencial de membrana negativo, e o ajuste de sua

isoterma de interação com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) com um modelo simples forneceu $K_{app} = 3,52 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (figura 4.6). Esta constante de afinidade é o somatório de ambos os efeitos hidrofóbico e eletrostático, forças que podem ser dissociadas pela aplicação do modelo de partição em superfície. A aplicação deste modelo revelou uma afinidade intrínseca $K_p = 1 \text{ M}^{-1}$. Assim, dos $-6,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ de energia livre de partição de intra 2 em LUVs de DMPC/DMPG (2:1), $-4,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ são devidos puramente ao efeito eletrostático, sendo o restante devido à hidrofobicidade intrínseca do peptídeo ($-2,4 \text{ kcal/mol}$) (tabela 4.3). A energética dessa interação é compatível com a de outros peptídeos membrano-ativos, tais quais nisina Z e somatostatina, os quais tiveram energias livre de interação na faixa de -4 a $-10 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (Seelig *et al.* 1993; Breukink *et al.* 2000). Os outros parâmetros termodinâmicos desta interação foram $\Delta H = -55,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$, e $\Delta S = -162 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$, ambos determinados por experimentos de injeção de fosfolídeos em peptídeos. Isso indica que a adsorção de intra 2 em membranas é dominada pelo componente entálpico negativo, e induz um aumento de ordem no sistema, o contrário do esperado para a partição de moléculas hidrofóbicas em solventes orgânicos (Wieprecht *et al.* 1999). Um termo entálpico negativo ($\Delta H \ll 0$) e um aumento de ordem ($\Delta S < 0$) caracterizam o efeito “hidrofóbico não-clássico”, o qual parece ser comum à interação de uma série de peptídeos com bicamadas lipídicas, como a de magainina 2 amida com LUVs de POPC/POPG (75:25) (Wenk e Seelig 1998; Wieprecht *et al.* 1999). Epanand e Sturtevant 1981 demonstraram que a interação de glucagon com vesículas multi-lamelares de DMPC resulta em parâmetros termodinâmicos antagônicos a diferentes temperaturas, antes e depois da transição de fase de gel (β) para lamelar (α), que ocorre a aproximadamente $23,5^\circ\text{C}$ para esse fosfolípido (Epanand e Sturtevant 1981). A titulação completa de glucagon a $50 \mu\text{M}$ com uma suspensão de DMPC a 25°C tem um $\Delta H = -155 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $\Delta S = -480 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$. O mesmo experimento a 23°C , temperatura na qual as membranas encontram-se em estrutura β , altera ambos os parâmetros, para $\Delta H = +80 \text{ kcal/mol}$ e $\Delta S = 290 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$. Os autores deste trabalho reconheceram tamanha diferença de entalpia de interação como resultante, em maior parte, de eventos de reorganização e transição de fase de grupos de fosfolídeos, induzida pela partição de moléculas exógenas (Epanand e Sturtevant 1981). Embora a

adsorção de intra 2 em LUVs a temperaturas mais baixas que seu T_m não tenha sido investigada, o mesmo padrão de trocas calorimétricas foi observado para o peptídeo DS 01. A titulação de DS 01 com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) a 15°C induziu reações endotérmicas, enquanto que a 25°C as reações foram exotérmicas (dados não mostrados). Sabe-se que peptídeos são capazes de induzir alterações localizadas no estado de ordem de um determinado grupo de fosfolipídeos (McElhaney 1986; Prenner *et al.* 1999). Alguns autores acreditam que a fonte desta entalpia negativa seja a transição conformacional protéica, de randômica para α -hélice, em vez de efeitos de reorganização de fosfolipídeos (Scholtz e Baldwin 1992; Wieprecht *et al.* 1999). Calcula-se que a entalpia de helicoidização seja responsável por $\Delta H_{helix} \sim -0,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$, e um $\Delta S_{helix} \sim -1,9 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$, ambos por cada mol de resíduo de aminoácido. Esse mesmo estudo concluiu que o fenômeno de helicoidização corresponde, em geral, a aproximadamente 50% da entalpia de interação (Wieprecht *et al.* 1999). Intra 2 não se estrutura ao interagir com LUVs de DMPC/DMPG (2:1), conforme demonstrado na figura 3.21 do capítulo 3. Também intra 1, penetratina e tat-peptide não se estruturaram ao entrar em contato com vesículas. Mesmo assim, todos eles se comportaram de acordo com o efeito “hidrofóbico não-clássico”, já que o termo entálpico, embora variável, foi predominante em sua energia livre de interação (tabela 4.3). De acordo com o capítulo 3, nenhum desses peptídeos é capaz de formar estruturas transmembrana estáveis ao serem adicionados à vesículas aniônicas, reforçando que suas interações com LUVs de DMPC/DMPG (2:1) são de natureza primariamente eletrostática.

A constante K_p é a medida da afinidade intrínseca de peptídeos membrano-ativos por membranas, desconsiderando efeitos eletrostáticos, incorporados no valor de K_{app} . Assim, é possível tentar correlacionar os K_p 's dos peptídeos, obtidos pelo modelo de partição em superfície, com suas hidrofobicidades calculadas *in silico*. Infelizmente o parâmetro hidrofobicidade é de difícil cálculo, pois além de existirem várias escalas de hidrofobicidade de aminoácidos, ela ainda sofre influência complexa do momento hidrofóbico (M_H) (Lewis *et al.* 2007). Dessa forma, valores calculados de hidrofobicidade *in silico* devem ser utilizados com cautela. Mesmo assim, os peptídeos ordenaram-se, do mais hidrofóbico ao mais hidrofílico, em $\text{intra 1} > \text{intra 2} > \text{penetratina} > \text{tat-peptide}$, enquanto suas afinidades intrínsecas por membrana foram por $\text{intra 1} \gg \text{penetratina} >$

intra 2 > tat-peptide. Embora penetratina não tenha apresentado estruturação mensurável no presente trabalho ao interagir com LUVs de DMPC/DMPG (2:1), alguns estudos mostram helicoidização (Persson *et al.* 2003). Tal estruturação poderia conferir uma hidrofobicidade maior do que a calculada, invertendo sua posição com intra 2 e confirmando assim uma correlação perfeita entre K_p e hidrofobicidade. É a primeira vez que os K_p 's para os peptídeos intra 1 e intra 2 são calculados, porém os valores aqui relatados para penetratina e tat-peptide, estão em parcial acordo com experimentos prévios (Persson *et al.* 2003; Ziegler *et al.* 2003). O K_p da penetratina em vesículas de DOPC/DOPG (75:25) foi de 80 M^{-1} , enquanto tat-peptide, testado em vesículas de várias composições, demonstrou K_p variável de $0,8 - 15 \text{ M}^{-1}$, dependendo do sistema. (Persson *et al.* 2003; Ziegler *et al.* 2003). Todos os estudos relatados foram feitos em tampões diferentes e com vesículas de diferente composição, o que pode explicar a discrepância entre os dados. Estudos anteriores apontam uma forte dependência do K_p do parâmetro de ajuste “carga do peptídeo” (z_p). Esse parâmetro deve ser ajustado por causa da não aditividade dos parâmetros eletrostáticos e hidrofóbicos da interação entre peptídeos e membranas, o que normalmente resulta em cargas efetivas menores que as cargas formais ($z_p < z$) (Ladokhin e White 2001). Porém, como interações previstas pelo modelo de partição em superfície são sempre dominadas por forças eletrostáticas, quanto maior a carga z_p , maior a concentração de peptídeos em membrana, c_m e assim, menor o K_p . Existem assim motivos para acreditar que o modelo de partição em superfície superestime o papel da atração eletrostática na interação de peptídeos e membranas.

Alguns peptídeos que interagem tanto com LUVs de DMPC, eletricamente neutras, quanto LUVs de DMPC/DMPG (2:1), de natureza aniônica, também puderam ser ajustados com sucesso ao modelo de partição em superfície. Esse é o caso das filoseptinas PS 1 e PS 2, sendo o último peptídeo utilizado como exemplo (figura 4.4). Este modelo calculou a afinidade intrínseca de PS 2 como $K_p = 1172 \text{ M}^{-1}$ para vesículas eletricamente neutras, e de $K_p = 38 \text{ M}^{-1}$ para vesículas aniônicas. Estes dados indicam, que, assim como para magainina 2 amida, o peptídeo PS 2 possui afinidade intrínseca maior por vesículas de DMPC do que por vesículas mistas de DMPC/DMPG (2:1) (Wieprecht *et al.* 1999). Uma explicação biofísica para essa diferença de afinidade intrínseca de PS 2 por membranas neutras e negativamente carregadas diz respeito ao

grau de enterramento das cadeias laterais do peptídeo (Wieprecht *et al.* 1999). A presença de moléculas de DMPG seria capaz de formar uma camada eletrostaticamente negativa, e sua interação com cadeias laterais de carga positiva de peptídeos membrano-ativos seria capaz de prevenir sua inserção (Wieprecht *et al.* 1999). O peptídeo PS 2 possui $pI = 7,02$ próximo ao pH do tampão, que é de 7,4, o que indica que essa molécula estará próxima a neutralidade de cargas nas condições dos ensaios (tabela 4.1). Esta molécula apresenta porém a maior hidrofobicidade relativa aos peptídeos analisados ($H = + 2,36$), tendo também grande tempo de retenção em colunas de fase reversa de cromatografia líquida de alta eficiência (Leite *et al.* 2005). Assim, os autores desse trabalho acreditam que o peptídeo em questão interage com membranas primariamente por forças hidrofóbicas, agindo de forma quase que independente das cargas de membrana. Os valores de K_p podem ser artefatos matemáticos do modelo de partição em superfície, o qual pode superestimar o papel das forças eletrostáticas (figura 4.13). Mesmo que as isotermas de interação sejam capazes de ajuste pelo modelo de partição em superfície, este não é capaz de explicar a interação de todas as moléculas estudadas.

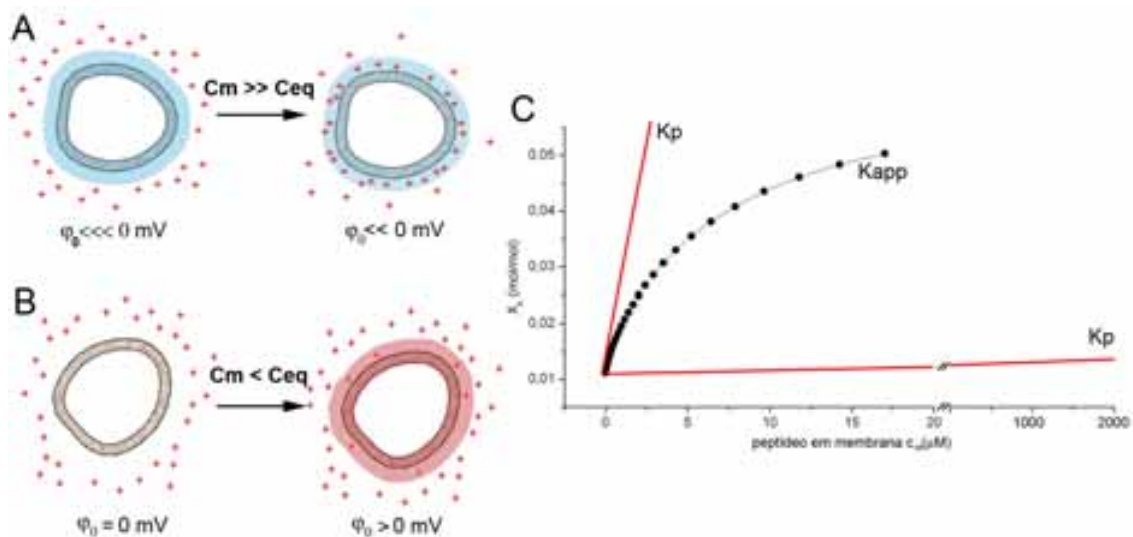


Figura 4.13. Estado de cargas no modelo de partição em superfície. **A.** LUVs negativamente carregadas (halo azul ao redor da vesícula) atraem contra-íons (peptídeos catiônicos) para uma camada imediatamente superior à suas superfícies. Assim, as vesículas passam de um potencial de membrana negativo ($\varphi_0 \lll 0 \text{ mV}$) para um potencial menos negativo ($\varphi_0 \ll 0 \text{ mV}$) com a adsorção dos peptídeos. Nessas condições, cargas positivas concentram-se em uma camada imediatamente superior a membrana aumentando sua concentração efetiva ($c_m \gg c_{eq}$). **B.** LUVs neutras não possuem cargas a priori ($\varphi_0 = 0 \text{ mV}$), porém a adsorção de peptídeos cria um potencial de membrana

positivo ($\varphi_0 > 0$ mV). Esse potencial positivo (halo em vermelho ao redor da vesícula) reduz a concentração de peptídeo na camada imediatamente superior à membrana em relação ao peptídeo livre ($c_m < c_{eq}$). C. A consequência da aplicação do modelo de partição em superfície para vesículas negativamente carregadas é um K_p numericamente baixo em relação ao K_{app} . Já vesículas eletricamente neutras induzem um K_p numericamente mais alto com relação ao K_{app} .

A titulação de DS 01 e nattererina K com vesículas fosfolipídicas aniônicas gerou isotermas de interação fora dos padrões compatíveis com uma simples adsorção de peptídeos em membranas (figura 4.10). A figura 4.10 mostra que para os peptídeos nattererina K e DS 01, as isotermas de adsorção em LUVs de DMPC/DMPG (2:1) não acompanham o padrão de estruturação em α -hélice dos peptídeos. Ambas as moléculas estruturam-se antes do equilíbrio térmico, o que indica que a adsorção dos peptídeos em membranas não são os únicos eventos termodinâmicos. Essa não é a primeira vez que comportamentos anormais são descritos para esse tipo de sistema (Wenk e Seelig 1998). A dependência das isotermas de adsorção em função da concentração de peptídeo na célula calorimétrica foi estudada para a titulação do peptídeo magainina 2 amida com SUVs de POPC/POPG (3:1) (Wenk e Seelig 1998). Os autores demonstraram que conforme a concentração de peptídeo na célula aumentava, as isotermas desviavam do previsto para a simples adsorção do peptídeo a membranas. As concentrações trabalhadas foram de $c_p^0 = 8,26 \mu\text{M}$ a $31,2 \mu\text{M}$, com comportamento incompatível a partir da concentração de $10,65 \mu\text{M}$ (Wenk e Seelig 1998). Os autores sugerem trabalhar com baixas concentrações iniciais de peptídeo, justamente para evitar padrões aberrantes. Contudo, é possível que a essência da ação de cada peptídeo seja perdida para o encaixe de suas interações em uma metodologia. Experimentos de espalhamento de luz não detectaram alteração do tamanho das vesículas ao serem tituladas com magainina 2 amida (Wenk e Seelig 1998).

A explicação para os padrões complexos de titulação para alguns peptídeos, como DS 01 e nattererina K, pode ser feita por uma analogia com alguns detergentes, como octil-beta-tioglucopiranosídeo (Wenk e Seelig 1997). Embora peptídeos não formem micelas, e assim não possuam uma concentração micelar crítica (CMC) por si, sua interação com membranas é aparentemente capaz de induzir transição bicamada/micela, dependendo da composição das membranas. Este efeito é comum a detergentes, como

octil-tioglucoσίdeo, cujo CMC é de aproximadamente 9 mM, porém sua interação com SUVs de POPC induz formação de micelas em 7,3 mM (Wenk e Seelig 1997). Micelas mistas fosfolípídeos/peptídeos não devem apresentar composição fixa, de organização definida, e devem servir de núcleo para a agregação de outros peptídeos. DS 01 possui aproximadamente 30-40% de estruturação, conforme mensurado por dicróismo circular, em solvente aquoso, o que indica que este peptídeo forma agregados, comum em dermaseptinas (figura 4.10C e D) (Feder *et al.* 2000). Assim, processos termodinâmicos alternativos à adsorção de peptídeos em membrana podem ser devidos a processos de desintegração e formação de membrana (Wenk e Seelig 1997). Durante as primeiras injeções, o calor de reação exotérmico, resultante da adsorção de peptídeos às membranas, é superimposto a um segundo evento, também exotérmico, provavelmente da formação de micelas mistas fosfolípídeos/peptídeos (figura 4.14A). Nesse regime, micelas mistas fosfolípídeos/peptídeos coexistem com peptídeos em forma monomérica. Essas estruturas mistas são capazes de interação com outras vesículas fosfolípídicas, transferindo peptídeos/fosfolípídeos para novas vesículas e induzindo sua partição de forma diferenciada dos monômeros (figura 4.14B) Este último fenômeno constitui um segundo processo termodinâmico. Após um dado número injeções, o processo de formação de estruturas mistas pára, já que a concentração de peptídeo livre não é alta o suficiente para a ruptura de vesículas, e o único processo observado é a adsorção do peptídeo em forma monomérica às membranas.

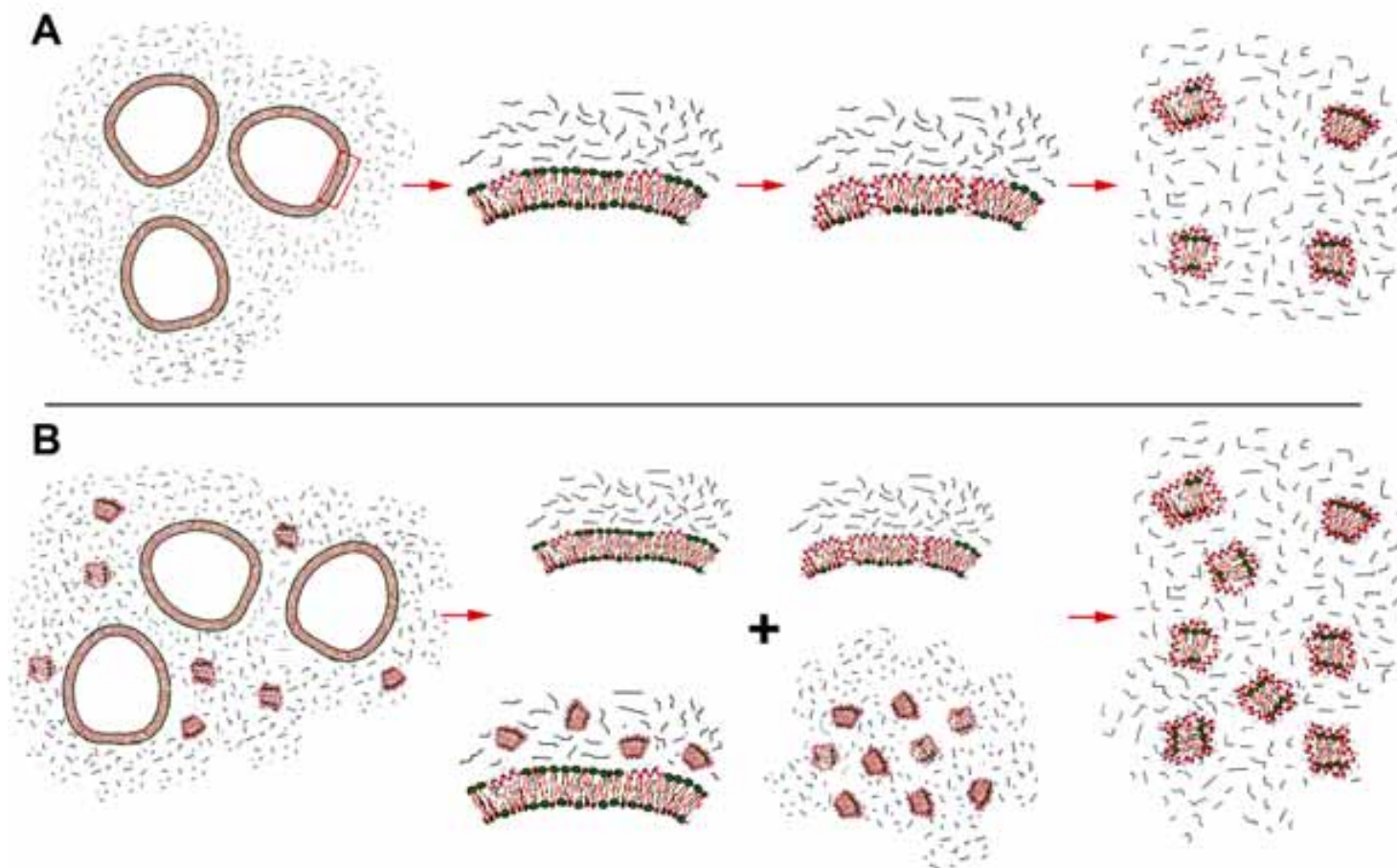


Figura 4.14. Ilustração das primeiras injeções de vesículas fosfolipídicas em peptídeos com atividade surfactante. A. Vesículas fosfolipídicas são injetadas em uma solução contendo peptídeos, os quais se concentram em uma camada superior à membrana e se inserem de maneira a formar estruturas mistas como micelas/bicamadas saturadas de peptídeos antimicrobianos, boa parte já estruturados. **B.** Vesículas subsequentemente injetadas no sistema são solubilizadas tanto por novos peptídeos quanto pelas estruturas mistas entre fosfolípeos e peptídeos, constituindo um segundo evento termodinâmico.

4.5. Referências bibliográficas

- Abdiche, Y. N. e D. G. Myszka (2004). "Probing the mechanism of drug/lipid membrane interactions using Biacore." Anal Biochem **328**(2): 233-43.
- Abrunhosa, F., S. Faria, P. Gomes, I. Tomaz, J. C. Pessoa, D. Andreu e M. Bastos (2005). "Interaction and lipid-induced conformation of two cecropin-melittin hybrid peptides depend on peptide and membrane composition." J Phys Chem B **109**(36): 17311-9.
- Allende, D. e T. J. McIntosh (2003). "Lipopolysaccharides in bacterial membranes act like cholesterol in eukaryotic plasma membranes in providing protection against melittin-induced bilayer lysis." Biochemistry **42**(4): 1101-8.
- Amiche, M., A. A. Seon, T. N. Pierre e P. Nicolas (1999). "The dermaseptin precursors: a protein family with a common preproregion and a variable C-terminal antimicrobial domain." FEBS Lett **456**(3): 352-6.
- Appelt, C., A. K. Schrey, J. A. Soderhall e P. Schmieder (2007). "Design of antimicrobial compounds based on peptide structures." Bioorg Med Chem Lett **17**(8): 2334-7.
- Araujo, M. S., R. Andreotti, M. Tiaen, V. Nunes, M. L. Oliva, M. Sampaio, O. Imura, K. Shimamoto, N. Ura e C. Sampaio (1996). "Caiman crocodilus yacare plasma kininogen detection." Immunopharmacology **32**(1-3): 82-4.
- Bagatolli, L. A. (2006). "To see or not to see: lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy." Biochim Biophys Acta **1758**(10): 1541-56.
- Barral-Netto, M., R. L. Von Sohsten, M. Teixeira, W. L. dos Santos, M. L. Pompeu, R. A. Moreira, J. T. Oliveira, B. S. Cavada, E. Falcoff e A. Barral (1996). "In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*." Acta Trop **60**(4): 237-50.
- Bechinger, B. e K. Lohner (2006). "Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides." Biochim Biophys Acta **1758**(9): 1529-39.
- Belaid, A., M. Aouni, R. Khelifa, A. Trabelsi, M. Jemmali e K. Hani (2002). "In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1." J Med Virol **66**(2): 229-34.
- Beschiaschvili, G. e J. Seelig (1990). "Peptide binding to lipid bilayers. Binding isotherms and zeta-potential of a cyclic somatostatin analogue." Biochemistry **29**(49): 10995-1000.
- Beschiaschvili, G. e J. Seelig (1991). "Peptide binding to lipid membranes. Spectroscopic studies on the insertion of a cyclic somatostatin analog into phospholipid bilayers." Biochim Biophys Acta **1061**(1): 78-84.
- Blom, T. S., M. Koivusalo, E. Kuismanen, R. Kostianen, P. Somerharju e E. Ikonen (2001). "Mass spectrometric analysis reveals an increase in plasma membrane polyunsaturated phospholipid species upon cellular cholesterol loading." Biochemistry **40**(48): 14635-44.
- Bobin-Dubreux, S., M. E. Reverdy, C. Nervi, M. Rougier, A. Bolmstrom, F. Vandenesch e J. Etienne (2001). "Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate

- Staphylococcus aureus susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative." Antimicrob Agents Chemother **45**(1): 349-52.
- Bockaert, J. e J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." EMBO J **18**(7): 1723-9.
- Boman, H. G. (1995). "Peptide antibiotics and their role in innate immunity." Annu Rev Immunol **13**: 61-92.
- Braff, M. H. e R. L. Gallo (2006). "Antimicrobial peptides: an essential component of the skin defensive barrier." Curr Top Microbiol Immunol **306**: 91-110.
- Brand, G. D., J. R. Leite, S. M. de Sa Mandel, D. A. Mesquita, L. P. Silva, M. V. Prates, E. A. Barbosa, F. Vinecky, G. R. Martins, J. H. Galasso, S. A. Kuckelhaus, R. N. Sampaio, J. R. Furtado, Jr., A. C. Andrade e C. Bloch, Jr. (2006). "Novel dermaseptins from Phyllomedusa hypochondrialis (Amphibia)." Biochem Biophys Res Commun **347**(3): 739-46.
- Brand, G. D., J. R. Leite, L. P. Silva, S. Albuquerque, M. V. Prates, R. B. Azevedo, V. Carregaro, J. S. Silva, V. C. Sa, R. A. Brandao e C. Bloch, Jr. (2002). "Dermaseptins from Phyllomedusa oreades and Phyllomedusa distincta. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells." J Biol Chem **277**(51): 49332-40.
- Brasseur, R. (1991). "Differentiation of lipid-associating helices by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations." J Biol Chem **266**(24): 16120-7.
- Breukink, E., P. Ganz, B. de Kruijff e J. Seelig (2000). "Binding of Nisin Z to bilayer vesicles as determined with isothermal titration calorimetry." Biochemistry **39**(33): 10247-54.
- Bringezu, F., S. Wen, S. Dante, T. Hauss, M. Majerowicz e A. Waring (2007). "The insertion of the antimicrobial peptide dicynthaurin monomer in model membranes: thermodynamics and structural characterization." Biochemistry **46**(19): 5678-86.
- Brogden, K. A. (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" Nat Rev Microbiol **3**(3): 238-50.
- Bulet, P., S. Cociancich, J. L. Dimarcq, J. Lambert, J. M. Reichhart, D. Hoffmann, C. Hetru e J. A. Hoffmann (1991). "Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family." J Biol Chem **266**(36): 24520-5.
- Campbell, D. J. (2000). "Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides." Braz J Med Biol Res **33**(6): 665-77.
- Castiglione-Morelli, M. A., P. Cristinziano, A. Pepe e P. A. Temussi (2005). "Conformation-activity relationship of a novel peptide antibiotic: structural characterization of dermaseptin DS 01 in media that mimic the membrane environment." Biopolymers **80**(5): 688-96.
- Chaurand, P., S. A. Schwartz, D. Billheimer, B. J. Xu, A. Crecelius e R. M. Caprioli (2004). "Integrating histology and imaging mass spectrometry." Anal Chem **76**(4): 1145-55.
- Chen, F. Y., M. T. Lee e H. W. Huang (2002). "Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin." Biophys J **82**(2): 908-14.

- Chen, F. Y., M. T. Lee e H. W. Huang (2003). "Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation." Biophys J **84**(6): 3751-8.
- Chen, R., Y. V. Mukhin, M. N. Garnovskaya, T. E. Thielen, Y. Iijima, C. Huang, J. R. Raymond, M. E. Ullian e R. V. Paul (2000). "A functional angiotensin II receptor-GFP fusion protein: evidence for agonist-dependent nuclear translocation." Am J Physiol Renal Physiol **279**(3): F440-8.
- Chen, T., D. F. Orr, A. J. Bjourson, S. McClean, M. O'Rourke, D. G. Hirst, P. Rao e C. Shaw (2002). "Novel bradykinins and their precursor cDNAs from European yellow-bellied toad (*Bombina variegata*) skin." Eur J Biochem **269**(18): 4693-700.
- Chen, T. e C. Shaw (2003). "Cloning of the (Thr6)-phyllokinin precursor from *Phyllomedusa sauvagei* skin confirms a non-consensus tyrosine O-sulfation motif." Peptides **24**(8): 1123-30.
- Chen, T., B. Walker, M. Zhou e C. Shaw (2005). "Dermatoxin and phylloxin from the waxy monkey frog, *Phyllomedusa sauvagei*: cloning of precursor cDNAs and structural characterization from lyophilized skin secretion." Regul Pept **129**(1-3): 103-8.
- Chinchar, V. G., L. Bryan, U. Silphadaung, E. Noga, D. Wade e L. Rollins-Smith (2004). "Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides." Virology **323**(2): 268-75.
- Conlon, J. M. (1999). "Bradykinin and its receptors in non-mammalian vertebrates." Regul Pept **79**(2-3): 71-81.
- Couture, R., M. Harrisson, R. M. Vianna e F. Cloutier (2001). "Kinin receptors in pain and inflammation." Eur J Pharmacol **429**(1-3): 161-76.
- Daly, J. W., J. Caceres, R. W. Moni, F. Gusovsky, M. Moos, Jr., K. B. Seamon, K. Milton e C. W. Myers (1992). "Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10960-3.
- Dathe, M. e T. Wieprecht (1999). "Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells." Biochim Biophys Acta **1462**(1-2): 71-87.
- Dathe, M., T. Wieprecht, H. Nikolenko, L. Handel, W. L. Maloy, D. L. MacDonald, M. Beyermann e M. Bienert (1997). "Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides." FEBS Lett **403**(2): 208-12.
- De Lucca, A. J., J. M. Bland, T. J. Jacks, C. Grimm e T. J. Walsh (1998). "Fungicidal and binding properties of the natural peptides cecropin B and dermaseptin." Med Mycol **36**(5): 291-8.
- Delorenzi, J. C., L. Freire-de-Lima, C. R. Gattass, D. de Andrade Costa, L. He, M. E. Kuehne e E. M. Saraiva (2002). "In vitro activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*." Antimicrob Agents Chemother **46**(7): 2111-5.
- Dennison, S. R., J. Wallace, F. Harris e D. A. Phoenix (2005). "Amphiphilic alpha-helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships." Protein Pept Lett **12**(1): 31-9.

- Duda, T. F., Jr., D. Vanhoye e P. Nicolas (2002). "Roles of diversifying selection and coordinated evolution in the evolution of amphibian antimicrobial peptides." Mol Biol Evol **19**(6): 858-64.
- Duner, T., J. M. Conlon, J. P. Kukkonen, K. E. Akerman, Y. L. Yan, J. H. Postlethwait e D. Larhammar (2002). "Cloning, structural characterization and functional expression of a zebrafish bradykinin B2-related receptor." Biochem J **364**(Pt 3): 817-24.
- Eisenberg, D. (1984). "Three-dimensional structure of membrane and surface proteins." Annu Rev Biochem **53**: 595-623.
- Eisenberg, M., T. Gresalfi, T. Riccio e S. McLaughlin (1979). "Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids." Biochemistry **18**(23): 5213-23.
- Eband, R. F., N. Umezawa, E. A. Porter, S. H. Gellman e R. M. Eband (2003). "Interactions of the antimicrobial beta-peptide beta-17 with phospholipid vesicles differ from membrane interactions of magainins." Eur J Biochem **270**(6): 1240-8.
- Eband, R. M. (2007). "Detecting the presence of membrane domains using DSC." Biophys Chem **126**(1-3): 197-200.
- Eband, R. M. e J. M. Sturtevant (1981). "A calorimetric study of peptide-phospholipid interactions: the glucagon-dimyristoylphosphatidylcholine complex." Biochemistry **20**(16): 4603-6.
- Ersparmer, V., P. Melchiorri, G. Falconieri Ersparmer, P. C. Montecucchi e R. de Castiglione (1985). "Phyllomedusa skin: a huge factory and store-house of a variety of active peptides." Peptides **6 Suppl 3**: 7-12.
- Escobar, P., V. Yardley e S. L. Croft (2001). "Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice." Antimicrob Agents Chemother **45**(6): 1872-5.
- Feder, R., A. Dagan e A. Mor (2000). "Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity." J Biol Chem **275**(6): 4230-8.
- Fernandez-Vidal, M., S. Jayasinghe, A. S. Ladokhin e S. H. White (2007). "Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity." J Mol Biol **370**(3): 459-70.
- Fernandez, J. H., G. Neshich e A. C. Camargo (2004). "Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs." Genet Mol Res **3**(4): 554-63.
- Fischer, R., M. Fotin-Mleczek, H. Hufnagel e R. Brock (2005). "Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides." Chembiochem **6**(12): 2126-42.
- Fleury, Y., V. Vouille, L. Beven, M. Amiche, H. Wroblewski, A. Delfour e P. Nicolas (1998). "Synthesis, antimicrobial activity and gene structure of a novel member of the dermaseptin B family." Biochim Biophys Acta **1396**(2): 228-36.
- Fournier, I., J. Barwicz e P. Tancrede (1998). "The structuring effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a differential scanning calorimetry study." Biochim Biophys Acta **1373**(1): 76-86.

- Gaidukov, L., A. Fish e A. Mor (2003). "Analysis of membrane-binding properties of dermaseptin analogues: relationships between binding and cytotoxicity." Biochemistry **42**(44): 12866-74.
- Galli, G. L., N. Skovgaard, A. S. Abe, E. W. Taylor, J. M. Conlon e T. Wang (2005). "Cardiovascular actions of rattlesnake bradykinin ([Val1,Thr6]bradykinin) in the anesthetized South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**(2): R456-65.
- Ghosh, J. K., D. Shaool, P. Guillaud, L. Ciceron, D. Mazier, I. Kustanovich, Y. Shai e A. Mor (1997). "Selective cytotoxicity of dermaseptin S3 toward intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and the underlying molecular basis." J Biol Chem **272**(50): 31609-16.
- Gilson, M. K., J. A. Given, B. L. Bush e J. A. McCammon (1997). "The statistical-thermodynamic basis for computation of binding affinities: a critical review." Biophys J **72**(3): 1047-69.
- Hayashi, M. A. e A. C. Camargo (2005). "The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme." Toxicon **45**(8): 1163-70.
- Henriques, S. T., M. N. Melo e M. A. Castanho (2006). "Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they?" Biochem J **399**(1): 1-7.
- Hernandez, C., A. Mor, F. Dagger, P. Nicolas, A. Hernandez, E. L. Benedetti e I. Dunia (1992). "Functional and structural damage in *Leishmania mexicana* exposed to the cationic peptide dermaseptin." Eur J Cell Biol **59**(2): 414-24.
- Hildebrand, P. W., R. Preissner e C. Frommel (2004). "Structural features of transmembrane helices." FEBS Lett **559**(1-3): 145-51.
- Hilpert, K., M. R. Elliott, R. Volkmer-Engert, P. Henklein, O. Donini, Q. Zhou, D. F. Winkler e R. E. Hancock (2006). "Sequence requirements and an optimization strategy for short antimicrobial peptides." Chem Biol **13**(10): 1101-7.
- Hitz, T., R. Iten, J. Gardiner, K. Namoto, P. Walde e D. Seebach (2006). "Interaction of alpha-and beta-oligoarginine-acids and amides with anionic lipid vesicles: a mechanistic and thermodynamic study." Biochemistry **45**(18): 5817-29.
- Huang, C. e S. Li (1999). "Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids." Biochim Biophys Acta **1422**(3): 273-307.
- Huang, H. W. (2006). "Molecular mechanism of antimicrobial peptides: the origin of cooperativity." Biochim Biophys Acta **1758**(9): 1292-302.
- Jacobson, K. e C. Dietrich (1999). "Looking at lipid rafts?" Trends Cell Biol **9**(3): 87-91.
- Jenssen, H., P. Hamill e R. E. Hancock (2006). "Peptide antimicrobial agents." Clin Microbiol Rev **19**(3): 491-511.
- Kanakubo, A. e M. Isobe (2004). "Differentiation of sulfate and phosphate by H/D exchange mass spectrometry: application to isoflavone." J Mass Spectrom **39**(11): 1260-7.
- Kelly, S. M., T. J. Jess e N. C. Price (2005). "How to study proteins by circular dichroism." Biochim Biophys Acta **1751**(2): 119-39.
- Kobayashi, S., A. Chikushi, S. Tougu, Y. Imura, M. Nishida, Y. Yano e K. Matsuzaki (2004). "Membrane translocation mechanism of the antimicrobial peptide buforin 2." Biochemistry **43**(49): 15610-6.

- Kustanovich, I., D. E. Shalev, M. Mikhlín, L. Gaidukov e A. Mor (2002). "Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial dermaseptin S4 derivatives." *J Biol Chem* **277**(19): 16941-51.
- Kwon, M. Y., S. Y. Hong e K. H. Lee (1998). "Structure-activity analysis of brevinin 1E amide, an antimicrobial peptide from *Rana esculenta*." *Biochim Biophys Acta* **1387**(1-2): 239-48.
- Lacombe, C., C. Cifuentes-Díaz, I. Dunia, M. Auber-Thomay, P. Nicolas e M. Amiche (2000). "Peptide secretion in the cutaneous glands of South American tree frog *Phyllomedusa bicolor*: an ultrastructural study." *Eur J Cell Biol* **79**(9): 631-41.
- Ladokhin, A. S. e S. H. White (2001). "Protein chemistry at membrane interfaces: non-additivity of electrostatic and hydrophobic interactions." *J Mol Biol* **309**(3): 543-52.
- Lambros, M. P. e Y. E. Rahman (2004). "Effects of cyclosporin A on model lipid membranes." *Chem Phys Lipids* **131**(1): 63-9.
- Lee, M. T., F. Y. Chen e H. W. Huang (2004). "Energetics of pore formation induced by membrane active peptides." *Biochemistry* **43**(12): 3590-9.
- Leite, J. R., G. D. Brand, L. P. Silva, S. A. Kuckelhaus, W. R. Bento, A. L. Araujo, G. R. Martins, A. M. Lazzari e C. Bloch, Jr. (2007). "Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*.
- Leite, J. R., L. P. Silva, M. I. Rodrigues, M. V. Prates, G. D. Brand, B. M. Lacava, R. B. Azevedo, A. L. Bocca, S. Albuquerque e C. Bloch, Jr. (2005). "Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus." *Peptides* **26**(4): 565-73.
- Lequin, O., F. Bruston, O. Convert, G. Chassaing e P. Nicolas (2003). "Helical structure of dermaseptin B2 in a membrane-mimetic environment." *Biochemistry* **42**(34): 10311-23.
- Lequin, O., A. Ladram, L. Chabbert, F. Bruston, O. Convert, D. Vanhoye, G. Chassaing, P. Nicolas e M. Amiche (2006). "Dermaseptin S9, an alpha-helical antimicrobial peptide with a hydrophobic core and cationic termini." *Biochemistry* **45**(2): 468-80.
- Lewis, R. N., F. Liu, R. Krivanek, P. Rybar, T. Hianik, C. R. Flach, R. Mendelsohn, Y. Chen, C. T. Mant, R. S. Hodges e R. N. McElhaney (2007). "Studies of the minimum hydrophobicity of alpha-helical peptides required to maintain a stable transmembrane association with phospholipid bilayer membranes." *Biochemistry* **46**(4): 1042-54.
- Li, Z., S. M. Secor, V. A. Lance, M. A. Masini, M. Vallarino e J. M. Conlon (1998). "Characterization of bradykinin-related peptides generated in the plasma of six sarcopterygian species (African lungfish, amphiuma, coachwhip, bullsnake, gila monster, and Gray's monitor)." *Gen Comp Endocrinol* **112**(1): 108-14.
- Lorin, C., H. Saidi, A. Belaid, A. Zairi, F. Baleux, H. Hocini, L. Belec, K. Hani e F. Tangy (2005). "The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro." *Virology* **334**(2): 264-75.
- Mangoni, M. L., R. Miele, T. G. Renda, D. Barra e M. Simmaco (2001). "The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms." *FASEB J* **15**(8): 1431-2.

- Mann, M. e O. N. Jensen (2003). "Proteomic analysis of post-translational modifications." Nat Biotechnol **21**(3): 255-61.
- Mannock, D. A., R. N. Lewis e R. N. McElhaney (2006). "Comparative calorimetric and spectroscopic studies of the effects of lanosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes." Biophys J **91**(9): 3327-40.
- Matsuzaki, K., A. Nakamura, O. Murase, K. Sugishita, N. Fujii e K. Miyajima (1997). "Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge." Biochemistry **36**(8): 2104-11.
- Matsuzaki, K., K. Sugishita, N. Ishibe, M. Ueha, S. Nakata, K. Miyajima e R. M. Epand (1998). "Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2." Biochemistry **37**(34): 11856-63.
- McElhaney, R. N. (1986). "Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems." Biochim Biophys Acta **864**(3-4): 361-421.
- McLaughlin, S. (1989). "The electrostatic properties of membranes." Annu Rev Biophys Chem **18**: 113-36.
- Mee, R. P., T. R. Auton e P. J. Morgan (1997). "Design of active analogues of a 15-residue peptide using D-optimal design, QSAR and a combinatorial search algorithm." J Pept Res **49**(1): 89-102.
- Mikus, J., M. Harkenthal, D. Steverding e J. Reichling (2000). "In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*." Planta Med **66**(4): 366-8.
- Mor, A., M. Amiche e P. Nicolas (1994). "Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin." Biochemistry **33**(21): 6642-50.
- Mor, A., K. Hani e P. Nicolas (1994). "The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms." J Biol Chem **269**(50): 31635-41.
- Mor, A., V. H. Nguyen, A. Delfour, D. Migliore-Samour e P. Nicolas (1991). "Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin." Biochemistry **30**(36): 8824-30.
- Mor, A. e P. Nicolas (1994). "The NH₂-terminal alpha-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity." J Biol Chem **269**(3): 1934-9.
- Myszka, D. G. e T. A. Morton (1998). "CLAMP: a biosensor kinetic data analysis program." Trends Biochem Sci **23**(4): 149-50.
- Nagalla, S. R., B. J. Barry e E. R. Spindel (1994). "Cloning of complementary DNAs encoding the amphibian bombesin-like peptides Phe₈ and Leu₈ phyllolitorin from *Phyllomedusa sauvagei*: potential role of U to C RNA editing in generating neuropeptide diversity." Mol Endocrinol **8**(8): 943-51.
- Nicolas, P., D. Vanhoye e M. Amiche (2003). "Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides." Peptides **24**(11): 1669-80.
- Noinville, S., F. Bruston, C. El Amri, D. Baron e P. Nicolas (2003). "Conformation, orientation, and adsorption kinetics of dermaseptin B2 onto synthetic supports at aqueous/solid interface." Biophys J **85**(2): 1196-206.

- Ohmori, N., T. Niidome, T. Hatakeyama, H. Mihara e H. Aoyagi (1998). "Interaction of alpha-helical peptides with phospholipid membrane: effects of chain length and hydrophobicity of peptides." J Pept Res **51**(2): 103-9.
- Palm, C., S. Netzereab e M. Hallbrink (2006). "Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects." Peptides **27**(7): 1710-6.
- Papahadjopoulos, D., M. Moscarello, E. H. Eylar e T. Isac (1975). "Effects of proteins on thermotropic phase transitions of phospholipid membranes." Biochim Biophys Acta **401**(3): 317-35.
- Papo, N. e Y. Shai (2003). "Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes?" Peptides **24**(11): 1693-703.
- Papo, N. e Y. Shai (2004). "Effect of drastic sequence alteration and D-amino acid incorporation on the membrane binding behavior of lytic peptides." Biochemistry **43**(21): 6393-403.
- Pasenkiewicz-Gierula, M., Y. Takaoka, H. Miyagawa, K. Kitamura e A. Kusumi (1999). "Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: A molecular dynamics simulation study." Biophys J **76**(3): 1228-40.
- Patrzykat, A., C. L. Friedrich, L. Zhang, V. Mendoza e R. E. Hancock (2002). "Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in Escherichia coli." Antimicrob Agents Chemother **46**(3): 605-14.
- Persson, D., P. E. Thoren, M. Herner, P. Lincoln e B. Norden (2003). "Application of a novel analysis to measure the binding of the membrane-translocating peptide penetratin to negatively charged liposomes." Biochemistry **42**(2): 421-9.
- Persson, D., P. E. Thoren, P. Lincoln e B. Norden (2004). "Vesicle membrane interactions of penetratin analogues." Biochemistry **43**(34): 11045-55.
- Pierre, T. N., A. A. Seon, M. Amiche e P. Nicolas (2000). "Phylloxin, a novel peptide antibiotic of the dermaseptin family of antimicrobial/opioid peptide precursors." Eur J Biochem **267**(2): 370-8.
- Plock, A., W. Sokolowska-Kohler e W. Presber (2001). "Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on Leishmania Spp." Exp Parasitol **97**(3): 141-53.
- Pouny, Y., D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas e Y. Shai (1992). "Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes." Biochemistry **31**(49): 12416-23.
- Prates, M. V., M. L. Sforca, W. C. Regis, J. R. Leite, L. P. Silva, T. A. Pertinhez, A. L. Araujo, R. B. Azevedo, A. Spisni e C. Bloch, Jr. (2004). "The NMR-derived solution structure of a new cationic antimicrobial peptide from the skin secretion of the anuran Hyla punctata." J Biol Chem **279**(13): 13018-26.
- Prenner, E. J., R. N. Lewis, L. H. Kondejewski, R. S. Hodges e R. N. McElhaney (1999). "Differential scanning calorimetric study of the effect of the antimicrobial peptide gramicidin S on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol lipid bilayer membranes." Biochim Biophys Acta **1417**(2): 211-23.

- Radziszewsky, I. S., S. Rotem, D. Bourdetsky, S. Navon-Venezia, Y. Carmeli e A. Mor (2007). "Improved antimicrobial peptides based on acyl-lysine oligomers." Nat Biotechnol **25**(6): 657-9.
- Regoli, D. e J. Barabe (1980). "Pharmacology of bradykinin and related kinins." Pharmacol Rev **32**(1): 1-46.
- Rotem, S., I. Radziszewsky e A. Mor (2006). "Physicochemical properties that enhance discriminative antibacterial activity of short dermaseptin derivatives." Antimicrob Agents Chemother **50**(8): 2666-72.
- Santos, E. L., J. B. Pesquero, L. Oliveira, A. C. Paiva e C. M. Costa-Neto (2004). "Mutagenesis of the AT1 receptor reveals different binding modes of angiotensin II and [Sar1]-angiotensin II." Regul Pept **119**(3): 183-8.
- Scholtz, J. M. e R. L. Baldwin (1992). "The mechanism of alpha-helix formation by peptides." Annu Rev Biophys Biomol Struct **21**: 95-118.
- Schote, U., P. Ganz, A. Fahr e J. Seelig (2002). "Interactions of cyclosporines with lipid membranes as studied by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy and high-sensitivity titration calorimetry." J Pharm Sci **91**(3): 856-67.
- Schroeder, C., H. Beug e W. Muller-Esterl (1997). "Cloning and functional characterization of the ornithokinin receptor. Recognition of the major kinin receptor antagonist, HOE140, as a full agonist." J Biol Chem **272**(19): 12475-81.
- Schwartz, S. A., M. L. Reyzer e R. M. Caprioli (2003). "Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation." J Mass Spectrom **38**(7): 699-708.
- Seelig, J. (1997). "Titration calorimetry of lipid-peptide interactions." Biochim Biophys Acta **1331**(1): 103-16.
- Seelig, J. (2004). "Thermodynamics of lipid-peptide interactions." Biochim Biophys Acta **1666**(1-2): 40-50.
- Seelig, J., S. Nebel, P. Ganz e C. Bruns (1993). "Electrostatic and nonpolar peptide-membrane interactions. Lipid binding and functional properties of somatostatin analogues of charge $z = +1$ to $z = +3$." Biochemistry **32**(37): 9714-21.
- Seto, G. W., S. Marwaha, D. M. Kobewka, R. N. Lewis, F. Separovic e R. N. McElhaney (2007). "Interactions of the Australian tree frog antimicrobial peptides aurein 1.2, citropin 1.1 and maculatin 1.1 with lipid model membranes: Differential scanning calorimetric and Fourier transform infrared spectroscopic studies." Biochim Biophys Acta.
- Shai, Y. (2002). "Mode of action of membrane active antimicrobial peptides." Biopolymers **66**(4): 236-48.
- Shalev, D. E., A. Mor e I. Kustanovich (2002). "Structural consequences of carboxyamidation of dermaseptin S3." Biochemistry **41**(23): 7312-7.
- Silva, L. P., J. R. Leite, G. D. Brand, W. B. Regis, A. C. Tedesco, R. B. Azevedo, S. M. Freitas e C. Bloch, Jr. (2007). "Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Liposomes fusion and/or lysis investigated by fluorescence and atomic force microscopy." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.
- Simons, K. e E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-72.

- Singer, S. J. e G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-31.
- Steen, H., B. Kuster, M. Fernandez, A. Pandey e M. Mann (2001). "Detection of tyrosine phosphorylated peptides by precursor ion scanning quadrupole TOF mass spectrometry in positive ion mode." Anal Chem **73**(7): 1440-8.
- Steen, H. e M. Mann (2002). "Analysis of bromotryptophan and hydroxyproline modifications by high-resolution, high-accuracy precursor ion scanning utilizing fragment ions with mass-deficient mass tags." Anal Chem **74**(24): 6230-6.
- Sturtevant, J. M. (1982). "A scanning calorimetric study of small molecule-lipid bilayer mixtures." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(13): 3963-7.
- Thoren, P. E., D. Persson, P. Lincoln e B. Norden (2005). "Membrane destabilizing properties of cell-penetrating peptides." Biophys Chem **114**(2-3): 169-79.
- Tossi, A., L. Sandri e A. Giangaspero (2000). "Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides." Biopolymers **55**(1): 4-30.
- Uematsu, N. e K. Matsuzaki (2000). "Polar angle as a determinant of amphipathic alpha-helix-lipid interactions: a model peptide study." Biophys J **79**(4): 2075-83.
- Vanhoye, D., F. Bruston, P. Nicolas e M. Amiche (2003). "Antimicrobial peptides from hylid and ranin frogs originated from a 150-million-year-old ancestral precursor with a conserved signal peptide but a hypermutable antimicrobial domain." Eur J Biochem **270**(9): 2068-81.
- Wenk, M. R. e J. Seelig (1997). "Interaction of octyl-beta-thioglucopyranoside with lipid membranes." Biophys J **73**(5): 2565-74.
- Wenk, M. R. e J. Seelig (1998). "Magainin 2 amide interaction with lipid membranes: calorimetric detection of peptide binding and pore formation." Biochemistry **37**(11): 3909-16.
- White, S. H. e W. C. Wimley (1998). "Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces." Biochim Biophys Acta **1376**(3): 339-52.
- White, S. H. e W. C. Wimley (1999). "Membrane protein folding and stability: physical principles." Annu Rev Biophys Biomol Struct **28**: 319-65.
- Wieprecht, T., O. Apostolov, M. Beyermann e J. Seelig (1999). "Thermodynamics of the alpha-helix-coil transition of amphipathic peptides in a membrane environment: implications for the peptide-membrane binding equilibrium." J Mol Biol **294**(3): 785-94.
- Wieprecht, T., O. Apostolov, M. Beyermann e J. Seelig (2000). "Membrane binding and pore formation of the antibacterial peptide PGLa: thermodynamic and mechanistic aspects." Biochemistry **39**(2): 442-52.
- Wieprecht, T., O. Apostolov e J. Seelig (2000). "Binding of the antibacterial peptide magainin 2 amide to small and large unilamellar vesicles." Biophys Chem **85**(2-3): 187-98.
- Wieprecht, T., M. Beyermann e J. Seelig (1999). "Binding of antibacterial magainin peptides to electrically neutral membranes: thermodynamics and structure." Biochemistry **38**(32): 10377-87.
- Wieprecht, T., M. Dathe, M. Beyermann, E. Krause, W. L. Maloy, D. L. MacDonald e M. Bienert (1997). "Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes." Biochemistry **36**(20): 6124-32.

- Yeaman, M. R. e N. Y. Yount (2003). "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance." Pharmacol Rev **55**(1): 27-55.
- Zasloff, M. (1987). "Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(15): 5449-53.
- Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature **415**(6870): 389-95.
- Zhang, J., T. Hadlock, A. Gent e G. R. Strichartz (2007). "Tetracaine-membrane interactions: effects of lipid composition and phase on drug partitioning, location, and ionization." Biophys J **92**(11): 3988-4001.
- Ziegler, A., X. L. Blatter, A. Seelig e J. Seelig (2003). "Protein transduction domains of HIV-1 and SIV TAT interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis." Biochemistry **42**(30): 9185-94.

Conclusões e perspectivas

Existe certa assimetria entre os capítulos desta tese. Os dois primeiros trataram da prospecção de moléculas bioativas da secreção cutânea do anfíbio *Phyllomedusa hypochondrialis*.

Mais especificamente, o capítulo 1 descreveu todos os análogos de peptídeos relacionados à bradicinina passíveis de seqüenciamento pelos métodos proteômicos corriqueiramente utilizados no laboratório de espectrometria de massa da EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia. A identificação e isolamento de 18 moléculas da mesma família, assim como a determinação de suas modificações pós-traducionais, demonstraram o poder analítico de tais técnicas e reforçaram a validade de secreções de anfíbios como modelo de misturas protéicas complexas. Além disso, a geração de imagens por meio de espectrometria de massa foi uma metodologia inovadora. Porém, este estudo não se limitou a prover contribuição metodológica. Este foi o primeiro trabalho a demonstrar a variabilidade real de seqüências protéicas de uma mesma família em anfíbios. A comparação destes análogos com as principais cininas plasmáticas de diferentes vertebrados indicou que *P. hypochondrialis* possui em sua secreção cutânea cininas como parte de um sistema de defesa químico específico para cada grupo de animais. Porém, a completa relevância biológica destes dados só será desvendada ao avaliar-se a afinidade e especificidade de cada um dos análogos descritos por diferentes receptores de bradicinina.

O capítulo 2 tem temática semelhante ao anterior, e discorreu sobre novas dermaseptinas encontradas na pele de *P. hypochondrialis*, utilizando as mesmas técnicas do capítulo anterior. A relevância biológica deste trabalho está na identificação de moléculas que possuem potencial como molde para agentes antimicrobianos. Enquanto o desenho racional de moléculas com atividade antimicrobiana não for possível, a descrição de novos peptídeos permitirá uma melhor compreensão das propriedades que os definem.

Enquanto os capítulos 1 e 2 foram são mais descritivos e tiveram sua força na exatidão das técnicas analíticas para estudos proteômicos, os capítulos 3 e 4 são tanto descritivos como investigativos. No capítulo 3 fica claro que a falta de integração entre conceitos e metodologias para o estudo de moléculas membrano-ativas gera um cenário

fragmentado. Resulta disto a incapacidade de prever atividade de moléculas tendo como informação somente seqüências peptídicas

O capítulo 3 teve como pretensão dar um pequeno salto conceitual e criar um sistema capaz de categorizar peptídeos membrano-ativos de acordo com suas atividades. A análise de moléculas por este sistema foi capaz de distinguir diferentes grupos funcionais para 17 peptídeos de estrutura primária distinta, correlacionando-os com suas propriedades físico-químicas. Também foram possíveis descobertas sobre sua forma de interação com membranas. Acredita-se que peptídeos com diferentes estruturas primárias, porém com propriedades físico-químicas compatíveis, também compartilharão seus aspectos funcionais. A validade desta aproximação requer a expansão do modelo a um número ainda maior de peptídeos membrano-ativos, permitindo a solidificação dos conceitos apresentados. Também faz-se necessário testar a capacidade preditiva da metodologia por meio da síntese de moléculas *de novo* e verificação de seu modo de ação.

O capítulo 4 tratou da termodinâmica de adsorção de peptídeos em membranas como forma de melhor compreensão das forças envolvidas neste processo. Nele, foi introduzido o modelo de partição em superfície, o qual é capaz de distinguir entre as interações primariamente eletrostáticas e as interações hidrofóbicas. Foram sujeitos à esta análise os mesmos 17 peptídeos do capítulo 3, e ficou clara a inadequação do modelo para descrever interações que não são dominadas por componentes eletrostáticos. Este capítulo apontou novamente para a existência de sub-grupos de peptídeos com diferentes graus e formas de interação com membranas. Os dados apresentados neste capítulo demonstram a necessidade de expansão do modelo de partição em superfície, com a consideração de fenômenos outros à simples adsorção de peptídeos em membranas.

Assim, esta tese demonstrou que o avanço da ciência cria ferramentas que permitem o estudo de vários sistemas. Estas ferramentas são úteis tanto à prospecção de novas moléculas quanto à análise de suas atividades. Porém, a aplicação de técnicas só descreve os sistemas em estudo de acordo com os paradigmas vigentes, o que nem sempre resulta em real progresso científico.

Anexo I

Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis* (2007). Brand, G.D., Krause, F.C., Silva, L.P., Leite, J.R., Melo, J.A., Prates, M.V., Pesquero, J.B., Santos, E.L., Nakaie, C.R., Costa-Neto, C.M., Bloch, C Jr. *Peptides* 27(9):2137-46

Anexo II

Brand, G.D., Leite, J.R., de Sá Mandel, S.M., Mesquita, D.A., Silva, L.P., Prates, M.V., Barbosa, E.A., Vinecky, F., Martins, G.R., Galasso, J.H., Kuckelhaus, S.A., Sampaio, R.N., Furtado J.R. Jr, Andrade, A.C., Bloch C Jr. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). *Biochem Biophys Res Commun* 347(3):739-46.

Anexo III

Trabalhos em co-autoria