JOSÉ CARLOS BOZELLI JUNIOR

**Interação do peptídeo de defesa do hospedeiro tritrpticina
(TRP3) e seus análogos com membranas modelo:
Efeitos na estrutura e dinâmica da membrana**

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.*

Orientadora: Prof^a Dr^a. Shirley Schreier

São Paulo 2015

JOSÉ CARLOS BOZELLI JUNIOR

Interação do peptídeo de defesa do hospedeiro tritricina (TRP3) e seus análogos com membranas modelo: efeitos na estrutura e dinâmica da membrana

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.*

Aprovado em / /

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus pais, ***José Carlos e Fátima.***

AGRADECIMENTOS

À **Fernanda,**

Ao **Otto,**

Ao **José Carlos,**

À **Fátima,**

À **Maíra**

Ao **Virgílio,**

Aos **meus familiares,**

Aos **meus amigos,**

Aos **colegas do LBE,**

À **Denise,**

Ao **Gustavo,**

Aos **alunos e Professores da Universidade de Havana (Cuba),**

Aos **funcionários do IQ,**

Ao **Prof. Bayardo B. Torres,**

À **Prof^a Iolanda M. Cuccovia,**

Ao **Prof. Hernan Chaimovich,**

Ao **Prof. Richard M. Epand,**

À **Raquel F. Epand,**

À **Professor Shirley Schreier,**

Às agências de fomento **CNPq e CAPES**

À **FAPESP** por ter financiando o meu projeto de pesquisa (2011/50506-2) e estágio no exterior (BEPE2013/19491-4)

Peço sua licença para algumas sentenças em inglês.

Nowadays science became a matter of metrics. In order to evaluate a scientist, people usually rely on h-index, impact factors, number of publications, number of citations, and so on. All these intend to summarize in numbers what a scientist should be or have been doing. However, what is not a constant of the math equations is that the training to become a scientist needs the once called MENTORS. According to the dictionary a mentor is: (i) a wise and trusted counselor or teacher; (ii) an adviser, guide, master, preceptor; (iii) tutor, coach. Unfortunately, mentors are old fashioned. I feel grateful to say that I had a MENTOR.

Thank you Professor Shirley Schreier!

RESUMO

Bozelli Jr, J.C. Interação do peptídeo de defesa do hospedeiro tritripticina (TRP3) e seus análogos com membranas modelo: efeitos na estrutura e dinâmica da membrana. 2015, 174p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Tritripticina (TRP3) é um peptídeo antimicrobiano com 13 resíduos de amino ácidos com três Ws sequenciais. Com o objetivo de contribuir para a compreensão de seu mecanismo de ação, realizaram-se estudos funcionais e conformacionais da TRP3 e de dois análogos onde um (WLW) ou dois (LWL) W foram substituídos por L. Os peptídeos foram igualmente ativos contra bactérias Gram positivas e negativas. Sua atividade hemolítica requereu concentrações maiores, diminuindo na ordem TRP3>WLW>LWL. Os peptídeos permeabilizaram membranas modelo de *E. coli* ou contendo fosfolipídios carregados negativamente. Espectros de CD sugeriram que os peptídeos adquirem diferentes conformações ao se ligarem a bicamadas e micelas. Estudos de fluorescência mostraram que a ligação a membranas decresce na ordem: TRP3>WLW>LWL e que os peptídeos se localizam próximos à interface membrana-água. Espectros de RPE de marcadores de spin lipídicos indicaram que a ligação dos peptídeos altera a organização dos lipídios, aumentando o empacotamento molecular.

Palavras chave: tritripticina, peptídeo antimicrobiano, interação peptídeo-membrana, ressonância paramagnética eletrônica, dicroísmo circular,

ABSTRACT

Bozelli Jr, J.C. Interaction of the host defense peptide and its analogues with model membranes: effects on the structure and dynamics of the membranes. 2015, 174p. Ph.D. Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Tritrpticin (TRP3) is a 13-residue antimicrobial peptide that contains three sequential Ws. With the aim of contributing to the understanding of its mechanism of action, functional and conformational studies were performed with TRP3 and two of its analogues where one (WLW) or two (LWL) of the W were replaced by L. The peptides were equally active against both Gram positive and Gram negative bacteria. Higher concentrations were required for hemolytic activity which varied in the order: TRP3>WLW>LWL. The peptides permeabilized membranes model membranes mimicking *E. coli*'s lipid composition or containing different negatively charged phospholipids. CD spectra suggested the peptides acquired different conformations upon binding to bilayers or micelles. Fluorescence studies showed that membrane binding decreases in the order: TRP3>WLW>LWL and that the peptides are located close to the water-membrane interface. EPR spectra of lipid spin labels indicated that peptide binding alter lipid organization, increasing molecular packing.

Key words: tritrpticin, antimicrobial peptide, peptide-membrane interaction, electron paramagnetic resonance, circular dichroism

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2A_{||}**: Extremos externos dos espectros de RPE
- 2A_⊥**: Extremos internos dos espectros de RPE
- 5MESL**: Ácido esteárico 5-doxil metil éster
- 5PCSL**: 1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina
- 5OHW**: 5-hidroxi-triptofano
- 7PCSL**: 1-palmitoil-2-estearoil-(7-doxil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina
- 10MESL**: Ácido esteárico 10-doxil metil éster
- 10PCSL**: 1-palmitoil-2-estearoil-(10-doxil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina
- 12MESL**: Ácido esteárico 12-doxil metil éster
- 12PCSL**: 1-palmitoil-2-estearoil-(12-doxil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina
- 14PCSL**: 1-palmitoil-2-estearoil-(14-doxil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina
- 16MESL**: Ácido esteárico 16-doxil metil éster
- 16PCSL**: 1-palmitoil-2-estearoil-(16-doxil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina
- BLM**: Bicamadas lipídicas planas
- CD**: Dicroísmo circular
- CF**: 5(6)-carboxifluoresceína
- ΔG_0^*** : Energia livre padrão da transferência do peptídeo em água para a membrana
- DNA**: Ácido desoxirribonucléico
- DPC**: Dodecil fosfocolina
- Doxil**: 4',4'-dimetiloxazolidina-N-oxil
- DSC**: Calorimetria diferencial de varredura
- ϵ** : Coeficiente de extinção molar
- FTIR**: Infravermelho com transformada de Fourier
- ITC**: Titulação calorimétrica isotérmica
- h₀**: Altura da linha de campo central do espectro de RPE
- h₊₁**: Altura da linha de campo baixo do espectro de RPE
- K_B**: Constante de ligação aparente
- K_{SV}**: Constante de Stern-Volmer

$\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$: Comprimento de onda de máxima emissão

LP₅₀: Relação molar lipídio:peptídeo necessária para causar 50% de vazamento do conteúdo interno de vesículas lipídicas

LPA: 1-palmitoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfato (sal de sódio)

LPC: 1-palmitoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina

LPG: 1-palmitoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]

LUV: Vesículas unilamelares grandes

LWL: Análogo da tritripticina, cujos W⁶ e W⁸ foram substituídos por L

MIC: Concentração inibitória mínima

MLV: Vesículas multiamelares

n: Fator de cooperatividade

NATA: N-acetil triptofanamida

PDH: Peptídeo de defesa do hospedeiro

PG: Fosfatidil glicerol

POPA: Ácido 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatídico

POPC: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

POPG: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]

POPS: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (sal de sódio)

PSDP: Perfil de supressão dependente da profundidade

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RNA: Ácido ribonucléico

RPE: Ressonância Paramagnética Eletrônica

S_{ef}: Parâmetro de ordem

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TEMPO: 2,2,6,6-tetrametil-piperidinil-1-oxil

TEMPOL: 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidinil-1-oxil

TempoPCSL: 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo(tempo)colina

TFE: Álcool 2,2,2-trifluoretanol

TOCL: 1',3'-bis[1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfo]-*sn*-glicerol (sal de sódio) (Cardiolipina)

TRP3: Tritripticina

[θ]: elipticidade molar

W_0 : Largura da linha de campo central do espectro de RPE

WHO: Organização mundial de saúde

WLW: Análogo da tritripticina, cujo o W^7 foi substituído por L

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	14
1.1 – Peptídeos de defesa do hospedeiro (PDH).....	14
1.2 – Família das Catelicidinas.....	20
1.2.1 – Trypticina (TRP3).....	22
2 – OBJETIVOS	29
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 – Materiais.....	30
3.1.A – Reagentes.....	30
3.1.B – Peptídeos.....	32
3.2. Métodos.....	33
3.2.1 – Determinação da concentração dos peptídeos.....	33
3.2.2 – Ensaios de atividade antimicrobiana.....	33
3.2.3 – Ensaios de atividade hemolítica.....	34
3.2.4 – Técnicas espectroscópicas.....	35
3.2.4.1 – Fluorescência.....	36
3.2.4.1.A – Diagrama de Perrin-Jablonski.....	37
3.2.4.1.B – Efeito do Solvente.....	40
3.2.4.1.C – Supressão de fluorescência.....	42
3.2.4.1.D – Fluorescência em polipeptídeos.....	43
3.2.4.1.E – Ensaios de permeabilidade de vesículas lipídicas.....	44
3.2.4.1.F – Ligação às membranas modelo.....	46
3.2.4.1.G – Localização dos peptídeos em membranas modelo através da supressão da fluorescência intrínseca dos peptídeos.....	48
3.2.4.2 – Dicroísmo circular (CD).....	50
3.2.4.2.A – Contribuição dos resíduos aromáticos no CD.....	52
3.2.4.2.B – Estudos conformacionais dos peptídeos através de CD	53
3.2.4.3 – Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....	54
3.2.4.3.A – O método do marcador de spin.....	55
3.2.4.3.B – Introdução a técnica de RPE.....	56
3.2.4.3.C – Espectros de RPE de nitroxídeos.....	57
3.2.4.3.D – Dependência dos espectros de RPE da orientação.....	59

3.2.4.3.E – Dependência dos espectros de RPE da mobilidade.....	61
3.2.4.3.F – Análise dos espectros de RPE de marcadores de spin intercalados na membrana.....	62
3.2.4.3.G – Estudos do efeito da ligação dos peptídeos sobre a organização molecular das membranas modelo.....	66
4 – RESULTADOS.....	68
4.1 – Estudos funcionais.....	69
4.1.1 – Atividade antimicrobiana e hemolítica.....	69
4.1.2 – Efeito dos peptídeos sobre a permeabilidade de vesículas lipídica.....	71
4.1.2.A – Efeito dos peptídeos sobre a permeabilidade de LUVs de E. coli.....	72
4.1.2.B – Efeito dos peptídeos sobre a permeabilidade de LUVs de composição binária compostas por POPC e diferentes lipídios carregados negativamente.....	75
4.2 – Interação peptídeo-membrana modelo: ligação, conformação, localização e efeito sobre a organização molecular das membranas.....	84
4.2.1 – Ligação dos peptídeos a membrana modelo.....	85
4.2.1.A – LUVs de E. coli.....	85
4.2.1.B – LUVs de composição binária compostas por POPC e diferentes lipídios carregados negativamente.....	88
4.2.1.C – Micelas.....	92
4.2.2 – Predição da conformação dos peptídeos e estudos de CD.....	93
4.2.2.1 – Predição da conformação dos peptídeos.....	94
4.2.2.2 – Estudos conformacionais dos peptídeos através de CD.....	95
4.2.2.2.A – Espectros de CD dos peptídeos em solução aquosa.....	95
4.2.2.2.B – Espectros de CD dos peptídeos em micelas.....	97
4.2.2.2.C – Espectros de CD dos peptídeos em soluções contendo TFE	102
4.2.2.2.D – Espectros de CD dos peptídeos em presença de LUVs de E. coli.....	104
4.2.2.2.E – Espectros de CD dos peptídeos em presença de LUVs de misturas binárias contendo POPC e diferentes lipídios carregados negativamente.....	105
4.2.3 – Localização dos peptídeos em membranas modelo através da supressão da fluorescência intrínseca dos peptídeos.....	109
4.2.3.A – LUVs de E. coli.....	110
4.2.3.B – LUVs de composição binária compostas por POPC e diferentes lipídios carregados negativamente.....	111
4.2.3.C – Micelas.....	115
4.2.4 – Efeito da ligação dos peptídeos sobre a organização molecular das membranas modelo.....	117

4.2.4.A – LUVs de E. coli.....	117
4.2.4.B – LUVs de composição binária compostas por POPC e diferentes lipídios carregados negativamente.....	124
4.2.4.C – Micelas.....	129
5 – DISCUSSÃO.....	133
5.1 – Propriedades funcionais.....	136
5.2 – Propriedades estruturais e dinâmicas.....	141
6 – CONCLUSÃO.....	156
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	158

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Peptídeos de defesa do hospedeiro (PDH)

A resistência de micro-organismos patogênicos a antibióticos de primeira escolha atualmente cresce a taxas alarmantes. De tal modo que a Organização Mundial de Saúde (WHO) e a comunidade científica vêm alertando e propondo soluções para este problema de uma forma contínua (WHO, 2001; Nordberg et al., 2005; WHO, 2012; 2013; 2014; 2015; Nature outlook, 2014). Os antibióticos convencionais, em geral, atuam sobre um número limitado de alvos macromoleculares – enzimas bacterianas, ribossomo – agindo em uma escala de tempo de alguns dias (aproximadamente uma semana). Além do mais, desde os anos 1960 apenas quatro novas classes de antibióticos foram introduzidas no mercado (Fischbach e Walsh, 2009). Sendo assim, o desenvolvimento de novos antibióticos com novos mecanismos de ação é uma necessidade urgente.

Uma estratégia que tem sido considerada para o desenvolvimento de uma nova classe de antibióticos é o uso de peptídeos de defesa do hospedeiro (PDH). Essa classe de moléculas – a qual constitui parte importante do sistema imune inato de fungos, bactérias, plantas, invertebrados e vertebrados – exibe um amplo espectro de ação, agindo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, vírus, protozoários e células mamíferas, sendo essas tumorais ou não (Brogden, 2005). Quando comparados aos antibióticos de primeira escolha os PDH têm como vantagem o fato de agirem sobre múltiplos alvos macromoleculares – membrana, ácidos nucleicos, mitocôndria, proteínas citoplasmáticas – e atuarem na escala de tempo de minutos, o que torna a resistência antimicrobiana mais difícil de ocorrer (Blondelle et al., 1999; Brogden, 2005; Jenssen et al, 2006; Fjell et al., 2011; Teixeira et al., 2012). Além do mais, foi mostrado que eles podem apresentar atividades imuno-modulatórias, modulando o sistema imune inato e adaptativo (Yang et al., 1999; Yang et al., 2000a).

A associação da atividade antimicrobiana com polipeptídeos catiônicos se deu no início dos anos 1960 (Zeya e Spitznagel, 1963). No entanto, a área só ganhou visibilidade e expansão depois do isolamento e purificação das cecropinas, magaininas e defensinas (Steiner et al., 1981; Ganz et al., 1985; Zasloff, 1987).

Atualmente, mais de 2.500 PDH já foram isolados e caracterizados ou tiveram sua sequência predita a partir do genoma do hospedeiro (Wang et al., 2009).

Essa classe de peptídeos pode apresentar expressão gênica constitutiva ou induzida por infecções e/ou estímulo inflamatório (Jenssen et al., 2006). A síntese pode ocorrer de duas formas: via ribossomo ou por vias metabólicas especializadas. A síntese via ribossomo ocorre em todas as espécies e, geralmente, os peptídeos são sintetizados como precursores inativos, os quais por meio de uma clivagem proteolítica se tornam ativos. Já os PDH de fungos e bactérias, em sua maioria, são sintetizados por vias metabólicas especializadas e, frequentemente, apresentam aminoácidos não usuais, além de modificações como glicosilação e adição de ácidos graxos (Hancock e Chapple, 1999).

Os PDH apresentam propriedades físicas similares – curtos, carregados em pH fisiológico e capazes de adquirir uma conformação anfipática. No entanto, os peptídeos dessa classe apresentam uma baixa homologia de sequência e uma diversidade de estruturas secundárias. Várias propostas têm sido feitas para classificá-los com base na sequência e estrutura secundária, uma delas é a reportada por Brogden (Brogden, 2005):

Peptídeos aniônicos. Curtos (até 10 resíduos), carregados negativamente em pH fisiológico e necessitam de zinco como cofator. Estes peptídeos são encontrados em concentrações da ordem de mM em extratos de surfactante pulmonar, lavados de fluidos brônquio-alveolar e células epiteliais das vias respiratórias. Um representante desse grupo é a dermcidina humana.

Peptídeos que formam α -hélice. A maioria dos PDH descritos até o momento encontra-se neste grupo. Curtos (até 40 resíduos), carregados positivamente em pH fisiológico e não possuem resíduos de cisteína. Em condições apropriadas (presença de solventes indutores de estrutura secundária ou membranas modelo) adquirem uma conformação (anfipática) em α -hélice. Um representante desse grupo é a magainina II de anfíbios.

Peptídeos que contêm cisteínas e formam ligações dissulfeto. Carregados negativamente ou positivamente em pH fisiológico, contêm resíduos

de cisteína, formam ligações dissulfeto e adquirem uma conformação (anfipática) em folha β . Um representante desse grupo é a defensina A de insetos.

Peptídeos ricos em aminoácidos específicos. Carregados positivamente em pH fisiológico, ricos em um aminoácido em particular e não possuem cisteína. As conformações tendem a diferir da α -hélice e folha- β , mas o caráter anfipático é mantido. Um representante desse grupo é a Histatina-5 de humanos e primatas superiores.

Fragmentos de proteínas. Carregados negativamente ou positivamente em pH fisiológico, produzidos pela clivagem proteolítica de uma proteína precursora. Um representante desse grupo é a lactoferricina bovina.

Embora grande quantidade de dados tenha sido publicada desde o início dos anos 1980, o mecanismo de ação a nível molecular dos PDH ainda não é completamente compreendido. Em 1989, estudos com a defensina humana sugeriram que a atividade bacteriana estaria relacionada com a permeabilização da membrana plasmática (Lehrer et al., 1989). Posteriormente, estudos mostraram que o mecanismo de ação da cecropina A, magainina II amida e melitina envolve a interação direta entre os peptídeos e os lipídios da membrana celular, sem uma interação estereoespecífica com receptores ou enzimas (Wade et al., 1990). Desde então, vários resultados experimentais sugeriram que o mecanismo de ação desses peptídeos é por meio da danificação e/ou permeabilização da membrana plasmática da célula alvo (Shai, 2002; Huang et al., 2004; Lohner e Blondelle, 2005; Brogden, 2005; Melo et al., 2009; Teixeira et al., 2012).

De modo alternativo, evidências recentes sugerem que alguns peptídeos podem interagir com alvos intracelulares, por exemplo, inibindo a síntese da parede celular, ácidos nucleicos, proteínas e a atividade de enzimas (Brogden, 2005; e referências a partir desta). A membrana plasmática além de ser uma barreira física, a qual delimita o ambiente extracelular e intracelular, tem um papel no fluxo de moléculas para dentro ou para fora da célula, funcionando como um filtro de seletividade. Sendo assim, mesmo que a atividade do peptídeo não seja a nível de membrana, ele terá que transpassar essa barreira para atingir o seu alvo molecular, interagindo inicialmente com esta. De tal modo, que o estudo da

interação peptídeo-membrana é importante para a compreensão da atividade biológica dos PDH. A fim de compreender os mecanismos moleculares da interação peptídeo-membrana, frequentemente, utilizam-se membranas modelo (micelas, lipossomos, bicamadas lipídicas planas, monocamadas), já que membranas celulares são extremamente complexas e o estudo utilizando métodos biofísicos com sistemas celulares, em geral, apresenta limitações (Jelinek e Kolusheva, 2005).

O conceito de composição lipídica característica para uma determinada membrana celular é bem aceito, embora a composição lipídica possa mudar com as condições ambientais. De uma maneira simplificada, pode-se assumir que a monocamada externa de membranas bacterianas é carregada negativamente e a de mamíferos apresenta carga líquida igual a zero. Neste contexto, acredita-se que a seletividade de ação dos PDH ocorre devido a interações eletrostáticas entre os peptídeos carregados positivamente e as membranas bacterianas carregadas negativamente (Hancock e Chapple, 1999; Brogden, 2005; Lohner, 2009). De fato, um número crescente de resultados experimentais tem mostrado a interação preferencial de alguns desses peptídeos com fosfolipídios carregados negativamente (Nakamura et al., 1988; White et al., 1995; Schibli et al., 2002; Salay et al., 2004; Melo e Castanho, 2007; Bastos et al., 2008; Teixeira et al., 2010; Bozelli et al., 2012).

As propriedades físicas que influenciam a interação peptídeo-membrana são: interações eletrostáticas (entre os peptídeos carregados positivamente e lipídios carregados negativamente), hidrofobicidade (interação entre os resíduos hidrofóbicos do peptídeo e as cadeias acila dos lipídios) e flexibilidade (a qual permite uma transição conformacional do peptídeo livre em solução para aquela do peptídeo ligado à membrana) (Jenssen et al., 2006).

Alguns modelos têm sido propostos para explicar a permeabilização da membrana por PDH (Teixeira et al., 2012; e referências a partir desta). Entre os modelos propostos, três são os mais aceitos. Os três modelos apresentam uma etapa inicial em comum. Após o peptídeo ter alcançado a membrana, há a interação com os lipídios. Geralmente, o peptídeo em solução apresenta um equilíbrio entre diferentes conformações e ao se ligar à membrana adquire uma estrutura secundária anfipática. Em condições em que a relação peptídeo:lipídio é

baixa, o peptídeo (eixo longo molecular), frequentemente, encontra-se paralelo à superfície da membrana, com sua face hidrofóbica embebida na membrana. O aumento dessa relação pode culminar na desintegração da membrana ou formação de poros/canais (Yang et al., 2001). Esses eventos dependem do peptídeo e da composição lipídica (Lee et al., 2004; Andrushchenko et al., 2008; Tang e Hong, 2009; Su et al., 2011). Os três modelos mais aceitos são:

Barril de estacas (Ehrenstein e Lecar, 1977): descreve a formação de poros/canais aquosos transmembranares, os quais são formados por um grupo de peptídeos com estrutura secundária anfipática, frequentemente, α -hélices. Neste modelo, os peptídeos interagem lateralmente uns com os outros para formar uma estrutura parecida com a de um canal proteico, onde a face hidrofóbica do peptídeo interage com as cadeias acila dos lipídios, enquanto que a face hidrofílica forma o lúmen do poro/canal. Um peptídeo que se acredita agir segundo este modelo é a alameticina, um peptídeo sintetizado pelo fungo *Trichoderma viride* (**Figura 1.1 A**).

Carpete (Pouny et al., 1992): descreve o acúmulo de peptídeos na superfície da membrana, de tal modo que haja o recobrimento da mesma de forma semelhante a um carpete. Neste modelo, quando uma concentração crítica de peptídeo é alcançada na membrana, acredita-se que haja uma desestabilização global da membrana, levando, eventualmente, a formação de micelas mistas de peptídeo+lipídio. Um peptídeo que se acredita agir segundo este modelo é a cecropina P1, um peptídeo isolado do nematóide *Ascaris suum* (**Figura 1.1 B**).

Poro toroidal (Ludtke et al., 1996): descreve a formação de poros/canais aquosos transmembranares, os quais são formados por peptídeos (cuja estrutura secundária é anfipática) e lipídios. Nesse modelo, interações específicas peptídeo-peptídeo não ocorrem, entretanto, os peptídeos afetam a curvatura local da membrana de modo cooperativo, levando à indução (local) de curvatura positiva. A energia desfavorável de deformação da membrana alcança um valor crítico e várias moléculas de peptídeo com lipídios ao redor formam um poro dinâmico composto por um complexo supramolecular peptídeo-lipídio ou um poro toroidal, cuja superfície polar é composta pela porção hidrofílica dos peptídeos e as cabeças polares dos lipídios. A formação deste poro é transiente (o tempo de vida varia) e pode representar um modo de lançamento do peptídeo para o interior da

célula. Um peptídeo que se acredita agir segundo este modelo é a magainina II, um peptídeo isolado da pele do anfíbio *Xenopus laevis* (**Figura 1.1 C**).

Figura 1.1. Esquema dos três modelos de desintegração ou permeabilização da membrana por PDH. (A) Barril de estacas; (B) Carpete; (C) Poro toroidal. Peptídeos estão representados como cilindros, as faces hidrofóbicas estão coloridas de cinza e as faces hidrofílicas estão coloridas de azul. A visão por cima dos poros (A e C) está mostrada nas caixas (adaptado de Toke, 2005).

1.2 – Família das Catelicidinas

Uma das famílias de PDH mais estudadas é a das Catelicidinas. Os peptídeos desta família são encontrados em neutrófilos e epitélio como parte da defesa inicial de mamíferos contra infecções (Zanetti, 2005). O termo ‘Catelicidinas’ foi proposto em 1995 para reconhecer a existência da relação evolutiva de uma nova família de proteínas com a catelina, uma proteína isolada dos neutrófilos suínos, cujas características estruturais sugerem ter sido um membro da superfamília cistatina de inibidores de cisteína proteases (Ritonja et al., 1989).

Pode-se dizer que a descoberta das Catelicidinas ocorreu em 1988 quando Romeo e colaboradores (1988), estudando a atividade antimicrobiana do extrato de neutrófilos bovinos, isolaram um peptídeo de doze resíduos ciclizado por uma ligação dissulfeto. Posteriormente, mais dois peptídeos antimicrobianos de neutrófilos foram purificados, Bac5 (um peptídeo de 43 resíduos com o C-terminal amidado, caracterizado por motivos de prolina repetidos) e Bac7 (um peptídeo com 60 resíduos, rico em prolina) (Gennaro et al., 1989). Entretanto, a classificação destes peptídeos e outros não relacionados estruturalmente como membros de uma família, só aconteceu em 1995 (Zanetti et al., 1995). Foram Zanetti e colaboradores (1993) que, com o intuito de amplificar um fragmento de cDNA de Bac5 a partir de uma biblioteca de cDNA de células mielóides bovinas, mostraram a existência de uma variedade de transcritos a partir do mesmo par de *primers*. Os transcritos identificados possuíam uma região no N-terminal (pró-região) com 75-85% de homologia com a sequência de Bac5, enquanto o C-terminal apresentava sequências distintas. A pró-região (99 a 114 resíduos) é a marca das Catelicidinas e, geralmente, apresenta mais de 70% de homologia com a catelina. Desde, então, uma estratégia utilizando biologia molecular, baseada na pró-região, vem sendo usada para a identificação de outros membros dessa família a partir do cDNA (Zanetti, 2005).

Figura 1.2. Representação esquemática da estrutura do gene e do mRNA das Catelicidinas. A diversidade estrutural dos peptídeos com atividade antimicrobiana também está esquematizada: estrutura em α -hélice (a), contém cisteína e forma ligação dissulfeto (b), rico em triptofano (c) e rico em prolina (d) (adaptado de Zanetti, 2005).

Nos neutrófilos, as Catelicidinas são sintetizadas na forma de pré-pró-peptídeo. A região pré é um peptídeo sinal que direciona os pró-peptídeos, geralmente inativos, para armazenamento em grânulos específicos. Na presença

de estímulo, os pró-peptídeos são processados de forma a liberar o domínio catelina e o peptídeo funcional. Assume-se que o processamento da forma armazenada para o peptídeo ativo ocorre em neutrófilos ativados, durante a liberação do conteúdo dos grânulos no vacúolo fagocítico ou no meio extracelular, onde as Catelicidinas são expostas a proteases apropriadas presentes nos grânulos azurófilos, em particular elastase e proteinase 3 (Zaiou e Gallo, 2002; e referências a partir desta).

Os peptídeos dessa família exibem um amplo espectro de atividade contra microrganismos patogênicos, apresentando atividade na faixa de concentração de micromolar (Zanetti, 2005). Além do mais, os membros dessa família apresentam diferenças de especificidade e potência na atividade antimicrobiana. Alguns ainda mostraram ter papel na modulação do sistema imune e mediação da inflamação, além de conectar o sistema imune inato e adaptativo (Yang et al., 2000a; Yu et al., 2007).

1.2.1 – Trrpticina (TRP3)

Trrpticina (TRP3) é um peptídeo da família das Catelicidinas. Este peptídeo possui treze resíduos de aminoácidos e seu nome se deve à presença de três resíduos de W consecutivos na sua sequência – uma característica única entre os PDH. A sua sequência é aproximadamente palindrômica (VRRFPWWPFLRR), contém dois resíduos de R próximos de cada extremidade (N-terminal e C-terminal), seguidos de resíduos de F e P, os quais flanqueiam os três resíduos de W na região central. A presença de quatro resíduos de R confere carga líquida positiva (+ 4) ao peptídeo em pH fisiológico.

Pungercar e colaboradores (1993), com o intuito de identificar uma proteína precursora da catelina e peptídeos com atividade antimicrobiana, realizaram um *screening* na biblioteca de cDNA da medula suína e identificaram dois clones proximamente relacionados, os quais codificavam um precursor potencial. O maior clone codificava uma proteína com duzentos e vinte e oito resíduos, sendo noventa e oito resíduos no N-terminal similar à catelina e cento e um resíduos no C-terminal com grande quantidade de resíduos de R e P. Para identificar a atividade funcional deste precursor potencial, Lawyer e colaboradores (1996) sintetizaram

peptídeos de vários tamanhos, correspondentes ao C-terminal da proteína, e identificaram, assim, uma sequência com ampla atividade antimicrobiana. Esta sequência era a da TRP3.

Atividade. TRP3 apresenta amplo espectro de atividade, agindo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e células mamíferas, sendo estas tumorais ou não (Lawyer et al., 1996; Nagpal et al., 1999; Yang et al., 2002; Yang et al., 2003; Farnaude et al., 2004; Cironi et al., 2006; Ghiselli et al., 2006; Schibli et al., 2006; Yang et al., 2006a,b; Zhu et al., 2006; Yang et al., 2009; Infante et al., 2011; Nguyen et al., 2011; Bagheri et al., 2012; Sharma et al., 2013; Tiewcharoen et al., 2014; Arias et al., 2015). De acordo com estes estudos a potência de ação segue a ordem: bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) > fungos >> células mamíferas (tumorais ou não). Estudos também mostraram um efeito sinérgico entre o peptídeo e outros antibióticos contra bactérias Gram-negativas (Cironi et al., 2006; Ghiselli et al., 2006).

O mecanismo de ação de TRP3 envolve interações com a membrana, mas ainda não é totalmente compreendido a nível molecular. O peptídeo mostrou ser capaz de despolarizar a membrana plasmática de *E. coli* e *S. aureus* (Yang et al., 2006b; Zhu et al., 2006). Recentemente, foi mostrado que TRP3 é capaz de inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas em *E. coli*; entretanto, nestas condições não se observou morte celular e atribui-se esta inibição ao colapso das funções bacterianas em decorrência da permeabilização da membrana (Arias et al., 2015). Em sistemas modelo foi observado o vazamento induzido por TRP3 do compartimento aquoso interno de vesículas lipídicas encapsuladas com sondas fluorescentes (Schibli et al., 2002; Yang et al., 2002; Yang et al., 2003; Schibli et al., 2006; Yang et al., 2006a,b; Andrushchenko et al., 2008; Nguyen et al., 2011; Bagheri et al., 2012). Além disso, estudos relataram a indução de *flip-flop* dos lipídios por TRP3 e a extensão do processo está correlacionada com o grau de vazamento (Schibli et al., 2006). Estudos com bicamadas lipídicas planas ainda mostraram que o peptídeo possui atividade tipo canal iônico, com seletividade para cátions, tendo sido proposto que a estrutura do canal seria a de um poro toroidal (Salay et al., 2004).

Ligação a membranas. Interações eletrostáticas desempenham um papel importante na ligação de TRP3 à membrana. Estudos de fluorescência mostraram

um maior efeito (deslocamento do máximo de emissão, efeitos de *red-edge*, supressão de fluorescência por supressor aquossolúvel e supressores embebidos na membrana, vazamento do compartimento aquoso interno de vesículas lipídicas, indução de *flip-flop* dos lipídios) na presença de vesículas lipídicas contendo carga líquida negativa em comparação a vesículas zwitteriônicas (Schibli et al., 2002; Yang et al., 2003; Schibli et al., 2006; Yang et al., 2006a; Zhu et al., 2006; Andrushchenko et al., 2008; Nguyen et al., 2011; Bozelli et al., 2012). Além disso, estudos por ITC (calorimetria de titulação isotérmica) reafirmaram estas observações, mostrando ligação mais forte a vesículas contendo lipídios carregados negativamente do que a vesículas com carga líquida superficial igual a zero (Andrushchenko et al., 2008). Estudos com bicamadas lipídicas planas também mostraram a interação preferencial com bicamadas carregadas negativamente (Salay et al., 2004). Além da interação preferencial com lipídios carregados negativamente, estudos com monocamadas lipídicas reportaram que TRP3 exibe seletividade para lipídios com a cabeça polar PG (fosfatidil glicerol) (Salay et al., 2012). Além disso, estudos de DSC (calorimetria diferencial de varredura) também mostraram maior afinidade do peptídeo por membranas com carga superficial negativa, embora os resultados tenham mostrado que forças hidrofóbicas também desempenham um papel na ligação, a qual ocorre preferencialmente na fase fluida quando comparada com a fase gel (Andrushchenko et al., 2007). Estudos de fluorescência e CD mostraram que a ligação a micelas tem uma menor contribuição de interações eletrostáticas e que, neste caso, outras forças (hidrofóbica, ligação de hidrogênio, van der Waals, hidratação) também desempenham um papel na ligação (Bozelli et al., 2012).

Localização. TRP3 encontra-se na interface membrana-água. Estudos por microscopia confocal mostraram que TRP3 marcado com uma sonda fluorescente não penetra células de *E. coli* e *S. aureus* e se mantém associado à membrana (Zhu et al., 2006). Segundo estudos de fluorescência (deslocamento do máximo de emissão e supressão de fluorescência por supressor aquossolúvel ou embebido na membrana) a região central do peptídeo ($W^6W^7W^8$) se encontra na interface bicamada (micela)/água (Schibli et al., 1999; Schibli et al., 2002; Zhu et al., 2006; Andrushchenko et al., 2008; Bozelli et al., 2012), sendo que a acessibilidade do supressor aquossolúvel acrilamida é maior quando o peptídeo encontra-se ligado a

micelas (Bozelli et al., 2012). Além do mais, estudos de RMN (ressonância magnética nuclear) do peptídeo ligado a micelas de SDS (dodecil sulfato de sódio), as quais continham o marcador de spin 5-doxil ácido esteárico mostraram alargamento considerável das ressonâncias das cadeias laterais dos resíduos F⁴, W⁶, W⁷, W⁸, F¹⁰ e L¹¹. Este resultado é consistente com a estrutura determinada para o peptídeo ligado a micelas de SDS, de modo que a porção hidrofóbica estaria na direção do centro da micela, enquanto os outros resíduos estariam orientados mais superficialmente (Schibli et al., 1999). Além disso, estudos de RPE (ressonância paramagnética eletrônica) do peptídeo contendo um aminoácido paramagnético antes do resíduo V¹ evidenciaram uma localização superficial do N-terminal do peptídeo quando ligado a micelas de diferentes composições lipídicas (Bozelli, 2011).

Conformação. TRP3 adquire conformação anfipática ao se ligar a membranas. Estudos de RMN mostraram que TRP3 apresenta equilíbrio entre diferentes conformações em solução (Schibli et al., 1999; Schibli et al., 2006). No entanto, ao se ligar a micelas de SDS ou DPC (dodecil fosfocolina) o peptídeo adquire estrutura anfipática do tipo dobra-dobra (incomum) ao redor dos resíduos P⁵ e P⁹ (**Figura 1.3**). A ligação às micelas, resultando na aquisição desta conformação, diminui significativamente a mobilidade da porção hidrofóbica, enquanto as extremidades N- e C-terminais mantêm certo grau de flexibilidade; este arranjo espacial conduz a segregação das porções hidrofóbica e hidrofílica da molécula. Estudos de CD (dicroísmo circular) e FTIR (infravermelho com transformada de Fourier) do peptídeo em diferentes solventes - etanol e trifluoretanol (TFE) - e na presença de micelas de DPC mostraram que TRP3 adquire conformação envolvendo a presença de dobra(s) em todos os ambientes estudados (Andrushchenko et al., 2006). Além do mais, estudos de CD mostraram que a conformação do peptídeo ligado a micelas difere daquela do peptídeo ligado a bicamadas (Bozelli et al., 2012).

Efeito da substituição de amino ácidos. A atividade, ligação e conformação de TRP3 variam com substituições dos resíduos de amino ácidos. Estudos de atividade indicam aumento de atividade contra bactérias Gram-positivas e diminuição da atividade hemolítica com o aumento da carga líquida do peptídeo de

+ 4 para + 5 (C-terminal amidado) (Schibli et al., 2006). De acordo com estudos de fluorescência, DSC e ITC, a ligação a bicamadas lipídicas se mantém com o aumento da carga do peptídeo (Schibli et al., 2006; Andrushchenko et al., 2007; Andrushchenko et al., 2008). Além do mais, estudos de CD, FTIR e RMN reportaram uma conformação para o peptídeo com o C-terminal amidado similar a do peptídeo nativo em diversos solventes e em micelas de DPC (Andrushchenko et al., 2006; Schibli et al., 2006).

Figura 1.3. Esquema da estrutura tridimensional, resolvida por RMN, de TRP3 ligado a micelas de SDS. (A) Átomos do esqueleto (C α , N e C) das 18 estruturas finais de TRP3 ligado a SDS. Os resíduos 4-11 estão sobrepostos. Resíduos de R estão representados em azul, F em vermelho, P em laranja, W em amarelo, L em verde escuro e V em verde claro. (B) Todos os átomos das 18 estruturas finais de TRP3 ligada a SDS. Resíduos 4-11 sobrepostos. (C) Diagrama de fita da média das estruturas de TRP3. As cadeias laterais de W⁶, W⁷ e W⁸ estão visíveis (em amarelo) (adaptado de Schibli et al., 1999).

A substituição dos resíduos de R por K manteve a atividade antimicrobiana, embora tenha diminuído a atividade hemolítica (Yang et al., 2003; Schibli et al., 2006). Estudos de vazamento do conteúdo interno de vesículas lipídicas e indução de *flip-flop* dos lipídios por fluorescência mostram efeito similar do análogo em

bicamadas contendo fosfolipídios carregados negativamente, enquanto o efeito é menor em bicamadas zwitteriônicas (Schibli et al., 2006). De acordo com estes resultados, estudos de fluorescência, DSC e ITC reportaram que a ligação a bicamadas carregadas negativamente se mantém, enquanto a ligação a bicamadas zwitteriônicas diminui (Yang et al., 2003; Schibli et al., 2006; Andrushchenko et al., 2007; Andrushchenko et al., 2008). Ademais, estudos de CD, FTIR e RMN reportaram conformação similar a do peptídeo nativo em diversos solventes e em presença de micelas de DPC para o peptídeo onde os resíduos de R foram substituídos por K (Andrushchenko et al., 2006; Schibli et al., 2006). Um estudo de fluorescência de vários análogos de TRP3 onde os resíduos de R foram substituídos por derivados de R, K ou derivados de K, os quais apresentavam pequenas variações no comprimento da cadeia lateral e estado de metilação, reportou que a interação determinante para a desestabilização da membrana se deve à potencialidade de fortes ligações de hidrogênio entre os guanido grupos dos resíduos de R de TRP3 com as cabeças polares dos fosfolipídios (Nguyen et al., 2011).

A substituição dos resíduos de P por A aumentaram tanto a atividade antimicrobiana quanto a atividade hemolítica (Yang et al., 2002; Yang et al., 2006b; Schibli et al., 2006). Estes resultados são reafirmados por estudos em sistemas modelo, onde foi mostrado aumento no vazamento do conteúdo interno de vesículas lipídicas e indução de *flip-flop* dos lipídios, tanto em bicamadas carregadas negativamente, quanto em bicamadas zwitteriônicas (Yang et al., 2002; Yang et al., 2006b; Schibli et al., 2006). Esta substituição também resultou em aumento da despolarização de membranas de *E. coli* e *S. aureus* (Yang et al., 2006b). Entretanto, a substituição da P⁵ por A manteve a atividade antimicrobiana e diminuiu a atividade hemolítica, enquanto a substituição da P⁹ por A manteve tanto a atividade antimicrobiana quanto a hemolítica (Schibli et al., 2006). De acordo com estudos de fluorescência, DSC e ITC a ligação tanto a bicamadas carregadas negativamente, quanto a zwitteriônicas aumentou (Schibli et al., 2006; Andrushchenko et al., 2007; Andrushchenko et al., 2008). Quanto à conformação, estudos de CD, FTIR e NMR em diversos solventes e em presença de micelas de DPC e SDS mostraram que a substituição da P⁵ ou ambas por A levou à aquisição

de estrutura em α -hélice (Yang et al., 2002; Andrushchenko et al., 2006; Schibli et al., 2006).

No caso em que os resíduos de W foram substituídos por F foi relatado um aumento na atividade contra bactérias Gram-negativas, enquanto a atividade hemolítica diminuiu (Yang et al., 2002; Schibli et al., 2006). Já a substituição dos resíduos de W por Y levou à diminuição tanto da atividade antimicrobiana quanto da atividade hemolítica (Schibli et al., 2006). A substituição individual ou dos três resíduos de W por 5-hidroxi-triptofano (5OHW) essencialmente não alterou a atividade antimicrobiana do peptídeo (Arias et al., 2015). Além disso, o análogo com F não foi capaz de despolarização da membrana de *E. coli* e *S. aureus* (Yang et al., 2006b). A substituição individual ou dos três resíduos de W por 5OHW não alterou a capacidade do peptídeo de permeabilizar a membrana externa de *E. coli*, enquanto só os análogos com substituições individuais foram capazes de permeabilizar a membrana interna da bactéria (Arias et al., 2015). Consistente com estes resultados os análogos com substituições individuais foram capazes de induzir o vazamento do conteúdo interno de vesículas lipídicas, enquanto o análogo com os três resíduos de W substituídos por 5OHW não apresentou atividade permeabilizante, assim como análogos em que os três resíduos de W foram substituídos por F ou Y (Yang et al., 2002; Schbili et al., 2006; Arias et al., 2015). A ligação às membranas modelo dos análogos com os três resíduos de W substituídos por F ou Y diminuiu, enquanto todos os análogos com 5OHW mantiveram a ligação (Schibli et al., 2006; Andrushchenko et al., 2007; Andrushchenko et al., 2008; Arias et al., 2015). A conformação dos análogos individuais com 5OHW ligados a micelas de SDS foi resolvida por RMN (Arias et al., 2015). Enquanto o análogo com 5OHW substituindo o W⁶ manteve a conformação do peptídeo nativo, os análogos com 5OHW substituindo o W⁷ ou W⁸ apresentaram estruturas mais compactas, com as extremidades N- e C-terminais mais próximos espacialmente (Arias et al., 2015).

2 – OBJETIVOS

Considerando a importância do desenvolvimento de novos compostos com propriedades antibióticas e que, para viabilizar sua produção e seu uso clínico, é importante ter conhecimento aprofundado de suas propriedades fundamentais, bem como de seu mecanismo de ação a nível molecular, o objetivo deste projeto é o de contribuir para ampliar o conhecimento das propriedades do peptídeo catiônico com atividade antimicrobiana, TRP3, e para a compreensão mais detalhada de seu mecanismo de ação a nível molecular.

Para tanto, estudamos as propriedades funcionais, estruturais e dinâmicas da interação do PDH TRP3 e seus dois análogos, WLW (cujo W⁷ foi substituído por L) e LWL (cujos W⁶ e W⁸ foram substituídos por L), com membranas modelo – micelas e bicamadas lipídicas – de composição variada.

Objetivos específicos:

1. Examinar o efeito da substituição do(s) resíduo(s) de W por L dos análogos nas propriedades funcionais do peptídeo. Para tal fim, realizamos ensaios de atividade antimicrobiana e hemolítica de TRP3 e seus análogos, assim como estudos de permeabilização de vesículas lipídicas.

2. Examinar o efeito da substituição do(s) resíduo(s) de W por L nos análogos nas propriedades estruturais e dinâmicas por meio do emprego das técnicas espectroscópicas de fluorescência, dicroísmo circular (CD) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Assim sendo, estudamos:

- i. a ligação dos peptídeos a membranas modelo,
 - ii. as propriedades conformacionais dos peptídeos,
 - iii. a localização destes quando da ligação às membranas modelo,
 - iv. o efeito da ligação dos peptídeos sobre as propriedades microscópicas (organização molecular) das membranas modelo.
3. Investigar o papel da composição lipídica das membranas modelo nas propriedades funcionais, estruturais e dinâmicas dos peptídeos.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

3.1.A – Reagentes

Todos os fosfolipídios, incluindo os marcadores de spin fosfolipídicos, e lisofosfolipídios foram adquiridos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) (**Tabela 3.1** e **3.2**). O álcool 2,2,2-trifluoretanol (TFE, $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$), NaCl, sephadex G-25, tris-hidroximetilaminometano (Tris), N-acetil triptofanamida (NATA), 5(6)-carboxifluoresceína (CF) e os marcadores de spin com o grupamento nítróido ligado em diferentes posições ao longo da cadeia acila do metil éster de ácido esteárico (MESL, **Tabela 3.2**) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. As membranas de policarbonato com diâmetro de poro de 100 nm foram adquiridas da GE healthcare (Piscataway, NJ). A acrilamida foi adquirida da BioRad (Hercules, CA).

Tabela 3.1 – Nome, sigla e estrutura química dos fosfolipídios e lisofosfolipídios usados.

Nome (Sigla) dos fosfolipídios/lisofosfolipídios	Estrutura química
1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina (POPC)	A
1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (sal de sódio) (POPG)	B
1',3'-bis[1,2-dioleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo]- <i>sn</i> -glicerol (sal de sódio) (TOCL)	C
1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-L-serina (sal de sódio) (POPS)	D

1-palmitoil-2-oleoil-<i>sn</i>-glicero-3-fosfato (sal de sódio) (POPA)
1-palmitoil-2-hidroxi-<i>sn</i>-glicero-3-fosfocolina (LPC)
1-palmitoil-2-hidroxi-<i>sn</i>-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (sal de sódio) (LPG)
1-palmitoil-2-hidroxi-<i>sn</i>-glicero-3-fosfato (sal de sódio) (LPA)

Tabela 3.2 – Nome, sigla e estrutura química dos marcadores de spin utilizados.

Marcador de spin (sigla)	Estrutura química
1-palmitoil-2-oleoil-<i>sn</i>-glicero-3-fosfo(tempo)colina (TempoPCSL)
1-palmitoil-2-estearoil-(5-doxil)-<i>sn</i>-glicero-3-fosfocolina (5PCSL)
1-palmitoil-2-estearoil-(7-doxil)-<i>sn</i>-glicero-3-fosfocolina (7PCSL)
1-palmitoil-2-estearoil-(10-doxil)-<i>sn</i>-glicero-3-fosfocolina (10PCSL)
1-palmitoil-2-estearoil-(12-doxil)-<i>sn</i>-glicero-3-fosfocolina (12PCSL)

3.1.B – Peptídeos

Os peptídeos (**Tabela 3.3**) foram sintetizados pelo método de síntese em fase sólida (Merrifield, 1963; Stewart e Young, 1984). Trritpticina (TRP3) foi sintetizada no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo pelo grupo do Prof. Dr. Clóvis R. Nakaie. Os análogos WLW e LWL foram adquiridos da GenScript (Piscataway, NJ).

Tabela 3.3 – Peptídeos sintetizados para os estudos. Peptídeo, sequência, número de resíduos e carga formal em pH fisiológico.

Peptídeo	Sequencia	Número de resíduos	Carga formal
TRP3	VRRFPWWPFLRR	13	+ 4

WLW	VRRFPWLWPFLRR	13	+ 4
LWL	VRRFPLWLPFLRR	13	+ 4

3.2 – Métodos

3.2.1 – Determinação da Concentração dos Peptídeos

As amostras contendo os peptídeos foram preparadas a partir da diluição de soluções estoque concentradas de TRP3, WLW e LWL, de modo a obter a concentração desejada.

A concentração dos peptídeos nas amostras foi determinada pelo espectro de absorção obtido em espectrofotômetro UV-Vis Hitachi modelo U-2010. O espectro foi lido entre 230 e 340 nm e o máximo da absorbância foi obtido em 280 nm (absorção dos resíduos de triptofano) para TRP3, WLW e LWL. O valor de ϵ , no comprimento de onda de máxima absorção, utilizado para a absorção do W foi de $5.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, para os peptídeos com mais de um W esse valor foi multiplicado pelo número de W. A partir do valor da absorbância no comprimento de onda de máxima absorção e do ϵ correspondente, pode-se calcular a concentração dos peptídeos nas amostras por meio da equação de Lambert-Beer (**Equação 3.1**):

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot l} \quad (\text{Equação 3.1})$$

onde C é a concentração do peptídeo (em $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), A é absorbância no comprimento de onda correspondente ao máximo de absorção, ϵ é coeficiente de extinção molar ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e l é o caminho óptico da cubeta (em cm).

3.2.2 – Ensaio de Atividade Antimicrobiana

Estes experimentos foram realizados no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, no Instituto Butantã, sob a orientação do Prof. Pedro I. Silva Jr. Os microorganismos (*Micrococcus luteus* cepas BR32, resistente ao antibiótico ácido nalidíxico, e A270 e *Escherichia coli* cepas D31, resistente à ampicilina e estreptomicina, e SBS 363) foram cultivados em meio PB (poor broth nutrient; PB: 1 g de peptona em 100 mL de água contendo 86 mM NaCl, pH 7,4, 217 mOsm) e

os ensaios foram realizados segundo Riciluca e colaboradores (2012), sendo que a atividade contra cada microorganismo foi realizada em quatro medidas independentes. A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada em um ensaio de diluição seriada dos peptídeos (a faixa de concentração foi de 100 µM a 20 nM) em placas de 96 poços com volume final de 100 µL. A concentração de microorganismos em cada poço era de 1×10^5 unidades formadoras de colônia/mL. Foi utilizado o meio de cultura como controle negativo e a suspensão de microorganismos como controle positivo. As placas foram incubadas por 18 h a 30 °C, sob agitação constante. A inibição do crescimento foi avaliada pela medida da absorbância em 595 nm.

3.2.3 – Ensaio de Atividade Hemolítica

Estes experimentos também foram realizados no Laboratório especial de toxinologia aplicada, no Instituto Butantã, sobre a orientação do Prof. Pedro I. Silva Jr, sendo que os ensaios foram realizados segundo Riciluca e colaboradores (2012). Os eritrócitos humanos foram coletados em tampão citrato 150 mM, pH 7,4, e lavados três vezes por centrifugação (700g, 10 minutos, 4 °C) com tampão fosfato salino (PBS) 150 mM, pH 7,4. Após a última centrifugação, os eritrócitos foram ressuspensos em PBS, pH 7,4. A determinação da atividade hemolítica foi realizada em um ensaio de diluição seriada dos peptídeos (a faixa de concentração foi de 170 µM a 200 nM) em placas de 96 poços com um volume final de 100 µL e 3% (v/v) de eritrócitos. As placas foram incubadas por 3 hs à 37 °C. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada, o sobrenadante foi coletado e a hemólise foi determinada pela medida de absorção em 414 nm do sobrenadante. Foi utilizado PBS como controle negativo e a adição de 0,1% (v/v) de Triton X-100 como controle positivo. A porcentagem de hemólise foi calculada segundo a **equação 3.2**:

$$H = \frac{(A_{Pep} - A_{CN})}{(A_{CP} - A_{CN})} \times 100 \quad \text{(Equação 3.2)}$$

onde H é a porcentagem de hemólise, A_{Pep} é absorção na presença do peptídeo, A_{CN} é absorção do controle negativo e A_{CP} é absorção do controle positivo.

3.2.4 – Técnicas Espectroscópicas

A espectroscopia molecular é o estudo da interação da radiação eletromagnética com as moléculas. O uso de técnicas espectroscópicas para o estudo de biomoléculas e processos biológicos fornece informações importantes sobre estrutura, dinâmica e função. A **Figura 3.1** ilustra o espectro eletromagnético dividido por energias (medida em unidades de frequência ou comprimento de onda) e a faixa do espectro empregada pelas técnicas espectroscópicas mais usuais nos estudos de sistemas biológicos. Na **Figura 3.2** está apresentada uma ilustração de tipos de interação da radiação eletromagnética com moléculas e técnicas espectroscópicas baseadas em cada tipo de interação.

Figura 3.1 – Espectro eletromagnético dividido por energia (frequência, ν , ou comprimento de onda, λ) e faixa do espectro utilizada pelas técnicas espectroscópicas mais usuais no estudo de sistemas biológicos.

Figura 3.2 – Esquema representando tipos de interação da radiação eletromagnética com moléculas e técnicas espectroscópicas baseadas em cada tipo de interação.

3.2.4.1 – Fluorescência

A emissão de fótons com energia na região do UV, visível ou infravermelho de uma espécie eletronicamente excitada é conhecida como Luminescência. A fluorescência e a fosforescência são casos particulares da luminescência. Nestes casos, o modo de excitação é a absorção de um fóton, a qual leva a espécie que absorveu para um estado eletrônico excitado. A emissão de fótons acompanhando a desexcitação, conhecida como fotoluminescência (fluorescência, fosforescência), é um dos possíveis efeitos físicos resultantes da interação da radiação eletromagnética com moléculas (Valeur, 2001).

A fluorescência e a fosforescência são distinguidas pela natureza do estado excitado. Na fluorescência o estado excitado é singlete, assim, o elétron no orbital excitado está pareado (com spin oposto) com o elétron que se encontra no orbital do estado fundamental. Consequentemente, o retorno para o estado fundamental é uma transição permitida e a emissão ocorre com velocidade da ordem de 10^8 s^{-1} . Na fosforescência o estado excitado é triplete, assim, o elétron no orbital excitado não está pareado (com mesmo spin) que o elétron no estado fundamental. Consequentemente, o retorno para o estado fundamental é uma transição proibida e a emissão ocorre com uma velocidade de 10^3 a 10^0 s^{-1} (Lakowicz, 2006).

A primeira vez que o termo fluorescência apareceu na literatura foi em 1852, quando Sir G. G. Stokes demonstrou que o brilho azul de uma solução de sulfato de quinino, obtido pela iluminação da solução com a porção do espectro solar depois do violeta (obtida com um prisma), era um fenômeno de emissão de luz seguida da absorção de luz. Entretanto, o primeiro trabalho que reporta o fenômeno data de 1565, quando Nicolas Monardes descreveu uma cor azul peculiar em uma infusão de uma madeira chamada *Lignum Nephriticum* (Valeur, 2001).

As características da fluorescência de uma molécula: espectro (gráfico da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda ou número de onda), comprimento de onda de máxima emissão ($\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}}$), tempo de vida do estado excitado (τ_F) e rendimento quântico (Φ_F , razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos), são dependentes da estrutura química

da molécula e afetadas por qualquer processo do estado excitado, envolvendo interações da molécula excitada com o ambiente ao seu redor, podendo, assim, fornecer informações a respeito deste microambiente (Valeur, 2001). Como consequência da forte influência do microambiente na fluorescência, moléculas fluorescentes são utilizadas como sondas em investigações físico-químicas, bioquímicas e em sistemas biológicos. As sondas fluorescentes podem ser divididas em 3 classes: (i) sondas intrínsecas (são ideais, entretanto, não existem em grande extensão; um exemplo deste tipo de sonda é o aminoácido triptofano); (ii) sondas extrínsecas associadas; (iii) sondas extrínsecas covalentemente ligadas (possuem a vantagem sobre as sondas extrínsecas associadas pois a localização da sonda é conhecida) (Valeur, 2001).

O sucesso da fluorescência como uma ferramenta investigativa no estudo da estrutura e dinâmica de biomoléculas e sistemas biológicos deve-se à alta sensibilidade da técnica, à especificidade das características da fluorescência de uma molécula ao seu microambiente e à capacidade de fornecer informação espacial e temporal (Valeur, 2001).

3.2.4.1.A – Diagrama de Perrin-Jablonski

Uma maneira conveniente e simples para visualizar as transições radiativas e não radiativas entre estados eletrônicos é o diagrama de Perrin-Jablonski (**Figura 3.3 A**).

No diagrama de Perrin-Jablonski apresentado (**Figura 3.3A**) está considerada uma molécula diatômica, entretanto a discussão a seguir também se aplica a moléculas poliatômicas. O estado eletrônico fundamental singlete (S_0), o primeiro estado eletrônico excitado singlete (S_1) e o primeiro estado eletrônico excitado tripleto (T_1) estão representados por curvas de energia potencial. Os níveis vibracionais dos estados eletrônicos, fundamental e excitados, estão representados por linhas horizontais (McQuarrie e Simon, 1997).

Segundo o princípio de Franck-Condon, tendo os elétrons uma massa muito menor do que a dos núcleos, o movimento dos elétrons é considerado como

instantâneo em relação ao movimento dos núcleos. Consequentemente, quando um elétron realiza uma transição de um estado eletrônico para outro, os núcleos não se movem consideravelmente durante a transição. Assim, transições eletrônicas podem ser representadas por linhas verticais no diagrama (McQuarrie e Simon, 1997).

Figura 3.3. Ilustração da absorção e subsequente vias de desexcitação. (A) Diagrama de Perrin-Jablonski, com estados eletrônicos representados por curvas de energia potencial em função da distância interatômica, para uma molécula diatômica: 1, absorção (transição $S_0 \rightarrow S_1$ radiativa); 2, fluorescência (transição $S_1 \rightarrow S_0$ radiativa); 3, conversão interna (transição $S_1 \rightarrow S_0$ não radiativa); 4, cruzamento intersistemas (transição $S_1 \rightarrow T_1$ não radiativa); 5, fosforescência (transição $T_1 \rightarrow S_0$ radiativa); 6, cruzamento intersistema (transição $T_1 \rightarrow S_0$ não radiativa). As setas com linhas onduladas entre estados vibracionais (linhas horizontais) adjacentes ilustram o processo não radiativo de relaxação vibracional. (B) Ilustração das posições relativas das bandas de absorção, fluorescência e fosforescência.

A absorção para S_1 (seta 1 no diagrama) produz uma molécula que está em um estado vibracional (e, possivelmente, rotacional) excitado. A molécula no

estado excitado pode relaxar por mecanismos radiativos (setas com linhas sólidas) ou não radiativos (setas com linhas onduladas, dentro de um estado eletrônico, ou tracejadas, entre estados eletrônicos). Na ausência de colisões, a molécula excitada apenas realiza processos que conservam energia e, assim, o retorno para o estado fundamental envolve a emissão de um fóton. Colisões entre a molécula excitada e outras moléculas na amostra (por exemplo, do solvente), no entanto, podem resultar na troca de energia, a qual remove parte da energia vibracional excedente. Este processo é denominado *relaxação vibracional* (setas com linhas onduladas no diagrama). Por causa da relaxação vibracional, uma molécula excitada rapidamente relaxa para o estado vibracional de menor energia de S_1 . Uma vez que a molécula alcança o estado vibracional de menor energia de S_1 ela pode relaxar para um dos níveis vibracionais de S_0 tanto pela emissão de um fóton quanto por uma transição não radiativa (por colisões). O processo de decaimento radiativo envolve a transição entre estados de mesma multiplicidade de spin e é denominado fluorescência (seta 2 no diagrama). O processo de decaimento não radiativo também envolve a transição entre estados de mesma multiplicidade de spin e é denominado conversão interna (IC, seta 3 no diagrama) (McQuarrie e Simon, 1997).

No diagrama, alguns níveis vibracionais de S_1 sobrepõem-se com níveis vibracionais de T_1 . Quando tal sobreposição ocorre, a molécula pode realizar uma transição não radiativa entre estados de diferente multiplicidade de spin, um processo denominado cruzamento inter-sistemas (ISC, seta 4 no diagrama). Visto que ISC necessita de uma mudança no spin do elétron, ele é, geralmente, um processo mais lento que IC. Caso ISC produza uma molécula no estado T_1 com excesso de energia vibracional, a relaxação vibracional pode ocorrer no estado T_1 , até que a molécula alcance o nível vibracional de menor energia deste estado. Tendo a molécula alcançado o nível vibracional de menor energia de T_1 ela pode relaxar para um dos níveis de energia vibracional de S_0 tanto pela emissão de um fóton quanto por uma transição não radiativa. O processo de decaimento radiativo envolve a transição entre estados de multiplicidade de spin diferentes ($T_1 \rightarrow S_0$) e é denominado fosforescência (seta 5 no diagrama). O processo de decaimento não radiativo também envolve transição entre estados de multiplicidade de spin diferentes e é outro exemplo de ISC (seta 6 no diagrama). A fosforescência, por

necessitar de uma mudança no spin do elétron, é um processo mais lento que a fluorescência (McQuarrie e Simon, 1997).

A relaxação vibracional ocorre em escala de tempo (10^{-14} s) menor do que a fluorescência (10^{-8} s). Sendo assim, pode-se assumir que a molécula excitada relaxa para o estado vibracional de menor energia do estado eletrônico S_1 antes da fluorescência ocorrer (McQuarrie e Simon, 1997).

O retorno para o estado fundamental via fluorescência ocorre tipicamente para um nível vibracional de maior energia do estado fundamental, o qual então sofre um processo de relaxação vibracional alcançando o nível vibracional de menor energia do estado fundamental. Uma consequência interessante da emissão para o nível vibracional de maior energia do estado fundamental é que o espectro de emissão tipicamente é imagem especular do espectro de absorção da transição $S_0 \rightarrow S_1$, em energias menores. Além do mais, pelo estado eletrônico T_1 ser de energia menor do que o estado eletrônico S_1 , a fosforescência ocorre em energias menores do que a fluorescência (**Figura 3.3 B**) (Lakowicz, 2006).

3.2.4.1.B – Efeito do Solvente

Desde o trabalho pioneiro de Berthelot e Péan de Saint-Gilles em 1862, tem sido bem documentado que solventes influenciam fortemente a velocidade de reação e a o equilíbrio químico. Tal dependência com o solvente também é observada para as bandas espectrais de espécies individuais medidas por técnicas espectroscópicas (por exemplo, UV-visível, infravermelho, fluorescência, RMN, RPE) (Valeur, 2001).

As bandas de absorção e fluorescência podem sofrer deslocamentos induzidos por mudança na natureza ou composição do solvente; estes deslocamentos são evidências experimentais de mudanças na energia de solvatação. Em outras palavras, quando um soluto está circundado por moléculas de solvente, o seu estado fundamental e seu estado excitado estão mais ou menos estabilizados por interações soluto-solvente, dependente da natureza química de ambas as moléculas. Interações soluto-solvente são usualmente descritas em

termos de interações de van der Waals e possíveis interações específicas, como ligação de hidrogênio (Valeur, 2001).

Na maioria dos casos, o momento de dipolo de uma molécula no estado excitado (μ_e) difere daquele do estado fundamental (μ_g). De fato, a absorção de um fóton por uma molécula ocorre em escala de tempo menor em relação ao deslocamento dos núcleos (princípio de Franck-Condon), mas permite a redistribuição dos elétrons, a qual resulta em quase instantânea mudança no momento de dipolo. Geralmente, $\mu_e > \mu_g$ para moléculas sensíveis à polaridade. Como consequência, após excitação, a camada de solvatação se reorienta, diminuindo a energia do estado excitado. Quanto maior a polaridade do solvente, menor a energia do estado excitado e maior o deslocamento do espectro de fluorescência para o vermelho. Este processo é denominado *relaxação com o solvente* (Valeur, 2001). Vale lembrar que a velocidade de reorientação do solvente depende da viscosidade do mesmo. Se o tempo para a reorientação das moléculas de solvente da camada de solvatação é pequeno comparado ao tempo de vida do estado excitado, a relaxação com o solvente ocorrerá antes da emissão. Entretanto, se o meio é muito viscoso para permitir uma rápida reorientação das moléculas do solvente, a emissão ocorre sem a relaxação com o solvente, resultando em emissão de um estado excitado de maior energia (Valeur, 2001).

O uso comum de efeitos de solvente é estimar a polaridade do sítio de ligação de uma molécula fluorescente em uma macromolécula. Isto é realizado por comparação do espectro de emissão e/ou rendimento quântico quando o fluoróforo está ligado a uma macromolécula ou dissolvido em solventes de diferentes polaridades. Estas mudanças espectrais podem ser utilizadas para medir a extensão da ligação (Lakowicz, 2006).

Embora pareça simples interpretar espectros de emissão baseados em efeitos do solvente, este é um tópico muito complexo. Isto se deve ao fato de moléculas fluorescentes geralmente realizarem múltiplas interações (ligações de hidrogênio, transferência de carga, interações sonda-sonda, solvatação preferencial) com o seu microambiente, as quais podem deslocar o espectro em quantidades comparáveis aos efeitos gerais dos solventes. Os efeitos originados

destas interações são denominados efeitos específicos do solvente (Lakowicz, 2006).

3.2.4.1.C – Supressão de Fluorescência

A supressão de fluorescência se refere a qualquer processo que diminua a intensidade de fluorescência de uma molécula. Entre estes se encontram reações do estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, interação com espécies paramagnéticas, formação de complexos do estado fundamental e supressão colisional (Lakowicz, 2006).

O grupamento nitróxido (espécie paramagnética), presente em marcadores de spin utilizados na investigação de propriedades conformacionais, dinâmicas e de parâmetros físico-químicos de biomoléculas e agregados moleculares por meio de medidas de RPE, é um supressor de fluorescência eficiente. De modo que estas espécies estão sendo utilizadas para obter informações da inserção de proteínas e peptídeos em membranas lipídicas e alterações conformacionais sofridas por esses polipeptídeos por meio de medidas de fluorescência.

No caso da supressão colisional, o supressor deve difundir-se até a molécula fluorescente durante o tempo de vida do estado excitado. Devido ao contato, a molécula retorna para o estado fundamental sem emissão de fóton. De modo geral, a supressão ocorre sem qualquer tipo de mudança permanente nas moléculas, ou seja, sem reação fotoquímica. Devido à necessidade de contato, entre a molécula fluorescente e o supressor, para a supressão ocorrer, estudos de supressão colisional podem dar informações da acessibilidade do supressor à molécula fluorescente. Assim, esses estudos podem ser utilizados, por exemplo, para identificar a localização de uma molécula fluorescente em uma proteína ou membrana (Lakowicz, 2006).

A supressão de fluorescência colisional é descrita pela equação de Stern-Volmer (**Equação 3.3**):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_Q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad \text{(Equação 3.3)}$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente, k_Q é a constante de supressão por unidade de concentração, τ_0 é o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo na ausência do supressor, $[Q]$ é a concentração do supressor e K_{SV} é a constante de Stern-Volmer (Lakowicz, 2006).

O plote de F_0/F versus $[Q]$, conhecido como curva de Stern-Volmer, para moléculas fluorescentes com mesma acessibilidade ao supressor é linear; e o coeficiente angular da reta é igual à K_{SV} . O Valor de K_{SV} nos informa quão acessível à molécula fluorescente é ao supressor; quanto menor o valor de K_{SV} menor a acessibilidade.

3.2.4.1.D – Fluorescência em Polipeptídeos

Dentre os biopolímeros, as proteínas são especiais por apresentarem fluoróforos intrínsecos. Em proteínas, três aminoácidos são responsáveis pela fluorescência, os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Estes aminoácidos, geralmente, são pouco abundantes em proteínas, o que facilita a interpretação dos dados espectrais (Lakowicz, 2006). Uma característica valiosa da fluorescência intrínseca de proteínas é a alta sensibilidade do triptofano ao microambiente (polaridade e mobilidade). Mudanças espectrais do triptofano geralmente ocorrem em resposta a mudanças conformacionais, associações de subunidades, ligação de substrato, desnaturação, mudanças de polaridade do meio. Esta alta sensibilidade da emissão do triptofano a detalhes do seu microambiente permite o estudo da função, dinâmica e enovelamento de proteínas (Lakowicz, 2006).

No caso, entretanto, da presença de múltiplos aminoácidos fluorescentes a interpretação dos espectros de fluorescência pode ser complicada. A sobreposição espectral devida às diferenças nas propriedades espectrais de cada resíduo (diferentes microambientes), junto com a possibilidade de ocorrer transferência de energia ressonante entre aminoácidos doadores e aminoácidos aceptores (por exemplo, F-W, F-Y, Y-W, W-W), torna a separação das contribuições espectrais de cada resíduo difícil.

3.2.4.1.E – Ensaios de permeabilidade de vesículas lipídicas

A atividade permeabilizante dos peptídeos foi avaliada pelo vazamento do conteúdo interno de vesículas lipídicas (Weinstein et al., 1977). Vesículas unilamelares grandes (LUV) com composição desejada foram preparadas contendo a molécula fluorescente carboxifluoresceína (CF) no compartimento aquoso interno. Em altas concentrações CF apresenta auto-supressão da fluorescência. Caso o peptídeo permeabilize a vesícula, o vazamento da molécula fluorescente resulta na sua diluição e consequente aumento da fluorescência.

As composições lipídicas das LUVs (em moles %) foram: POPE:POPG:TOCL (67:23:10, mimetiza a membrana plasmática da bactéria Gram-negativa *E. coli*), POPC:POPG 80:20, POPC:POPG 60:40, POPC:TOCL 90:10, POPC:TOCL 80:20, POPC:POPS 80:20 e POPC:POPA 80:20. Soluções estoque dos fosfolípidios utilizados no preparo das LUVs de composição desejada foram preparadas em clorofórmio:metanol (2:1, v/v). A concentração das soluções foi determinada segundo o método de dosagem de fosfato inorgânico de Rouser (1970). Filmes lipídicos de composição desejada foram obtidos em tubos de ensaio pela evaporação sob fluxo de N₂ dos volumes adequados das soluções estoque em clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e, a seguir, mantidos sob vácuo por pelo menos 2 h, de forma a assegurar a eliminação de todo o solvente. Os filmes foram ressuspensos com uma solução contendo 50 mM CF, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, através de agitação vigorosa em vórtex por 15 min. Dependendo da composição lipídica, foi necessário colocar em banho de ultrassom por 5 min para soltar por completo o filme da parede do tubo e ressuspê-lo. Após ressuspensos, os filmes passaram por 5 ciclos de congelamento-descongelamento e, a seguir, foram submetidos a 21 ciclos de extrusão em um extrusor Avestin, à temperatura acima da transição de fase de todos os lípidios utilizados. A extrusão foi realizada através de membranas de polycarbonato com diâmetro do poro de 100 nm. A CF presente no meio externo das LUVs foi removida em uma coluna Sephadex G-25 pré-equilibrada com tampão 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 7,4. As LUVs foram coletadas no volume morto da coluna e mantidas a 4 °C antes do uso. A concentração das LUVs após a gel filtração foi determinada segundo o método de dosagem de fosfato inorgânico de Rouser (1970).

Os ensaios de vazamento foram realizados em placas de 96 poços monitorando a fluorescência com excitação e emissão em 492 e 520 nm, respectivamente, com filtro de emissão de 515 nm em um leitor de fluorescência de placas da Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Cada poço teve um volume de 140 μ L, o qual continha 20 μ M lipídio com uma diluição seriada dos peptídeos em uma faixa de concentração de 80 μ M a 40 nM. A fluorescência foi monitorada por 10 horas, sendo medida a cada 3 minutos. A placa foi agitada a cada 5 segundos e os experimentos foram realizados a 37 °C para as LUVs de *E. coli* e a 25 °C para as demais composições. Seis poços foram utilizados como controle negativo apenas contendo as vesículas carregadas com CF e outros seis para o controle positivo, os quais continham as vesículas carregadas com CF na presença 10% (v/v) Triton X-100. O vazamento foi avaliado utilizando a **equação 3.4**:

$$\text{Vazamento (\%)} = \frac{(F_P - F_0)}{(F_T - F_0)} \times 100 \quad (\text{Equação 3.4})$$

onde F_0 é a intensidade de fluorescência média dos controles negativos, F_T é a intensidade de fluorescência média dos controles positivos e F_P é a intensidade de fluorescência na presença das diferentes concentrações dos peptídeos.

A capacidade permeabilizante dos peptídeos foi avaliada pela construção de gráficos de vazamento após 10 horas em função da relação molar lipídio:peptídeo. A **equação 3.5** foi ajustada aos dados para obter o fator de cooperatividade (n) e a relação molar lipídio:peptídeo necessária para causar 50% de vazamento (LP_{50}).

$$\text{Vazamento após 10 hs (\%)} = 100 \times \frac{LP^n}{(LP_{50}^n + LP^n)} \quad (\text{Equação 3.5})$$

onde LP é a relação molar lipídio:peptídeo, LP_{50} é a relação molar lipídio:peptídeo necessária para causar 50% de vazamento após 10 horas e n é o fator de cooperatividade.

A velocidade inicial de vazamento (V_0) foi obtida pelo ajuste de uma reta aos pontos da curva cinética na região linear em tempos iniciais como exemplificado na **Figura 3.4A**. Em curvas cinéticas com comportamento bifásico, o tempo de início do segundo vazamento foi obtido pela intersecção das retas quando da saturação do primeiro e início do segundo vazamento como exemplificado na **Figura 3.4B**.

Figura 3.4 – Ilustração do ajuste de equação linear aos dados cinéticos para obtenção dos valores de (A) V_0 (min^{-1}) e (B) tempo de início do segundo vazamento. Em vermelho a reta ajustada aos dados e nos insertos os parâmetros dos ajustes.

3.2.4.1.F – Ligação às membranas modelo

O estudo da ligação dos peptídeos às membranas modelo foi realizado utilizando a fluorescência intrínseca dos peptídeos devido à presença de resíduo(s) de W na sequência destes. A fluorescência dos resíduos de W é sensível à polaridade do ambiente, sendo assim, foi possível estudar a partição dos peptídeos em membranas modelo (Lakowicz, 2006). Para tanto titulamos as membranas modelo (LUVs e micelas) de composição desejada em uma solução de peptídeo.

As composições das LUVs foram iguais àsquelas dos estudos de permeabilidade e o seu preparo foi semelhante, exceto o tampão para ressuspender o filme lipídico que neste caso foi 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 (**3.2.4.1.E**). As composições das micelas (em moles %) foram: LPC:LPG (8:2) e LPC:LPA (8:2). Soluções estoque dos lisofosfolipídios utilizados no preparo das micelas foram preparadas em clorofórmio:metanol (2:1, v/v). A concentração das soluções foi determinada segundo o método de dosagem de fosfato inorgânico de Rouser (1970). Filmes dos lisolipídios de composição desejada foram obtidos em tubos de ensaio pela evaporação sob fluxo de N_2 dos volumes adequados das soluções estoque em clorofórmio:metanol (2:1, v/v) e, a seguir, mantidos sob

vácuo por pelo menos 2 h, de forma a assegurar a eliminação de todo o solvente. Os filmes foram ressuspensos em tampão 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 em banho de ultrassom por 5 min.

A fluorescência dos peptídeos foi adquirida em um fluorímetro da Hitachi modelo F-4500 interfaciado com um computador a 37 °C para o estudo da ligação à LUVs de *E. coli* e a 23 °C para as demais membranas modelo. Os espectros foram adquiridos com $\lambda_{ex} = 280$ nm, varrendo a emissão de 310-450 nm com uma velocidade de 60 nm.min⁻¹, utilizando polarizadores cruzados (0° na excitação e 90° na emissão), fendas de excitação e emissão de 5 e 10 nm, respectivamente, e voltagem da fotomultiplicadora de 700 V. As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 2 mm para excitação e 10 mm para emissão. Os peptídeo foram preparados a uma concentração de 5 µM a partir das soluções estoques em tampão 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4. As membranas modelo foram tituladas nas soluções peptídicas em uma faixa de concentração de 0,0-1,0 mM e 0,0-1,5 mM para LUVs e micelas, respectivamente. Todas as amostras tiveram os respectivos brancos (membranas tituladas no tampão) adquiridos, subtraídos e os espectros foram corrigidos para efeitos de diluição.

Para corrigir artifícios de espalhamento de luz devido ao aumento da concentração das LUVs, titulamos as LUVs em uma solução do análogo do W N-acetil-triptofanamida (NATA), o qual não se liga as LUVs e corrigimos as intensidades de fluorescência de acordo com a **equação 3.6** (Ladokhin et al., 2000):

$$I_p^{Corrigida}([L]) = I_p([L]) \times \frac{I_{NATA}^{Tampão}}{I_{NATA}([L])} \quad (\text{Equação 3.6})$$

onde $I_p([L])$ é a intensidade de fluorescência da solução peptídica em uma determinada concentração de LUV, $I_{NATA}^{Tampão}$ é a intensidade de fluorescência de NATA no tampão e $I_{NATA}([L])$ é a intensidade de fluorescência de NATA na mesma concentração de LUV que aquela do peptídeo.

As isotermas de ligação foram construídas pelo plote da relação da intensidade fluorescência na presença (F) e ausência (F_0) das membranas modelo

em um comprimento de onda constante em função da concentração dos fosfolipídios ou lisofosfolipídios. A **equação 3.7** foi ajustada aos dados de modo a obter uma constante de ligação aparente (K_B):

$$\frac{F}{F_0} = 1 + (F_{M\acute{a}x} - 1) * \frac{x^n}{k^n + x^n} \quad \text{Equação 3.7}$$

onde $F_{M\acute{a}x}$ é a relação da intensidade de fluorescência em condições de saturação, x é a concentração do fosfolipídio ou lisofosfolipídio, k é a concentração de fosfolipídio ou lisofosfolipídio em $F_{M\acute{a}x}/2$ e n é o fator de cooperatividade (as isotermas de ligação tiveram a forma de uma hipérbole retangular e $n = 1$). Assumindo uma estequiometria peptídeo:fosfolipídio/fosfolisoplipídio de 1:1 obtivemos K_B a partir de $1/k$.

Para o cálculo da energia livre de partição (ΔG_x^0) utilizamos a **Equação 3.8** (White e Wimley, 1999):

$$\Delta G_x^0 = -R * T * \ln K_B - R * T * \ln([H_2O]) \quad \text{Equação 3.8}$$

Onde $R = 1,987 \text{ cal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ (constante dos gases), T a temperatura em K, $[H_2O] = 55,5 \text{ M}^{-1}$ e K_B a constante de ligação aparente obtida a partir das isotermas de ligação.

3.2.4.1.G – Localização dos peptídeos em membranas modelo através da supressão da fluorescência intrínseca dos peptídeos

A localização dos peptídeos em membranas modelo foi investigada através de experimentos de supressão da fluorescência intrínseca dos peptídeos. Espectros de fluorescência foram adquiridos e processados como nos experimentos de ligação às membranas modelo (**3.2.4.1.F**). A supressão da fluorescência foi realizada com o uso de acrilamida, um supressor aquossolúvel, e por marcadores de spin fosfolipídicos com o grupamento nitróxido (supressor) ligado na cabeça polar e em diferentes posições ao longo da cadeia acila *sn*-2 intercalado nas LUVs e por marcadores de spin com o grupamento nitróxido ligado

em diferentes posições ao longo da cadeia acila do metil éster de ácido esteárico intercalado em micelas (**Tabela 3.2**).

A supressão com acrilamida foi realizada titulando esta (faixa de concentração de 0-200 mM) em uma solução 5 μ M de peptídeo em tampão 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 na ausência e presença de 1,0 mM LUV e 1,5 mM micelas. As composições e o preparo das membranas modelo foi como descrito na seção **3.2.4.1.F**. Os experimentos com LUVs de *E. coli* foram realizados a 37 °C e das demais composições de membranas modelo a 23 °C. A acessibilidade da acrilamida ao(s) resíduo(s) de W dos peptídeos na ausência e presença das membranas modelo foi avaliado pela plote de Stern-Volmer e valores de K_{SV} obtidos a partir deste (**3.2.4.1.C**).

A supressão da fluorescência intrínseca dos peptídeos com marcadores de spin intercalados nas membranas modelo foi realizada de acordo com Schibli et al. (2002) e Ladokhin (2014). Espectros de fluorescência de uma solução 5 μ M de peptídeo em 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 foram adquiridos na presença de LUVs (300 μ M para TRP3 e WLW e 600 μ M para LWL) ou micelas (1 mM) contendo ou não os marcadores de spin intercalados nestas. As composições e o preparo das membranas modelo foi como descrito na seção **3.2.4.1.F**. As membranas modelo foram preparadas sem marcadores de spin intercalados ou na intercalação de 30 mol % destes. As soluções estoques dos marcadores de spin foram preparadas em clorofórmio e suas concentrações determinadas segundo o método de dosagem de fosfato inorgânico de Rouser (1970) e/ou por RPE utilizando o padrão TEMPOL para a construção da curva de calibração. Quando presentes, os marcadores de spin substituíram os lipídios zwitteriônicos POPC, POPE e LPC. Os experimentos com LUVs de *E. coli* foram realizados a 37 °C e das demais composições de membranas modelo a 23 °C. A extensão da fluorescência foi medida pela relação $F/F_0 - 1$, onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência dos peptídeos na presença das membranas modelo sem e com marcadores de spin intercalados, respectivamente. Gráficos de $F/F_0 - 1$ em função da posição do grupamento nitróxido nos marcadores de spin foram construídos para avaliar o perfil de supressão dependente da profundidade (PSDP).

3.2.4.2 – Dicroísmo Circular (CD)

Espectroscopia quiroóptica refere-se à espectroscopia utilizando luz circularmente polarizada e, especialmente, aos tipos de espectroscopia que utilizam diferenças na interação de moléculas com a luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, na ausência de campo magnético. Para exibir tais diferenças, uma molécula deve ser quiral, ou seja, sua imagem especular não pode ser sobreponível. Dicroísmo circular (CD) e dispersão óptica rotatória (ORD) são os tipos de espectroscopia quiroóptica mais utilizados (Woody, 1996). Em 1895, Aimé Cotton descreveu o CD e a ORD anômala de soluções, as quais se deviam a bandas de absorção de moléculas opticamente ativas; juntos CD e a ORD correspondente são atualmente denominados como efeito Cotton. Do meio dos anos de 1950 a começo dos anos de 1960, quase todos os dados de propriedades quiroópticas de proteínas eram limitados à ORD nas regiões do visível e ultravioleta próximo. Desde então, ORD foi substituída por CD no estudo conformacional de biopolímeros, principalmente porque as bandas de CD na região do ultravioleta distante, para as várias conformações, podem ser observadas experimentalmente de forma direta. ORD é uma propriedade dispersiva e CD, absorptiva, mas estão correlacionadas pela transformação geral de Kronig-Kramers (Yang, 1996).

O método para medir o CD de uma molécula utiliza como vantagem o fato de que quando a luz plano-polarizada atravessa um meio assimétrico, a absorção diferencial das duas componentes circulares converte a luz plano-polarizada em luz elipticamente polarizada (**Figura 3.5**). Quando os vetores elétricos das duas componentes circulares estão na mesma direção, a soma das magnitudes dá o eixo maior da elipse, e quando estão em direções opostas, a diferença das magnitudes dá o eixo menor da elipse. O CD pode ser caracterizado pela razão dos eixos menor e maior da elipse, a qual é a tangente do ângulo θ (que, por ser muito pequeno, pode ser aproximado para θ), denominado elipticidade. A elipticidade é diretamente proporcional ao CD (**Equação 3.9**):

$$\theta \text{ (grau)} = 2,303. (A_E - A_D). \frac{180}{4\pi} = 2,303. (\varepsilon_E - \varepsilon_D). C. l. \frac{180}{4\pi} \quad \text{(Equação 3.9)}$$

onde A_E e A_D são as absorções da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, respectivamente; ϵ_E e ϵ_D são os coeficientes de extinção molar da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, respectivamente; C é a concentração do soluto e l é o caminho óptico. Para remover a dependência linear trivial do caminho óptico e da concentração do soluto, define-se a elipticidade molar $[\theta]$ (**Equação 3.10**). A unidade de $[\theta]$ é grau.cm².dmol⁻¹ (Woody, 1996).

$$[\theta] = \frac{100 \cdot \theta}{c \cdot l} = 3.298 \Delta\epsilon \quad (\text{Equação 3.10})$$

Figura 3.5 – Esquema da luz elipticamente polarizada (roxo) formada pela luz circularmente polarizada à direita (azul) e à esquerda (vermelho) com intensidades diferentes.

O CD é uma das técnicas físicas mais sensíveis para determinar estruturas e monitorar mudanças estruturais de biomoléculas. Os espectros de CD de proteínas e peptídeos no UV distante (abaixo de 250 nm) são sensíveis à estrutura secundária destas moléculas, enquanto os espectros no UV próximo (250 – 350 nm) são sensíveis ao arranjo das cadeias laterais dos resíduos aromáticos (F, Y, W). Nesta região aparecem também bandas correspondentes a ligações dissulfeto e a grupos prostéticos (Venjaminov e Yang, 1996).

O estudo de polipeptídios por CD no UV distante baseia-se na absorção da radiação ultravioleta (UV) pela ligação peptídica. A luz UV circularmente polarizada terá suas componentes absorvidas diferencialmente de acordo com o conjunto de ângulos ϕ e ψ das ligações $C\alpha - N$ e $C\alpha - C$, respectivamente (**Figura 3.6**). Desta forma, o espectro de CD é dependente do conjunto de ângulos ϕ e ψ do polipeptídio. Tais ângulos de torção (**Figura 3.6**) são determinantes da estrutura secundária de polipeptídeos; desta maneira, por meio do espectro de CD é possível caracterizar a estrutura secundária de uma proteína ou peptídeo.

Figura 3.6. – Representação esquemática da ligação peptídica, evidenciando os ângulos ϕ e ψ . Código de cores: preto = carbono α ; cinza = carbono da carbonila; azul = nitrogênio; branco = hidrogênio; laranja = cadeia lateral; vermelho = oxigênio.

Cada tipo de estrutura secundária, por exemplo, α -hélice, folha β e estrutura ao acaso (equilíbrio entre diferentes conformações), dá origem a espectros característicos. Espectros típicos destas conformações são mostrados na **Figura 3.7**. Os espectros são ainda sensíveis à ocorrência de dobras.

Figura 3.7 – Espectros de CD característicos das estruturas secundárias **(a)** α -hélice, **(b)** folha β pregueada e **(c)** estrutura ao acaso (adaptado de Greenfield e Fasman, 1969).

3.2.4.2.A – Contribuição dos Resíduos Aromáticos no CD

As cadeias laterais dos resíduos aromáticos (F, Y, W) de polipeptídios podem contribuir para os espectros de CD, tanto no UV próximo quanto no UV distante. No UV próximo, as contribuições das cadeias laterais dos resíduos aromáticos para o espectro de CD são amplamente reconhecidas e utilizadas como sondas sensíveis a mudanças conformacionais em polipeptídios e para monitorar a ligação de um ligante; já que esses resíduos são, geralmente,

encontrados em regiões afetadas por mudanças conformacionais e/ou sítios de ligação (Woody e Dunker, 1996).

O entendimento das contribuições aromáticas no espectro de CD na região do UV distante de polipeptídeos se desenvolveu de forma mais lenta do que no UV próximo. No UV distante, as cadeias laterais aromáticas têm transições $\pi \rightarrow \pi^*$ completamente permitidas, as quais são ao menos uma ordem de grandeza mais intensa do que as no UV próximo. Essa maior intensidade deve-se à possibilidade de acoplamento com transições em outros grupos; por exemplo, o acoplamento com transições da ligação peptídica deve resultar em uma transição mais intensa do que no UV próximo por pelo menos uma ordem de grandeza, enquanto o acoplamento com transições em outros resíduos aromáticos deve resultar em uma transição pelo menos duas ordens de grandeza mais intensa (Woody e Dunker, 1996).

A cadeia lateral do W – grupo indol – apresenta quatro bandas de CD. As bandas L_b e L_a , correspondem a transições de menor energia, as quais se sobrepõem na região de 280 nm e as bandas B_b e B_a , correspondem a transições de maior energia, com B_b centrada em 225 nm. Quanto a B_a , acredita-se que seja uma das duas ou três transições fortes na região de 180–210 nm, embora esta não tenha sido demonstrada experimentalmente. A transição para o estado excitado B_b é a transição mais intensa no indol ($\epsilon \sim 3,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Woody e Dunker, 1996).

3.2.4.2.B – Estudos conformacionais dos peptídeos através de CD

O estudo das propriedades conformacionais dos peptídeos foi realizado através do uso de CD no UV distante dos peptídeos em solução aquosa, na presença do solvente indutor de estrutura secundária TFE e das membranas modelo. Os estudos em TFE foram realizados titulando este (conteúdo variou entre 10-90%, v/v) em uma solução de peptídeos em água pH 7,2. Os estudos com membranas modelo foram realizados titulando as LUVs (0-250 μM) e micelas (0-2,0 mM) em uma solução de peptídeo em tampão fosfato 2,5 mM, pH 7,4. As composições das LUVs e micelas foram iguais àsquelas dos estudos de

fluorescência e o seu preparo foi semelhante, exceto o tampão para ressuspender o filme lipídico que neste caso foi 2,5 mM fosfato, pH 7,4 (**3.2.4.1.E** e **F**). Os espectros de CD foram adquiridos a 37 °C para as LUVs de *E. coli* e a 23 °C para as demais composições em um espectropolarímetro da Jasco modelo J-720 ou modelo J-815. As amostras foram lidas em cela de quartzo de 1,0 mm ou 5,0 mm de caminho óptico. A concentração dos peptídeos nas amostras encontra-se na legenda de cada figura. O intervalo de comprimento de onda medido foi de 190 a 260 nm, medidos a cada 0,5 nm com velocidade de varredura de 50 nm.min⁻¹, fenda de 1 nm, tempo de resposta de 8 s e o número de varreduras variou entre 1 e 6. Do espectro obtido subtraiu-se o espectro do branco (obtido nas mesmas condições, só que na ausência dos peptídeos), seguido por um processo de filtragem, utilizando o método de Savitzky-Golay, de forma a eliminar a interferência do ruído gerado durante a aquisição.

3.2.4.3 – Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A ressonância magnética só pode ser observada em espécies que possuem momento magnético diferente de zero, já que o pré-requisito é a interação destas espécies com um campo magnético, de modo semelhante a um ímã (Knowles et al., 1976). Para uma molécula dar sinal na ressonância paramagnética eletrônica (RPE) ela precisa ser paramagnética (elétrons desemparelhados), pois moléculas diamagnéticas (elétrons pareados) possuem momento magnético do spin do elétron igual à zero, devido ao cancelamento efetivo dos spins.

A maioria das moléculas contém elétrons pareados (centros diamagnéticos) já que esta configuração é energeticamente favorável. As exceções a esta regra são íons de metais de transição, os quais se encontram em sistemas biológicos específicos, e radicais livres (intermediários de reações bioquímicas), os quais são espécies instáveis devido à sua alta reatividade. No entanto, com a introdução do método de marcador de spin, a faixa de aplicações de RPE em sistemas biológicos aumentou significativamente (Knowles et al., 1976). As aplicações biológicas de RPE incluem estudos do ambiente de um ligante ao redor de um íon metálico em uma metaloproteína, a detecção de intermediários (radicais livres) de reações

bioquímicas (*spin trapping*) e o estudo de marcadores de spin, o qual pode dar informação dinâmica e estrutural do sistema (Campbell e Dwek, 1984).

3.2.4.3.A – O Método do Marcado de Spin

Marcadores de spin são radicais livres estáveis ligados covalentemente ou associados a macromoléculas ou agregados moleculares. Por meio da análise do espectro de RPE do marcador de spin procura-se obter informação de caráter estrutural e dinâmico do sistema ao qual o marcador encontra-se ligado (Knowles et al., 1976). O método de marcador de spin foi introduzido por Ohnishi e McConnell (1965). O primeiro experimento baseado no princípio do marcador de spin consistiu na introdução do radical cátion da clorpromazina em moléculas de ácido desoxirribonucleico (Ohnishi e McConnell, 1965). Em estudo posterior, McConnell e colaboradores introduziram o radical estável nitróxido covalentemente ligado a proteínas (Stone et al., 1965).

A possibilidade de se obter informações de caráter estrutural (como da natureza conformacional) e dinâmico de macromoléculas ou agregados moleculares reside no fato da RPE ser uma técnica que opera na região de micro-ondas do espectro eletromagnético, a qual corresponde à frequência de movimentos translacionais, rotacionais e/ou segmentais das estruturas em estudo (Schreier, 1979).

Os marcadores de spin mais utilizados são os radicais nitróxidos. Isso se deve ao fato de serem estáveis em solventes de propriedades físico-químicas diferentes, inclusive em meio aquoso, em amplas faixas de pH e temperatura (ambas incluindo a região fisiológica). A estabilidade adicional destes radicais deve-se a presença de grupos metila nos carbonos vizinhos ao átomo de nitrogênio (**Figura 3.8**).

Figura 3.8 – Estrutura geral de um radical nitróxido estabilizado por metilas.

3.2.4.3.B – Introdução à Técnica de RPE

A técnica de RPE se baseia na aplicação de um campo magnético externo (H) na amostra, sob a ação do qual os níveis de energia do momento magnético de spin do elétron ($m_S = \pm 1/2$), antes degenerados, se tornam divergentes (efeito Zeeman). Aplicando a esta amostra uma energia adequada na forma de radiação eletromagnética ($h\nu$), é possível induzir a transição do spin do elétron do estado de menor energia para o estado de maior energia ($m_S = - 1/2 \rightarrow + 1/2$) (**Figura 3.9**). A condição de ressonância para que ocorra a transição entre os níveis de energia do momento magnético de spin do elétron são obedecidas quando:

$$\Delta E = h\nu = g\beta H \quad \text{Equação 3.11}$$

onde h é a constante de Plank, ν é a frequência da radiação eletromagnética, H é o campo magnético externo aplicado, β é o magnéton de Bohr ($9,27408 \times 10^{-28} \text{ J.G}^{-1}$) e g é uma constante de proporcionalidade, a qual depende da espécie magnética considerada ($g = 2,0023$ para o elétron livre). Essa energia absorvida gera um espectro registrado como a primeira derivada da absorção (Knowles et al., 1976).

Figura 3.9 – Desdobramento dos níveis de energia de spin do elétron quando um campo magnético externo é aplicado.

3.2.4.3.C – Espectro de RPE de Nitróxidos

Além da interação do elétron com o campo magnético externo aplicado, os espectros de RPE são sensíveis à interação entre o elétron e os núcleos ao seu redor. No caso de átomos com spin nuclear (I) diferente de zero, os espectros de EPR tornam-se mais complexos, já que estes núcleos apresentam um momento magnético associado ao momento angular de spin nuclear (Wertz e Bolton, 1972). De tal modo que o campo magnético sentido pelo elétron é uma soma vetorial do campo magnético aplicado mais o campo magnético criado pelo spin nuclear. A interação entre o momento magnético do spin do elétron desemparelhado e o momento magnético do spin nuclear é denominada interação hiperfina. Em geral, haverá $(2I + 1)$ níveis de energia do spin nuclear (m_I) no campo magnético, de modo que o espectro de EPR se desdobrará em $(2I + 1)$ linhas. A separação entre as linhas é denominada desdobramento hiperfino (A) e é uma medida da interação hiperfina (Campbell e Dwek, 1984). As transições permitidas devem satisfazer as condições de ressonância: $\Delta m_S = 1$ e $\Delta m_I = 0$.

No caso de radicais nitróxidos, a maior parte da densidade eletrônica está localizada no átomo de nitrogênio. O isótopo mais abundante do nitrogênio, ^{14}N , possui $I = 1$, apresentando, na presença de um campo magnético, três valores para spin nuclear ($m_I = -1, 0, +1$). Neste caso, três transições são observadas, as quais satisfazem as condições de ressonância (**Figura 3.10**) (Schreier, 1979).

Figura 3.10 – Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico por um átomo com spin nuclear, $I=1$. A separação entre as linhas espectrais mede o desdobramento hiperfino.

A energia do sistema de spin é descrita pela Hamiltoniana de spin (**equação 3.12**) (Schreier et al., 1978):

$$\mathcal{H} = \beta_e \vec{H} \vec{g}_e \hat{S} + \hat{S} \vec{A} \hat{I} + \beta_N \vec{H} \vec{g}_N \hat{I} + \mathcal{H}_{\text{Troca}} + \mathcal{H}_{\text{Dipolar}} \quad (\text{Equação 3.12})$$

onde β_e e β_n são os magnétons de Bohr eletrônico e nuclear, respectivamente, $\vec{H}$ é o vetor de campo magnético externo aplicado, $\vec{g}_e$ é o tensor g do elétron cujas componentes principais são g_{xx} , g_{yy} , e g_{zz} , g_n é o fator de desdobramento nuclear Zeeman, $\hat{S}$ é o operador do momento angular de spin do elétron, $\hat{I}$ é o operador de momento angular do spin do núcleo e $\vec{A}$, o tensor de desdobramento hiperfino cujas componentes principais são A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} .

Nessa equação, o primeiro termo representa a interação entre o campo magnético e o spin eletrônico (interação eletrônica do tipo Zeeman), o segundo termo representa a interação entre spin eletrônico e spin nuclear (interação hiperfina), o terceiro, a interação entre o spin nuclear e o campo magnético (termo nuclear de Zeeman), a qual é negligenciável nas condições usuais dos experimentos com marcadores de spin em RPE. E os termos $\mathcal{H}_{\text{Troca}}$ e $\mathcal{H}_{\text{Dipolar}}$ representam as energias envolvidas em interações entre elétrons livres, que ocorrem em bi- ou poli-radicais ou em concentrações elevadas de mono-radicais e também entre radicais e íons metálicos paramagnéticos. $\mathcal{H}_{\text{Troca}}$ depende da interpenetração dos orbitais das espécies paramagnéticas e $\mathcal{H}_{\text{Dipolar}}$ depende da geometria do sistema, uma vez que envolve uma dependência angular (Schreier et al., 1978).

3.2.4.3.D – Dependência dos espectros de RPE da orientação

Uma das características principais dos espectros de RPE é que, em muitos casos, a posição das linhas no campo magnético e os desdobramentos das linhas (especificados pelos valores de g e desdobramento hiperfino, A , respectivamente) dependem da direção do campo magnético aplicado em relação aos eixos moleculares (anisotropia). A anisotropia espectral é muito importante na interpretação dos espectros de íons de metais de transição e, também, é a base fundamental do método de marcador de spin (Knowles et al., 1976).

Os efeitos da anisotropia de g e A podem ser mais facilmente entendidos quando consideramos espectros de RPE de radicais nitróxidos introduzidos como impurezas substitucionais em um monocristal diamagnético (**Figura 3.11**). No sistema de coordenadas atribuído arbitrariamente ao radical nitróxido (**Figura 3.11A**), o eixo x coincide com a direção da ligação N-O, o eixo z coincide com o orbital $2p\pi$ do nitrogênio, onde há maior probabilidade da presença do elétron desemparelhado, e o eixo y é perpendicular aos dois anteriores. A **Figura 3.11B** apresenta espectros de RPE onde o campo magnético aplicado está orientado paralelamente aos principais eixos moleculares do radical nitróxido di-*t*-butil, o qual foi introduzido como impureza substitucional em cristais de tetrametil-1,3-ciclobutadiona (Griffith e Waggoner, 1969). A análise dos espectros mostra claramente a variação dos valores de g e A com a mudança do eixo principal do radical nitróxido que está paralelo ao campo magnético aplicado (**Figura 3.11B**). A anisotropia espectral é especificada pelos valores de g e A na direção dos componentes principais desses tensores (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} e A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} , respectivamente), as quais, geralmente, coincidem com os eixos principais atribuído ao radical nitróxido (Knowles et al., 1976). No caso de nitróxidos, quando o campo magnético estiver alinhado paralelamente ao orbital que contém o elétron desemparelhado (eixo z), o valor de A será máximo ($A_{zz} \sim 32$ G) e o valor de g será mínimo ($g_{zz} \sim 2,002$). Quando o campo magnético estiver paralelo aos eixos y ou x , os valores de A se tornam menores (A_{xx} e $A_{yy} \sim 6$ G) e os de g maiores ($g_{xx} \sim 2,009$ e $g_{yy} \sim 2,006$) (Griffith et al., 1965). Para orientações intermediárias, g e A dependem do ângulo do campo magnético em relação aos eixos principais segundo as **equações 3.13** e **3.14**, respectivamente:

$$g^2(\theta, \phi) = g_{xx}^2 \sin^2 \theta \cos^2 \phi + g_{yy}^2 \sin^2 \theta \sin^2 \phi + g_{zz}^2 \cos^2 \theta \quad (\text{Equação 3.13})$$

$$A^2(\theta, \phi) = A_{xx}^2 \sin^2 \theta \cos^2 \phi + A_{yy}^2 \sin^2 \theta \sin^2 \phi + A_{zz}^2 \cos^2 \theta \quad (\text{Equação 3.14})$$

onde θ é o ângulo entre o campo magnético aplicado (H) e o eixo z do radical nitróxido e ϕ é o ângulo formado entre a projeção de H no plano xy e o eixo x , de acordo com o diagrama da **Figura 3.12**.

Figura 3.11 – Sistema de coordenadas convencionalmente atribuído ao radical nitróxido (a) e espectros do radical nitróxido di-*t*-butil incluído em um monocristal diamagnético de tetrametil-1,3-ciclobutadiona (b). Os espectros foram obtidos para a direção do campo magnético paralela aos eixos x, y e z do nitróxido (adaptado de Griffith e Waggoner, 1969).

Figura 3.12– Diagrama de coordenadas polares da orientação do campo magnético, H, em relação aos eixos x, y e z do radical nitróxido.

3.2.4.3.E – Dependência dos espectros de RPE da mobilidade

Em condições em que o radical nitróxido move-se rapidamente (na escala de tempo da RPE, $\tau < 10^{-8}$ s) e isotropicamente o sinal de RPE consiste de três linhas estreitas de igual altura (Kivelson, 1960; Freed e Fraenkel, 1963). Moléculas pequenas tombando livremente em um meio não viscoso apresentam esse tipo de espectro. Esse movimento é caracterizado por um tempo de correlação rotacional, τ . De tal modo que o espectro apresenta valores de g e de A que são as médias dos principais valores dos respectivos tensores (Schreier, 1979):

$$a_N = 1/3 (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad \text{(Equação 3.15)}$$

$$g_0 = 1/3 (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad (\text{Equação 3.16})$$

onde a_N e g_0 são o desdobramento hiperfino isotrópico e o fator g isotrópico, respectivamente.

A velocidade do movimento determina a largura das linhas espectrais. Estas são estreitas para movimentos rápidos e vão se alargando à medida que o movimento se torna mais lento na escala de tempo da RPE. A diminuição da velocidade de tombamento da molécula gera alargamento diferencial das linhas espectrais na seguinte ordem: linha central < linha de campo baixo < linha de campo alto, para espectros obtidos em banda X (cerca de 9 GHz) (**Figura 3.13**). Quando a frequência do movimento se torna comparável à diferença entre os valores principais de A ou g (medidos em unidades de frequência), obtém-se linhas de formas complexas. No caso extremo, quando o movimento molecular é lento na escala de tempo do aparelho ($\tau > 10^{-8}$ s), cada molécula contribui com um espectro individual, obtendo-se um espectro resultante que representa a soma de todas as possíveis orientações em relação ao campo magnético aplicado. Espectros deste tipo são chamados espectros de pó (Schreier, 1979).

Figura 3.13 – Espectros dos marcadores de spin: TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-N-oxil-piperidina, à esquerda) e TEMPOL (2,2,6,6-tetrametil-4-hidroxi-N-oxil-piperidina, à direita) em glicerol a diferentes temperaturas. Os espectros a -36°C e -100°C correspondem a espectros de pó (adaptado de Jost et al., 1971).

3.2.4.3.F – Análise dos espectros de RPE de marcadores de spin intercalados nas membranas modelo

Devido à sua estrutura química, marcadores de spin de natureza lipídica, quando intercalados em bicamadas, assim como os fosfolipídios não marcados, possuem a tendência de se orientar com seus eixos longos moleculares aproximadamente paralelos à normal à bicamada (**Figura 3.14**). Quando se trabalha com lipossomas, vesículas, e mesmo algumas micelas suficientemente grandes, o tempo de rotação dessas estruturas é suficientemente alto, de modo que elas podem ser consideradas paradas na escala de tempo do RPE. Assim, o que se observa é uma soma dos espectros das moléculas incorporadas no agregado. Como essas moléculas estão orientadas em um meio anisotrópico, o que se observa é um espectro composto pela soma de todos os espectros com todas as orientações em relação ao campo magnético. Além disso, em membranas suficientemente fluidas, as moléculas podem apresentar vários tipos de movimentos: rotação ao redor do eixo longo molecular, difusão lateral, e, quando se trata de moléculas com movimentos intra-moleculares, como ocorre com compostos que possuem cadeias acila, esses movimentos (que ocorrem em diferentes escalas de tempo) podem contribuir para a forma das linhas espectrais. Também neste caso, o espectro observado corresponde à soma de todos os espectros correspondentes às várias orientações do marcador em relação ao campo magnético aplicado. Como em todas as situações descritas as moléculas encontram-se em um ambiente anisotrópico, esses espectros são chamados de espectro de pseudo-pó (Schreier, 1979).

Figura 3.14 – Estrutura química do marcador de spin 16PCSL em configuração estendida (todas as ligações das cadeias acilas em *trans*) com os eixos arbitrários do grupamento nitroxídeo atribuído.

Marcadores de spin do tipo nPCSL possuem o eixo z do nitróxido aproximadamente paralelo ao eixo longo molecular (**Figura 3.14**). Assim, espera-se que no caso de movimento rápido ao redor do eixo longo molecular, e quando o grupamento doxil está ligado aos carbonos mais próximos da cabeça polar, que provê um forte ancoramento à interface membrana-água, o espectro deve apresentar extremos externos e extremos internos (medidos por $2A_{||}$ e $2A_{\perp}$, respectivamente, como mostrado na **Figura 3.15**) que representam os valores de desdobramento hiperfino para moléculas com o eixo longo molecular aproximadamente paralelo e perpendicular ao campo magnético, respectivamente. A existência dessas características espectrais informa que o eixo longo molecular (z) executa rotação rápida na escala de tempo do experimento, o que tem como consequência gerar no plano xy a média dos valores de A_{xx} e A_{yy} . Nesse caso é possível calcular um parâmetro de ordem (S, chamado S_{ef}) a partir dos valores de $2A_{||}$ e $2A_{\perp}$ medidos no espectro através da **equação 3.17** (Schreier et al., 1978). O parâmetro de ordem é interpretado como refletindo a amplitude de movimento do eixo longo molecular. Quanto maior S, menor a amplitude e mais ordenados os lipídios formadores da membrana.

Figura 3.15 – Ilustração das medidas dos parâmetros utilizados para a análise dos espectros de RPE. (A) Medidas de extremos externos ($2A_{||}$) e internos ($2A_{\perp}$) e largura da linha de campo central (W_0) do marcador 5PCSL intercalado em LUV de 10CL na ausência de peptídeo. (B) Medidas das alturas das linhas de campo baixo (h_{+1}) e central (h_0) e largura da linha de campo central (W_0) do marcador 16PCSL intercalado em LUV de 10CL na ausência de peptídeo.

$$S_{ef} = \frac{A_{||} - A_{\perp}}{A_{ZZ} - \frac{A_{xx} + A_{yy}}{2}} \quad \text{(Equação 3.17)}$$

onde A_{xx} , A_{yy} , e A_{zz} representam os valores principais do tensor hiperfino ($A_{xx} = 5,9$ G, $A_{yy} = 5,4$ G e $A_{zz} = 32,9$ G para o doxilpropano, Jost et al., 1971) e $A_{||}$ e $A_{\perp}$ são, respectivamente, os valores de extremos externos e extremos internos medidos no espectro (**Figura 3.15**).

Quando a molécula possui movimentos intra-moleculares, esses também contribuirão para o valor se S . Hubbell e McConnell (1971), empregando tratamento de mecânica estatística apresentaram uma equação para analisar S em termos das contribuições da orientação do eixo longo molecular (S_0) e de isomerizações *trans-gauche* em consequência da rotação ao redor de ligações simples -C-C- (P_t e P_g , onde os termos correspondem à probabilidade de rotâmeros *trans* e *gauche*, respectivamente, e $P_t + P_g = 1$). Contudo, nós não fizemos essa análise e os valores de S apresentados (S_{ef}) foram calculados a partir das medidas de $2A_{||}$ e $2A_{\perp}$ nos espectros. A literatura tem mostrado que em membranas fluidas ocorre um gradiente de flexibilidade, com a mobilidade aumentando ao longo da cadeia acila devido ao crescente distanciamento desses carbonos da região de ancoramento – a cabeça polar (Hubbell e McConnell, 1971, Jost et al., 1971). Em consequência, o espectro perde a resolução de extremos externos e internos e adquire a forma de três linhas estreitas à medida que o grupamento nitróxido se aproxima da metila terminal da cadeia. Essa forma espectral não permite a medida de extremos externos e internos, porém sabe-se que, devido às características geométricas das moléculas e do ambiente onde se encontram, os espectros ainda são determinados tanto por propriedades de orientação como de mobilidade. Essas informações poderiam ser obtidas a partir de simulações espectrais com programas como os do grupo de Freed (Schneider e Freed, 1989; Budil et al., 1996). Porém, esses programas não foram empregados no presente trabalho. Levando em conta as considerações acima, os espectros foram analisados através do parâmetro empírico h_0/h_{+1} , relação das alturas dos picos de campo central e campo alto. Segundo Schreier e colaboradores (1984), estão embutidas nesse parâmetro as contribuições tanto de ordem como de mobilidade para as formas espectrais. Quanto menor h_0/h_{+1} , maior a mobilidade e/ou menor a ordem.

A discussão acima é válida para o caso em que a molécula executa um movimento rápido ao redor do eixo longo molecular na escala de tempo do experimento. No entanto, quando esse movimento é lento, como é o caso de membranas em fase gel, por exemplo, o formalismo para o cálculo de S não pode ser empregado. Nesse caso, marcadores contendo o grupamento nitróxido próximo da cabeça polar costumam fornecer espectros indicativos de alta imobilização, com grandes separações entre extremos externos e internos (ver espectro de 5PCSL em presença de TRP3 na **Figura 4.44** (espectro D)). É também usual a perda do pico de campo alto utilizado para a medida de $2A_{\perp}$. Assim, frequentemente esses espectros são analisados através da medida dos extremos externos, denominada $2A_{\max}$. $A_{\max}$ equivale a $A_{\parallel}$ para os casos em que o movimento ao redor do eixo longo molecular é rápido e podem ser feitas comparações entre ambos em casos em que não se pode medir $A_{\perp}$ em um dos espectros.

Nos casos em que o espectro experimental corresponde à somatória de vários espectros, a largura da linha de campo central (W_0 , **Figura 3.15**) refletirá a somatória das larguras de todos os espectros contribuintes, bem como sua posição no campo magnético devido à influência de diferentes valores de g para os espectros. Quando os marcadores estão intercalados em membranas, devido ao gradiente de flexibilidade ao longo da cadeia acila, a linha de campo central resultante terá a contribuição de espectros mais alargados devido ao movimento mais restrito quando o marcador se encontra mais próximo à região da cabeça polar. À medida que o marcador se aproxima da metila terminal, seu movimento será mais rápido e, conseqüentemente, as linhas mais estreitas. Assim, deve-se esperar uma diminuição (gradiente) de W_0 à medida que o espectro monitora regiões mais profundas na membrana.

3.2.4.3.G – Estudos do efeito da ligação dos peptídeos sobre a organização molecular das membranas modelo

A organização molecular das membranas modelo foi investigada com marcadores de spin de natureza lipídica intercalados nestas empregando RPE.

Filmes dos fosfolipídios ou lisofosfolipídios (5 mM) de composição desejada na presença de 1 mol % dos marcadores de spin (**Tabela 3.2**) foram obtidos em tubos de ensaio pela evaporação sob fluxo de N₂ dos volumes adequados das soluções estoque e, a seguir, mantidos sob vácuo por pelo menos 2 h, de forma a assegurar a eliminação de todo o solvente. Os filmes foram ressuspensos em tampão 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 ou com uma solução de peptídeo 500 µM em 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 (exceto para a composição que mimetiza a membrana de *E. coli*). Para os lipossomos (MLVs) os filmes foram ressuspensos em vórtex através de agitação vigorosa em vórtex por 15 min. Dependendo da composição lipídica das bicamadas, foi necessário colocar em banho de ultrassom por 5 min para soltar por completo o filme da parede do tubo e ressuspendê-lo. Para micelas a ressuspensão foi feita em banho de ultrassom por 5 min.

O preparo das vesículas de *E. coli* foi diferente das demais, pois não foi possível hidratar o filme lipídico com a solução de peptídeo. Neste caso foi preparado LUVs de *E. coli* (5 mM lipídio total) como descrito em **3.2.4.1.E** ressuspendendo o filme lipídico com 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4. Em um tubo de ensaio separado um filme do marcador foi preparado (50 µM) e submetido a vácuo por no mínimo 2 horas para assegurar a eliminação do solvente. Em seguida, o filme do marcador foi ressuspense em 5 µL de etanol absoluto a 60 °C e 500 µL das LUVs de *E. coli* foram adicionados ao tubo. O tubo foi agitado vigorosamente no vórtex e mantido em banho de ultrassom a 45 °C por 15 min. Para avaliar o efeito da ligação dos peptídeos na organização molecular destas membranas, uma alíquota da solução estoque dos peptídeos foi adicionada nas LUVs de *E. coli* contendo os marcadores de spin de modo a obter uma concentração final de peptídeo de 500 µM.

Os espectros de RPE foram adquiridos logo após o preparo em espectrômetro da Bruker modelo EMX-200, interfaciado com um microcomputador, a 23 °C. As amostras foram colocadas em celas chatas de quartzo, para soluções aquosas (*Wilmad*, Buena, New Jersey). Foram empregadas frequências da ordem de 9,9 GHz. O campo varrido foi de 100 G, 2.048 pontos, amplitude de modulação de 1,0 a 2,0 G (inferior à largura das linhas espectrais), a constante de tempo foi da ordem de 163 ms (de modo que a largura das linhas espectrais fosse percorrida

em tempos equivalentes a, no mínimo, 10 constantes de tempo), e, em cada caso, foi efetuado o número de varreduras (1-4) necessárias para se obter espectros com relação sinal/ruído suficientemente alta para uma análise adequada. As integrais dos espectros, as alturas e as larguras das linhas foram obtidas utilizando-se o programa WINEPR, da Bruker.

4 – RESULTADOS

Nesta seção apresentamos os resultados referentes aos estudos funcionais e de propriedades estruturais e dinâmicas da interação do PDH TRP3 e seus dois análogos, WLW e LWL, com membranas modelo – micelas e bicamadas lipídicas – de composição variada. As bicamadas foram produzidas na forma de vesículas unilamelares grandes (LUVs) ou vesículas multilamelares (MLVs, apenas para experimentos de EPR). Com relação à composição lipídica das membranas modelo, utilizamos uma composição que mimetiza a membrana plasmática da bactéria Gram-negativa *E. coli*, isto é, os lipídios presentes em maior quantidade nessa membrana; de agora em diante, nos referiremos a este sistema como membranas de *E. coli*. Outras membranas modelo foram empregadas onde foi mantido constante o fosfolipídio zwitteriônico fosfatidilcolina (PC) e foi adicionado um fosfolipídio negativamente carregado no qual foi variada a natureza química da cabeça polar. Para ambos os lipídios foi mantida constante a composição das cadeias acila: *sn*-1 – palmitoil – e *sn*-2 – oleil. Especificamente, as membranas de *E. coli* tinham a composição (em moles %) PE:PG:CL 67:23:10 (Andrushchenko et al., 2008). As membranas de composição binária eram constituídas por: POPC:POPG 80:20, POPC:POPG 60:40, POPC:TOCL 90:10, POPC:TOCL 80:20, POPC:POPS 80:20, POPC:POPA 80:20. Foi ainda estudada a interação de TRP3 com micelas de composição LPC:LPG 80:20 e LPC:LPA 80:20. A **Tabela 4.1** indica a quantidade de carga negativa para cada sistema, calculada com base em dados de pK do lipídios encontrados na literatura (Boggs, 1987; Tsu et al., 1986; Kooijman et al., 2005; Olofsson e Sparr, 2013).

Em relação aos estudos funcionais, realizamos ensaios de atividade antimicrobiana e hemolítica de TRP3 e seus análogos, assim como estudos de permeabilização de vesículas lipídicas.

A caracterização das propriedades estruturais e dinâmicas se deu por meio de estudos de: i. ligação dos peptídeos a membranas modelo, ii. propriedades conformacionais dos peptídeos, iii. localização destes quando da ligação às membranas modelo e iv. efeito da ligação dos peptídeos sobre a organização molecular das membranas. Esses estudos foram realizados empregando as

técnicas espectroscópicas de fluorescência, dicroísmo circular (CD) e ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

Tabela 4.1 – Sigla e composição das membranas modelo utilizadas, e fração molar de carga negativa (ϕ) das diferentes membranas. Cálculo realizado para pH 7,4 com os pK dos grupos ionizáveis encontrados na literatura (Boggs, 1987; Tsu et al., 1986; Kooijman et al., 2005; Olofsson and Sparr, 2013).

Sigla	Lipídio zwitteriônico (fração molar)	Composição	ϕ
		Lipídio carregado negativamente (fração molar)	
LUVs			
<i>E. coli</i>	POPE (0,67)	POPG (0,23) TOCL (0,10)	0,43
20PG	POPC (0,80)	POPG (0,20)	0,20
40PG	POPC (0,60)	POPG (0,40)	0,40
10CL	POPC (0,90)	TOCL (0,10)	0,20
20CL	POPC (0,80)	TOCL (0,20)	0,40
20PS	POPC (0,80)	POPS (0,20)	0,20
20PA	POPC (0,80)	POPA (0,20)	0,25
Micelas			
20LPG	LPC (0,80)	LPG (0,20)	0,20
20LPA	LPC (0,80)	LPA (0,20)	0,30

4.1 – Estudos funcionais

Os estudos funcionais, realizados por meio de ensaios de atividade antimicrobiana, hemolítica e de permeabilidade de vesículas lipídicas de composição variada, visaram avaliar o efeito da substituição do(s) resíduo(s) de W por L nos análogos de TRP3 sobre a sua atividade. Os ensaios em sistemas modelo ainda permitiram analisar o efeito da natureza da cabeça polar dos lipídios carregados negativamente na atividade dos peptídeos.

4.1.1 – Atividade antimicrobiana e hemolítica

A atividade antimicrobiana de TRP3, WLW e LWL foi testada por meio de ensaios líquidos de inibição de crescimento (Riciluca et al., 2012). A atividade foi testada contra *Micrococcus luteus* (uma bactéria Gram-positiva), cepas BR32 (resistente ao antibiótico ácido nalidíxico) e A270, assim como contra *Escherichia coli* (uma bactéria Gram-negativa), cepas D31 (resistente à ampicilina e estreptomicina) e SBS 363. Esses estudos foram realizados variando a

concentração dos peptídeos entre 0,02 e 100 μM por meio de diluição seriada e permitiram determinar a menor concentração de peptídeo que causou 100% de inibição de crescimento dessas bactérias, isto é, a concentração inibitória mínima (MIC) (**Tabela 4.2**). Os resultados mostraram que TRP3 e seus análogos apresentam atividade antimicrobiana contra as bactérias aqui estudadas, sendo que a MIC ocorre em valores na região de ca. 10^3 nM. As bactérias apresentaram, essencialmente, a mesma susceptibilidade a um determinado peptídeo. A média das MIC das quatro bactérias é 1,1, 1,1 e 2,0 μM para TRP3, WLW e LWL, respectivamente, sugerindo que a atividade de LWL é 2 vezes menor que a dos outros peptídeos. No entanto, essa diferença não é estatisticamente significativa. Esses resultados estão de acordo com dados da literatura que mostram que a substituição dos três resíduos de W de TRP3 por Y ou F essencialmente não altera a atividade antimicrobiana do peptídeo (Schibli et al., 2006).

Tabela 4.2 – Atividade antimicrobiana de TRP3 e seus análogos WLW e LWL. Concentração inibitória mínima (MIC, em μM) contra *M. luteus*, cepas BR32 e A270, e *E. coli*, cepas D31 e SBS 363. Esses valores representam uma média de quatro ensaios independentes, com os respectivos desvios padrão entre parênteses.

Bactéria	TRP3	MIC WLW	LWL
<i>M. luteus</i> BR32	1,1 ($\pm$ 0,6)	1,2 ($\pm$ 0,5)	2,3 ($\pm$ 0,9)
<i>M. luteus</i> A270	0,7 ($\pm$ 0,2)	0,9 ($\pm$ 0,4)	1,9 ($\pm$ 0,0)
<i>E. coli</i> D31	1,9 ($\pm$ 0,7)	1,2 ($\pm$ 0,5)	2,3 ($\pm$ 0,9)
<i>E. coli</i> SBS 363	0,5 ($\pm$ 0,7)	0,9 ($\pm$ 0,5)	1,4 ($\pm$ 0,5)

A toxicidade dos peptídeos contra células de mamíferos foi avaliada por meio de ensaio de atividade hemolítica (Riciluca et al., 2012). A **Figura 4.1** apresenta a porcentagem de hemólise em função da concentração dos peptídeos. O peptídeo nativo, TRP3, apresenta atividade contra eritrócitos humanos como evidenciado pelo aumento na porcentagem de hemólise (H) em função da concentração do peptídeo. Na concentração mais alta estudada (170 μM), TRP3 apresentou 41% de hemólise. Estudos da literatura mostraram que TRP3 possui atividade contra células de mamíferos, no entanto, as concentrações necessárias são ca. 100 vezes maiores (menor atividade) (Yang et al., 2002; Yang et al., 2003; Schibli et al., 2006; Yang et al., 2006; Yang et al., 2009), de acordo com os dados aqui apresentados. Para os análogos, essencialmente, não foi observada atividade hemolítica. Na concentração mais alta estudada (170 μM) WLW e LWL causaram,

respectivamente, 16 e 1% de hemólise. Esses resultados estão em concordância com estudos da literatura, nos quais não se observou atividade hemolítica para análogos de TRP3 cujos três resíduos de W foram substituídos por Y, F ou A (Yang et al., 2002; Schibli et al., 2006). Esses resultados ressaltam a importância dos resíduos de W para a atividade hemolítica de TRP3. Vale notar que o fato de os análogos apresentarem essencialmente a mesma atividade antimicrobiana e uma diminuição na toxicidade indica que estes apresentam uma maior potencialidade terapêutica em relação ao peptídeo nativo.

Figura 4.1 – Atividade hemolítica. Porcentagem de hemólise (H, %) em função da concentração de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL. Os ensaios foram realizados contra uma suspensão de eritrócitos 3% (v/v) em tampão PBS pH 7,4. Os valores de H são a média de valores obtidos em triplicata com os respectivos desvios padrão.

4.1.2 – Efeito dos peptídeos sobre a permeabilidade de vesículas lipídicas

A membrana celular é considerada o alvo principal dos PDH. Assim, grandes esforços veem sendo feitos para a compreensão a nível molecular da interação destes com membranas modelo, onde a composição e propriedades dos componentes são bem conhecidas. Um ensaio clássico para testar a atividade dos PDH é baseado no vazamento do conteúdo interno de vesículas lipídicas (Weinstein et al., 1977). Geralmente, uma molécula fluorescente é encapsulada em alta concentração dentro das vesículas; nessa condição ocorre auto-supressão da fluorescência; no caso de o peptídeo permeabilizar a vesícula, o vazamento da molécula fluorescente resulta na sua diluição e consequente aumento da fluorescência. Esse ensaio é feito acompanhando-se o vazamento em função do tempo; geralmente, a cinética de vazamento é seguida por minutos, até 1-2 horas.

No entanto, estudos de atividade contra microorganismos são feitos em escalas de tempo maiores (ca. 16 horas). Assim, para ter uma condição que representasse de forma mais próxima possível os estudos de atividade contra microorganismos, os experimentos de permeabilidade de vesículas lipídicas foram realizados seguindo-se as cinéticas de vazamento por 10 horas.

4.1.2A – Efeito dos peptídeos sobre a permeabilidade LUVs de *E. coli*

Foi investigado o efeito de TRP3, WLW e LWL sobre a permeabilidade de LUVs de *E. coli* (Tabela 4.1). A Figura 4.2 apresenta a cinética de vazamento do fluoróforo CF do interior aquoso dessas bicamadas promovido por TRP3, WLW e LWL. Foi variada a relação molar lipídio:peptídeo de 521:1 a 0,25:1. Experimentos controle mostraram que as vesículas são estáveis nas condições experimentais, como evidenciado pelo vazamento espontâneo reduzido (ca. 10% após 10 horas, dado não apresentado). Algumas observações podem ser feitas a respeito da cinética de vazamento: (1) é gradual; (2) depende da relação lipídio:peptídeo, aumentando com o decréscimo dessa (isto é, com o aumento da concentração de peptídeo); (3) em algumas relações lipídio:peptídeo a velocidade inicial de vazamento (V_0) é menor do que em relações mais altas (concentrações mais baixas de peptídeo); ou seja, a dependência de V_0 da concentração de peptídeo não parece ser linear; (4) estende-se por horas; (5) os três peptídeos apresentaram diferentes capacidades de permeabilizar as bicamadas, decrescendo na ordem TRP3 > WLW > LWL.

Figura 4.2 – Vazamento de CF de LUVs de *E. coli*. Cinética de vazamento em função da concentração de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL. As legendas apresentam a razão molar

lipídio:peptídeo de cada curva. [Lipídio] = 20 μ M em tampão Tris-HCl pH 7,4. Essas cinéticas são representativas de quatro experimentos.

As velocidades iniciais de vazamento (V_0) foram calculadas pela inclinação da curva na região linear nos tempos iniciais das cinéticas. A **Figura 4.3** apresenta os gráficos de V_0 em função da concentração dos peptídeos. Os gráficos mostram um mínimo de V_0 seguido por um aumento linear com o aumento da concentração de peptídeo (isto ocorre para os três peptídeos). O mínimo é observado quando a concentração dos peptídeos é 1,25, 2,5 e 10 μ M para TRP3, WLW e LWL, respectivamente. Na ordenada do lado direito na **Figura 4.3** também está apresentada a carga líquida nominal do sistema, ou seja, a soma das cargas positivas dos peptídeos e negativas dos lipídios para cada concentração de peptídeo. O mínimo de V_0 ocorre quando a carga líquida nominal do sistema é - 3,6, + 1,4 e + 31,4 μ M para TRP3, WLW e LWL, respectivamente. Os valores para TRP3 e WLW encontram-se próximos ao ponto de eletroneutralidade do sistema, onde a carga líquida nominal aproxima-se de zero. Para TRP3, estudos de espalhamento de luz dinâmico mostraram que este peptídeo induz agregação de vesículas carregadas negativamente próximo ao ponto de eletroneutralidade do sistema (dados não apresentados). O mínimo de V_0 próximo ao ponto de eletroneutralidade do sistema sugere a presença de agregados de vesículas+peptídeos. Esses agregados podem funcionar como “barreira cinética” sequestrando os peptídeos disponíveis para agirem nas vesículas, diminuindo assim o valor de V_0 calculado. Para que a agregação ocorra é necessário que os peptídeos liguem-se às vesículas, neutralizando as cargas líquidas negativas dos lipídios, dependendo assim da afinidade do peptídeo pelos lipídios. Neste contexto, o deslocamento de V_0 para maiores concentrações de LWL, possivelmente deve-se à menor afinidade deste peptídeo pelos lipídios constituintes da membrana (**Seção 4.2.1A**).

Figura 4.3 – Velocidade inicial de vazamento (V_0) de LUVs de *E. coli*. V_0 em função da concentração de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL. Na ordenada do lado direito (em vermelho) encontra-se a carga líquida nominal do sistema (a soma de todas as cargas positivas – peptídeo – e negativas – lipídio). Os valores de V_0 foram obtidos pelas inclinações das curvas de cinética de vazamento na região linear e representam uma média de quatro medidas com os respectivos desvios padrão.

Para quantificar o efeito dos peptídeos na permeabilidade das LUVs de *E. coli* construímos gráficos do vazamento (%) após 10 horas de incubação em função da relação lipídio:peptídeo. A **Figura 4.4A** mostra um comportamento sigmoidal para o vazamento em função da relação lipídio:peptídeo, sugerindo um efeito cooperativo. Esses dados foram ajustados com a **equação 3.5** de modo a extrair o fator de cooperatividade (n , **Tabela 4.3**) e a razão lipídio:peptídeo necessária para causar 50% de vazamento (LP_{50} , **Figura 4.4B**). Valores de n maiores do que 1 correspondem a uma cooperatividade positiva, enquanto valores menores do que 1 correspondem a uma cooperatividade negativa e valores iguais a 1 indicam ausência de cooperatividade. Os valores de n foram 1,0, 0,7 e 0,5 para TRP3, WLW e LWL, respectivamente. Esse resultado mostra que o efeito de TRP3 na permeabilidade de LUVs de *E. coli* não apresenta cooperatividade. No entanto, os valores de n para os análogos foram menores do que 1, indicando uma cooperatividade negativa. A cooperatividade negativa não é tão compreendida quanto à cooperatividade positiva. No caso de ligação de um substrato a uma proteína, a cooperatividade negativa pode estar relacionada tanto a um decréscimo na afinidade por sítios idênticos, induzida pela ligação do substrato, ou à presença de sítios de ligação heterogêneos (Abeliovich, 2005). O efeito da permeabilidade dos peptídeos foi avaliado pelos valores de LP_{50} : quanto maior esse valor, mais ativo é o peptídeo (menor a concentração de peptídeo necessária

para causar o mesmo efeito). Os valores de LP_{50} decrescem na ordem $TRP3 > WLW > LWL$ e são na média, respectivamente, 17,5, 2,4 e 0,6. Esses dados evidenciam a importância dos resíduos de W para a atividade permeabilizante de TRP3.

Figura 4.4 – Vazamento de LUVs de *E. coli* após 10 horas (%) em função da razão molar lipídio:peptídeo. (A) Comparação entre TRP3, WLW e LWL. As linhas representam os ajustes dos pontos com a equação 3.5. Esses dados são representativos de 4 medidas. (B) Razão molar lipídio:peptídeo necessária para causar 50% de vazamento (LP_{50}). Os valores de LP_{50} são a média de quatro medidas com os respectivos desvios padrão. Esses valores foram obtidos a partir do ajuste das curvas em A com a equação 3.5.

Tabela 4.3 – Fator de cooperatividade (n) para o vazamento de membranas de *E. coli* causado por TRP3, WLW e LWL. Valores obtidos pelo ajuste da equação 3.5 nos gráficos de vazamento após 10 horas (%) em função da relação lipídio:peptídeo. Esses valores são a média de quatro medidas com os respectivos desvios padrão.

n		
TRP3	WLW	LWL
1,0 ($\pm 0,2$)	0,7 ($\pm 0,1$)	0,5 ($\pm 0,1$)

4.1.2B – Efeito dos peptídeos sobre a permeabilidade LUVs de composição binária compostas por POPC e diferentes lipídios carregados negativamente

Foi investigado o efeito dos peptídeos na permeabilidade de LUVs contendo fosfolipídios com diferentes cabeças polares carregadas negativamente. Foram preparadas LUVs de composição binária contendo o fosfolipídio zwitteriônico fosfatidilcolina (PC) e os lipídios carregados negativamente fosfatidilglicerol, PG, cardiolipina, CL, fosfatidilserina, PS, ácido fosfatídico, PA, nas relações molares

dadas na **Tabela 4.1**. De agora em diante nos referiremos a essas composições como 20PG, 40PG, 10CL, 20CL, 20PS e 20PA, respectivamente.

Figura 4.5 – Vazamento de CF de LUVs de 20PG. Cinética de vazamento em função da concentração de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL. As legendas apresentam a razão molar lipídio:peptídeo de cada curva. [Lipídio] = 20 μM em tampão Tris-HCl pH 7,4. Velocidade inicial de vazamento (V_0) em função da concentração de (D) TRP3, (E) WLW e (F) LWL. Na ordenada do lado direito (em vermelho) encontra-se a carga líquida nominal do sistema (a soma de todas as cargas positivas – peptídeo – e negativas – lipídio). Os valores de V_0 foram obtidos das inclinações das curvas de cinética de vazamento na região linear.

Figura 4.6 – Vazamento de CF de LUVs de 40PG. Cinética de vazamento em função da concentração de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL. As legendas apresentam a razão molar lipídio:peptídeo de cada curva. [Lipídio] = 20 μM em tampão Tris-HCl pH 7,4. Velocidade inicial de vazamento (V_0) em função da concentração de (D) TRP3, (E) WLW e (F) LWL. Na ordenada do lado direito (em vermelho) encontra-se a carga líquida nominal do sistema (a soma de todas as cargas positivas – peptídeo – e negativas – lipídio). Os valores de V_0 foram obtidos pelas inclinações das curvas de cinética de vazamento na região linear.

As cinéticas de vazamento são apresentadas nas **Figuras 4.5 a 4.10**. Como nos estudos com LUVs de *E. coli*, os estudos aqui apresentados foram realizados variando-se a relação molar lipídio:peptídeo de 521:1 a 0,25:1. As vesículas mostraram-se estáveis nas condições experimentais (vazamento espontâneo de ca. 10% após 10 horas, dado não apresentado). A análise dessas cinéticas mostra que: (1) o vazamento é gradual e (2) depende da relação lipídio:peptídeo, aumentando com o decréscimo dessa (isto é, com o aumento da concentração de peptídeo); (3) no caso do vazamento de bicamadas de 20CL induzido por TRP3, para algumas relações lipídio:peptídeo, V_0 é menor do que para relações maiores (ou seja, menores concentrações de peptídeo); (4) o vazamento estende-se por horas e (5) apresenta comportamento bifásico em algumas relações lipídio:peptídeo para os três peptídeos nas cinéticas de vazamento de LUVs de 10CL e 20PS; (6) os três peptídeos apresentaram diferentes capacidades de permeabilizar as bicamadas, decrescendo na ordem TRP3 > WLW > LWL.

Figura 4.7 – Vazamento de CF de LUVs de 10CL. Cinética de vazamento em função da concentração de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL. As legendas apresentam a razão molar lipídio:peptídeo de cada curva. [Lipídio] = 20 μM em tampão Tris-HCl pH 7,4. Velocidade inicial de vazamento (V_0) em função da concentração de (D) TRP3, (E) WLW e (F) LWL. Na ordenada do lado direito (em vermelho) encontra-se a carga líquida nominal do sistema (a soma de todas as cargas positivas – peptídeo – e negativas – lipídio). Os valores de V_0 foram obtidos pelas inclinações das curvas de cinética de vazamento na região linear.

Figura 4.8 – Vazamento de CF de LUVs de 20CL. Cinética de vazamento em função da concentração de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL. As legendas apresentam a razão molar lipídio:peptídeo de cada curva. [Lipídio] = 20 μM em tampão Tris-HCl pH 7,4. Velocidade inicial de vazamento (V_0) em função da concentração de (D) TRP3, (E) WLW e (F) LWL. Na ordenada do lado direito (em vermelho) encontra-se a carga líquida nominal do sistema (a soma de todas as cargas positivas – peptídeo – e negativas – lipídio). Os valores de V_0 foram obtidos pelas inclinações das curvas de cinética de vazamento na região linear.

As **Figuras 4.5 a 4.10** (painéis inferiores) mostram que no ponto de eletroneutralidade do sistema, um mínimo de V_0 ou um desvio da linearidade é observado para todas as composições lipídicas. Uma inspeção visual das cinéticas de vazamento não permite observar esse comportamento (exceto para LUVs de 20CL em presença de TRP3), mostrando a importância de uma análise quantitativa (por meio do cálculo de V_0) para a descrição do fenômeno. Para LUVs de 20CL esse efeito é mais evidente, com a presença de mínimos de V_0 bem definidos para os três peptídeos. Para esta composição, o mínimo de V_0 é observado quando a concentração dos peptídeos é 1,25-2,5, 2,5 e 40 μM para TRP3, WLW e LWL, respectivamente. Nessas concentrações dos peptídeos a carga líquida nominal do sistema é $-3,0/+2,0$, $+2,0$ e $+152$ μM . Para TRP3 e WLW, as concentrações onde se observa o mínimo de V_0 correspondem a pontos próximos da eletroneutralidade do sistema, enquanto que para LWL esse valor está deslocado para concentrações maiores do peptídeo. Esses resultados sugerem, como observado para LUVs de *E. coli*, a presença de agregados de vesículas+peptídeo, os quais por estarem sequestrando os peptídeos disponíveis, diminuem o valor de V_0 ; atuando, assim, como uma “barreira cinética”. O deslocamento para maiores concentrações de LWL, também neste caso, provavelmente deve-se à menor afinidade do peptídeo pelas membranas (**Seção**

4.2.1.B). A formação desses agregados supramoleculares parece ser um evento recorrente, que depende diretamente da blindagem das cargas negativas dos lipídios pelos peptídeos carregados positivamente e, desse modo, da afinidade dos peptídeos por essas bicamadas.

Figura 4.9 – Vazamento de CF de LUVs de 20PS. Cinética de vazamento em função da concentração de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL. As legendas apresentam a razão molar lipídio:peptídeo de cada curva. [Lipídio] = 20 μM em tampão Tris-HCl pH 7,4. Velocidade inicial de vazamento (V_0) em função da concentração de (D) TRP3, (E) WLW e (F) LWL. Na ordenada do lado direito (em vermelho) encontra-se a carga líquida nominal do sistema (a soma de todas as cargas positivas – peptídeo – e negativas – lipídio). Os valores de V_0 foram obtidos pelas inclinações das curvas de cinética de vazamento na região linear.

Figura 4.10 – Vazamento de CF de LUVs de 20PA. Cinética de vazamento em função da concentração de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL. As legendas apresentam a razão molar lipídio:peptídeo de cada curva. [Lipídio] = 20 μM em tampão Tris-HCl pH 7,4. Velocidade inicial de vazamento (V_0) em função da concentração de (D) TRP3, (E) WLW e (F) LWL. Na ordenada do lado direito (em vermelho) encontra-se a carga líquida nominal do sistema (a soma de todas as cargas positivas – peptídeo – e negativas – lipídio). Os valores de V_0 foram obtidos pelas inclinações das curvas de cinética de vazamento na região linear.

As cinéticas de vazamento de LUVs de 10CL (**Figura 4.7**) e 20PS (**Figura 4.9**) apresentaram comportamento mais complexo do que o das outras composições. Nesses casos foi observado comportamento bifásico. A **Tabela 4.4** sumariza os tempos em que se inicia a segunda etapa para as duas composições e os três peptídeos em função da relação lipídio:peptídeo. Esses valores foram obtidos pela intersecção de retas ajustadas para os pontos da saturação do primeiro e início do segundo vazamento e mostram que o início do comportamento bifásico ocorre em tempos menores com a diminuição da relação lipídio:peptídeo, ou seja, com o aumento da concentração de peptídeo. Pode-se observar ainda que a faixa de relações lipídio:peptídeo, onde se observa tal comportamento, é deslocada para menores valores para os análogos WLW e LWL em comparação com o peptídeo nativo. Para LUVs de 20PS, as relações lipídio:peptídeo nas quais se observa o comportamento bifásico coincidem com as concentrações de peptídeo nas quais se observa um mínimo de V_0 . Esse resultado sugere que o comportamento bifásico poderia ser devido à dissolução dos agregados lipídio+peptídeo e consequente aumento na concentração efetiva de peptídeo disponível para se ligar e permeabilizar as vesículas. Entretanto, esta correlação não ocorre para LUVs de 10CL, sugerindo que outros eventos poderiam estar contribuindo para a ocorrência do comportamento bifásico (**Seção 5.1**).

Tabela 4.4 – Início do comportamento bifásico observado no vazamento de bicamadas de composição 10CL e 20PS. Tempo (em min) obtido pela intersecção das retas quando da saturação do primeiro e início do segundo vazamento.

L:P	10CL			20PS		
	TRP3	WLW	LWL	TRP3	WLW	LWL
0,25	-	-	-	-	-	190
0,50	-	240	270	-	-	230
1,00	150	250	280	-	167	310
2,00	220	280	300	-	240	380
4,00	230	350	-	-	320	-
8,00	250	-	-	260	330	-

Gráficos do vazamento (%) após 10 horas de incubação em função da relação lipídio:peptídeo foram construídos para quantificar a atividade permeabilizante dos peptídeos em LUVs contendo fosfolipídios com diferentes cabeças polares carregadas negativamente (**Figura 4.11**). Um comportamento sigmoidal é observado para TRP3 e seus análogos para o vazamento das diferentes LUVs, sugerindo um efeito cooperativo. Contrariamente ao observado para LUVs de *E. coli*, os valores de n calculados para o vazamento destas vesículas foram, em sua maioria, maiores do que 1, indicando cooperatividade positiva exceto para LUVs contendo CL na presença de LWL, quando foram obtidos valores menores que 1, indicando cooperatividade negativa (**Tabela 4.5**). Os valores médios obtidos foram 2,4, 1,7 e 1,2, respectivamente, para TRP3, WLW e LWL. Nota-se que a cooperatividade diminui na ordem TRP3 > WLW > LWL.

Figura 4.11 – Vazamento após 10 horas (%) em função da razão molar lipídio:peptídeo. Comparação entre TRP3, WLW e LWL para o vazamento de LUVs de (A) 20PG; (B) 40PG; (C) 10CL; (D) 20CL; (E) 20PS e (F) 20PA. As linhas representam o ajuste dos pontos utilizando a equação X.1. Esses gráficos são representativos de experimentos realizados em triplicata.

A capacidade de permeabilizar as vesículas varia entre os peptídeos (**Figuras 4.11 e 4.12**). Os valores médios de LP_{50} são 23, 9 e 2 para TRP3, WLW e LWL, respectivamente. Essa ordem decrescente de atividade (TRP3 > WLW > LWL) está de acordo com aquela observada para a permeabilização de LUVs de *E. coli*, e mostra a importância dos resíduos de W, presentes de forma sequencial, para a atividade permeabilizante do peptídeo nativo.

Tabela 4.5 – Fator de cooperatividade (n) obtido a partir do ajuste das curvas da **Figura 4.11** com a equação 3.5 para o vazamento promovido por TRP3, WLW e LWL em LUV de todas as composições lipídicas estudadas. Esses valores representam a média de experimentos realizados em triplicata com os respectivos desvios padrão em parênteses.

Composição	n		
	TRP3	WLW	LWL
20PG	2,3 ($\pm 1,0$)	1,4 ($\pm 0,4$)	1,1 ($\pm 0,2$)
40PG	2,8 ($\pm 0,9$)	2,0 ($\pm 0,6$)	1,3 ($\pm 0,1$)
10CL	2,2 ($\pm 0,7$)	1,2 ($\pm 0,1$)	0,8 ($\pm 0,1$)
20CL	1,8 ($\pm 0,1$)	1,1 ($\pm 0,1$)	0,8 ($\pm 0,0$)
20PS	2,6 ($\pm 0,6$)	2,3 ($\pm 0,4$)	1,7 ($\pm 0,3$)
20PA	2,7 ($\pm 0,7$)	2,0 ($\pm 0,9$)	1,6 ($\pm 0,5$)

O efeito da natureza da cabeça polar carregada negativamente na atividade permeabilizante dos peptídeos foi avaliado pelos valores de LP_{50} para as diferentes composições lipídicas (**Figura 4.12**). A atividade dos três peptídeos foi maior em bicamadas de 20PA, como evidenciado pelos maiores valores de LP_{50} (isto é, menor concentração de peptídeo). O perfil de LP_{50} em função da natureza da cabeça polar é semelhante para TRP3 e WLW, com a atividade decrescendo

na ordem: 20PA > 40PG ~ 20CL > 20PS > 20PG ~ 10CL. O perfil de atividade de LWL difere um pouco do dos outros dois, sendo a ordem decrescente: 20PA > 40PG > 20CL ~ 20PS > 20PG ~ 10CL.

Figura 4.12 – Razão molar lipídio:peptídeo necessária para causar 50% de vazamento (LP₅₀) em vesículas contendo lipídios com diferentes cabeças polares carregadas negativamente. (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL (note que a escala da ordenada é diferente para este peptídeo). Os valores de LP₅₀ são valores médios de experimentos realizados em triplicata com os respectivos desvios padrão. Os valores foram obtidos ajustando os dados da **Figura 4.11** à equação 3.5.

4.2 – Interação peptídeo-membrana modelo: ligação, conformação, localização e efeito sobre a organização molecular das membranas

De acordo com a relação fundamental da biologia, a função de uma biomolécula está diretamente relacionada à sua estrutura e dinâmica. A função de TRP3 e seus análogos foi avaliada por meio de ensaios de atividade antimicrobiana e hemolítica (**Seção 4.1.1**), e em sistemas modelo, pela capacidade de permeabilizar vesículas lipídicas (**Seção 4.1.2**). Nesta seção apresentamos uma investigação do efeito da interação com membranas modelo sobre as propriedades estruturais e dinâmicas dos peptídeos, de modo a dissecar os eventos que culminam na função desses peptídeos a nível molecular. A fim de visualizar os eventos que ocorrem durante essa interação de forma mais completa, examinamos ainda o efeito da mesma sobre as propriedades de organização molecular das membranas modelo.

4.2.1 – Ligação dos peptídeos a membranas modelo

Foi examinada a ligação de TRP3 e seus análogos a LUVs e micelas. A composição das LUVs foi a mesma empregada nos estudos de permeabilidade. Micelas também foram preparadas com composição binária contendo um lisofosfolípido zwitteriônico (lisofosfatidilcolina, LPC) e um lisofosfolípido carregado negativamente, lisofosfatidilglicerol, LPG, ou ácido lisofosfatídico, LPA, conforme descrito no início de **Resultados** (ver **Tabela 4.1**). A presença de resíduo(s) de W na sequência de TRP3 e seus análogos permitiu utilizar sua fluorescência intrínseca para avaliar sua afinidade pelas membranas modelo estudadas. Para tanto, titulamos as membranas em soluções dos peptídeos e obtivemos os espectros de fluorescência para cada concentração. Assim, pudemos construir isotermas de ligação para o cálculo da constante de ligação aparente (K_B), conforme o procedimento descrito em **Materiais e Métodos**.

4.2.1A – LUVs de *E. coli*

Os espectros de fluorescência normalizados para TRP3, WLW e LWL na ausência e presença de 1 mM de LUVs de *E. coli* estão apresentados na **Figura 4.13**, juntamente com as respectivas isotermas de ligação. Os espectros em solução apresentaram máximo de emissão ($\lambda_{em}^{máx}$) em 346 nm, 351 nm e 351 nm para TRP3, WLW e LWL, respectivamente (**Tabela 4.6**). Na presença de LUVs de *E. coli*, os valores de $\lambda_{em}^{máx}$ são deslocados para o azul, passando a 338, 338 e 336 nm para TRP3, WLW e LWL, respectivamente, e os espectros aumentam de intensidade. Os deslocamentos para o azul ($\Delta\lambda_{em}^{máx}$) e os aumentos de intensidades são evidências da ligação dos peptídeos às LUVs.

Figura 4.13 – Espectros de fluorescência normalizados de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL 5 μM na ausência e presença de membranas de *E. coli* 1,0 mM. Isotermas de ligação de (D) TRP3, (E) WLW e (F) LWL em 338, 338 e 336 nm. As linhas representam o ajuste dos dados experimentais à equação 3.7 de modo a obter a constante de ligação aparente (K_B).

Tabela 4.6 – Parâmetros dos espectros de fluorescência de TRP3, WLW e LWL em solução e quando ligados às membranas modelo. Valores de comprimento de onda de máxima emissão ($\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}}$, em nm) e deslocamento do comprimento de onda de máxima emissão para o azul na presença de membranas modelo ($\Delta\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}}$, em nm). [Peptídeo] = 5 μM , [Lipídio] = 1,0 e 1,5 mM para LUVs e micelas, respectivamente. As medidas para membranas de *E. coli* foram feitas a 37 °C, enquanto que as demais foram realizadas a 23 °C.

	TRP3		WLW		LWL	
	$\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}}$	$\Delta\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}}$	$\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}}$	$\Delta\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}}$	$\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}}$	$\Delta\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}}$
Solução 23 °C	344	-	348	-	349	-
Solução 37 °C	346	-	351	-	351	-
LUVs						
<i>E. coli</i>	338	8	338	13	336	15
20PG	336	8	337	11	338	11
40PG	335	9	335	13	336	13
10CL	336	8	337	11	339	10
20CL	336	8	337	11	338	11
20PS	337	7	337	11	341	8
20PA	336	8	336	12	338	11
Micelas						
20LPG	338	6	341	7	339	10
20LPA	339	5	340	8	339	10

As isotermas de ligação foram construídas por meio de gráficos da razão da intensidade de fluorescência na presença e ausência das bicamadas (F/F_0), em um comprimento de onda constante, em função da concentração de lipídio (**Figura 4.13**). De acordo com Ladokhin e colaboradores (2000) o cálculo da constante de ligação aparente (K_B) pode ser sub/sobre estimado, dependendo do comprimento de onda escolhido para a construção da isoterma de ligação. O comprimento de onda mais adequado é aquele que apresenta uma resposta linear e a sua

determinação é empírica. Para evitar tais desvios construímos isotermas de ligação em uma faixa de comprimentos de onda de $\lambda_{em}^{máx}$ em solução até $\lambda_{em}^{máx}$ na presença de 1,0 mM de LUVs de *E. coli* (dados não apresentados). Todas as isotermas de ligação mostraram aumento linear da fluorescência e saturação a partir de determinada concentração de lipídio. Os dados das isotermas de ligação foram ajustados com a equação 3.7 (**Seção Materiais e Métodos**) para o cálculo de K_B , assumindo uma estequiometria peptídeo:lipídio de 1:1 (**Tabela 4.7**). Os dados mostram um decréscimo na afinidade dos peptídeos pelas LUVs de *E. coli* com a substituição de resíduo(s) de W por L e estão de acordo com a diminuição da atividade permeabilizante. Estudos de análogos de TRP3 onde os resíduos de W foram substituídos por Y ou F, também, apresentaram um decréscimo na ligação a membranas modelo (Schibli et al., 2006).

Tabela 4.7 – Constantes de ligação aparentes (K_B , em M^{-1}) dos peptídeos às membranas modelo de composição lipídica variada. Valores obtidos pelo ajuste das isotermas de ligação pela equação 3.7, assumindo uma estequiometria lipídio:peptídeo de 1:1. Foram construídas entre 5-15 isotermas de ligação, variando de $\lambda_{em}^{máx}$ em solução a $\lambda_{em}^{máx}$ na presença das membranas modelo. Os valores de K_B são a média de valores obtidos com 5 a 15 medidas, com os respectivos desvios padrão entre parênteses. ϕ é a fração molar de carga negativa das membranas modelo.

Composição	ϕ	$K_B \times 10^{-3} \text{ (M}^{-1}\text{)}$		
		TRP3	WLW	LWL
LUVs				
<i>E. coli</i>	0,43	66,0 ($\pm 2,0$)	22,2 ($\pm 0,9$)	11,6 ($\pm 0,6$)
20PG	0,20	11,7 ($\pm 0,2$)	5,9 ($\pm 0,3$)	1,2 ($\pm 0,3$)
40PG	0,40	33,9 ($\pm 3,7$)	11,2 ($\pm 0,3$)	5,1 ($\pm 0,3$)
10CL	0,20	13,0 ($\pm 0,4$)	7,0 ($\pm 0,1$)	1,9 ($\pm 0,3$)
20CL	0,40	34,0 ($\pm 1,9$)	22,5 ($\pm 2,7$)	4,3 ($\pm 0,4$)
20PS	0,20	14,1 ($\pm 0,3$)	6,3 ($\pm 0,3$)	0,8 ($\pm 0,5$)
20PA	0,25	18,5 ($\pm 0,5$)	10,8 ($\pm 0,4$)	2,2 ($\pm 0,2$)
Micelas				
20LPG	0,20	345 (± 95)	59,0 ($\pm 3,5$)	26,0 ($\pm 1,3$)
20LPA	0,30	115 (± 1)	76,0 ($\pm 2,3$)	56,0 ($\pm 3,1$)

Os valores de K_B foram usados para o cálculo da energia livre de partição (ΔG_x^0), dos peptídeos da solução aquosa para as LUVs de *E. coli* (equação 3.8). A **Tabela 4.8** apresenta esses valores juntamente com a diferença da energia livre da ligação dos análogos em relação ao peptídeo nativo ($\Delta\Delta G_x^0$). Os valores de ΔG_x^0 aumentaram (módulo decresceu) 0,68 e 1,08 kcal.mol⁻¹ para WLW e LWL, respectivamente, quando comparados com o peptídeo nativo. Segundo a escala de hidrofobicidade de Wimley e White (1996), a diferença na energia livre de

partição de água para a interface de bicamadas de POPC entre resíduos de W e L é $+1,29 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Assim, se a diferença entre as afinidades dos peptídeos fosse apenas devida à diferença de hidrofobicidade dos resíduos de W e L, dever-se-ia observar um aumento de ΔG^0_x de $+1,29$ e $+2,58 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para WLW e LWL, respectivamente. No entanto, esses valores são 53 e 42% do esperado, respectivamente. Esse resultado sugere que outras interações desempenham um papel na partição desses peptídeos, de modo a favorecer essa partição, tendo em vista o decréscimo na penalidade energética apenas por considerações de hidrofobicidade.

Tabela 4.8 – Energia livre de partição (ΔG^0_x , em kcal.mol^{-1}) dos peptídeos da solução aquosa para LUVs e micelas de composição variada e diferença entre a energia livre de partição dos análogos e aquela do peptídeo nativo ($\Delta\Delta G^0_x$, em kcal.mol^{-1}).

Composição	TRP3 ΔG^0_x	WLW ΔG^0_x		LWL ΔG^0_x	
		$\Delta\Delta G^0_x$			$\Delta\Delta G^0_x$
LUVs					
<i>E. coli</i>	-9,31	-8,63	0,68	-8,23	1,08
20PG	-7,90	-7,54	0,36	-6,78	1,12
40PG	-8,45	-7,81	0,64	-7,35	1,10
10CL	-7,83	-7,44	0,39	-6,51	1,32
20CL	-8,45	-8,21	0,20	-7,25	1,20
20PS	-7,94	-7,47	0,47	-6,51	1,43
20PA	-8,10	-7,79	0,31	-6,86	1,24
Micelas					
20LPG	-9,80	-8,78	1,02	-8,30	1,50
20LPA	-9,16	-8,92	0,24	-8,75	0,41

4.2.1B – LUVs de composição binária compostas por POPC e diferentes lipídios carregados negativamente

Os espectros de fluorescência de TRP3, WLW e LWL também apresentaram aumento de intensidade e deslocamento para o azul de $\lambda_{em}^{máx}$ com o aumento da concentração de LUVs de composição binária contendo fosfolipídios com diferentes cabeças polares carregadas negativamente, evidenciando a ligação (dado não apresentado). Os valores de $\lambda_{em}^{máx}$ e $\Delta\lambda_{em}^{máx}$ dos peptídeos em solução e na presença de 1,0 mM destas LUVs são apresentados na **Tabela 4.6**. Na presença dessas LUVs, os valores médios de $\lambda_{em}^{máx}$ foram 336, 337 e 338 nm para TRP3, WLW e LWL, respectivamente.

A afinidade dos peptídeos pelas LUVs foi quantificada pela construção de isotermas de ligação a partir dos espectros de fluorescência dos peptídeos na ausência e presença de concentrações crescentes das LUVs. As **Figuras 4.14 a 4.19** apresentam as isotermas de ligação.

Figura 4.14 – Isotermas de ligação de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em LUVs de 20PG. F/F_0 em 336, 337 e 338 nm, respectivamente. As linhas representam o ajuste dos dados à equação 3.7 de modo a obter a constante de ligação aparente (K_B).

Figura 4.15 – Isotermas de ligação de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em LUVs de 40PG. F/F_0 em 335, 335 e 336 nm, respectivamente. As linhas representam o ajuste dos dados à equação 3.7 de modo a obter a constante de ligação aparente (K_B).

Figura 4.16 – Isotermas de ligação de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em LUVs de 10CL. F/F_0 em 336, 337 e 339 nm, respectivamente. As linhas representam o ajuste dos dados à equação 3.7 de modo a obter a constante de ligação aparente (K_B).

Todas as isotermas de ligação mostraram aumento linear da fluorescência e saturação a partir de determinada concentração de lipídio. Os valores de K_B calculados a partir dessas isotermas são apresentados na **Tabela 4.7**. A tabela ainda apresenta a fração molar de carga negativa das membranas modelo (ϕ). A partir da análise dos valores de K_B , nota-se que: (1) TRP3 tem maior afinidade do que WLW, o qual, por sua vez, apresenta maior afinidade do que LWL por membranas com a mesma composição lipídica, de acordo com o observado para LUVs de *E. coli*; (2) para TRP3, os valores de K_B aumentam com ϕ ; (3) a ligação de WLW apresenta especificidade para LUV contendo CL, o que é mais evidente quando as membranas contêm concentrações maiores desse lipídio (20 mol %); (4) os valores de K_B para LWL são similares para 20PG, 10CL, 20PS e 20PA, com um pequeno aumento (ca. 2 vezes) para 40PG e 20CL. A ordem decrescente de ligação entre os peptídeos é similar à observada para a atividade permeabilizante, sugerindo que, possivelmente, a diferença na atividade dos peptídeos seja devida ao decréscimo na ligação com a substituição do(s) resíduo(s) de W por L.

Figura 4.17 – Isotermas de ligação de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em LUVs de 20CL. F/F_0 em 336, 337 e 338 nm, respectivamente. As linhas representam o ajuste dos dados à equação 3.7 de modo a obter a constante de ligação aparente (K_B).

Figura 4.18 – Isotermas de ligação de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em LUVs de 20PS. F/F_0 em 337, 337 e 341 nm, respectivamente. As linhas representam o ajuste dos dados à equação 3.7 de modo a obter a constante de ligação aparente (K_B).

Figura 4.19 – Isotermas de ligação de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em LUVs de 20PA. F/F_0 em 336, 336 e 338 nm, respectivamente. As linhas representam o ajuste dos dados à equação 3.7 de modo a obter a constante de ligação aparente (K_B).

Os valores de ΔG_x^0 para as bicamadas contendo lipídios com diferentes cabeças polares carregadas negativamente são apresentados na **Tabela 4.8** juntamente com $\Delta\Delta G_x^0$. Como no caso de LUVs de *E. coli*, os valores de $\Delta\Delta G_x^0$ foram menores do que os esperados por considerações de hidrofobicidade, sugerindo uma compensação pela contribuição de outras interações na ligação dos análogos às LUVs.

4.2.1C – Micelas

A ligação dos peptídeos às micelas também foi avaliada por estudos de fluorescência. Na presença de concentrações crescentes de micelas, aumentou a

intensidade de fluorescência dos peptídeos e os comprimentos de onda de máxima emissão foram deslocados para o azul, evidenciando a ligação (dados não apresentados). A **Tabela 4.6** apresenta os valores de $\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$ e $\Delta\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$ e as **Figuras 4.20 e 4.21** apresentam as isotermas de ligação às micelas de 20LPG e 20LPA, respectivamente.

Figura 4.20 – Isotermas de ligação de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL a micelas de 20LPG. F/F_0 em 338, 341 e 339 nm, respectivamente. As linhas representam o ajuste dos dados à equação 3.7 de modo a obter a constante de ligação aparente (K_B).

Figura 4.21 – Isotermas de ligação de (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL a micelas de 20LPA. F/F_0 em 339, 340 e 339 nm, respectivamente. As linhas representam o ajuste dos dados à equação 3.7 de modo a obter a constante de ligação aparente (K_B).

Os valores de $\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$ quando da ligação às micelas foram 339, 341 e 339 nm para TRP3, WLW e LWL, respectivamente. Os valores de K_B calculados a partir das isotermas de ligação são apresentados na **Tabela 4.7**. Nota-se na **Tabela 4.7** que: (1) os valores de K_B para micelas são ≥ 5 vezes aqueles obtidos para as bicamadas com a mesma composição de cabeça polar; (2) a afinidade por

micelas também varia entre os peptídeos na ordem decrescente TRP3 > WLW > LWL, de acordo com os resultados obtidos com bicamadas; (3) para TRP3, os valores de K_B são maiores para micelas de 20LPG em relação às de 20LPA (K_B ca. 2,5 vezes maior), mesmo estas apresentando uma fração molar de carga negativa nominal maior do que aquelas; (4) WLW e LWL apresentam maior afinidade por micelas de composição 20LPA, provavelmente, devido à maior fração molar de carga negativa nominal desta. Os valores calculados de ΔG_x^0 e $\Delta \Delta G_x^0$ para a interação dos peptídeos com micelas, assim como para bicamadas, também, indicam que a ligação dos análogos às micelas tem uma compensação por outras interações (**Tabela 4.8**).

4.2.2 – Predição da conformação dos peptídeos e estudos de CD

As propriedades conformacionais dos peptídeos foram investigadas pelo emprego da técnica espectroscópica de Dicroísmo Circular (CD). O CD é uma das técnicas físicas mais sensíveis para determinar estruturas e monitorar mudanças estruturais de biomoléculas. Os espectros de CD de proteínas e peptídeos no UV-distante (abaixo de 250 nm) são sensíveis à estrutura secundária dessas moléculas e, também, podem apresentar contribuições de transições de resíduos aromáticos (**Seção Materiais e Métodos**). Nesta seção apresentamos estudos da predição da conformação dos peptídeos, utilizando um servidor online de predição de estruturas de peptídeos (PEP-FOLD), e de sua conformação em solução aquosa, na presença de um indutor de estrutura secundária, TFE, e na presença das membranas modelo através da espectroscopia de CD.

4.2.2.1 – Predição da conformação dos peptídeos

Atualmente não é possível prever com precisão a estrutura de um peptídeo/proteína com base na sua sequência; no entanto, alguns algoritmos permitem estimar a propensão de uma dada sequência a adquirir uma estrutura específica. O servidor PEP-FOLD modela as conformações tridimensionais de peptídeos em solução aquosa (Maupetit et al., 2009). A partir da sequência de

amino ácidos, PEP-FOLD conduz 50 simulações e gera as 5 conformações mais representativas em termos de energia e população. A **Figura 4.22** apresenta a estrutura 3D de TRP3 ligado a micelas de SDS, determinada por RMN (Schibli et al., 1999), e as conformações preditas para TRP3, WLW e LWL usando PEP-FOLD. A predição permite algumas análises qualitativas: (1) a predição para os três peptídeos resultou em uma conformação global na forma de cunha, com uma dobra ao redor da P⁵, similar à da estrutura determinada por RMN para TRP3 ligado a micelas de SDS; (2) o C-terminal dos peptídeos apresenta propensão a formar conformação helicoidal; (3) as 5 conformações geradas para TRP3 e WLW apresentam desvio maior do que aquelas geradas para LWL.

Figura 4.22 – Predição da conformação de TRP3, WLW e LWL. (A) 19 estruturas finais de TRP3 ligado a SDS determinado por RMN (Schibli et al., 1999). Modelagem das estruturas preditas por PEP-FOLD para (B) TRP3, (C) WLW e (D) LWL. As predições geraram 5 modelos conformacionais para cada peptídeo que se encontram sobrepostos. As estruturas estão coloridas de acordo com o desvio quadrático médio (RMSD) do C α , variando de azul a vermelho, do menor para o maior desvio, respectivamente. Os valores médios de RMSD do C α de todas as estruturas são (A) 2,5 Å, (B) 3,1 Å, (C) 2,3 Å e (D) 1,4 Å. Circulada em verde a dobra ao redor de P⁵. As imagens foram construídas utilizando o software VMD (Humphrey et al., 1996).

4.2.2.2 – Estudos conformacionais dos peptídeos através de CD

4.2.2.2A – Espectros de CD dos peptídeos em solução aquosa

A **Figura 4.23** apresenta os espectros de CD no UV distante de TRP3, WLW e LWL em solução aquosa. O espectro de TRP3 é semelhante ao obtido em

outros estudos (Nagpal et al., 1999; Schibli et al., 1999; Andrushchenko et al., 2006; Bozelli et al., 2012), sendo caracterizado principalmente pela presença de uma banda negativa em 225 nm.

Figura 4.23 – Espectros de CD no UV-distante de TRP3 (48 μ M), WLW (42 μ M) e LWL (47 μ M) em solução aquosa, pH 7,2.

Esse perfil não se assemelha a nenhuma das formas espectrais para as estruturas clássicas (ao acaso, α -hélice, folha- β ; Greenfield e Fasman, 1969). Estudos teóricos e experimentais de peptídeos contendo resíduos de W evidenciaram a contribuição desse (e de outros resíduos aromáticos) para o espectro de CD no UV distante de proteínas e peptídeos (Woolley et al., 1992; Grishina e Woody, 1994; Woody, 1994; Wimley et al., 1998; Ladokhin et al., 1999; Strömstedt et al., 2009). O indol (cadeia lateral do W) apresenta uma transição permitida nessa região, a qual ocorre na região de 225 nm devido à transição para o estado excitado 1B_b , sendo essa a transição mais intensa no indol ($\epsilon \sim 3,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; Woody e Dunker, 1996). O espectro de CD no UV distante de um tripeptídeo, W3 (WWW), apresenta um espectro com características similares ao de TRP3 (Strömstedt et al., 2009). Sendo um peptídeo curto, que provavelmente apresenta uma estrutura flexível em solução, os autores atribuíram a banda negativa em 224 nm a uma transição das cadeias laterais dos resíduos de W. Outros peptídeos contendo cinco resíduos de W de forma sequencial, com sequencia N-terminal distinta, também apresentaram espectros similares, reforçando a idéia de que a banda em 225 nm se deva à transição das cadeias laterais dos resíduos de W (Strömstedt et al., 2009). Tomando esses resultados

em consideração, parece razoável atribuir a banda negativa em 225 nm às transições das cadeias laterais dos resíduos de W, que, na sequência de TRP3, encontram-se de forma sequencial. Essa análise é corroborada pelos espectros de WLW e LWL em solução aquosa. Os espectros de CD no UV distante desses peptídeos mudam notadamente em relação ao espectro de TRP3. Em ambos os casos os espectros são caracterizados principalmente por uma banda negativa intensa em ca. 199 nm, evidenciando a presença de equilíbrio entre diferentes conformações. A substituição de apenas um resíduo de W por L no caso de WLW minimiza consideravelmente a contribuição dos resíduos aromáticos. Para esse peptídeo, uma banda de baixa intensidade em 235 nm é observada, sugerindo alguma contribuição dos resíduos aromáticos para o espectro, possivelmente, pelos W encontrarem-se próximos espacialmente. No entanto, estas contribuições são muito menos pronunciadas. No caso de LWL, essas contribuições essencialmente desaparecem.

4.2.2.2B – Espectros de CD dos peptídeos em micelas

Nesta seção apresentamos os estudos de CD dos peptídeos na presença de micelas. A grande contribuição dos resíduos aromáticos para os espectros de CD de TRP3 dificulta a análise em termos de estrutura secundária. No entanto, estudos de CD e RMN mostraram que a conformação adquirida pelo peptídeo em micelas é similar na presença de micelas de composição variada (Schibli et al., 1999; Schibli et al., 2006; Bozelli et al., 2012; comunicação pessoal de A.P. Valente). Segundo os estudos de RMN, o peptídeo adquire uma conformação anfipática do tipo dobra-dobra, com as dobras ocorrendo ao redor da P⁵ e da P⁹ (Schibli et al., 1999; Schibli et al., 2006). Nesse contexto, tiramos proveito do conhecimento da conformação do peptídeo ligado em micelas (resolvida por RMN) para compreender as características dos espectros de CD e, posteriormente, analisar os espectros na presença de TFE e LUVs de composição lipídica variada.

Peptídeos anfifílicos em solução aquosa geralmente encontram-se em equilíbrio entre diferentes conformações e, ao se ligarem a membranas, esse equilíbrio é deslocado para uma conformação preferencial energeticamente

favorecida pelas características de polaridade do novo ambiente (Wimley e White, 1996; Almeida et al., 2012). De acordo com o modelo de partição-enovelamento acoplados, o alto custo energético da partição de ligações peptídicas na interface membrana-água é reduzido drasticamente se essas ligações participarem de ligações de hidrogênio, sendo essa a força motriz para a aquisição de conformação por peptídeos anfifílicos na ligação à membrana (Wimley e White, 1996; Almeida et al., 2012). A conformação adquirida por peptídeos anfifílicos usualmente é anfipática (uma face hidrofílica, com cadeias laterais polares/carregadas envolvida na interação com a cabeça polar dos lipídios e o meio aquoso, e uma face hidrofóbica, com cadeias laterais apolares envolvida na interação com as cadeias acila dos lipídios).

TRP3 ao se ligar a micelas também adquire conformação anfipática. No entanto, devido à sua sequência (VRRFPWWPFLRR) o peptídeo não teria como alcançar uma conformação anfipática caso adquirisse as estruturas secundárias mais encontradas, α -hélice e folha- β . Assim, a conformação do tipo dobra-dobra permite a aquisição de caráter anfipático; no entanto, ligações de hidrogênio estão presentes em menor extensão do que se a conformação fosse em α -hélice ou folha- β (Schibli et al., 1999). No caso de TRP3, parece que a conformação em micelas é dominada pelas interações das cadeias laterais dos resíduos de TRP3 com as micelas. Além do mais, a presença de dois motivos Ar-P-Ar (Ar = resíduo aromático), conhecidos por estabilizar dobras tipo VI, as quais possuem os resíduos aromáticos empilhados e a cadeia lateral da P entre eles, com a ligação X-P em *cis*, pode favorecer a estabilização de dobras no peptídeo (Yao et al., 1994). No entanto, segundo resultados de RMN, no caso de TRP3 ligado a micelas, as duas ligações X-P estão em *trans* (Schibli et al., 1999; Schibli et al., 2006; A.P. Valente comunicação pessoal).

Os espectros de CD de TRP3, WLW e LWL são apresentados na ausência e presença de micelas de 20LPG (**Figura 4.24**) e 20LPA (**Figura 4.25**). Os espectros sofrem mudanças decorrentes da interação com as micelas, evidenciando a ligação e aquisição de conformação. Utilizando os valores de K_B obtidos nos experimentos de ligação calculamos a fração dos peptídeos ligada às micelas (**Tabela 4.9**). Nestas condições, TRP3 e seus análogos encontram-se

totalmente ligados às micelas e os espectros refletem apenas as propriedades conformacionais desta população. Os espectros apresentam características semelhantes resultantes da interação com ambas as micelas, sugerindo uma conformação similar. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que a conformação de TRP3 é semelhante em micelas de composição variada (Schibli et al., 1999; Schibli et al., 2006; Bozelli et al., 2012; comunicação pessoal A.P. Valente).

Figura 4.24 – Espectros de CD no UV distante de 5 μ M (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL na ausência e presença de 1,0 mM de micelas de 20LPG em tampão fosfato pH 7,4.

Figura 4.25 – Espectros de CD no UV distante de 5 μ M (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL na ausência e presença de 1,0 mM de micelas de 20LPA em tampão fosfato pH 7,4.

Tabela 4.9 – Fração (%) de TRP3, WLW e LWL ligados às membranas modelo. Valores calculados utilizando os valores de K_B apresentados na Tabela 4.7.

Composição	Fração ligada		
	TRP3	WLW	LWL
LUVs			
<i>E. coli</i>	94	85	74
20PG	74	59	23
40PG	81	74	56

10CL	76	63	32
20CL	81	85	52
20PS	64	44	9
20PA	70	73	56
Micelas			
20LPG	100	98	96
20LPA	99	99	98

O espectro de TRP3 ligado às micelas é caracterizado por uma banda negativa em 225 nm e uma banda positiva em 198 nm com um ombro em 208 nm (**Tabela 4.10**). Esses espectros são semelhantes àqueles obtidos na presença de micelas de SDS e DPC, onde a estrutura resolvida por RMN mostra a conformação do tipo dobra-dobra (Schibli et al., 1999; Andrushchenko et al., 2006; Schibli et al., 2006) e também na presença de micelas de diferentes lisofosfolipídios (Bozelli et al., 2012).

Tabela 4.10 – Parâmetros dos espectros de CD de TRP3 na presença de 40% (v/v) TFE e membranas modelo. São indicados: comprimento de onda (em nm) da banda positiva na região de 192-202 nm (λ_1), da banda positiva na região de 204-208 nm (λ_2), da banda negativa na região de 223-225 nm (λ_3) e valores da elipticidade molar residual (em grau.cm². dnmol⁻¹) em λ_1 ($[\theta]_1$), λ_2 ($[\theta]_2$), λ_3 ($[\theta]_3$).

Condição	TRP3					
	λ_1	λ_2	λ_3	$[\theta]_1$	$[\theta]_2$	$[\theta]_3$
40 % TFE	196	208	223	11.210	3.203	-15.223
LUVs						
<i>E. coli</i>	196	204	225	11.327	5.140	-13.580
20PG	202	208	224	1.404	1.311	-8.640
10CL	196	207	225	4.847	3.273	-8.100
20PS	200	210	225	3.605	1.986	-8.308
20PA	198	208	225	3.684	1.138	-9.308
40PG	202	208	225	4.794	4.143	-10.892
20CL	197	207	225	5.033	3.694	-7.632
Micelas						
20LPG	199	207	224	6.380	4.582	-6.037
20LPA	198	208	224	7.340	4.858	-6.446

O emprego dos análogos com menor número de triptofanos permitiu a obtenção de espectros onde a contribuição da banda negativa centrada em ca. 225 nm diminuiu consideravelmente de intensidade, possibilitando uma melhor análise em termos de estrutura secundária dos peptídeos. Para WLW, o espectro de CD na presença de micelas é caracterizado principalmente por uma banda positiva em 195 nm, de baixa intensidade, e duas bandas negativas em ca. 206 nm

e ca. 218 nm, sendo que a banda negativa em 218 nm apresenta maior intensidade do que aquela em 206 nm (**Tabela 4.11, Figuras 4.24 e 4.25**). Essas características espectrais são semelhantes às de outros peptídeos contendo resíduos aromáticos na presença de TFE e/ou membranas modelo, cujos espectros foram analisados como sendo devidos à presença de dobra(s), sugerindo uma conformação semelhante para WLW (Bishop et al., 2001; Salinas et al., 2002). Para este peptídeo também é observada uma banda negativa de baixa intensidade centrada em ca. 234 nm (**Tabela 4.11**); esse tipo de banda tem sido atribuído, entre outras possíveis causas, ao empilhamento de resíduos aromáticos (Arnold et al., 1992), o que seria consistente com a interação entre W^6 e W^8 em WLW, sendo que a ausência de W^7 levaria a uma menor influência da interação entre os resíduos aromáticos sobre o espectro do que as interações entre os resíduos sequenciais $W^6W^7W^8$ do peptídeo nativo.

Tabela 4.11 – Parâmetros dos espectros de CD de WLW na presença de 40% (v/v) TFE e de membranas modelo. São indicados: comprimento de onda (em nm) da banda positiva (λ_1), da banda negativa na região de 201-205 nm (λ_2), da banda negativa na região de 217-226 nm (λ_3), da banda negativa entre 230-240 nm (λ_4) elipticidade molar (em grau.cm².dmol⁻¹) em λ_1 ($[\theta]_1$), λ_2 ($[\theta]_2$), λ_3 ($[\theta]_3$).

Condição	WLW						
	λ_1	λ_2	λ_3	λ_4	$[\theta]_1$	$[\theta]_2$	$[\theta]_3$
40 % TFE	192	202	217	236	4.027	-9.935	-5.939
LUVs							
<i>E. coli</i>	192	202	222	-	9.002	-8.459	-8.613
20PG	< 190	202	222	-	14.442	-6.093	-4.292
10CL	194	201	223	-	12.029	-5.808	-2.999
20PS	-	204	224	-	-	-3.987	-3.952
20PA	-	204	226	-	-	-4.700	-5.214
40PG	< 190	205	223	-	11.436	-4.894	-4.762
20CL	195	203	224	-	1.130	-3.914	-3.909
Micelas							
20LPG	196	205	217	237	1.348	-1.666	-2.111
20LPA	196	205	218	238	1.347	-2.154	-2.713

Quanto a LWL, o espectro em micelas é caracterizado por duas bandas negativas em ca. 205 nm e ca. 218 nm. Espectros de peptídeos curtos contendo resíduos aromáticos na presença de TFE ou membranas modelo apresentaram duas bandas na região de 202-205 nm e 217-220 nm, semelhantes às observadas nos espectros de LWL na presença de micelas (Tinker et al., 1988; Ladokhin et al., 1999; Bishop et al., 2001; Salinas et al., 2002). Assim, propomos que esses espectros sejam devidos à aquisição de conformação com uma ou mais dobras.

Vale notar que, diferentemente de WLW, no espectro de LWL não aparece a banda de baixa intensidade na região de 234 nm (comparar **Tabelas 4.11 e 4.12** e espectros dos dois peptídeos em micelas de 20 LPG e 20 LPA, **Figuras 4.24 e 4.25**). Isto poderia dever-se à ausência de interações entre resíduos de triptofanos nesse peptídeo e corrobora a proposta de que a banda em discussão corresponde a essa interação em WLW.

Tabela 4.12 – Parâmetros dos espectros de CD de LWL na presença de 40% (v/v) TFE e membranas modelo de composição variada. São indicados: comprimento de onda (em nm) da banda positiva (λ_1), da banda negativa na região de 198-205 nm (λ_2), da banda negativa na região de 218-222 nm (λ_3) e da elipticidade molar (em grau.cm².dmol⁻¹) em λ_1 ($[\theta]_1$), λ_2 ($[\theta]_2$), λ_3 ($[\theta]_3$).

Condição	LWL					
	λ_1	λ_2	λ_3	$[\theta]_1$	$[\theta]_2$	$[\theta]_3$
TFE	192	202	220	1.641	-8.325	-6.737
LUVs						
E. coli	192	200	220	6.990	-8.584	-5.254
20PG	< 190	202	-	4.089	-7.039	-
10CL	194	202	222	6.194	-6.177	-2.015
20PS	< 190	199	-	4.260	-6.424	-
20PA	-	205	224	-	-4.814	-3.578
40PG	< 190	198	218	18.928	-8.790	-3.601
20CL	< 190	203	-	23.177	-4.560	-
Micelas						
20LPG	-	204	225	-	-2.993	-1.570
20LPA	-	204	221	-	-3.359	-2.625

A ocorrência de dobra(s) nos análogos quando ligados a micelas, assim como no peptídeo nativo, sugere que a substituição do(s) resíduo(s) de W por L não afetou significativamente a conformação dos análogos. Esse resultado mostra a validade de usar os espectros dos análogos, os quais possuem menor contribuição das cadeias laterais aromáticas, para avaliar a estrutura secundária adquirida pelo peptídeo nativo nos diferentes ambientes.

4.2.2.2C – Espectros de CD dos peptídeos em soluções contendo TFE

O álcool 2,2,2-trifluoretanol (TFE) promove a aquisição de estrutura em polipeptídeos. TFE induz α -hélice, folha- β ou dobras e transições de folha- β para α -hélice em peptídeos e proteínas, sendo que a titulação de um peptídeo com TFE costuma ser utilizada para verificar a propensão que esse peptídeo tem de adquirir

determinada estrutura secundária (Martenson et al., 1985; Fan et al., 1993; Jasanoff e Fersht, 1994; Buck, 1998; Schreier et al., 2004; Teixeira et al., 2015). Nesse contexto, foi utilizado o TFE para obter informações a respeito das conformações que os peptídeos têm propensão de adquirir. A **Figura 4.26** apresenta os espectros de CD no UV distante de TRP3, WLW e LWL na ausência e presença de 10 e 40 % em volume de TFE. Os espectros sofrem alterações com o aumento do conteúdo de TFE, indicando a aquisição de estrutura mais ordenada. A **Figura 4.26 (B, D e F)** mostra que o efeito satura em ca. 30% TFE.

Figura 4.26 – Espectros de CD no UV distante de (A) 48 μM TRP3, (B) 42 μM WLW e (C) 47 μM LWL em solução aquosa e em solução contendo 10 e 40% TFE (v/v). Valores de $[\theta]$ normalizados em função do conteúdo de TFE para (D) TRP3 (em 225 nm), (E) WLW (em 220 nm) e (F) LWL (em 220 nm).

O espectro de TRP3 na presença de TFE é caracterizado por uma banda negativa em 223 nm e uma banda positiva em 196 nm com um ombro em 208 nm. Esse perfil de espectro é similar ao reportado na presença de micelas de várias composições, sugerindo que a conformação adquirida pelo peptídeo em TFE envolve a presença de dobra(s) (Schibli et al., 1999; Andrushchenko et al., 2006; Bozelli et al., 2012). Estudos teóricos de espectros de CD mostraram que

distorções no arranjo espacial de α -hélices, folhas- β e dobras- β levam a alterações nas intensidades das transições e deslocamento dos espectros (Manning et al., 1988). Assim, embora a forma do espectro em TFE indique a presença de dobra(s), os valores de λ_1 , $[\theta]_1$ e $[\theta]_3$ sugerem que o arranjo espacial do peptídeo deve diferir daquele em micelas (**Tabela 4.10**).

Quanto a WLW, na presença de TFE o espectro é caracterizado por uma banda positiva em 192 nm de baixa intensidade e uma banda negativa em 202 nm com um ombro em 217 nm. Em estudos com peptídeos modelos, um espectro com características similares foi analisado como sendo devido à aquisição de conformação em dobra- β (Perczel e Fasman, 1992). Assim, os espectros de WLW sugerem que o peptídeo adquire conformação em dobra(s). Da mesma forma que em micelas, contribuições de transições dos resíduos aromáticos também estão presentes no espectro, como evidenciado pela banda de baixa intensidade em 234 nm. Contudo, em TFE a intensidade do espectro na região de 218 nm é menor do que em 206, diferentemente do observado em micelas, sugerindo que as conformações em TFE e micelas diferem, de acordo com a análise dos espectros do peptídeo nativo.

O espectro de LWL é caracterizado por uma banda positiva de baixa intensidade em 192 nm e duas bandas negativas em 202 nm e 220 nm. Essas características espectrais indicam a presença de dobra(s), como observado para outros peptídeos contendo resíduos aromáticos na presença de TFE e/ou membranas modelo (Tinker et al., 1988; Ladokhin et al., 1999; Bishop et al., 2001; Salinas et al., 2002). Ainda, como em micelas de 20LPA e 20LPG, não se observa a banda de baixa intensidade na região de 234 nm, corroborando a idéia de que a sua presença nos espectros de WLW se deve ao empilhamento entre resíduos aromáticos. A presença de dobra(s) nos três peptídeos sugere que essa seria a conformação mais favorável para esses peptídeos na presença de micelas e TFE. No entanto, as diferenças mais sutis nesses espectros sugerem que o arranjo espacial dessa(s) dobra(s) difere nos diversos sistemas.

4.2.2.2D – Espectros de CD dos peptídeos em presença de LUVs de *E. coli*

A **Figura 4.27** apresenta os espectros de CD de TRP3, WLW e LWL na ausência e presença de LUVs de *E. coli*. Na presença destas bicamadas, os espectros sofreram alterações, evidenciando ligação e aquisição de conformação.

Figura 4.27 – Espectros de CD no UV distante de 2,5 μ M (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL na ausência e presença LUVs de *E. coli* (razão molar lipídio total:peptídeo 100:1) em tampão fosfato pH 7,4.

O espectro de TRP3 na presença de LUVs de *E. coli* é caracterizado por uma banda positiva em 196 nm com um ombro em 204 nm e uma banda negativa em 225 nm (**Tabela 4.10**). A fração ligada de TRP3 é 94% e o espectro reflete essencialmente as propriedades conformacionais desta população. A fração de peptídeo livre foi subtraída do espectro experimental resultando em um espectro com características essencialmente similares, de acordo com o fato do peptídeo encontrar-se quase todo ligado (**Figura 4.28**). A grande contribuição dos resíduos aromáticos para o espectro não permite a análise em termos de estrutura secundária. No entanto, o perfil do espectro difere um pouco daquele observado em micelas e TFE (**Figuras 4.24, 4.25 e 4.26**), sugerindo que poderia existir alguma diferença no arranjo espacial (**Tabela 4.10**).

Quanto aos análogos, a análise dos espectros na presença de LUVs de *E. coli* apresenta uma complexidade adicional, qual seja a presença de uma fração dos peptídeos livres (**Tabela 4.9**). Estes espectros refletem as propriedades conformacionais de no mínimo duas populações, peptídeos em solução e ligados.

Neste contexto, realizamos uma subtração espectral de modo a obter o espectro apenas dos peptídeos ligados (**Figura 4.28**). A principal diferença observada na subtração dos espectros de WLW e LWL encontra-se na região entre 190 e 200 nm, de acordo com a contribuição de uma população de peptídeo livre para o espectro (**Figuras 4.27 e 4.28**). O espectro de WLW ligado em LUVs de *E. coli* apresenta uma banda positiva em 190 nm e duas bandas negativas em 203 e 222 nm, sendo esta mais intensa. O espectro de um peptídeo de quatro resíduos (APYG), o qual adquire conformação em dobra- β possui características semelhantes, sugerindo que a conformação de WLW envolve a presença de dobra(s) (Tinker et al., 1988). Vale notar que para este peptídeo, na presença de LUVs de *E. coli*, não foi observada a banda negativa na região de 234 nm, sugerindo que a conformação não envolve o empilhamento de resíduos aromáticos de forma contrária ao observado em micelas e TFE (**Figuras 4.24, 4.25 e 4.26**). Quanto a LWL, o espectro apresenta características semelhantes às de WLW, sendo caracterizado por uma banda positiva em 190 nm e duas bandas negativas em 201 e 221 nm, sugerindo que a conformação deste peptídeo também envolve a presença de dobra(s).

Figura 4.28 – Subtração dos espectros em solução dos espectros obtidos na presença de LUVs de *E. coli*. (A) TRP3 e (B) WLW.

4.2.2.2E – Espectros de CD dos peptídeos em presença de LUVs de misturas binárias contendo PC e diferentes lipídios carregados negativamente

Os espectros de CD de TRP3, WLW e LWL são apresentados na ausência e presença de LUVs de 20PG, 40PG, 10CL, 20CL, 20PS e 20PA (**Figuras 4.29,**

4.31, 4.33, 4.35, 4.37 e 4.39, respectivamente). Todos os peptídeos na presença das LUVs de misturas binárias contendo PC e diferentes lipídios carregados negativamente apresentaram mudanças nos espectros de CD, mostrando ligação e aquisição de conformação. No entanto, a menor afinidade dos peptídeos por estas bicamadas resultou em uma maior contribuição da forma livre para os espectros do que aquela observada em LUVs de *E. coli*, principalmente, para LWL, o qual possui a menor afinidade por membranas do que os outros peptídeos (**Tabelas 4.7 e 4.9**). Uma forma de aumentar a fração dos peptídeos ligados seria aumentando a concentração das LUVs, de modo a deslocar o equilíbrio para a forma ligada. Entretanto, em concentrações mais altas do que as apresentadas observou-se a presença de uma grande contribuição de espalhamento de luz para os espectros, principalmente em comprimentos de onda menores que 200 nm, inviabilizando a análise. Quando a fração de peptídeo livre correspondia a no máximo 50%, a subtração dos espectros permitiu obter informações a respeito das propriedades conformacionais da população ligada (**Figuras 4.30, 4.32, 4.34, 4.36, 4.38 e 4.40**). Para espectros com uma maior fração do peptídeo livre (> 50%) a subtração espectral resultou em linhas distorcidas, inviabilizando a análise. Neste contexto, as propriedades conformacionais dos peptídeos ligados nestas LUVs serão avaliadas principalmente de forma qualitativa pela análise dos espectros obtidos a partir da subtração espectral.

Figura 4.29 – Espectros de CD no UV distante de 2,5 μ M (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL na ausência e presença de LUVs de 20PG (razão molar lipídio total:peptídeo 100:1) em tampão fosfato pH 7,4

Figura 4.30 – Subtração dos espectros em solução dos espectros obtidos na presença de LUVs de 20PG. (A) TRP3 e (B) WLW.

Figura 4.31 – Espectros de CD no UV distante de 2,5 μ M (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL na ausência e presença de LUVs de 40PG (razão molar lipídio total:peptídeo 50:1 para TRP3 e 100:1 para WLW e LWL) em tampão fosfato pH 7,4.

Figura 4.32 – Subtração dos espectros em solução dos espectros obtidos na presença de LUVs de 40PG. (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL.

Os espectros de TRP3 na presença destas LUVs é principalmente caracterizado pela banda negativa centrada em 225 nm, evidenciando a grande contribuição dos resíduos aromáticos para os espectros deste peptídeo. Estes espectros também apresentam duas bandas positivas ou uma banda positiva com um ombro na região de 197 a 210 nm (**Tabela 4.10**). Os espectros na presença destas LUVs não se assemelham àqueles em micelas ou TFE, sugerindo uma conformação diferente. A grande contribuição dos resíduos aromáticos também nestes casos dificulta a análise em termos de estrutura secundária. No caso de LUVs de 10CL e 20CL, além da banda negativa em 225 nm, observa-se o desdobramento em duas bandas na região de $[\theta]$ positivo, 197 nm e 207 nm, sendo a primeira de intensidade um pouco maior que a segunda (**Figuras 4.34 e 4.36**). Um análogo de TRP3, cujo W^8 foi substituído por 5-hidroxi-triptofano (5OHW), ligado a micelas de SDS apresenta um espectro de CD com características similares, sugerindo que TRP3 ligado a LUVs contendo CL poderia adquirir uma conformação semelhante (Arias et al., 2015). A conformação deste análogo resolvida por RMN não mostrou a presença de nenhuma dobra- β evidente; no entanto, esse peptídeo apresentou uma conformação anfipática mais compacta, na qual as extremidades N- e o C-terminais estão mais próximos espacialmente (Arias et al., 2015).

Figura 4.33 – Espectros de CD no UV distante de 2,5 μ M (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL na ausência e presença de LUVs de 10CL (razão molar lipídio total:peptídeo 100:1) em tampão fosfato pH 7,4.

Figura 4.34 – Subtração dos espectros em solução dos espectros obtidos na presença de LUVs de 10CL. (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL.

Figura 4.35 – Espectros de CD no UV distante de 2,5 μ M (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL na ausência e presença de LUVs de 20CL (razão molar lipídio total:peptídeo 50:1 para TRP3 e 100:1 para WLW e LWL) em tampão fosfato pH 7,4.

Figura 4.36 – Subtração dos espectros em solução dos espectros obtidos na presença de LUVs de 20CL. (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL.

Quanto a WLW, os espectros da população ligada a estas LUVs de composição binária são principalmente caracterizado por duas bandas negativas de baixa intensidade em 204 e 224 nm, sugerindo que a conformação deste peptídeo envolve a presença de dobra(s) (Tinker et al., 1988; Bishop et al., 2001). Como observado em LUVs de *E. coli*, a banda negativa de baixa intensidade em ca. 234 nm não é observada, indicando que a interação deste peptídeo com as bicamadas não envolve o empilhamento dos resíduos aromáticos.

Figura 4.37 – Espectros de CD no UV distante de 2,5 μM (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL na ausência e presença de LUVs de 20PS (razão molar lipídio total:peptídeo 50:1) em tampão fosfato pH 7,4.

Figura 4.38 – Subtração do espectro de TRP3 em solução do espectro obtido na presença de LUVs de 20PS.

Figura 4.39 – Espectros de CD no UV distante de 2,5 μ M (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL na ausência e presença de LUVs de 20PA (razão molar lipídio total:peptídeo 50:1 para TRP3 e 100:1 para WLW e LWL) em tampão fosfato pH 7,4.

Figura 4.40 – Subtração dos espectros em solução dos espectros obtidos na presença de LUVs de 20PA. (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL.

Os espectros de CD de LWL na presença de LUVs de composição binária, em todos os casos, apresentaram uma maior contribuição do peptídeo livre quando comparado com os outros peptídeos, devido à menor afinidade deste peptídeo pelas bicamadas (**Tabela 4.7 e 4.9**). Para este peptídeo, apenas os espectros na presença de LUVs de 40PG, 20CL e 20PA puderam ser analisados (**Figuras 4.32, 4.36 e 4.40**). Para estas composições os espectros são caracterizados principalmente por duas bandas negativas de baixa intensidade na região de 198-206 nm e 220-224 nm, sugerindo que o peptídeo adquire uma conformação com uma ou mais dobra(s) (Carbone e Leach, 1985; Tinker et al., 1988; Bishop et al., 2001).

4.2.3 – Localização dos peptídeos em membranas modelo através da supressão da fluorescência intrínseca dos peptídeos

Avaliamos a ligação e conformação dos peptídeos quando da interação com as membranas modelo; outra informação importante para a compreensão do seu mecanismo de ação é a sua localização nas membranas. Para tanto, realizamos experimentos da supressão da fluorescência intrínseca dos peptídeos utilizando um supressor aquossolúvel (acrilamida) e supressores intercalados nas membranas modelo (fosfolipídios e ésteres metílicos de ácido esteárico, MESL) contendo o grupamento nitróxido em diferentes posições. No caso dos fosfolipídios, usamos marcadores de spin com o grupamento nitróxido ligado no lugar de uma das metilas da cabeça polar colina (TempoPCSL) e em várias posições ao longo da cadeia acila *sn*-2. O grupamento nitróxido, no caso de MESL, estava ligado em várias posições ao longo da cadeia acila do éster metílico de ácido esteárico. Além do mais, analisamos o comprimento de onda de máxima emissão da fluorescência intrínseca dos peptídeos quando ligados às membranas, o qual é sensível à polaridade do ambiente e, portanto, informa qualitativamente sobre a penetração dos peptídeos.

4.2.3A – LUVs de *E. coli*

Os valores de $\lambda_{em}^{máx}$ e $\Delta\lambda_{em}^{máx}$ encontram-se na **Tabela 4.6** e as constantes de Stern-Volmer (K_{SV}), obtidas para a supressão pelo supressor aquossolúvel acrilamida, na **Tabela 4.13**. Como já discutido na análise dos estudos de ligação (**Seção 4.2.1**), todos os peptídeos apresentaram um deslocamento de $\lambda_{em}^{máx}$ para o azul na presença de LUVs de *E. coli*, evidenciando um ambiente de menor polaridade. Os valores de $\lambda_{em}^{máx}$ para TRP3, WLW e LWL quando da interação com essas bicamadas são 338, 338 e 336 nm, sugerindo uma penetração um pouco maior para LWL em relação aos outros peptídeos. A constante de Stern-Volmer nos informa quão acessível o fluoróforo (no presente caso o(s) resíduo(s) de W dos peptídeos) é ao supressor, diminuindo com o decréscimo da acessibilidade. Os valores de K_{SV} para os três peptídeos diminuíram na presença destas membranas em relação aos valores em solução aquosa, evidenciando uma

menor acessibilidade. Esses valores foram 4,9, 4,6 e 4,4 M⁻¹ para TRP3, WLW e LWL, respectivamente (**Tabela 4.13**).

Tabela 4.13 – Constantes de Stern-Volmer (K_{SV} , em M⁻¹) para a supressão da fluorescência por acrilamida. [Peptídeo] = 5 μM, [Lipídio] = 1,0 e 1,5 mM para LUVs e micelas, respectivamente. As medidas para LUVs de *E. coli* foram feitas a 37 °C, enquanto que as demais foram realizadas a 23 °C.

Condição	TRP3	K_{SV} WLW	LWL
Solução ^{23 °C}	22,4	22,4	26,7
Solução ^{37 °C}	23,4	22,9	28,0
LUVs			
<i>E. coli</i>	4,9	4,6	4,4
20PG	6,1	5,8	10,8
40PG	5,0	4,5	4,3
10CL	6,0	5,8	7,2
20CL	6,4	5,1	4,5
20PS	5,9	6,0	9,0
20PA	5,6	5,6	6,1
Micelas			
20LPG	7,2	6,6	7,6
20LPA	7,0	6,1	6,7

Para melhor caracterizar a localização dos peptídeos ligados a essas bicamadas, as LUVs de *E. coli* foram preparadas intercalando-se marcadores de spin fosfolipídicos contendo o grupamento nitróxido na cabeça polar e em diferentes posições ao longo da cadeia acila *sn*-2. O nitróxido é um supressor da fluorescência do triptofano e, quanto maior a proximidade entre ambos, maior será a supressão. No entanto, não foram utilizados métodos como análise da distribuição (Ladokhin, 1997) ou paralaxe (Chattopadhyay e London, 1987), os quais, em alguns casos permitem localizar com certa precisão a profundidade do fluoróforo na bicamada. Sendo assim, apresentamos uma análise qualitativa do perfil de supressão dependente da profundidade (PSDP) (Kyrychenko e Ladokhin; Ladokhin, 2014). O PSDP para TRP3, WLW e LWL na presença de LUVs de *E. coli* é apresentado na **Figura 4.41**. Para fins de simplificação, o marcador TempoPCSL é representado nas figuras pelas letras HG (head group). O perfil de supressão apresenta o pico da distribuição centrado no carbono 7 para TRP3 e WLW e 12 para LWL, sugerindo uma maior penetração deste, de acordo com os valores de λ_{em}^{max} e K_{SV} .

Figura 4.41 – Supressão da fluorescência dos peptídeos por marcadores de spin intercalados em LUVs de *E. coli*. Extensão da supressão ($F_0/F - 1$) para (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em função da posição na qual o grupamento nitroxido encontra-se ligado ao fosfolípido. [Peptídeo] = 5 μ M, [Lípido] = 300 μ M para TRP3 e WLW e 600 μ M para LWL em tampão Tris-HCl pH 7,4. Os marcadores de spin são TempoPCSL (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfo(Tempo)colina) e nC = n-doxil-PC (1-palmitoil-2-estearoil-(n-doxil)-*sn*-glicero-3-fosfocolina) onde n é o carbono ao qual o nitroxido está ligado na cadeia acila *sn*-2. O Em TempoPCSL, o marcador está ligado à cabeça polar.

4.2.3B – LUVs de composição binária compostas por POPC e diferentes lipídios carregados negativamente

A localização de TRP3, WLW e LWL em LUVs com diferentes cabeças polares carregadas negativamente também foi estudada. Os valores de $\lambda_{em}^{m\acute{a}x}/\Delta\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$ e K_{SV} são apresentados nas **Tabelas 4.6** e **4.13**, respectivamente. Os valores de $\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$ para TRP3 na presença das bicamadas compostas por diferentes cabeças polares carregadas negativamente são muito semelhantes, com valor médio de 336 nm. Os valores da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) diminuem pela ligação dos peptídeos às bicamadas, evidenciando menor acessibilidade dos triptofanos. O valor médio de K_{SV} nas bicamadas foi de 5,8 M^{-1} . $\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$ para WLW e LWL apresentou valores médios de 337 e 339 nm. Os valores de K_{SV} , também, evidenciaram menor acessibilidade desses peptídeos devido à ligação, o valor médio para WLW foi 5,5 M^{-1} enquanto que para LWL o valor foi 8,3 M^{-1} para bicamadas de 20PG, 10CL, 20PS e 20PA e 4,4 M^{-1} , para bicamadas de 40PG e 20CL. Utilizando os valores de K_B (**Tabela 4.7**) calculamos que nas condições experimentais 46, 35, 56 e 31% do LWL encontra-se em solução na presença de LUVs de 20PG, 10CL, 20PS e 20PA, respectivamente, enquanto que

esse valor diminui para 17% em LUVs de 40PG e 20CL. Assim, o maior valor de K_{SV} obtido para as composições 20PG, 10CL, 20PS e 20PA, deve-se a uma maior fração do peptídeo livre, a qual é mais acessível à acrilamida.

Figura 4.42 – Supressão da fluorescência dos peptídeos por marcadores de spin intercalados em LUVs de 20PG. Extensão da supressão ($F_0/F - 1$) para (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em função da posição na qual o grupamento nitroxido encontra-se ligado ao fosfolipídio. [Peptídeo] = 5 μ M, [Lipídio] = 300 μ M para TRP3 e WLW e 600 μ M para LWL em tampão Tris-HCl pH 7,4. Marcadores de spin como na **Figura 4.41**.

Figura 4.43 – Supressão da fluorescência dos peptídeos por marcadores de spin intercalados em LUVs de 40PG. Extensão da supressão ($F_0/F - 1$) para (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em função da posição na qual o grupamento nitroxido encontra-se ligado ao fosfolipídio. [Peptídeo] = 5 μ M, [Lipídio] = 300 μ M para TRP3 e WLW e 600 μ M para LWL em tampão Tris-HCl pH 7,4. Marcadores de spin como na **Figura 4.41**.

Figura 4.44 – Supressão da fluorescência dos peptídeos por marcadores de spin intercalados em LUVs de 10CL. Extensão da supressão ($F_0/F - 1$) para (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em função da posição na qual o grupamento nitroxido encontra-se ligado ao fosfolípido. [Peptídeo] = 5 μ M, [Lípido] = 300 μ M para TRP3 e WLW e 600 μ M para LWL em tampão Tris-HCl pH 7,4. Marcadores de spin como na **Figura 4.41**.

Os gráficos de PSDP para TRP3, WLW e LWL na presença de LUVs contendo diferentes lipídios carregados negativamente são apresentados nas **Figuras 4.41 a 4.47**. O perfil de supressão foi semelhante para os três peptídeos nas diferentes bicamadas, com o pico da distribuição centrado entre os carbonos 7 e 12. Para TRP3, o pico da distribuição está centrado na posição 10 para as composições 20PG, 40PG e 20CL, enquanto que para as LUVs de 10CL, 20PS e 20PA se encontra na posição 7. Para WLW o pico encontra-se centrado na posição 10 para as composições 20PG, 40PG e 20CL, entre 7-12 para 10CL, em 12 para 20PS e em 7 para 20PA. No caso de LWL o pico encontrou-se centrado na posição 10 para todas as composições estudadas.

Figura 4.45 – Supressão da fluorescência dos peptídeos por marcadores de spin intercalados em LUVs de 20CL. Extensão da supressão ($F_0/F - 1$) para (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em função da posição na qual o grupamento nitroxido encontra-se ligado ao fosfolípido. [Peptídeo] = 5 μ M, [Lípido] = 300 μ M para TRP3 e WLW e 600 μ M para LWL em tampão Tris-HCl pH 7,4. Marcadores de spin como na **Figura 4.41**.

Figura 4.46 – Supressão da fluorescência dos peptídeos por marcadores de spin intercalados em LUVs de 20PS. Extensão da supressão ($F_0/F - 1$) para (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em função da posição na qual o grupamento nitroxido encontra-se ligado ao fosfolipídio. [Peptídeo] = 5 μ M, [Lipídio] = 300 μ M para TRP3 e WLW e 600 μ M para LWL em tampão Tris-HCl pH 7,4. Marcadores de spin como na **Figura 4.41**.

Figura 4.47 – Supressão da fluorescência dos peptídeos por marcadores de spin intercalados em LUVs de 20PA. Extensão da supressão ($F_0/F - 1$) para (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em função da posição na qual o grupamento nitroxido encontra-se ligado ao fosfolipídio. [Peptídeo] = 5 μ M, [Lipídio] = 300 μ M para TRP3 e WLW e 600 μ M para LWL em tampão Tris-HCl pH 7,4. Marcadores de spin como na **Figura 4.41**.

4.2.3C – Micelas

A localização dos peptídeos também foi avaliada quando da interação com micelas. Os valores de $\lambda_{em}^{m\acute{a}x}/\Delta\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$ e K_{SV} são apresentados nas **Tabelas 4.6** e **4.13**. Os gráficos de PSDP para os peptídeos na presença destas micelas são apresentados nas **Figuras 4.48** e **4.49**.

Figura 4.48 – Supressão da fluorescência dos peptídeos por marcadores de spin intercalados em micelas de 20LPG. Extensão da supressão ($F_0/F - 1$) para (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em função do carbono no qual o grupamento nitróxido encontra-se ligado ao longo da cadeia acila do éster metílico do ácido esteárico (MESL). [Peptídeo] = 5 μ M, [Micela] = 1,0 mM em tampão Tris-HCl, pH 7,4. Os marcadores de spin foram nC = n-MESL, onde n é o carbono no qual o grupamento nitróxido está ligado ao longo da cadeia acila.

Os valores de $\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$ para a interação com micelas é semelhante para as duas composições e os valores médios são 339, 341 e 339 nm para TRP3, WLW e LWL. No caso de TRP3 e WLW, observa-se um aumento de $\lambda_{em}^{m\acute{a}x}$ quando comparado com bicamadas, sugerindo que a ligação é um pouco mais superficial no caso das micelas. A análise dos valores de K_{SV} também sugere localização um pouco mais superficial nas micelas, como evidenciado pelo aumento nos valores de K_{SV} . Os valores médios para TRP3, WLW e LWL são, respectivamente, 7,1, 6,4 e 7,2 M^{-1} . O PSDP é essencialmente o mesmo para as duas composições. No caso das micelas, os supressores incorporados foram éster metílico do ácido esteárico (MESL) contendo nitróxido em diferentes posições ao longo da molécula. A supressão para todos os peptídeos é mais eficiente com o nitróxido na posição 5 e 16 da cadeia acila. O nitróxido é um grupamento polar e, provavelmente, quando ligado à posição 16 poderia ocorrer um dobramento da molécula, deslocando o nitróxido para uma localização mais superficial (na interface micela-água), ou a molécula poderia estar tombando rapidamente, de modo que na média o nitróxido passa parte do tempo na superfície e outra parte no cerne da micela. Essa consideração parece razoável e explicaria o perfil de supressão. Esses resultados indicam uma localização dos peptídeos na superfície micela-água de acordo com outros estudos da literatura (Schibli et al., 1999; Bozelli et al., 2012). No entanto,

uma comparação direta com LUVs não é possível, uma vez que a baixa polaridade do grupo éster nos marcadores de spin MESL não permite uma ancoragem forte da molécula na interface e a localização dos mesmos na micela não é conhecida (Bianconi et al., 1988; de Paula e Schreier, 1995).

Figure 4.49 – Supressão da fluorescência dos peptídeos por marcadores de spin intercalados em micelas de 20LPA. Extensão da supressão ($F_0/F - 1$) para (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL em função do carbono no qual o grupamento nitroxido encontra-se ligado ao longo da cadeia acila do éster metílico do ácido esteárico (MESL). [Peptídeo] = 5 μ M, [Micela] = 1,0 mM em tampão Tris-HCl, pH 7,4. Marcadores de spin como na **Figura 4.48**.

4.2.4 – Efeito da ligação dos peptídeos sobre a organização molecular das membranas modelo

A organização molecular das membranas modelo foi investigada com marcadores de spin de natureza lipídica empregando a espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica, RPE. Para tanto, foram incorporados marcadores de spin com o hexanel Tempo contendo o radical nitroxido ligado no lugar de uma das metilas da cabeça polar colina (TempoPCSL) ou com o grupamento doxil contendo o radical nitroxido em várias posições ao longo da cadeia acila *sn*-2 em LUVs de *E. coli* e em MLVs para as demais composições. Em micelas, intercalamos marcadores de spin com o grupamento doxil contendo o radical nitroxido ligado em várias posições ao longo da cadeia acila do éster metílico de ácido esteárico (MESL) (**Tabela 3.2**). Os estudos com LUVs de *E. coli* foram realizados na presença de TRP3, WLW e LWL. Nos estudos de bicamadas de composição binárias e de micelas foi investigado apenas o peptídeo nativo.

4.2.4A – LUVs de *E. coli*

A **Figura 4.50** apresenta os espectros de RPE dos marcadores fosfolipídicos intercalados em LUVs de *E. coli* na ausência e presença de TRP3, WLW e LWL.

Figura 4.50 – Espectros de RPE de marcadores de spin lipídicos incorporados em LUVs de *E. coli* na ausência (em preto) e presença (em vermelho) de TRP3 (A, D, G, J, M, P, W), WLW (B, E, H, K, N, Q, T) e LWL (C, F, I, L, O, R, U) em tampão Tris-HCl, pH 7,4. Os marcadores são (A, B, C) TempoPCSL, (D, E, F) 5PCSL, (G, H, I) 7PCSL, (J, K, L) 10PCSL, (M, N, O) 12 PCSL, (P, Q, R) 14PCSL e (S, T, U) 16PCSL. [Lipídio total] = 5 mM e [Peptídeo] = 500 μ M.

Na ausência de peptídeos, o espectro de TempoPCSL intercalado em LUVs de *E. coli* apresenta três linhas relativamente estreitas, indicando que a cabeça polar do marcador executa um movimento rápido ao redor de seu eixo longo molecular. Neste espectro, as alturas dos picos decrescem na ordem: campo baixo > campo central > campo alto. Esse tipo de espectro é característico de rotação rápida ao redor do eixo x do nitróxido (ao longo da ligação N-O; para identificação dos eixos arbitrários atribuídos aos nitróxidos (ver **Seção Materiais e Métodos**) (Griffith e Jost, 1976). Isso se deve à estrutura química do marcador, que possui o eixo x do nitróxido orientado aproximadamente paralelo ao eixo longo molecular. Assim, o espectro de TempoPCSL indica que, em média, a ligação N-O encontra-se aproximadamente paralela à normal à bicamada. Na presença dos peptídeos, os espectros também apresentam três linhas estreitas; no entanto, a ordem decrescente das alturas muda, decrescendo na ordem campo central > campo baixo > campo alto, mostrando uma mudança na orientação média da ligação N-O (e, portanto, da cabeça polar), a qual não se encontra mais aproximadamente paralela à normal à bicamada.

O fato de as linhas espectrais de TempoPCSL serem relativamente estreitas é indicativo de alta velocidade de rotação ao redor do eixo x e provavelmente da cabeça polar. A **Figura 4.50** mostra que a ligação dos peptídeos promove um alargamento das linhas espectrais, provavelmente devido na sua maior parte a uma diminuição da mobilidade na região da cabeça polar da membrana.

Os espectros de TempoPCSL apresentam ainda evidência de interação de troca spin-spin, indicada pela presença de um espectro subjacente muito alargado, que faz com que a parte positiva do espectro no campo baixo tenha uma contribuição maior do que a parte negativa, o oposto ocorrendo na região de campo alto. Esse evento é interessante, uma vez que a concentração (1% em moles do total de lipídios é planejada para que o marcador se encontre suficientemente diluído de modo a prevenir a ocorrência de interação spin-spin). A observação da interação indica que o marcador deve ter sido excluído de alguma(s) região(ões) da membrana de modo a ter sua concentração aumentada em outra(s). Esse fenômeno será discutido de forma mais extensa na análise dos espectros dos nPCSL.

A **Figura 4.50** mostra que, na ausência dos peptídeos, os espectros de 5PCSL, 7PCSL e 10PCSL apresentam extremos externos e internos. Os valores calculados de S_{ef} encontram-se na **Tabela 4.14** e mostram que a membrana de *E. coli* apresenta o gradiente de flexibilidade geralmente observado em membranas. Além disso, os espectros dos três marcadores evidenciam a ocorrência de interação de troca, de forma muito intensa para 5PCSL e 7PCSL. Além do mais, a interação não é observada para posições mais próximas da metila terminal.

Espectros de RPE de marcadores fosfolipídicos intercalados em bicamadas preparadas com lipídios de *E. coli* (uma composição semelhante à empregada no presente estudo) também apresentaram interação de troca (Hubert et al., 2003). Esse resultado mostra que os marcadores encontram-se próximos espacialmente. Em sistemas modelo de composição semelhante, estudos de microscopia de força atômica (AFM) mostraram a existência de dois tipos de domínios (Lopes et al., 2010). A possível existência desses domínios poderia explicar a ocorrência da interação de troca, caso as sondas sofressem partição preferencial em um domínio, embora não explique porque a interação foi apenas observada para os marcadores com o grupamento nitróxido próximo à interface bicamada-água. Assim, torna-se necessário considerar também as propriedades físico-químicas das bicamadas e das sondas. As LUVs de *E. coli* contém 67% de PE. Quando comparada com outros fosfolipídios (PC, PG, PS), PE forma bicamadas com menor área por lipídio (mais empacotada). Essa diferença no empacotamento deve-se à reduzida hidratação da cabeça polar de PE devida a fortes ligações de hidrogênio intermoleculares (Boggs, 1987; Kucerka et al., 2014). Além disso, vale ressaltar que o grupamento doxil é um grupo volumoso. Nesse contexto, a introdução de um grupamento volumoso próximo à interface bicamada-água não seria favorecido e, possivelmente, acarretaria a sua segregação de eventuais regiões enriquecidas em PE, aumentando sua concentração em outras regiões (ou domínios). Essa hipótese explicaria porque a interação de troca é observada preferencialmente para os marcadores com o grupamento nitróxido próximo à interface bicamada-água.

Quanto aos espectros de 12PCSL, 14PCSL e 16PCSL, nota-se que os mesmos não apresentam extremos externos e internos, de acordo com o esperado

para o gradiente de flexibilidade. Uma forma empírica de extrair combinadamente as informações sobre ordem e mobilidade é pelo uso da relação das alturas das linhas espectrais (Schreier et al., 1984; Frezzatti et al., 1986). Para os espectros desses marcadores foi calculada a relação h_{+1}/h_0 (**Tabela 4.15**); pode ser visto que, quanto mais próximo o nitróxido da metila terminal, menor a relação, indicando um aumento da mobilidade e/ou uma diminuição da ordem.

A adição dos peptídeos causou significativas alterações nos espectros dos marcadores, indicando que a interação com os lipídios da membrana de *E. coli* tem um profundo efeito sobre a organização molecular da bicamada. Os espectros de 5PCSL, 7PCSL e 10PCSL foram os mais afetados e evidenciam forte imobilização dos marcadores na região da bicamada mais próxima da interface membrana-água. Além da imobilização indicada pelo desaparecimento da linha de campo alto relativa a $2A_{\perp}$, observa-se que houve um estreitamento do espectro na região de campo baixo, sugerindo um ordenamento maior das moléculas. Valores de $A_{\parallel}$ e $A_{\max}$ medidos na ausência e presença dos peptídeos, respectivamente, mostram um considerável aumento desses parâmetros por ação dos peptídeos (**Tabela 4.14**). Os espectros sugerem também uma diminuição na interação de troca, que seria devida a uma redistribuição dos marcadores resultante de alterações no empacotamento dos lipídios e/ou modificações na existência de eventuais domínios enriquecidos em certos lipídios. Os efeitos dos peptídeos variaram na ordem: TRP3 > WLW > LWL. Para os marcadores 12PCSL, 14PCSL e 16PCSL o efeito foi avaliado através da relação h_0/h_{+1} . A relação aumenta na presença dos peptídeos, evidenciando um decréscimo na mobilidade e/ou aumento na ordem induzidos pelos peptídeos. A variação da relação ($\Delta(h_0/h_{+1})$) mostra que o efeito decresce na ordem TRP3 > WLW > LWL, enquanto que ao longo da cadeia acila a ordem decrescente é 12PCSL > 14PCSL > 16PCSL (**Tabela 4.15**). Para o marcador 12PCSL os espectros na presença dos peptídeos ainda evidenciam a presença de duas componentes, uma correspondente a uma população mais imobilizada (linhas mais largas) e outra correspondente a uma população mais móvel (linhas mais estreitas).

Tabela 4.14 – Parâmetro de ordem, S_{ef} , e $2A_{||}$ (G) na ausência e $2A_{max}$ (G) na presença de TRP3, WLW e LWL para os espectros de 5PCSL, 7PCSL e 10PCSL em membranas de *E. coli*. Valores medidos ou calculados a partir dos espectros da **Figura 4.44**, conforme descrito em Materiais e Métodos (**Seção 3.2.4.3.F**).

Marcador de spin	S_{ef}	$2A_{ }$	$2A_{max}$		
	s/ peptídeo	s/ peptídeo	TRP3	WLW	LWL
5PCSL	0,682	54,3	58,6	58,3	58,2
7PCSL	0,641	52,4	57,2	54,8	54,1
10PCSL	0,543	48,3	52,8	50,1	49,3

Tabela 4.15 – Relação das alturas dos picos de campo central (h_0) e baixo (h_{+1}), h_0/h_{+1} , para os marcadores de spin 12PCSL, 14PCSL e 16PCSL intercalados em LUVs de *E. coli* na ausência e presença de TRP3, WLW e LWL. Variação percentual de h_0/h_{+1} ($\Delta h_0/h_{+1}$, na presença – ausência dos peptídeos).

Marcador de spin	h_0/h_{+1}	$\Delta h_0/h_{+1}$
12PCSL		
S/ peptídeo	1,70	
TRP3	1,89	11
WLW	1,83	7,6
LWL	1,79	5,3
14PCSL		
S/ peptídeo	1,35	
TRP3	1,42	5,2
WLW	1,37	1,5
LWL	1,35	0,0
16PCSL		
S/ peptídeo	1,07	
TRP3	1,11	3,7
WLW	1,09	1,9
LWL	1,08	0,9

Uma vez que os parâmetros S_{ef} , A_{max} , $A_{||}$ e h_0/h_{+1} não são aplicáveis a todos os espectros, a fim de comparar as propriedades de organização molecular, tanto em ausência como em presença dos peptídeos para os marcadores em todas as posições através de um único critério, decidimos empregar a medida da largura da linha de campo central (W_0), o que viabiliza o nosso objetivo.

A **Figura 4.51** apresenta os valores de W_0 para os diferentes marcadores fosfolipídicos intercalados em LUVs de *E. coli* na ausência e presença dos peptídeos e a variação percentual em W_0 induzida pelos peptídeos (ΔW_0). De acordo com os parâmetros medidos anteriormente, os valores de W_0 refletem o

gradiente de flexibilidade da membrana, mostrando que o empacotamento molecular é maior na região próxima à cabeça polar dos lipídios, diminuindo à medida que nos aproximamos da metila terminal. Na presença dos peptídeos, nota-se um aumento em W_0 , indicando um decréscimo na mobilidade e/ou aumento na ordem. O efeito é maior para os marcadores próximos à interface bicamada-água, enquanto que em posições próximas à metila terminal o efeito é muito pequeno. Esse perfil de perturbação é semelhante ao observado para peptídeos que não possuem orientação transmembrana e encontram-se localizados mais próximos à superfície da membrana (Kleinschmidt et al., 1997).

Figura 4.51 – Largura da linha de campo central (W_0) em função da posição do grupamento nitróxido em marcadores de spin intercalado em LUVs de *E. coli*. (A) Valores de W_0 na ausência e presença de TRP3, WLW e LWL. (B) Variação percentual de W_0 (na presença e na ausência de peptídeo) em função da posição do grupamento nitróxido.

4.2.4B – MLVs de composição binária compostas por POPC e diferentes lipídios carregados negativamente

As **Figuras 4.52 e 4.53** apresentam os espectros de RPE dos marcadores fosfolipídicos intercalados em MLVs de composição 20PG e 40PG, respectivamente. As outras composições apresentaram espectros qualitativamente similares.

Figura 4.52 – Espectros de RPE de marcadores de spin lipídicos incorporados em MLVs de 20PG na ausência (linha preta) e presença de TRP3 (linha vermelha) em tampão Tris-HCl, pH 7,4. Os marcadores são (A) TempoPCSL, (B) 5PCSL, (C) 7PCSL, (D) 10PCSL, (E) 12PCSL, (F) 14PCSL e (G) 16PCSL. [Lipídio] = 5,0 mM e [TRP3] = 500 μ M.

Figura 4.53 – Espectros de RPE de marcadores de spin lipídicos incorporados em MLVs de 40PG na ausência (linha preta) e presença de TRP3 (linha vermelha) em tampão Tris-HCl, pH 7,4. Os marcadores são (A) TempoPCSL, (B) 5PCSL, (C) 7PCSL, (D) 10PCSL, (E) 12 PCSL, (F) 14PCSL e (G) 16PCSL. [Lipídio] = 5,0 mM e [TRP3] = 500 μ M.

Na ausência de TRP3, os espectros de TempoPCSL intercalado em MLVs de composição binária compostas por POPC e diferentes lipídios carregados negativamente apresentaram três linhas relativamente estreitas, assim como observado em LUVs de *E. coli*, indicando que a cabeça polar do marcador executa um movimento rápido ao redor de seu eixo longo molecular. Nestes espectros, as alturas dos picos decrescem na ordem: campo baixo > campo central > campo alto. Como discutido para LUVs de *E. coli*, esses espectros indicam que, em média, a ligação N-O encontra-se aproximadamente paralela à normal às bicamadas. Na presença de TRP3, os espectros também apresentam três linhas relativamente estreitas; no entanto, a ordem decrescente das alturas muda, decrescendo na ordem campo central > campo baixo > campo alto, mostrando uma mudança na orientação média da ligação N-O (e, portanto, da cabeça polar), a qual não se encontra mais aproximadamente paralela à normal à bicamada. As **Figuras 4.52 e 4.53** mostram que a ligação de TRP3 promove um alargamento das linhas espectrais, provavelmente devido na sua maior parte a uma diminuição

da mobilidade na região da cabeça polar da membrana. O alargamento das linhas espectrais induzido pelo peptídeo também foi observado para as outras composições. Vale notar que para as MLVs de composição binária compostas por POPC e diferentes lipídios carregados negativamente a interação spin-spin observada nos espectros de TempoPCSL (5PCSL, 7PCSL e 10PCSL) em LUVs de *E. coli* não é observada, mostrando que para estas composições o marcador não é segregado em alguma(s) região(ões) da membrana e encontra-se homogeneamente distribuído nesta.

As **Figuras 4.52 e 4.53** mostram que, na ausência de TRP3, os espectros de 5PCSL, 7PCSL e 10PCSL apresentam extremos externos e internos. Os valores calculados de S_{ef} encontram-se na **Tabela 4.16** e mostram que estas membranas apresentam o gradiente de flexibilidade geralmente observado em membranas. Além disso, os espectros dos três marcadores não evidenciam a ocorrência de interação de troca, mostrando que estes não são segregados nestas membranas, como observado para o marcador TempoPCSL. A adição de TRP3 causou alterações nos espectros dos marcadores, indicando que a interação com os lipídios tem um efeito sobre a organização molecular destas bicamadas. Os espectros de 5PCSL, 7PCSL e 10PCSL também apresentaram extremos externos e internos na presença de TRP3. A presença da linha de campo alto relativa a $2A_{\perp}$ mostra que para estas membranas as sondas ainda movimentam-se rapidamente na escala de tempo do experimento, diferentemente da forte imobilização induzida pelo peptídeo na região mais próxima a interface membrana-água em membranas de *E. coli*. Os valores de S_{ef} calculados aumentaram na presença do peptídeo, indicando uma restrição na amplitude de movimento destas sondas quando o peptídeo intercala-se nas membranas (**Tabela 4.16**).

Tabela 4.16 – Extremos externos ($2A_{\parallel}$, G) e parâmetro de ordem efetivo (S_{ef}) para os espectros de RPE de 5PCSL, 7PCSL e 10PCSL intercalados em MLVs de sistemas binários contendo diferentes cabeças polares carregadas negativamente, na ausência (-) e presença (+) de TRP3.

Marcador	20PG		40PG		10CL		20CL		20PS		20PA	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
$2A_{\parallel}$												
5PCSL	53,6	55,6	53,2	56,2	53,6	55,7	54,2	55,8	53,5	55,1	53,5	54,6
7PCSL	51,6	53,2	51,5	54,9	52,1	53,1	52,2	54,1	51,5	53,5	52,0	53,3
10PCSL	48,6	50,5	48,3	51,2	47,8	50,3	48,2	49,8	47,1	48,8	47,6	49,9
S_{ef}												
5PCSL	0,668	0,714	0,659	0,720	0,665	0,715	0,674	0,718	0,668	0,703	0,665	0,694

7PCSL	0,614	0,658	0,616	0,690	0,628	0,655	0,628	0,674	0,613	0,659	0,626	0,656
10PCSL	0,537	0,587	0,536	0,602	0,519	0,581	0,534	0,572	0,507	0,551	0,521	0,573

Quanto aos espectros de 12PCSL, 14PCSL e 16PCSL, nota-se que os mesmos não apresentam extremos externos e internos, assim como observado em LUVs de *E. coli*. Na ausência de TRP3, a relação h_0/h_{+1} diminui na direção da metila terminal, indicando um aumento na mobilidade e/ou diminuição na ordem (**Tabela 4.17**). Na presença de TRP3, esta relação aumenta, evidenciando um decréscimo na mobilidade e/ou aumento na ordem induzidos pelo peptídeo. A variação da relação ($\Delta(h_0/h_{+1})$) mostra que o efeito decresce ao longo da cadeia acila na ordem 12PCSL > 14PCSL > 16PCSL (**Tabela 4.17**). Como observado em LUVs de *E. coli*, os espectros de RPE do marcador 12PCSL na presença de TRP3 também evidenciam a presença de duas componentes, uma mais imobilizada e outra mais móvel.

Tabela 4.17 – Relação das alturas dos picos de campo central (h_0) e baixo (h_{+1}), h_0/h_{+1} , para os marcadores de spin 12PCSL, 14PCSL e 16PCSL intercalados em MLVs compostas por diferentes lipídios carregados negativamente na ausência e presença de TRP3. Variação porcentual de h_0/h_{+1} ($\Delta h_0/h_{+1}$, na presença – ausência dos peptídeos).

Composição		12PCSL		14PCSL		16PCSL	
		h_0/h_{+1}	$\Delta h_0/h_{+1}$	h_0/h_{+1}	$\Delta h_0/h_{+1}$	h_0/h_{+1}	$\Delta h_0/h_{+1}$
20PG	-	1,94		1,40		1,06	
	+	2,04	5,2	1,47	5,0	1,13	6,6
40PG	-	1,86		1,35		1,07	
	+	2,16	16	1,55	15	1,14	6,5
10CL	-	1,79		1,37		1,06	
	+	2,03	13	1,20	-12,4	1,11	4,7
20CL	-	1,88		1,41		1,08	
	+	1,87	-0,5	1,46	3,5	1,11	3,7
20PS	-	1,88		1,36		1,08	
	+	2,01	6,9	1,48	8,8	1,11	3,7
20PA	-	1,74		1,34		1,06	
	+	1,91	9,8	1,47	9,7	1,13	6,6

A **Figura 4.54** apresenta os valores de W_0 para os diferentes marcadores fosfolipídicos intercalados em MLVs de composição binária compostas por POPC e os diferentes lipídios carregados negativamente na ausência e presença de TRP3 e a variação percentual em W_0 induzida pelo peptídeo (ΔW_0). De acordo com os parâmetros medidos anteriormente, os valores de W_0 refletem o gradiente de flexibilidade da membrana, mostrando que o empacotamento molecular é maior na região próxima à cabeça polar dos lipídios, diminuindo à medida que nos aproximamos da metila terminal. Na presença de TRP3, nota-se um aumento em W_0 , indicando um decréscimo na mobilidade e/ou aumento na ordem. O efeito é maior para os marcadores próximos à interface bicamada-água, enquanto que em posições próximas à metila terminal o efeito é muito pequeno. Como observado para LUVs de *E. coli*, o perfil de perturbação sugere que o peptídeo encontra-se localizado mais próximo à superfície destas membranas (Kleinschmidt et al., 1997).

Figura 4.54 - Largura da linha de campo central (W_0 , painel superior) e as variações percentuais de W_0 (ΔW_0 , valor na presença – ausência de peptídeo, painel inferior) em função da posição do grupamento nitroxídeo intercalado em MLVs de (A) 20PG, (B) 40PG, (C) 10CL, (D) 20CL, (E) 20PS e (F) 20PA.

4.2.4C – Micelas

Os espectros de RPE na ausência e presença de TRP3 são apresentados para micelas de composição 20LPG (**Figura 4.55**). Os espectros de micelas de composição 20LPA foram qualitativamente similares e não são apresentados.

Figura 4.55 – Espectros de RPE de marcadores de spin de éster metílico de ácido esteárico intercalados em micelas de 20LPG na ausência (linha preta, A-D) e presença de TRP3 (linha vermelha, E-F) em tampão Tris-HCl, pH 7,4. Os marcadores são (A, E) 5MESL, (B, F) 10MESL, (C, G) 12MESL e (D, H) 16MESL. [Lisofosfolípido total] = 5 mM e [TRP3] = 500 μ M.

De acordo com medidas de SAXS (espalhamento de raios-X a baixos ângulos) micelas de LPC apresentam uma forma elipsoidal com raio curto de 29 Å e raio longo de 49,3 Å (anisometria 1,7) (Paulino, 2010). Quando estes valores de raios são empregados na equação de Stokes-Einstein para o cálculo do tempo de correlação rotacional (τ) obtêm-se valores $> 10^{-8}$ s.rad⁻¹, mostrando que elas encontram-se paradas na escala de tempo do RPE. As micelas aqui estudadas contêm 80% de LPC e, possivelmente, possuem dimensões semelhantes e encontrar-se-iam paradas na escala de tempo do RPE. Sendo assim, os espectros são devidos aos movimentos das moléculas (e dos marcadores) na micela.

Na ausência de TRP3, os espectros de RPE de 5-, 10-, 12- e 16MESL intercalados em micelas de 20LPG e 20LPA apresentam três linhas relativamente estreitas, indicando que estes marcadores possuem alta mobilidade. O fato do 5MESL não apresentar extremos externos e internos deve-se à baixa polaridade do grupo éster, o qual não possibilita o ancoramento do marcador na interface, fazendo com que o marcador tenha alta mobilidade (Bianconi et al, 1988; de Paula e Schreier, 1995). Resultados de nosso laboratório mostraram que quando se

emprega o marcador 5SASL, micelas de LPC dão origem a espectros com extremos externos e internos (M.T. Campanhã, resultados não publicados).

Na presença de TRP3, os espectros de 5MESL e 10MESL sofreram fortes alterações, indicando que a interação do peptídeo com os lisofosfolipídios tem um efeito drástico na organização molecular destas micelas. Os espectros destes marcadores, em ambas as micelas, mostram a presença de no mínimo duas componentes, uma mais imobilizada e outra mais móvel (com linhas estreitas). A Esse efeito também foi observado nos espectros de 12MESL, porém de forma menos acentuada. Esses resultados sugerem que na interação com o peptídeo a micela apresenta ambientes com diferentes empacotamentos, um mais e outro menos empacotado. Apesar de os espectros de 12MESL indicarem a presença de ao menos duas populações, como esse efeito foi mais sutil do que para as posições 5 e 10, os espectros deste marcador foram analisados através da relação h_0/h_{+1} (ver abaixo).

Quanto aos marcadores 12MESL e 16MESL, a relação h_0/h_{+1} na ausência de TRP3 decresce na ordem 12MESL > 16MESL, evidenciando o aumento da mobilidade e/ou diminuição da ordem em direção à metila terminal (**Tabela 4.18**). Na presença de TRP3 esta relação aumenta, mostrando uma diminuição na mobilidade e/ou aumento na ordem.

Tabela 4.18 – Relação das alturas dos picos de campo central (h_0) e baixo (h_{+1}), h_0/h_{+1} , para os marcadores de spin 12MESL e 16MESL intercalados em micelas na ausência e presença de TRP3. Variação percentual de h_0/h_{+1} ($\Delta h_0/h_{+1}$, na presença – ausência do peptídeo).

Composição	12MESL		16MESL	
	h_0/h_{+1}	$\Delta h_0/h_{+1}$	h_0/h_{+1}	$\Delta h_0/h_{+1}$
20LPG	-	1,51	1,12	
	+	1,68	1,23	9,8
20LPA	-	1,54	1,11	
	+	1,63	1,25	13

A **Figura 4.56** apresenta W_0 para os diferentes marcadores, em ambas as micelas, na ausência e presença de TRP3. Na presença do peptídeo, nota-se um aumento em W_0 , indicando um decréscimo na mobilidade e/ou aumento na ordem. Como observado nas bicamadas, o efeito é maior para os marcadores próximos à

interface bicamada-água, enquanto que em posições próximas à metila terminal o efeito é muito menor, sugerindo que o peptídeo encontra-se localizado mais próximo à superfície da micela (Kleinschmidt et al., 1997).

Figura 4.56 – Largura da linha de campo central (W_0 , painel superior) e as variações percentuais de W_0 (ΔW_0 , valor na presença – ausência de peptídeo, painel inferior) em função da posição do grupamento nitróxido quando intercalado em micelas de (A) 20LPG e (B) 20LPA. Valores apresentados na ausência e presença de TRP3. [Lisofosfolípido] = 5,0 mM e [Peptídeo] = 500 μ M.

5 – DISCUSSÃO

O problema da resistência de microrganismos a antibióticos convencionais está cada vez mais presente no nosso cotidiano. Com o aumento da identificação do número de microrganismos não susceptíveis aos produtos comercialmente disponíveis, a preocupação torna-se mais aguda. A Organização Mundial de Saúde e a comunidade científica vêm alertando e sugerindo medidas para atacar o problema, também, com uma frequência que acompanha o aumento da resistência antimicrobiana (WHO, 2001; Nordberg et al., 2005; WHO, 2011; WHO, 2012; WHO, 2013; Nature outlook, 2014; WHO, 2014; WHO, 2015).

Entre as medidas que são discutidas para atacar este problema encontra-se o desenvolvimento de novos antibióticos com novos mecanismos de ação. Para tal fim várias estratégias vêm sido consideradas, sendo uma delas o uso de peptídeos com atividade antimicrobiana, os quais apresentam um amplo espectro de ação contra microrganismos. Estes peptídeos, em sua maioria, agem, pelo menos em uma etapa inicial, através da permeabilização da membrana plasmática dos microrganismos. De acordo com os modelos mais aceitos, a permeabilização ocorreria ou pela formação de poros/canais ou rompimento da membrana. Os eventos moleculares que descrevem a atividade permeabilizante destes peptídeos envolvem: (1) ligação dos peptídeos à membrana; (2) mudança de conformação dos peptídeos na ligação às membranas; (3) localização e orientação na membrana; (4) alteração da organização molecular dos lipídios; (5) dinâmica destes eventos.

Neste contexto, os estudos aqui reportados tiveram como objetivo contribuir para a caracterização da atividade antimicrobiana de um PDH, tritripticina (TRP3, VRRFPWWPFLRR), suas propriedades conformacionais e funcionais e uma descrição mais detalhada do seu mecanismo de ação a nível molecular. Para tanto, realizamos estudos das propriedades funcionais, estruturais e dinâmicas de TRP3 e dois análogos (WLW, cujo W⁷ foi substituído por L, e LWL, cujos W⁶ e W⁸ foram substituídos por L). Com respeito às propriedades estruturais e dinâmicas, estas foram estudadas através do enfoque da interação dos peptídeos com membranas modelo – bicamadas lipídicas e micelas – de composição variada. A lógica para a sequência de amino ácidos dos análogos e da composição lipídica

das membranas modelo levou em consideração: (1) a presença de três resíduos sequenciais de W na sequência de TRP3, os quais, em seus espectros de CD no UV distante, apresentam transições eletrônicas, impossibilita a análise dos espectros em termos de estrutura secundária. Apesar desse empecilho, estudos de CD permitiram mostraram que a conformação de TRP3 difere quando ligado em micelas ou bicamadas, embora não tenha sido possível obter informações relativas à estrutura secundária adquirida nestes ambientes (Bozelli et al., 2012). Assim, substituímos um (WLW) ou dois (LWL) resíduos de W por L, com o intuito de diminuir a contribuição dessas transições para o espectro e, possivelmente, caracterizar as conformações adquiridas em micelas e bicamadas; (2) a proposta de que o mecanismo de ação de PDH envolve uma interação direta entre os peptídeos e os lipídios das membranas microbianas sem uma interação estéreo específica com receptores ou enzimas (Wade et al., 1990). Com um desenho minimalista mimetizamos a parte lipídica da membrana plasmática da bactéria Gram-negativa *E. coli*, construindo bicamadas com os fosfolipídios majoritários, e na proporção molar encontrada nesta; (3) a sugestão de que a seletividade de PDH por membranas de microrganismos (quando comparada à membrana de células eucarióticas) deve-se à carga superficial negativa das membranas dos microrganismos e às cadeias laterais dos resíduos carregados positivamente destes peptídeos. No caso de TRP3, estudos com monocamadas de Langmuir de fosfolipídios mostraram a especificidade da interação com o lipídio carregado negativamente fosfatidilglicerol (PG), um lipídio presente em grandes quantidades em membranas de bactérias (Salay et al., 2012). Para expandir estes estudos, investigamos se a especificidade ainda é observada em outras membranas modelo. Estes estudos foram realizados em membranas modelo de composição binária contendo um lipídio zwitteriônico, fosfatidilcolina (PC), e uma variedade de fosfolipídios com a cabeça polar carregada negativamente (PG, cardiolipina, CL, fosfatidilserina, PS, e ácido fosfatídico, PA). Dentre os lipídios contendo cabeça polar carregada negativamente, apenas PG e CL fazem parte dos lipídios majoritários da membrana de bactérias (Epand e Epand, 2009). A comparação com os outros dois, PS e PA, permite avaliar o efeito da estrutura química da cabeça polar carregada negativamente. Além do mais, em contexto mais fisiológico, PS encontra-se exposto para o meio extracelular em membranas de

células sofrendo apoptose e PA desempenha vários papéis no funcionamento de células, sendo precursor para a síntese dos outros lipídios, facilitando a fissão/fusão de vesículas e agindo como um lipídio sinalizador (Neve e Brindle, 2006; Wang et al., 2006).

5.1 – Propriedades funcionais de TRP3 e seus análogos

Atividade antimicrobiana e hemolítica

Uma estratégia que vem sido usada por vários grupos de modo a entender o mecanismo molecular de ação de PDH e caracterizar suas propriedades, com o objetivo final de produzir novos antibióticos por meio de um desenho racional, é fazer substituições pontuais em suas sequências de amino ácidos. Esse tipo de abordagem, também, foi realizado para TRP3 (Yang et al., 2002; Schibli et al., 2006; Yang et al., 2006a,b; Zhu et al., 2006; Andrushchenko et al., 2008; Arias et al., 2015).

Nos estudos aqui apresentados, alterações pontuais na sequência de TRP3 foram feitas, de modo a investigar seu efeito na atividade do peptídeo. Realizamos ensaios de atividade antimicrobiana e contra células eucarióticas; conduzimos estes ensaios, respectivamente, contra bactérias e eritrócitos humanos. Estudos mostraram que TRP3 apresenta atividade contra bactérias na faixa de concentração do baixo micromolar e, embora cause hemólise, a concentração necessária para esta atividade é ca. 100 vezes maior (Lawyer et al., 1996; Nagpal et al., 1999; Yang et al., 2002; Yang et al., 2003; Farnaude et al., 2004; Cironi et al., 2006; Ghiselli et al., 2006; Schibli et al., 2006; Yang et al., 2006a,b; Zhu et al., 2006; Yang et al., 2009; Infante et al., 2011; Nguyen et al., 2011; Bagheri et al., 2012; Arias et al., 2015). Nossos estudos estão de acordo com os reportados na literatura, mostrando que TRP3 apresenta atividade contra as bactérias estudadas na faixa do baixo micromolar (MIC ca. 1 μ M) e, embora cause hemólise, a concentração necessária é muito maior (ca. 40% hemólise com 170 μ M peptídeo, **Figura 4.1 e Tabela 4.2**). A substituição de um (WLW) ou dois (LWL) resíduos de W por L, essencialmente manteve a atividade antimicrobiana do peptídeo. Entretanto, houve um decréscimo na quantidade de eritrócitos hemolisados. WLW

hemolisou ca. 2,5 vezes menos eritrócitos do que TRP3, e LWL essencialmente não apresentou atividade hemolítica na faixa de concentração estudada. Estudos da literatura mostraram que a substituição dos três resíduos de W por Y ou F essencialmente não altera a atividade antimicrobiana, mas diminui a atividade hemolítica (Yang et al., 2002; Schibli et al., 2006). Os nossos resultados estão de acordo com os estudos onde os resíduos de W de TRP3 foram substituídos e em conjunto apontam para a importância dos três resíduos de W de forma sequencial em TRP3 para a sua atividade hemolítica. No que diz respeito à atividade antimicrobiana, esse arranjo parece não ter mesma importância. A membrana de eritrócitos apresenta carga líquida superficial próxima de zero, enquanto as membranas de bactéria apresentam carga superficial negativa. O efeito hidrofóbico tende a excluir resíduos de W da água (Wimley e White, 1992, 1993, 1996; Yau et al., 1998). Neste contexto, a presença de três resíduos de W de forma sequencial em TRP3 possivelmente favorece a partição do peptídeo nessas membranas independentemente de interações eletrostáticas. Para o peptídeo nativo estudos mostraram que o peptídeo se liga e permeabiliza vesículas lipídicas zwitteriônicas; no entanto, tanto a ligação quanto a atividade permeabilizante são significativamente menores quando comparadas com bicamadas contendo lipídios carregados negativamente (Schibli et al., 2002; Bozelli, 2011; e dados não apresentados). É importante apontar o fato de a atividade antimicrobiana ter sido conservada para os análogos, enquanto houve uma diminuição na atividade hemolítica, indicando que estes possuem um maior potencial terapêutico do que o peptídeo nativo.

Efeito dos peptídeos sobre a permeabilidade de vesículas lipídicas

O mecanismo de ação a nível molecular de TRP3 não está totalmente elucidado, porém vários estudos apontam para a atividade permeabilizante deste peptídeo (Schibli et al., 2002; Yang et al., 2002; Yang et al., 2003; Salay et al., 2004; Schibli et al., 2006; Yang et al., 2006a,b; Andrushchenko et al., 2008; Nguyen et al., 2011; Bagheri et al., 2012; Zhu et al., 2006; Arias et al., 2015). Uma forma de investigar a atividade permeabilizante é por medidas de vazamento do conteúdo interno de vesículas lipídicas. Neste contexto, realizamos experimentos

do vazamento do conteúdo aquoso interno de LUV de composição variada causado pelos três peptídeos. Na literatura, cinéticas de vazamento, geralmente, são seguidas por minutos a 1-2 horas. No presente trabalho apresentamos cinéticas de vazamento seguidas por 10 horas monitorando o efeito dos peptídeos por uma faixa de concentração que varre 3 ordens de grandeza. Estes resultados evidenciaram a presença de eventos ocorrendo em escalas de tempo maiores do que aquelas usualmente reportadas.

A observação mais notável das curvas cinéticas foi o comportamento bifásico em LUVs de composição 10CL e 20PS (**Figuras 4.7 e 4.9**). Com relação ao fenômeno de vazamento, várias hipóteses vêm sendo propostas para descrever a etapa determinante, incluindo ligação à membrana, transição conformacional, agregação de peptídeo, formação do poro e translocação do peptídeo (DeGrado et al., 1982; Saberwal e Nagaraj, 1993; Rex e Schwarz, 1998; Pokorny e Almeida, 2004; Andersson et al., 2007; Yandek et al., 2007; Gregory et al., 2008;). Recentemente, Stella e colaboradores propuseram um modelo estocástico, onde a etapa determinante seria o tempo necessário para que o número crítico de peptídeos necessário para formação do poro se ligasse às vesículas intactas (Mazzuca et al., 2011).

Os estudos aqui apresentados não permitem distinguir entre as diferentes hipóteses qual seria a responsável pelo comportamento bifásico observado em LUVs de 10CL e 20PS. No entanto, algumas considerações podem ser feitas com base na análise de V_0 em função da concentração dos peptídeos. Os valores de V_0 apresentaram um mínimo (ou desvio da linearidade) em concentrações onde a carga nominal líquida do sistema aproxima-se de zero (eletroneutralidade do sistema) (**Figuras 4.3 e 4.5-4.10**). Para TRP3 estudos de espalhamento de luz dinâmico mostraram a presença de agregados de vesículas lipídicas induzidos pelo peptídeo próximo ao ponto de eletroneutralidade (resultados não apresentados). Outros estudos da literatura também mostraram a presença destes agregados próximo ao ponto de eletroneutralidade do sistema (Ferre et al., 2009; Domingues et al., 2013; Manzini et al., 2014). A presença de agregados de vesículas induzido pelo peptídeo poderia explicar o decréscimo de V_0 nestas condições. Estes agregados atuariam como “barreira cinética”, sequestrando os

peptídeos disponíveis para formação do poro e, como consequência, diminuiriam V_0 nestas condições, de acordo com o modelo do grupo de Stella (Mazzuca et al., 2011). No caso de bicamadas de composição 20PS, o mínimo em V_0 se correlaciona, também, com as curvas que apresentam o comportamento bifásico. A natureza dinâmica da interação peptídeo-bicamada indica que, dado um tempo suficiente, estes agregados poderiam ser desfeitos. Com a dissolução destes agregados, a quantidade de peptídeo disponível para atuar nas vesículas intactas aumentaria. Por outro lado, em bicamadas de 10CL, para as quais apenas pudemos calcular V_0 em todas as concentrações no caso de WLW, o decréscimo de V_0 não se correlaciona com as concentrações onde se observa o comportamento bifásico (**Figuras 4.7 e 4.9**). Além do mais, todas as composições estudadas apresentaram decréscimo (desvio da linearidade) de V_0 com a concentração de peptídeo próxima ao ponto de eletroneutralidade do sistema; entretanto, o comportamento bifásico não foi observado para outras composições. Esses resultados ressaltam a importância da investigação de eventos ocorrendo em escalas de tempos maiores para a permeabilização da membrana por PDH, a qual está intimamente relacionada com as propriedades estruturais e dinâmicas da interação peptídeo-membrana.

Os resultados mostraram que os peptídeos apresentam diferentes capacidades de permeabilizar as vesículas lipídicas. Em todas as composições estudadas a ordem decrescente foi TRP3 > WLW > LWL. Em LUVs de *E. coli* a diferença dos valores de LP_{50} , os quais refletem a capacidade permeabilizante dos peptídeos (quanto maior LP_{50} , mais ativo é o peptídeo), é 7 vezes entre TRP3 e WLW e 6 vezes entre WLW e LWL (**Figura 4.4 e 4.12**). No caso das bicamadas compostas por PC e diferentes lipídios com cabeça polar carregada negativamente a diferença entre LP_{50} é na média ca. 3 vezes entre TRP3 e WLW e 4 vezes entre WLW e LWL. Estes resultados mostram a importância dos três resíduos de W de forma sequencial na sequência de TRP3 para a atividade permeabilizante. Enquanto se obteve uma diferença na atividade permeabilizante, os ensaios de atividade antimicrobiana mostram essencialmente a mesma atividade entre os peptídeos (**Tabela 4.2**), sugerindo que o mecanismo de ação dos análogos difere e que, possivelmente, envolva um alvo intracelular. Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura, onde a substituição dos três resíduos de W por Y

ou F essencialmente não altera a atividade antimicrobiana, enquanto diminui a atividade hemolítica e a capacidade de permeabilizar vesículas lipídicas (Yang et al., 2002; Schibli et al., 2006).

Recentemente, foi mostrado que TRP3 é capaz de inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas em *E. coli*; entretanto, nestas condições não se observou morte celular e atribui-se esta inibição ao colapso das funções bacterianas em decorrência da permeabilização da membrana (Arias et al., 2015). Parece razoável que, no caso dos análogos, o decréscimo na capacidade permeabilizante e mesmo da afinidade pelas membranas desloque o mecanismo de ação da membrana para alvos intracelulares (síntese de DNA, RNA, proteína). PDH possuem um amplo espectro de atividade antimicrobiana. Interações eletrostáticas entre os peptídeos carregados positivamente e biomoléculas carregadas negativamente (lipídio, DNA, RNA, proteínas) tornaria possível a interação destes com diversos alvos o que, possivelmente, seria a causa de seu amplo espectro de ação.

As propriedades físico-químicas da membrana modulam a capacidade permeabilizante dos peptídeos. Enquanto em LUVs de *E. coli* não se observa cooperatividade na atividade permeabilizante, esta é observada nas LUVs de composição binária estudadas (**Tabelas 4.3 e 4.4**). Além do mais, embora os valores de constante de ligação aparente (K_B) sejam maiores para LUVs de *E. coli*, os valores de LP_{50} são semelhantes àqueles obtidos para bicamadas de composição 20PG e 10CL, para as quais se observam os menores valores de K_B (**Figuras 4.4, 4.12 e 5.1**). No caso de LUVs de *E. coli*, o lipídio zwitteriônico é fosfatidiletanolamina (PE) em fração molar de 67%, enquanto que, nas demais LUVs, o lipídio zwitteriônico é fosfatidilcolina (PC) em fração molar entre 60-90%. Estes lipídios apresentam propriedades físico-químicas diferentes, sugerindo que estas poderiam estar relacionadas com as diferenças na capacidade permeabilizante observada. A cabeça polar de PE é menor e menos hidratada do que a de PC; além do mais, as ligações de hidrogênio intermoleculares entre moléculas de PE tornam as bicamadas mais coesas como sugerido pelo aumento ca. 20 °C na transição de fase de PE quando comparada com PCs com a mesma composição de cadeia acila (McElhaney, 1982; Boggs, 1987; Kucerka et al., 2014). As vesículas são, de fato, mais resistentes: quando na bancada à temperatura ambiente, elas são estáveis por mais de 10 dias, enquanto que o conteúdo interno

das outras bicamadas vaza totalmente em 2-3 dias nestas condições (dado não apresentado).

Figura 5.1 – Constantes de ligação aparentes (K_B) dos peptídeos às membranas modelo de composição lipídica variada. (A) TRP3, (B) WLW e (C) LWL.

Com relação à influência da natureza da cabeça polar carregada negativamente, os dados mostraram que a atividade dos peptídeos é maior em LUVs de 20PA (**Figura 4.12**). Em pH 7,4 a carga da cabeça polar dos lipídios carregados negativamente é -1,00 para PG e PS ($pK_a \sim 3,5$ e $5,5$, respectivamente), -1,25 para PA ($pK_a \sim 8$) e -2,00 para CL (pK_a^1 e $pK_a^2 \sim 3,2$) (Boggs, 1987; Tsu et al., 1986; Kooijman et al., 2005; Olofsson and Sparr, 2013). A carga do PA deve-se à presença de duas espécies moleculares, 75% com carga -1,00 e 25% com carga -2,00. Quando comparadas as atividades dos peptídeos em LUVs de 20PG, 10CL e 20PS, as quais apresentam a mesma fração molar de carga formal negativa (0,20), a atividade é maior no caso de 20PS. De acordo com estudos de DSC de misturas de PA e PC, a espécie molecular com carga -1,00 e aquela com carga -2,00 apresentam diferentes capacidades de homogeneização com PC (Garidel et al., 1997). Enquanto a espécie molecular com carga -1,00 apresenta uma homogeneização ideal, a espécie molecular com carga -2,00 (de modo surpreendente) sofre separação de fases. Também ocorre separação de fases quando PS é incorporado em bicamadas de PC na fase fluida (Huang e Feigenson, 1993; Huang et al., 1993). A separação de domínios lipídicos tende a formar defeitos de borda, os quais aumentam a permeabilidade (Epand e Epand, 2009). A maior permeabilidade nestas composições poderia tanto ser devida a uma bicamada mais frágil, quanto à partição preferencial dos peptídeos nos

eventuais defeitos de borda, entre domínios lipídicos, aumentando a permeabilidade; de toda forma, não parece provável que o maior efeito observado deva-se a uma interação específica com estes lipídios.

Vários modelos têm sido propostos para a atividade permeabilizante dos PDH; entre estes, os mais aceitos são os modelos: barril de estacas, carpete e poro toroidal (**Seção 1.1**). Nosso grupo já apresentou anteriormente argumentação demonstrando que TRP3 não possui estrutura adequada para a formação de barril de estacas (Salay, etc). Também, medidas de canal único não suportam a idéia de que a permeabilização ocorre através do mecanismo de carpete (Salay, 2004). Esses argumentos serviram de base para a proposta de que TRP3 atua através da formação de poro toroidal. Os presentes resultados obtidos nos experimentos de vazamento acrescentam argumentos contra o mecanismo de carpete. Esse modelo descreve o acúmulo de peptídeos na superfície da membrana, de modo a recobri-la, semelhante a um carpete. Quando uma concentração crítica de peptídeo é alcançada, acredita-se que haja uma desestabilização global da membrana, levando, eventualmente, à formação de micelas mistas de peptídeo+lipídio. As cinéticas de vazamento mostraram que o vazamento é gradual e se estende por horas. Um evento drástico como a formação de micelas mistas de peptídeo+lipídio deveria resultar em um vazamento instantâneo. Assim, os resultados de vazamento fornecem evidências de que a atividade permeabilizante não deve ocorrer segundo o modelo de carpete.

5.2 – Propriedades estruturais e dinâmicas de TRP3 e seus análogos

Com o intuito de compreender as etapas que culminam na atividade permeabilizante de TRP3 a nível molecular estudamos as propriedades estruturais e dinâmicas decorrentes da interação deste peptídeo e seus análogos com membranas modelo. Em particular, realizamos estudos para medir a afinidade dos peptídeos pelas membranas modelo, propriedades conformacionais em solução e na presença das membranas, localização na membrana e o efeito dos peptídeos sobre a organização molecular dos lipídios.

Ligação a membranas modelo

Os estudos de ligação mostraram que os peptídeos apresentam diferentes afinidades pelas membranas modelo. Os valores de K_B decrescem na ordem TRP3 > WLW > LWL (**Tabela 4.6** e **Figura 5.1**). A diferença destes valores, em média, é ca. 2,5 vezes entre TRP3 e WLW e 4 vezes entre WLW e LWL. Essa ordem decrescente na afinidade dos peptídeos está de acordo com a diminuição na atividade permeabilizante. Foi observado que a ligação de análogos de TRP3 com os resíduos de W substituídos por Y ou F a membranas modelo diminui significativamente (Schibli et al., 2006). Resíduos de W em proteínas e peptídeos de membrana possuem preferência por se localizarem na interface membrana-água, atuando, assim, como “âncoras” (Wimley e White, 1996; Yau et al., 1998, Killian e von Heijne, 2000). A ação combinada de interações dipolares, quadrupolares, cátion- π e ligações de hidrogênio determinam a preferência dos resíduos de W pela interface (Yau et al., 1998). Nesse contexto, a presença de três resíduos de W de forma sequencial em TRP3 “ancora” mais fortemente este peptídeo nas membranas.

Os resultados apresentados mostraram que a contribuição das forças que desempenham um papel na ligação às membranas modelo é alterada pela sequência de amino ácidos dos peptídeos, propriedades físico-químicas da membrana e geometria do agregado molecular (bicamadas ou micelas). Quando se comparam as diferentes composições de LUVs, a afinidade dos peptídeos é maior por LUVs de *E. coli*. A fração molar de carga formal negativa destas membranas é semelhante (ca. 40%) às das LUVs de composição 40PG e 20CL (**Tabela 4.1**); entretanto, os valores de K_B são ca. 2 vezes maiores para LUVs de *E. coli* (exceto para WLW, quando o valor de K_B para 20CL é igual ao de *E. coli*) (**Figura 5.1**). A maior afinidade, independente do favorecimento de interações eletrostáticas, sugere que a ligação a estas membranas possui um aumento na contribuição de outras forças (hidrofóbica, ligação de hidrogênio, forças de van der Waals, forças de hidratação). É importante mencionar que o lipídio zwitteriônico (com 67% da fração molar) nestas membranas é PE. A capacidade de formar ligações de hidrogênio intermoleculares desse lipídio é amplamente conhecida e consideravelmente maior do que a de outros lipídios (Boggs, 1980; McElhaney, 1982; Boggs, 1987; Sen et al., 1988; Kucerka et al., 2014). A intercalação dos

peptídeos nessas membranas poderia levar a uma competição das ligações de hidrogênio intermoleculares entre moléculas de PE e, possivelmente, favorecimento da partição pela formação de ligações de hidrogênio entre PE e as ligações peptídicas dos peptídeos ou com as cadeias laterais. Esta proposta é corroborada por estudos de fluorescência de TRP3 e um análogo contendo o aminoácido paramagnético TOAC (ácido 2,2,6,6-tetrametil-N-oxil-4-amino-4-carboxílico) antes do primeiro resíduo (TOAC⁰-TRP3), os quais mostraram que a afinidade destes peptídeos por micelas e bicamadas contendo o lisofosfatidiletanolamina (LPE) e PE, respectivamente, é maior quando comparado com composições similares cujo o lipídio zwitteriônico é LPC e PC (Bozelli, 2011). Esses resultados em conjunto com aqueles aqui apresentados sugerem que a presença de ligações de hidrogênio entre o PE e o peptídeo contribuem de forma significativa para a partição nas membranas. As diferenças observadas para as LUVs de *E. coli* ressaltam a importância de usar um modelo mimético da membrana bacteriana para o estudo da interação PDH-membrana, o qual, geralmente, apresenta diferenças nas propriedades em relação àquelas apresentadas por modelos de membrana mais simples.

Com relação à influência da natureza da cabeça polar carregada negativamente, os estudos mostraram que a ligação de TRP3 e LWL é principalmente dirigida por interações eletrostáticas, enquanto WLW apresenta especificidade por CL (**Figura 5.1**). Assim, os resultados mostram que a sequência de amino ácidos dos peptídeos também altera o equilíbrio entre as forças que desempenham um papel para a ligação. Além do mais, quando comparamos bicamadas de composições semelhantes às de micelas, os valores de K_B são ca. 5 vezes maiores para a interação com micelas (**Tabela 4.6**). Estudos mostraram que as forças que desempenham um papel na ligação a micelas e bicamadas por peptídeos é diferente; enquanto a ligação a bicamadas é dirigida principalmente por interações eletrostáticas, a ligação a micelas possui maior contribuições de outras forças (hidrofóbica, ligação de hidrogênio, interações de van der Waals, forças de hidratação) para a energia de ligação (Pertinhez et al., 1995; Pertinhez et al., 1997; Salinas et al., 2002; Bozelli et al., 2012).

Os cálculos de energia livre de partição (ΔG_x^0) dos peptídeos mostraram a espontaneidade da interação com as membranas modelo. No entanto, os valores

para os diferentes peptídeos em relação a uma mesma composição da membrana modelo não são explicados apenas por considerações na diferença de hidrofobicidade do(s) resíduo(s) de W e L, segundo a escala de hidrofobicidade de Wimley e White (1996). Outros grupos mostraram que na interação de peptídeos policationicos com bicamadas aniônicas, apenas considerações de hidrofobicidade não explicam diferenças nos valores de ΔG_x^0 (Beschiaschvili e Seelig, 1991; Beschiaschvili e Baeuerle, 1991; Thorgeirsson et al., 1995; Ladokhin e White, 2001). Esse resultado evidencia que a ligação dos análogos às membranas modelo é favorecida pela contribuição de outras forças (ligação de hidrogênio, forças de van der Waals, forças de hidratação).

Conformação de TRP3 e seus análogos

Peptídeos curtos em solução geralmente apresentam uma estrutura flexível, decorrente do equilíbrio entre diferentes conformações. Na presença de um solvente indutor de estrutura secundária ou em consequência da ligação a membranas modelo, eles tendem a adquirir estrutura secundária. Os peptídeos estudados são curtos, possuindo 13 resíduos de aminoácidos. No caso de um ambiente favorável para a aquisição de conformação, a presença de duas prolinas (P⁵ e P⁹) no meio do esqueleto peptídico argumenta contra a aquisição de estrutura em α -hélice ou folha- β , já que a estrutura cíclica de prolinas (o único imino ácido dentre os 20 usuais) não favorece este tipo de estrutura por impedimentos estéricos e devido à falta de grupo N-H para participar de ligações de hidrogênio do esqueleto peptídico. Entretanto, prolinas são, geralmente, encontradas em dobras.

Os nossos estudos de CD em solução aquosa evidenciam a presença de equilíbrio entre diferentes conformações. Embora o espectro de TRP3 reflita prioritariamente a contribuição da transição eletrônica 1B_b do indol (**Figura 4.23**), estudos de RMN evidenciam um equilíbrio entre diferentes conformações para este peptídeo em solução (Schibli et al., 1999). Além do mais, a substituição do(s) resíduo(s) de W por L nos análogos, diminui substancialmente a contribuição dessa transição para o espectro de CD, evidenciando a estrutura flexível dos análogos de TRP3 em solução. No contexto das considerações acima, as predições de conformação destes peptídeos indicaram uma propensão à aquisição

de conformação em dobra (ao redor da P⁵), sugerindo que em um ambiente favorável estes peptídeos poderiam adquirir estrutura em dobra (**Figura 4.22**). Na ligação a micelas de SDS e DPC, estudos de RMN de TRP3 mostraram aquisição de conformação do tipo dobra-dobra, ao redor de P⁵ e P⁹, indicando que a predição apresentou resultados satisfatórios (Schibli et al., 1999). Essa conformação permite aquisição de caráter anfipático, necessário para a interação de peptídeos anfifílicos com membranas.

Os estudos de CD sugeriram que a conformação adquirida por TRP3 e seus análogos contem uma ou mais dobra(s). Os espectros de CD do peptídeo nativo possuem grande contribuição de transições dos resíduos aromáticos, as quais dificultam a análise em termos de estrutura secundária. No entanto, mudanças nas formas dos espectros permitiram mostrar que, embora a conformação deva envolver dobra(s), o arranjo espacial difere para os vários ambientes. Essas análises foram corroboradas pelos espectros dos análogos, os quais apresentam menor contribuição dos resíduos aromáticos para o espectro. Vale notar que a diferença de conformação adquirida em micelas e bicamadas reportada para o peptídeo nativo (Bozelli et al., 2012) também é observada para os análogos (**Figuras 4.24, 4.25 e 4.27-4.40**). Quando é feita uma inspeção na estrutura primária dos peptídeos (TRP3: VRRFPWWPFLRR; WLW: VRRFPWLWPFLRR; LWL: VRRFPLWLPFLRR) parece bastante evidente que a única forma de adquirirem conformação de caráter anfipático é através da formação de dobra(s) no meio do esqueleto peptídico, de modo que uma porção contenha as extremidades N- e C- terminais carregadas positivamente e a outra porção contenha os resíduos apolares no meio da sequência. TRP3 ainda sacrifica fazer ligações de hidrogênio intramoleculares para favorecer a conformação anfipática em micelas, sendo que a conformação é dominada pelas interações das cadeias laterais dos resíduos de TRP3 com as micelas (Schibli et al., 1999; Schibli et al., 2006). A presença de cinco resíduos aromáticos em TRP3 ainda argumenta a favor de uma possível interação entre aromáticos (empilhamento), as quais são bastante evidentes nos espectros de CD deste peptídeo, de modo a diminuir o custo energético associado à aquisição da conformação do tipo dobra-dobra. Segundo Almeida et al., (2012), interações intramoleculares tendem a ser favorecidas em ambientes apolares. Essas considerações também parecem ser

válidas para as propriedades conformacionais dos análogos WLW e LWL. Neste contexto, a mudança nos arranjos espaciais sugerida pelos espectros de CD com a mudança do ambiente encontra-se inteiramente de acordo com o dogma de Anfinsen, o qual diz que a conformação de uma proteína “é determinada pela totalidade das interações interatômicas e, assim, pela sequência de amino ácidos em um determinado ambiente” (Anfinsen, 1973).

No caso de TRP3, na presença de LUVs contendo o fosfolípido carregado negativamente cardiolipina, a semelhança dos espectros de CD com aqueles reportados por Arias e colaboradores (2015) para um análogo de TRP3 com 5-hidroxi-triptofano substituindo o W⁸, sugeriu para ambos os peptídeos uma conformação semelhante (**Figura 5.2**). Segundo estes estudos, a conformação adquirida por esse análogo não apresenta nenhuma dobra evidente, mas é anfipática e mais compacta, com o N- e o C-terminais espacialmente próximos. Estudos de RMN da indolicidina (um AMP da família das catelicidinas, rico em P e W) mostraram que, embora a conformação global seja semelhante em micelas de DPC e SDS, o peptídeo apresenta uma estrutura mais estendida em micelas de SDS (Rosek et al., 2000). Estudos com monocamadas do peptídeo nativo mostraram que, com o aumento da pressão lateral, há um decréscimo na área ocupada pelo peptídeo (Salay et al., 2012). Embora o decréscimo na área ocupada pelo peptídeo tenha sido atribuído a uma expulsão do peptídeo das monocamadas em altas pressões, o decréscimo também poderia estar associado a uma mudança de conformação do peptídeo (conformação mais compacta). Neste contexto, os resultados sugerem que a principal diferença na conformação dos peptídeos entre micelas e bicamadas seria a compactação da estrutura 3D nestas últimas.

Figura 5.2 – Comparação dos espectros de TRP3 em LUVs contendo CL com aquele reportado para o análogo de TRP3 HW3. Espectros de CD no UV distante de 2,5 μ M TRP3 na ausência e presença de LUVs de (A) 10CL e (B) 20CL. (C) Espectro de CD em solução aquosa (linha contínua) e micelas de SDS (linha tracejada) de HW3 (Adaptado de Arias et al., 2015). Estrutura determinada por RMN na presença de micelas de SDS (D) representação do esqueleto peptídico e dos resíduos de W e (E) potencial eletrostático de superfície.

Em peptídeos e proteínas, a maioria das ligações peptídicas encontra-se na conformação *trans*, devido ao caráter de dupla parcial dessa ligação. No entanto em ligações peptídicas X-P (onde X é qualquer um dos 20 aminoácidos naturalmente encontrados em proteínas), o impedimento estérico entre o δ -CH₂ do anel pirrolidínico da P e o C α do aminoácido precedente desestabiliza a conformação *trans*, favorecendo a isomerização *trans/cis*. TRP3 e seus análogos possuem em sua sequência duas ligações X-P, podendo apresentar quatro populações resultantes da isomerização dessas ligações: *cis-cis*, *trans-cis*, *cis-trans* e *trans-trans*. De fato, Schibli e colaboradores (1999, 2006) mostraram a presença das quatro populações de isômeros nos estudos por RMN de TRP3 em solução aquosa. Vale notar que estes estudos ainda evidenciaram a presença de dois isômeros conformacionais na interação com micelas de SDS e DPC, tendo aquele presente majoritariamente sido usado para o cálculo da estrutura. Bicamadas lipídicas apresentam em média uma distância entre as moléculas que são menores que aquelas observadas em micelas; isto se deve às diferenças no empacotamento desses agregados. Cantor (1999) propôs que mudanças no perfil de pressão lateral de bicamadas podem resultar em mudanças na conformação (ou agregação) de proteínas. O maior empacotamento das moléculas em bicamadas do que em micelas, o qual resulta em maior pressão lateral, poderia

deslocar o equilíbrio da isomerização *trans/cis*, favorecendo, assim, a aquisição de uma conformação mais compacta. Em micelas, estudos de RMN mostraram que as duas ligações X-P estão em *trans* (Schibi et al., 1999; Schibli et al., 2006; A.P. Valente comunicação pessoal). Possivelmente, a pressão imposta pelo maior empacotamento em bicamadas desestabilize uma ou as duas configurações em *trans* em prol de *cis*.

Nosso grupo tem reportado diferenças na interação de peptídeos com micelas e bicamadas há algum tempo (Pertinhez et al., 1995; Pertinhez et al., 1997; Salinas et al., 2002; Dyszy, 2008; Paulino, 2011; Bozelli et al., 2012). No caso de peptídeos que formam poros em membranas, de acordo com o modelo do poro toroidal, propomos que os resultados com bicamadas representariam a interação inicial do peptídeo com a membrana. Pelo fato das micelas apresentarem curvatura positiva (como a região da membrana no poro toroidal), a interação com micelas poderia mimetizar, em alguma extensão, a organização molecular dos lipídios e peptídeos no poro. Neste contexto, propomos que os resultados com micelas representaria o arranjo espacial peptídeo+lipídio na região do poro. Sob esta perspectiva, as diferenças na conformação para esses peptídeos entre bicamadas e micelas, sugere uma mudança conformacional quando da formação do poro por TRP3.

Localização dos peptídeos nas membranas modelo

Para compreender os detalhes moleculares do mecanismo de ação de PDH é importante saber a localização transversal (ao longo da direção normal a membrana) do peptídeo na membrana. O estudo da localização dos peptídeos foi feito através de medidas de supressão da fluorescência intrínseca destes por um supressor aquossolúvel e por supressores de natureza lipídica intercalados nas membranas. A localização dos peptídeos nas membranas está diretamente relacionada com a conformação anfipática que eles adquirem quando ligados, de modo que a porção com caráter hidrofóbico interaja com as cadeias acila e a porção com caráter hidrofílico interaja com a cabeça polar dos lipídios e meio aquoso. Os estudos mostraram que a supressão da fluorescência dos peptídeos por supressores embebidos nas bicamadas é maior quando o grupamento nítróido encontra-se ligado nos carbonos 7, 10 e 12 da cadeia acila. Outros

estudos na literatura mostraram uma maior eficiência na supressão quando o grupamento nitróxido encontra-se ligado no carbono 5 da cadeia acila para a interação de TRP3 com bicamadas (Schibli et al., 2002). O número de supressores empregados no presente estudo foi maior do que aquele usado por Schibli e colaboradores e a composição das membrana também era diferente, o que possivelmente explicaria a pequena diferença entre os nossos resultados e os apresentados naquele trabalho. No entanto, os resultados evidenciam claramente que TRP3 e seus análogos não penetram profundamente nas bicamadas e encontram-se próximos à interface bicamada-água (**Figura 4.41-4.47**). Essa análise ainda é corroborada por nossos estudos de RPE, os quais mostraram que a perturbação da organização molecular das cadeias acila pelos peptídeos é maior na região da interface bicamada-água, com pouca perturbação próxima às metilas terminais (**Seção 4.2.4**).

Em micelas os resultados mostraram que TRP3 e seus análogos também se encontram localizados próximos à interface micela-água (**Figuras 4.48 e 4.49**). Estes resultados estão de acordo com outros da literatura que mostram essa localização em micelas para o peptídeo nativo (Schibli et al., 1999; Bozelli et al., 2012; A.P. Valente comunicação pessoal). Os dois tipos de membranas modelo utilizadas nos estudos apresentados aqui (micelas e vesículas lipídicas) apresentam diferenças na forma, curvatura, empacotamento, hidratação da cabeça polar e, provavelmente, posição média (em relação à normal à membrana) dos supressores quando intercalados nestes agregados moleculares, o que dificulta uma comparação direta dos resultados obtidos em micelas e vesículas lipídicas. No caso de micelas, o fato de os marcadores não se ancorarem fortemente na interface (Bianconi et al, 1988; de Paula e Schreier, 1995) coloca um problema adicional na comparação. No entanto, as pequenas diferenças nos valores médios de $\lambda_{em}^{máx}$ e K_{SV} entre micelas e vesículas lipídicas para os peptídeos, sugerem uma localização um pouco mais superficial em micelas.

Efeito da ligação dos peptídeos sobre a organização molecular das membranas modelo

Os estudos da interação TRP3-membrana na literatura têm focado as propriedades funcionais e/ou estruturais e dinâmicas do peptídeo. Por outro lado até o momento pouco se sabe do efeito da interação TRP3-membrana sobre a organização molecular dos componentes da membrana. Os estudos aqui apresentados compreendem a primeira investigação do efeito de TRP3 sobre o arranjo molecular em bicamadas e micelas de diferentes composições lipídicas com um detalhamento do efeito monitorado em diferentes posições ao longo da profundidade da membrana.

A organização molecular das bicamadas e micelas bem como o efeito de TRP3 e seus análogos sobre essa organização foram avaliados pela análise dos espectros de RPE de marcadores de spin lipídicos intercalados. Foram analisados os parâmetros: relação de h_0/h_{+1} , separação entre os extremos externos ($2A_{\max}$ e $2A_{\parallel}$), parâmetro de ordem efetivo (S_{ef}) e largura da linha de campo central (W_0). Aumentos nos valores de todos os parâmetros indicaram que a ligação do(s) peptídeo(s) induziu um aumento da ordem e/ou diminuição da mobilidade dos lipídios na membrana. De uma forma geral, serão empregadas as expressões empacotamento ou organização molecular para descrever essas propriedades de forma combinada.

Organização molecular das bicamadas

Os espectros dos marcadores de spin fosfolipídicos indicaram que tanto as bicamadas de *E. coli* como de sistemas binários contendo PC apresentam o gradiente de flexibilidade usualmente observado para bicamadas no sentido que liberdade de movimento é mais restrita na região da cabeça polar e aumentando à medida que nos aproximamos da metila terminal das cadeias acila. Isso foi evidenciado pela presença de extremos externos e internos nos espectros para marcadores contendo o grupamento nitróxido nos carbonos 5, 7 e 10, possibilitando o cálculo do parâmetro de ordem, S_{ef} , e pela ausência dessas características nos espectros de 12PCSL, 14PCSL e 16PCSL, que apresentaram

três linhas relativamente estreitas indicativas de maior liberdade de movimento e cuja análise foi efetuada através da relação de alturas das linhas de campo central e de campo baixo, h_0/h_{+1} , conforme descrito em Materiais e Métodos (3.2.4.3.F) e em Resultados (4.2.3). Ainda, o parâmetro W_0 permitiu a comparação dos espectros para todas as posições dos marcadores através de um único parâmetro.

Com relação às bicamadas lipídicas, os espectros de RPE mostraram diferenças entre membranas de *E. coli* e aquelas formadas por sistemas binários contendo PC e diferentes lipídios carregados negativamente. Porém diferentes parâmetros apresentaram diferentes comportamentos. Um fato notável consiste na observação de considerável interação spin-spin (possivelmente devida à troca de Heisenberg) nos espectros de TempoPCSL, 5PCSL, 7PCSL e 10PCSL em membranas de *E. coli* (**Figura 4.50**), enquanto que esse fenômeno não é observado nos sistemas contendo PC. A principal diferença entre essas membranas é a presença do lipídio zwitteriônico PE em *E. coli*, enquanto PC é o lipídio zwitteriônico nas outras membranas. As propriedades físico-químicas desses lipídios são bastante diferentes: PE apresenta cabeça polar menor e menos hidratada, além da capacidade de formar ligações de hidrogênio intermoleculares única entre os lipídios mais estudados (Boggs, 1980; McElhaney, 1982; Boggs, 1987; Sen et al., 1988; Kucerka et al., 2014). Quando comparada com outros lipídios, a área por cabeça polar também é significativamente menor (58 Å² para PE e 64 Å² para PC), ou seja, o empacotamento nas bicamadas de PE é maior (Kucerka et al., 2014) devido às fortes ligações de hidrogênio intermoleculares que ocorrem de forma extensiva (Sen et al., 1988, Kucerka et al., 2014), tornando altamente coesas bicamadas de PE. A ocorrência da interação de troca indica um aumento da concentração local do marcador. Assim, os espectros sugerem a existência de domínio(s) enriquecido(s) em PE, tais que, devido ao seu forte empacotamento, segregariam os marcadores para domínio(s) menos ricos em PE, levando a um aumento da sua concentração. A coesão do(s) domínio(s) enriquecido(s) em PE é observada principalmente, na interface bicamada-água, de acordo com a existência das ligações de hidrogênio na cabeça polar do lipídio.

Nesse contexto, é provável que as medidas efetuadas nos espectros se refiram ao(s) domínio(s) menos ricos em PE, como sugerido pelos valores de A e

S_{ef} (**Tabela 4.14**), que se mostram apenas um pouco mais altos do que esses mesmos valores para as membranas contendo PC (**Tabela 4.16**). No caso de h_0/h_{+1} , esses valores são bastante semelhantes para os dois tipos de membranas (**Tabelas 4.15 e 4.17**). No entanto, quando se mediu W_0 para os dois tipos de membranas, os valores foram consideravelmente mais altos para *E. coli* (**Figura 5.3**). Esse resultado poderia ser devido à contribuição da interação de troca para a largura das linhas, mas essa interação não ocorre para os marcadores próximos da metila terminal e, contudo os valores de W_0 são consideravelmente mais altos para esses marcadores em *E. coli*. Esse resultado permite sugerir que o alargamento devido à interação de troca não contribui de maneira muito significativa para W_0 dos espectros de TempoPCSL, 5PCSL, 7PCSL e 10PCSL e que as diferenças entre *E. coli* e os sistemas binários são reais e que o(s) ambiente(s) monitorado(s) pelos marcadores nessas membranas tem movimentos mais restritos. Além disso, os sistemas binários apresentaram essencialmente os mesmos valores de W_0 (**Figura 5.3**). O maior empacotamento da membrana de *E. coli* é, provavelmente, o motivo pelo qual os peptídeos apresentam uma atividade permeabilizante similar à de 20PG e 10CL, embora o valor de K_B seja ca. de 6 vezes maior para LUVs de *E. coli* (**Figura 4.4, 4.12 e 5.1**). Vale notar que PE está presente de forma majoritária nas membranas de bactérias. Os estudos da interação PDH-membrana, por outro lado, são geralmente feitos com misturas contendo PC. As conhecidas diferenças nas propriedades físico-químicas entre PE e PC, juntamente com os presentes resultados, mostram que, a fim de compreender o mecanismo de ação a nível molecular de PDHs, composições mais adequadas de membranas modelo envolveriam o uso de PE.

Figura 5.3 – Largura da linha de campo central (W_0) em função da posição do grupamento nitroxido intercalado em bicamadas de composição variada na ausência.

Efeito dos peptídeos sobre a organização molecular nas bicamadas

A ligação de TRP3 e seus análogos promove alterações na organização molecular das membranas de LUVs de *E. coli*, sendo que o efeito decresce na ordem TRP3 > WLW > LWL. Utilizando os valores de K_B obtidos, calculamos que nos experimentos de RPE, 99,7, 99,0 e 98,1% de TRP3, WLW e LWL encontram-se ligados, ou seja, as diferenças entre os efeitos dos peptídeos não parecem ser devidas à menor ligação dos análogos. A ligação dos peptídeos levou a alterações espectrais indicativas de forte imobilização dos marcadores 5PCSL e 7PCSL, sugerindo uma grande diminuição na velocidade de rotação do eixo longo molecular dos marcadores (**Figura 4.50**). Como discutido acima, a membrana de *E. coli* provavelmente contém domínios com diferentes composições lipídicas. A diminuição da interação de troca sugere que o marcador encontra-se mais diluído, tendo acesso a uma maior quantidade de lipídios. Em vista da sua complexidade, não é possível descrever de forma completa a organização do sistema antes ou depois da adição dos peptídeos. Poder-se-ia especular que, além do efeito diluidor do peptídeo, ele poderia causar um rearranjo dos domínios, bem como da sua composição. É concebível que, pela potencialidade de formação de ligações de hidrogênio, tanto pelos grupamentos $-NH$ e $-C=O$ do esqueleto peptídico como por resíduos das cadeias laterais, moléculas de PE formariam ligações de

hidrogênio com o peptídeo, diminuindo a formação de extensas ligações de hidrogênio entre moléculas de PE e aumentando o espaçamento médio entre os lipídios.

As diferenças na extensão das alterações promovidas pelos peptídeos nas membranas de *E. coli* não estão totalmente elucidadas no momento. No entanto, como eles estão ligados na mesma extensão (praticamente 100%), essa não seria a causa das diferenças. Outras alternativas poderiam ser: diferenças de conformação, localização, influência da substituição de W por L, ou uma combinação desses fatores. Os espectros de CD não permitem uma comparação direta entre eles, no entanto, a similaridade dos espectros de WLW e LWL, sugere uma conformação similar. Assim, não parece que os diferentes efeitos na organização molecular devam-se a diferenças na conformação. Os estudos de localização mostram que os peptídeos encontram-se próximos à interface bicamada-água. No entanto, pequenas diferenças na localização poderiam existir. Os valores de K_{SV} mostram a ordem decrescente TRP3>WLW>LWL de supressão por acrilamida e os estudos com supressores intercalados nas LUVs de *E. coli* mostraram uma posição mais superficial para TRP3 e WLW em relação à LWL. Parece razoável que, se o peptídeo estiver mais próximo da interface bicamada-água, a perturbação será maior. Além disso, a cadeia lateral de resíduos de W é ca. 37% mais volumosa que a cadeia lateral da L e a ação combinada de interações dipolares, quadrupolares, cátion- π e ligações de hidrogênio por resíduos de W na interface poderia contribuir para estas diferenças.

A ligação de TRP3 também promoveu alterações na organização molecular dos lipossomas contendo diferentes fosfolipídios carregados negativamente. Na presença do peptídeo há um aumento no empacotamento dos lipídios, o qual é mais acentuado na região da interface bicamada-água, de acordo com o observado em LUVs de *E. coli*. Para estas, os espectros de RPE mostraram que TRP3 induz um aumento no ordenamento e diminui consideravelmente a mobilidade dos lipídios na região da interface. Para as membranas de composição binária esses eventos ocorreram em menor extensão, evidenciando mais uma vez as diferenças entre os dois tipos de bicamadas.

Enquanto os espectros de *E. coli* indicaram ausência de rotação ao redor do eixo longo molecular, nos sistemas binários de PC os espectros de 5PCSL, 7PCSL e 10PCSL apresentaram extremos externos e internos, permitindo a medida de $A_{||}$ e $A_{\perp}$, e, conseqüentemente o cálculo de S_{ef} . A **Tabela 4.16** mostra o aumento de S_{ef} causado pela adição de TRP3. Da mesma forma, o peptídeo causou um aumento da relação h_0/h_{+1} nos espectros dos marcadores 12PCSL, 14PCSL e 16PCSL (**Tabela 4.17**). O conjunto dos efeitos pode ser visualizado na **Figura 4.54**, onde a variação de W_0 mostra que o peptídeo afetou a organização das bicamadas de forma diferencial segundo a profundidade, exercendo maior efeito na região próxima da cabeça polar. No caso do marcador TempoPCSL, os espectros indicam que a ligação do peptídeo afetou a orientação das cabeças polares, como visto par membranas de *E. coli*.

Conforme mencionado anteriormente, o perfil de perturbação decrescente é semelhante ao observado para peptídeos que não possuem orientação transmembrana e encontram-se localizados mais próximos à superfície da membrana (Kleinschmidt et al., 1997).

Organização molecular em micelas e efeito da TRP3

Como já é conhecido na literatura, espectros de marcadores de spin em micelas convencionais, como as de SDS e CTAB mostram uma liberdade de movimento maior nessas estruturas do que em bicamadas lipídicas (Ernandes et al., 1976; 1977, Schreier et al., 1978). Contudo, a caracterização de micelas de LPC por SAXS mostrou tratar-se de estruturas bem maiores e com forma elipsoidal (Barbosa et al., 2006). Espectros de EPR de 5PCSL em micelas de LPC apresentaram extremos externos e internos, se bem que o parâmetro de ordem calculado para esses espectros seja um pouco menor do que para bicamadas de POPC (M.T. Campanhã, resultados não publicados). Essas informações sugerem que as micelas de lisofosfolipídios aqui estudadas possuem características de organização molecular semelhantes às de bicamadas.

Os espectros dos marcadores da família MESL apresentaram linhas relativamente estreitas cuja largura diminuiu à medida que o grupamento nitróxido se localiza

mais próximo da metila terminal, de forma análoga à encontrada em bicamadas (**Figura 4.56**). A adição de TRP3 também modifica a organização molecular dos agregados micelares. Isso é evidenciado pela obtenção de espectros com duas componentes para os marcadores 5MESL e 10MESL tanto em micelas de 20LPG como de 20LPA. O mesmo é observado para 12MESL, porém de forma menos acentuada. Esses resultados evidenciam a presença de ao menos dois ambientes, um mais e outro menos empacotado. O ambiente mais empacotado provavelmente resulta da formação de domínios enriquecidos no lipídio carregado negativamente promovida pela atração eletrostática entre o peptídeo e os lipídios.

Em estudos com peptídeos correspondentes à região N-terminal das toxinas proteicas esticolisina I e esticolisina II, formadoras de poro, espectros de marcadores de spin mostraram uma mudança na organização molecular de micelas semelhante àsquelas reportadas aqui (Paulino, 2011). Ainda nesse trabalho, experimentos de SAXS revelaram que a adição de um peptídeo promoveu uma mudança na forma das micelas. Esse efeito também poderia ocorrer por ação de TRP3. Essa possibilidade é corroborada pela considerável alteração causada nos espectros de 5MESL e 12MESL pela TRP3. A **Figura 5.4** compara os valores de W_0 para os espectros de marcadores de spin em micelas e bicamadas na ausência e presença do peptídeo.

Figura 5.4 – A. Valores de W_0 para os espectros de marcadores de spin em bicamadas de 20PG e micelas de 20LPG em ausência e presença de TRP3. B. Variação dos valores de W_0 .

6 – Conclusões

Os estudos de propriedades funcionais, estruturais e dinâmicas realizados neste trabalho com o peptídeo antimicrobiano tritripticina (TRP3) e seus análogos (WLW e LWL) mostraram a importância dos três resíduos de W sequenciais em TRP3 quanto à sua atividade hemolítica, permeabilizante e de ancoramento à membrana. Os resultados sugeriram que a potencialidade terapêutica dos análogos de TRP3 pode ser maior do que a do peptídeo nativo.

Os estudos de vazamento evidenciaram a presença de eventos ocorrendo em escalas de tempos maiores do que aquelas geralmente reportadas (minutos a 1-2 horas). Os cálculos de energia livre de partição mostraram a espontaneidade da interação com membranas, sendo que as forças que desempenham um papel para a ligação às membranas contribuem de forma diferente quando são alteradas a sequência de amino ácidos, as propriedades físico-químicas da membrana, e a geometria do agregado molecular (bicamadas ou micelas). A substituição do(s) resíduo(s) de W por L nos análogos diminui consideravelmente a contribuição das transições eletrônicas dos resíduos aromáticos para o espectro de CD. A análise dos espectros permitiu propor que o arranjo espacial difere nos vários ambientes, sendo que as várias estruturas mostram propensão para a formação de uma ou mais dobras. A diferença de conformação em micelas e bicamadas anteriormente reportada para TRP3 também foi observada para os análogos, sendo que a principal diferença parece ser devida a uma mudança na compactação da estrutura 3D desses peptídeos. Os peptídeos não penetram profundamente nas membranas, encontrando-se próximos à interface membrana-água. Ao se intercalar, promovem um aumento no empacotamento nessa região. Em micelas TRP3 modula a organização dos lipídios, conduzindo a uma estrutura com no mínimo dois ambientes, um mais empacotado e outro mais fluido. As membranas contendo PE são mais empacotadas do que aquelas contendo PC. As conhecidas diferenças nas propriedades físico-químicas entre os dois lipídios, juntamente com as diferenças encontradas entre bicamadas de *E. coli* e os sistemas binários contendo PC e diferentes lipídios carregados negativamente mostra que, a fim de compreender o mecanismo de ação a nível molecular de AMPs, composições mais adequadas de membranas modelo requerem o emprego de PE.

O mecanismo proposto para atividade permeabilizante de TRP3 é de formação de um poro toroidal (Salay et al., 2004). Os lipídios originalmente organizados em bicamada devem adquirir uma organização molecular em curvatura positiva. Nesse contexto, a formação do poro deve ser visualizada como sendo o resultado do efeito recíproco dos peptídeos sobre a organização dos lipídios e dos lipídios sobre a conformação dos peptídeos. A capacidade dos lipídios de modular a conformação da TRP3, bem como a do peptídeo de afetar o arranjo molecular em micelas e bicamadas, demonstrados neste trabalho, estão de acordo com o modelo proposto para o mecanismo de ação deste PDH.

Possíveis implicações dos resultados para o mecanismo de formação de poro toroidal por TRP3

De acordo com o modelo de Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) para a formação de poro toroidal por peptídeos em α -hélice anfipática, inicialmente o peptídeo liga-se à interface da membrana, alinhando o seu eixo longo molecular paralelamente à superfície da membrana (Zaslhoff, 2002). Esta localização produz a separação das cabeças polares dos lipídios, induzindo formação de curvatura positiva localizada (Matsuzaki, 2001). Quando a energia desfavorável de deformação da membrana atinge um valor crítico, um poro de natureza dinâmica é formado por um complexo supramolecular de peptídeo-lipídio - um poro toroidal, cuja superfície polar é formada pela face polar dos peptídeos anfifílicos e a cabeça polar dos lipídios (Ludtke et al., 1996; Matsuzaki et al., 1996; Yang et al., 2000).

Os resultados deste trabalho fornecem subsídios para a elucidação do mecanismo de formação de poro por TRP3. Os estudos com bicamadas representariam a etapa inicial da interação peptídeo-membrana. Pelo fato de micelas apresentarem curvatura positiva (como a organização dos lipídios no poro toroidal), a interação com micelas mimetizaria, em alguma extensão, a organização molecular dos lipídios e peptídeos no poro. Neste contexto, as diferenças de conformação sugeridas entre bicamadas e micelas, corresponderiam a uma mudança conformacional do peptídeo na etapa de formação do poro. A TRP3 possui dois resíduos de P, que podem apresentar isomerização *trans/cis*.

Em micelas, as duas P estão em *trans*, o que conduz a uma estrutura 3D mais aberta. A conformação 3D mais compacta, proposta para o peptídeo em bicamadas, poderia ser devida à presença de isômeros *cis* em uma ou nas duas P, o que levaria a um maior empacotamento das moléculas nas bicamadas. O peptídeo inicialmente se ligaria na interface da membrana, adquirindo conformação anfipática. No caso da TRP3, a molécula se alinharia com seu eixo longo molecular aproximadamente paralelo à normal à bicamada e, conforme proposto, sua conformação implicaria em que os resíduos hidrofóbicos se situem na região de dobra no peptídeo, estando localizados mais profundamente na membrana, em contacto com os carbonos 10-12 das cadeias acila dos lipídios. Por outro lado, os terminais N- e C- carregados positivamente formariam a parte hidrofílica da estrutura e estariam mais próximos à interface (**Figura 5.5**). Na transição para o poro toroidal, uma mudança na isomerização da(s) P ocorreria, favorecendo uma conformação mais aberta. Esta mudança conformacional aumentaria a separação das cabeças polares e, consequentemente, a energia desfavorável de deformação da membrana, resultando na formação do poro.

Figura 5.5 – Esquema ilustrando a formação do poro toroidal por (A) um peptídeo genérico, onde. 1 – Interação inicial com a bicamada e 2 – arranjo peptídeo-lipídeo na região do poro. Adaptado de Toke, 2005. (B) conformações da TRP3 na bicamada e no poro toroidal. As estruturas do peptídeo foram adaptadas de Arias et al., 2015.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeliovich H (2005) An empirical extremum principle for the Hill coefficient in ligand-protein interactions showing negative cooperativity. *Biophys. J.* **89**:76-79.
- Almeida PF, Ladokhin AS, White SH (2012) Hydrogen-bond energetics drive helix formation in membrane interfaces. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**:178-82.
- Andersson AJ, Danielsson J, Gräslund A, Måler L (2007) Kinetic models for peptide-induced leakage from vesicles and cells. *Eur. Biophys. J.* **36**:621–635.
- Andrushchenko VV, Vogel HJ, Prenner EJ (2006) Solvent-dependent structure of two tryptophan-rich antimicrobial peptides and their analogs studied by FTIR and CD spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**:1596-1608.
- Andrushchenko VV, Vogel HJ, Prenner EJ (2007) Interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model membranes studied by differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**:2447-2458.
- Andrushchenko VV, Aarabi MH, Nguyen LT, Prenner EJ, Vogel HJ (2008) Thermodynamics of the interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model and natural membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**:1004-1014.
- Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**:223-230.
- Arias M, Jensen KV, Nguyen LT, Storey DG, Vogel HJ (2015) Hydroxy-tryptophan containing derivatives of *tritrpticin*: modification of antimicrobial activity and membrane interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**:277-288.
- Arnold GE, Day LA, Dunker AK (1992) Tryptophan contributions to the unusual circular dichroism of fd bacteriophage. *Biochemistry* **31**:7948-56.
- Bagheri M, Beyermann M, Dathe M (2012) Mode of action of cationic antimicrobial peptides defines the tethering position and the efficacy of biocidal surfaces. *Bioconjug. Chem.* **23**:66-74.
- Barbosa LR, Caetano W, Itri R, Homem-de-Mello P, Santiago PS, Tabak M (2006) Interaction of phenothiazine compounds with zwitterionic lysophosphatidylcholine micelles: Small angle X-ray scattering, electronic absorption spectroscopy, and theoretical calculations. *J. Phys. Chem. B* **110**:13086-13093.
- Bastos M, Bai G, Gomes P, Andreu D, Goormaghtigh E, Pietro M (2008) Energetics and partition of two cecropin-melittin hybrid peptides to model membranes of different composition. *Biophys. J.* **94**:2128-2141.
- Beschiaschvili G, Seelig J (1990) Melittin binding to mixed phosphatidylglycerol phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry* **29**:52-58.
- Beschiaschvili G, Baeuerle H-D (1991) Effective charge of melittin upon interaction with POPC vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1068**:195-200.
- Bianconi ML, do Amaral AT, Schreier S (1988) Use of membrane spin label spectra to monitor rates of reaction of partitioning compounds: hydrolysis of a local anesthetic analog. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**:344-350.

- Bishop CM, Walkenhorst WF, Wimley WC (2001) Folding of β -sheets in membranes: specificity and promiscuity in peptide model systems. *J. Mol. Biol.* **309**:975-988.
- Blondelle SE, Lohner K, Aguilar M (1999) Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**:89-108.
- Boggs JM (1987) Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochim. Biophys. Acta* **906**:353-404.
- Bozelli JC Jr. (2011) *Estudos espectroscópicos da interação entre o peptídeo de defesa do hospedeiro (PDH) tritrpticin (TRP3) e seu análogo paramagnético (TOAC⁰-TRP3-TRP3) e membranas modelo*. São Paulo: Instituto de Química; Universidade de São Paulo, 175 p. Dissertação de mestrado.
- Bozelli JC Jr., Sasahara ET, Pinto MR, Nakaie CR, Schreier S (2012) Effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritrpticin to lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* **165**:365-373.
- Brogden K (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:238-250.
- Buck M. (1998) Trifluoroethanol and colleagues cosolvents come age. Recent studies with peptides and proteins. *Quart. Rev. Biophys.* **31**:297-355.
- Budil DE, Lee S, Saxena S, Freed JH (1996) Nonlinear-least-squares analysis of slow motion EPR spectra in one and two dimensions using a modified Levenberg-Marquardt algorithm. *J. Magn. Res. Ser. A* **120**:155-189.
- Campbell ID, Dwek RA (1984) *Biological Spectroscopy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., London, pp. 179-216.
- Cantor RS (1999) Lipid composition and the lateral pressure profile. *Biophys. J.* **76**:2625-2639.
- Chattopadhyay A, London E (1987) Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry*. **26**:39-45
- Cirioni O, Giacometti A, Silvestri C, Della Vittoria A, Licci A, Riva A, Scalise G (2006) In vitro activities of tritrpticin alone and in combination with other antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:3923-3925.
- Cole AM, Hong T, Boo LM, Nguyen T, Zhao C, Bristol G, Zack JA, Waring AJ, Yang OO, Lehrer RI (2002) Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**:1813-1818.
- Craveur P, Joseph AP, Poulain P, de Brevern AG, Rebehmed J (2013) Cis-trans isomerization of omega dihedrals in proteins. *Amino acids* **45**:279-289.
- DeGrado WF, Musso GF, Lieber M, Kaiser ET, Kézdy FJ (1982) Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic melittin analogue. *Biophys. J.* **37**:329-338.
- de Paula E, Schreier S (1995) Use of a novel method for determination of partition coefficients to compare the effect of local anesthetics on membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1240**:25-33.

- Domingues TM, Mattei B, Seelig J, Perez KR, Miranda A, Riske KA (2013) Interaction of the antimicrobial peptide gomesin with model membranes: a calorimetric study. *Langmuir* **29**:8609-8618.
- Domingues TM, Buri MV, Daffre S, Campana PT, Riske KA, Miranda A (2014) Structure-activity relationship of Trp-containing analogs of the antimicrobial peptide gomesin. *J. Pept. Sci.* **20**:421-428.
- Dyszy FH (2008) *Estudos estruturais de Histatina-5 e seu análogo TOAC⁰-Histatina-5: interação com metais e sistemas biomiméticos*. São Paulo: Instituto de Química; Universidade de São Paulo, 185 p. Tese de doutorado.
- Ehrenstein G, Lecar H (1977) Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* **10**:1-34.
- Epand RM, Epand RF (2009) Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**:289-294.
- Ernandes JR, Schreier S, Chaimovich H (1976) Spin label studies of micellar and pre-micellar aggregates. *Chem. Phys. Lipids* **16**:19-30.
- Ernandes JR, Chaimovich H, Schreier S (1977) Spin label study of detergents in the region of critical micelle concentration. *Chem. Phys. Lipids* **18**:304-315.
- Fan P, Bracken C, Baum J (1993) Structural characterization of monellin in the alcohol-denatured state by NMR: evidence for β -sheet to α -helix conversion. *Biochemistry* **32**:1573-1582.
- Farnaud S, Spiller C, Moriarty LC, Patel A, Gant V, Odell EW, Evans RW (2004) Interactions of lactoferricin-derived peptides with LPS and antimicrobial activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**:193-199.
- Ferre R, Melo MN, Correia AD, Feliu L, Bardaji E, Planas M, Castanho M (2009) Synergistic effects of the membrane actions of cecropin-melittin antimicrobial hybrid peptide BP100. *Biophys. J.* **96**:1815-1827.
- Fischbach MA, Walsh CT (2009) Antibiotics for emerging pathogens. *Science* **325**:1089-1093.
- Fjell CD, Hiss JA, Hancock REW, Schneider G (2011) Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**:37-51.
- Freed JH, Fraenkel GK (1963) Theory of linewidths in electron spin resonance spectra. *J. Chem. Phys.* **39**:326-348.
- Frezzatti WA Jr, Toselli WR, Schreier S (1986) Spin label study of local anesthetic-lipid membrane interactions. Phase separation of the uncharged form and bilayer micellization by the charged form of tetracaine. *Biochem. Biophys. Acta* **860**:531-538.
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SSL, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI (1985) Defensins. Natural peptides antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **76**:1427-1435.
- Garidel P, Johann C, Blume A (1997) Nonideal mixing and phase separation in phosphatidylcholine-phosphatidic acid mixtures as a function of acyl chain length and pH. *Biophys. J.* **72**:2196-2210.

- Gennaro R, Skerlavaj B, Romeo D (1989) Purification, composition, and activity of two bacterenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect. Immun.* **57**:3142-3146.
- Ghiselli R, Cirioni O, Giacometti A, Mocchegiani F, Orlando F, Silvestri C, Licci A, Della Vittoria A, Scalise G, Saba V (2006) The cathelicidin-derived tritrpticin enhances the efficacy of ertapenem in experimental rat models of septic shock. *Shock* **26**:195-200.
- Greenfield N, Fasman GD (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**:4108-4116.
- Gregory SM, Cavanaugh A, Journigan V, Pokorny A, Almeida PF (2008) A quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles by the antimicrobial peptide cecropin A. *Biophys. J.* **94**:1667-1680.
- Griffith OH, Waggoner AS (1969) Nitroxide free radicals: spin labels for probing biomolecular structure. *Acc. Chem. Res.* **2**:17-24.
- Griffith OH, Jost PC (1976) *Lipid spin labels in biological membranes* .in: Spin Labeling – Theory and Applications, Berliner, L.W, ed., Academic Press, 453-523.
- Grishina IB, Woody RW (1994) Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: exciton couplets and coupled oscillators. *Faraday Discuss.* **99**:245-262.
- Hancock REW, Chapple DS (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1317-1323.
- Huang HW, Chen F-Y, Lee M-T (2004) Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. *Phys. Rev. Lett.* **92**:198304/1-198304/4.
- Huang J, Feigenson FW (1993) Monte Carlo simulation of lipid mixtures: finding phase separation. *Biophys. J.* **65**:1788-1794.
- Huang J, Swanson JE, Dibble ARG, Hinderliter AK, Feigenson FW (1993) Nonideal mixing of phosphatidylserine and phosphatidylcholine in the fluid lamellar phase. *Biophys. J.* **64**:413-425.
- Hubbell HL, McConnell HM (1971) Molecular motions in spin labeled phospholipids and membranes. *J. Amer. Chem. Soc.* **93**:314-326.
- Hubert A, Henderson PJF, Marsh D (2003) Lipid-protein interactions in Escherichia coli membranes overexpressing the sugar-H⁺ symporter, GalP EPR of spin-labelled lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1611**:243-248.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graphics* **14**:33-38.
- Infante VV, Miranda-Olvera Ad, De Leon-Rodriguez LM, Anaya-Velazquez F, Rodriguez MC, Avila EE (2011) Effect of the antimicrobial peptide tritrpticin on the in vitro viability and growth of *Trichomonas vaginalis*. *Curr. Microbiol.* **62**:301-306.
- Jasanoff A, Fersht AR (1994) Quantitative determination of helical propensities from trifluoroethanol titration curves. *Biochemistry* **33**:2129-2135.
- Jelinek R, Kolusheva S (2005) Membrane interactions of host-defense peptides studied in model systems. *Curr. Protein Pept. Sci.* **6**:103-114.

- Jenssen H, Hamill P, Hancock REW (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:491-511.
- Jost P, Libertine LJ, Hbert VC, Griffith OH (1971) Lipid spin labels in lecithin multilayers. A study of motion along fatty acid chains. *J. Mol. Biol.* **59**:77-98.
- Killian AJ, von Heijne G (2000) How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* **25**:429-434.
- Kivelson D (1960) Theory of ESR linewidths of free radicals. *J. Chem. Phys.* **33**:1094.
- Kleinschmidt JH, Mahaney JE, Thomas DD, Marsh D (1997) Interaction of bee venom melittin with zwitterionic and negatively charged phospholipid bilayers: a spin-label electron spin resonance study. *Biophys. J.* **72**:767-778.
- Knowles PF, Marsh D, Rattle HWE (1976) *Magnetic Resonance of Biomolecules. An Introduction to the Theory and Practice of NMR and ESR in Biological Systems*, Wiley-Interscience Publication, London.
- Kooijman EE, Carter KM, van Laar EG, Chupin V, Burger KNJ, de Kruijff B (2005) What makes the bioactive lipids phosphatidic acid and lysophosphatidic acid so special? *Biochemistry* **44**:17007-17015.
- Kucerka N, van Oosten B, Pan J, Heberle F, Harroun TA, Katsaras J (2014) Molecular structures of fluid phosphatidylethanolamine bilayers obtained from simulation-to-experiment comparisons and experimental scattering density profiles. *J. Phys. Chem. B* **119**:1947-1956.
- Kyrychenko A, Ladokhin AS (2014) Refining membrane penetration by a combination of steady-state and time-resolved depth-dependent fluorescence quenching. *Anal. Biochem.* **446**:19-21.
- Ladokhin AS (1997) Distribution analysis of depth-dependent fluorescence quenching in membranes: a practical guide. *Methods Enzymol.* **278**:462-473.
- Ladokhin AS, Selsted ME, White SH (1999) CD spectra of indolicidin antimicrobial peptides suggest turns, not polyproline helix. *Biochemistry* **38**:12313-12319.
- Ladokhin AS, Jayasinghe S, White SH (2000) How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? *Anal. Biochem.* **285**:235-245.
- Ladokhin AS, White SH (2001) Protein chemistry at membrane interfaces: non-additivity of electrostatic and hydrophobic interactions. *J. Mol. Biol.* **309**:543-552.
- Lakowicz JR (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd edition, Springer Media, New York.
- Lawyer C, Pai S, Watabe M, Borgia P, Mashimo T, Eagleton L, Watabe K (1996) Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides. *FEBS Lett.* **390**:95-98.
- Lee M-T, Chen F-T, Huang HW (2004) Energetics of pore formation induced by membrane active peptides. *Biochemistry* **43**:3590-3599.

- Lehrer RI, Barton A, Daher KA, Harwig SSL, Ganz T, Selsted ME (1989) Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. *J. Clin. Invest.* **84**:553-561.
- Lohner K, Blondelle SE (2005) Molecular mechanisms of membrane perturbation by antimicrobial peptides and the use of biophysical studies in the design of novel peptide antibiotics. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **8**:241-256.
- Lohner K (2009) New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes. *Gen. Physiol. Biophys.* **28**:105-116.
- Lopes S, Neves CS, Eaton P, Gameiro P (2010) Cardiolipin, a key component to mimic the *E. coli* bacterial membrane in model systems revealed by dynamic light scattering and steady-state fluorescence anisotropy. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**:1357-1366.
- Ludtke SJ, He K, Heller WT, Harroun TA, Yang L, Huang HW (1996) Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* **35**:13723-13728.
- Manning MC, Illagasekare M, Woody RW (1988) Circular dichroism studies of distorted α -helices, twisted β -sheets, and β -turns. *Biophys. Chem.* **31**:77-86.
- Manzini MC, Perez KR, Riske KA, Bozelli Jr JC, Santos TL, da Silva MA, Saraiva GK, Politi MJ, Valente AP, Almeida FC, Chaimovich H, Rodrigues MA, Bemquerer MP, Schreier S, Cuccovia IM (2014) Peptide:lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**:1985-1999.
- Marsh D, Horváth LI (1998) Structure, dynamics and composition of the lipid-protein interface. Perspectives from spin-labelling. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**:267-296.
- Martenson RE, Park JY, Stone AL (1985) Low-ultraviolet circular dichroism spectroscopy of sequential peptides 1-63, 64-95, 96-128, and 129-168 derived from myelin basic protein of rabbit. *Biochemistry* **24**:7689-7695.
- Matsuzaki K (2001) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defense? *Biochem. Soc. Trans.* **29**:598-601.
- Matsuzaki K, Murase O, Fujii N, Miyajima K (1996) An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* **35**:11361-11368
- Maupetit J, Derreumaux P, Tuffery P (2009) PEP-FOLD: an online resource for *de novo* peptide structure prediction. *Nucleic Acids Res.* **37**:W498-W503.
- Mazzuca C, Orioni B, Coletta M, Formaggio F, Toniolo C, Maulucci G, de Spirito M, Pispisa B, Venzani M, Stella L (2011) Fluctuations and the rate-limiting step of peptide-induced membrane leakage. *Biophys. J.* **99**:1791-1800.
- McElhaney RN (1982) The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chem. Phys. Lipids* **30**:229-259.
- McQuarrie DA, Simon JD (1997) *Physical chemistry: a molecular approach*, 1st edition, University Science Books, Sausalito.
- Melo MN, Castanho MARB (2007) Omiganan interaction with bacterial membranes and cell wall models. Assigning a biological role to saturation. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**:1277-1290.

- Melo MN, Ferre R, Castanho MARB (2009) Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**:245-250.
- Merrifield RB (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**:2149-2154.
- Nagpal S, Gupta V, Kaur KJ, Salunke DM (1999) Structure-function analysis of tritrypticin, an antibacterial peptide of innate immune origin. *J. Biol. Chem.* **274**:23296-23304.
- Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, Tokunaga F, Muta T, Iwanaga S, Niwa M, Takao T, Shimonishi Y (1988) Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J. Biol. Chem.* **263**:16709-16713.
- Nguyen LT, de Boer L, Zaat SA, Vogel HJ (2011) Investigating the cationic side chains of the antimicrobial peptide tritrypticin: hydrogen bonding properties govern its membrane-disruptive activities. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**:2297-2303.
- Nature outlook (2014) Antibiotics. *Nature* **509**:S1-S34.
- Nemeth E, Preza GC, Jung C-L, Kaplan J, Waring AJ, Ganz T (2006) The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. *Blood* **107**:328-333.
- Neves AA, Brindle KM (2006) Assessing responses to cancer therapy using molecular imaging. *Biochim. Biophys. Acta* **1766**:242-261.
- Nordberg P, Monnet DL, Cars O (2005) Antibacterial drug resistance: options for concerned action. WHO, Department of Medicines Policy and Standards.
- Ohnishi S, McConnell HM (1965) Interaction of the radical ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **87**:2293.
- Olofsson G, Sparr E (2013) Ionization constants pKa of Cardiolipin. *PLoS one* **8**:e73040.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J. Biol. Chem.* **276**:7806-7810.
- Paulino, J. *Estudos Conformacionais de Peptídeos correspondentes à região N-terminal das Toxinas Protéicas Esticolisinas I e II*. São Paulo: Instituto de Química; Universidade de São Paulo, 2010, 158 p. Tese de mestrado.
- Perczel A, Fasman GD (1992) Quantitative analysis of cyclic β -turn models. *Protein Sci.* **1**:378-395.
- Pertinhez TA, Nakaie CR, Carvalho RS, Paiva ACM, Tabak M, Toma F, Schreier S (1995) Conformational changes upon binding of a receptor loop to lipid structures: possible role in signal transduction. *FEBS Lett.* **375**:239-242.
- Pertinhez TA, Nakaie CR, Paiva ACM, Schreier S (1997) Spin-labeled extracellular loop from a seven-transmembrane helix receptor: studies in solution and interaction with model membranes. *Biopolymers* **42**:821-829.
- Pokorny A, Almeida PF (2004) Kinetics of dye efflux and lipid flip-flop induced by delta-lysin in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, alpha-helical peptides. *Biochemistry* **43**:8846-8857.

- Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y (1992) Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* **31**:12416-12423.
- Pungercar J, Strukelj B, Kopitar G, Renko M, Lenarcic B, Gubensek F, Turk V (1993) Molecular cloning of a putative homolog of proline/arginine-rich antibacterial peptides from porcine bone marrow. *FEBS Lett.* **336**:284-288.
- Rex S, Schwarz G (1998) Quantitative studies on the melittin-induced leakage mechanism of lipid vesicles. *Biochemistry* **37**: 2336–2345.
- Riciluca KCT, Sayegh RSR, Melo RL, Silva PI Jr. (2012) Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. *Results in Immunol.* **2**:66-71.
- Ritonja A, Kopitar M, Jerala R, Turk V (1989) Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leucocytes. *FEBS Lett.* **255**:211-214.
- Romeo D, Skerlavaj B, Bolognesi M, Gennaro R (1988) Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* **263**:9573-9575.
- Rozek A, Friedrich CL, Hancock REW (2000) Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* **39**:15765-15774.
- Rouser G, Fleisher S, Yamamoto A (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorous analysis of spots. *Lipids* **5**:494-496.
- Saberwal G, Nagaraj R (1993) Interaction of hydrophobic peptides with model membranes: slow binding to membranes and not subtle variations in pore structure is responsible for the gradual release of entrapped solutes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1151**:43–50.
- Salay LC, Procopio J, Oliveira E, Nakaie CR, Schreier S (2004) Ion channel-like activity of the antimicrobial peptide tritrpticin in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **565**:171-175.
- Salay LC, Ferreira M, Oliveira ON Jr., Nakaie CR, Schreier S (2012) Headgroup specificity for the interaction of the antimicrobial peptide tritrpticin with phospholipid Langmuir monolayers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **100**:95-102.
- Salinas RK, Shida CS, Pertinhez TA, Spisni A, Nakaie CR, Paiva ACM, Schreier S (2002) Trifluoroethanol and Binding to Model Membranes Stabilize a Predicted Turn in a Peptide Corresponding to the First Extracellular Loop of the Angiotensin II AT1A Receptor. *Biopolymers* **65**:21-31.
- Schibli DJ, Hwang PM, Vogel HJ (1999) Structure of the antimicrobial peptide tritrpticin bound to micelles: a distinct membrane-bound peptide fold. *Biochemistry* **38**:16749-16755.
- Schibli DJ, Epand RF, Vogel HJ, Epand RM (2002) Tryptophan-rich antimicrobial peptides: comparative properties and membrane interactions. *Biochem. Cell. Biol.* **80**:667-677.
- Schibli DJ, Nguyen LT, Kernaghan SD, Rekdal Ø, Vogel HJ (2006) Structure-function analysis of tritrpticin analogues: potential relationships between antimicrobial activities, model membrane interactions, and their micelle bound NMR structures. *Biophys. J.* **91**:4413-4426.

- Schneider DJ, Freed JH (1989) Calculating slow motional magnetic resonance spectra: a user's guide. *Biological Magnetic Resonance*: Plenum Publisher Cooperation. NY 1-76p.
- Schreier S (1979) *Estudos estruturais e dinâmicos de membranas pelo método do marcador de spin*. São Paulo: Instituto de Química; Universidade de São Paulo, 271 p. Tese de Livre Docência em Ciências.
- Schreier S, Polnaszek CF, Smith IC (1978) Spin labels in membranes: problems in practice. *Biochim. Biophys. Acta* **515**:375-436.
- Schreier S, Frezzatti WA, Araujo PS, Chaimovich H, Cuccovia IM (1984) Effect of lipid membranes on the apparent pK of the local anesthetic tetracaine spin label and titration studies. *Biochim. Biophys. Acta* **769**:231-237.
- Schreier S, Barbosa SR, Casallanovo F, Vieira RFF, Cilli EM, Paiva ACM, Nakaie CR (2004) Conformational basis for the biological activity of TOAC-labeled angiotensin II and bradykinin: electron paramagnetic resonance, circular dichroism, and fluorescence studies. *Biopolymers* **74**:389-402.
- Seelig A, Alt T, Lotz S, Hölzemann G (1996) Binding of substance P agonists to lipid membranes and to neurokinin-1 receptor. *Biochemistry* **35**:4365-4374.
- Sen A, Yang PW, Mantsch HH, Hui S-W (1988) Extended hydrogen-bonded structures of phosphatidylethanolamine. *Chem. Phys. Lipids* **47**:109-116.
- Shai Y (2002) Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **66**:236-248.
- Shamas-Din A, Satsoura D, Khan O, Zhu W, Leber B, Fradin C, Andrews DW (2014) Multiple partners can kiss-and-run: Bax transfers between multiple membranes and permeabilizes those primed by tBid. *Cell Death and Disease* **5**:1-9.
- Sharma R, Lomash S, Salunke DM (2013) Putative bioactive motif of tritrypticin revealed by an antibody with biological receptor-like properties. *PLoS One* **8**:e75582.
- Shintou K, Nakano M, Kamo T, Kuroda T, Handa T (2007) Interaction of an amphipathic peptide with phosphatidylcholine/phosphatidylethanolamine mixed membranes. *Biophys. J.* **93**:3900-3906.
- Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**:246-248.
- Stewart JM, Young JD (1984) *Solid phase peptide synthesis*. Pierce Chemical Co., Rockford.
- Stone TJ, Buckman T, Nordio PL, McConnell HM (1965) Spin-labeled biomolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **54**:1010-1017.
- Strömstedt AA, Pasupuleti M, Schmidtchen A, Malmsten M (2009) Oligotryptophan-tagged antimicrobial peptides and the role of cationic sequence. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**:1916-1923.
- Su Y, Waring AJ, Ruchala P, Hong M (2011) Structures of β -hairpin antimicrobial protegrin peptides in lipopolysaccharide membranes: mechanism of gram selectivity obtained from solid-state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **50**:2072-2083.

- Tam JP, Lu YA, Yang JL (2000) Design of salt-insensitive glycine-rich antimicrobial peptides with cyclic tricyclic structures. *Biochemistry* **39**:71597169.
- Tang M, Hong M (2009) Structure and mechanism of β -hairpin antimicrobial peptides in lipid bilayers from solid-state NMR spectroscopy. *Mol. Biosyst.* **5**:317-322.
- Teixeira LG, Malatova L, Bersanetti PA, Schreier S, Carmona AK, Nakaie CR (2015) Conformational properties of seven toac-labeled angiotensin I analogues correlate with their muscle contraction activity and their ability to act as ACE substrates. *Plos One* **10**:e0136608.
- Teixeira V, Feio MJ, Bastos M (2012) Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid Res.* **51**:149-177.
- Thorgeirsson TE, Yu YG, Shin Y-K (1995) A limiting law for the electrostatics of the binding of polypeptides to phospholipid bilayers. *Biochemistry* **34**:5518-5522.
- Tiewcharoen S, Phurttikul W, Rababert J, Auewarakui P, Roytrakul S, Chetanachan P, Atitthep T, Junnu V (2014) Effect of synthetic antimicrobial peptides on *Naegleria fowleri* trophozoites. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **45**:537-546.
- Tinker DA, Krebs EA, Feltham IC, Attah-Poku SK, Ananthanarayanan VS (1988) Synthetic β -turn peptides as substrates for a tyrosine protein kinase. *J. Biol. Chem.* **263**:5024-5026.
- Toke O (2005) Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers* **80**:717-735.
- Tsui FC, Ojcius DM, Hubbell WL (1986) The intrinsic pKa values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidylcholine host bilayers. *Biophys. J.* **49**:459-468.
- Valeur B (2001) *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Veniaminov SY, Yang JT (1996) *Determination of Protein Secondary Structure in: Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules.* (G.D. Fasman, Ed.), Plenum Press, New York, p. 69-107.
- Vogel HJ, Schibli DJ, Jing W, Lohmeier-Vogel EM, Epand RF, Epand RM (2002) Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. *Biochem. Cell Biol.* **80**:49-63.
- Wade D, Boman A, Wåhlin B, Drain CM, Andreu D, Boman HG, Merrifield RB (1990) All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4761-4765.
- Wang G, Li X, Wang Z (2009) APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucl. Acids Res.* **37**:D933-937.
- Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R (2006) Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid Res.* **45**:250-278.
- Weinstein JN, Yoshikama S, Henkart P, Blumenthal R, Hagins WA (1977) Liposome-cell interaction: transfer and intracellular release of a trapped fluorescent marker. *Science* **195**:489-492.

- Wertz JE, Bolton JR (1972) Electron spin resonance: elementary theory and practical applications. McGraw-Hill, Inc., United States of America.
- White SH, Wimley WC, Selsted ME (1995) Structure, function, and membrane integration of defensin. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**:521–527.
- White SH, Wimley WC (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**:319-365.
- Wimley WC, White SH (1992) Partitioning of tryptophan side-chain analogs between water and cyclohexane. *Biochemistry* **31**:12813-12818.
- Wimley WC, White SH (1993) Membrane partitioning: distinguishing bilayer effects from the hydrophobic effect. *Biochemistry* **32**:6307-6312.
- Wimley WC, White SH (1996) Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat. Struct. Biol.* **3**:842-848.
- Wimley WC, Hristova K, Ladokhin AS, Silvestro L, Axelsen PH, White SH (1998) Folding of β -sheet membrane proteins: a hydrophobic hexapeptide model. *J. Mol. Biol.* **277**:1091-1110.
- Woody RW (1994) Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. *Eur. Biophys. J.* **23**:253-262.
- Woody RW (1996) *Theory of circular dichroism of proteins.* in: Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. (G.D. Fasman, Ed.), Plenum Press, New York, p. 25-67.
- Woody RW, Dunker AK (1996) *Aromatic and Cystine Side-Chain Circular Dichroism.* in: Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. (G.D. Fasman, Ed.), Plenum Press, New York, p. 109-157.
- Woolley GA, Dunn A, Wallace BA (1992) Gramicidin-lipid interactions induce specific tryptophan side-chain conformations. *Biochem. Soc. Trans.* **20**:864-867
- World Health Organization (2001) WHO Global strategy for containment of antimicrobial resistance. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2.
- World Health Organization (2012) The evolving threat of antimicrobial resistance – Options for action.
- World Health Organization (2013) Strategies for global surveillance of antimicrobial resistance. WHO/HSE/PED/2013.10358
- World Health Organization (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. WHO/HSE/PED/AIP/2014.2
- World Health Organization (2015) Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. WHO/HSE/PED/AIP/2015.1
- Yandek LE, Pokorny A, Flóren A, Knoelke K, Langel U, Almeida PF (2007) Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophys. J.* **92**:2434–2444.
- Yang JT (1996) *Remembrance of Things Past. A Career in Chiroptical Research.* in: Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. (G.D. Fasman, Ed.), Plenum Press, New York, p. 1-24.

- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OMZ, Oppenheim JJ (1999) β -Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**:525-528.
- Yang D, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O (2000a) LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J. Exp. Med.* **192**:1069-1074.
- Yang L, Weiss TM, Lehrer RI, Huang HW (2000b) Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys. J.* **79**:2002–2009
- Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW (2001) Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* **81**:1475-1485.
- Yang S-T, Shin SY, Kim Y-C, Kim Y, Hahm K-S, Kim JI (2002) Conformation-dependent antibiotic activity of tritrpticin, a cathelicidin-derived antimicrobial peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**:1044-1050.
- Yang S-T, Shin SY, Lee CW, Kim Y-C, Hahm K-S, Kim J.I. (2003) Selective cytotoxicity following Arg-to-Lys substitution in tritrpticin adopting a unique amphipathic turn structure. *FEBS Lett.* **540**:229-233.
- Yang S-T, Shin SY, HahmK-S, Kim JI (2006a) Design of perfectly symmetric Trp-rich peptides with potent and broad-spectrum antimicrobial activities. *Int. J. Antimicrob. Agents* **27**:325-330.
- Yang S-T, Shin SY, Hahm K-S, Kim JI (2006b) Different modes in antibiotic action of tritrpticin analogs, cathelicidin-derived Trp-rich and Pro/Arg-rich peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**:1580-1586.
- Yang S-T, Kim JI, Shin SY (2009) Effect of dimerization of a beta-turn antimicrobial peptide, PST13-RK, on antimicrobial activity and mammalian cell toxicity. *Biotechnol. Lett.* **31**:233-237.
- Yao J, Feher VA, Espejo BF, Reymond MT, Wright PE, Dyson HJ (1994) Stabilization of a Type VI Turn in a Family of Linear Peptides in Water Solution. *J. Mol. Biol.* **243**:736-753.
- Yau W-M, Wimley WC, Gawrisch K, White SH (1998) The preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry* **37**:14713-14718.
- Yu J, Mookherjee N, Wee K, Bowdish DME, Pistolic J, Li Y, Rehaume L, Hancock REW (2007) Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1 β , augments immune responses by multiple pathways. *J. Immunol.* **179**:7684-7691.
- Zaiou M, Gallo RL (2002) Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J. Mol. Med.* **80**:549-561.
- Zanetti M, Del Sal G, Storici P, Schneider C, Romeo D (1993) The cDNA of the neutrophil antibiotic Bac5 predicts a pro-sequence homologous to a cysteine proteinase inhibitor that is common to other neutrophil antibiotics. *J. Biol. Chem.* **268**:522-526.
- Zanetti M, Gennaro R, Romeo D (1995) Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* **374**:1-5.
- Zanetti M (2005) The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr. Issues Mol. Biol.* **7**:179-196.

- 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. USA* **84**:5449-5453.
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**:389–395.
- Zeya HI, Spitznagel JK (1963) Antibacterial and enzymic basic proteins from leukocyte lysosomes: separation and identification. *Science* **142**:1085–1087.
- Zhu WL, Lan H, Park Y, Yang S-T, Kim JI, Park I-S, You HJ, Lee JS, Park YS, Kim Y, Hahm K-S, Shin SY (2006) Effects of Pro→Peptoid residue substitution on cell selectivity and mechanism of antibacterial action of tritrypticin-amide antimicrobial peptide. *Biochemistry* **45**:13007-13017.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

José Carlos Bozelli Junior

Local e data de nascimento: São José do Rio Preto/SP Brasil – 22/09/1983.

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Junho 2011 –

Atualmente

Aluno de doutorado em Bioquímica

Instituto de Química, Universidade de São Paulo

Título: Interação do peptídeo de defesa do hospedeiro tritripticina (TRP3) e seus análogos com membranas modelo: efeitos na estrutura e dinâmica das membranas

Orientadora: Professora Dr^a Shirley Schreier

Bolsista FAPESP (Processo número 2011/50506-2)

Janeiro –

Dezembro 2014

Estágio de pesquisa no exterior

Departamento de Bioquímica e Ciências Biomédicas

McMaster University, Hamilton, ON, Canadá

Título: Inibição da liberação de citocromo c promovida por tBid pelo peptídeo antimicrobiano tritripticina: efeitos na estrutura da membrana.

Orientador: Professor Dr. Richard M. Epand

Bolsista FAPESP (BEPE 2013/19491-4)

Agosto 2008 –

Janeiro 2011

Mestrado em Bioquímica

Instituto de Química da Universidade de São Paulo

Título: Estudos espectroscópicos da interação entre o peptídeo de defesa do hospedeiro (PDH) tritripticina

(TRP3) e seu análogo paramagnético (TOAC⁰-TRP3) com membranas modelo.

Orientador: Professora Dr^a Shirley Schreier

Bolsista CNPq

Fevereiro 2002 –

Junho 2008

Bacharelado em Química

Instituto de Química da Universidade estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brasil

Título: Vidros titanoniobofosfato codopados com Erbó e Ytérbio para o preparo de guias planares de onda via troca-iônica.

Orientador: Professor Dr. Ítalo O. Mazali

Co-orientador: Professor Dr. Fernando A. Sigoli

3. ÁREAS DE ESPECIALIZAÇÃO

1. Biofísica
2. Bioquímica
3. Química de biomoléculas

4. PUBLICAÇÕES

1 – Sun Y, Filho PL, **Bozelli JC**, Carvalho J, Schreier S, Oliveira CL (2015) Unfolding and folding pathway of lysozyme induced by sodium dodecyl sulfate. *Soft Matter* Epub ahead of print.

2 – Manzini MC, Perez KR, Riske KA, **Bozelli JC**, Santos TL, da Silva MA, Saraiva GKV, Politi MJ, Valente AP, Almeida FCL, Chaimovich H, Rodrigues MA, Bemquerer MP, Schreier S, Cuccovia IM (2014) Peptide:lipid ratio and membrane surface charge determine the mechanism of action of the antimicrobial peptide BP100. Conformational and functional studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**:1985-1999.

3 – Lima FS, Cuccovia IM, Horinek D, Amaral LQ, Riske KA, Schreier S, Salinas RK, Bastos EL, Pires PAR, **Bozelli JC Jr**, Favaro DC, Rodrigues ACB, Dias LG, El Seoud AO, Chaimovich H (2013) Effect of counterions on the shape,

hydration, and degree of order at the interface of cationic micelles: the triflate case. *Langmuir* **29**:4193-4203.

4 – Schreier S, **Bozelli Jr JC**, Marín N, Vieira RF, Nakaie CR (2012) The spin label amino acid TOAC and its uses in studies of peptides: chemical, physicochemical, spectroscopic, and conformational aspects. *Biophys. Rev.* **4**:45-66.

5 – **Bozelli JC Jr**, Sasahara ET, Pinto MR, Nakaie CR, Schreier S (2012) Effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritrpticin to lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* **165**:365-373.

6 – **Bozelli JC Jr**, Nunes LAO, Sígoli FA, Mazali IO (2010) Erbium and ytterbium codoped titanoniobophosphate glasses for ion exchange-based planar waveguides. *J. Am. Cer. Soc.* **93**:2689-2692.

5. SUPERVISÃO DE ALUNOS DE IC

Abril –

Dezembro 2013

Aluna: Juliana D. R. de Carvalho

Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Título: Especificidade da natureza da cabeça polar carregada negativamente de lisofosfolipídios para a interação do peptídeo antimicrobiano tritrpticina e seus análogos com micelas: um estudo espectroscópico

Janeiro –

Dezembro 2010

Aluna: Estela T. Sasahara

Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Título: Interação do peptídeo antimicrobiano tritrpticina (TRP3) e seu análogo paramagnético (TOAC⁰-TRP3) com membranas modelo

Trabalho recebeu honra ao mérito no 18º SIICUSP

Agosto 2008 –

Junho 2009

Aluna: Edivania P. Bastos

Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Título: Estudos estruturais da histatina-5 e seu análogo (TOAC⁵-Histatina-5): interação com íons metálicos e sistemas biomiméticos.

6. EXPERIÊNCIA DIDÁTICA

Julho 2015 –

Atualmente

Monitoria

Disciplina: Bioquímica Experimental

Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Fevereiro –

Julho 2013

Monitoria

Disciplina: Bioquímica Experimental

Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Fevereiro –

Julho 2012

Monitoria

Disciplina: Bioquímica, estrutura de biomoléculas e metabolism.

Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

7. IDIOMAS

Português: língua nativa

Inglês: Fluente

Espanhol: Capacidade de comunicação básica