UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Ana Paula Felizatti

MEGs de *S. mansoni* contendo hélices anfipáticas: caracterização da interação com
bicamadas lipídicas

São Carlos

2017

ANA PAULA FELIZATTI

MEGs de *S. mansoni* contendo hélices anfipáticas: caracterização da interação com bicamadas lipídicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Drº. Ricardo DeMarco

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E
PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Felizatti, Ana Paula

MEGs de *S. mansoni* contendo hélices anfipáticas :
caracterização da interação com bicamadas lipídicas. /
Ana Paula Felizatti; orientador Ricardo De Marco -
versão corrigida -- São Carlos, 2017.
159 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. MEGs. 2. *Schistosoma Mansoni*. 3. Hélice
anfipática. 4. Interação com membranas. I. De Marco,
Ricardo, orient. II. Título.

Dedico aos persistentes “fazedores de
ciência” do Brasil

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador prof. Drº Ricardo DeMarco pela oportunidade de trabalhar neste projeto e pela orientação;

À prof.^a Dr^a Ana Paula Ulian Araújo, pela disponibilidade, atenção e todo o auxílio essencial para o término desta dissertação;

À Dr^a Ana Elisa Zeraik por todo auxílio, discussões, ideias e ensinamentos, que foram o embrião desse projeto.

À Dr^a Patrícia Suemi Kumagai pelas medidas de SRCD e pelas "consultorias" em OCD e Leakage;

Ao Drº Luis Guilherme Basso Mansor pelo profissionalismo, didática e discussões que foram de suma importância para o enriquecimento e conclusão deste trabalho;

Aos técnicos da Biofísica, Fernando, Andressa, Bel e Rafael, por tornar tudo possível. Em especial a Bel por me salvar sempre e ao Fernando pelas medidas de EPR;

A todos os funcionários do IFSC e USP em geral : biblioteca, secretarias, comissões, limpeza, restaurante universitário e etc, pela efetividade e competência;

Aos queridos da Jovem Guarda: Carla, Gabriel , Heline, Helô, Marcela, Mari, Naty Alves, Rafa, Raissa, Sina , Ton, por tornar os dias no laboratório mais sorridentes, e pelos almoços e cafés cheios de atualidades. Também agradeço a Débora Orcia, que foi uma grande professora.

Ao meu namorado Paulo, por me acompanhar às idas no laboratório de final de semana, por toda paciência, dedicação e compreensão para que eu pudesse terminar este mestrado, amo você;

Aos meus queridos amigos que eu sempre posso contar, em especial às minhas duas melhores de sempre, pra sempre: Rafa e Bob, e aos dois biotecos que sempre estão presentes para ouvir e discutir qualquer assunto aleatório a qualquer hora do dia : Pires e Duardo.

À minha família essencialmente: meus pais, Rosana e Valério, que tudo fizeram pela minha educação, e meu irmão Hugo pelas risadas e desabafos. Amo vocês, muito obrigada por tudo;

Às agencias de fomento,

E todos que de alguma forma, contribuíram para este momento.

“Quando o visitante sentou na areia da praia e disse: “Não há mais o que ver”, saiba que não era assim. O fim de uma viagem é apenas o começo de outra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já, ver na primavera o que se viu no verão, ver de dia o que se viu de noite, com o sol onde primeiramente a chuva caía, ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que mudou de lugar, a sombra que aqui não estava. É preciso voltar aos passos que foram dados, para repetir e para traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomeçar a viagem. Sempre.”

José Saramago

RESUMO

FELIZATTI, A. P. **MEGs de *S. mansoni* contendo hélices anfipáticas** : caracterização da interação com bicamadas lipídicas. 2017. 159 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

A classe de proteínas das MEGs (codificadas por genes de micro-éxon) presente em *Schistosoma mansoni*, ganhou evidência após a publicação do genoma deste parasita, principalmente por ser majoritariamente secretada, estando em contato direto com moléculas do hospedeiro, e possuir alta taxa de variação, o que poderia ter relação com um possível um mecanismo de evasão do sistema imune. Assim, foram escolhidas proteínas da classe das MEGs, todas com predição de hélice anfipática em sua estrutura, para investigação neste trabalho. Hélices anfipáticas são amplamente descritas na literatura como tendo alta propensão à interação com membranas celulares e interessantes funções fisiológicas. O objetivo deste projeto foi estudar a dinâmica de interação com membranas e estabelecer possíveis indícios de função biológica das proteínas MEG-24 e MEG-27 a partir de técnicas biofísicas. Optou-se por trabalhar com essas proteínas produzidas a partir da síntese química. Utilizando as técnicas de CD, Fluorescência e DLS, observou-se que a presença de miméticos de membrana induzem o enovelamento e o aumento da estabilidade térmica de MEG-27, e interferem no seu estado oligomérico. Para MEG-24, também foi observado aumento da estabilidade térmica e influência no estado oligomérico na presença de sistemas miméticos de membrana. Utilizando OCD, inferiu-se que MEG-27 possivelmente interage com a superfície da membrana, a passo que MEG-24 se insere na bicamada. Adicionalmente, ambas foram capazes de interferir na dinâmica de vesículas, conforme observado pelo ensaio de vazamento de calceína e DSC. Utilizando células de eritrócito e um modelo de membrana a partir dessas células (*ghosts*) foram realizados ensaios biológicos, DSC e EPR. A capacidade de MEG-24 e MEG-27 realizarem hemólise e hemoaglutinação, respectivamente, reitera o potencial de interação destas proteínas com membranas biológicas. Os resultados de DSC apontaram que ambas interferem nas transições das proteínas de membrana embebidas na bicamada de *ghosts* de eritrócitos. Por EPR, notou-se que MEG-27 tem maior efeito na dinâmica de lipídios em detrimento a MEG-24, possivelmente devido a um mecanismo de acomodação envolvendo domínios raft e a diferença de orientação de interação entre ambas as proteínas. A expressão de MEG-27 exclusivamente na região da glândula do esôfago em vermes adultos verificada por WISH, sugere que a mesma deva entrar em contato com células recém ingeridas pelo parasita. Não foi observada atividade antimicrobiana para ambas e não foram encontrados parceiros de interação proteínas pela técnica de Duplo-híbrido para MEG-27. Concluiu-se que os peptídeos estudados interagem com membranas biológicas, podendo ter papéis importantes na interface de interação parasito-hospedeiro.

Palavras chave: MEGs. *Schistosoma Mansoni*. Hélice anfipática. Interação com membranas.

ABSTRACT

FELIZATTI, A. P. **MEGs from *S. mansoni* containing amphipathic helices: characterization of the interaction with lipid bilayers.** 2017. 159 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

The class of MEGs proteins (coded by micro-exon genes) present in *Schistosoma mansoni*, drawn attention after the parasite genome publication. These proteins are mostly secreted, being in direct contact with host molecules and with a high rate of variation, which could be a mechanism of immune system evasion. Thus, proteins of the MEGs class, all with amphipathic prediction in their structure, were chosen for investigation in this work. Amphipathic helices are widely described in the literature with high propensity to interact with membranes and, consequently, probability of related biological function. The objective of this project was to study the interaction dynamics with membranes and to establish possible indications of biological function of MEG-24 and MEG-27 proteins from biophysical techniques. We chose to work with these proteins produced by chemical synthesis. Using CD, Fluorescence and DLS techniques, it was observed that the presence of membrane mimetics induced the folding and increased thermal stability of MEG-27, and interfered with its oligomeric state. For MEG-24, an increase in thermal stability and influence on the oligomeric state was also observed when in the presence of membrane mimetic systems. The results of OCD suggest that MEG-27 possibly interacts with the membrane surface, whereas MEG-24 is inserted into the bilayer. Both were able to interfere with vesicle dynamics, as observed by the Leakage and DSC tests. Using a more realistic membrane model from erythrocyte cells, biological assays, DSC and EPR were performed. The ability of MEG-24 and MEG-27 to perform hemolysis and hemagglutination, respectively, provides evidence of the potential for interaction of these proteins with biological membranes. The DSC results indicated that both interfere with the transitions of the membrane proteins embedded in the bilayer of erythrocyte ghosts. By EPR, it was noted that MEG-27 has a greater effect on lipid dynamics than MEG-24, possibly due to an accommodation mechanism involving raft domains and the difference in orientation of interaction between both proteins. The expression of MEG-27 exclusively in the region of the esophagus gland in adult worms verified by WISH suggests that it should come into contact with cells just ingested by the parasite. No antimicrobial activity was observed for both and no protein interaction partners were found by the MEG-27 double-hybrid technique. It was concluded that the studied peptides interact with biological membranes and may have important roles in the parasite-host interaction interface.

Keywords: MEGs. *Schistosoma Mansoni*. Amphipathic helix. Interaction with membranes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vermes adultos <i>S. mansoni</i>	23
Figura 2 – Distribuição das principais espécies de Schistosoma.	25
Figura 3 – Molusco invertebrado <i>B. glabrata</i>	25
Figura 4 – Fases de vida - <i>S. mansoni</i>	27
Figura 5 – Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	30
Figura 6 – Fibrose de Symmers em fígado de indivíduo acometido esquistossomose.	32
Figura 7 – Evolução do tegumento de <i>S.mansoni</i>	34
Figura 8 – Esquema representativo de tegumento de <i>S. mansoni</i>	35
Figura 9 – Glândula do esôfago de <i>S. mansoni</i>	36
Figura 10 – Estrutura de genes de micro éxons.	38
Figura 11 – Estudos publicados envolvendo MEGs.	41
Figura 12 – Diagrama da Reação em Cadeia da Polimerase.	47
Figura 13 – Esquematização de expressão heteróloga em <i>E.coli</i>	50
Figura 14 – Representação de uma vesícula do tipo SUV.....	52
Figura 15 – Represenção experimental: Vazamento de Calceína.....	55
Figura 16 – Esquematização do processo de formação de Ghost.	57
Figura 17 – Sistema de Duplo-Híbrido em leveduras.....	60
Figura 18 – Análise da presença de peptídeo sinal.	72
Figura 19 – Predição de estrutura secundária.	73
Figura 20 – Predição de hélice anfipática.	73
Figura 21 – Predição de domínio transmembrana.	74
Figura 22 – Amplificação dos insertos de interesse por PCR.....	75
Figura 23 – Purificação da proteína MEG-27.....	76
Figura 24 – Resultado de Espectrometria de Massas.	77
Figura 25 – Dicroísmo circular MEG-27.....	79
Figura 26 – Espectro de Dicroísmo Circular Síncrotron MEG-27.....	80
Figura 27 – Análise da estrutura secundaria da proteína MEG-24.	81
Figura 28 – Abundância de MEGs em diferentes regiões do verme adulto de <i>S. mansoni</i>	82
Figura 29 – Espectro de Dicroísmo Circular – MEG27 e micelas.....	83
Figura 30 – Espectro de Dicroísmo Circular – MEG24 e micelas.....	84
Figura 31 – Blueshift do Triptofano - MEG27 na presença de micelas de SDS.	85
Figura 32 – Espectro de CD: MEG27 com POPC.....	87
Figura 33 – Espectro de CD -MEG27 com POPG.	88
Figura 34 – Espectro de CD - MEG27 com SUVs.	89
Figura 35 - Espectro de CD -MEG27 com SUVs.....	90
Figura 36 - Estabilidade Térmica de MEG-27 por Dicroísmo Circular.	91
Figura 37 - Estabilidade Térmica de MEG-24 por Dicroísmo Circular.	92
Figura 38 - OCD: Orientação em modelos de membrana – MEG27.....	93

Figura 39 - OCD: Orientação em modelos de membrana –MEG24.	93
Figura 40 - Blueshift do Triptofano – MEG27.....	94
Figura 41 - Perfil de distribuição de DLS para vesículas de POPC.	96
Figura 42 - DLS de MEG24 com SUV.	97
Figura 43 - DLS de MEG27 com SUV.	97
Figura 44 - Purificação de vesículas encapsulada com calceína.	99
Figura 45 - Leakage causado por MEG24 em SUVs de POPC.....	101
Figura 46 - Leakage causado por MEG24 em SUVs de POPC com 20% POPG.	101
Figura 47 - Leakage causado por MEG27 em SUVs de POPC.....	102
Figura 48 - Leakage causado por MEG27 em SUVs de POPC com 20% de POPG.....	102
Figura 49 - Leakage causado por MEG24 em SUVs de POPC com 20% colesterol.	103
Figura 50 - Leakage causado por MEG27 em SUVs de POPC com 20% colesterol.	104
Figura 51 - Leakage causado por MEG24 em SUVs de POPC com 20% colesterol e 20% esfingomielina.	104
Figura 52 - Leakage causado por MEG27 em SUVs de POPC com 20% colesterol e 20% esfingomielina.	105
Figura 53 - Transições termotrópicas típicas para DPPC.....	106
Figura 54 - DSC da proteína MEG-27 com LUVs de DMPC.....	108
Figura 55 - DSC da proteína MEG-24 com LUVs de DMPC.....	108
Figura 56 - DSC com MEG-24 e MEG-27 na presença de LUVs de PCSMCOL.	109
Figura 57 - Modelo hipotético para interação de MEG-27 com LUVs.....	111
Figura 58 - Gráfico de hemólise para MEG-27.....	113
Figura 59 - Teste de hemoaglutinação com MEG-24 e 27.....	113
Figura 60 - Grumos observados nos poços a olho nu.....	114
Figura 61 - Aglomerações celulares causadas por MEG-27.	114
Figura 62 - Aglomerações celulares causadas por MEG-24.	114
Figura 63 - Teste com miméticos para verificar precipitação.	115
Figura 64 - Ensaio de proteção osmótica com MEG-24.	116
Figura 65 - Gráfico de proteção osmótica.	117
Figura 66 - Etapas da obtenção de Ghost de eritrócitos.	118
Figura 67 - Esquema de membrana de eritrócito com proteínas de membrana.	119
Figura 68 - Termograma de DSC para GHOST.....	120
Figura 69 - Scan de transições proteicas de DSC para Ghost.	120
Figura 70 - Termograma para ghost na presença de MEG-27.	123
Figura 71 - Termograma para ghost na presença de MEG-24.	123
Figura 72 - Estabilidade térmica do pico a 20°C.....	124
Figura 73 - Espectro de EPR para GHOST e MEG-27.....	127
Figura 74 - Espectro de EPR para GHOST e MEG-24.....	128
Figura 75 - WISH para MEG27.....	130
Figura 76 - Teste antimicrobiano com <i>E.coli</i> Amp ^r	131
Figura 77 - Testes iniciais do DH.....	132
Figura 78 - Teste do 3AT.....	132

Figura 79 - Testes DH.	133
Figura 80 - Modelo hipotético de interação entre membrana e MEG-27.	137
Figura 81 - Modelo hipotético de interação entre membrana e MEG-24.	137
Figura A1 - Espectros típicos de dicroísmo circular.	150
Figura A2 -Dicroísmo Circular Orientado.	151
Figura C1 -Gráfico típico hipotético de DSC.	156
Figura D1 - Marcadores de Spin.	158

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Famílias de MEGs descritas na literatura, com o número de membros de cada família e o local de expressão.	39
Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos sintetizados.	46
Tabela 3 – Composição dos tampões no preparo de <i>Ghost</i> de eritrócitos.	58
Tabela 4 – Linhagens e Vetores DH.	60
Tabela 5 – Meios de cultivo utilizados no ensaio de Duplo-híbrido.	61
Tabela 6 – Dados de DLS.	95
Tabela 7 – Concentração de peptídeo e vesículas para experimento de Leakage.	99
Tabela 8 – Vazamento causado pelos peptídeos MEG-24 e MEG-27 em diferentes composições. % VC= % vazamento de calceína.	100
Tabela 9 – Parâmetros termodinâmicos calculados dos termogramas de DSC em diferentes proporções molares de peptídeo: lipídio. Valores de ΔH , T_M e $T_{M1/2}$ calculados para cada composição utilizada.	110
Tabela 10 – Concentração de peptídeo e efeito observado em hemácias	121
Tabela 11 – Parâmetros de DSC calculados para GHOST e peptídeos.	124
Tabela 12 – Resultado de alinhamentos DH.	134

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	<i>Schistosoma mansoni</i> e a esquistossomose	24
1.1.1	Origem e disseminação.....	24
1.1.2	<i>S. mansoni</i> e importância no Brasil	25
1.1.3	Morfologia.....	26
1.1.3.1	Ovos, miracídeos e esporocistos	27
1.1.3.2	Cercárias	28
1.1.3.3	Esquistossômulos	28
1.1.3.4	Vermes adultos	29
1.1.4	Ciclo de vida.....	29
1.1.5	Aspectos patológicos	31
1.1.6	Diagnóstico e tratamento	32
1.1.7	Interação parasito-hospedeiro.....	33
1.2	Genômica de <i>S. mansoni</i> : do genoma às MEGs.....	36
2	OBJETIVOS	43
3	METODOLOGIA.....	45
3.1	Obtenção das proteínas de interesse	45
3.1.1	Expressão heteróloga.....	45
3.1.1.1	Extração de RNA total.....	45
3.1.1.2	Clonagem e transformação das células competentes.....	45
3.1.1.3	Expressão.....	47
3.1.1.4	Purificação.....	48
3.1.1.5	Espectrometria de Massas	48
3.1.2	Peptídeo sintético.....	50
3.1.2.1	Teste de solubilidade	50
3.2	Predições por bioinformática.....	51
3.3	Interação proteína-modelos de membrana: estudo da alteração da estrutura secundária peptídica	51
3.3.1	Preparo de vesículas – Small Unilamellar Vesicles (SUV) e micelas de surfactantes	51
3.3.2	Dicroísmo circular (CD), Dicroísmo Circular usando Radiação Síncrotron (SRCD) e Dicroísmo Circular Orientado (OCD)	52
3.3.3	Dinamic Light Scattering (DLS)	53
3.3.4	Fluorescência Intrínseca	53
3.4	Interação proteína-modelos de membrana: estudo da alteração da estrutura lipídica	54
3.4.1	Ensaio de Vazamento de calceína	54
3.4.2	Calorimetria Diferencial de Varredura – DSC	55
3.5	Interação peptídeo – eritrócito como modelo de membrana real.....	56
3.5.1	Hemólise, hemoaglutinação e ensaio de proteção osmótica para determinação da formação de aberturas na membrana.....	56
3.5.1.1	Hemólise e hemoaglutinação.....	56
3.5.1.2	Proteção osmótica e determinação da formação de aberturas	56
3.5.2	Ensaio com Ghost de eritrócito.....	57
3.5.2.1	Preparo.....	57

3.5.2.2	DSC	58
3.5.2.3	EPR.....	58
3.6	Busca de parceiros de interação proteicos	59
3.6.1	Duplo-híbrido	59
3.6.1.1	Linhagens, vetores e bibliotecas utilizadas.....	60
3.6.1.2	Soluções e meios utilizados	61
3.6.1.3	Clonagem.....	62
3.6.1.4	Transformação em levedura - pequena escala	62
3.6.1.5	Testes da β -galactosidase e 3-AT	62
3.6.1.6	<i>Matting</i> com a biblioteca universal humana	63
3.6.1.7	Detecção de parceiros de interação.....	64
3.6.1.8	Extração plasmidial de leveduras	65
3.6.1.9	Identificação dos parceiros de interação	65
3.7	Teste antimicrobiano	65
3.8	WISH – <i>Whole Amount In Situ Hybridization</i>	66
3.8.1	Soluções utilizadas	66
3.8.2	Preparo da sonda de RNA.....	67
3.8.3	Hibridização.....	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1	Predições de Bioinformática.....	71
4.2	Obtenção da proteína de interesse: Expressão heteróloga VS. Peptídeo Sintético..	74
4.2.1	Expressão heteróloga, purificação e espectrometria de massas.....	75
4.2.2	Peptídeo Sintético	77
4.2.3	Expressão Heteróloga e Peptídeo Sintético: análise do enovelamento.....	78
4.3	Considerações sobre a triagem de peptídeos: escolha da MEG-27 e inserção da MEG-24 no projeto.....	80
4.4	Interação proteína-modelos de membrana: estudo do efeito de interação no peptídeo	82
4.4.1	Dicroísmo Circular convencional.....	82
4.4.2	Fluorescência intrínseca.....	84
4.4.3	Vesículas de Fosfolipídios.....	85
4.4.3.1	Dicroísmo Circular	86
4.4.2.2.1	Efeito na Estabilidade Térmica – CD	90
4.4.2.2.2	Efeito na orientação – OCD.....	92
4.4.2.3	Fluorescência intrínseca.....	94
4.4.2.3	Espalhamento Dinâmico de Luz.....	95
4.5	Interação proteína-modelos de membrana: efeitos na estrutura lipídica	98
4.5.1	Ensaio de Vazamento de Calceína – <i>Leakage</i>	98
4.5.1	Ensaio de Calorimetria de Varredura – DSC.....	106
4.6	Ensaio – Interação peptídeo e modelos reais de célula humana	112
4.6.1	Células sanguíneas como modelos de membrana de mamíferos	112
4.6.1.1	Hemólise e hemoaglutinação	112
4.6.1.2	Determinação do tamanho da abertura durante hemólise	115
4.6.1.2	Ensaio com Ghost de Eritrócitos	117
4.6.1.3	DSC	118
4.6.1.5	EPR.....	124
4.7	Localização – WISH.....	129
4.8	Atividade antimicrobiana.....	131

4.9	Busca de parceiros de interação: duplo-híbrido: MEG-27	131
5	Conclusão e perspectivas futuras.....	135
	REFERÊNCIAS	139
	ANEXOS: Especificações teóricas das principais técnicas biofísicas utilizadas e sequencias primárias de MEG-24 e MEG-27.....	149
	ANEXO A - Dicroísmo circular.....	149
	ANEXO B - Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Ligth Scattering – DLS)...	153
	ANEXO C - Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimetry)	155
	ANEXO D - Ressonância paramagnética eletrônica (RPE)	157
	ANEXO E - Sequências Primárias MEG-27 e MEG-24	159

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN), fruto de mal gerenciamento de recursos d'água e políticas sanitárias, com maior importância. Estima-se que ocorram até 700 milhões de pessoas em áreas de risco¹ sendo a segunda DTN de maior importância e repercussão, atrás apenas da Malária. De caráter crônico e debilitante, a esquistossomose possui taxa de óbito de 500 mil pessoas por ano² com 258 milhões de pessoas necessitando tratamento.³ A enfermidade é disseminada majoritariamente em locais deficientes em saneamento básico, em populações que vivem próximas de conjuntos hídricos acometidos com caramujos infectados. Chamada popularmente de “Barriga d'água”, é presente em 78 países² e é causada por um parasito da espécie *Schistosoma spp*, (Figura 1) cujo mecanismo de permanência no hospedeiro é altamente especializado.

Figura 1 – Vermes adultos *S. mansoni*. Fêmea alojada no canal ginecóforo do macho.

Fonte: MICROBIOLOGY ...¹⁴¹

O parasito pode permanecer por décadas sem que o hospedeiro tenha reações imunológicas capazes de expulsar os vermes adultos, em decorrência de mecanismos moleculares não esclarecidos. A publicação do genoma de *S. mansoni*⁴ facilitou os estudos genéticos biomoleculares, e dentre os genes anotados, uma classe chamou atenção por apresentar ampla distribuição no genoma e características intrigantes: os genes de micro-éxons – *MEGs*. O presente trabalho visou estudar características de proteínas codificadas por essa classe de genes, as quais acredita-se estarem associadas à mecanismos de patogenicidade do parasito.

1.1 *SCHISTOSOMA MANSONI* E A ESQUISTOSSOMOSE

1.1.1 ORIGEM E DISSEMINAÇÃO

Do filo Platyhelminthes, classe Trematódea, a família *Schistosomatidae* contempla trematódeos parasitos de mamíferos, aves e alguns répteis. Os Schistosomatidae são divididos em duas subfamílias: *Bilharziellinae* e *Schistosomatinae*. A segunda subfamília, diferencia-se da primeira por apresentar dimorfismo sexual e parasitar espécies com importância médica direta (mamíferos/humanos), ao passo que a primeira, tem como alvo de parasitismo algumas espécies de aves e mamíferos silvestres ou domésticos.⁵ Considerada uma das doenças mais antigas da humanidade, sua origem tem por base suas características morfológicas e estudos biomoleculares e geográficos, devido à ausência de fósseis. As teorias a respeito de sua origem envolvem diversas hipóteses, sendo a de maior concordância entre autores aquela resultante do estudo de dados de biologia molecular que sugerem que um ancestral asiático insurgiu para a África, onde, passando por extensa exposição à radiação, tornou-se parasito exclusivo de moluscos planorbídeos. Este descendente retornou à Ásia, recolonizando-a e originando grupos de espécies que se diferenciavam das espécies nativas desta região por determinadas características, como por exemplo, ovos com espículas, típicas do grupo *S. mansoni*.⁶⁻⁷ Atualmente a esquistossomose atinge milhões de pessoas em todo o mundo⁸ e três espécies destacam-se pela abrangência: *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*⁹ (Figura 2). Os hospedeiros intermediários invertebrados, moluscos do tipo caramujo da espécie *Biomphalaria* spp., (Figura 3) tiveram papel principal na disseminação da esquistossomose. Análises filogenéticas indicam que a origem do molusco *Biomphalaria* deu-se na América, há cerca de 5 milhões de anos atrás, migrando para a África, originando os descendentes africanos da espécie, e então, servindo como hospedeiro intermediário e veículo disseminador das espécies de Schistosoma.¹⁰⁻¹¹

Figura 2 – Distribuição das principais espécies de *Schistosoma*. No Brasil, ocorre exclusivamente a espécie *S. mansoni*, representada em verde na figura.

Fonte: Adaptada de GRYSSELS et al.⁹

Figura 3 – Molusco invertebrado *B. glabrata*. Hospedeiro intermediário de *S. mansoni*.

Fonte: VETOR ...¹⁴²

1.1.2 *S. MANSONI* E IMPORTÂNCIA NO BRASIL

No Brasil, a esquistossomose ocorre exclusivamente devido à infecção por *S. mansoni*

¹² A parasitose é herança escravocrata, pela importação de mão de obra de países africanos. O hospedeiro intermediário presente no país possibilitou o estabelecimento e disseminação da doença. Foi em abril de 1908, que Pirajá da Silva identificou e reconheceu ovos espiculados de uma suposta nova espécie, que havia sido recentemente descrita como *S. mansoni*, em amostra biológica de um morador nativo da região nordeste. Anos depois, pesquisas de *Adolf Lutz*,

identificaram moluscos *B. glabrata* e *B. straminea* como hospedeiros intermediários responsáveis. Foram descritos também detalhes da doença e a morfologia do parasita em suas formas de vida e do molusco hospedeiro, dos aspectos sintomatológicos, patogênicos, terapêutico e profiláticos, assim como a ilustração anatômica e funcional dos organismos estudados^{7,13}.

Dos 12.491.280 óbitos registrados no Brasil entre 2000 e 2011, a esquistossomose foi identificada em 8.756 mortes, sendo desses óbitos, 6.319 (72.2%) como causa principal e 2.437 (27.8%) como causa associada. A doença concentra-se nos estados de Minas Gerais, Bahia, Alagoas e Sergipe, com uma pequena, mas importante parcela de casos no Rio de Janeiro, Espírito Santo e São Paulo. Ao todo, são 19 unidades federadas atingidas pela doença, de forma endêmica ou em focos.¹⁴ Apesar da categórica classificação da esquistossomose como uma doença relacionada a pobreza, os casos no município de São Paulo mostram que a doença ainda não foi totalmente extinta nos estados com maior índice de desenvolvimento no país. Nos anos 2000, em São Paulo, foram detectados 2 mil casos por ano, sendo cerca de 200 autóctones.¹⁵ De 1996 a 2007, o número de mortos em decorrência da esquistossomose no estado de São Paulo e no Brasil, ultrapassou os números relacionados a Dengue, Malária, e Leishmaniose Visceral, segundo dados do SIM/DATASUS/MS¹⁵ reiterando a importância de estudos do parasito e formas de combate. Em 2010, foram registrados no Sistema de Informações do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (SISPCE), Ministério da saúde e Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), respectivamente: 39.199 infectados, 300 internações e 495 óbitos. No Brasil, esses dados representam seis vezes o número de casos por malária. O custo total estimado do tratamento da esquistossomose no SUS foi de R\$1.010.278,79.¹⁶

1.1.3 MORFOLOGIA

A morfologia do parasito *S. mansoni* envolve 5 principais etapas de desenvolvimento: ovos, miracídios, cercárias, esquistossômulos e vermes adultos, representadas na (Figura 4).

Figura 4 – Fases de vida - *S. mansoni*. De vida livre, cercárias são origem a esquistossômulos quando infectam o hospedeiro vertebrado (mamífero), que se desenvolvem até a fase de vermes adultos. Fêmeas adultas depositam ovos, que são eliminados e quando eclodem em ambiente aquoso, liberam miracídios que infectam o hospedeiro invertebrado, e originam esporocistos que são novamente liberados na água.

Fonte: Adaptada de HAN et al.⁵¹

1.1.3.1 OVOS, MIRACÍDIOS E ESPOROCISTOS

Os ovos maduros possuem cerca de 150 µm de comprimento e 60 µm de diâmetro, de casca transparente, apresentando, caracteristicamente, um espinho em sua lateral. São formados por dois órgãos da fêmea: glândulas vitelinas e ovários e já possuem o sexo definido geneticamente (macho homozigoto ZZ, fêmea heterozigota ZW).¹⁷ Em seu interior ocorre um conjunto de células vitelínicas (em contato direto com a casca do ovo) com citoplasma rico em mitocôndrias, gorduras, vesículas e grânulos. O processo de fecundação e formação do ovo no interior da fêmea dura cerca de 8 semanas, período em que o ovo aumenta de tamanho sucessivamente. Após o amadurecimento completo dos ovos, quando o miracídio é formado em seu interior, estes são liberados por eclosão, usualmente em corpos d'água.^{6,18-20} Os miracídios são pequenas larvas ciliadas de vida livre com tempo de vida relativamente curto, que possuem forma cilíndrocônica, com cerca de 160-180 µm. Para garantir a sobrevivência, precisam infectar o hospedeiro intermediário em um período de algumas horas. Após o processo de infecção e penetração pelo tegumento do hospedeiro intermediário, os miracídios passam por alterações morfológicas, perdendo o epitélio ciliado e outras estruturas, se reorganizando e dando origem ao esporocisto primário, que após multiplicação, originará esporocistos secundários. Estes, conseguem romper a camada membranar dos esporocistos primários, e livres, iniciam o processo de migração pelo corpo do caramujo, se dirigindo ao hepatopâncreas e gônadas, onde as cercárias serão originadas de maneira assexuada.^{5,18,21}

1.1.3.2 CERCÁRIAS

As cercárias medem cerca de 500 µm total, incluindo uma cauda bifurcada medindo aproximadamente 230 µm. São larvas de vida livre liberadas pelo caramujo a partir de algumas semanas após a infecção, tendo a sobrevivência de cerca de 72 horas em água, precisando encontrar o hospedeiro definitivo para se estabelecer. O encontro do hospedeiro ocorre devido a perturbações na água, a um gradiente termal e químico emitidos pela pele ou pelo toque. As cercárias fixam-se fortemente, através de uma ventosa ventral, estimuladas por calor e aminoácidos específicos, rastejando, explorando e escolhendo o local apropriado para iniciar o processo penetrante, de acordo com a temperatura, concentração de lipídios e arginina, buscando sítios para penetração mais profunda.^{5,8,18,22} A penetração pela epiderme do hospedeiro ocorre devido a um mecanismo enzimático presente na região da cabeça das cercárias, onde estão presentes dez glândulas (30% do volume corporal) que liberam proteases capazes de hidrolisar proteínas da pele, permitindo a penetração, além da presença de uma cauda na extremidade do corpo, bifurcada, que também participa do processo de penetração, mecanicamente. Inicialmente, a cercária passa pelo estrato córneo, onde cada célula está envolta por um envelope resistente a agressões químicas e físicas. As cercárias passam por uma grande barreira epitelial formada por adesões celulares de junções ancorantes ou comunicantes, ultrapassando os estratos granuloso, espinhoso e basal, e em seguida, por uma segunda barreira, a zona da membrana basal, repleta de estruturas fibrosas e resistentes.^{5,18-19,23}

1.1.3.3 ESQUISTOSSÔMULOS

Devido a alterações de temperatura e osmolaridade, uma série de adaptações bioquímicas e morfológicas ocorrem, e nesta etapa, a cauda da cercária é perdida, dando origem aos esquistossômulos, além de alterações no tegumento. Estes, enfim chegam a derme, ultrapassando diversas estruturas glicoproteicas e fibrilas de colágeno, para então iniciar o processo de migração pelo sistema vascular sanguíneo. A saída da derme ocorre, na maioria das vezes, pelo sistema venoso, e mais raramente, por capilares venosos dilatados, linfáticos ou ambos. A rota de evasão para o pulmão ocorre primordialmente pelo sistema venoso, onde os esquistossômulos são carregados pelo fluxo sanguíneo até o coração, sendo distribuídos para os pulmões via artéria pulmonar, e por fim, para as veias do sistema porta-hepático. Transcorridos cerca de 25 dias no fígado, atingem a maturação por ganho de biomassa exponencial, e migram para os ramos terminais da veia mesentérica inferior, esta

parcela, que chega ao sistema porta intra-hepático e são capazes de amadurecer, formam vermes adultos.^{5,18-19,22-23}

1.1.3.4 VERMES ADULTOS

A forma de vida adulta, diferenciada em macho e fêmeas, medem em torno de 1cm e 1,5 cm respectivamente. Nutrem-se de hemácias do hospedeiro, e a hemoglobina liberada é essencial para o desenvolvimento, crescimento e reprodução dos parasitos. As diferenças morfológicas entre macho e fêmeas são facilmente visualizadas, sendo a fêmea mais fina, com tegumento liso e de coloração mais escura, ao passo que o macho possui tegumento recoberto de tubérculos e coloração esbranquiçada. A coloração mais escura da fêmea é consequência da maior taxa de ingestão e quebra de hemoglobina em hemazóina. O corpo do verme adulto contempla duas porções: anterior e posterior. No caso dos machos, na porção anterior, encontra-se a ventosa oral e ventral, e na posterior, o ginecóforo, local onde a fêmea permanece alojada para acasalamento, pela justaposição dos orifícios genitais feminino e masculino.^{5,18-19,22-23}

1.1.4 CICLO DE VIDA

A esquistossomose é vista como uma doença comportamental, causada pela exposição de indivíduos à infecção por cercárias, devido a indisponibilidade de água segura para uso doméstico ou profissional.²⁴ A infecção e transmissão ocorre pelo contato com águas contaminadas, e, devido à carência de informação ou cuidados com higiene, os indivíduos infectados contaminam novamente seu ambiente, liberando ovos nos dejetos. O ciclo - Figura 5 - é constituído em duas fases: sexuada no hospedeiro vertebrado definitivo (mamíferos), e assexuada no hospedeiro invertebrado intermediário – caramujos do gênero *Biomphalaria*. Descrito em 1915, por Leiper, o ciclo tem início com a deposição dos ovos em corpos d'água, que ao entrarem em contato com o ambiente aquoso, eclodem liberando a larva, denominada de miracídio – forma infectante para o hospedeiro invertebrado. Para garantir sua sobrevivência, a larva, de sexo definido, precisa encontrar um molusco, do gênero *Biomphalaria*. Ao entrar em contato com o caramujo e infectá-lo penetrando pelo hemocel, o miracídio se desenvolve e se transforma em esporocisto primários e secundários. Os esporocistos migram para as glândulas digestivas e hepatopâncreas do caramujo, onde dividem-se em vários ciclos por expansão clonal, produzindo milhares de cercárias. Estas, reconhecem estímulos externos fototérmicos e deixam o caramujo, permanecendo no meio aquático até a infecção do hospedeiro vertebrado.

Pelo emprego de enzimas proteolíticas, penetram em questão de minutos na pele de humanos e outros mamíferos, perdendo a cauda e passando para a fase de esquistossômulo.^{22,25} Em cada fase de vida no hospedeiro definitivo, o parasito utiliza de meios de escape do sistema imune, mas este contato inicial da cercária com a pele, que pode durar de 24 a 72 horas, pode causar um pequeno quadro de inflamação. Transcorridos três dias, atingem a corrente sanguínea, sendo levados aos pulmões pela pequena circulação. A partir do 8º dia de infecção, os vermes adultos, macho e fêmea vão para o sistema porta-hepático, e ali permanecem por cerca de 25 dias, quando amadurecem, acasalam-se e migram para as veias mesentéricas inferiores, onde fêmeas iniciam a postura de ovos. Os primeiros ovos podem ser encontrados nas fezes após cerca de 40/45 dias da infecção. O ciclo biológico se completa quando os ovos eclodem em contato com a água e liberam os miracídios, aptos a reiniciar o ciclo.^{22,25}

Figura 5 – Ciclo de vida do *S. mansoni*. Quadro superior indicando um possível mecanismo de interação parasito-hospedeiro baseando em modulação de receptores e mediadores do hospedeiro.

Fonte: Adaptada de DUNNE et al.²⁸

Alguns ovos, no entanto, podem alojar-se nos tecidos durante a migração, causando a resposta inflamatória responsável por grande parte da patogenia associada à esquistossomose.²⁶⁻

²⁷ O ciclo de vida de *S. mansoni* é bastante característico com modificações bioquímicas e morfológicas, incluindo a expressão de diferentes proteínas em determinados estágios de vida,

permitem a sobrevivência do parasito em diferentes ambientes – água e hospedeiros-, assegurando sua permanência em decorrência dessas adaptações evolutivas.²

1.1.5 ASPECTOS PATOLÓGICOS

Os aspectos patológicos da doença são relacionados diretamente com a fase de vida do parasito em seu hospedeiro definitivo. As fases evolutivas que migram pelo organismo definitivo – ovos, esquistossômulo, verme adultos – influenciam diretamente os mecanismos de interação com o hospedeiro e consequentemente os aspectos fisiológicos de respostas do organismo.⁹ Os ovos chegam aos tecidos e secretam enzimas proteolíticas que provocam reações de eosinófilos e formação de granulomas, que progressivamente formam depósitos fibrosos, principais fatores associados à morbidade. A severidade da doença está intrinsicamente relacionada com o número de vermes em razão da capacidade de deposição de ovos e respostas imunes individuais, pois a presença *per se* do parasito adulto não acarreta respostas significativas do sistema imune, resposta inflamatória não eficientes para combate da doença.^{9,28-30} Os vermes adultos possuem mecanismos eficazes de escape do sistema imune, e após a infecção e chegada no sistema sanguíneo, não é detectado pelo sistema imune, utilizando métodos ainda não esclarecidos de escape, alojando-se e propagando-se por décadas no hospedeiro. Os sintomas principais, portanto, são causados pelas reações aos ovos que não são expelidos nas fezes e se alojam nos tecidos do intestino ou fígado, causando inflamação e fibroses.^{28,31}

Em indivíduos expostos continuamente ao risco de infecção, a ocorrência de reinfecção pode causar anemia, má nutrição e dificuldades de aprendizado, principalmente em crianças. A doença é usualmente assintomática, sendo detectada ao acaso em exames de rotina. A forma sintomática, no entanto, pode ter início no momento da infecção devido á dermatite cercariana, com o aparecimento de micropápulas eritematosas no local da infecção. Com o passar dos meses e dependendo do número de parasitos – e consequente aumento da postura de ovos- e a sensibilidade do indivíduo alguns sintomas podem aparecer, como febre ou dores musculares. A cronicidade da doença é diretamente proporcional ao tempo que o parasito permanece no organismo, causando danos contínuos no fígado, intestino, baço, pulmões e bexiga.^{3,32-33} Os sinais da esquistossomose crônica incluem: dores abdominais, hepatomegalia, sangue nas fezes, taquicardia e hipotensão arterial. As complicações da doença podem incluir hipertensão pulmonar pela obstrução vascular pelos ovos ou vermes mortos, formas neurológicas, quando ovos alcançam o sistema nervoso, e outras complicações, dependentes do

local de alojamento dos ovos. A característica principal da doença é a extensão abdominal devido á inflamação do fígado e baço em decorrência de múltiplas fibroses resultantes de reações aos ovos, formando granulomas que acarretam na Fibrose de Symmers (Figura 6). Este sintoma, é popularmente conhecido como Barriga d'agua, designação popular da Esquistossomose.^{3,33-35}

Figura 6 – Fibrose de Symmers em fígado de indivíduo acometido esquistossomose. Detalhe superior esquerdo mostra a presença dos ovos no centro de um granuloma.

Fonte: SILVA et al.¹⁴³

1.1.6 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico é realizado por exames laboratoriais em fezes ou tecidos, pela busca de ovos ou antígenos do hospedeiro pelo método ELISA, respectivamente. A intensidade da doença é realizada pela quantificação de ovos por grama de fezes. Também podem ser realizados exames de biópsia retal hepática, pulmão, medula, pele, cérebros e outros tecidos com possíveis anormalidades. Um exame importante de diagnóstico por imagem envolve a ultrassonografia de abdômen, para observação de fibrose de Symmers.^{3,36}

O tratamento atual é medicamentoso com a administração de Praziquantel. Em alguns casos, considera-se procedimentos cirúrgicos. O praziquantel é amplamente utilizado e traz bons resultados, porém, devido a sua ampla disseminação existem preocupações em relação ao surgimento de cepas resistentes ao medicamento e da necessidade de busca por novos métodos de tratamento.³⁷⁻³⁹

1.1.7 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

A falta de resposta inflamatória eficiente perante o parasito adulto, caracteriza a esquistossomose como uma doença de caráter crônico-debilitante, onde o parasito permanece no hospedeiro por décadas, evadindo-se do sistema imune. A resposta imune ocorre, mas não é efetiva para proteger o hospedeiro contra a doença. As interações e relações fisiológicas entre o parasito e o hospedeiro não são totalmente esclarecidas, mas acredita-se que algumas moléculas secretadas pelo parasito interagem com o sistema imune do hospedeiro, influenciando esse processo. O parasito possui uma dependência clara das condições fisiológicas do ambiente fornecido pelo hospedeiro para seu desenvolvimento e maturação, manipulando e utilizando o sistema imune para auxiliar sua própria permanência e disseminação.^{9,29,38,40-41}

A resposta inicial perante à infecção ocorre durante as cinco primeiras semanas, com funcionamento de células primárias de defesa contra patógenos (Th1), seguindo de uma queda dessa resposta, concomitante ao aumento da resposta de células Th2, criando um meio com crescimento de eosinófilos, basófilos e mastócitos, por aproximadamente 12 semanas, quando essa resposta passa a regredir. A formação de células Th1 ou Th2 depende de antígenos e citocinas presentes no meio, e ambas geram respostas diferentes devido aos compostos produzidos. Há evidências que o parasito usufrua dos componentes liberados durante a resposta imune inicial e consiga modular essas respostas de acordo com suas necessidades. O bom funcionamento do sistema imune humano é crucial para que ocorra o transporte dos ovos pela veia porta até o lúmen do intestino, para conseguinte liberação pelas fezes. Camundongos com sistema imune suprimido, não apresentaram bons sinais de transmissão da doença, comprovando a importância do sistema imune nesse processo.^{28-29,32,42} O estado nutritivo e níveis hormonais do hospedeiro são também, importantes gargalos no desenvolvimento dos vermes adultos, pois indivíduos subnutridos ou com problemas hormonais apresentam formas menos desenvolvidas do parasito adulto, em termos de tamanho, diâmetro e outras características morfológicas, influenciando diretamente a presença e permanência efetiva do parasito.^{18,39,43} O longo processo evolutivo do esquistossoma levou a adaptações e dependência vital do hospedeiro específico, e atualmente, entende-se que o parasito é dependente de respostas imune do hospedeiro para garantir sua sobrevivência, embora não se compreenda totalmente o processo de modulação em uma interface de interação parasito-hospedeiro.^{44,28} Acredita-se que os mecanismos utilizados para evasão podem estar relacionados com mimetismo de moléculas, constante troca da superfície membranar, utilização de proteases ou

imunomoduladores, propriedades biofísicas do tegumento e modulação da expressão de antígenos de superfície.^{47,55} O tegumento do parasito tem como finalidade diversos papéis fisiológicos e de proteção biomolecular e física e é um dos principais componentes da interface de interação parasito-hospedeiro ⁴⁵⁻⁴⁷ juntamente com a glândula do esôfago, órgão secretor. ⁴⁸

A porção tegumentar está sob constante exposição ao sistema imune, secretando proteínas e moléculas. A região passa por processos de alteração das membranas tegumentares de modo contínuo, dificultando o estabelecimento de uma resposta imune eficiente e definitiva por parte do hospedeiro, tornando-se mais especializada e resistente nos vermes adultos em relação ao esquistossômulos e cercárias⁴⁹⁻⁵ (Figura 7). As proteínas e moléculas que são secretadas na superfície do tegumento estão em contato direto com a interface de interação parasito-hospedeiro, participando dos processos de modulação do sistema imune, além de processos de nutrição, excreção, recepção sensorial e transdução de sinal, homeostase, degradação de proteínas do hospedeiro e manipulação do reconhecimento de antígenos (Figura 8).⁵⁰⁻⁵⁵

Figura 7 – Evolução do tegumento de *S. mansoni*. Tegumento tornando-se mais especializado na forma adulta.
Fonte: Adaptada de JONES et al.⁴⁹

Figura 8 – Esquema representativo de tegumento de *S. mansoni*. As camadas tornam o tegumento um método primordial de proteção para o parasita, e também exerce função nas interações com o hospedeiro.

Fonte: Adaptada de UNIVERSITY...¹⁴⁴

Com arquitetura de superfície ainda mais especializada que o tegumento, a cavidade do esôfago (Figura 9A e B) possui papel crucial nesta interface de interação, participando também de mecanismos de evasão do sistema imune, além de processos nutritivos e secretórios.^{48,56-58} A cavidade é dividida entre a região posterior, que é circundada por células secretoras que formam a glândula do esôfago, responsável pela produção e secreção de proteínas e moléculas para o lúmen do esôfago, e a região anterior formada por células secretoras menores. As células do hospedeiro ingeridas pelo parasito – hemácias, leucócitos – ficam retidas na cavidade em constante interação com secreções do parasito. Os leucócitos ingeridos levam alguns minutos para serem degradados, sofrendo necrose em consequência da exposição aos produtos secretados na glândula. As células sanguíneas, por sua vez, atravessam a glândula posterior em um período de 4-5 segundos, quando ocorre liberação de hemoglobina. A glândula é de grande importância para a evasão do sistema imune, com a função de degradação de células do sistema imune, além da nutrição do parasito. Li e colaboradores sugerem que a interrupção da função secretória da glândula do esôfago em *S. japonicum* em decorrência da ação de anticorpos IgG contra antígenos do parasito, pode estar associado ao fenômeno de autocura de macaco *Rhesus* acometidos com a doença, o que torna a glândula uma potencial rota de estudos terapêuticos.^{56-57,59}

Figura 9 – Glândula do esôfago de *S. mansoni*. (A) Microscopia de glândula do esôfago. L=lúmen, LE=leucócitos, F=invaginações. (B) Esquema da glândula do esôfago.

Fonte: Adaptada de LI et al.⁴⁸

Os diferentes modos de modulação do sistema imune baseados em um mecanismo de interação parasito-hospedeiro, sugerem uma conjectura sobre como uma parasitose mantém-se por tanto tempo como uma doença de grande importância médica. A capacidade de adaptação do parasito perante o sistema imune, modulando e utilizando-se de moléculas por ele secretadas, pode ser colocada como uma das hipóteses sobre estabelecimento da infecção. Todavia os potenciais mecanismo de interação, bastante complexos e que envolveriam diferentes estágios de vida e secreção de diversas moléculas na interface de interação, sugerindo uma co-evolução do parasito e a espécie humana, ainda não foram completamente decifrados.²⁸ O reconhecimento e descoberta de mecanismos moduladores pode ser uma das chaves para o entendimento molecular do parasito e a patogenicidade por ele causada.

1.2 GENÔMICA DE *S. MANSONI*: DO GENOMA ÀS MEGs

O estudo da biologia molecular de *S. mansoni* vem sendo facilitado nos últimos anos como resultado de estudos do genoma e transcriptoma^{4,60-61} e o processo de anotação gênica. A publicação do genoma⁴ possibilita o acesso às sequências gênicas importantes para compreensão do processo infeccioso e mecanismos de escape imunológico do parasito.

O *S. mansoni* é diploide, $2n=16$, com sete com sete pares de cromossomos autossomos e um par sexual. As fêmeas são heterogaméticas (ZW), ao passo que os machos são homogaméticos (ZZ).¹⁷ O genoma do *S. mansoni* é bastante complexo, contemplando 363 milhões de pares de base - apenas 10 vezes menor que o genoma humano. Possui cerca de 20% de regiões derivadas de elementos de transposição, identificados em 72 famílias, sendo 15 % LTR e 5 % não-LTR transposons.⁴ Foram identificados um total de 11.809 genes codificando 13.197 transcritos, com tamanho médio de 4,7 kb, contendo grandes íntrons, sendo os íntrons

próximos a extremidades 5' menores aqueles à 3', característica inédita em eucariotos, e pequenos éxons.⁴ O tamanho médio de íntrons foi calculado em 1692 bp, aproximadamente 8 vezes maior que os éxons, cuja média foi de 217 bp.⁴ A publicação do genoma do *S. mansoni* permitiu a descrição de uma classe especial de genes que foi denominada *Micro-Exon Genes* (MEGs).^{4,62} Esses genes possuem características peculiares que os tornam promissores alvos de estudos. Antes da publicação do genoma, autores haviam notado a presença de genes com éxons curtos em *S. mansoni*. Davis et al, 1988 apresentou um gene composto por éxons curtos e em tandem, mas a descrição detalhada não prosseguiu devido à falta de um genoma referência para comparação e identificação, agravado pela falta de homologia com qualquer espécie.⁶²

Os MEGs são formados primordialmente por éxons pequenos, com 6 até 36 pb – múltiplos de 3 – organizados em tandem, majoritariamente simétricos, com raras exceções. Codificam pequenas proteínas (6-20 kDa) sem homologia com quaisquer espécies fora do gênero *Schistosoma*, ou domínios conservados. Normalmente possuem regiões N-terminais que indicam que os produtos proteicos de genes de micro-éxon, são secretados, e portanto, podem estar em contato direto com o hospedeiro na interface parasito-hospedeiro.⁶²

Genes de micro-éxons foram descritos anteriormente em outras espécies, mas de forma dispersa em genomas majoritariamente convencionais, compondo entre 0,5 % e 1,6 % dos éxons totais.⁶¹ Em *S. mansoni*, no entanto, são observados múltiplos genes de micro-éxons que correspondem em média a 75 % da região codificante das MEGs. Esses genes foram divididos em famílias, de acordo com as similaridades de sequência.^{4,62} A Figura 10 mostra as primeiras estruturas de genes da classe das MEGs publicadas, e atualmente, são conhecidas mais de 100 proteínas da classe divididas em 33 famílias.^{4,56,62,64} Os produtos de codificação desses genes diferem-se entre si estruturalmente e em tamanho, sendo que algumas podem ser consideradas peptídeos e outras, proteínas. Um fator que coloca as MEGs como alvos promissores para estudos visando terapias está ligado a ocorrência de níveis de expressão diferenciados em diferentes estágios de vida do parasito. As MEGs são expressas preferencialmente nos estágios intramamífero do parasita (Tabela 1), indicando uma possível característica funcional relacionada à permanência no hospedeiro definitivo.^{4,62} Ocorrem também diferenças de expressão entre machos e fêmeas em relação a algumas MEGs.⁶⁵ As pequenas proteínas codificadas por genes de *micro-éxon* apresentam, majoritariamente, um peptídeo sinal que indica secreção, colocando-as, possivelmente em contato direto com a interface de interação parasito-hospedeiro. Além disso, mecanismos de splicing alternativo, de alta ocorrência nesses genes, pode ser um meio de evasão sistema imune. Assim, o parasita produz várias isoformas

de uma mesma proteína, com éxons contendo o número de pares de base múltiplos de três (de 6 a 36 pb), sem a perda do quadro de leitura, gerando proteínas minimamente diferentes em questões de ponto isoelétrico e massa molecular, mas com provável manutenção de função e estrutura.⁶² A análise da evolução de membros de uma família de MEGs mostra que eventos de duplicação segmentais em conjunto com mutações pontuais são os prováveis responsáveis pelas diferenciações gênicas dentro das famílias, com eventuais perdas e ganhos e micro-éxons ao longo do tempo e mudanças nos sítios de *splicing*. Juntamente com outras proteínas envolvidas no escape do sistema imune, as MEGs também apresentam alta relação entre taxas de substituições não sinônimas e sinônimas (*dn/ds*), indicativo de baixa ocorrência de seleção purificadora ou em alguns casos ocorrência de seleção positiva de mutações.

Figura 10 – Estrutura de genes de micro éxons. Retângulos vermelhos representam micro-éxons múltiplos de três pares de base; os laranjas, micro-éxons não múltiplos de 3 pares de base. Retângulos azuis e verdes representam éxons longos múltiplos e não múltiplos de 3 pares de base, respectivamente. Retângulos cinzas representam éxons de iniciação ou terminação da região codificante; os pretos, UTRs. Triângulos representam éxons codificando para peptídeo sinal e diamantes, éxons codificando para hélice transmembrana.

Fonte: BERRIMAN. et al.⁹

Análises de bancos de transcritos, proteômicas e técnicas de imunolocalização, e hibridização *in situ* com sondas marcadas permitiram determinar que a transcrição das MEG

ocorre principalmente em estágios de vida intramamífero (Tabela 1), em secreções de ovos e esquistossômulos e no tegumento de vermes adultos e em glândulas secretórias.^{4,56-57,62,64,66-68}

Tabela 1 – Famílias de MEGs descritas na literatura, com o número de membros de cada família e o local de expressão. Locais de expressão cabeça=cauda são provavelmente MEGs presentes no tegumento. GB: germball, C: cercária, O: ovos, E: esquistossômulo, V: vermes (jovens e/ou adultos). **: Encontrada somente no estudo com vermes machos de Nawaratma.⁶⁸

Família	Membros	Transcrito					Região de Expressão	Referência
		GB	O	C	E	V		
MEG-1	7						Cabeça = cauda	4,62,64
MEG-2	23						-	4,62,66
MEG-3	4						-	4,62,66
MEG-4	2						Esôfago	4, 62, 57, 68,6
MEG-5	1						Cabeça = cauda	4, 62, 56
MEG-6	1						Cabeça= cauda, Esôfago**	4,62, 56, 68
MEG-7	1						-	4,62
MEG-8	4						Esôfago	4,62, 64, 56,68
MEG-9	9						Esôfago	4, 62, 56
MEG-10	11						Cauda, Esôfago**	4, 62, 56,68
MEG-11	11						Esôfago	4, 62, 56
MEG-12	12						Esôfago	4, 62, 56
MEG-13	13						Cabeça = cauda	4, 62, 56
MEG-14	15						Esôfago	4,62,64,56 71,68
MEG-15	1						Esôfago	4, 62, 56
MEG-16	1						Esôfago	4, 62, 56
MEG-17	19						Esôfago	4, 62, 56
MEG-18	5						-	4,62
MEG-19	1						Cabeça	64,56
MEG-20	1						Cabeça	64,56
MEG-21	1						-	64
MEG-22	1						Esôfago	64,56
MEG-23	1						-	64
MEG-24	1						Cabeça = cauda	64,56
MEG-25 a MEG-32.2	1						Cabeça	56

Fonte: Elaborada pela autora.

Os locais onde MEGs foram detectadas reiteram a hipótese de que estejam em contato direto com o sistema imune, sendo secretadas para o meio externo de acordo com o endereçamento do peptídeo sinal contido na sequência. A presença na interface de interação

pode estar relacionada com mecanismos de evasão, colocando as MEGs como potenciais participantes de modulação funcionais no hospedeiro. Desde a descrição e detalhamento, as proteínas codificadas por genes *de micro-éxon* trouxeram questões nada triviais em relação à biologia molecular de *S. mansoni*.^{56,62,64}

Dentre as MEGs atualmente descritas, algumas foram alvos de estudos estruturais e funcionais, além da localização. Os resultados principais publicados trazem apontamentos que corroboram para a hipótese de participação na modulação do hospedeiro definitivo:

- Da família MEG-4, as proteínas MEG-4.1 e MEG-4.2 apresentam forte associação com linfócitos observados na região do esôfago do parasito que se apresentam agregados como resultado de processos após sua ingestão; além disso a proteína MEG 4.1, também se encontra associada ao revestimento do esôfago, e anticorpos contra essa proteína em camundongos infectados reduziram o número médio de vermes adultos e ovos;^{57,69}
- Em *S.japonicum*, as proteínas sjMEG4.1, 8.2, 9, e 11, mostraram forte colocalização com anticorpos IgG, sendo potenciais alvos do organismo hospedeiro (Rhesus) para interrupção da função secretória da glândula e consequente auto-cura;⁵⁹
- A proteína de membrana MEG-14, intrinsecamente desordenada, é expressa na região do esôfago e possui a capacidade de interagir com a proteína S100A9, que possui atividade estimuladora de processos inflamatórios. A interação entre ambas resulta em alteração no enovelamento da MEG-14.⁷⁰⁻⁷¹

São poucos e recentes os estudos publicados que visam esclarecer a real função das proteínas de MEGs (Figura 11), porém, a hipótese de interação e modulação do sistema imune vem sendo fortalecida por grupos de pesquisas empenhados em entender o funcionamento destes genes. Algumas características da estrutura primária e secundária preditas por bioinformática fornecem alguns sinais de possíveis funções: proteínas com predição de intrinsecamente desordenada tem propensão a interagir com outras moléculas/proteínas; proteínas com predição de hélice anfipática possuem propensão de interação com membranas/lipídios; por exemplo. Porém, mais de um terço das proteínas de MEGs não possuem características estruturais claras que forneçam uma hipótese de sua funcionalidade, como citado anteriormente para hélices anfipáticas e proteínas desordenadas, por exemplo,⁵⁶ gerando uma lacuna de conhecimento sobre essas proteínas. Um maior entendimento sobre as

MEGs poderá trazer novos caminhos para o estudo dos mecanismos de evasão do *S. mansoni*, o que trará grandes avanços para o entendimento da esquistossomose a nível biomolecular.

Figura 11 – Estudos publicados envolvendo MEGs. Linha do tempo dos trabalhos publicados até 2016 relacionados à MEGs.

Fonte: Elaborada pela autora.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi a seleção de proteínas codificadas por genes de micro-éxons para estudos estruturais e funcionais, afim de estabelecer relações e determinar os mecanismos moleculares utilizados pelo parasita visando identificar possíveis funções biológicas.

Assim, os objetivos específicos foram:

- produção heteróloga e purificação de MEGs selecionadas;
- estudos biofísicos desses produtos visando sua caracterização (CD, OCD,SRCD, fluorescência intrínseca, DSC,EPR, DLS) ;
- avaliação da interação das MEGs com membranas e modelos de membrana;
- estudos de localização das proteínas estudadas em *Schistosoma mansoni* (*Whole Amount In Situ Hybridization*);
- estudos funcionais para busca de parceiros proteicos e ensaio de atividade antimicrobiana.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE

3.1.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA

A expressão heteróloga visou a obtenção das proteínas de interesse em vetor bacteriano (*E.coli*). Por se tratar de proteínas de tamanho pequeno, são consideradas peptídeos. A vantagem da expressão heteróloga é o baixo custo e rendimento satisfatório e, por esta razão, optou-se por esse sistema de expressão inicialmente.⁷²⁻⁷³ Os passos para a produção heteróloga estão esquematizados na Figura 13, ao fim dessa seção (3.1.1).

3.1.1.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

O RNA total foi extraído de aproximadamente 50 vermes adultos de *S. mansoni*, de ambos os sexos, com o reagente Tri-reagente®, de acordo com os procedimentos indicados pelo fabricante Sigma-Aldrich. Os vermes foram macerados na presença do reagente e submetidos a lavagens a 4 °C com clorofórmio ou isopropanol, separando a fase orgânica das demais por centrifugação. A precipitação do RNA total ocorreu pela adição de etanol 75 %. O precipitado formado foi deixado a temperatura ambiente, por cerca de 5 minutos para secagem (evaporação do etanol), antes da ressuspensão em água Milli-Q™-DEPC (*diethylpyrocarbonate*) 1 % estéril. O RNA obtido foi utilizado como molde para reação de transcrição reversa.

3.1.1.2 CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES

A clonagem da região codificante iniciou-se com o desenho dos oligonucleotídeos flanqueadores das regiões 5' *forward* e *reverse*, com cerca de 15 pb cada. A sequência total da proteína foi analisada afim de reconhecer a região da ORF e identificar o peptídeo sinal. A região codificante de interesse (excluindo o peptídeo sinal) foi utilizada como molde para o desenho dos *primers*, levando em consideração a % CG, temperatura de *melting*, possibilidade de formação de *hairpins* ou *self-dimers*, além de especificidade única com a sequência de interesse para garantir a qualidade do par de oligonucleotídeos, que foram encomendados em

empresa especializada. As sequências estão sumarizadas na Tabela 2, já com os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição desejadas inseridas.

Tabela 2 – Sequência dos oligonucleotídeos sintetizados. F: forward, R: reverse. Em azul estão as sequências para inserção de sítio de restrição.

MEG	Sequência dos oligonucleotídeos 5'→3'
MEG26 F	GGATCCCAAAAGGGAAATAGAGTTATCTTCAA
MEG26 R	CTCGAGCTAAGGGTAACAGCTTTTATTTTACC
MEG28 F	GGATCCCAAAATATTCGAAGTGCATTCAA
MEG28 R	CTCGAGTTATCCTAAAAGAACCATCCAAGTG
MEG10 F	GGATCCGGATCATCTGGGAGCACC
MEG10 R	CTCGAGATTTATCCATAGATGAAGTTTGAATT
MEG10.2 F	GGATCCGAAAATGATAATGCAGGAACAAC
MEG10.2 R	CTCGAGTTATAATGTTATACCGAAGAAGTTTCTG
MEG27 F	GGATCCATCAAATGGGTAAATTGCAGC
MEG27 R	CTCGAGTTAGAAGTTATGGAACAGGAAGCTAAA

Fonte: Elaborada pela autora

Posteriormente, o primer *reverse* de cada amplificação e uma alíquota do RNA extraído foram utilizados para reação de transcrição reversa com o kit *Supertranscript® III* (Invitrogen). Na reação foram adicionados 5 µg de RNA total, 2 µM de primer e tampão de anelamento (1x), adicionando água DEPEC até completar o volume da reação. Seguiu-se os passos indicados pelo fabricante do *kit*, desnaturando o RNA inicialmente a 65 °C por 5 minutos antes de adicionar a enzima Transcriptase Reversa e demais reagentes do *kit*. O procedimento foi realizado em termociclador *Mastercycler® Gradient* (Eppendorf). Após término do protocolo, utilizou-se o produto da reação, cDNA, para realização de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O diagrama da reação utilizada está esquematizado na Figura 12. O cDNA obtido foi ligado em vetor *pGEM®* (Promega) com auxílio da enzima T4 DNA Ligase (Promega), numa razão de 1:3 (mol:mol) de inserto e vetor.

O volume da reação de ligação foi utilizado para transformar células competentes de *E.coli* DH5α, previamente tratadas com solução de cloreto de cálcio.⁷⁴ A transformação por choque-térmico seguiu os seguintes parâmetros: 20 minutos de incubação em gelo, 90 segundos em banho-maria 42 °C, e 5 minutos em gelo. Após o choque, foram adicionados de 200 µL de meio Lysogenic-Broth¹ (LB) às células e deixadas a 37° C em agitador (200 rpm), por cerca de 1 hora, antes de serem plaqueadas em meio sólido LB na presença de 100 µg/ml de ampicilina, 1 mM de IPTG e 20 µg/mL de X-Gal, para seleção azul e branco colônias positivas.⁷⁴⁻⁷⁵ As colônias brancas foram inoculadas em meio líquido LB e crescidas *overnight*. No dia seguinte,

o inóculo foi submetido reação de extração de DNA com auxílio do kit *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega). O DNA extraído foi enviado para sequenciamento e, uma vez confirmada a sequência de interesse, o inserto foi subclonado em vetor de expressão pETSUMO (Invitrogen) para expressão em células competentes ROSETTA™(DE3). As células foram transformadas e plaqueadas conforme descrito para DH5 α , alterando-se o antibiótico para canamicina (50 mg/ml) e cloranfenicol (25 mg/ml). As colônias selecionadas foram cultivadas em meio LB *overnight*, submetidas posteriormente a extração de DNA e análise de restrição para confirmação da presença do inserto, observada em gel de agarose 1 %.

Figura 12 – Diagrama da Reação em Cadeia da Polimerase. Valores de temperatura e tempo utilizada no experimento. Temperatura variando em cada experimento (ΔT) para estabelecer melhor temperatura de amplificação.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.1.3 EXPRESSÃO

As colônias positivas de *E. coli* Rosetta(DE3) hospedando os vetores de expressão das MEGs, foram cultivadas em meio LB, com diferentes volumes para testes iniciais de expressão, e com gradiente de concentração de IPTG para teste de indução. Testaram-se cultivos de 10 mL, 50 mL, 100 mL e 1 L de meio LB, com concentrações de IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) de 100 mM a 500 mM. Um pré-cultivo *overnight* (pré-inóculo) foi adicionado em um volume maior de meio (1 mL de pré inóculo para 50 mL de meio novo) incubado a 37 °C, sob agitação de 250 rpm, até atingir a D.O entre 0,6 e 0,8 (medida a 600nm em espectrofotômetro), para então adicionar-se o indutor de expressão IPTG, de acordo com a concentração pré-estabelecida. A expressão foi realizada a 18 °C ou 20 °C, *overnight*, sob

agitação de 200 rpm. Para confirmar a expressão, alíquotas dos extratos brutos anteriores e posteriores à indução, foram analisadas em gel de poliacrilamida 15 % ou tricina 16 %.

3.1.1.4 PURIFICAÇÃO

A cultura após a expressão foi submetida ao processo de centrifugação, por 40 minutos, 11.000 g, 4 °C. O precipitado celular foi ressuspensionado em solução tampão com composições variadas. Testaram-se tampões Tris-HCl ou Fosfato de Sódio Monobásico/Dibásico com aditivos: cloreto de sódio, glicerol, detergentes, ou agentes redutores para avaliar a solubilidade. Após ressuspensão das células foi feita a lise, por meio de ultrassom (Sonic Dismembrator, Termo Fisher) com ciclos de 50''ON / 50''OFF, por 7 minutos. Os restos celulares foram separados do conteúdo intracelular solúvel por meio de centrifugação a 13.000 g, 30', 4 °C. Uma alíquota do precipitado foi reservada para análise por eletroforese. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro e, após, foi incubado por cerca de 2 horas, sob agitação suave, a 4 °C, em uma coluna de níquel Ni-NTA Superflow (QIAGEN), previamente equilibrada com 10 volumes de tampão. Coletou-se uma alíquota da solução referente a fração não-ligada (sem afinidade pela resina) para análise. Após isso, ocorreram sucessivas lavagens com tampão, num gradiente crescente de imidazol de 30 mM a 600 mM, afim de eluir a proteína purificada nas lavagens finais. Utilizou-se 10 volumes de tampão para as lavagens iniciais e 5 volumes para a eluição.

As frações da eluição foram analisadas por SDS-PAGE 15 % ou tricina 16 %, juntamente com frações das lavagens e pré-lavagem e, quando solúvel, a fração contendo a proteína de interesse foi concentrada (AMICON® Ultra, Merck-Millipore). Para remoção da proteína SUMO, utilizou-se a enzima SUMOPROTEASE (ULP), incubando-se 1U de enzima para cada 2 ug de proteína de fusão, a 4 °C, *overnight*. A digestão foi então aplicada em coluna de exclusão molecular Superdex 75 10/300 (GE Healthcare Life Science), acoplada ao equipamento ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Science) para purificação final.

3.1.1.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O protocolo para análise proteica a partir da extração de gel de eletroforese foi adaptado de Shevchenko.⁷⁶ As amostras foram preparadas para o equipamento Espectrômetro de Massas MicrOTOF-QII (Bruker Daltonics). O preparo foi dividido em etapas de:

Descoloração, Remoção do SDS, Desidratação, Alquilação, Hidratação e Desidratação, Tripsinização e Extração.

Recortou-se do gel de eletroforese (tricina 16 %) a banda referente ao tamanho da proteína de interesse, colocando-os em tubos de 1,5 mL. As bandas recortadas passaram pelo processo de *descoloração e remoção do SDS* com duas incubações (2 h e 1 h respectivamente) em 500 µL solução de metanol 50 % e ácido acético 2,5 %, em água purificada. Em seguida, as amostras foram desidratadas com 200 µL acetonitrila 100 % por 5 minutos. A solução de acetonitrila foi removida com auxílio de fluxo de ar e o processo de desidratação foi repetido. Incubou-se a amostra então com 30 µL de solução de DTT 10 µM, suficiente para cobrir os pedaços de gel, por 30 minutos. A solução de DTT foi substituída por 30 µL de solução de Iodoacetamida 50 mM/bicarbonato de amônio 100 mM, incubando-se pelo mesmo tempo, para etapa de *alquilação*.

Iniciou-se um ciclo duplo de *hidratação e desidratação* com lavagens com 200 µL de bicarbonato de amônio 100 mM, 10 minutos, e 200 µL de acetonitrila 100 %, 5 minutos. Para remoção das soluções, a amostra foi colocada no equipamento SpeedVac, por 5 minutos. Após a secagem, as amostras foram submetidas a *tripsinização*, adicionando uma proporção de 1:50 de tripsina: proteína, em banho de gelo, por 30'. Utilizou-se 30 µL de uma solução de tripsina a 20 ng/µL, por estimativa visual da concentração proteica contida na banda. A solução foi removida e incubada com 30 µL de bicarbonato de amônio 50mM durante 16 horas, 37° C.

Transcorrido o tempo de incubação, iniciou-se a etapa de *extração* da proteína dos pedaços de gel tratados. Para isso, utilizou-se 10 µL de uma solução de ácido fórmico 5%, 10 minutos, em temperatura ambiente. Coletou-se o sobrenadante, e este foi incubado por 10 minutos em novo tubo contendo 15 µL de ácido fórmico 5 %/acetonitrila 50%. Repetiu-se esse passo por duas vezes, juntando os sobrenadantes obtidos. Este, foi então concentrado até cerca de ~50 µL no equipamento SpeedVac™ Concentrator (SAVANT™) e então aplicado no equipamento de Espectrometria de Massas pela técnica responsável Dr^a Andressa Alves Pinto.

Figura 13 – Esquematização de expressão heteróloga em *E. coli*. Setas da mesma cor indicam o mesmo processo (indicado na caixa de texto também da mesma cor).

Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.2 PEPTÍDEO SINTÉTICO

A síntese de proteínas ou peptídeos é uma alternativa para pequenas sequências de difícil produção ou obtenção nativa. O processo permite a obtenção do peptídeo liofilizado, com a possibilidade de mutações ou modificações que facilitem sua manipulação e aumentem sua estabilidade, além da obtenção ser mais rápida e inteiramente controlada.⁷⁷⁻⁷⁸

A sequência dos peptídeos com difícil obtenção via expressão heteróloga (MEG-26, MEG-27 e MEG-28) devido à alta hidrofobicidade foram solicitadas à empresa especializada (Genscript, EUA). Os peptídeos referentes a MEG-26 e MEG-28, devido a problemas com a síntese, não foram entregues e a empresa sintetizou apenas o peptídeo da MEG-27.

3.1.2.1 TESTE DE SOLUBILIDADE

Amostras do peptídeo sintético MEG-27 foram solubilizadas em diferentes solventes e tampões, e também em água *MilliQ*. Testou-se os solventes orgânicos: acetonitrila, clorofórmio, metanol e TFE (trifluoroetanol), 100% ou diluídos em água, e os tampões Hepes 10 mM, Fosfato de Sódio 20 mM e Tris-HCl 20 mM, com e sem a adição de 10 mM de NaCl.

3.2 PREDIÇÕES POR BIOINFORMÁTICA

Predições de estrutura secundária foram realizadas pelos *softwares* PSIPRED Server (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), PREDICT PROTEIN (<https://www.predictprotein.org/getqueries>) e JPRED4 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4/>). A plataforma SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) forneceu predições sobre a região de peptídeo sinal. A análise realizada no software HELIQUEST (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py>) foi para diagramação dos resíduos e análise da hidrofobicidade, e no TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) para identificação de possíveis regiões transmembrana. Outras características foram preditas pela plataforma PROTPARAM (<http://web.expasy.org/protparam/>).

3.3 INTERAÇÃO PROTEÍNA-MODELOS DE MEMBRANA: ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA PEPTÍDICA

Modelos de membrana são estruturas compostas por lipídios característicos que são preparadas de modo a formarem vesículas que simulam o ambiente celular a nível membranar. Também podem ser formados por surfactantes que se organizam em micelas em ambientes aquosos. Foram utilizados POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), POPG (1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol), POPE (1-hexadecanoyl-2-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), Colesterol e Esfingomielina (N-octadecanoyl-D-erythro-sphingosylphosphorylcholine). Os lipídios utilizados nesta etapa foram adquiridos na empresa Avanti Lipids.

Como surfactantes de diferentes cargas, utilizou-se HPS (N-hexadecyl-N-N'-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate) como zwitteriônico, CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) como catiônico, e SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) como aniônico. Todos os surfactantes foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

3.3.1 PREPARO DE VESÍCULAS – SMALL UNILAMELLAR VESICLES (SUV) E MICELAS DE SURFACTANTES

Pequenas vesículas (SUVs – até 50 nm, Figura 14) de diferentes composições de fosfolipídios foram preparadas, dissolvendo os lipídios de interesse em clorofórmio, com

auxílio de seringa de vidro. Depositou-se 5 mg/mL da solução em tubos de vidro, que foi submetido a evaporação do solvente sob fluxo contínuo de nitrogênio, para formação de filme lipídico. Para assegurar a remoção total do solvente, as amostras foram levadas à secagem a vácuo no equipamento SpeedVac™ Concentrator (SAVANT™) por pelo menos 4 horas. Após a secagem, o filme foi ressuspensão em água (compatível com o peptídeo) para o processo de hidratação, que ocorreu *overnight* a 42 °C, resultando na formação de vesículas multilamelares. Para homogeneização da amostra e uniformização do tamanho vesículas, a solução foi submetida a 10 ciclos de congelamento e descongelamento. Em seguida, as amostras foram colocadas em gelo, em sonicator, por 5 ciclos de 50 segundos. Para atestar a formação das SUVs e homogeneidade da amostra, utilizou-se o equipamento de DLS. Foram utilizados lipídios puros ou em composições (POPC – 100 % ou em composições com POPG, COL e/ou SM).

Figura 14 – Representação de uma vesícula do tipo SUV. Cabeças hidrofílicas na cor laranja, caudas hidrofóbicas na cor azul, formando uma vesícula pequena unilamelar.

Fonte: Adaptada de TAJES et al. ¹⁴⁵

O preparo de micelas de surfactantes implica no preparo de soluções estoque concentradas a fim de utilizar concentrações acima da CMC (Concentração Crítica Micelar) para assegurar a formação de micelas. Para isto, basta dissolver o conteúdo em solução aquosa e quando necessário, encubar em banho-maria para completa dissolução dos agentes.

3.3.2 DICROÍSMO CIRCULAR (CD), DICROÍSMO CIRCULAR USANDO RADIAÇÃO SÍNCROTRON (SRCD) E DICROÍSMO CIRCULAR ORIENTADO (OCD)

O dicróismo circular é uma técnica de espectroscopia que utiliza luz polarizada para inferir dados sobre a estrutura da proteína.⁷⁹ A descrição técnica detalhada está na seção Anexo.

Os espectros de CD convencional e OCD deste trabalho foram obtidos nos equipamentos Jasco J-815 (Jasco Corporation) e Jasco J-720 (Jasco Corporation), respectivamente. Utilizou-se cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 mm, na faixa de 190 ou 195 até 260 nm, com velocidade de 50nm/min para as varreduras. Acoplado ao equipamento, um módulo Peltier (termoelétrico) foi utilizado para controle da temperatura. Espectros de SRCD foram obtidos nas instalações do Instituto de Armazenamento em Anel (ISA) (Aarhus, Dinamarca), sob os cuidados da pesquisadora Dr^a Patrícia Suemy Kumagai, em colaboração com a Dr^a Bonnie A. Wallace (University of London).

Para CD convencional em solução, as amostras foram preparadas utilizando o peptídeo solubilizado em água na presença ou não de surfactantes e SUVs. Utilizou-se uma concentração de peptídeo de 15 μ M, surfactantes acima da concentração micelar crítica, e SUVs na proporção de 1:50 e 1:100 (peptídeo: lipídio).

O preparo das amostras para CD orientado incluiu a solubilização mútua de lipídio e peptídeos em TFE e depósito da mistura em placa circular de quartzo. A placa foi seca em câmara dessecadora sob vácuo, por no mínimo 2 horas para evaporação total do solvente. Em seguida, mantidas por 16 horas em câmara de hidratação, na presença de solução saturada de sais de potássio para reidratação e reorganização dos lipídios e peptídeo. Utilizou-se uma concentração de peptídeo de 15 μ M e lipídios na proporção de 1:50 (peptídeo: lipídio).

Em todas as medidas, o espectro relativo ao branco foi subtraído do espectro final. A análise e tratamento dos dados foi realizada no *software* CDtolls e Origin 8.0.

3.3.3 DINAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)

As medidas de DLS foram realizadas no equipamento Zetasizer uV (Malvern), em cubeta de quartzo de 2 μ L, com tempo de equilíbrio de temperatura de 120 segundos. Neste trabalho, a técnica foi utilizada para analisar estados de oligomerização/agregação de proteínas, na presença e ausência de vesículas fosfolipídicas.

3.3.4 FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA

Alterações no espectro de emissão de fluorescência intrínseca de uma proteína podem indicar alterações no ambiente dos aminoácidos-sonda, podendo-se inferir, portanto, se a conformação está sendo alterada em diferentes condições.⁸⁰ Neste experimento, o espectro de

emissão de fluorescência intrínseca foi obtido por monitoramento do triptofano, que se encontra na região da hélice do peptídeo MEG-27, sob diferentes condições.

As medidas foram realizadas no equipamento K2-Fluorometer (ISS-IL) em cubeta de quartzo com pulga magnética, sob agitação. Excitou-se o triptofano com 295 nm, monitorando o espectro de emissão de 300 a 500 nm. Utilizou-se 2 μ M de MEG-27 em água, e com proporções de 1:100 de surfactante (SDS) ou SUVs (POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) / POPC 20% POPG (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol*)/ POPC: 20 % colesterol/ POPC 20 % esfingomielina, 20 % colesterol.)

3.4 INTERAÇÃO PROTEÍNA-MODELOS DE MEMBRANA: ESTUDO DA ALTERAÇÃO DA ESTRUTURA LIPÍDICA

3.4.1 ENSAIO DE VAZAMENTO DE CALCEÍNA

O ensaio de vazamento consiste no monitoramento do extravasamento de uma substância excitável e a alteração no comprimento de onda detectado devido a essa liberação em solução, em função de perturbações da membrana que circundava o composto, permitindo seu extravasamento. A medida foi realizada no equipamento K2-Fluorometer (ISS-IL). A esquematização do experimento está na Figura 15.

O ensaio utilizou o cromóforo calceína, solubilizado em tampão HEPES 7,4 e 100 mM de NaCl para hidratação do filme lipídico de interesse. Os passos para produção das vesículas, seguiram os indicados no tópico 2.7, com exceção da etapa de sonicação. Após a hidratação com solução contendo calceína, a solução foi submetida à etapa de congelamento e descongelamento e passagem por extrusor contendo uma membrana com poros de 0,2 μ M, para modelar as vesículas e homogeneizar a amostra, formando *Large Unilamellar Vesicles* (LUVs, >100 nm), atestadas pelo equipamento DLS. Após a extrusão, a amostra foi colocada em uma coluna para separação do excesso de solução e as vesículas com calceína encapsuladas. A coluna com resina *Sephadex G-50* (*Sigma Aldrich*) foi montada em suporte de vidro, com 20 cm x 1 cm. Após eluição, foi realizada a dosagem dos fosfatos para inferir a concentração final de vesículas. Para isso, incubou-se 10 μ L da amostra de vesículas com 200 μ L de ácido perclórico, por 2 horas, 150 °C em tubos específicos de vidro, tampados com pequenas esferas de vidro. Após duas horas, adicionou-se 1 mL de Molibdato de Amônio e 125 μ L de ácido ascórbico para início da reação calorimétrica. Os tubos foram agitados e deixados por 15 minutos a 100 °C. A medida da absorbância ocorreu no leitor de placa a 812 nm, e utilizou-se

uma curva padrão de 1 mM de NaPO_4^- para inferir a concentração da amostra de interesse. Alíquotas da amostra foram transferidas para cubeta de quartzo de 2 mL com pulga magnética sob agitação e, após 60 segundos, injetou-se solução contendo o peptídeo para análise da indução do extravasamento da calceína. Como controle de lise total, utilizou-se o detergente Triton X100, em solução 10 %. O experimento foi realizado por 600 segundos, com injeção do Triton, aos 400 ou 500 segundos. O comprimento de onda de excitação foi 495 nm e emissão 520 nm para calceína. Foram testadas diferentes proporções de peptídeo:lipídio (1:20, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000 e 1:5000). Os dados de fluorescência foram plotados em função da taxa de lise vs tempo, utilizando 10 % de Triton_x100 como parâmetro para 100 % de lise

Figura 15 - Representação experimental: Vazamento de Calceína. LUVs preparadas na presença de solução saturada de calceína e purificadas em resina de exclusão molecular, seguido de quantificação dos fosfatos. Ocorre a excitação do fluoróforo e perturbação da membrana para que ocorra o vazamento. O comprimento de onda de emissão da calceína diferencia-se nas duas condições: encapsulada pela membrana e livre (em solução), sendo utilizada como uma sonda para monitorar a integridade da membrana.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.2 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA – DSC

O experimento de Calorimetria Diferencial de Varredura permite a detecção de alterações termotrópicas de um sistema. Pode ser utilizado com membranas lipídicas, proteínas e outras biomoléculas.⁸¹ A descrição técnica detalhada pode ser consultada nos anexos.

O experimento de DSC foi realizado no microcalorímetro VP-DSC (MicroCal). As amostras foram preparadas incubando LUVs de DMPC com os peptídeos de interesse. A taxa de fornecimento de calor às amostras foi de 30 °C/h para LUVs. O intervalo de temperatura utilizado foi de 6 a 45 °C. As amostras foram deixadas sob vácuo e agitação por aproximadamente 20 minutos para remoção de bolhas e ar da amostra. O período de equilíbrio

(6 °C) foi de 15 minutos antes do início da varredura. O número de termogramas foi estabelecido quando se atingiu a reprodutibilidade das varreduras. A análise dos termogramas foi realizada no *software* MicroCal, desenvolvido dentro do software Origin 7.0.

3.5 INTERAÇÃO PEPTÍDEO – ERITRÓCITO COMO MODELO DE MEMBRANA REAL

3.5.1 HEMÓLISE, HEMOAGLUTINAÇÃO E ENSAIO DE PROTEÇÃO OSMÓTICA PARA DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ABERTURAS NA MEMBRANA

A observação de interação entre compostos e hemácias é simples, pois pode-se notar a olho nu alterações no comportamento de sedimentação e coloração das células sanguíneas. Com auxílio de microscópio e leitor de comprimentos de onda, pudemos inferir informações mais confiáveis, observando os detalhes celulares e espectros de absorção da hemoglobina respectivamente.

3.5.1.1 HEMÓLISE E HEMOAGLUTINAÇÃO

Para este experimento, coletou-se sangue de um doador voluntário saudável, diluindo-se o conteúdo (1 mL) na proporção 1:10 em solução salina PBS pH 7,4. A amostra foi centrifugada, a 4 °C, 3500 g, para remoção do plasma e separação das hemácias. A centrifugação e troca do sobrenadante foram realizadas sucessivas vezes até o sobrenadante retornar transparente após a centrifugação. O precipitado de hemácias foi então diluído a 1 % em PBS e aliqotado (100 µL) em microplacas de 96 poços, na presença de controles e do peptídeo, em concentração de 0,5 µM a 5 µM. Como controle negativo, utilizou-se água, e para controle positivo de hemólise utilizou-se 10 µL de Triton 10 %. A placa foi vedada com papel de parafina plástica e incubada a 37 °C por cerca de 1 hora. Para análise da hemoaglutinação, observou-se a formação de aglomerados, a olho nu ou com auxílio de microscópio. Para hemólise, detectou-se a hemoglobina no sobrenadante sob comprimento de onda 409 nm em espectrofotômetro acoplado a leitor de microplaca SpectraMaxi3x (Molecular Devices).

3.5.1.2 PROTEÇÃO OSMÓTICA E DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE ABERTURAS

O ensaio de proteção osmótica utiliza o composto PEG (polietilenoglicol) de massas médias diferentes, para inferir efeitos sobre a hemólise de acordo com o tamanho do protetor

utilizado. A presença do composto oferece uma proteção osmótica que impede a liberação da hemoglobina se o poro de liberação for suficientemente vedado. O método se baseia no estudo de Lorenzón e colaboradores, 2012.¹⁴⁶ Utilizou-se 30 mM de PEGs com os tamanhos médios relativos de 0,9 nm, 1,2 nm, 1,5 nm, 2,4 nm, 3 nm e 5 nm de diâmetro, para determinar o tamanho médio dos poros formados na membrana. Alíquotas de 100 μ L de uma solução de hemácias a 1 % foram adicionadas a 100 μ L da solução de PEGs em PBS pH 7,4, e em seguida, incubou-se com o peptídeo de interesse sob a concentração 2xHC 50 %, previamente determinada. Incubou-se por 1 h, a 37 °C, e mediu-se a porcentagem de liberação de hemoglobina no sobrenadante em leitor de placa, sob comprimento de onda de 409 nm.

3.5.2 ENSAIOS COM *GHOST* DE ERITRÓCITO

Os chamados “*ghosts* de eritrócitos” são hemácias cujo interior foi removido em um processo de perturbação e reestruturação da membrana externa e são amplamente utilizados como modelos autênticos de membrana biológica.⁸²

3.5.2.1 PREPARO

O protocolo utilizado foi adaptado de An et al.⁸². A Figura 16 resume o processo.

Figura 16 – Esquemática do processo de formação de Ghost. Hemácias íntegras são submetidas a rompimento osmótico para liberação do conteúdo intracelular, e depois, retornam ao equilíbrio osmótico reestruturando-se. As setas indicam processo de centrifugação, remoção de sobrenadante e troca de solução.

Fonte : Elaborada pela autora.

Cerca de 20 mL de sangue de doador saudável foi tratado conforme descrito no item 3.5.1, com sucessivas lavagens com tampão isotônico salino (tampão A), até o sobrenadante tornar-se transparente. O processo de liberação do conteúdo intracelular ocorreu por diversas centrifugações (20.000 g, 40') na presença de tampão hipotônico (tampão B). As lavagens com

este tampão foram realizadas até o precipitado celular ficar esbranquiçado, indicando que a remoção da hemoglobina e conteúdo intracelular. Para reestruturar a membrana (resselando), 1 volume de tampão C foi adicionado para restaurar a isotonicidade do meio. Para isso, incubou-se por 40 minutos a 37 °C. A composição dos tampões utilizados está na Tabela 3. A formação de vesículas foi confirmada por microscopia.

Tabela 3 – Composição dos tampões no preparo de *Ghost* de eritrócitos.

Soluções : Preparo de Ghost de Eritrócitos	
<i>Nome</i>	<i>Composição</i>
A	150 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
B	5 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4
C	1,5 M KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4

Fonte: Adaptada de HAN et al.⁸²

3.5.2.2 DSC

O ensaio de DSC com *Ghost* de eritrócitos permite a observação dos componentes proteicos da membrana pelas temperaturas de transição de fase. A quantificação baseou-se na massa de precipitado obtida após as lavagens e resselagem, assegurando a uniformidade das alíquotas.

O experimento de DSC foi realizado no microcalorímetro VP-DSC (MicroCal). As amostras foram preparadas incubando os *ghosts* com os peptídeos de interesse a 37 °C por 20 minutos antes da utilização. A taxa de fornecimento de calor às amostras foi de 60 °C/h. O intervalo de temperatura utilizado foi de 15 a 90 °C. As amostras foram deixadas sob vácuo e agitação por aproximadamente 5 minutos para remoção de bolhas de ar. O período de equilíbrio (a 15 °C) foi de 10 minutos antes do início da varredura.

3.5.2.3 EPR

Alíquotas de *ghost* foram precipitadas e ressuspensas na presença de marcadores de spin. Imediatamente após ressuspensão, os *ghosts* foram diluídos na presença de PBS para assegurar a resselagem. Após diluição, foram centrifugadas por 5 minutos a 15000 g e o sobrenadante foi substituído por nova solução de PBS. Esse procedimento de lavagem foi

repetido 4 vezes para remoção do excesso de marcador de spin. Utilizou-se três marcadores: DPPTC para monitoramento da região polar (superfície); 5PC e 16-PC para região hidrofóbica interna.

As amostras foram inseridas em capilares que foram selados e centrifugados. O equipamento (Varian, modelo E109) foi operado pelo físico responsável Dr. José Fernando de Lima.

3.6 BUSCA DE PARCEIROS DE INTERAÇÃO PROTEICOS

3.6.1 DUPLO-HÍBRIDO

A técnica de duplo-híbrido por leveduras tem por objetivo a busca de parceiros de interação para uma proteína específica. Consiste em transformar leveduras com um plasmídeo (carregando genes-repórteres) contendo o inserto da proteína a qual deseja-se encontrar um parceiro de interação. A proteína de interesse funciona como uma “isca” contra uma biblioteca de “presas” contendo potenciais parceiros de interação.⁸³ Utiliza-se leveduras cotransformadas com as proteínas isca e presa, e a técnica se baseia na separação física de um fator de transcrição AD-BD, onde a proteína isca é expressa fusionada ao domínio BD, e as presas, fusionadas ao domínio AD. Caso ocorra aproximação e ligação covalente desses domínios em resposta a interação isca-presa, o fator passa a ser funcional e capaz de ativar a transcrição de genes repórter. A presa pode ser uma proteína conhecida (duplo-híbrido dirigido) ou contida em uma biblioteca generalizada de uma espécie específica, por exemplo.⁸³⁻⁸⁵

A Figura 17 resume o funcionamento da técnica.

Figura 17 – Sistema de Duplo-Híbrido em leveduras. As proteínas alvo e parceira de ligação, ao interagirem, ativam a transcrição do gene repórter do sistema.

Fonte: Adaptada de ALBERTS et al. ⁸⁶

3.6.1.1 LINHAGENS, VETORES E BIBLIOTECAS UTILIZADAS

Utilizou-se a linhagem L40 para transformação do plasmídeo pBTM116K contendo a sequência da proteína-isca. Para a busca de parceiros de interação foi utilizada uma biblioteca comercial humana, normalizada (Normalized Yeast Two-Hybrid cDNA Library—Normalized Mate & Plate, Clontech), que utiliza a linhagem Y187, com clones de proteínas-presa no vetor PGAD-T7. As características das linhagens e vetores estão na Tabela 4.

Tabela 4 – Linhagens e Vetores DH.

Linhagens				
Levedura	Genoma	Gene Repórter	Marcação de transformação	Referência
Y187	MAT α ura3-52 his3 ade2-101 trp1 leu2	HIS3 LacZ	LEU-	87
	gal4 Δ met- gal80 Δ URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ			
L40	MAT α leu2 his3 trp1 ade2 GAL4 gal80 LYS2:::(lexAop)4-HIS3 URA3:::(lexAop)s-lacZ	HIS3 LacZ	TRP-	88

(continuação)

(continua)

Vetores				
Plasmídeo	Seleção	ISCA/PRESA	Domínio AD/BD	Referência
pBTM116k	Canamicina ^r	ISCA	BD	89
Pgad-T7	Ampicilina ^r	PRESA	AD	90

Fonte: Elaborada pela autora.

3.6.1.2 SOLUÇÕES E MEIOS UTILIZADOS

Os meios de cultivo e seletivos estão sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5 – Meios de cultivo utilizados no ensaio de Duplo-híbrido.

Meios de cultivo (valores em g/L)*								
	Extrato de levedura	Peptona	Glicose	YNB	Adenina	Leucina	Histidina	Triptofano
YPD	10	20	20	-	-	-	-	-
YPDA**	10	20	20	-	0,12	-	-	-
SD-W	-	-	20	6,7	0,02	0,1	0,02	-
SD-L	-	-	20	6,7	0,02	-	0,02	0,02
SD-WH	-	-	20	6,7	0,02	0,1	-	-
SD-WL	-	-	20	6,7	0,02	-	0,02	-
SD-								
WHL	-	-	20	6,7	0,02	-	-	-

* Para meios sólidos, adiciona-se 18 g/L de Ágar.

** Para 2xYPDA, dobrar a concentração; para 0,5xYPDA, diminuir pela metade. Quando necessário, adicionou-se 50 µg/ml de canamicina.

Fonte: Elaborada pela autora.

As soluções abaixo descritas foram utilizadas ao decorrer do experimento.

- **Tampão de Transformação** : 1340 µL PEG 50%, 200 µL Acetato de Lítio (LiAc) 2 M, 200 µL TE 10X, 200 µL DTT 1M
 - TE 10x: 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 7,5
- **Tampão Z** : 16,1 g/L Na₂HPO₄.7H₂O (Fosfato de sódio dibásico), 5,5 g/L NaH₂PO₄.H₂O (Fosfato de sódio monobásico), 0,75 g/L KCl (Cloreto de Potássio), 0,246 g/L MgSO₄.7H₂O (Sulfato de magnésio) pH 7,0
- **Solução P2**: 1,2 M Sorbitol, 0,1 M Na₂HPO₄ pH 7,4, 5 mg/mL Liticase

- **Solução P3:** 4,2 M Cloridrato de Guanidida (Gu-HCl), 0,9 M Acetato de Potássio, pH 4,8
- **Solução P4:** 4,2 Gu-HCl, 30 % isopropanol
- **Solução P5:** 10 mM Tris-HCl, 80 % etanol, pH 7,5
- **Tampão de Eluição:** 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,5

3.6.1.3 CLONAGEM

A sequência para proteína MEG-27 (isca) foi amplificada na presença de primers específicos para adição de sítios de restrição compatíveis com o vetor PBTM116K. Foram inseridos sítios para *EcoRI* e *SAL*. A clonagem seguiu o protocolo padrão de transformação, seleção de colônias em placa LB-ágar, pré-inóculo e extração do DNA por lise alcalina. Foram transformadas no vetor pBTM116K os controles e a sequência da proteína de interesse. A amostra extraída foi sequenciada para confirmação da sequência e a correta fase de leitura.

3.6.1.4 TRANSFORMAÇÃO EM LEVEDURA - PEQUENA ESCALA

Uma alíquota da linhagem L40 foi estriada em placa de Petri contendo meio YPD (1 % extrato de levedura, 2 % peptona, 2 % glicose) sólido, onde cresceu por 4 dias, a 30 °C, adquirindo uma coloração rosada. Uma colônia isolada foi inoculada em 50 mL de meio YPD líquido, por 24 horas, a 200 rpm. Foram separadas alíquotas de 1 mL para cada transformação necessária, incluindo os controles. Essas alíquotas foram centrifugadas por 3 minutos, 800 g, e o pellet de células foi ressuspendido em 200 µL de tampão de transformação e deixados em gelo durante o preparo dos DNAs para utilização na transformação das leveduras. Misturou-se em cada DNA (~500 ng), 100 µg de DNA de esperma de salmão desnaturado previamente (10 minutos, 95 °C), e em seguida, adicionou-se esta mistura às células de levedura. Os tubos foram levados ao banho-maria, 45 °C, por 40 minutos, com homogeneizações a cada 10 minutos. Após isso, as alíquotas foram plaqueadas em meio SD-W sólido, para seleção dos transformantes. As colônias cresceram a 30 °C, por 4 dias.

3.6.1.5 TESTES DA B-GALACTOSIDASE E 3-AT

Para evitar falsos-positivos, testamos a ativação dos genes-reporteres *HIS3* e *lacZ*, com as colônias transformadas apenas com o DNA-isca. O gene *HIS3* codifica uma enzima que

desencadeia a biossíntese de histidina, aminoácido importante para o crescimento das leveduras. O gene *LacZ*, por sua vez, codifica a enzima β -galactosidase, que, quando disponível, cliva o composto X-gal, produzindo uma coloração azulada característica.⁸⁵

Inicialmente, para o teste da β -galactosidase (teste da ativação do gene *lac-Z* na presença de leveduras expressando apenas a proteína isca) recortamos papéis-filtro no formato da placa contendo as colônias frescas, pressionando-o contra as colônias até assegurar que aderiram ao papel, que foi imerso em nitrogênio líquido por 5 minutos para induzir a lise da membrana das leveduras. Umedeceu-se outro papel-filtro, com o mesmo formato, em *tampão* Z, contendo 83,5 μ L de X-gal (20 mg/mL) e 13,5 μ L B-mercaptoetanol (14,4 M). O papel contendo as colônias lisadas após contato com nitrogênio, foi colocado sobre o papel umedecido em *tampão* (colônias voltadas para cima), até o controle positivo apresentar coloração azulada. Os papéis foram separados e deixados em estufa para secagem.

O teste do gene *HIS3* envolve a retirada de histidina do meio de cultivo, assegurando que apenas os transformantes com ativação do gene *HIS3* sobrevivam sem prejuízos de crescimento. Para evitar falsos-positivos de colônias que escapam ao stress seletivo da falta de histidina, adiciona-se o composto 3-AT no meio, que compete com o produto do gene *HIS3*. Assim, apenas colônias com expressão suficientemente forte de *HIS3* para superar o efeito do 3-AT (interações fortes) serão selecionadas. Nesta etapa inicial, são adicionadas concentrações gradativas do composto para definir qual a menor concentração de 3-AT que permite o crescimento das colônias transformadas em até 3mm após 7 dias de cultivo. Testou-se as concentrações 0, 5, 10, 20, 40 e 50 mM, em meio SD-WH, e o crescimento das colônias foi monitorado durante 7 dias, 30 °C.

3.6.1.6 *MATting* COM A BIBLIOTECA UNIVERSAL HUMANA

Após atestar que as colônias transformadas de L40 não auto ativavam o sistema, e definir a concentração mínima de 3-AT, iniciou-se a etapa da busca por parceiros de interação. A técnica utilizada consiste em cultivar leveduras MAT α com MAT a , haploides com pequenas diferenças sexuais entre si, para gerar zigotos que carregam ambos os plasmídeos isca e presa. Leveduras MAT a e MAT α secretam feromônios (fator a e fator α respectivamente) para atração de parceiros (fator a atrai fator α e reciprocamente), que ao detectarem a presença dos fatores, se projetam na direção do parceiro e dão origem a diploides a/α , que carregam o genoma de ambos os parentais.^{85,90}

Para isso, inoculamos uma colônia correspondente a isca em 50 mL de SD-W, a 200 rpm, 30 °C, por 20 horas. O cultivo foi centrifugado por 5 minutos, 1000 g, descartando-se o sobrenadante. O pellet celular foi ressuspensionado em 5 mL de meio ($\sim 1 \times 10^8$ cél/ml) SD-W. Uma alíquota de 1 mL da biblioteca universal humana foi descongelada a 25 °C, por imersão em água. Uma pequena alíquota foi separada para plaqueamento em meio SD-L para testar a qualidade da biblioteca para seleção do plasmídeo. Combinou-se então, o restante da biblioteca com 5 mL do cultivo-isca, em um frasco estéril de 2 L. Adicionou-se a esse frasco, 45 mL de 2xYPDA com 50 µg/mL de canamicina. Encubou-se por 24 horas, com leve agitação (70 rpm), 30 °C.

Após 24 horas, uma alíquota foi analisada em microscópio para observação de zigotos (estrutura usualmente com lóbulos representando os parentais haploides e um proeminente referente ao zigoto diploide). Confirmando-se a presença dos zigotos, o cultivo pode ser centrifugado (1000 g, 10 minutos). Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspensionado em 10 mL de 0,5xYPDA/Can. A ressuspensão foi então dividida em alíquotas iguais e plaqueadas em meio SD-W (seleção isca haploide), SD-L (seleção biblioteca haploide) e SD-WL com (seleção dos recombinantes diploides totais), e SD-WLH com 3-AT (seleção recombinante diploides que crescem em meio sem histidina, na presença de 3-AT). Cerca de 500 µL de ressuspensão foram utilizados para plaquear, e separou-se uma alíquota, que foi diluída na proporção de 1:1000 para contabilizar o *screen* total de clones da biblioteca. Encubou-se por 5 dias, 30 °C.

Para contabilizar o *screen* total de clones, utilizou-se os cálculos indicados pelo fabricante da biblioteca, onde multiplica-se o volume total de ressuspensão em 0,5xYPDA/Can pelo volume plaqueado e pelo número de clones crescidos na diluição, multiplicado por 10 e pelo fator de diluição (1000). É imperativo que um mínimo de 1 milhão de clones participe do *screening*.

3.6.1.7 DETECÇÃO DE PARCEIROS DE INTERAÇÃO

As colônias que cresceram mais de 3 mm em meio SD-WLH na presença de 3-AT (Teste HIS3) foram selecionadas para o Teste da β -galactosidase. As colônias foram cultivadas em meio SD-L, SD-W e SD-WL e testadas em cada condição. As colônias que auto ativaram o sistema apenas em meio SD-WL (ou seja, somente quando em conjunto - isca/presa) foram selecionadas como potenciais interações e preparadas para extração plasmidial.

3.6.1.8 EXTRAÇÃO PLASMIDIAL DE LEVEDURAS

As colônias selecionadas foram cultivadas em meio SD-L líquido, por 24 h, 30 °C. Utilizou-se o método descrito por Singh et al.,⁹¹ que utiliza um Kit de extração de DNA em bactéria para extração em leveduras, com algumas modificações. Inicialmente, o pellet celular foi obtido via centrifugação (2000 g, 5 minutos, 4 °C) e ressuspenso em 200 µL de solução *Cell Resuspension Solution*, do kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Após vortexar, adicionou-se 100 µL de solução P2. Encubou-se por ceca de 1 hora, a 37 °C com agitações ocasionais. Em seguida, adicionou-se 300 µL da solução *Cell Lysis Solution*, também do kit Wizard® Plus, incubando-se por 10 minutos, a 22 °C, ou até torna-se viscoso. Adicionou-se então, 420 µL de solução P3 em gelo, por 30 minutos. Após esse tempo, centrifugou-se a mistura, coletando-se o sobrenadante, que foi aplicado nas colunas do kit para separação do DNA. Aplicou-se 500 µL da solução P4, e centrifugou-se por 1 minuto, 16000 rpm. A segunda lavagem foi realizada com a solução P5. Após centrifugação, a coluna foi transferida para um tubo limpo por 1 minutos a temperatura ambiente para evaporar álcool residual, passando então, para a etapa de eluição. O tampão de foi adicionado na coluna, e encubou-se por 5 minutos, a 65 °C. Enfim, centrifugou-se por 1 minuto, coletando a fração liberada no tubo.

3.6.1.9 IDENTIFICAÇÃO DOS PARCEIROS DE INTERAÇÃO

Com o DNA plasmidial obtido, transformou-se em *E.coli DH5α* para aumentar a concentração de DNA. As colônias transformadas foram utilizadas pra pré-inóculo, e extração alcalina pelo kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). O DNA resultante foi enviado para sequenciamento. O resultado do sequenciamento foi analisado com auxílio da plataforma BLAST/NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.7 TESTE ANTIMICROBIANO

Um inóculo de *E.coli* resistente a ampicilina foi plaqueado em meio LB-sólido. Recortou-se papéis filtro permeáveis estéreis em círculos com diâmetro de ~1 cm. Uma solução de MEG-24 e outra de MEG-27 foi utilizada para umedecer regiões do papel filtro. Foi utilizada uma solução a 50µM, e utilizou-se 15 µL para umedecer a região do papel. Como controle positivo, adicionou-se antibiótico em outra região do papel, e como negativo, papel embebido

em água. Os papéis foram dispostos delicadamente sobre o meio sólido contendo o inóculo de *E.coli* e a placa foi vedada. O crescimento ocorreu *overnight* e observou-se a formação de halos.

3.8 WISH – *WHOLE AMOUNT IN SITU HIBRIDIZATION*

O protocolo para WISH é dividido em quatro dias, podendo ser estendido dependendo da fase de revelação. A técnica utiliza uma sonda de RNA marcada com Dioxigenina que se hibridiza com o RNAm no local onde a proteína de interesse será possivelmente expressa. A adição de anticorpos conjugados a Fosfatase Alcalina que reconhecem a Dioxigenina, permite a clivagem de compostos que são responsáveis pela visualização do local de expressão.⁹² O protocolo utilizado neste trabalho foi baseado nos trabalhos de Dillon.⁹²

3.8.1 SOLUÇÕES UTILIZADAS

A lista descreve a composição das principais soluções utilizadas e citadas ao longo deste protocolo.

- **PBST:** PBS pH 7,4 + 0,3 % triton X-100 (Para 1 Litro de solução de PBS: 8 g de NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄)
- **Proteinase-K:** 2 ug/mL de proteinase K com 0,1 % de SDS em 1xPBST.
- **Pré-hibridização (PH) e Hibridização (H)**
 - **Solução PH:** 50 % de formamida deionizada, 5x SSC (Saline Sodium Citrate, Thermo Fisher), 1 mg/mL RNA de levedura (RNA de *Torula*, Sigma Aldrich), 1 % Tween 20
 - **Solução H:** PH + Sonda de RNA (0,5-1 ug)
- **MABT:** 100 mM de ácido maléico, 150 mM de NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5
- **Solução de bloqueio / anticorpo**
 - **Bloqueio:** 10 % soro fetal bovino em MABT
 - **Anticorpo:** Anticorpo Anti-Dioxigenina (Sigma Aldrich) diluído 1:4000 em solução de bloqueio
- **Tampão AP:** 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1 % Tween 20 (diluído em solução 10 % de PVA – polivinilalcool)

- **Solução de revelação:** Tampão AP , 450 µg/mL de NBT (4-Nitro blue tetrazolium chloride, Roche), 175 µg/mL BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Roche)

3.8.2 PREPARO DA SONDA DE RNA

Todo o material para o preparo da sonda deve ser RNase *free*. A sonda de RNA foi preparada a partir de DNA previamente sequenciado e purificado, clonado no vetor PGEM. Para reação de linearização do vetor, observou-se o alinhamento do DNA disponível com banco de dados (BLAST/NCBI) para definir a enzima de restrição e polimerase a serem utilizadas. Para alinhamentos “plus-plus” utiliza-se a enzima SP6 polimerase (alinhamento com a fita *foward*), e para alinhamento “plus-minus” (alinhamento com a fita *reverse*) utiliza-se a enzima T7 polimerase. No primeiro caso, utiliza-se enzimas de restrição à esquerda do sítio de clonagem, e no segundo caso, utiliza-se enzimas de restrição à direita do sítio de clonagem.

Utilizou-se então, para reação de linearização, cerca de 500 µg de DNA encubado com 5 µL de tampão da enzima de restrição e 2 µL de enzima de restrição, com água DEPEC até completar o volume de 50 µL. Neste experimento, utilizamos a enzima NCO. A reação foi deixada overnight, 37 °C. No dia seguinte, adicionou-se 50 µL de água DEPEC para aumentar o volume de trabalho antes de iniciar a etapa de extração do DNA. Adicionou-se um volume de Fenol/Clorofórmio (Sigma Aldrich), centrifugando a 10.000 rpm, por 10', TA. A fase aquosa foi transferida para novo tubo RNase free, onde adicionou-se 1 volume de clorofórmio. Centrifugou-se por 5 minutos, AT, 10.000 rpm. Repetiu-se a adição de clorofórmio e centrifugação por mais uma vez, e então, transferiu-se a fase aquosa para novo tubo. Neste tubo, adicionou-se 1/10 do volume de Acetato de Sódio estéril 3 M e 1 volume de isopropanol. Encubou-se por 30 minutos, a -20 °C. Centrifugou-se então, a 4 °C, 10.000 rpm, 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O pellet de DNA formado foi lavado com etanol 75 % gelado, adicionando-se 500 µL e centrifugando na condição anterior. O etanol foi removido, e o pellet foi cuidadosamente deixado dentro de Capela de Exaustão (estéril e RNase free) com o tubo aberto para secagem do etanol. Quando seco, ressuspendeu-se o DNA (molde para sonda) em 20 µL de água DEPEC estéril.

Para a reação de transcrição e síntese da sonda de RNA, utilizou-se o kit Riboprobe® in vitro (PROMEGA), conforme especificado pelo fabricante: utilizou-se 10 µL do tampão 5x *transcription Buffer*, 5 µL de DTT 100mM, 40 U de RNazin (inibidor de RNase, PROMEGA), 20 U de polimerase (SP6), 2 µg de DNA molde linearizado, e nucleotídeos: dATP, dCTP ,

dGTP, 2 mM de dUTP e 0,5 mM dUTP-dioxigenina completando-se o volume para 50 µl com água DEPEC estéril. A reação foi encubada a 37 °C, por 4 horas, quando se adicionou mais 1 µL da enzima polimerase, deixando então, overnight. No outro dia, para remoção do DNA molde, adicionou-se 1 µL de DNase I (Promega), encubando-se 20 minutos, a 37 °C, seguido de 5 minutos a 80 °C. A integridade da sonda, assim como ausência de DNA, foi analisada por gel de agarose 1 % (RNase free).

A última etapa do protocolo de preparo da sonda consiste na precipitação da mesma, para concentrar e trocar o tampão de trabalho, além de remover os outros componentes presentes na amostra. Para isso, adiciona-se 50 µL de água DEPEC, e 50 µL de solução Cloreto de Lítio 7,5 M e 50 mM de EDTA, encubando-se overnight, 20 °C. A solução foi centrifugada no outro dia, a 12.000 g, 4 °C, 15 minutos. (Quando não houve formação de precipitado, adicionou-se 400 µL de etanol 100 %, encubando-se por mais 4 horas a 20 °C.) O sobrenadante foi cuidadosamente removido, e o pellet lavado com etanol 70 %, por duas vezes. Ao término da centrifugação da etapa da lavagem, o tubo foi deixado aberto para secagem do etanol, e então, o pellet foi ressuspensionado em água DEPEC (20 µL) e quantificado. Para assegurar a integridade da sonda após precipitação, analisou-se a banda presente em gel de agarose (RNase free) 2 %.

3.8.3 HIBRIDIZAÇÃO

A primeira etapa consiste no preparo dos vermes adultos. Os vermes são colocados sob luz constante para que fêmeas e machos se separem sob o stress luminoso. Uma vez separados, as fêmeas são colocadas em peróxido de hidrogênio 6 % em metanol para descoloração, sob luz constante. Os machos não necessitam dessa etapa.

No segundo dia, os vermes são preparados para receber a sonda de hibridização, passando por diversas lavagens até a encubação com a solução de hibridização. A primeira série de lavagem é realizada com uma solução 100 % metanol. Em seguida, troca-se a solução por PBST com 50 % metanol, e por fim, troca-se por PBST, 100 %. Após os 10 minutos de encubação, a solução é trocada por uma solução de Proteínase K por cerca de 20 minutos, TA. Posteriormente, a solução é substituída por PFA (Paraformaldeído) 4 %, por 10 minutos, TA. A solução foi removida por duas lavagens seguidas com PBST. Iniciou-se então, uma série de lavagens para adição da *solução de hibridização*. Foram realizadas três lavagens: a primeira, com 50 % de solução PH, 10 minutos, TA. A segunda, substituiu-se por uma solução PH 100 %,

por 2 horas, 56 °C, para então, adicionar a Solução de Hibridização (solução H) aquecida (85 °C, 5 minutos) e encubar por 20 horas, 56 °C, sob agitação.

No terceiro dia, os vermes são preparados para receber o anticorpo. São realizadas três lavagens, a 56 °C, por 30 minutos cada, com as seguintes soluções:

- 2xSSC + 0,1 % Triton + solução PH, 1:1
- 2xSSC + 0,1 % Triton
- 0,2xSSC + 0,1 % Triton

Após essas lavagens, os vermes retornam a temperatura ambiente para estabilização. Em seguida, são submetidos a duas lavagens com MABT, por 10 minutos, temperatura ambiente, sob agitação. Esta solução foi substituída pela Solução de Bloqueio, que permaneceu por 2 horas, TA, e em seguida foi substituída pela Solução de Anticorpo, overnight, 4 °C. No quarto dia, os vermes passam pelo processo de revelação, para que a sonda seja visualizada. Inicia-se com a troca da solução anterior por solução MABT, a cada 20 minutos, por 2 horas. Em seguida, trocou-se por tampão AP, por 10 minutos, temperatura ambiente. Os tubos foram cobertos por papel alumínio para evitar a luz, e então, adicionou-se a Solução de Revelação, contendo os componentes responsáveis pela detecção de cor. O tempo de revelação varia, e portanto, foi monitorado a cada 4 horas até os vermes tornarem-se escuros. Após isso, passaram pelo processo de lavagem com PBS e fixação com 4 % PFA, por 10 minutos. A solução foi substituída por etanol 100 %, 20 minutos, e em seguida, por etanol 50%, por mais 10 minutos. Ocorreu uma última lavagem com PBS e então, foram preparadas lâminas para microscopia.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, nos propusemos a estudar as características biofísicas e biomoleculares de peptídeos de *S. mansoni* codificados por genes de micro-éxon, estruturalmente semelhantes a outras proteínas que estavam sendo pesquisadas pelo grupo. Nesta seção, apresenta-se os resultados pormenorizados e a discussão acerca dos dados obtidos em cada experimento, com embasamento da literatura. Inicialmente, serão discutidas a forma de obtenção dos peptídeos e análises iniciais, responsáveis pelo direcionamento do projeto de acordo com os resultados primários, onde os peptídeos MEG-27 e -24 são definidas como alvo do estudo. Em seguida, passamos a discutir os efeitos dos dois peptídeos em modelos de membrana, assim como o oposto – o efeito dos modelos de membrana nos peptídeos - utilizando um conjunto de técnicas biofísicas para compreender os mecanismos de interação. Posteriormente, apresenta-se estudos com modelos biológicos, e a busca por parceiros de interação proteicos e teste antimicrobiano. O teste antimicrobiano foi realizado pela similaridade estrutural com as MEGs deste trabalho. Por fim, por uma técnica de hibridização com sonda de RNA, mostra-se a localização de MEG-27 em vermes adultos.

4.1 PREDIÇÕES DE BIOINFORMÁTICA

Selecionou-se as proteínas MEG 10, 10.2, 26, 27 e 28 para este estudo, pela presença de uma hélice anfipática compondo uma fração significativa de sua estrutura, de modo semelhante ao que fora observado para outras MEGs (12 e 24) que já vinham sendo estudadas em nosso grupo, e, vinham apresentado resultados parciais promissores de interação com moléculas do hospedeiro e/ou membranas biológicas. As proteínas escolhidas apresentaram predição de um peptídeo sinal (Figura 18) e predição estrutural majoritariamente formada por uma hélice anfipáticas (Figura 19 e Figura 20). Hélices anfipáticas possuem uma face hidrofóbica e uma face hidrofílica, e são descritas na literatura como potenciais proteínas de interação com membranas, tornando-as interessantes alvos de estudo.⁹³⁻⁹⁹

Figura 18 – Análise da presença de peptídeo sinal. C-score (vermelho) representa a probabilidade de sítio de clivagem, S-score (verde) a probabilidade de peptídeo sinal, e Y-score (azul) representa a probabilidade média considerando os scores C e S. O *eixo x* representa a posição do aminoácido e o *eixo y* a probabilidade, sendo que a linha rosa, representa o limiar de confiabilidade alta (acima) e baixa (abaixo).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figure 1 displays five circular diagrams representing protein structures for MEG-10, MEG-10.2, MEG-26, MEG-27, and MEG-28. Each diagram shows a circular arrangement of amino acid residues (represented by letters and colors) with lines connecting them to form a network. Below each diagram, the 'Face hidrofóbica' (hydrophobic face) is identified by a sequence of residues and their corresponding <H> and <uH> values.

Protein	Face hidrofóbica	<H>	<uH>
MEG-10	F W W F F I A W	0,89	0,54
MEG-10.2	L F F I F	0,78	0,51
MEG-26	L I L W F Y L A	0,59	0,66
MEG-27	V L L I F F	0,77	0,44
MEG-28	F F L M F	0,64	0,58

Fonte: Elaborada pela autora.

Adicionalmente, analisamos a propensão à formação de hélices transmembrana. Regiões transmembrana (intrinsecamente hidrofóbicas) são de complexa obtenção, estabilização e solubilização, principalmente em expressão heteróloga em organismos procariotos e o pré-conhecimento sobre a probabilidade é necessário para traçar estratégias de

obtenção heteróloga. Observamos que apenas a proteína MEG-10 possui uma região com alta probabilidade para esta estrutura (Figura 21).

Figura 21 – Predição de domínio transmembrana. Software TMHMM 2.0. Região em vermelho indica a probabilidade de formação de estrutura transmembrana.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA DE INTERESSE: EXPRESSÃO HETERÓLOGA VS. PEPTÍDEO SINTÉTICO

As estratégias de obtenção foram pensadas levando em consideração estudos prévios para expressão de proteínas da classe das MEGs, e as predições de alta hidrofobicidade. Nesta seção, expõem-se os direcionamentos para a tentativa de obtenção das proteínas de interesse.

4.2.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Obtiveram-se os cDNAs correspondentes a porção codificante da proteína madura após extração de RNA total de vermes adultos e reação de transcrição reversa, seguida de amplificação por PCR (Figura 22).

Figura 22 – Amplificação dos insertos de interesse por PCR. (1) MEG-10, (2) MEG-10.2, (3) MEG-26, (4) MEG-27, (5) MEG-28.

Fonte: Elaborada pela autora.

A ligação nos vetores de clonagem (pGEM) e expressão (pETSUMO) foram confirmadas via análise de restrição com enzimas específicas e sequenciamento. A clonagem e expressão heteróloga foi satisfatória apenas para a proteína MEG-27. Nos outros casos a análise do sequenciamento no vetor de clonagem retornou sequências não confiáveis apesar das repetitivas tentativas de amplificação e clonagem. O genoma de *S. mansoni* é notadamente repetitivo,⁴ e os genes de micro-éxon bastante curtos comparativamente aos demais genes, o que pode explicar a dificuldade de obtenção dos insertos viáveis apesar da utilização de primers otimizados. Apenas o sequenciamento das construções com MEG-27 e -28 retornaram alinhamentos de qualidade, e prosseguiu-se com a expressão, com a ligação em vetor de expressão petSUMO. A detecção da expressão foi realizada via eletroforese, observando a ocorrência da banda referente ao peso molecular das proteínas proeminente no extrato proteico total do vetor bacteriano.

A análise de expressão inicial, mostrou que a proteína MEG-28 encontrava-se insolúvel, e apesar das tentativas de solubilização utilizando aditivos no tampão de lise celular (surfactantes) não se obteve sucesso. Prosseguiu-se apenas com a construção referente à MEG-27. A purificação por cromatografia de afinidade (níquel) e complementarmente exclusão molecular, após clivagem da cauda Sumo-fusão (Figura 23 A e B), mostrou-se satisfatória em níveis de pureza e rendimento, obtendo-se cerca de 3 mg/mL de proteína purificada por litro de cultivo.

Utilizou-se o gel de eletroforese pós exclusão molecular para tripsinização da amostra e realização de Espectrometria de Massas. Foi detectado um peptídeo com uma confiança (e-value), resultando em uma cobertura de 53 % da proteína madura, confirmando a identidade da estrutura primária da proteína MEG-27 na forma heteróloga (Figura 24).

Figura 23 – Purificação da proteína MEG-27. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida 16% contendo SDS e tampão tris-tricina, 1: marcador molecular, 2: purificação em coluna de níquel, pós clivagem da Sumo-fusão. 3: Purificação por Exclusão Molecular, pós remoção da SUMO-fusão. 4: Fração 3 concentrada 4x em Membrana de celulose (Amicon). 5: Clivagem da Sumo-Fusão (banda superior) da proteína MEG-27 (banda inferior). (B) Perfil de Eluição da proteína MEG-27 em coluna de exclusão molecular Superdex75, com eluição majoritária na fração 16, sendo as demais frações referentes á contaminantes ou estados oligoméricos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 24 – Resultado de Espectrometria de Massas. Software Mascot. Porcentagem de cobertura total da sequência em 32 %, indicado em azul; peptídeo maduro em destaque no quadro tracejado rosa, com os aminoácidos identificados no banco de dados em vermelho, contemplando 53% da sequência destacada.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 PEPTÍDEO SINTÉTICO

Devido as tentativas malsucedidas de obtenção das demais proteínas via expressão heteróloga, optamos por obtê-las através da síntese química, realizada por uma empresa especializada. No entanto, a empresa obteve sucesso apenas na síntese da proteína MEG-27.

Testou-se a solubilização do peptídeo sintético liofilizado de MEG-27 em diversas soluções. Atestamos que a solubilidade do mesmo é extremamente restrita, sendo incompatível com qualquer tampão contendo sais de modo geral. Consegue-se uma solubilização parcial em água pura, observando-se um precipitado após a centrifugação, mas com uma porção significativa em solução de aproximadamente 2 mg/mL (aferida por espectroscopia, equipamento Nanodrop 1000, ThermoFisher). Como resultado de testes para solventes orgânicos, obteve-se solubilização total apenas na presença de TFE (2,2, 2-trifluoroethanol), mesmo a partir de 5 % em água. Observou-se que esse solvente também solubiliza precipitados dessa proteína, retornando-a a um estado de enovelado (aferido por Dicroísmo circular). Nenhum outro solvente testado (Clorofórmio, Metanol, Acetonitrila – 100 %, em misturas binárias ou diluídos) mostrou efeito na solubilização do peptídeo. A solubilização dificultada tem como causa provável a alta instabilidade e anfipaticidade da proteína MEG-27, que na ausência de compostos que estimulem um efeito hidrofóbico de interação e/ou estabilização, possui uma propensão a insolubilidade.

4.2.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PEPTÍDEO SINTÉTICO: ANÁLISE DO ENOVELAMENTO

Definido o protocolo de solubilização do peptídeo, buscamos identificar o perfil de estrutura secundária da proteína heteróloga e comparativamente à sintética, por Dicroísmo Circular. O composto TFE é um solvente orgânico conhecido na literatura por induzir a formação de hélices em estruturas proteicas e portanto, usualmente utilizado para forçar uma estruturação em proteínas com propensão helicoidal¹⁰⁰. Foram realizadas 6 varreduras no equipamento Jasco-815 (de 190 ou 195 nm a 260 nm), obtendo um espectro médio final para cada amostra:

- MEG-27 heteróloga em tampão F (20mM Fosfato de Sódio, 100 mM NaCl, 5 % Glicerol);
- MEG-27 heteróloga em tampão F com 50 % TFE;
- MEG-27 sintética em água;
- MEG-27 sintética em água com 50 % TFE.

Observou-se que o perfil da proteína heteróloga em tampão F era condizente ao estado desenovelado (pico negativo em 198 nm), e mesmo com a adição de TFE, agente altamente indutor de enovelamento, não era capaz de atingir um estado enovelado completo. O peptídeo sintético, em contrapartida, apresentou um perfil já parcialmente helicoidal em água, com mínimos mais simétricos comparativamente a heteróloga com TFE (nas regiões 208 nm e 222 nm). A adição de TFE ao peptídeo sintético induziu a formação de hélice característica, com mínimos marcados, conforme esperado pela predição (Figura 25). Neste teste inicial, a concentração de ambas as amostras foi de 30 μ M.

Concluiu-se, portanto, que a forma heteróloga foi incapaz de assumir uma forma helicoidal, permanecendo em um estado relativamente desordenado mesmo na presença de TFE, ao contrário do peptídeo sintético. Tais resultados sugerem que o método de produção da proteína aparentemente influenciou as características da mesma. Devido ao fato do processo de síntese de peptídeos ser mais controlado que a expressão heteróloga e que os resultados estruturais para esta forma são mais concordantes com as análises bioinformáticas, decidimos continuar os experimentos com esta preparação e abandonar a proteína produzida via expressão heteróloga.

Figura 25 – Dicroísmo circular MEG-27. Comparação dos espectros de CD. Forma heteróloga (H) e sintética (S) de MEG-27. Espectros pontilhados indicam medidas na ausência de TFE, e os contínuos representam presença de 50 % de TFE.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por Dicroísmo circular com fonte de luz Síncrotron, pode-se obter um espectro mais informativo sobre a estrutura da proteína MEG-27 (peptídeo sintético) nas regiões abaixo de 190nm, em água. O espectro em solução aquosa apresenta picos característicos de alfa-hélices assimétricos e região em 190 nm com pico positivo (Figura 26). O aumento do pico positivo de 190 nm, que não pode ser detectado no espectro anterior por limitação do equipamento utilizado (CD convencional) indicam quantitativamente as estruturas do tipo alfa-hélice em solução.

Figura 26 – Espectro de Dicroísmo Circular Síncroton MEG-27. Forma sintética em água, 30 μ M.

Fonte: Elaborada pela autora.

Comparativamente, observamos dois espectros similares depositados no Banco de Dados de Espectros de Dicroísmo Circular (<http://pcddb.cryst.bbk.ac.uk/>), ambos referentes a estruturas contendo hélices e regiões desordenadas, o que pode ser um indício de que a proteína MEG-27 em solução apresente-se tanto com regiões helicoidais como regiões desestruturadas. Um aumento das estruturas ordenadas em detrimento de desordenadas, potencialmente ocorreria quando a estrutura se estabilizasse de tal forma que as regiões desordenadas se ordenassem em hélice, aumentando a simetria entre os picos negativos nas regiões de 208 e 222 nm, e um aumento significativo positivo na região de 190 nm, em decorrência de um efeito hidrofóbico de estabilização estrutural.

4.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A TRIAGEM DE PEPTÍDEOS: ESCOLHA DA MEG-27 E INSERÇÃO DA MEG-24 NO PROJETO

Com base nas informações obtidas pela tentativa de expressão heteróloga, síntese química e análises de bioinformática, concluímos que a proteína MEG-27 seria a mais promissora para o tempo disponível de trabalho. Para a obtenção das outras proteínas, uma vez que a síntese química também se mostrou falha, seria necessário estabelecer um protocolo

específico e laborioso em sistemas de expressão heteróloga sem garantias de obtenção de formas enoveladas confiáveis, visto que a expressão heteróloga mostrou-se falha neste ponto com relação a MEG-27.

Concomitante a esse projeto, a pesquisadora Pós-Doutora Ana Eliza Zeraik, do nosso grupo, trabalhava em um projeto paralelo com o peptídeo sintético MEG-24. Por conter conformação semelhante à MEG-27, (estrutura helicoidal anfipática – Figura 27) mas se apresentar em diferentes localizações – MEG-27 identificada na região da cabeça e MEG-24 em todo a extensão (Figura 28).⁵⁶ Inserimos a proteína MEG-24 em algumas etapas deste projeto a fim de reconhecer possíveis paridades e disparidades entre essas proteínas estruturalmente semelhantes (ambas hélices anfipáticas) e localmente distintas.

Figura 27 – Análise da estrutura secundária da proteína MEG-24. (A) Predições da hélice anfipática realizadas pelo programa Jpred e HeliQuest. (B) Espectro SRCD do peptídeo sintético em água.

Fonte: Dados cedidos pela Dr^a Ana Eliza Zeraik.

Figura 28 – Abundância de MEGs em diferentes regiões do verme adulto de *S. mansoni*. Setas verdes destacam as MEGs estudadas neste trabalho. O círculo azul pontilhado delimita a população de MEGs igualmente abundantes na cabeça e cauda, ou seja, distribuídas pelo corpo do verme. O círculo vermelho pontilhado delimita a população de MEGs com maior abundância na cabeça. O círculo preto pontilhado delimita a população de MEGs com maior presença na cauda. $Abundância = \log_2 RPKM$; $diferença = \log_2(RPKM_{cabeça}/RPKM_{cauda})$

Fonte: Adaptada de WILSON et al.⁵⁶

4.4 INTERAÇÃO PROTEÍNA-MODELOS DE MEMBRANA: ESTUDO DO EFEITO DE INTERAÇÃO NO PEPTÍDEO

4.4.1 DICROÍSMO CIRCULAR CONVENCIONAL

Observando os efeitos de interação na estrutura peptídica por Dicroísmo circular utilizando membranas micelares, modelos básicos, podemos direcionar os demais experimentos em relação aos fatores que influenciam a interação, como por exemplo, a carga elétrica. Utilizou-se concentrações acima da CMC para assegurar a estruturação micelar.

Observamos que os surfactantes HPS, SDS, e CTAB, com cargas diferenciadas não diferiram significativamente a estruturação dos peptídeos MEG-27 e MEG 24 (Figura 29 e Figura 30). Observamos uma clara mudança de estruturação para a proteína MEG-27, independente da carga líquida da micela utilizada. Ocorre uma alteração considerável do sinal (DE) nas regiões características de estruturação helicoidal, nos comprimentos de onda (λ) 208 nm e 222 nm. Pequenos desvios nesses valores podem ser resultados de erros intrínsecos ao equipamento e ruído associado e não serem significantes no resultado final do espectro. Além disso, a proteína MEG-27 retorna um sinal fraco de dicroísmo circular. Mesmo em

concentrações mais altas, os sinais sofrem um acréscimo quase insignificativo, e maiores aumentos culminam em um maior espalhamento de luz, que limita a extensão de comprimentos de onda menores que 200 nm que podem ser explorados. Em Dicroísmo circular, utiliza-se a medida da média de desvio padrão entre os scans de uma mesma amostra para indicação dos níveis de erro para os comprimentos de onda. O resultado é representado por barras de erro que auxiliam a identificação de erros significativos aos espectros e erros devido a fatores instrumentais, como o equipamento ou espalhamento do solvente. Quando barras de erro, que representam o desvio padrão dos valores obtidos na média de espectros, coincidem entre si, as diferenças não são significativas.¹⁰¹ Para MEG-27 e MEG-24, as barras de erro (Figura 29 e Figura 30) indicam a ausência de alterações nos espectros de formas distintas para cada micela testada. Distintamente da proteína MEG-27, a proteína MEG-24 já possui uma estrutura helicoidal em solução, e alterações estruturais em decorrência de interações são sutis e mais difíceis de visualizar pela análise do espectro, pois ocorrem mínimas diferenças no sinal detectáveis para as regiões de hélices, e não se observou alterações significativas na presença de micelas.

Figura 29 – Espectro de Dicroísmo Circular – MEG27 e micelas. O espectro de CD mostra uma clara alteração conformacional saindo de um estado minimamente enovelado para um estado helicoidal claro, com mínimos na região de 208 e 222, típicos de alfa-hélice. Utilizou-se 30 μ M de peptídeo, e 10 mM de agentes surfactantes. As barras de erro mostram que não ocorrem alterações muito significativas nas diferentes composições de micelas utilizadas.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 30 – Espectro de Dicroísmo Circular – MEG24 e micelas. Espectros relativos a proteína em solução aquosa e na presença de micelas com mínimas alterações conformacionais. Utilizou-se 15 μM de peptídeo, e 10 mM de agentes surfactantes. As barras de erro indicam que poucas mudanças conformacionais são diferenciáveis da forma na ausência de micelas.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2 FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA

A proteína MEG-27 apresenta um triptofano na região de predição de hélice que pode ser utilizado como uma sonda para detectar alterações conformacionais que ocorrem no microambiente. O triptofano é um aminoácido aromático que pode ser excitado a 295 nm e emitir fluorescência entre 350 e 330 nm, dependendo do ambiente ao qual está inserido e estado de exposição. Quando exposto ao solvente, o pico de emissão ocorre em 350 nm, ao passo que um deslocamento próximo a 330 nm (*blueshift*) indica o oposto. Utilizando esta técnica, pudemos monitorar as alterações a nível de estrutura primária e expandir para secundária, pela observação de alterações no padrão de fluorescência intrínseca da proteína na presença de micelas.

Comparando o espectro de emissão da proteína em solução aquosa na presença de micelas de SDS em relação ao deslocamento $\lambda_{\text{máx}}$ e variação da intensidade, observou-se um claro deslocamento de cerca de 20 nm entre as condições (Figura 31). Este resultado indica que

a exposição do triptofano ao ambiente com micelas, causa alteração de seu estado exposto para estado enterrado, passando de um ambiente polar (exposto ao solvente aquoso) para um ambiente apolar (enterrando-se na face hidrofóbica da micela) alterando seu λ de emissão máximo e intensidade.

Figura 31 – Blueshift do Triptofano - MEG27 na presença de micelas de SDS. Estado de exposição do triptofano alterando de exposto (ambiente polar) para enterrado (ambiente apolar) com característico deslocamento do comprimento de onda de emissão máximo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Não foram realizados ensaios de fluorescência intrínseca para a proteína MEG-24 pois a mesma não possui aminoácidos aromáticos com suficiente rendimento quântico para detecção de emissão de fluorescência em decorrência de alterações conformacionais.

4.4.3 VESÍCULAS DE FOSFOLIPÍDIOS

Comparamos os efeitos de interação de peptídeos com modelos de membranas mais complexos e próximos ao modelo biológico, utilizando vesículas compostas por fosfolipídios. Os resultados obtidos nessa seção permitiram uma maior compreensão deste efeito, explicitando que ambas as proteínas possuem de fato, propensão a interagir com miméticos de membrana.

4.4.3.1 DICROÍSMO CIRCULAR

Realizando medidas com duas composições de vesículas generalistas- POPC (componente majoritário de membranas de mamíferos, zwitteriônico)¹⁰¹ e POPG (majoritário de microrganismos, negativo)¹⁰² em Dicroísmo Circular Síncroton, estabelecemos as proporções a serem utilizadas nos demais experimentos em Dicroísmo Circular convencional.

Notou-se aumento significativo de estruturação na presença de vesículas multilamelares de POPC e POPG (figura). Conseguiu-se obter espectros com proporções molares de até 1:200 (proteína : lipídio) por SRCD (Dicroísmo circular Síncroton), proporção inviável para equipamentos com fonte de luz convencional devido a limitação de espalhamento de luz e consequente interferência negativa e ruidosa na média final dos espectros. Porém, para proporções menores já se observou um grau significativo de aumento da estruturação, possibilitando que as medidas fossem realizadas com confiança em equipamentos convencionais.

Utilizamos como miméticos de membranas celulares três tipos de composições para diferentes tipos celulares. Para mimetizar membranas com carga negativa, e membranas bacterianas, e utilizamos uma mistura de PC e PG e somente PG, respectivamente.¹⁰²⁻¹⁰³ Para mimetizarmos células de mamíferos, buscamos os fosfolipídios majoritários de membrana mamíferos e construímos as vesículas com esses componentes. Para membranas de mamífero utilizamos uma composição de PC, Colesterol e Esfingomielina. Em conjunto, esses fosfolipídios produzem um domínio lipídico, chamado *raft* de membrana, ou “balsas lipídicas”, responsável por diversos mecanismos de interação de membrana, respostas celulares e trocas com o meio externo.¹⁰⁴⁻¹⁰⁵ Assim, a composição ternária entre PC, Colesterol e Esfingomielina pode trazer informações importantes sobre mecanismos de interação, sendo um modelo amplamente utilizado para mimetizar *rafts* de lipídios.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷ Adicionalmente, utilizamos miméticos contendo PC e PE. A adição de PE insere um grupo amina na membrana que aumenta a ordem da bicamada, tornando-a mais coesa e com as cadeias carbônicas mais ordenadas e com maior força de interação entre si.¹⁰³ Assim, pode-se verificar se a organização da bicamada altera de alguma forma, a interação dos peptídeos de interesse.

A proteína MEG-27 estruturou-se na presença de miméticos generalistas – POPC e POPG de maneiras distintas (Figura 32 e Figura 33). O grupo colina da cabeça fosfolipídica de POPC apresenta carga neutra, a passo que o grupo glicerol em POPG apresenta carga negativa. A presença de uma cabeça hidrofílica negativa levou a distorção do espectro helicoidal, podendo indicar um arranjo distinto daquele apresentado na presença de POPC. Uma hipótese

seria que a região hidrofílica da hélice (local onde estão concentradas as argininas) podem interagir de maneira distinta com as vesículas de POPG em comparação com POPC, em decorrência da atração elétrica adicional em resposta a cargas opostas, ao passo que com vesículas de POPC ocorre apenas interação por efeito de hidrofobicidade. Essa “atração” adicional pode resultar um leve arranjo distinto e consequentemente em espectros distintos de CD.

Figura 32 – Espectro de CD: MEG27 com POPC. Vesículas de POPC afetam a estrutura secundária, tornando-a mais helicoidal.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 33 – Espectro de CD -MEG27 com POPG. A presença de vesículas de POPG interferem no espectro de CD de MEG-27 distintamente á vesículas de POPC, por uma provável influência da carga negativa na cabeça polar de POPG.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os experimentos com vesículas com composições que mimetizam membranas de mamíferos (e domínios *rafts ternários*) também apresentaram mudanças no espectro de CD em relação ao espectro solução (Figura 34). Foram também testadas vesículas onde um dos componentes foi retirado, e poucas alterações foram observadas comparativamente entre os espectros. O espectro com a composição PC+SM, sem colesterol, apresentou uma certa distorção comparativamente aos demais, podendo ser um pequeno indício de uma diferença de interação. A presença apenas de esfingomielina altera a fluidez da membrana, formando domínios *rafts* por interação com POPC. Todavia, a presença de colesterol aumenta o recrutamento de esfingomielina e sua dissolução na membrana de POPC.¹⁰⁷ Assim, uma pequena alteração no espectro de CD observado para esta composição pode ser devido a uma alteração de fluidez da membrana ou presença de esfingomielina não totalmente dissolvida na membrana, interferindo de forma não esclarecida com a estrutura secundária de MEG-27.

Figura 34 – Espectro de CD - MEG27 com SUVs. MEG-27 na presença de SUVs compostas de fosfolipídios que compõem domínios *rafts* de membrana: esfingomielina e colesterol, em adição à POPC. Pequena distorção do espectro na composição PCSM (laranja) pode indicar influência na interação.

Fonte: Elaborada pela autora

Por fim, verificamos que a estruturação da proteína ocorre de modo semelhante aos anteriores quando da utilização de miméticos de membranas compostas essencialmente por POPC e POPE (Figura 35), ambos com cabeça neutra e estruturalmente muito parecidos, com distinções apenas em relação à insaturações. Todavia, a presença de PE fortalece a coesão lipídica nas cadeias hidrofóbicas. A proteína apresentou uma estruturação helicoidal bastante simétrica, similarmente a outras composições utilizadas sem alterações significativas entre as composições.

De todas as composições utilizadas, observou-se certa promiscuidade de interação com membranas, sem uma especificidade clara por determinada composição dentre as testadas. Isto ocorre provavelmente por um efeito hidrofóbico de interação com o peptídeo, onde a carga da cabeça polar (hidrofílica) exerce menos influência que a ramificação apolar (hidrofóbica), que interfere diretamente na formação de domínios *rafts*, fluidez e rigidez da membrana. Desta maneira, quando possível, optamos por utilizar como modelo de membrana vesículas de POPC para experimentos posteriores devido a sua maior simplicidade de preparo e manutenção.

Figura 35 - Espectro de CD -MEG27 com SUVs. Espectros na presença de SUVs de POPE, e POPC com 20% POPE.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2.2.1 EFEITO NA ESTABILIDADE TÉRMICA – CD

Por Dicroísmo Circular com controle de temperatura a cada *scan*, observamos que a proteína MEG-27 pura em água possui baixa estabilidade térmica (Figura 36 - Estabilidade Térmica de MEG-27 por Dicroísmo Circular. **A.** MEG-27 sob crescente temperatura, agregando em temperaturas maiores que 35°C. **B.** MEG-27 na presença de vesículas, mantendo-se estável em altas temperaturas, além de retornar ao estado inicial sob decrescimento térmico. Isso pode refletir o fato que MEG-27 não é solúvel em soluções com força iônica semelhante ao do plasma sanguíneo e possui baixa solubilidade mesmo em água pura. Desta maneira, a estrutura observada em solução deve representar uma forma metaestável que não deve existir no sistema nativo, onde a proteína deve estar interagindo com membranas ou outros componentes. De fato, o aquecimento de MEG-27 leva a uma queda do sinal de CD o que seria compatível com um cenário de agregação e precipitação do peptídeo. Na presença de vesículas de POPC MEG-27 passa a ter uma alta estabilidade termica, mantendo a estrutura helicoidal mesmo em altas temperaturas. Apesar da queda do sinal observada com o aquecimento, observou-se o retorno

do espectro semelhante ao inicial quando resfriada a 25°C. Esses dados mostram que a presença de membranas é um fator estabilizador importante para esse peptídeo.

Figura 36 - Estabilidade Térmica de MEG-27 por Dicroísmo Circular. **A.** MEG-27 sob crescente temperatura, agregando em temperaturas maiores que 35°C. **B.** MEG-27 na presença de vesículas, mantendo-se estável em altas temperaturas, além de retornar ao estado inicial sob decrescimento térmico.

Fonte: Elaborada pela autora.

O espectro de CD da proteína MEG-24 na presença de vesículas mostrou uma conformação helicoidal que no entanto vai sendo perdida a medida que a proteína é aquecida (Figura 37). Apesar disso, a estrutura da proteína é mais estável que aquela da proteína na ausência de vesículas, onde ocorre uma grande perda do sinal helicoidal já aos 40°C (Dados anteriores do grupo). A queda de sinal não parece relacionada a ocorrência de agregação, pois há uma recuperação do sinal ao esfriar a amostra novamente a temperatura de 25°C.

Figura 37 - Estabilidade Térmica de MEG-24 por Dicroísmo Circular. Na presença de vesículas, ocorre manutenção do estado enovelado em altas temperaturas, onde observa-se perda de sinal, mas não o desenovelamento.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2.2.2 EFEITO NA ORIENTAÇÃO – OCD

Foram realizados experimentos de dicroísmo circular orientado (OCD) com as proteínas MEG-24 e MEG-27, para análise dos espectros fora de solução, livre da camada de solvatação e efeitos do solvente, e conhecimento do modo de inserção durante a interação com membranas.

A proteína MEG-27 desidratada possui um espectro distorcido na região de 220 nm, podendo ser devido a um estado agregado e instável (Figura 38A). Na presença de vesículas, adquiriu um espectro característico de inserção superficial na membrana (Ver: Figura A 2), com aumento da intensidade do pico na região de 210 nm, gerando uma certa simetria com o pico na região de 220 nm.¹⁰⁸ Para ambas as composições lipídicas utilizadas, notou-se esse tipo de interação, apesar dos espectros distinguirem-se entre si, provavelmente por influência de carga elétrica negativa na cabeça polar contendo PG, ambos representam o mesmo modo de interação (Figura 38B).

Figura 38 - OCD: Orientação em modelos de membrana – MEG27. A. Espectro MEG27 sob filme seco e reidratado em solução saturada salina. B. Espectros sob mesma condição de A, na presença de vesículas, indicando interação na superfície da membrana para ambas composições.

Fonte: Elaborada pela autora.

A proteína MEG-24 por sua vez mantém o espectro helicoidal quando desidratada, e na presença de composições lipídicas, passa para um estado de inserção na membrana, com aumento da intensidade do pico na região de 220nm e aumento da diferença de intensidade entre as regiões de 210 nm e 220 nm, indicado por uma linha tracejada na Figura 39.

Figura 39 - OCD: Orientação em modelos de membrana – MEG24. Orientação helicoidal em modelos de membrana – MEG24. A. Espectro de MEG24 sob filme seco e reidratado em solução saturada salina. B. Espectros sob mesma condição de A, na presença de vesículas, indicando interação do tipo inserção da membrana. Os tracejados destacam a diferença entre os picos negativos, comparativamente maiores em B em relação a A.

Fonte: Elaborada pela autora.

As diferentes orientações detectadas para os peptídeos quando interagindo com modelos de membrana biológica sugerem que podem ter efeitos bastante distintos na dinâmica das membranas e que podem exercer papéis biológicos bastante diferentes.

4.4.2.3 FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA

Monitoramos o estado de exposição do triptofano na proteína MEG-27 quando a proteína interagia com lipossomos de diferentes composições através da medida de alterações no máximo de excitação e intensidade de fluorescência. Observou-se que para todas as composições testadas, ocorria uma diminuição de cerca de 20nm do comprimento de onda de emissão do triptofano, o que indica uma menor exposição ao ambiente aquoso. Isso evidencia mudanças no microambiente monitorado que provavelmente refletem a interação da cadeia lateral peptídica com a vesículas de fosfolipídios (Figura 40).

Para todas as composições, observou-se o mesmo comportamento, de deslocamento e intensidade, o que corrobora para a hipótese da ocorrência de um efeito hidrofóbico de interação, sem notável especificidade por determinadas composições.

Figura 40 - Blueshift do Triptofano – MEG27. Alteração de comprimento de onda identificado em todas as composições utilizadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2.3 ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ

Utilizando a técnica de DLS para estimar o tamanho das partículas (vesículas e peptídeos) em solução. A técnica tem como modelo para o cálculo proteínas globulares ideais, e tal modelo não é perfeitamente adequado para a proteína MEG-27 e -24, visto que os dados obtidos sugerem proteínas primordialmente compostas de uma alfa-hélice, com um formato bastante alongado. Porém, dados de DLS permitem obter uma avaliação qualitativa dos eventos no ambiente estudado através do dado Z-average¹⁰⁹, apenas para uma análise comparativa dos dados de MEGs em água pura e na presença de vesículas miméticas de modelo de membrana. Os pormenores da técnica podem ser consultados no Anexo.

As medidas de DLS estão sumarizadas na Tabela 6

Tabela 6 - Dados de DLS.

	POPC puro (SUVs)	MEG-27	MEG-24	MEG-27 + POPC	MEG-24 + POPC
Z- average (nm)	85,12 ± 55,58 nm	410,6 ± 298,3 nm	437,5 ± 381,1 nm	250,9 ± 146,8 nm	86,32 ± 72,4 nm

Fonte: Elaborada pela autora.

As SUVs de POPC puro indicaram um diâmetro de aproximadamente 85nm ± 55nm, o esperado para LUVs (Tabela 6, Figura 41).

A solução pura contendo apenas MEG-24 resultou em um valor médio de 437,5 ± 381,1 nm, valor alto para um peptídeo de apenas 46 aminoácidos. Todavia, a análise de uma solução contendo uma mistura de SUV com MEG-24 tem valor Z-average = 86,32 ± 72,4 nm, semelhante aquele observado na solução contendo apenas SUVs (Figura 42). Infere-se então que a presença de vesículas de POPC estabilizam o peptídeo, diminuindo efetivamente o estado agregado em solução, indicando que provavelmente a interação entre peptídeo e vesícula não envolve formas oligoméricas agregadas, diferente do observado para MEG-27.

Em solução, a proteína MEG-27 encontra-se em um estado agregado, retornando valores médios altos de diâmetro para um peptídeo com apenas 34 aminoácidos. O valor Z-average = 410,6 ± 298,3 nm para MEG-27 sugere a formação de agregados envolvendo um

grande número de proteínas. Quando na presença de SUVs, todavia, os valores diminuem para $250,9 \pm 146,8$ nm, sugerindo uma diminuição do estado agregado. Infere-se então, que possivelmente, a presença de agentes que induzem o enovelamento e consequentemente o aumento da estabilidade deste peptídeo, tornam o meio propício à desagregação de MEG-27 que ao interagir com membranas tornam-se mais estáveis, mas possivelmente ainda formando agregados em conjunto com as vesículas, resultando em um tamanho médio de diâmetro maior que as vesículas puras, e menor que o peptídeo em solução sem vesículas (Figura 43).

Pressupõem-se então que a formação de agregados de MEG-24 e MEG-27 em solução busca estabilizar estas proteínas através da interação de regiões hidrofóbicas. Quando se inserem vesículas, os peptídeos passam a interagir com estas de maneira individual, visto que esta interação individual seria termodinamicamente mais favorável que a interação entre peptídeos nos agregados, causando a desagregação de MEG-27 e MEG-24.

Figura 41 - Perfil de distribuição de DLS para vesículas de POPC. Tamanho médio (Z-average) em 85 nm, típico para SUVs.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 42 - DLS de MEG24 com SUV. O pico verde é referente a MEG-24 em solução. O pico vermelho, a solução de SUVs. O pico azul equivale a MEG-24 (15 μ M) na presença de SUVs, na proporção de 1:50 (peptídeo: lipídio). Quadro superior à direita mostra os picos ampliados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 43 - DLS de MEG27 com SUV. O pico azul é referente a MEG-27 em solução. O pico verde, a solução de MEG-27 (15 μ M) na presença de SUVs na proporção de 1:50 (peptídeo: lipídio). O pico vermelho equivale a solução de SUVs. Quadro superior à direita mostra os picos ampliados.

Fonte: Elaborada pela autora

Não há afirmação se este estado agregado é um estado ordenado ou causado pela alta hidrofobicidade e instabilidade na ausência de membranas de interação. Acreditamos que a segunda hipótese seja mais provável, onde ocorreriam interações entre as regiões hidrofóbicas da proteína em um estado intermediário de enovelamento resultando em agregados não ordenados que são desfeitos quando as regiões hidrofóbicas são atraídas para interação com membranas.

4.5 INTERAÇÃO PROTEÍNA-MODELOS DE MEMBRANA: EFEITOS NA ESTRUTURA LIPÍDICA

Inferimos na seção anterior que a presença de modelos de membrana aumenta a estabilidade térmica e desfazem a agregação de MEG-27 e MEG-24, além de induzir um maior enovelamento da primeira, observando-se assim, os efeitos de modelos de membrana nas estruturas peptídicas. Nesta seção utilizamos técnicas biofísicas para identificar os efeitos dos peptídeos nos modelos de membrana, afim de compreender melhor o mecanismo de interação e identificar possíveis alterações na estrutura das vesículas em consequência da presença dos peptídeos MEG-27 e MEG-24.

4.5.1 ENSAIO DE VAZAMENTO DE CALCEÍNA – *LEAKAGE*

O ensaio de Leakage permitiu a observação quantitativa de perturbações nas membranas pelo monitoramento do conteúdo interno vesicular (fluoróforo calceína) extravasado para o meio externo. O excesso de fluoróforo foi separado por cromatografia de exclusão molecular (Figura 44) e as amostras finais resultantes desse processo foram quantificadas pelo método de dosagem de fosfatos.

Considerou-se que pequenas diferenças de porcentagem, - de até 5%- pudessem ser atribuídas ao volume de sonda incorporado nas vesículas, não controlável durante o preparo, podendo haver diferenças quantitativas de sonda encapsulada e consequentemente da intensidade do sinal obtido. Esse valor foi estipulado empiricamente.

Testamos inicialmente, vesículas de POPC, como mimético de mamífero e modelo de membrana zwitteriônico, e na adição de POPG para análise de influência de carga negativa.

Figura 44 - Purificação de vesículas encapsulada com calceína. Separação por exclusão molecular do excesso de calceína (A) e vesículas encapsuladas (B) em resina G-75.

Fonte: Elaborada pela autora.

Utilizando as vesículas compostas de POPC, e POPC com 20% de POPG, pode-se observar uma alta capacidade de perturbação da membrana, com altas taxas de vazamento de calceína. Utilizamos a concentração fixa de 50 μ M de vesículas, alterando a proporção de peptídeo injetado, cujas concentrações finais estão na Tabela 7 - Concentração de peptídeo e vesículas para experimento de Leakage. Tomou-se o cuidado de manter o volume total de peptídeo injetado sempre fixo em 15 μ L evitando possíveis efeitos de diluição.

Tabela 7 - Concentração de peptídeo e vesículas para experimento de Leakage

Proporção molar	[Final] peptídeo	[Final] vesículas	Volume
1:20	2.5 μ M	50 μ M	1.015 mL
1:50	1 μ M	50 μ M	1.015 mL
1:100	0.5 μ M	50 μ M	1.015 mL
1:250	0.2 μ M	50 μ M	1.015 mL
1:500	0.1 μ M	50 μ M	1.015 mL
1:1000	0.05 μ M	50 μ M	1.015 mL
1:5000	0.01 μ M	50 μ M	1.015 mL

Fonte: Elaborada pela autora

Observou-se que ambos os peptídeos – MEG24 e MEG27- causaram o vazamento de calceína, e, portanto, provocaram rupturas que permitiram a passagem do conteúdo interno para o meio externo vesicular. O resumo do vazamento em todas as composições utilizadas para ambas as proteínas está na Tabela 8.

Tabela 8 - Vazamento causado pelos peptídeos MEG-24 e MEG-27 em diferentes composições. %VC= % vazamento de calceína.

MEG-24							
PC		PCPG		PCCOL		PCCOLSM	
Proporção	%VC	Proporção	%VC	Proporção	%VC	Proporção	%VC
1 : 20	84	1 : 20	97	1 : 20	75	1 : 20	72
1 : 50	84	1 : 50	85	1 : 50	64	1 : 50	67
1 : 100	76	1 : 100	59	1 : 100	53	1 : 100	63
1 : 250	68	1 : 250	21	1 : 250	51	1 : 250	57
1 : 500	59	1 : 500	14	1 : 500	42	1 : 500	52
1 : 1000	41	1 : 1000	10	1 : 1000	41	1 : 1000	26
1 : 5000	10	1 : 5000	3	1 : 5000	5	1 : 5000	22
MEG-27							
PC		PCPG		PCCOL		PCCOLSM	
Proporção	%VC	Proporção	%VC	Proporção	%VC	Proporção	%VC
1 : 20	96	1 : 20	91	1 : 20	94	1 : 20	91
1 : 50	83	1 : 50	62	1 : 50	89	1 : 50	91
1 : 100	80	1 : 100	45	1 : 100	87	1 : 100	90
1 : 250	69	1 : 250	19	1 : 250	73	1 : 250	82
1 : 500	51	1 : 500	11	1 : 500	67	1 : 500	68
1 : 1000	46	1 : 1000	2	1 : 1000	34	1 : 1000	26
1 : 5000	12	1 : 5000	0	1 : 5000	0	1 : 5000	9

Fonte: Elaborada pela autora.

Para as vesículas compostas apenas de POPC, a porcentagem de liberação de calceína chegou a 84% para MEG-24 e 97% para MEG-27 na maior proporção (1:20) ao passo que as menores concentrações resultaram em liberação de 10% para a primeira e 3% para a segunda (Figura 45 e Figura 47). Em vesículas contendo 20% de POPG, a proteína MEG-24 a proporção de liberação variou de 3% até 97% e em MEG-27 de 0 a 91% (Figura 46 e Figura 48).

A taxa de variação do vazamento não foi diretamente relacionada a variação da concentração peptídica, o que nos sugere que o mecanismo que leva ao vazamento deva ser complexo, dependendo da estrutura bicamada, e não apenas da disponibilidade de peptídeo e membrana. Adicionalmente, os resultados indicam que a presença de carga líquida na cabeça polar dos lipídios parece influenciar a capacidade de liberação de sonda. Para essas composições generalistas (POPC e POPC 20% POPG) não se observou diferenças significativas entre os peptídeos nos efeitos causados nas membranas, considerando as porcentagens dentro da margem de erro estipulada empiricamente em 5%.

Figura 45 - Leakage causado por MEG24 em SUVs de POPC. Proporção peptídeo: lipídio. Alta taxa de vazamento de calceína até a proporção 1:1000, mostrando que as vesículas são bastante susceptíveis a perturbação na presença de MEG-24.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 46 - Leakage causado por MEG24 em SUVs de POPC com 20% POPG. Proporção peptídeo: lipídio. As altas taxas de vazamento indicam que a carga líquida não torna as vesículas menos susceptíveis a perturbações.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 47 - Leakage causado por MEG27 em SUVs de POPC. Proporção peptídeo: lipídio. As altas taxas de extravasamento de calceína indicam um efeito de perturbação na membrana causada pelo peptídeo, mesmo em baixas proporções.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 48 - Leakage causado por MEG27 em SUVs de POPC com 20% de POPG. Proporção peptídeo: lipídio. A presença de carga líquida parece diminuir o efeito de MEG-27, que passa a ter menor efeito quando em baixa concentração, comparativamente ao experimento com vesículas de POPC puras.

Fonte: Elaborada pela autora.

Composições miméticas mais complexas foram testadas, pela adição de colesterol e esfingomiélin. Esses lipídios alteram a curvatura e rigidez da membrana celular e são importantes constituintes de um mimético confiável de membrana biológica, além de ser modelo de *raft* de lipídios.¹⁰⁶ Notou-se efeito similar ao observado nos miméticos anteriores. Verificamos que em ambas vesículas binárias (contendo POPC e 20% Colesterol) e ternárias (POPC, 20% e colesterol e 20% esfingomiélin) ocorreu o efeito de vazamento na presença dos

peptídeos. Baseando-se neste resultado, concluímos que mesmo na presença de lipídios que enrijecem a membrana, ainda ocorre o efeito de perturbação e consequentemente vazamento, com algumas diferenças relativas a concentração peptídica e efeito observado. A proteína MEG-24 foi capaz de causar 75% de extravasamento de calceína nas vesículas binárias e 72% das ternárias, considerando a maior concentração, de 1:20 (Figura 49 e Figura 51). Já a proteína MEG-27, causou 94% de vazamento de calceína em das vesículas binárias e 91% das ternárias (figura 50 e 52). Interessantemente, a proteína MEG-24 manteve maiores taxas de vazamento em menores concentrações comparativamente a MEG-27, causando vazamento de 22% nas composições ternárias na menor proporção utilizada – 1:5000, ao passo que MEG-27, causou 9% de (Figura 51 e Figura 52). Este dado pode indicar que MEG-24 tenha maior afinidade por vesículas dessa composição em relação a MEG-27, e que ocorre um efeito de interação com maior dependência da concentração para MEG-27 do que para MEG-24. Observa-se, portanto, um efeito maior para MEG-24 nas vesículas que mimetizam a composição ternária.

Figura 49 - Leakage causado por MEG24 em SUVs de POPC com 20% colesterol. Proporção peptídeo: lipídio. A presença de colesterol não foi suficiente para impedir o vazamento de calceína, apesar de influenciar a rigidez da vesícula.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 50 - Leakage causado por MEG27 em SUVs de POPC com 20% colesterol. Proporção peptídeo: lipídio. A presença de colesterol não parece impedir o efeito do peptídeo na vesícula.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 51 - Leakage causado por MEG24 em SUVs de POPC com 20% colesterol e 20% esfingomielina. Proporção peptídeo: lipídio. A presença do mimético de raft de membrana, parece tornar o efeito do peptídeo mais linear, mantendo o efeito de vazamento com taxas acima de 20% mesmo nas menores concentrações de peptídeo.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 52 - Leakage causado por MEG27 em SUVs de POPC com 20% colesterol e 20% esfingomielina. Proporção peptídeo: lipídio. Altas concentrações de MEG-27 perturbam quase a totalidade de vesículas, mas menores concentrações geram um decaimento de vazamento bastante efetivo, mostrando que MEG-27 tem um provável efeito relacionado a alta concentração que induzem o vazamento.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observou-se que todas as composições sofreram vazamentos com ambos os peptídeos, porém, notamos que, em todas as composições os valores de vazamentos para ambos os peptídeos foram próximos, incluindo as diferenças de porcentagem originadas com o gradiente de concentração peptídica, exceto para a composição ternária PCSMCOL. Notou-se que MEG-27 manteve altos índices de vazamento, com decaimentos sutis na porcentagem de vazamento durante o gradiente da concentração peptídica até a proporção de 1:250. Ao decair para proporções menores, houve um decaimento mais acentuado a cada gradiente de contração. Em contrapartida, para MEG-24, os valores permaneceram mais estáveis por todo o gradiente de concentração, mantendo, inclusive, 22% de vazamento na proporção de 1:5000. A razão de observamos este possível efeito pautado na concentração, somente nessa composição, explica-se pela rigidez do mimético e presença do *rafts* de lipídio, regiões mais espessas na membrana. Esfingomielina e colesterol atuam juntos para manter a membrana estruturada, além de formarem os *rafts* de lipídios que aumentam a facilidade de acomodação de proteínas interagindo na membrana. Assim a presença de interações superficiais em baixas concentrações não parece perturbar tanto a membrana quando interações internas, que mesmo em baixas concentrações, alteram a distribuição de interações lipídicas. As demais composições não possuíam o efeito da rigidez e *rafts* e, portanto, os peptídeos tinham efeito similares por estar ocorrendo interações hidrofóbicas em membranas mais flexíveis, sem a resistência encontrada

no modelo ternário utilizado que limita a capacidade de interação e consequentemente o efeito de vazamento.

Concluimos, portanto que a estrutura e rigidez dos modelos, são características importante para compreender os efeitos de MEG-27 e -24 em membranas biológicas. Para melhor compreensão dos efeitos de interação é necessário realizar o monitoramento de possíveis interações que ainda ocorrem na membrana quando o efeito de concentração que provoca rupturas é diminuído.

4.5.1 ENSAIO DE CALORIMETRIA DE VARREDURA – DSC

Através da técnica de DSC, pôde-se determinar o comportamento termotrópico de vesículas unilamelares do tipo LUV, na ausência e na presença dos peptídeos MEG-24 e MEG-27 para tentar compreender com mais detalhes os efeitos dos peptídeos nos modelos de membrana. Usualmente, ocorrem dois eventos endotérmicos associados a transições lipídicas em vesículas unilamelares contendo fosfatidilcolinas, um correspondendo à pré-transição e outro correspondendo à transição de fase principal. Tais transições são caracterizadas pela presença de dois picos no gráfico da capacidade calorífica (C_p/cal) em função da temperatura resultante do experimento de DSC. O primeiro pico, chamado de pré-transição, corresponde à transição entre as fases gel L_β e ripple gel P_β' e ocorre em temperaturas mais baixas e é menos energético comparativamente à transição principal. O segundo pico ocorre em temperaturas mais altas e possui maior energia de transição e equivale a mudança da fase P_β' (ripple gel) para fase líquido-cristalina (L_α)¹¹⁰(Figura 53). Esta é chamada transição de fase principal.

Figura 53 - Transições termotrópicas típicas para DPPC. T1 e T2 indicam as temperaturas de transição de fases indicadas na figura.

Fonte: Adaptada de SMITH et al.¹¹⁰

Para vesículas compostas de 100% DMPC, identificou-se a pré-transição entre 12°C e 14°C e a temperatura de melting ou de transição de fase principal (T_m) em 23°C, dados condizentes com relatos da literatura.¹¹¹ Adicionalmente, observamos que altas concentrações de MEG-27 (razão molar peptídeo/lipídio = 1:100 e 1:50) causaram um efeito de ruptura e resselagem das LUVs de DMPC, já que o termograma da amostra DMPC/MEG-27 se assemelha ao perfil esperado para SUVs de DMPC puro¹¹² (Figura 54). Esta observação corrobora a hipótese apresentada no item anterior, onde pressupomos que altas concentrações de MEG-27 interagindo na camada superficial da membrana causam perturbações que culminam em sua ruptura. Por outro lado, baixas concentrações de MEG-27 não apresentaram o mecanismo de ruptura/resselagem observado, mas influenciaram o termograma. Pode ser notado na figura 62 que tanto a transição principal quanto a pré-transição são perturbadas na presença do peptídeo. Mesmo em baixas concentrações a MEG-27 é capaz de abolir completamente a pré-transição de fase do DMPC. Este resultado indica que, em baixas concentrações, o peptídeo se liga na membrana e interage principalmente com a cabeça polar dos lipídios¹¹¹. Analisando este dado juntamente com os resultados das sessões anteriores, concluímos que o efeito de rompimento pela proteína MEG-27 em modelos de membrana tem clara dependência com a concentração utilizada, e abaixo de determinada proporção não causam rompimentos identificáveis pelas multitécnicas utilizadas, apesar de ainda ocorrer interações.

Para MEG-24, observou-se um efeito distinto àquele do peptídeo anterior. Notou-se um menor efeito da MEG-24 na pré-transição do DMPC comparativamente a MEG-27 (Figura 55). Conforme mencionado anteriormente, este resultado é indicativo de maior penetração da MEG-24 na membrana, ao passo que a MEG-27 interage mais superficialmente. Mesmo em altas concentrações de MEG-24, observou-se apenas alterações no termograma em relação a perda da pré-transição e diminuição da entalpia da transição de fase principal, mas sem indícios de rompimentos e resselagem das membranas, como observado para MEG-27. Este dado pode indicar que o vazamento observado na seção 4.5.1 pode ser resultado de aberturas de poros que alteram a permeabilidade da membrana sem causar seu completo rompimento.

Figura 54 - DSC da proteína MEG-27 com LUVs de DMPC. Diferentes razões molares peptídeo/lípido. Medidas realizadas em água, a 25 $^\circ\text{C}$. Quadro superior à direita refere-se à pré-transição e quadro inferior à direita a transição principal.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 55 - DSC da proteína MEG-24 com LUVs de DMPC. Medidas realizadas em água, a 25 $^\circ\text{C}$. Quadro superior à direita refere-se à pré-transição e quadro inferior à direita a transição principal.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para compreender se a rigidez da membrana e a presença de domínios *rafts* influenciaria no efeito induzido pelos peptídeos, utilizamos um mimético de membrana contendo DPPC (60%), colesterol (20%) e esfingomielina (20%). Utilizamos apenas a proporção proteína/lipídio = 1:200 para verificarmos se a concentração mínima de MEG-27 que não causa vazamento na composição ternária, poderia promover mudanças no comportamento termotrópico de fases deste modelo de membrana. Adicionalmente, objetivamos comparar o comportamento de MEG-24, que mostrou ter mais propensão de interação com essa composição, com aquele causado pela MEG-27.

Conforme ilustrado na Figura 56 ambos os peptídeos promovem alterações similares na transição de fase da mistura ternária, indicando, portanto, efeitos similares na estabilidade térmica da membrana. Desta forma, confirmamos a hipótese de que a MEG-27 rompe os miméticos de membrana a partir de determinada concentração limiar; abaixo desta concentração, ainda ocorre interação, mas não com efeito de ruptura.

Figura 56 - DSC com MEG-24 e MEG-27 na presença de LUVs de PCSMOL. Medida realizada em água, a 25°C, com proporção molar peptídeo:lipídio de 1:200.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para comparar os dados obtidos de maneira mais efetiva, calculou-se os parâmetros termodinâmicos derivados dos termogramas: T_M , $T_{M1/2}$ e ΔH . Os valores da entalpia

calorimetria, ΔH , foram obtidos pela integral da curva C_p vs. T obtida ($\Delta H = \int C_p dT$). A temperatura de melting é um indicador de estabilidade térmica, fornecendo a temperatura na qual ocorre a capacidade calorífica máxima do sistema. O valor de $TM_{1/2}$ fornece informações sobre a cooperatividade dos componentes do sistema experimental. Quanto menor o $TM_{1/2}$, maior o nível de cooperatividade de um sistema. Os valores obtidos estão sumarizados na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros termodinâmicos calculados dos termogramas de DSC em diferentes proporções molares de peptídeo: lipídio. Valores de ΔH , TM e $TM_{1/2}$ calculados para cada composição utilizada.

Peptídeo / Proporção	LUV	TM	$TM_{1/2}$	ΔH
-	DMPC	23.34	0.67	5709.66
MEG24 1:200	DMPC	23.37	0.66	4970.50
MEG24 1:100	DMPC	23.21	0.85	3136.71
MEG24 1:50	DMPC	23.14	0.87	3199.85
MEG27 1:200	DMPC	23.22	1.18	2747.08
MEG27 1:100	DMPC	24.56	6.60	4316.63
MEG27 1:50	DMPC	24.11	8.13	4002.83
-	PCSMCOL	41.02	7.93	1435.46
MEG24 1:200	PCSMCOL	41.06	9.91	1342.69
MEG27 1:200	PCSMCOL	41.07	8.43	958.99

Fonte: Elaborada pela autora.

Para vesículas contendo apenas DPMC, nota-se que a MEG-24 promove um efeito relativamente constante nos parâmetros observados, reduzindo a cooperatividade dos lipídios nas proporções de 1:100 e 1:50 e diminuindo o ΔH do sistema em 1,6 vezes em média, sem alterações significativas no TM. A MEG-27, por sua vez, mostrou resultados maiores, deslocando o TM em aproximadamente $+1^\circ\text{C}$ nas proporções de 1:100 e 1:50 e diminuindo significativamente a cooperatividade lipídica em todas as proporções, além de diminuir o ΔH em aproximadamente 1,5 vezes, em média. Pode-se inferir, portanto, que a MEG-24 induz maior efeito na entalpia calorimétrica das transições, ao passo que a MEG-27 tem maior influência na cooperatividade lipídica. Para a composição ternária, todavia, observou-se o resultado oposto, ou seja, que a MEG-24 teve uma maior influência na cooperatividade lipídica,

ao passo que a MEG-27 promoveu maior mudança na entalpia de transição. Esses dados sugerem que a presença de componentes que tornam a membrana mais rígida (lipídios ou colesterol) pode modular a interação dos peptídeos com as membranas.

Concluimos, portanto, que ambos os peptídeos alteram o comportamento termotrópico de fase dos miméticos de membranas. Um provável modelo de interação para a proteína MEG-27 em altas concentrações que explica o efeito de lise e resselagem, também observado no ensaio de Leakage, pode ser baseado no mecanismo de interação tipo *tapete* (*carpet-like*). Neste mecanismo, uma alta concentração de peptídeos interagindo superficialmente pode causar rompimento da membrana e reestruturação de seus fragmentos recobertos com o peptídeo¹¹³ (Figura 57). Todavia, cabe ressaltar que este modelo serve apenas para ilustrar o efeito de altas concentrações de MEG-27 em modelos artificiais membranas apresentando baixa resistência e sendo exclusivamente formadas por lipídios, e assim, pouco provável de ocorrer em modelos *in vivo*. Como para a MEG-24 não se observou este efeito de ruptura/resselagem, pode-se inferir que as rupturas são devido a outro mecanismo, como por exemplo, uma possível formação de poros. Estudos com modelos reais de células humanas são, portanto, necessários para investigar se o modelo ora proposto pode ser estendido para o mecanismo de ação dos peptídeos *in vivo* e para verificar se os efeitos membranotrópicos distintos observados para cada peptídeo são igualmente observáveis *in vivo*.

Figura 57 - Modelo hipotético para interação de MEG-27 com LUVs. Inicialmente, um pequeno número de moléculas se ligam na superfície da membrana, gerando uma tensão na camada externa, insuficiente para causar rupturas. Porém a ligação de um maior número de peptídeos, ou seja, em alta concentração, pode causar ruptura e resselagem da membrana, em consequência da diferença de tensão entre a camada externa e interna da bicamada lipídica.

Fonte: BROGDEN.¹¹³

4.6 ENSAIO – INTERAÇÃO PEPTÍDEO E MODELOS REAIS DE CÉLULA HUMANA

4.6.1 CÉLULAS SANGUÍNEAS COMO MODELOS DE MEMBRANA DE MAMÍFEROS

Para analisar o efeito dos peptídeos em questão com modelos reais de células humanas, utilizamos células de eritrócitos como modelo. Nosso objetivo é investigar a interação dos peptídeos de interesse com a fração lipídica de células humanas, que de forma geral, são majoritariamente formadas pelos mesmos fosfolipídios. Assim, as células de eritrócito apresentam composição lipídica majoritária de PC, com regiões de esfingomielina e colesterol, como a maioria das células de mamífero,^{102,114} além de possuir hemoglobina no interior, que pode facilmente ser monitorada em casos de extravasamento. Além disso, são de fácil obtenção e trabalho e são modelos completos, por serem reais, de células humanas, essencialmente em relação a composição lipídica.

4.6.1.1 HEMÓLISE E HEMOAGLUTINAÇÃO

Previamente realizado pelo grupo, estudos de hemólise com a MEG-24 mostraram que este peptídeo possuía capacidade de lisar células sanguíneas, com concentração mínima de 5µM, causando 10% de lise, e com HC₅₀ de 40µM (vazamento de 50% durante 1 hora de incubação a 37 °C). O efeito é dependente de tempo e concentração (dados obtidos pela Dra. Ana Eliza Zeraik). O ensaio foi realizado com a proteína MEG-27, onde a lise de eritrócitos foi inferida a partir da medida colorimétrica da presença de hemoglobina na solução após retirada das células. No entanto obteve-se valores indicativos de ausência de lise, não havendo diferenças significativas quando comparado com concentrações semelhantes de BSA, utilizado como controle negativo (Figura 58).

Este resultado contradiz os resultados de Leakage, onde ambas as proteínas lisaram os miméticos. A presença de proteínas de membrana e outros componentes estruturais dos eritrócitos podem influenciar diretamente no efeito dos peptídeos, pois, observando-se que ambos interagem com modelos de membrana que compreendem apenas a porção fosfolipídica, pode-se inferir que o demais componente da membrana biológica também tem influência no efeito dos peptídeos.

Figura 58 - Gráfico de hemólise para MEG-27. Valores próximos de 0 indicam que não houve detecção de hemoglobina no sobrenadante.

Fonte: Elaborada pela autora.

Devido a observação de que ocorria a formação de grumos de hemácias na superfície do poço decidimos testar os peptídeos quanto sua capacidade de hemoaglutinação. Ambas mostraram a capacidade de formação de emaranhados celulares, sendo que MEG-24 apresentou o efeito em menores concentrações que MEG-27 (Figura 59). Observamos a aglomeração de células formando uma rede a olho nu (Figura 60) e células agrupadas (Figura 61 e Figura 62) para ambos os peptídeos.

Figura 59 - Teste de hemoaglutinação com MEG-24 e 27. Nota-se que MEG-24 tem efeito de hemoaglutinação em menores concentrações que MEG-27. O valor mínimo onde observa-se o início da formação de redes para MEG-24 é de 0.25μM, e para MEG-27, 1μM.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 60 - Grumos observados nos poços a olho nu. Poço referente a concentração 5uM de MEG-27.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 61 - Aglomerações celulares causadas por MEG-27. Aglomerado de hemácias na presença de MEG-27, 15μM. Quadro a direita refere-se ao controle.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 62 - Aglomerações celulares causadas por MEG-24. Aglomerado de hemácias na presença de MEG-24, 15μM. Quadro a direita refere-se ao controle.
Fonte: Elaborada pela autora.

A proteína MEG-24, portanto, possui capacidade de aglutinação e lise, ao passo que MEG-27, apenas aglutinação. Diferentemente do observado pelos experimentos anteriores,

onde ambas lisam os miméticos, em células sanguíneas, apenas uma possui essa capacidade, provavelmente devido a presença de proteínas de membranas e outras moléculas de superfície que influenciam a interação.

Para averiguar se o efeito de agregação das membranas era reproduzível em miméticos, incubou-se o peptídeo MEG-27, que causa unicamente agregação e não lise em membranas de eritrócitos, em diferentes composições de vesículas sendo elas: POPC, POPG, POPC 20% POPG, POPC 20%SM 20%COL, POPC 20% SM, POPC 20% COL. As quatro primeiras composições são modelos de membranas simples ao passo que as três últimas mimetizam a composição de membranas de mamíferos, cujos principais componentes são fosfatidocolina (PC), esfingomiéline (SM) e colesterol (COL).^{102,114} Utilizou-se composições binárias e ternárias para atestar se algum componente adicional ou ausente influenciaria os resultados.

Observou-se a formação de precipitado apenas nas composições miméticas de células de mamífero, com um precipitado maior com a composição 4, mas também presente nas composições 5 e 6, em menor proporção. Este dado pode indicar que apesar da promiscuidade de interação com fosfolípidios de maneira geral, o efeito observado em eritrócitos (hemoaglutinação) pode estar relacionado com a composição lipídica ali presente (Figura 63).

Figura 63 - Teste com miméticos para verificar precipitação. A: Teste com MEG-27, para verificar a presença de aglomerados de miméticos. Observa-se a formação de precipitados para a composição 4, 5 e 6, mostrando que a presença de SM e Col podem influenciar no mecanismo de aglutinação. B: Hemoaglutinação causada por MEG-27 para comparação com os tubos de mimético. Observa-se a formação de pequenas redes na parede do tubo.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.6.1.2 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DA ABERTURA DURANTE HEMÓLISE

Utilizamos diferentes tamanhos de uma solução de PEG a 30mM para aferir o tamanho da abertura que MEG-24 causa em hemácias, durante hemólise. A solução de PEG funciona como um protetor osmótico, assim, quando ocorre uma ruptura na membrana, as partículas de PEG serão atraídas para o interior da hemácia. Se a partícula atraída for aproximadamente do tamanho da abertura formada, irá funcionar como um “curativo”, tampando o local do vazamento. Assim, estipula-se qual o tamanho de PEG capaz de impedir o vazamento de hemoglobina, e indiretamente, estipulamos o tamanho aproximado da abertura formada pelo efeito do peptídeo.¹¹⁵

Nota-se claramente na Figura 64 a alteração da coloração na adição de PEG a partir de 2.5nm, onde, após 1 hora de encubação, o sobrenadante permaneceu claro (linha C da Figura 64A e B), sem a coloração avermelhada. O sobrenadante foi separado do botão de hemácias para leitura da absorbância.

Figura 64 - Ensaio de proteção osmótica com MEG-24. A: imagem da superfície da placa. B: imagem do verso da placa. **Síglas:** P: PEG. M: MEG-24, S: sobrenadante. Colunas: A: Solução de hemácias na presença de PEG (tamanho descrito na imagem) e MEG-24; B: Solução de hemácias apenas com PEG; C: Sobrenadante da coluna A pós tempo de encubação. D: 0 indica a ausência de PEG, na presença de 80uM de MEG-24; C+ indica controle positivo, com 10% de Triton-X100. Para plotar a curva, utilizou-se a absorbância do poço D0 como 100%.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observamos que a partir de partículas de PEG com cerca de 2.5 nm, compromete-se a hemólise significativamente, e partículas maiores – 3nm a 5nm- impedem a hemólise em 100%

(Figura 65). Assim, podemos inferir que a presença de MEG-24 causa rupturas na membrana com tamanho maior que 2.5 nm.

Figura 65 - Gráfico de proteção osmótica. Nota-se inibição da hemólise a partir do tamanho 2.5nm.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.6.1.2 ENSAIO COM GHOST DE ERITRÓCITOS

Para compreender os mecanismos de interação *in vivo* que resultam em diferentes comportamentos para cada peptídeo, realizou-se experimentos com membranas reais de eritrócitos livres de conteúdo intracelular, mas estruturalmente preservados em termos de lipídios e proteínas de membrana¹¹⁶. Assim, temos um modelo real de membrana em termos de estrutura da bicamada. O resultado do processo de obtenção está sumarizado na Figura 66

Figura 66 - Etapas da obtenção de Ghost de eritrócitos. **A:** Após hemólise, liberação de hemoglobina no sobrenadante e formação de pellet de membrana celular. **B:** Pellet de membranas com sobrenadante livre de hemoglobina. **C:** Ghosts visualizados por microscopia pós resselagem com PBS 7.4, 37°C. Fonte: Elaborada pela autora

4.6.1.3 DSC

O experimento de calorimetria diferencial de varredura permite a observação de transições de fase das proteínas presentes na membrana, e, portanto, é uma ferramenta interessante para observar se o efeito observado nas hemácias anteriormente influencia as proteínas embebidas na membrana, ou são decorrentes de interações que afetam exclusivamente os lipídios.

Usualmente, observam-se de 4 a 5 transições de fase no termograma de Ghost de eritrócitos, dependente da sensibilidade do equipamento e da amostra biológica, sendo 4 principais – de A a D, e uma subtransição do nível B. Uma boa amostra biológica, com membranas íntegras e proteínas ancoradas, apresentam no mínimo 4 transições principais. A primeira transição, chamada de transição A, é referente a um domínio formado por espectrinas e actina. A transição B, e equivale a desnaturação de um domínio formado por anquirinas e proteínas do grupo Banda 4. A transição C corresponde a transição da proteína transmembrana Banda3. A transição D não possui clara descrição na literatura, sabendo-se apenas que são proteínas da membrana.¹⁷⁷ Um esquema representativo da membrana de eritrócitos encontra-se na Figura 67, com as respectivas indicações dos domínios identificáveis pelas transições em DSC.

Figura 67 - Esquema de membrana de eritrócito com proteínas de membrana. As letras correspondem as proteínas em destaque com a mesma cor, e indicam as transições esperadas no termograma.

Fonte: Adaptada de HOFFBRAND et al.¹¹⁸

O termograma obtido (Figura 68) engloba as 4 transições principais confirmadamente proteicas, como observado na Figura 69, onde as transições desaparecem após o scan ultrapassar a temperatura de desnaturação. Assim, confirmamos que a amostra utilizada continha membranas integras após o preparo. O cálculo da concentração molar dos ghosts obtidos não é trivial, pois considera-se uma amostra biológica contendo diversas proteínas, lipídios e carboidratos embebidos em uma matriz de fosfolipídios. Para assegurar a uniformidade quantitativa do experimento e normalização da concentração, utilizou-se como padrão, o peso de massa seca referente ao pellet. Utilizou-se 100mg/mL de pellet seco para as medidas de DSC com peptídeo e monitoramento das desnaturações. Para obtenção do termograma referência (Figura 70) e com maior resolução para distinção dos picos, utilizou-se 300mg/mL (3x) de pellet de membranas. Por fim, um scan completo de 20 a 85°C foi realizado, observando o desaparecimento das transições, que indica a desnaturação.

Figura 68 - Termograma de DSC para GHOST. Ghost (3x concentrado) apresentando as quatro transições esperadas: A, B, C, e D.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 69 - Scan de transições proteicas de DSC para Ghost. Identifica-se os TMs para cada transição, que deixam de existir no scan após alcançar a temperatura de desnaturação. Os scans foram realizados a de 20 a 50°C, retornando à 20°C indo até 65°C, retornando a 20°C novamente e indo até 74°C, retornando mais uma vez e indo até 85°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Utilizou-se 3 concentrações para cada peptídeo testado – MEG-24 e MEG-27-, considerando as concentrações que causaram efeitos em experimentos anteriores (**tabela 10**).

Tabela 10 - Concentração de peptídeo e efeito observado em hemácias

	[Peptídeo]	Efeito in vitro - solução 1% hemácias
MEG24	1 μ M	Hemaglutinação
	5 μ M	Hemólise e hemoaglutinação
	15 μ M	Hemólise e hemoaglutinação
MEG27	1 μ M	Sem efeito observado
	5 μ M	Hemaglutinação
	15 μ M	Hemaglutinação

Fonte: Elaborada pela autora.

Os termogramas para as concentrações testadas estão nas Figuras 70 e 71, para MEG-24 e 27, respectivamente. Os valores dos TMs observados estão sumarizados na tabela 11. Utilizou-se a razão entre as alturas relativas dos picos A e B (CP_A/CP_B) e B e C (CP_B/CP_C) como parâmetro adicional para estabelecer um critério comparativo sobre as mudanças observadas no termograma devido a adição dos peptídeos. Outras informações, como $TM_{1/2}$ e ΔH de cada pico, não foram calculadas pela limitação da quantificação das amostras e/ou sobreposição dos picos.

Analisando os termogramas obtidos (Figura 70) e os valores das razões CP_A/CP_B e CP_B/CP_C (Tabela 11), notou-se um efeito semelhante de ambos os peptídeos nas transições principais correspondentes às proteínas do *ghost*, com exceção da formação de um pico em 20°C na presença da MEG-24 (Figura 71), que será discutido posteriormente. Podem ser observadas alterações mais significativas na transição C, equivalente a proteína Banda3. Nota-se que quanto maior o efeito hemaglutinante, maior a alteração da temperatura de desenovelamento dessa proteína, o que claramente reflete um efeito em sua estabilidade térmica. O efeito nesse pico passa a ser menos acentuado quando se diminui a concentração peptídica. As demais transições também são afetadas na presença dos peptídicos, sendo a B mais proeminente que a transição A, ao passo que a transição D parece ser a menos influenciada. Esses dados mostram que a interação dos peptídeos com componentes da membrana de eritrócitos é capaz de alterar a estabilidade de proteínas inseridas na membrana lipídica, provavelmente por desestabilizar a acomodação das proteínas ou o espaço de ancoramento e

consequentemente, estabilidade, ou mesmo em um hipotético mecanismo de interação direta ou indireta com essas proteínas.

Intrigantemente, nota-se uma nova transição na faixa de 20°C na presença de MEG-24 que não ocorre para MEG-27. Observou-se o surgimento deste novo pico de transição nas concentrações de MEG-24 em 15µM e 5µM, mas não em 1µM, concentração onde apenas observa-se hemoaglutinação. Este pico pode ser devido a formação de um domínio com baixa energia de formação, devido à baixa temperatura de transição (20°C), que pode ocorrer durante a inserção de MEG-24 na membrana. Descartou-se a possibilidade de o pico ser referente apenas a presença da proteína MEG-24, pois a mesma não apresenta temperaturas de transição, conforme observado em experimentos de Dicroísmo Circular e DSC.

Uma hipótese para esse acontecimento, seria a formação de uma estrutura proteica ou lipídica relacionada ao rompimento- já que esse mecanismo somente foi observado para essa proteína dentre as testadas - pois nas concentrações onde não ocorre hemólise (baixa concentração) essa transição deixa de ser observada. Todavia, a temperatura de transição é menor que a temperatura para lise in vitro e acontecimentos fisiológicos, que ocorrem a 37°C. Testou-se então, a estabilidade somente deste pico, realizando uma varredura até 45°C, e retornando a 15°C em seguida, e refazendo a varredura com a mesma amostra, até 40°C. Confirmou-se que o domínio responsável por essa transição é reversível até aproximadamente 45°C, acima da temperatura padrão para experimentos que mimetizam o meio fisiológico, e que poderia estar envolvido em algum mecanismo de lise por efeito de concentração (Figura 72).

Figura 70 - Termograma para ghost na presença de MEG-27. Nota-se alterações na transição das proteínas, indicando uma diminuição da estabilidade térmica na presença do peptídeo, dependente da concentração.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 71 - Termograma para ghost na presença de MEG-24. Nota-se também alterações na transição das proteínas, indicando uma diminuição da estabilidade térmica na presença do peptídeo, dependente da concentração. Além disso, ocorre uma transição adicional em 20°C, nas concentrações de 5µM e 10µM.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 72 - Estabilidade térmica do pico a 20°C. O scan 1 ocorreu de 10°C a 45°C. O scan 2 retornou a 10°C, e então até 40°C. O pico mantém sua estabilidade, ou seja, o possível domínio formado não é sensível a temperaturas até ao menos 45°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 11 - Parâmetros de DSC calculados para GHOST e peptídeos.

	TM A	TM B	TM C	TM D	TM*	CPA/CPB	CPB/CPC
Ghost	48°C	57°C	70°C	78°C	-	0.9	0.6
MEG24 1:200	48°C	57°C	69°C	79°C	-	0.8	0.6
MEG24 1:100	49°C	56°C	66°C	-	19°C	1.1	0.8
MEG24 1:50	49°C	56°C	65°C	-	19°C	1.0	0.7
MEG27 1:200	50°C	58°C	70°C	79°C	-	0.9	0.6
MEG27 1:100	49°C	57°C	68°C	-	-	1.1	0.6
MEG27 1:50	49°C	57°C	66°C	-	-	1.2	0.8

Fonte: Elaborada pela autora.

4.6.1.5 EPR

Com a utilização de marcadores de spin incorporados em fosfolipídios, podemos investigar alterações dinâmicas na estrutura de membranas lipídicas através de experimentos

de EPR. Desta forma, os estudos por EPR podem complementar àqueles de DSC, que monitorou o efeito dos peptídeos na estabilidade das proteínas embebidas na membrana dos ghosts de eritrócitos. A análise dos espectros permite inferir alterações na mobilidade dos marcadores, ou seja, no aumento da fluidez e empacotamento da bicamada. As distinções entre linhas de diferentes espectros (para um mesmo marcador) quando sobrepostos, são suficientes para identificar possíveis alterações. Porém, existem cálculos complexos e simulações que podem trazer parâmetros físicos e matemáticos dessas alterações com maior precisão.¹¹⁹ Neste trabalho, utilizamos apenas a análise dos espectros sobrepostos para identificar alterações da bicamada.

Realizou-se as medidas com marcadores de spins lipídios com a sonda paramagnética (radical nitróxidos) incorporada em diferentes posições ao longo da cadeia acila e da cabeça polar dos lipídios tanto na ausência quanto na presença dos peptídeos e em temperatura fisiológica (37°C). Os seguintes marcadores de spin foram utilizados: DPPTC, que monitora a região da cabeça polar dos lipídios; 5-PC, que monitora a região hidrofóbica próxima à interface membrana-solvente; e 16-PC, que monitora o centro da bicamada lipídica.¹¹⁹⁻¹²⁰ Desta forma, um gradiente de perturbações ao longo da membrana dos ghosts de eritrócitos pode ser monitorado através da técnica de EPR. Particularmente, esperamos alterações mais proeminentes da MEG-27 nos espectros do marcador DPPTC, visto que esta proteína supostamente interage com a superfície da membrana. Por outro lado, o objetivo de utilizarmos os marcadores 5-PC e 16-PC reside em tentar compreender a profundidade de inserção da MEG-24 na bicamada lipídica, visto que esta proteína supostamente se insere na membrana. Todavia, conforme ilustrado nas figuras 82 e 83, notamos um efeito maior da MEG-27 em comparação com a MEG-24 nos espectros de todos os marcadores. A interação da MEG-27 com o ghost perturba a dinâmica estrutural da fase lipídica dos ghost em todas as regiões monitoradas (Figura 73), ao passo que a MEG-24 praticamente não muda a fluidez e o empacotamento das membranas (Figura 74).

Interessantemente, apesar dos experimentos de DSC apontarem para um efeito similar de ambos os peptídeos na estabilidade das proteínas do ghost, os resultados obtidos por EPR foram bastante distintos. O estreitamento das linhas espectrais induzidas pela MEG-27 nos espectros do DPPTC e 16-PC, assim como a diminuição da separação entre as linhas de campo alto (vale) e baixo (pico) nos espectros do 5-PC podem estar relacionados a efeitos de diminuição do empacotamento da bicamada e/ou aumento da fluidez da membrana nas regiões monitoradas pelos três marcadores (Figura 73)¹¹⁹ Este fato pode ser devido à alta concentração

de MEG-27 interagindo na região polar (superficial), aumentando a área superficial por lipídio e interferindo, portanto, nas interações hidrofóbicas que mantem a estabilidade do arranjo da bicamada. Desta forma, podemos inferir que a MEG-27 tem um efeito primordialmente de aumento de fluidez e de diminuição do ordenamento molecular (empacotamento da membrana) e é concentração dependente. Já para MEG-24, não foram observadas alterações nos espectros de nenhum dos marcadores (Figura 74), sugerindo, pois, que a suposta orientação transmembrana deste peptídeo não deve perturbar a mobilidade e o ordenamento molecular dos lipídios.

Conforme já mencionado, observamos alterações similares na estabilidade das proteínas inseridas na membrana do ghost para ambas as proteínas através da técnica de DSC. Em contrapartida, observamos que somente a MEG-27 é capaz de perturbar a estrutura dinâmica da fase lipídica das membranas do ghost. Desta forma, propusemos a seguinte hipótese para tentar explicar os resultados obtidos por DSC e EPR para a MEG-24: como a MEG-24 está supostamente disposta verticalmente na bicamada lipídica, ou seja, adquire orientação transmembrana, o empacotamento lipídico pode não ser afetado, visto que peptídeos hidrofóbicos que adotam α -hélices podem maximizar os contatos hidrofóbicos com os lipídios quando orientados com o eixo da hélice paralelo à cadeia lipídica. Neste caso, a estrutura da bicamada lipídica não é afetada, porém as proteínas ancoradas podem perder espaço físico de ancoramento onde MEG-24 passa a interagir, principalmente se a interação ocorrer próximo a um *raft* de lipídeos que facilita a acomodação de proteínas de membrana. Assim, MEG-24 poderia estar interagindo indiretamente com as proteínas de membrana. Adicionalmente, MEG-24 poderia interagir de maneira direta com essas proteínas e indiretamente com a bicamada lipídica, porém, essa hipótese deve ser explorada em outros estudos.

Este ensaio nos permitiu estabelecer novamente a hipótese de que MEG-24 e MEG-27 interagem de maneiras distintas com modelos de membrana.

Figura 73 - Espectro de EPR para GHOST e MEG-27. A: Marcados de spin DPPTC. B: Marcador de spin 16PC. C: Marcador de spin 5PC.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 74 - Espectro de EPR para GHOST e MEG-24. A: Marcados de spin DPPTC. B: Marcador de spin 5PC. C: Marcador de spin 16PC. Seta indicando uma sutil diferença no espectro de 16PC com 15μM de MEG-24.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 LOCALIZAÇÃO – WISH

A localização de transcritos de MEG-24 foi realizada anteriormente pelo grupo através da técnica de WISH, sendo identificada em vermes adultos sinal exclusivamente nas células subtegumentais, o que sugere que a proteína deva estar localizada no tegumento dos vermes (dados obtidos pela Dra. Ana Eliza Zeraik).

Realizando experimento de WISH utilizando sondas de RNA para MEG-27, identificamos pequenos pontos de marcação na região da glândula do esôfago (Figura 75). Esta marcação era esperada pois dados anteriores indicavam um enriquecimento de transcritos de MEG-27 na cabeça do parasita e este órgão é um “hotspot” para expressão de MEGs.⁵⁶ Além disso, é possível notar que o sinal obtido em nossos experimentos foi relativamente fraco e observado apenas em uma fração dos vermes marcados. Isso provavelmente reflete o fato que os níveis de expressão de MEG-27 são consideravelmente menores em relação às outras MEGs previamente localizados por WISH na glândula do esôfago, e que demonstravam sinais mais robustos.⁵⁶⁻⁵⁷

Figura 75 - WISH para MEG27. A. Marcações na região da glândula do esôfago em destaque. B: Controle
Fonte: Elaborada pela autora.

4.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Alguns peptídeos com hélices anfipáticas são descritos na literatura como potenciais agentes antimicrobianos. Os peptídeos possuem conformação parcial em água, e ao entrar em contato com membranas de microorganismos, enovelam-se formando uma hélice anfipática que causa a ruptura da parede celular e consequentemente, morte.¹¹³

Como se observou a característica de hélice anfipática para MEG-24 e MEG-27, e por experimento de *Leakage*, observamos a ruptura em vesículas contendo POPG, principal fosfolípido da membrana de microorganismos,¹⁰² testamos a ocorrência de uma possível atividade microbiana, em bactérias *E.coli*. Não se observou halos de não-crescimento ao redor das regiões com papel-filtro embebido em MEG-24 ou MEG-27 (Figura 76).

Figura 76 - Teste antimicrobiano com *E.coli* Amp^r. Halo formado apenas na presença de ampicilina.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.9 BUSCA DE PARCEIROS DE INTERAÇÃO: DUPLO-HÍBRIDO: MEG-27

Confirmou-se a clonagem do inserto codificante de MEG-27 e transformação em levedura (Figura 77A), confirmando que o inserto não tem a capacidade de auto ativar o sistema (Figura 77B). Esta etapa é importante para evitar falsos-positivos.

Figura 77 - Testes iniciais do DH. A. Colônias de levedura com inserto para MEG27 no vetor pBTM. B: Teste do azul, indicando a ausência da coloração azul para colônias de MEG27.
Fonte: Elaborada pela autora.

A concentração de 3-AT foi calculada em 40mM, concentração esta que manteve o crescimento de leveduras apesar da presença do composto Figura 78.

Figura 78 - Teste do 3AT. Colônias prejudicadas a partir de 40mM de 3AT.
Fonte: Elaborada pela autora.

Após a obtenção de colônias transformadas contendo a isca (MEG-27), iniciou-se o processo de matting contra uma biblioteca de leveduras para proteínas humanas totais, confirmando-se a obtenção de zigotos potencialmente diploides (isca-presa) por microscopia

(Figura 79 A,B)O cultivo contendo os potenciais zigotos foi plaqueado em meios seletivos SD-L, SD-WL, E SD-W, para análise do crescimento de leveduras contendo apenas a isca, apenas as presas, e ambos os plasmídeos (Figura 79C) e contagem do número de transformados e *screening* da biblioteca.

As colônias crescidas foram plaqueadas em 50 placas com meio SD-WLH suplementados com 3-AT, para assegurar o espaço físico para crescimento das colônias contendo apenas potenciais presas. Cerca de 80 colônias selecionadas foram submetidas a testes para eliminação de falsos-positivos (teste da galactosidase - dados não documentados em foto). Eliminando-se os falsos-positivos, extraiu-se o DNA das demais colônias (~10) para sequenciamento. As sequências obtidas estão na **Tabela 12**.

Figura 79 - Testes DH. A: Zigotos após matting de leveduras. B: Destaque para formação de zigotos. C: Meios seletivos para triagem de colônias com possíveis interações.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 12 - Resultado de alinhamentos DH.

Alinhamentos - Duplo-híbrido	
Nome	Cod. NCBI
<i>Homo sapiens glycine amidinotransferase (GATM)</i>	NM_001321015.1
<i>Homo sapiens dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1</i>	BC036432.2
<i>Homo sapiens Ras association domain family member 8 (RASSF8)</i>	XM_017018746.1
<i>Homo sapiens Ras related GTP binding D (RRAGD)</i>	NM_021244.4
<i>Homo sapiens transforming growth factor beta receptor 3 (TGFB3)</i>	NG_027757.1
<i>Homo sapiens KRR1, small subunit (SSU) processome component</i>	BC026107.2
<i>Homo sapiens CD55 molecule (Cromer blood group)</i>	NM_000574.4

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise minuciosa das sequências obtidas mostrou que nenhuma das regiões das sequências pescadas era confiavelmente um parceiro de interação, pois as fases de leitura estavam fora da região de transcrição proteica (levando em consideração a região referente ao vetor de expressão e ORFs encontradas) e, portanto, não poderiam ser interações entre proteínas.

Concluiu-se que, apesar de algumas sequências parecerem promissoras por estarem relacionadas com mecanismos do sistema imunológico e/ou sanguíneo, os resultados desse ensaio não encontrou parceiros de interação. Uma possível hipótese para ausência de interações positivas pode ser a alta hidrofobicidade e instabilidade da proteína, o que a torna de difícil obtenção em sistemas heterólogos. Além disso, questões técnicas e experimentais intrínsecas ao experimento podem ser as responsáveis pela detecção apenas de falso-positivos, apesar das exaustivas tentativas de eliminação dos mesmos. Portanto, não se deve concluir pela ausência de interações com proteína de hospedeiro, e outros métodos de detecção precisam ser testados.

O experimento não foi realizado para proteína MEG-24.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho, identificamos que MEG-27 e MEG-24, dois peptídeos de *S.mansoni* com estrutura de hélices anfipáticas, possuem indícios de interação com membranas biológicas. Hélices anfipáticas são estruturas com potencial de interação com membranas e são descritos na literatura casos onde participam efetivamente de interações importantes para o organismo. Adicionalmente, a maioria dos peptídeos antimicrobianos possuem esta estrutura, tendo papéis importantes em mecanismos de defesa.⁹³⁻⁹⁹ Assim, a presença de hélices anfipáticas interagindo com membranas é um indício importante do papel desses peptídeos.

Na presença de miméticos ou modelos de membrana biológica, para MEG-27, notou-se aumento da estabilidade térmica e do enovelamento além da alteração no estado oligomérico. Além disso, ocorrem alterações na estrutura da membrana, tanto mimético como em membranas de eritrócito, com alterações na estrutura e empacotamento, além da estabilidade de proteínas embebidas. Para MEG-24, notou-se também aumento da estabilidade térmica, e alteração no estado de oligomerização, além de alterações na estrutura de miméticos e estabilidade de proteínas embebidas em modelos de membrana biológica.

É importante notar que apesar das interações aparentarem ocorrer por mecanismos hidrofóbicos sem distinção clara de afinidade maior por determinada composição lipídica, ocorreram algumas diferenças experimentais observadas na presença da composição ternária PCSMCOL, que mimetiza membranas de células de mamífero.^{101,106} Observou-se uma maior linearidade de interação com MEG-24 com menor dependência da concentração, por Leakage, e a formação de precipitados na presença de MEG-27, por um provável efeito de concentração que causa a agregação das vesículas. Essa composição mimetiza *rafts* de membrana, que são bolsões lipídicos mais espessos e com funções biológicas importantes, funcionando como um centro organizador para processos celulares, influenciando o tráfico e ligação de moléculas, acomodação de proteínas de membrana, reconhecimento de receptores, e a fluidez da membrana.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷

Recentemente, descreveu-se que uma classe de proteínas de helmintos que mimetizam peptídeos antimicrobianos modulando respostas imunes inatas no hospedeiro.¹²¹ Esses peptídeos são produtos secretórios compostos por uma hélice anfipática que interage na superfície de membranas celulares de células do sistema imune inato, manipulando essas respostas.¹²¹ Adicionalmente, outro estudo mostrou que um peptídeo desta mesma classe possuía seletividade de interação com domínios de *lipid rafts*, interagindo na região e sendo

internalizado pela célula do hospedeiro e liberando a região de hélice anfipática no interior celular, que inibia a ativação de macrófagos.¹²² Em *S. mansoni*, a pequena proteína chamada SM16, também com estrutura de hélice anfipática e produto de secreção em cercárias, mostrou ser capaz de modular o sistema imune por interação com receptores celulares do tipo TLR (*Toll-like receptor*) que possuem função de reconhecimento de regiões conservadas de organismos invasores.¹²³

Comparativamente, observam-se algumas semelhanças com as MEGs estudadas neste trabalho e as proteínas descritas nos trabalhos acima citados. Entre as semelhanças destaca-se a similaridade de formação de hélice anfipática, serem produtos de secreção de helmintos e possuírem propensão de interação com membranas. Interessantemente, notou-se uma certa diferença de efeito de ligação a composições com domínios de *raft lipids* (*PCSMCOL*).¹²¹⁻¹²³

Assim, podemos concluir que este estudo fornece indícios da funcionalidade das MEGs estudadas. Pode-se inferir que os resultados obtidos indicam uma propensão de interação com modelos de membrana biológica, com mecanismos e efeitos provavelmente distintos, especialmente por estarem em locais diferentes. Para MEG-27, notamos que em baixa concentrações, ocorrem prováveis ligações na superfície da membrana, onde o peptídeo interage mais efetivamente com a cabeça polar, gerando uma tensão na camada externa da bicamada em detrimento da camada interna. Com o aumento da concentração de MEG-27 e consequentemente o número de moléculas disponíveis para ligação, a tensão aumenta e ultrapassa a resistência da vesícula miméticas, que se rompem. Como não notamos o efeito de rompimento em membranas de eritrócito, componentes da membrana externa devem influenciar a área de ligação de MEG-27, impedimento o rompimento. Para MEG-24, observamos indícios de interação transmembrana, além dos indícios de DSC de formação de um domínio de baixa estabilidade, que pode indicar a formação de um estado de oligomerização envolvendo proteínas de membrana e/ou somente lipídios que dependem da concentração de MEG-24. Ou seja, em altas concentrações MEG-24 poderia formar um estado de oligomerização que poderia induzir aberturas na membrana, causando a hemólise observada. Uma esquematização destas hipóteses podem ser conferidas na Figura 80 e Figura 81.

Figura 80 - Modelo hipotético de interação entre membrana e MEG-27. A: Estado parcialmente enovelado em agregado solúvel, que se desfaz na presença de modelo de membrana possivelmente por ação hidrofóbica, passando para um estado enovelado helicoidal. B: Modelo de membrana com raft de lipídio. Hélices anfipáticas de MEG-27 interagindo na região superficial polar, alterando o empacotamento da membrana e o acomodamento de proteínas de membrana, gerando uma tensão na camada externa da bicamada que altera a dinâmica dos componentes da membrana. *A figura não está em escala de tamanhos reais.*

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 81 - Modelo hipotético de interação entre membrana e MEG-24. A: Estado enovelado em agregado solúvel, que se desfaz na presença de modelo de membrana possivelmente por ação hidrofóbica. B: Modelo de membrana com raft de lipídio. Hélices anfipáticas de MEG-24 se inserindo na membrana, sem alterações no empacotamento pelo tamanho diminuto do peptídeo em baixas concentrações, mas influenciando o acomodamento de outras proteínas de membrana por “atrair” interações. Em alta concentração, aberturas na membrana e extravasamento do conteúdo interno podem ser observados, indicado pela seta vermelha, em uma possível estrutura oligomérica formada na presença de um grande número de moléculas de MEG-24.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em comparação aos estudos citados, uma hipótese de modulação do sistema imune frente aos dados expostos da literatura e as premissas desse trabalho, podem dar base para futuros estudos de interação com células do sistema imune inato. Portanto, concluímos neste estudo que MEGs-27 e 24 podem estar interagindo com membranas biológicas e exercer papéis de modulação no hospedeiro. Assim, estudos com células do sistema imune inato, utilizando

preferencialmente tais MEGs nativas, podem oferecer novos dados sobre essa classe de proteínas bastante promissora em relação a compreensão dos mecanismos de evasão de *S.mansoni*.

REFERÊNCIAS

- 1 CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 41–51, 2000.
- 2 HU, W. et al. Schistosome transcriptomes : new insights into the parasite and schistosomiasis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, n. 5, p. 217–225, 2004.
- 3 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- 4 BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352–360, 2009. doi: 10.1038/nature08160.
- 5 NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
- 6 SILVA, J. R. M.; NEVES, R. H.; GOMES, D. C. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Org.) **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 43
- 7 PARAENSE, W. L. Histórico do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Org.) **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 25
- 8 COLLEY, D. et al. Human Schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253–2264, 2015.
- 9 GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, p. 1106–1018, 2006.
- 10 CAMPBELL, G. et al. Molecular evidence supports an African affinity of the neotropical freshwater gastropod *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 267, p. 2351–2358, 2000. doi: 10.1098/rspb.2000.1291
- 11 DEJONG, R. J. et al. Evolutionary relationships and biogeography of biomphalaria (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 12, p. 2225–2239, 2001.
- 12 HOTEZ, P. J. et al. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, 2008. doi: 10.1371/journal.pntd.0000300.
- 13 LUTZ, A.; PENNA, O. Estudos sobre a esquistomatóse feitos no norte do Brasil por uma comissão do Instituto Oswaldo Cruz. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.10, n. 1, p. 83-94, 1918.
- 14 MARTINS-MELO, F. R. et al. Spatiotemporal patterns of Schistosomiasis- related deaths, Brazil, 2000–2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 3–6, 2015.
- 15 CVE – SAÚDE. **Situação epidemiológica da esquistossomose no estado de São Paulo**. Brasil, 2009. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/EsquistoESP09_Resumo.pdf>. Acesso em 12 nov. 2016

- 16 NASCIMENTO, G. L. **Formas graves da esquistossomose mansoni: carga epidemiológica e custos no Brasil em 2010** formas graves da esquistossomose mansoni : carga epidemiológica e custos no Brasil em 2010. 2013. 73f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- 17 SHORT, R. B.; MENZEL, M. Y.; PATHAK, S. Somatic chromosomes of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**, v. 65, n. 3, p. 471, 1979.
- 18 LENZI, H. L. et al. Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (Org.). **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 85
- 19 REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- 20 WILSON, R. A. **Introdução à parasitologia**. São Paulo: EDUSP, 1979.
- 21 CLEGG, J. A. In vitro cultivation of *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 16, n. 2, p. 133–147, 1965.
- 22 WRIGHT, C. A. **The Schistosome life-cycle**. Berlin, Heidelberg: Springer, 1967.
- 23 CUNHA, A. S. **Esquistossomose mansoni**. São Paulo: EDUSP, 1970
- 24 HAGAN, P.; NDHLOVU, P.D.; DUNNE, D. W. Schistosome immunology : more questions than answers. **Parasitology Today**, v. 14, n. 10, p. 407–412, 1998.
- 25 PARISE FILHO, R.; SILVEIRA, M. A. B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 2, p. 123–135, 2016.
- 26 MCMANNUS, D. The search for a vaccine against schistosomiasis - a difficult path hut an achievable goal. **Immunological Reviews**, v. 171, n. 1, p. 149–161, 1999.
- 27 COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 347–357, 2014.
- 28 DUNNE, D.; COOKE, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**. v. 5, n. 5, p. 420-426, 2005
- 29 PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 499–511, 2002. doi:10.1038/nri843.
- 30 ANTHONY, R. M. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nature Reviews Immunology**, v.7, n.12, p. 975-987, 2008. doi:10.1038/nri2199.
- 31 WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, p. 148–154, 2007. doi:10.1038/sj.icb.7100014.
- 32 BARSOUM, R. S. Human schistosomiasis : clinical perspective : review. **Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 5, p. 433–444, 2013.
- 33 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PARASITES. **Parasites - Schistomiasis**. 2012. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- 34 ANDRADE, Z. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 11, p. 656–663, 2009.

- 35 MAHMOUD, A. A. F. **Schistosomiasis**. London: Imperial College Press, 2001. (Tropical medicine practice, v. 3).
- 36 VITORINO, R. et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 39–45, 2012.
- 37 WANG, W.; WANG, L.; LIANG, Y. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis : a review. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 1871–1877, 2012.
- 38 KING, C. H. Toward the elimination of schistosomiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 2, p. 106–109, 2009.
- 39 DOENHOFF, M. J. et al. Resistance of schistosoma mansoni to praziquantel : is there a problem?. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 465–469, 2002.
- 40 FISHELSON, Z. Novel mechanisms of immune evasion by schistosoma mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 289–292, 1995.
- 41 WILSON, R. A.; COULSON, P. S. Schistosome vaccines : a critical appraisal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, Suppl. 1, p. 13–20, 2006.
- 42 FALLON, P. G. Cautionary tale of mice and men. **Immunology Today**, v. 21, n. 1, p. 29–35, 2000.
- 43 ASSIS, A. et al. Childhood stunting in Northeast Brazil : the role of Schistosoma mansoni infection and inadequate dietary intake. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, p. 1022–1029, 2004. doi:10.1038/sj.ejcn.1601926.
- 44 CALDAS, I. R. et al. Human schistosomiasis mansoni : immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 109–117, 2008.
- 45 HELLEMOND, J. J. et al. Functions of the tegument of schistosomes : clues from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 6, p. 691–699, 2006.
- 46 XAVIER, E. M. et al. The tegument of schistosoma mansoni : genes, antigens and the host-parasite relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 85–86, 1998. Supplement 1.
- 47 SKELLY, P. J.; WILSON, R. A. Making sense of the schistosome surface. **Advances in Parasitology**, v. 63, n. 6, p. 185–284, 2006.
- 48 LI, X. H. et al. The anterior esophageal region of Schistosoma japonicum is a secretory organ. **Parasite & Vectors**, v. 7, n. 565, n. 1, p. 1–12, 2014.
- 49 JONES, M. K. et al. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host – parasite interactions. **BioEssays**, v. 26, n. 7, p. 752–765, 2004.
- 50 BRASCHI, S.; BORGES, W. C.; WILSON, R. A. Proteomic analysis of the shistosome tegument and its surface membranes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 205–212, 2006.
- 51 HAN, Z. et al. Schistosoma genomics : new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 10, p. 211–240, 2009. doi: 10.1146/annurev-genom-082908-150036.

- 52 FAGHIRI, Z. et al. The tegument of the human parasitic worm schistosoma mansoni as an excretory organ : the surface aquaporin SmAQP is a lactate transporter. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. 1–9, 2010.
- 53 LOUKAS, A.; TRAN, M.; PEARSON, M. S. Schistosome membrane proteins as vaccines. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 3-4, p. 257–263, 2007.
- 54 FONSECA, C. T. et al. Schistosoma tegument proteins in vaccine and diagnosis development : an update. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1–8, 2012. doi.org/10.1155/2012/541268.
- 55 ABATH, F. G.; WERKHAUSER, R. C. The tegument of Schistosoma mansoni: functional and immunological features. **Parasite Immunology**, v. 18, n. 1, p. 15–20, 1996.
- 56 WILSON, R. A. et al. The schistosome esophagus Is a “ Hotspot ” for microexon and lysosomal hydrolase gene expression : implications for blood processing. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1-25, 2015.
- 57 LI, X. et al. The schistosome oesophageal gland : initiator of blood processing. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. 1-15, 2013.
- 58 FIGUEIREDO, B. C. et al. Kicking in the guts : schistosoma mansoni digestive tract proteins are potential candidates for vaccine development. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2015.
- 59 LI, X. et al. Evidence that rhesus macaques self-cure from a schistosoma japonicum infection by disrupting worm esophageal function : a new route to an effective vaccine ? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1-26, 2015.
- 60 FRANCO, G. et al. Identification of new schistosoma mansoni genes by the EST strategy using a directional cDNA library. **Gene**, v. 2, n. 23, p. 141–147, 1995.
- 61 VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite Schistosoma mansoni. **Nature Genetics**, v. 35, n. 2, p. 148–157, 2003.
- 62 DEMARCO, R. et al. Protein variation in blood-dwelling schistosome worms generated by differential splicing of micro-exon gene transcripts. **Genome Research**, v. 20, n. 8, p. 1112–1121, 2010.
- 63 PHILIPPSEN, G. S.; WILSON, R. A.; DEMARCO, R. GBE accelerated evolution of schistosome genes coding for proteins located at the host – parasite interface. **Genome Biology Evolution**, v. 7, n. 2, p. 431–443, 2015.
- 64 ALMEIDA, G. T. et al. Experimental parasitology exploring the schistosoma mansoni adult male transcriptome using RNA-seq. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 22–31, 2012.
- 65 ANDERSON, L. et al. Schistosoma mansoni egg , adult male and female comparative gene expression analysis and identification of novel genes by RNA-Seq. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. 1–26, 2015.
- 66 MATHIESON, W.; WILSON, R. A. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed Schistosoma mansoni egg and its contents : the miracidium, hatch fluid and secretions. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 5, p. 617–628, 2010.
- 67 PARKER-MANUEL, S. J. et al. Gene expression patterns in larval schistosoma mansoni associated with infection of the mammalian host. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. 1–19, 2011.

- 68 NAWARATNA, S. S. K. et al. Molecular & biochemical parasitology transcriptional profiling of the oesophageal gland region of male worms of *Schistosoma mansoni*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 196, n. 2, p. 82–89, 2014.
- 69 MARTINS, V. P. et al. Family, induces erythrocyte agglutination in vitro and partially protects vaccinated mice against *Schistosoma mansoni* infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 3, p. 1–12, 2014.
- 70 LOPES, J. L. S. et al. Folding factors and partners for the intrinsically disordered protein. **Biophysical Journal**, v. 104, n. 11, p. 2512–2520, 2013.
- 71 ORCIA, D. et al. Interaction of an esophageal MEG protein from schistosomes with a human S100 protein involved in inflammatory response. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 4–11, 2017. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.09.015.
- 72 ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v.5, p. 172, 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.
- 73 TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 211–222, 2006.
- 74 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 75 PADMANABHAN, S., BANERJEE, S., MANDI, N. Screening of bacterial recombinants: strategies and preventing false positives. In: BROWN, G. G. (Ed.). **Molecular cloning - selected applications in medicine and biology**. 5th ed. Rijeka, Croatia: In Tech, 2001.
- 76 SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850–858, 1996.
- 77 KASTIN, A J. **Handbook of biologically active peptides**, 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2013.
- 78 CHANDRUDU, S.; SIMERSKA, P.; TOTH, I. Chemical methods for peptide and protein production. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4373–4388, 2013.
- 79 GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2006.
- 80 CHATTOPADHYAY, A.; RAGHURAMAN, H. Application of fluorescence spectroscopy to membrane protein structure and dynamics. **Current Science**, v. 87, n. 2, p. 175–180, 2004.
- 81 CALORIMETRIA diferencial de varredura. 2010. Disponível em: <<http://www.malvern.com/br/products/technology/differential-scanning-calorimetry/>>. Acesso em: 30 abr. 2016.
- 82 AN, X. et al. Tropomyosin modulates erythrocyte membrane stability. **Blood**, v.109, n. 3, p.1284–1288, 2007.
- 83 MACDONALD, P. N. **Two-hybrid systems: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2001.
- 84 CRIEKINGE W. V.; BEYAERT, R. Yeast two-hybrid: state of the art. **Biological Procedures Online**, v. 2, n. 1, p. 1–38, 1999.

- 85 MERLINI, L.; DUDIN, O.; MARTIN, S. G. Mate and fuse: how yeast cells do it. **Open Biology**, v. 3, n. 3, 2013. doi: 10.1098/rsob.130008.
- 86 ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010. 1054 p.
- 87 BAUMGARTNER, U. et al. Functional analysis of the Zn(2)Cys(6) transcription factors Oaf1p and Pip2p : different roles in fatty acid induction of beta-oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 32, p. 22208-22216, 1999.
- 88 FROMONT-RACINE, M.; RAIN, J-C.; LEGRAIN, P. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. **Nature Genetics**, v.16, n.3, p.277–282, 1997.
- 89 MACEDO, J. N. A. **Estudos estruturais e funcionais de septinas humanas: a ligação e a hidrólise de GTP por SEPT3 e a busca por parceiros funcionais de SEPT1, SEPT5 e SEPT7**. 2010. 160 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 90 CHIEN, C. T et al. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, n. 21, p. 9578-9582, 1991.
- 91 SINGH, M. V.; WEIL, P. A. A method for plasmid purification directly from yeast. **Analytical Biochemistry**, v. 307, n. 1, p. 13-17, 2002.
- 92 DILLON, G. P. et al. Patterns of gene expression in schistosomes: localization by whole mount in situ hybridization. **Parasitology**, v. 134, Pt. 11, p. 1589-1597, 2007.
- 93 DRIN, G.; ANTONNY, B. Amphipathic helices and membrane curvature. **FEBS Letters**, v. 584, n. 9, p. 1840-1847, 2010. doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.022.
- 94 ELAZAR, M. et al. An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. **Journal of Virology**, v. 78, n. 20, p. 11393-11400, 2004.
- 95 EPAND, R. M. F. et al. Amphipathic helix and its relationship to the interaction of calcitonin with phospholipids. **Biochemistry**, v. 22, n. 22, p. 5074–5084, 1983.
- 96 OREN, Z.; SHAI, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. **Peptide Science**, v. 47, n. 6, p. 451-463, 1998.
- 97 SEGREST, J. P. et al. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. **Journal of Lipid Research**, v. 33, n. 2, p. 141-166, 1992.
- 98 TOSSI, A.; SANDRI, L.; GIANCASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, n. 1, p. 4-30, 2000.
- 99 ZHANG, L. et al. Investigating the interaction between peptides of the amphipathic helix of Hcf106 and the phospholipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta - biomembranes**, v. 1838, n. 1B, p. 413-418, 2014.
- 100 LUO, P.; BALDWIN, R. L. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: a framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. **Biochemistry**, v. 36, n. 27, p. 8413-8421, 1997.

- 101 URAN, S. et al. Analysis of phospholipid species in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: biomedical sciences and applications**, v. 758, n. 2, p. 265-275, 2001.
- 102 DOWHAN, W. Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? **Annual Review of Biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 199–232, 1997.
- 103 MURZYN, K.; RÓG, T.; PASENKIEWICZ-GIERULA, M. Phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 2, p. 1091-1103, 2005.
- 104 BROWN, D. A.; LONDON, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 14, p. 111-136, 1998. doi: 10.1146/annurev.cellbio.14.1.111
- 105 LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. **Science**, v. 327, n. 5961, p. 46–50, 2010.
- 106 DIETRICH, C. et al. Lipid rafts reconstituted in model membranes. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 3, p. 1417–1428, 2001.
- 107 LAWRENCE, J. C. et al. Real-time analysis of the effects of cholesterol on lipid raft behavior using atomic force microscopy. **Biophysical Journal**, v. 84, n. 3, p. 1827–1832, 2003.
- 108 BURKE, J. et al. Oriented circular dichroism: a method to characterize membrane-active peptides in oriented lipid bilayers. **Accounts of Chemical Research**, v. 49, n. 2, p. 184–192, 2016.
- 109 ESPALHAMENTO dinâmico de luz. 2010. Disponível em <<http://www.malvern.com/br/products/technology/dynamic-light-scattering/>>. Acesso em: 30 out. 2016.
- 110 DIFFERENTIAL scanning calorimetry studies of phospholipid membranes: the interdigitated gel phase, applications of calorimetry in a wide context - differential scanning calorimetry, isothermal titration calorimetry and microcalorimetry. 2009. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/applications-of-calorimetry-in-a-wide-context-differential-scanning-calorimetry-isothermal-titration-calorimetry-and-microcalorimetry/differential-scanning-calorimetry-studies-of-phospholipid-membranes-the-interdigitated-gel-phase>>. Acesso em: 30 out. 2016.
- 111 BASSO, L. G. M. et al. Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - biomembranes**, v. 1808, n. 1, p. 55–64, 2011.
- 112 DRAZENOVIC, J. et al. Effect of lamellarity and size on calorimetric phase transitions in single component phosphatidylcholine vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta - biomembranes**, v. 1848, n. 2, p. 532–543, 2015.
- 113 BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.
- 114 KUYPERS, F. A. et al. The distribution of erythrocyte phospholipids in hereditary spherocytosis demonstrates a minimal role for erythrocyte spectrin on phospholipid diffusion and asymmetry. **Blood**, v. 81, n. 4, p. 1051–1057, 1993.

- 115 WEI, S. et al. Characteristics of hemolytic activity induced by skin secretions of the frog *Kaloula pulchra hainana*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. 9, 2013.
- 116 DODGE, J. T.; MITCHELL, C.; HANAHAN, D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 100, n. 1, p. 119–130, 1963.
- 117 HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A. et al. Alterations in erythrocyte membrane protein composition in advanced non-small cell lung cancer. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 36, n. 3, p. 355–363, 2006.
- 118 HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H.; PETTIT, J. E. **Fundamentos em hematologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2006.
- 119 BASSO, L. G. M. **Interações de fármacos anti-malária com modelos de membrana**. 2009. 150 p. Dissertação (Mestrado em Física Básica) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- 120 BASSO, L. G. M.; MENDES, L. F. S.; COSTA FILHO, A. J. The two sides of a lipid-protein story. **Biophysical Reviews**, v. 8, p. 179-191, 2016. doi: 10.1007/s12551-016-0199-5.
- 121 ROBINSON, M. W. et al. A family of helminth molecules that modulate innate cell responses via molecular mimicry of host antimicrobial peptides. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1002042, 2011.
- 122 ROBINSON, M. W. et al. A helminth cathelicidin-like protein suppresses antigen processing and presentation in macrophages via inhibition of lysosomal vATPase. **FASEB Journal**, v. 26, n. 11, p. 4614–27, 2012.
- 123 SANIN, D. E.; MOUNTFORD, A. P. Sm16, a major component of *Schistosoma mansoni* cercarial excretory/secretory products, prevents macrophage classical activation and delays antigen processing. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, 2015. doi:10.1186/s13071-014-0608-1.
- 124 FASMAN, G. D. **Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules**. New York: Springer, 1996.
- 125 BEYCHOK, S. Circular dichroism of biological macromolecules. **Science**, v.9, n.154, p.1288-1299, 1966
- 126 WALLACE, B. A.; JANES, R. W. **Modern techniques for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy**. Amsterdam: IOS Press, 2009.
- 127 MILES, A. J.; WALLACE, B. A. Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins and applications in structural and functional genomics. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 1, p. 39-51, 2006.
- 128 WALLACE, B. A.; JANES, R. W. Circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy: tools for drug discovery. **Biochemical Society Transaction**, v. 31, Pt 3, p. 631-633, 2003.
- 129 BURKE, J. et al. Oriented circular dichroism: a method to characterize membrane-active peptides in oriented lipid bilayers. **Accounts of Chemical Research**, v. 49, n. 2, p. 184–192, 2016.

- 130 ZETASIZER NANO USER MANUAL. 2013. Disponível em <<https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20user%20manual.pdf>>. Acesso em: 23 dez. 2016.
- 131 KODRE, K. V. et al. Differential scanning calorimetry: a review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 3, p. 11-22, 2014.
- 132 CHIU, M. H.; PRENNER, E. J. Differential scanning calorimetry: an invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 39-59, 2011.
- 133 FREIRE, E. Differential scanning calorimetry. **Methods in Molecular Biology**, v.40, p.191–218, 1995. doi: 10.1385/0-89603-301-5:191.
- 134 SPINK, C. H.; JOHN, J. C.; DETRICH, H. W. Differential scanning calorimetry. **Methods in Cell Biology**; v. 84 p. 115–141, 2008. doi: 10.1016/S0091-679X(07)84005-2.
- 135 DEMETZOS, C. Differential scanning calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposome stability. **Journal of Liposome Research**, v.18, n. 3, p. 159–173, 2008.
- 136 CLAS, S. D.; DALTON, C. R.; HANCOCK B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 2, n. 8, p. 311–320, 1999.
- 137 CALLE, C. et al. Electron paramagnetic resonance spectroscopy. **International Journal for Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 763–766, 2001.
- 138 HOGG, N. Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 2, p. 122-129, 2010.
- 139 JUNK, M. J. N. Electron paramagnetic resonance theory. In: **Assessing the functional structure of molecular transporters by EPR spectroscopy**. Alemanha:Springer, 2012.cap. 2.
- 140 SAHU, I. D.; MCCARRICK, R. M.; LORIGAN, G. A. Use of electron paramagnetic resonance to solve biochemical problems. **Biochemistry**, v. 52, n. 35, p. 5967–5984, 2013.
- 141 MICROBIOLOGY LAB. **Schistosoma mansoni**. Disponível em: <http://www.easynotecards.com/print_list/36321>. Acesso em: 27 out. 2016
- 142 VECTOR BASE. **Biomphalaria spp.** Disponível em <<https://www.vectorbase.org/organisms/biomphalaria-glabrata>>.Acesso em: 27 out. 2016
- 143 DA SILVA, L. C.; CHIEFFI, P. P.; CARRILHO, F. J. Schistosomiasis mansoni – clinical features. **Gastroenterología y Hepatología**, v. 28, n. 1, p. 30–39, 2005.
- 144 UNIVERSITY OF YORK. **S. mansoni tegument**. Disponível em <<http://www.york.ac.uk/res/schisto/images/tegument.JPG>>. Acesso em: 29 out. 2016
- 145 TAJES, M. et al. The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it. **Molecular Membrane Biology**, v. 31, n. 5, p. 152–167, 2014.
146. LORENZÓN, E. N. et al. Effects of dimerization on the structure and biological activity of antimicrobial peptide Ctx-Ha. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n.6, 2012.

ANEXOS: ESPECIFICAÇÕES TEÓRICAS DAS PRINCIPAIS TÉCNICAS BIOFÍSICAS UTILIZADAS E SEQUENCIAS PRIMÁRIAS DE MEG-24 E MEG-27

ANEXO A - DICROÍSMO CIRCULAR

A técnica de Dicroísmo Circular (CD) é baseada nas diferenças de absorção de luz quando da sua passagem pela amostra. A luz possui campos magnéticos e elétricos, e quando polarizada, o campo elétrico (E) sofre uma oscilação sinusoidal em plano único. Ondas sinusoidais podem ser vistas como a resultante de dois vetores que oscilam em direções opostas, mas possuem o mesmo tamanho, gerando duas ondas circularmente polarizadas. Quando moléculas assimétricas interagem com a luz, ocorre a tendência a absorção de luz de luz circularmente polarizada de forma diferencial à esquerda e direita, além de produzir índices de refração diferenciados para as duas ondas.¹²⁴⁻¹²⁵

A utilização da técnica em estudos biológicos é possível, portanto, devido às propriedades de assimetria macromolecular de grupos quirais, como por exemplo, em proteínas que são formadas por grupos de aminoácidos quirais. O termo quiralidade é definido como imagens que não são sobreponíveis quando espelhadas. Quando a luz polarizada passa pela amostra, as diferenças de absorção devido a quiralidade da amostra, possibilita a obtenção de um espectro de dicroísmo circular e a interpretação do sinal em termos estruturais.¹²⁶ A fórmula representativa da técnica de CD está na equação:

$$\Delta A = A_L - A_R,$$

onde A_L e A_R representam a luz polarizada à esquerda e direita, respectivamente.

Em moléculas quirais, $A_L = A_R$, e portanto, $\Delta A = 0$, ou seja, não há sinal de CD, e o oposto ocorre com moléculas aquirais, com $\Delta A \neq 0$, pois em determinados comprimentos de onda, $A_L \neq A_R$. A diferença é aumentada eletronicamente –instrumentalmente- para que ocorra a detecção.⁷² A produção do sinal do CD ocorre pela absorção diferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita advinda da excitação de elétrons nos estados fundamentais para o estado excitado. Em proteínas, os grupos funcionais passíveis de serem excitados são as ligações peptídicas, originando transições eletrônicas detectáveis. Essas ligações formam estruturas secundárias, fornecendo informação sobre a estrutura proteica. Estruturas de α -hélice, por exemplo, produzem dois picos negativos em 222 nm e 208 nm, e um pico positivo em 190 nm; já estruturas em folhas- β apresentam picos em 215 nm e 200 nm, negativo e positivo, respectivamente (Figura Anexo 1).¹²⁴⁻¹²⁶

O padrão de comprimento de onda de luz para medidas em CD convencional é medido na faixa de *UV-distante*, faixa na qual os picos referentes a conformação das cadeias peptídicas dominam. Alterações conformacionais que ocorrem na região de *UV-vácuo* (< 190 nm) não são detectadas em equipamentos convencionais, somente em equipamentos com uma fonte de luz com alta energia, como é o caso da radiação Sincrotron. Relatos da literatura mostram que alterações conformacionais importantes podem ocorrer na região de UV-vácuo, diferenciando estruturas e aumentando a resolução dos espectros obtidos (figura Anexo 1).¹²⁶⁻¹²⁷

Figura A 1 - Espectros típicos de dicroísmo circular. A região verde destaca informações adicionais obtidas em SRCD em comparação com a técnica convencional. Espectro vermelho: α -hélice, amarelo: desordenado azul: folhas- β .

Fonte: Adaptada de MILES; WALLACE.¹²⁷

A utilização de SRCD para estudos com proteínas complexas, na presença de membranas ou composições que causam espalhamento de luz e absorção alta em comprimentos de onda menores que 190 nm, resulta em dados com maior resolução e mais informações estruturais. Esta limitação da utilização de CD convencional é diminuída, entretanto, em experimentos com membranas em filmes desidratados, pois a remoção da água diminui a absorção na região abaixo de 190 nm, possibilitando que o uso de CD convencional em filmes secos seja viável.¹²⁷⁻¹²⁸

A utilização de filmes secos para estudos de dicroísmo circular permite a obtenção de informações estruturais de macromoléculas fora de solução, como por exemplo, inseridas em camadas de lipídios orientadas macroscopicamente. Através de um tipo de experimento denominado CD Orientado, é possível, pela observação das alterações da forma da linha dos espectros, inferir a forma como a proteína em questão está inserida na membrana. Assim, a orientação da proteína na membrana pode ser investigada, possibilitando a interpretação do modo de interação do peptídeo na membrana (figura Anexo 2).¹²⁹

Figura A 2 - Dicroísmo Circular Orientado. Padrão de espectros característicos de diferentes orientações da proteína em uma bicamada lipídica. Três estados com espectros característicos são definidos: S-state, ligação na superfície da membrana e orientação paralela à superfície; T-state, proteína se insere na membrana em orientação inclinada com relação à cadeia lipídica; I-state, inserção da proteína na membrana em uma orientação transmembrana, ou seja, com o eixo da hélice perpendicular à superfície da bicamada lipídica.

Fonte: Adaptada de BURKE et al.¹²

ANEXO B - ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DYNAMIC LIGHT SCATTERING – DLS)

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é um tipo de espectroscopia que mede as flutuações dinâmicas da luz em uma solução contendo partículas em movimento. Como resultado do movimento browniano dessas partículas, ocorrem alterações no padrão de espalhamento da luz. Quanto maior a partícula, mais lento é seu movimento em solução. Desta forma, o tamanho das partículas pode ser determinado através da análise da equação de Stokes-Einstein (**equação 1**) que conecta e relaciona os coeficientes de difusão medidos pelo DLS com o tamanho da partícula, utilizando os parâmetros Coeficiente de Difusão (**D**), Constante de Boltzmann (**k**), temperatura (**T**), viscosidade (**η**), e o raio hidrodinâmico da partícula (**R**). A técnica é usualmente utilizada para análise de nanopartículas, incluindo proteínas. O grau de homogeneidade da amostra é medido em função da polidispersividade, sendo que valores baixos estão associados à elevados graus de homogeneidade, podendo indicar apenas um estado oligomérico na amostra.¹³⁰

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (1)$$

ANEXO C - CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY- DSC)

A Calorimetria Diferencial de Varredura é uma técnica termoanalítica utilizada para inferir informações sobre a termodinâmica de compostos. Pode ser utilizada, dentre outros, para estudos de interação de proteínas e modelos de membrana, medindo a alteração da estrutura e estabilidade dessas moléculas.

O princípio da técnica envolve conceitos de termodinâmica, onde celas que carregam amostra e referência (controle) são submetidas a alterações de temperatura com taxa controlada e constante e sob pressão constante. A diferença da quantidade de calor absorvida pela amostra e pela referência é medida e registrada em função da temperatura. Inicia-se preenchendo ambas as celas, uma com a amostra de interesse e outra com a solução controles (branco, contendo apenas o tampão).¹³¹ Eventos termodinâmicos diferenciados nas celas geram um gradiente térmico (fluxo de calor) que é medido em unidades de potência. Enquanto os eventos em ambas as células são iguais, um fluxo linear de fornecimento de calor (igual em ambas as celas) pelo equipamento ocorre. Contudo, se uma das celas (cela de amostra, por exemplo) passa por um evento térmico (endotérmico ou exotérmico), o calorímetro intensifica o fornecimento de calor para a cela que apresentou alteração a fim de igualar a diferença de temperatura gerada pelo evento térmico, retornando o ΔT para 0 °C. Tais eventos endotérmico ou exotérmico são identificados por deflexões positivas ou negativas e frequentemente correlacionados a transição de fase da amostra sendo estudada. Durante a transição, o calorímetro ajusta a taxa de fornecimento de calor para as celas de tal forma a manter nula a diferença de temperatura entre elas. Ao fim da transição, a linearidade dos eventos se restabelece enquanto as amostras apresentarem o mesmo comportamento termodinâmico.¹³²⁻¹³³ A resposta termodinâmica do sistema é ilustrada graficamente em uma curva com fluxo de calor diferencial vs. Temperatura e cujo gráfico é denominado termograma (**figura Anexo 3**). A área do gráfico (integral) representa a variação de entalpia da transição. Para experimentos com lipídios ou modelos de membrana, é importante analisar alguns parâmetros como a temperatura de transição de fase (T_M) e o grau de cooperatividade das moléculas, que fornecem informações importantes sobre os acontecimentos moleculares na amostra. Ambas informações são inferidas pela análise do gráfico, sendo que o T_M é geralmente representado pelo valor máximo atingido, e o grau de cooperatividade é dado pela largura à meia altura da transição, indicado pela seta laranja na figura 24. Quanto menor a largura da transição, mais cooperativa é a transição de fase da

amostra de interesse (proteína ou lipídio). Desta forma, o grau de cooperação intermolecular da amostra de interesse pode ser inferido.¹³⁴⁻¹³⁶

A técnica de DSC permite a detecção de alterações físicas (desenovelamento de proteínas, transições de fase lipídicas, etc.) dentro de um sistema que sofre mudanças termodinâmicas na presença de agentes de interação, sendo amplamente utilizada em experimentos envolvendo proteínas e lipídios.^{132,136} Neste trabalho, utilizamos a técnica para investigar alterações termodinâmicas em modelos de membranas e em membranas biológicas induzidas pelos peptídeos de interesse, a fim de estabelecer os efeitos por eles causados.

Figura C1 - Gráfico típico hipotético de DSC. Fluxo de calor diferencial vs. temperatura. A linha descontínua preta indica o pico da transição, onde se determina o T_m . A seta laranja indica a largura da transição medida à meia altura do termograma, chamada de $T_m1/2$. A integração da curva, representada pela área hachurada em cinza no gráfico, representa a variação de entalpia da transição.

Fonte: Adaptada de KODRE et al.¹³¹

ANEXO D - RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

A técnica de RPE consiste na análise espectroscópica para detecção de espécies paramagnéticas. Estas espécies possuem elétrons desemparelhados, ou seja, moléculas que possuem momento magnético não nulo associado ao spin eletrônico. Desta forma, tais moléculas se comportam como um ímã quando na presença de um campo magnético externo, ou seja, tendem a se alinhar na direção do campo magnético aplicado. Os marcadores utilizados e o modo de uma possível interação entre marcador e membrana podem ser observados na Figura Anexo 4. Como toda forma de espectroscopia, RPE também se baseia na absorção de energia de uma radiação eletromagnética pela molécula quando ocorrem transições entre diferentes estados. No caso de RPE, a radiação eletromagnética utilizada se encontra na faixa de micro-ondas e os diferentes estados eletrônicos podem ser pensados classicamente (como um ímã) como estados cujos momentos magnéticos associados estão alinhados paralela ou antiparalelamente à direção do campo magnético aplicado. Assim, transições entre os dois estados do spin eletrônico, gerados através da aplicação de um campo magnético externo, são induzidas através da aplicação de radiação de micro-ondas em frequência específica. Este é o chamado fenômeno de ressonância. Moléculas paramagnéticas distintas podem produzir espectros de RPE característicos.⁸⁵⁻⁸⁶ Assim, alterando as condições do microambiente da molécula em questão, obtém-se espectros informativos relativos a essas alterações.

O espectro de RPE somente é obtido para moléculas que possuem um centro paramagnético. Para a análise de moléculas diamagnéticas, ou seja, àquelas que naturalmente não possuem elétrons desemparelhados, são utilizados marcadores de spins, que são moléculas acopladas a um radical livre paramagnético, usualmente radicais nitróxidos. Tais moléculas podem ser inseridas a moléculas biológicas diamagnéticas como proteínas e lipídios e são capazes de reportar alterações que ocorrem em sua vizinhança, funcionando, pois, como “sondas” de spin para regiões específicas das moléculas diamagnéticas.¹³⁷⁻¹³⁸

Neste trabalho, utilizamos a técnica de RPE para detectar alterações em um sistema biológico de membrana celular. Utilizamos fosfolipídios marcados com radicais nitróxidos em diferentes posições da cadeia acila. Desta forma, alterações em diferentes regiões da bicamada lipídica foram monitoradas na ausência e na presença dos peptídeos.¹³⁸⁻¹⁴⁰

O objetivo da utilização desta técnica foi a investigação de possíveis alterações na estrutura e na dinâmica de membrana biológicas induzidas pela presença de peptídeos. Nosso objetivo não foi uma análise física matemática complexa da interação peptídeo-membranas, pois membranas biológicas possuem diversos componentes que influenciam em sua estrutura e

dinâmica, mas sim, um estudo comparativo dos efeitos causados pelos peptídeos em regiões específicas da bicamada lipídica. Portanto, uma descrição teórica da técnica assim como uma análise matemática dos efeitos observados não serão discutidos neste trabalho. Todavia, a descrição teórica pode ser consultada nas referências 119 e 120 deste trabalho.

Figura D 1 - Marcadores de Spin. **A.** Radical Nitróxido. O elétron desemparelhado da ligação destacada fornece o paramagnetismo a amostra. **B.** Estruturas utilizadas neste trabalho **C:** Esquematisação da marcação da membrana com molécula de 16-PC.

Fonte: A: Elaborada pela autora; B: STABLE ...¹⁴⁶; C: BASSO¹²⁰

ANEXO E – SEQUÊNCIAS PRIMÁRIAS MEG-27 E MEG-24

As sequências primárias de ambos peptídeos trabalhados nesse estudo estão apresentadas abaixo. Os aminoácidos sublinhados representam a região que compõe a hélice anfipática.

MEG-27IKWVNCSHELNEHTSETSLRRWIHTVFSFLHNF**MEG-24**AAVILHPKYEMMTFTEKLRFYFRCLVKVLCHMIRLG YIGPLSDYYVH