



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Ana Elisa de Moraes Lejtman

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO DE
PEPTÍDEOS PENETRADORES DE CÉLULAS COM MEMBRANAS
BIOMIMÉTICAS**

Trabalho de conclusão de curso

Brasília – DF

2019/1



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Ana Elisa de Moraes Lejtman

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO DE
PEPTÍDEOS PENETRADORES DE CÉLULAS COM MEMBRANAS
BIOMIMÉTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso em
Química apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de Brasília,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Química.

Orientador(a): Dr. Guilherme Dotto Brand

2019/1

Agradecimentos

Agradeço a todos que, de alguma maneira, ajudaram no desenvolvimento e na execução deste trabalho, dentre os quais devo mencionar:

O professor Guilherme Dotto Brand, por prontamente me aceitar como orientanda, me ajudando desde o desenvolvimento do trabalho – que se baseou extensamente em suas próprias pesquisas – até sua execução, sempre pronto para esclarecer minhas dúvidas e me ensinar sobre as técnicas pertinentes ao trabalho. Tenho-o como exemplo de pesquisador, e levarei seus ensinamentos por todas as minhas pesquisas futuras.

Todos do LSAB, em especial a Michelle, o José, o Thiago e o Éder, que me ajudaram em etapas cruciais para o andamento do trabalho, como síntese, purificação, quantificação, caracterização, entre outras.

José Roberto Leite, por disponibilizar o Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada (*NuPMIA - FS*) para a realização das análises cromatográficas, e principalmente a Andreanne por me ensinar e auxiliar em tais análises.

Carlos Bloch Jr., por possibilitar a realização das análises calorimétricas e espectrofotométricas no Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Em especial, devo mencionar o José Cardozo, do Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pois sem sua ajuda a realização do trabalho não seria possível. Sou imensamente grata pela sua ajuda na execução do trabalho, pela paciência em seus ensinamentos e por me passar sua vasta experiência na realização das técnicas usadas no trabalho.

Todos os que foram meus professores durante o curso, por me passarem algo tão importante quanto o conhecimento.

A professora Aline Lima de Oliveira Paterno e o professor Antônio Francisco Pereira de Araújo, por aceitarem participar dessa importante etapa para a minha formação.

Minha família, por sempre apoiar minhas decisões e me dar todo o suporte necessário para que eu possa pô-las em prática.

Meus amigos da UnB, em especial Eduardo, Izabella, Eric, Isabelle e André, por transformar minha experiência durante a graduação em momentos que lembrei com bastante carinho.

O Arthur, por tudo.

A todos, registro o meu sincero obrigada.

SUMÁRIO

Tabela de Aminoácidos	I
Lista de abreviaturas	II
Resumo	III
Abstract	IV

1 – Introdução	1
-----------------------	----------

1.1 – As classes de peptídeos membrano-ativos	1
1.2 – Propriedades gerais dos peptídeos membrano-ativos	2
1.3 – Peptídeos penetradores de célula (CPPs)	3
1.4 – Classificação experimental de peptídeos membrano-ativos	4
1.5 – Extravasamento de material fluorescente	5

2 – Objetivos	6
----------------------	----------

3 – Revisão Teórica	7
----------------------------	----------

3.1 – Peptídeos penetradores de célula	7
3.2 – Membranas plasmáticas e biomiméticas	14
3.3. Propriedades físico-químicas relevantes a interação de peptídeos membrano-ativos e seus alvos	16
3.4 – Síntese de peptídeos em fase sólida	20
3.5 – Estudo da interação de CPPs com membranas biomiméticas	21
3.6 – Sistema de classificação experimental de peptídeos	26
3.7 – Ensaios com extravasamento de Carboxifluoresceína	28

4 – Metodologia	31
------------------------	-----------

4.1 – Síntese de peptídeos em fase sólida	31
4.2 – Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	34
4.3 – Caracterização dos peptídeos por Espectrometria de Massa (MS)	34
4.4 – Quantificação dos peptídeos sintetizados	34

4.5 – Síntese de vesículas fosfolipídicas	35
4.6 – Testes de interação de CPPs com membranas fosfolipídicas	35
4.7 – Estudo de Dicroísmo Circular	36
4.8 – Experimentos de Extravasamento de Carboxifluoresceína	37
4.9 – Análises Estatísticas	38

5 – Resultados e discussão **39**

5.1 – Síntese e purificação dos CPPs	39
5.2 – Caracterização dos CPPs por MS	41
5.3 – Quantificação dos peptídeos sintetizados	48
5.4 – Estruturação dos peptídeos quando em interação com membranas modelo	48
5.5 – Testes de interação de CPPs com membranas fosfolipídicas	52
5.6 – Inserção em um sistema de classificação experimental de peptídeos	59

6 – Conclusões **63**

Referências

Tabela de aminoácidos

Aminoácido	Símbolo de uma letra	Símbolo de três letras	Massa monoisotópica
Ácido aspártico	D	Asp	115,026
Ácido glutâmico	E	Glu	129,042
Alanina	A	Ala	71,037
Arginina	R	Arg	156,101
Asparagina	N	Asn	114,042
Cisteína	C	Cys	103,009
Fenilalanina	F	Phe	147,068
Glicina	G	Gly	57,021
Glutamina	Q	Gln	128,058
Histidina	H	His	137,058
Isoleucina	I	Ile	113,084
Leucina	L	Leu	113,084
Lisina	K	Lys	128,094
Metionina	M	Met	131,04
Prolina	P	Pro	97,052
Serina	S	Ser	87,032
Tirosina	Y	Tyr	163,063
Treonina	T	Thr	101,047
Triptofano	W	Trp	186,079
Valina	V	Val	99,068

Lista de abreviaturas

AMP - Antimicrobial Peptide, em português, Peptídeo Antimicrobiano

CPP – Cell-penetrating peptide, em português, Peptídeo penetrador de célula

PAT – Pre-amyloid toxins, em português, Toxinas pré-amilóide

IAP - Intragenic Antimicrobial Peptide, em português, Peptídeo Antimicrobiano Intragênico

SPPS – Solid Phase Peptide Synthesis, em português, Síntese de peptídeo em fase sólida

DCM - Diclorometano

DMF - Dimetilformamida

DIC - Diisopropilcarbodiimida

HPLC – High performance liquid chromatography, em português, Cromatografia líquida de alta eficiência

MS – Mass Spectrometry, em português, Espectrometria de Massa

TFA - Trifluoroacetic Acid, em português, ácido trifluoro acético

DSC – Differential Scanning Calorimetry, em português, Calorimetria Diferencial de Varredura

CD – Circular Dichroism, em português, Dicroísmo Circular

CF – Carboxifluoresceína

HIV – Human Immunodeficiency Virus, em português, Vírus da imunodeficiência Humana

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DMPC – 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DMPG - 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-glicerol

LUVs – Vesículas grandes unilamelares, do inglês large unilamellar vesicles

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RPE – Ressonância Paramagnética Eletrônica

SFG – Espectroscopia por geração de soma de frequências

ATR-FTIR – Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier

Resumo

O presente trabalho trata do estudo da interação de peptídeos membrano-ativos, em especial peptídeos penetradores de célula (CPPs) com membranas modelo, visando o enriquecimento de um sistema de classificação de peptídeos quanto à sua atividade biológica, de modo a tornar possível a predição *in silico* de novos peptídeos com capacidade penetradora. Para tal, foram escolhidos para estudo dois peptídeos já descritos na literatura como CPPs, o TAT e Pep-1, que foram sintetizados e tiveram suas interações com vesículas unilamelares de DMPC e de 2:1 DMPC:DMPG estudadas por técnicas biofísicas como CD e DSC. Estas técnicas permitiram a obtenção de um perfil de interação desses CPPs com membranas modelo, que foram então inseridos num sistema de classificação de peptídeos previamente desenvolvido. Com isso, foi possível observar que peptídeos penetradores de membrana como a Penetratina e o Pep-1 de fato apresentam um padrão de interação similar, o que pode possibilitar, a partir de estudos mais extensos, a predição dessa capacidade penetradora para peptídeos com atividade biológica desconhecida, de acordo com esse sistema de classificação desenvolvido.

Palavras-chaves: Cell-Penetrating Peptides, DSC, TAT

Abstract

The present work describes the study of the interaction of membrane-active peptides – particularly cell-penetrating peptides (CPPs) – with model membranes, aiming the enrichment of a classification system for membrane active peptides, according to their bioactivity, allowing *in silico* prediction of the penetrating capability of novel peptides. For this study, two peptides were chosen, TAT and Pep-1, already described as CPPs in the literature. The CPPs were manually synthesized by solid phase procedure and had their interaction with DMPC and 2:1 DMPC:DMPG large unilamellar vesicles studied by two biophysical techniques: differential scanning calorimetry (DSC) and circular dichroism (CD). The biophysical data obtained with these techniques were inserted into a classification system for peptides, previously developed and described in the literature. The results showed that CPPs Pep-1 and Penetratin induce similar alterations in the main phase transition of model phospholipid membranes. Such observation can be used to categorize novel molecules with unknown biological activity, according to the alterations they cause in the main phase transition of model membranes.

Keywords: Cell-Penetrating Peptides, DSC, TAT

1 – Introdução

1.1 – As classes de peptídeos membrano-ativos

Três classes de peptídeos membrano-ativos são comumente encontradas na natureza e são classificadas de acordo com sua aparente atividade inicial. Peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês “antimicrobial peptide”) são componentes do sistema imune inato de animais e agem causando a ruptura de membranas microbianas, levando à morte celular. Peptídeos amilóides (PATs, do inglês “preamyloid toxins”) contribuem com a patologia de diversas doenças, de Alzheimer a diabetes tipo 2. Estados “pré-amilóide” desses peptídeos podem atuar como toxinas mediante a nucleação das membranas celulares. Peptídeos penetradores de células (CPPs, do inglês “cell-penetrating peptides”) possuem sequências curtas – naturais ou artificiais – e são capazes de penetrar membranas espontaneamente sem a indução de lise celular (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013). Apesar de algumas diferenças em sequência e estrutura secundária, esses peptídeos membrano-ativos compartilham similaridades quanto às suas propriedades físico-químicas, o que indica sobreposição destas classes (BRAND et al., 2018).

Em um artigo publicado em 2013, Last e colaboradores (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013) examinam a interação de pequenos peptídeos anfíflicos com membranas biológicas. Tais interações cobrem a base física da citotoxicidade causada por PATs em diversas doenças. Também são bastante relevantes no campo dos AMPs, pois compreender suas propriedades e mecanismos é vital dado o crescente surgimento de patógenos resistentes à antibióticos. Por fim, tais interações são críticas no comportamento de CPPs, cuja capacidade de transportar cargos ou acessar compartimentos intracelulares é central à sua atividade. Essa propriedade determinante de CPPs vêm ganhando importância dado que tais proteínas estão sendo desenvolvidas para atuarem como vetores de diversas moléculas para terapia genética.

Last e colaboradores mostram que essas três classes aparentemente distintas apresentam grandes similaridades em relação às suas propriedades físico-químicas. As propriedades físico-químicas de CPPs, por exemplo, soam bastante familiares para quem

estuda AMPs ou PATs, sendo que essas três classes diferem apenas no tipo de efeito que induzem ao interagir com membranas celulares.

1.2 – Propriedades gerais dos peptídeos membrano-ativos

Um conjunto amplo e bem definido de proteínas amilóides, antimicrobianas, e peptídeos penetradores de célula são anfifílicos, curtos (<50 aminoácidos), e prontamente solúveis em água e ambientes de membrana. Tipicamente, não apresentam estrutura definida quando em solução, mas passam por uma transição quando se associam a membranas, o que promove a formação de uma estrutura secundária do tipo α -hélice ou folha-beta, tipicamente anfifílicas. Tal caráter anfifílico permite que os peptídeos se liguem às membranas de modo que inicialmente se intercale entre os grupamentos cabeça da camada fosfolipídica (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013).

Esse processo inicial de adsorção geralmente resulta na orientação paralela desses peptídeos em relação ao plano da bicamada, com o lado polar da hélice voltada para os grupamentos cabeça, enquanto o lado apolar fica virado para a porção acil dos fosfolipídeos (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013).

As orientações resultantes dessas interações com membranas têm sido estudadas em diversos sistemas, usando-se diferentes meios de análise. Por exemplo, foi descoberto que a orientação do AMP “cecropina A” é paralela à superfície da bicamada fosfolipídica, através do uso da técnica de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) no estado sólido (MARASSI et al., 1999). Similarmente, medidas utilizando-se RPE (ressonância paramagnética eletrônica) de sistemas com peptídeos amiloides “a-synuclein” ligados a membranas indicaram orientação paralela do peptídeo em relação à superfície da bicamada fosfolipídica (APOSTOLIDOU; JAYASINGHE; LANGEN, 2008). Em contraste, uma análise combinando espectroscopia SFG (espectroscopia por geração de soma de frequências) e espectroscopia ATR-FTIR (espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier, do inglês “attenuated total reflectance” e “Fourier-transform infrared spectroscopy”) indicou que o CPP Pep-1 se orienta perpendicularmente à superfície da bicamada fosfolipídica, quando em baixa concentração (DING; CHEN, 2012).

O grau de curvatura da membrana é capaz de alterar a orientação de ligação dos peptídeos à mesma, levando a diversos modos de ligação, ou até mesmo a um modo dinâmico de ligação. Um conjunto de fenômenos combinados é associado com a interação desses peptídeos com a membrana, incluindo: adsorção/dessorção lateral, oligomerização, extravasamento e translocação. Oligomerização é geralmente identificada indiretamente. Adsorção à membrana em geral leva a uma mudança na estrutura secundária, que pode ser observada por CD (dicroísmo circular, do inglês “circular dichroism”) ou por espectroscopia de infravermelho (KNIGHT; HEBDA; MIRANKER, 2006).

1.3 – Peptídeos penetradores de célula (CPPs)

A capacidade de peptídeos catiônicos em atravessar a bicamada de um sistema celular foi primeiramente observada em um estudo conduzido em 1965 usando poliarginina e histonas (RYSER; HANCOCK, 1965). Tal estudo levou à descoberta dos CPPs e, desde então, é reconhecido que, apesar de membranas serem relativamente impermeáveis a cátions inorgânicos, estruturas anfifílicas mostram alta capacidade membrano-ativa e de translocação.

Os CPPs são o foco do presente trabalho. Como o nome já diz, tais peptídeos são capazes de penetrar a membrana celular espontaneamente e, mais importantemente, são capazes de facilitar a entrada/saída de moléculas que não apresentam a mesma capacidade. Isso porque um CPP não perde sua característica penetradora mesmo com uma molécula acoplada a ele, podendo atuar então como carreador de moléculas não-penetradoras. Moléculas carregadas por CPPs são chamadas, em inglês, de “cargo”, e podem se associar com CPPs por meio de ligações covalentes ou apenas por interações intermoleculares (MILLETTI, 2012).

Existe uma grande variedade de moléculas que podem ser carreadas por CPPs. Além disso, por apresentarem um mecanismo de carreamento intracelular versátil, os CPPs são aplicados em algumas áreas da medicina e são apropriados para pesquisas científicas (MILLETTI, 2012). No entanto, o uso de CPPs ainda é limitado devido à baixa especificidade de células-alvo e também devido à pouca compreensão sobre os

mecanismos de translocação dos peptídeos através da membrana (MILLETTI, 2012), apesar de já existirem alguns estudos que comprovem a especificidade na atividade de CPPs em relação à células cancerosas, por exemplo.

Quanto à sua estrutura primária, CPPs geralmente apresentam relativa abundância de aminoácidos carregados positivamente – como lisina e arginina –, bem como estruturas geralmente anfifílicas, o que facilita sua translocação através da membrana (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013).

1.4 – Classificação experimental de peptídeos membrano-ativos

Dada a sobreposição funcional e de características físico-químicas de AMPs, CPPs e PATs, foi recentemente introduzido um sistema de classificação experimental de moléculas membrano-ativas. Tal metodologia, desenvolvida por Brand e colaboradores (BRAND et al., 2018), tem por base um método de predição de atividade de fragmentos proteicos por Calorimetria diferencial de varredura (DSC, do inglês “Differential Scanning Calorimetry”), a partir da análise do efeito de peptídeos na transição de fase de membranas fosfolipídicas modelo.

De forma geral, fosfolipídeos quando organizados em estruturas coesas – como em uma membrana ou na forma de vesículas – tendem a apresentar um comportamento associado a um fenômeno térmico dito como transição de fase. Esse comportamento envolve a conversão da estrutura da vesícula de uma forma de gel a uma estrutura líquido-cristalina. As cadeias de hidrocarbonetos dos lipídeos são convertidas de uma estrutura rígida, estendida, dominada por conformações *anti* para um estado de orientação desordenada caracterizada pela presença de conformações *gauche* (MCELHANEY, 1982).

Tal estudo (BRAND et al., 2018) mostrou que AMPs apresentam um comportamento característico em relação aos efeitos na transição de fase de membranas modelo, de modo a possibilitar que novos peptídeos que apresentem o mesmo comportamento, isto é, que apresentem o padrão de interação característico de AMPs, sejam então classificados como AMPs.

O mesmo princípio pode ser usado na tentativa de desenvolvimento de uma metodologia preditiva que incorpore os peptídeos penetradores de célula, os CPPs. Para tal, basta que estes apresentem um padrão de interação característico, de modo que novos peptídeos, que compartilhem o mesmo padrão de interação, possam também ser classificados como CPPs.

1.5 – Extravasamento de material fluorescente

O extravasamento induzido de material intracelular tem sido observado tanto para membranas artificiais quanto para células vivas e tem se mostrado um método eficaz no estudo de mecanismos de perturbação da membrana, como meio da verificação da atividade do peptídeo.

Por exemplo, medidas de extravasamento de supressores fluorescentes contidos em lipossomas sintéticas mostram que a proteína amilóide “amilina” forma poros instáveis indefinidamente nas lipossomas (LAST; RHOADES; MIRANKER, 2011), eliminando mecanismos transitórios de permeabilização como “carpeting”, por exemplo.

De maneira similar, o mesmo método mostrou que o AMP “cecropina A” induz extravasamento de um maneira “tudo-ou-nada”, traduzido do termo em inglês “all-or-nothing”, usado para descrever um extravasamento que não ocorre de maneira gradual, e sim de maneira abrupta, partindo do não extravasamento para o total extravasamento, como consequência da ruptura da membrana sintética (GREGORY et al., 2008).

Em contraste, observa-se o extravasamento gradativo do supressor fluorescente contido na lipossomas quando expostas ao CPP “transportan 10” (ou tp10), indicando que o peptídeo não causa lise celular (YANDEK et al., 2007).

2 – Objetivos

2.1 – Objetivos Gerais

O presente estudo teve como objetivo a síntese, purificação e a avaliação da interação de dois peptídeos penetradores de célula obtidos a partir da literatura com membranas biomiméticas, mais especificamente vesículas unilamelares grandes (LUVs) de fosfolipídeos. Tais dados foram incorporados a um sistema de predição experimental de peptídeos membrano-ativos, visando tornar possível a predição *in silico* de novos peptídeos com capacidade de penetração em células.

2.2 – Objetivos Específicos

- 1) Sintetizar dois peptídeos, o TAT e o Pep-1, pelo método SPPS;
- 2) Purificá-los utilizando a técnica de HPLC;
- 3) Caracterizá-los quanto sua estrutura primária, usando-se Espectrometria de Massa (MS);
- 4) Realizar ensaios para verificar a interação dos peptídeos com vesículas lipídicas compostas de 14:0 PC (DMPC) e 14:0 PG (DMPG), com o auxílio da técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC);
- 5) Conduzir experimentos com Extravasamento de Carboxifluoresceína (CF) em vesículas lipídicas;
- 6) Obter um perfil de interação característico de CPPs;
- 7) Inserir os dados obtidos para os peptídeos em estudo num esquema de predição de peptídeos membrano-ativos, de modo que se torne possível prever quais peptídeos apresentarão a mesma característica penetradora.

3 – Revisão Teórica

3.1 – Peptídeos penetradores de célula

Peptídeos resultam da polimerização de aminoácidos por meio de uma reação de condensação. A ligação covalente CONH formada entre aminoácidos é denominada “ligação peptídica”. Em geral, peptídeos apresentam estrutura linear, onde uma das extremidades da cadeia termina com um resíduo de aminoácido que tem um grupo $-\text{NH}_3^+$ livre (à esquerda) e outra extremidade que termina com um grupo $-\text{CO}_2^-$ livre (à direita), conferindo um senso de direcionalidade a tais biomoléculas, conforme demonstrado na Figura 1 (NELSON; COX, 2013).

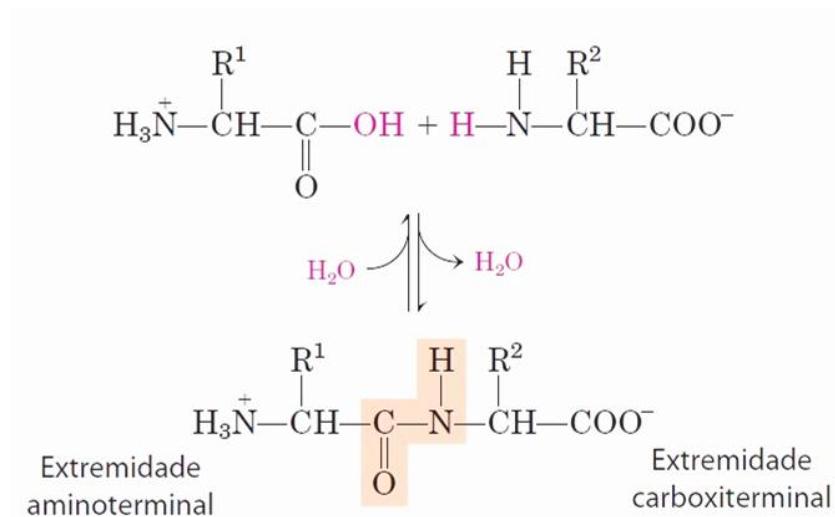


Figura 1: Formação de uma ligação peptídica por condensação. Os peptídeos são nomeados a partir do resíduo amino terminal (ADAPTADA) (NELSON; COX, 2013)

Peptídeos penetradores de células são moléculas com a capacidade intrínseca de se translocar por membranas biológicas. Tal capacidade foi notada pela primeira vez indiretamente, em 1965, como uma propriedade da poliarginina e de histonas aplicadas exogenamente à culturas celulares (RYSER; HANCOCK, 1965). A relação dessa propriedade com o enovelamento protéico foi descoberta em 1984, quando também se observou que o apocitocromo C podia se translocar espontaneamente através da bicamada em um sistema lipossomal sintético (DUMONT; RICHARDS, 1984). Estudos relacionados aos CPPs surgiram como resultado da observação de que tais peptídeos mantinham sua propriedade penetradora mesmo acoplados a outros materiais, sendo

denominados “carreadores”. O primeiro peptídeo a demonstrar tal capacidade foi o peptídeo policatiônico do HIV, o TAT. Diversos CPPs curtos foram desde então identificados, sendo artificiais ou ocorrendo naturalmente (MILLETTI, 2012).

A gama de materiais que podem ser carreados (chamados em inglês de “cargos”) por CPPs é consideravelmente ampla, variando de pequenas moléculas a trechos polianiônicos de DNA (figura 2). Essa capacidade é o que torna os CPPs interessantes, pois frequentemente os “cargos” são consideravelmente maiores que os seus carreadores e/ou consideravelmente mais membrano-impermeáveis. Por isso, tais peptídeos representam um mecanismo versátil para carreamento intracelular, apropriado para pesquisas científicas básicas e terapêuticas. De fato, diversos testes clínicos estão ocorrendo atualmente, envolvendo CPPs como carreadores (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013).

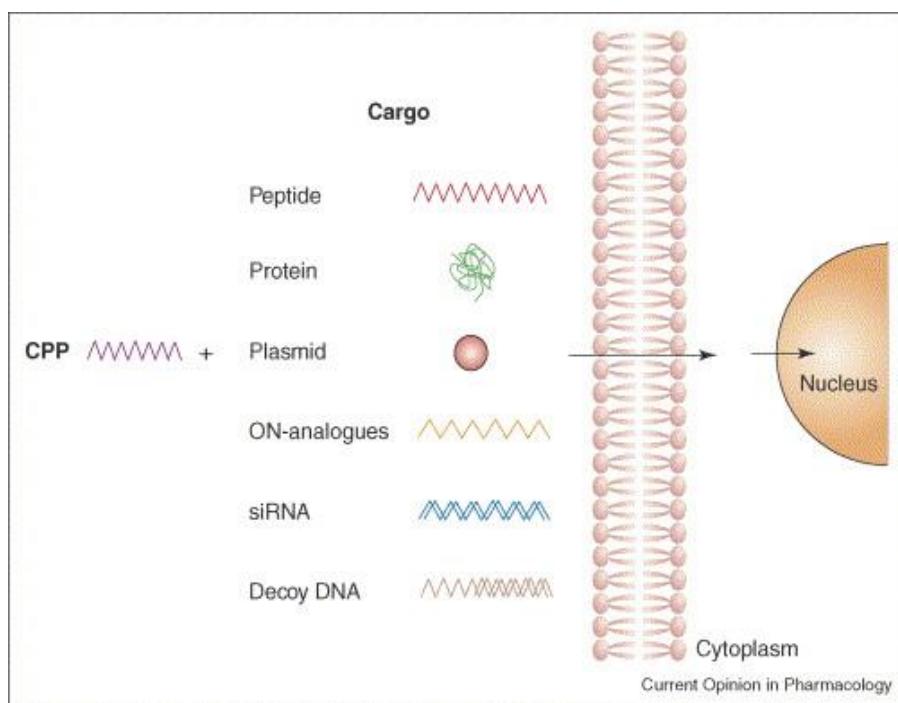


Figura 2: Aplicações de CPPs quanto ao transporte de "cargos". Mecanismos de entrada ainda estão sendo debatidos, no entanto, geralmente a entrada de CPPs na célula é realizada por meio de endocitose (MÄE; LANGEL, 2006)

Atualmente o uso é limitado pois os CPPs apresentam baixa especificidade ao carrearem materiais às células. Além disso, pouco se conhece sobre os mecanismos de entrada do CPP na célula, e por isso foram desenvolvidos alguns métodos análogos como o CellSqueeze e a eletroporação – ambos métodos de inserção de moléculas em células.

Apesar da baixa especificidade celular dos CPPs como um todo, alguns estudos mostram resultados promissores. Recentemente, dois estudos foram realizados com fragmentos de penetratina (p53p-Ant). O primeiro estudo, conduzido por Li e colaboradores (LI, 2005) mostrou que tal fragmento da penetratina induz morte celular seletiva, apenas de células malignas ou pré-malignas, sem afetar células normais. O segundo estudo, conduzido por Senatus e colaboradores (SENATUS et al., 2006), mostrou que o mesmo fragmento induz apoptose em células de gliomas em humanos e em ratos, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Também foram desenvolvidos recentemente CPPs que têm como alvo células cancerosas, baseando-se na ativação da matriz da metalloproteinase de peptídeos precursores (JIANG et al., 2004). Essa estratégia seletiva foi reportada como sendo aplicável na área de diagnóstico por imagem de tumores, com alto potencial terapêutico.

CPPs seletivos não estão restritos apenas para usos relacionados à modelos tumorais, sendo também aplicados para outros fins. Por exemplo, foi mostrado que a penetratina quando acoplada ao peptídeo G_{as} é capaz de inibir sinais de transdução de receptores em células neurais PC12, o que torna esse modelo valioso como ferramenta de pesquisa na modulação de sinais de transdução em células (D'URSI et al., 2006).

Em conclusão, como mostram os estudos mencionados acima, CPPs facilitam o transporte de peptídeos bioativos e mostram grande potencial terapêutico no tratamento de câncer, e em demais terapias (MÄE; LANGEL, 2006).

Para o presente estudo, foram escolhidos dois peptídeos já conhecidos na literatura como CPPs – o TAT e o Pep-1. Abaixo, os mesmos são discutidos em maiores detalhes:

3.1.1 – “TAT-peptide”:

Devido à natureza hidrofóbica de membranas celulares, torna-se difícil a entrada de moléculas exógenas maiores que 500 Da na célula. Uma estratégia alternativa impressionante de penetrar a bicama fosfolipídica de membranas celulares e atravessar barreiras biológicas é derivada do uso de uma proteína transativadora do HIV, a proteína TAT, que pode conter de 86–101 aminoácidos, dependendo do HIV isolado (KRAUTWALD et al., 2016).

Secretada por células infectadas com o vírus HIV, TAT tem se mostrado uma proteína capaz de sair de células em sua forma livre e entrar em células vizinhas ou interagir com receptores na superfície de membranas, de modo a regular a expressão de genes ou a função celular, espalhando assim a doença (FRANKEL; PABO, 1988).

O peptídeo TAT corresponde à região policatônica aa49-57 da proteína TAT, que é uma proteína ativadora da transcrição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BROOKS; LEBLEU; VIVÈS, 2005).

O primeiro estudo reportando que o TAT-peptide era capaz de transportar grandes proteínas para dentro de diferentes tipos de células animais foi publicado por Fawell e colaboradores em 1944 (FAWELL et al., 1994). Primeiramente, foi identificada uma região da proteína TAT composta por 36 aminoácidos que promovia a entrada de β -galactosidase em células vivas. Esse domínio de transdução da proteína TAT contém um cluster de resíduos de aminoácidos básicos, numa sequência que adota configuração de α -hélice. Depois dessa descoberta, foram realizados diversos estudos com o intuito de identificar se domínios mais curtos da proteína seriam suficientes para adentrar a célula. Com isso, chegou-se à um domínio determinante para translocação do TAT, que não apresenta necessariamente configuração de α -hélice, apesar de peptídeos com tal configuração serem mais eficientes em relação à entrada em células (BROOKS; LEBLEU; VIVÈS, 2005).

O grupo de pesquisa liderado por Bernard Lebleu por fim identificou um peptídeo catiônico truncado GRKKRRQRRR como o peptídeo que engloba as características adequadas para translocação por células e tecidos (RUBEN et al., 1989).

No presente estudo, será sintetizada uma versão do peptídeo TAT que contém o domínio mencionado acima, mas que possui mais alguns resíduos de aminoácidos, sendo que a estrutura primária do peptídeo a ser sintetizado é GRKKRRQRRRPPQ, contendo 13 resíduos de aminoácidos.

Abaixo (Figura 3) é mostrada uma ilustração da estrutura primária do TAT sintetizado:

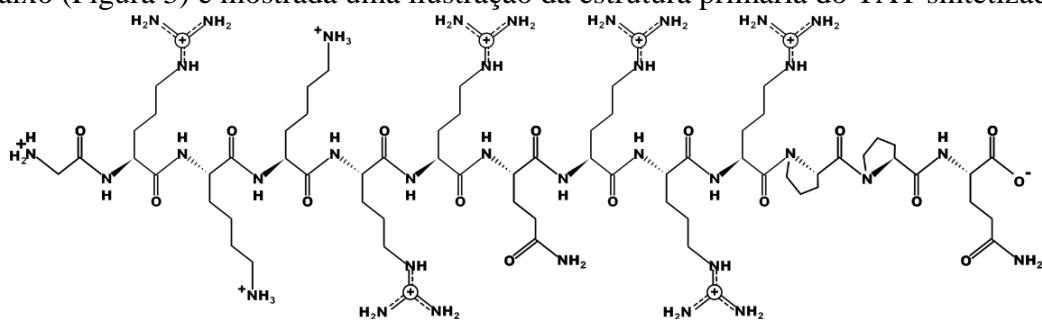


Figura 3: Ilustração da estrutura primária do TAT-peptide a ser sintetizado

É possível notar a relativa abundância de resíduos de arginina no TAT, sendo uma característica comum dos CPPs, o que, em geral, confere carga total positiva ao peptídeo.

Alguns exemplos de aplicação do peptídeo TAT com diferentes cargos são mostrados em tabela abaixo (tabela 1):

TABELA 1 – Aplicações *in vitro* ou *in vivo* do peptídeo TAT*

CPP	Cargo	Resposta celular	Nº de resíduos	Referência
Tat-p53C', Tat-RXL	DV3	Eliminação seletiva de células tumorais CXCR4 super-expressas	11	(SNYDER et al., 2005)
Tat	P15	Redução da massa tumoral	11	(PEREA et al., 2004)
Penetratin, Tat	Sheperdin ^b	Indução da morte de células tumorais	9	(PLESCIA et al., 2005)
Tat	Cre recombinase ^a	Ativação da expressão do EGFP	11	(WADIA; STAN; DOWDY, 2004)
Tat	Exonuclease III	Redução do reparo do dano do mtDNA, seguido de oxidação e redução de sobrevivência de células de câncer de mama.	11	(SHOKOLENKO et al., 2005)
Tat	Anti-Tat scFv	Supressão da transcrição dependente do tat de um gene HIV reportado	11	(THEISEN et al., 2006)
Tat	siRNA ^b	Indução de RNAi	11	(CHIU et al., 2004)

*Dados retirados da referência (MÄE; LANGEL, 2006)

Apesar do grande números de aplicações usando esse peptídeo, seu mecanismo de entrada ainda é um tema controverso e certamente requer maiores investigações, pois resultados contraditórios vêm sendo obtidos em diferentes estudos (BROOKS; LEBLEU; VIVÈS, 2005).

3.1.2 – Pep-1

Em 1977, foi descoberto o primeiro CPP não-covalente para transporte de ácidos nucleicos, o MPG. Em seguida, foi desenvolvido o Pep-1, peptídeo capaz de realizar o transporte não-covalente de proteínas e peptídeos (MUNYENDO et al., 2012).

O Pep-1 foi o primeiro CPP a ser comercializado, para ser usado na transdução não-covalente de proteínas. É um peptídeo sintético composto por 21 resíduos de aminoácidos e é capaz de estabelecer interações hidrofóbicas com “cargos” (CHUGH; EUDES; SHIM, 2010). O mesmo também estabiliza proteínas, protegendo-as da degradação durante o processo de transafecção (MORRIS et al., 2006).

Entre os CPPs, Pep-1 é um peptídeo anfifílico sintético que consiste dos seguintes domínios, a partir do N-terminal: um domínio hidrofóbico rico em triptofano (KETWWETWWTEW), um espaçador (SQP) – que melhora na flexibilidade e integridade dos domínios hidrofílico e hidrofóbico –, e um domínio hidrofílico rico em lisina (KKKRKV) (LUO et al., 2016). Devido à sua composição de aminoácidos, é também um exemplo de peptídeo que aumenta a eficiência individual de CPPs através da fusão de sequências contendo funções de interesse (KALAFATOVIC; GIRALT, 2017).

A figura 4 a seguir ilustra a estrutura primária desse peptídeo:

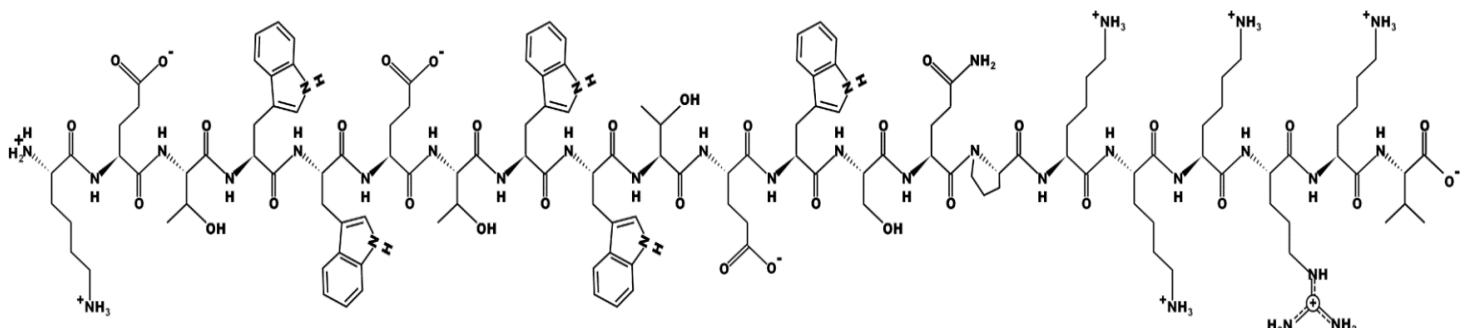


Figura 4: Ilustração da estrutura primária do Pep-1 a ser sintetizado

Entre suas diversas aplicações, deve ser mencionada a sua utilização para a facilitação da entrada celular *in vivo* e *in vitro* de diversas macromoléculas incluindo proteínas, peptídeos e anticorpos, através de ligações não-covalentes (GROS et al., 2006), de modo a manter a atividade biológica dessas moléculas carreadas intactas.

O Pep-1 pode ser classificado como o peptídeo anfifílico e tal característica pode ser melhor visualizada com o auxílio de uma roda helicoidal (ou “Helical wheel diagram”, em inglês), mostrada na figura 5, abaixo:

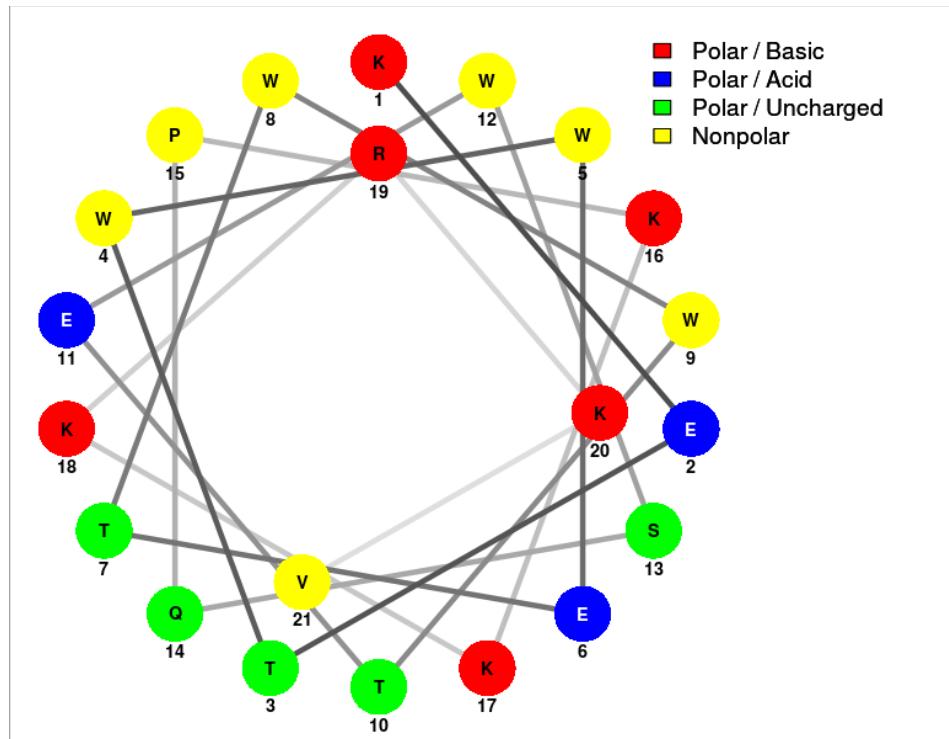


Figura 5: Roda helicoidal referente ao Pep-1

Analizando a figura, é possível notar que, em uma face, projetam-se principalmente resíduos hidrofóbicos, enquanto na outra, a presença predominante é de resíduos hidrofílicos. Isso auxilia na translocação dos CPPs através da membrana.

TABELA 2 – Sequências peptídicas e algumas de suas propriedades físico-químicas

Peptídeo	Estrutura Primária	Nº de resíduos	MW	Zp
TAT	GRKKRRQRRRPPQ	13	1718,0512	+8
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	21	2846,4656	+3

MW = massa molecular monoisotópica (g/mol)

Zp = Carga teórica

3.2 – Membranas plasmáticas e biomiméticas

A membrana plasmática é a estrutura que delimita as células, estabelecendo uma fronteira entre o meio intracelular e extracelular. Por ser o componente celular mais externo e possuir receptores específicos, a membrana tem a capacidade de reconhecer outras moléculas, permitindo ou não que a atravessem (JOHNSON, 1991).

Membranas plasmáticas são compostas fundamentalmente por fosfolipídeos, principalmente os glicerídicos, os quais possuem como estrutura geral um grupamento “cabeça”, um corpo de glicerol e duas caudas de ácidos graxos esterificados, como mostra a figura 6. As caudas de ácidos graxos compõem a parte apolar dos fosfolipídeos, conferindo a estas moléculas uma natureza anfifílica (NEW, 1990).

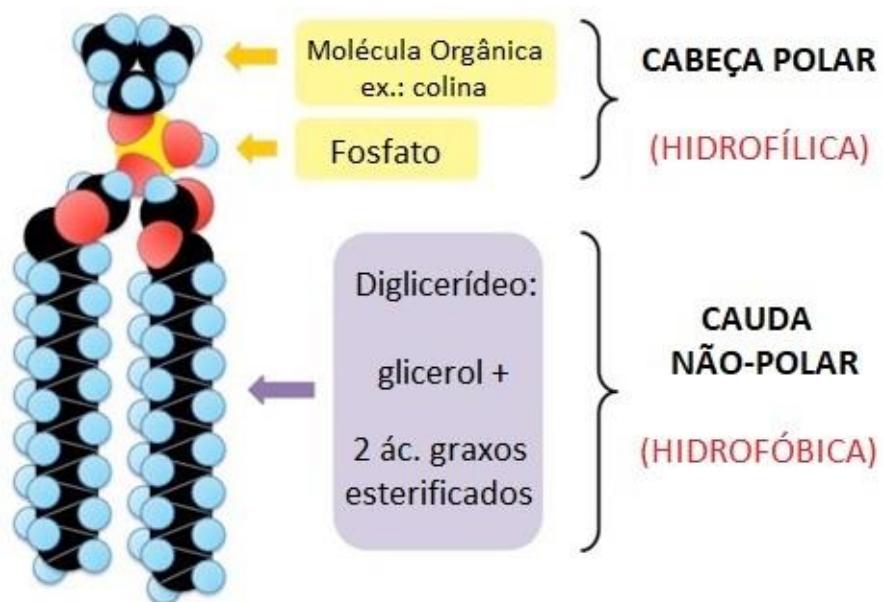


Figura 6: Estrutura comum de um fosfolipídio (ADAPTADA) Retirada de: University of Florida Agricultural and Biological Engineering, Web site of David P. Chynoweth MSPH, Ph.D

A membrana não é nem um corpo rígido, nem homogêneo – é muitas vezes descrita como um fluido bidimensional e tem a capacidade de mudar de forma e invaginar-se para o interior da célula (JOHNSON, 1991). O conceito da membrana como um solvente apolar bidimensional também foi desenvolvido com o reconhecimento de que estas estruturas são heterogêneas. Membranas são compostas por uma região interfacial hidrofílica – populada por água de solvatação – e pelo grupamento cabeça dos fosfolipídeos até as carboxilas que compõem o início dos ácidos graxos esterificados

(WHITE; WIMLEY, 1998). As regiões de interface correspondem a 50% da espessura de uma bicamada, o que mostra que membranas não devem ser tratadas como uma fase apolar que separa duas fases aquosas (WHITE; WIMLEY, 1998). Existem diversas possibilidades de interações inespecíficas das regiões de interface com moléculas membrano-ativas.

Para estudo da interação peptídeo-membrana é comum o preparo de meios biomiméticos de composições químicas variadas, porém compatíveis com as da célula alvo.

Dependendo da composição química e também de condições específicas, como pH, temperatura e concentração, diferentes agregados podem ser formados em solução aquosa, como mostra a figura 7. Essa organização espontânea se deve basicamente ao caráter anfifílico dos fosfolípideos, polares em seu grupamento cabeça e alifáticos em sua cauda de ácidos graxos. Fosfolípideos diferem de outras moléculas anfifílicas, como detergentes, porque sua estruturação em bicamadas lipídicas é favorável frente à formação de estruturas micelares (GENNIS, 1989).

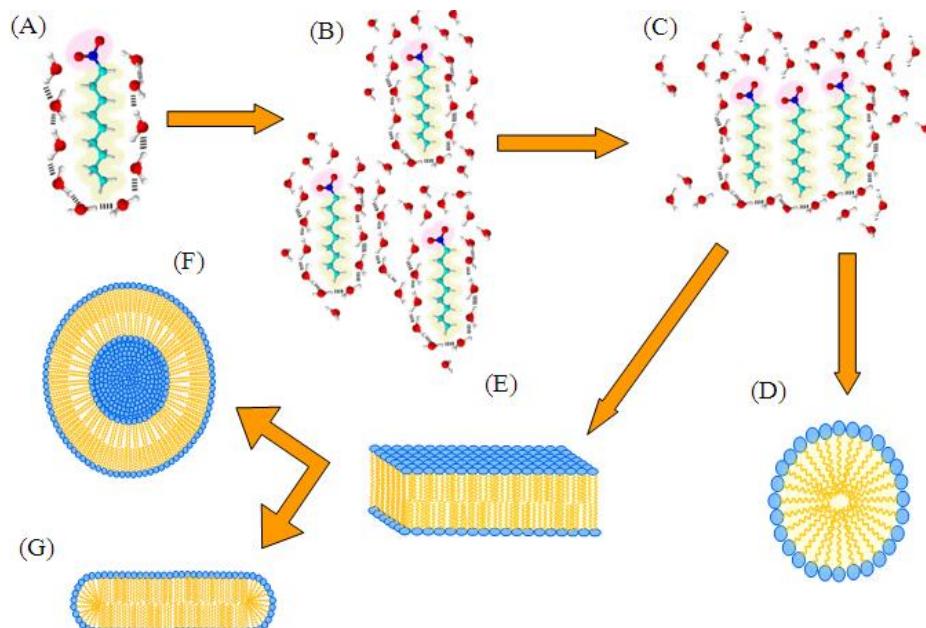


Figura 7: Diferentes sistemas biomiméticos formados por agregados de moléculas anfifílicas. (A) Orientação das moléculas de água ao redor da molécula anfifílica; (B) aproximação das moléculas anfifílicas; (C) agregação dos fosfolípideos decorrente da dessolvatação devido a interações hidrofóbicas entre as cadeias hidrocarbonadas; (D) estrutura de micelas; (E) bicamada fosfolipídica; (F) vesículas ou lipossomas; (G) bicelas (VERLY, 2010)

Em particular, a bicamada pode se organizar formando estruturas denominadas de vesículas ou lipossomas, que possuem maiores estabilidades termodinâmicas. Nesta estruturação, as cadeias hidrofóbicas dos fosfolipídeos encontram-se completamente isoladas das moléculas de água, resultando em uma maior dessolvatação do sistema.

Diferentes fosfolipídeos conferem às membranas diferentes características, principalmente de acordo com o grupamento químico ligado ao fosfato, o comprimento e grau de insaturação de ácidos graxos (HUANG; LI, 1999). Os fosfolipídeos mais comuns na natureza são a fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG) e fosfatidiletanolamina (PE), sendo comumente empregados em pesquisas científicas. Sendo assim, para o presente estudo serão confeccionadas vesículas unilamelares de DMPC e de DMPC/DMPG (2:1 mol/mol).

Em pH fisiológico, fosfatidilcolina (PC) apresentam-se neutro e fosfatidilglicerol apresenta-se com carga -1. Como a carga da superfície da membrana pode ser determinante na partição de moléculas, usando-se apenas vesículas de DMPC seria difícil modular diferentes parâmetros de interação com membrana. Por esse motivo, bicamadas formadas por uma mistura de DMPC e DMPG oferecem um bom modelo de membranas para o estudo do efeito causado pela partição de moléculas nos parâmetros da membrana, pois exibem variadas propriedades físico-químicas, devido à diferença, principalmente quanto à carga, dos fosfolipídeos PC e PG.

3.3. Propriedades físico-químicas relevantes a interação de peptídeos membranativos e seus alvos

As propriedades físico-químicas dos CPPs soam bastante familiares a pesquisadores que trabalham com AMPs e PATs. CPPs tipicamente apresentam uma sequência que ou possui abundância de aminoácidos carregados positivamente – como lisina ou arginina – ou que apresenta partes alternadas de aminoácido polares/carregados e aminoácidos apolares/hidrofóbicos. Essas duas estruturas são denominadas “policatônicas” ou “anfifílicas”, respectivamente. Existe ainda uma terceira estrutura, composta somente por aminoácidos apolares/hidrofóbicos (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013).

Os mecanismos de ação dos CPPs são geralmente divididos em duas categorias: aqueles que dependem de processos celulares, como endocitose e macropinocitose, e aqueles para os quais o carreamento não exige um processo celular ativo. A membrano-atividade está relacionada à natureza anfifílica de peptídeos (LAST; SCHLAMADINGER; MIRANKER, 2013). Sendo assim, AMPs, CPPs, e PATs estão, de certa forma, mecanisticamente relacionados.

Sendo assim, é possível identificar as três grandes subclasses para os CPPs: catiônica, anfifílica e hidrofóbica (MILLETTI, 2012). Para discutir tais subclasses, alguns parâmetros físico-químicos de peptídeos membrano-ativos merecem ser discutidos em maiores detalhes, tais como carga líquida, hidrofobicidade média e anfifilicidade, o que é feito a seguir:

3.3.1 – Carga líquida

De forma geral, os AMPs e os CPPs conhecidos compartilham a característica de carregarem consigo uma carga líquida positiva distribuída por sua cadeia.

Cationicidade é importante para a atração inicial de peptídeos antimicrobianos à membranas negativamente carregadas de bactérias e outros microorganismos (YEAMAN, 2003). A carga líquida observada em AMPs naturais varia de 0 a +16, sendo que a grande maioria cai dentro de uma faixa intermediária que varia em +4 e +6.

Em estudo conduzido por Milletti (MILLETTI, 2012), em 2003, são apresentados dados resultantes da análise de aproximadamente 100 CPPs. Avaliando esse conjunto, foi observado que a maioria (83%) dos CPPs apresentavam carga líquida positiva, o que mostra, assim como no caso dos AMPs, que a capacidade penetradora dos CPPs está relacionada à alta presença de cargas positivas na cadeia.

3.3.2 - Hidrofobicidade média

A hidrofobicidade média de uma cadeia é definida pela sua composição de aminoácidos. A hidrofobicidade associada a cada resíduo é definida como a energia livre associada à transferência de um mol da molécula de uma solução aquosa (a uma certa

concentração) para um meio etanólico (na mesma concentração), não considerando aqui coeficientes de atividade. É uma característica associada à cadeia lateral de cada resíduo. A denominação desta energia livre como sendo a *hidrofobicidade* é feita por Dunnill em 1965 (BIGELOW, 1967).

Em outras palavras, a hidrofobicidade reflete a capacidade intrínseca de uma sequência peptídica particionar-se entre uma fase aquosa polar e uma fase apolar. Devido à região central apolar das membranas, acredita-se que hidrofobicidade tenha forte papel modulador na interação de peptídeos com membranas (DATHE; WIEPRECHT, 1999). Resíduos hidrofóbicos correspondem a aproximadamente 50 % do total em uma sequência, com variações na faixa de 10 % (TOSSI; SANDRI; GIANGASPERO, 2000; YEAMAN, 2003).

De forma preocupante, peptídeos com alta hidrofobicidade média têm, aparentemente, capacidade hemolítica contra células de mamíferos, com potencial ação contra eritrócitos humanos. Em geral, peptídeos com baixa hidrofobicidade não exibem comportamento membrano-ativo (YIN et al., 2012). Assim, a análise de possíveis peptídeos membrano-ativos é pautada por encontrar sequências com valores intermediários de hidrofobicidade média, sem buscar extremos em que, de um lado, podem fornecer moléculas sem ação em membranas, e de outro levam à estruturas com possibilidade de hemólise de células do hospedeiro ou que levam à agregações que diminuam sua capacidade de ação.

No estudo de Milletti (MILLETTI, 2012), são considerados hidrofóbicos peptídeos que: contenham apenas resíduos apolares, que apresentem baixa carga líquida (menos de 20% da molécula); ou que apresentem grupo hidrofóbico que seja determinante para a entrada celular, independente do resto da sequência. Comparando-se com peptídeos catiônicos e anfifílicos, poucos CPPs hidrofóbicos foram até então descobertos.

3.3.3 – Anfifilicidade

Considerando a distribuição espacial das cadeias laterais dos resíduos presentes em um peptídeo que assume uma forma anfifílica, temos que, em uma face, projetam-se principalmente cadeias hidrofóbicas, enquanto na outra, a presença predominante é de

resíduos hidrofílicos (EISENBERG; WEISS; TERWILLIGER, 1982). Tal distribuição é que confere à molécula um caráter anfifílico necessário para que ela tanto interaja com a membrana quanto com o meio hidrofílico em que se está inserida.

A anfifilicidade de uma molécula, especialmente de uma α -hélice, é quantificada então pelo momento hidrofóbico, definido como o vetor médio da soma dos vetores hidrofobicidade H_i das cadeias laterais da hélice composta por N resíduos (EISENBERG; WEISS; TERWILLIGER, 1982).

A identificação de novos AMPs e CPPs deve buscar molécula com distribuição de cargas espacialmente separadas quando plotadas na forma de uma roda helicoidal. É essa separação de cargas, quantificada pelo momento hidrofóbico, que auxiliará em uma efetiva interação com o meio extracelular e com membranas.

Diversos CPPs anfifílicos são obtidos através da ligação covalente de um domínio hidrofóbico a um NLS (do inglês “nuclear localization sequence”). NLSs são um caso especial de CPPs catiônicos, sendo peptídeos curtos, ricos em resíduos de lisina, arginina e/ou prolina, capazes de se transportar até o núcleo celular através dos poros nucleares (MILLETTI, 2012).

Por exemplo, ambos os peptídeos MPG e Pep-1 são baseados no NLS PKKRKV. O domínio hidrofóbico do MPG é derivado da fusão sequencial do HIV glycoprotein 41, enquanto o domínio hidrofóbico do Pep-1 corresponde a um cluster rico em triptofano, que apresenta alta afinidade por membranas. Nos dois peptídeos mencionados, o domínio hidrofóbico é separado do NLS por um espaçador (MILLETTI, 2012).

Apesar da maioria dos CPPs serem catiônicos, evidências sugerem que a translocação pela membrana é uma consequência da anfifilicidade e não da carga líquida positiva. Por exemplo, estudos envolvendo o MAP (do inglês “model amphipathic peptide”), rico em resíduos de lisina, mostraram que, substituindo-se os resíduos de lisina por outros resíduos polares, a capacidade penetradora é mantida, se a anfifilicidade também for conservada (MILLETTI, 2012). No entanto, apesar de diversos CPPs serem anfifílicos, peptídeos anfifílicos geralmente não são CPPs (MILLETTI, 2012).

3.4 – Síntese de peptídeos em fase sólida

A Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (ou SPPS, do inglês, “Solid Phase Peptide Synthesis”) é atualmente um dos métodos mais utilizados para reproduzir e criar peptídeos e proteínas em laboratórios (AMBLARD et al., 2006). Tal técnica se mostrou muito eficiente na síntese de peptídeos, pois busca obter o maior rendimento em cada uma das etapas de acoplamento de aminoácidos, utilizando reagentes em excesso e minimizando as perdas físicas (CHAN; WHITE, 2000).

O acoplamento de aminoácidos é feito sobre uma resina insolúvel, a partir do grupo carboxila do aminoácido da porção C-terminal do peptídeo em questão, ou seja, a síntese é feita na direção contrária à da direcionalidade do peptídeo (CHAN; WHITE, 2000).

Um fator crucial na SPPS é a proteção das cadeias laterais e dos grupamentos amino das porções N-terminais. Por isso, os aminoácidos usados em tal método já devem estar protegidos antes do início da síntese. Há diferentes estratégias de SPPS, sendo a mais popular a estratégia Fmoc/tBu. O grupo Fmoc tem a função de proteger o grupo amino, por isso, deve ser removido logo antes do acoplamento do aminoácido seguinte (CHAN; WHITE, 2000).

As reações de acoplamento de aminoácidos seguindo o método Fmoc/tBu são feitas utilizando-se uma carbodiimida (DIC) como substância que ativa a carboxila do aminoácido que será acoplado, para que possa reagir com o grupo amino previamente desprotegido. Utiliza-se Oxima como agente de supressão de enantiomerização, processo que pode ocorrer com o peptídeo durante a síntese (CHAN; WHITE, 2000). O mecanismo de tal reação de acoplamento é mostrado na figura 8, abaixo:

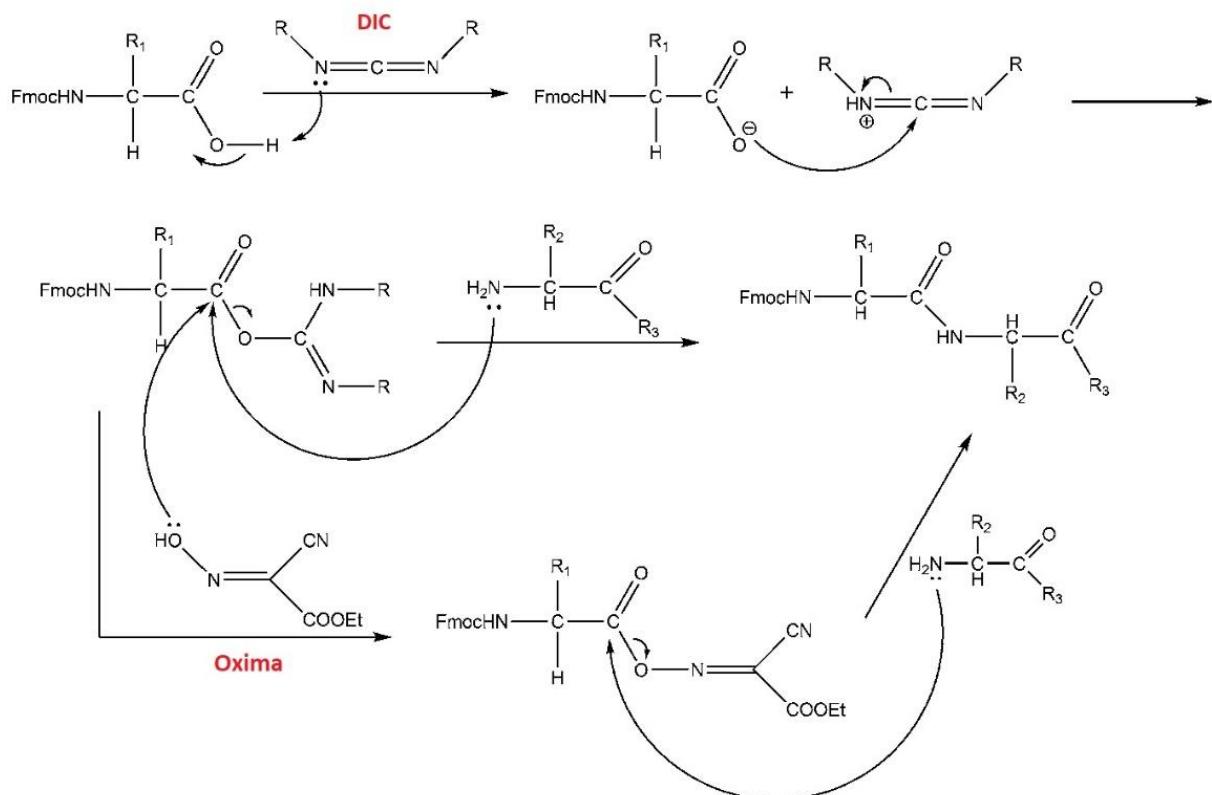


Figura 8: Mecanismo de ativação da reação de acoplamento (ADAPTADA)
(PIRES; BEMQUERER; DO NASCIMENTO, 2014)

A clivagem, última etapa da síntese, consiste numa reação em condições ácidas para retirada dos grupos de proteção das cadeias laterais dos aminoácidos. Nesta etapa, geralmente usa-se TFA (Ácido Trifluoroacético) para atingir a condição reacional ácida. Há, também, o uso de reagentes nucleofílicos tais como tioanisol, fenol, etanoditiol e água, que participam tanto da remoção dos grupos laterais quanto da clivagem da ligação entre o peptídeo e a resina, gerando um peptídeo amidado (CHAN; WHITE, 2000).

3.5 – Estudo da interação de CPPs com membranas biomiméticas

A interação de peptídeos e proteínas pode ser estudada por meio de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). De forma geral, fosfolipídeos quando organizados em estruturas coesas – como em uma membrana ou na forma de vesículas – tendem a apresentar um comportamento associado a um fenômeno térmico conhecido como transição de fase. Esse comportamento envolve a conversão da estrutura da vesícula de uma fase gel a fase líquido-cristalina.

3.5.1 - Transição de Fase de Fosfolipídeos

Uma das consequências do empacotamento dos ácidos graxos no centro da bicamada lipídica é que um pequeno aumento da temperatura pode causar uma mudança abrupta de suas propriedades físicas.

Bicamadas possuem estruturas ordenadas a baixas temperaturas, com consistência de gel e cadeias de ácidos graxos principalmente em conformação *trans*, estabilizadas por forças de van der Walls (HUANG; LI, 1999). Quando se fornece energia suficiente para sobrepor a barreira composta pelas interações de baixa distância entre as cadeias de hidrocarbonetos, ocorre um aumento de mobilidade rotacional entre ligações carbono-carbono (HUANG; LI, 1999). Esta transição permite conformações mais desordenadas, aumentando assim a fluidez da membrana (HUANG; LI, 1999). A esse estado, atribui-se o nome de líquido-cristalino, ilustrado na figura 9.

Esta transição, referida como $P'\beta \rightarrow L\alpha$, ocorre de forma cooperativa, com temperatura de transição (T_m) e variação de entalpia (ΔH) específicas para cada fosfolipídeo. Estes parâmetros podem ser estimados por meio da calorimetria diferencial de varredura (DSC) (HUANG; LI, 1999).

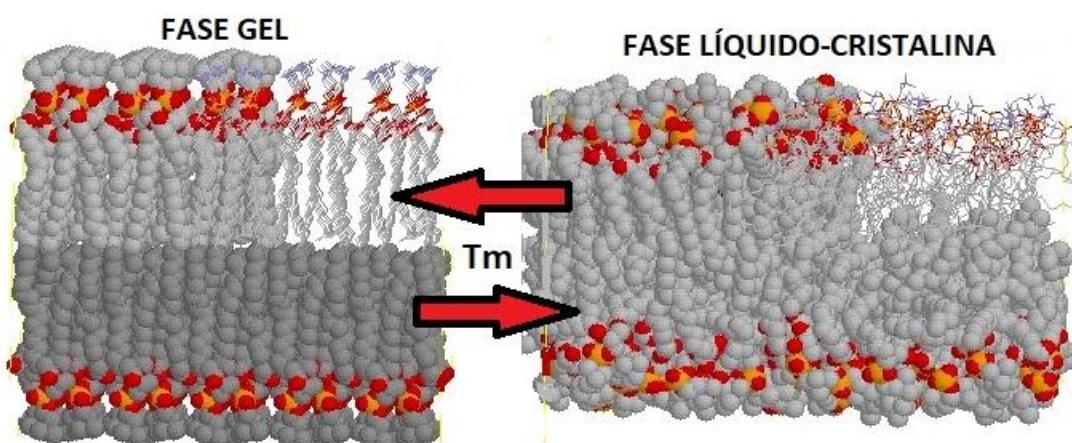


Figura 9: Transição de fase em membranas. Detalhe da diferença de organização entre o estado de gel, mais ordenado, para o estado líquido-cristalino, menos ordenado (BRAND, 2018)

A composição da membrana, o solvente e o pH afetam a energia, a cooperatividade e a temperatura de transição, conforme mensurados por DSC (EPAND et al., 2003; HUANG; LI, 1999).

Um fato importante para o presente estudo é que a incorporação de moléculas membrano-ativas, como os CPPs estudados, influencia na transição de fase $P'\beta \rightarrow La$ de forma particular, fornecendo informações sobre seu modo de interação (JAIN; WU, 1977).

3.5.2 - Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica que mede a quantidade de calor necessário para estabelecer uma diferença de temperatura próxima a zero entre uma substância e um material inerte de referência. Esta condição é mantida durante um período em que ambos os materiais estão sujeitos a regimes idênticos de temperatura em um ambiente aquecido ou resfriado a uma taxa controlada (LADBURY; DOYLE, 2008).

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

Conforme dito, a vesícula apresentará o comportamento de transição de fase quando houver aumento de temperatura. Para manter a temperatura das duas células igual, o aparelho deve fornecer ou retirar energia térmica da célula contendo os fosfolipídeos. Essa diferença de energia fornecida/retirada é o parâmetro medido pelo aparelho. Ou seja, o dado produzido pelo calorímetro é o excesso de potência (ΔP), apresentado em função da temperatura. O instrumento de DSC registra o excesso de potência (ΔP), o tempo t e a temperatura T . Assim, o excesso de calor q , requerido para a mudança de temperatura e a diferença de capacidade térmica, ΔCp (à pressão constante p) entre a célula de referência e experimental são computados.

Tais dados são posteriormente organizados de modo a se obter um perfil térmico da interação de peptídeo com membranas-modelo, como mostrado na figura 10.

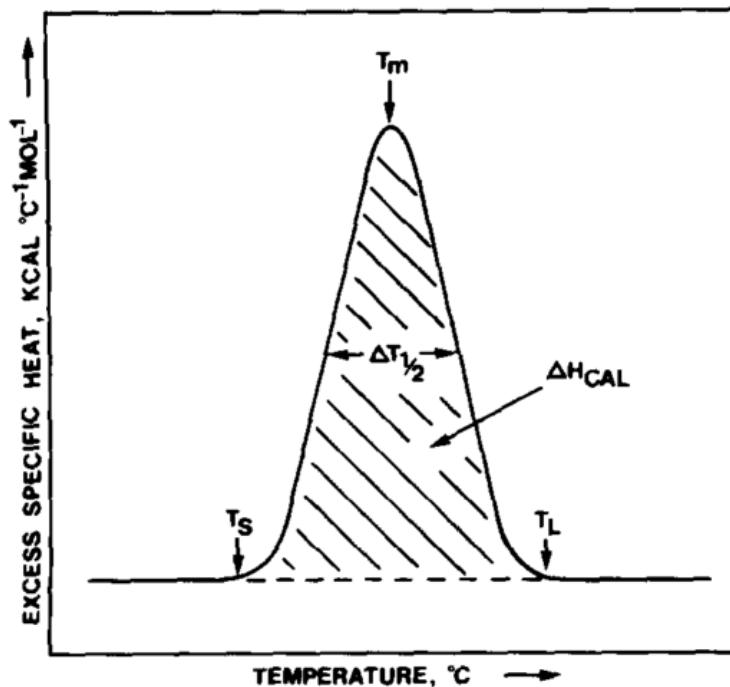


Figura 10: perfil térmico mostrando o comportamento de fosfolipídeos quando submetidos à rampa de temperatura na DSC (MCELHANEY, 1982)

Os seguintes parâmetros podem ser inferidos do gráfico acima:

- T_m = temperatura da transição de fase, que representa a temperatura em que o excesso de calor fornecido pelo aparelho é máximo;
- ΔH = entalpia associada ao processo de transição de fase;
- $\Delta T_{1/2}$ = largura da banda meia altura.

Partindo do pressuposto de que a interação dos peptídeos sintetizados com a vesícula de fosfolipídeos tende a desorganizar a estrutura coesa apresentada, é de se esperar que ocorra uma alteração na transição de fase dos fosfolipídeos que compõem a vesícula. O grau de alteração dessa transição de fase fornece um padrão de interação característico do peptídeo (sendo estudado) com a membrana modelo.

Obtendo-se esses padrões de interação para os CPPs TAT e Pep-1, deseja-se então tentar desenvolver um sistema de classificação experimental de peptídeos, de modo que peptídeos que compartilhem o mesmo padrão de interação que os CPPs, possam ser entendidos como tais.

3.5.3 – Influência de peptídeos membrano-ativos no perfil térmico da transição de fase de membranas fosfolipídicas

A incorporação de moléculas membrano-ativas em membranas modelo pode ser estudada de várias formas. Como já dito, uma delas é pelo efeito da adsorção de moléculas na transição de fase entre os estados de gel e líquido cristalino de membranas (STURTEVANT, 1982). A adsorção de moléculas é capaz de alterar as propriedades da transição de fase de membranas fosfolipídicas de forma particular ao modo de interação (JAIN; WU, 1977).

O que ocorre é que a incorporação de compostos exógenos causa uma alteração no modo de empacotamento das cadeias dos hidrocarbonetos, influindo em sua ordem, o que está ligado ao fato de que em uma bicamada no estado de gel, o movimento de uma cadeia de ácido graxo é transmitido às cadeias próximas, e assim a todas as outras unidades vizinhas (JAIN; WU, 1977).

Em suma, peptídeos membrano-ativos são capazes de aumentar ou diminuir a estabilidade de vesículas fosfolipídicas, fenômenos observados por alterações no *T_m* (EPAND et al., 2003; STURTEVANT, 1982).

3.5.4 – Classificação de interações peptídeo-membrana

McElhaney e colaboradores classificam as interações de peptídeos e proteínas com modelos de membrana em três tipos, de acordo com a alteração apresentada na transição de fase:

Tipo 1: não apresentam mudança ou, no máximo, uma pequena alteração nos valores de *T_m* e $\Delta T_{1/2}$ e um aumento progressivo no ΔH com o aumento da concentração do peptídeo. Não ocorre expansão de monocamadas ou alteração na permeabilidade das vesículas. Comportamento característico de peptídeos hidrofílicos que interagem com a membrana eletrostaticamente com os grupamentos fosfolipídicos (MCELHANEY, 1982).

Tipo 2: ocorre diminuição do Tm, aumento do $\Delta T_{1/2}$ e diminuição considerável e progressiva do ΔH , com expansão da monocamada e aumento da permeabilidade. Acredita-se que as moléculas interajam com a camada fosfolipídica em uma combinação de forças eletrostáticas e hidrofóbicas, com penetração parcial da molécula no core hidrofóbico da membrana (MCELHANEY, 1982).

Tipo 3: Tm e $\Delta T_{1/2}$ não são fortemente afetados. Entretanto, o ΔH diminui linearmente com a concentração de peptídeo/proteína. Comportamento adotado por moléculas que interagem acentuadamente com o core hidrofóbico da membrana, eliminando interações cooperativas entre os ácidos graxos (MCELHANEY, 1982).

3.6 - Sistema de classificação experimental de peptídeos

Através do estudo de AMPs pelo método de DSC, Brand e colaboradores (BRAND et al., 2018) apresentam uma classificação para peptídeos membrano-ativos, baseando-se na forma como tais moléculas interagem com membranas-modelo. A análise de 52 peptídeos e sua interação com DMPC e 2:1 DMPC:DMPG foi o ponto de partida para a definição desta nova classificação experimental. Os dados brutos foram analisados por meio de uma ferramenta estatística de análise de componentes principais (PCA) e o resultado foi a definição de cinco clusters de peptídeos, mostrados na figura 11:

Cluster 1: composto por moléculas que não apresentam nenhuma interação com os modelos de membrana testados;

Cluster 2: composto por peptídeos que não apresentam qualquer alteração na transição de fase de vesículas de DMPC, mas alteram a transição de fase de vesículas de 2:1 DMPC:DMPG;

Clusters 3 e 4: composto por IAPs e AMPs que alteram a transição de fase de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG;

Cluster 5: Composto somente por AMPs.

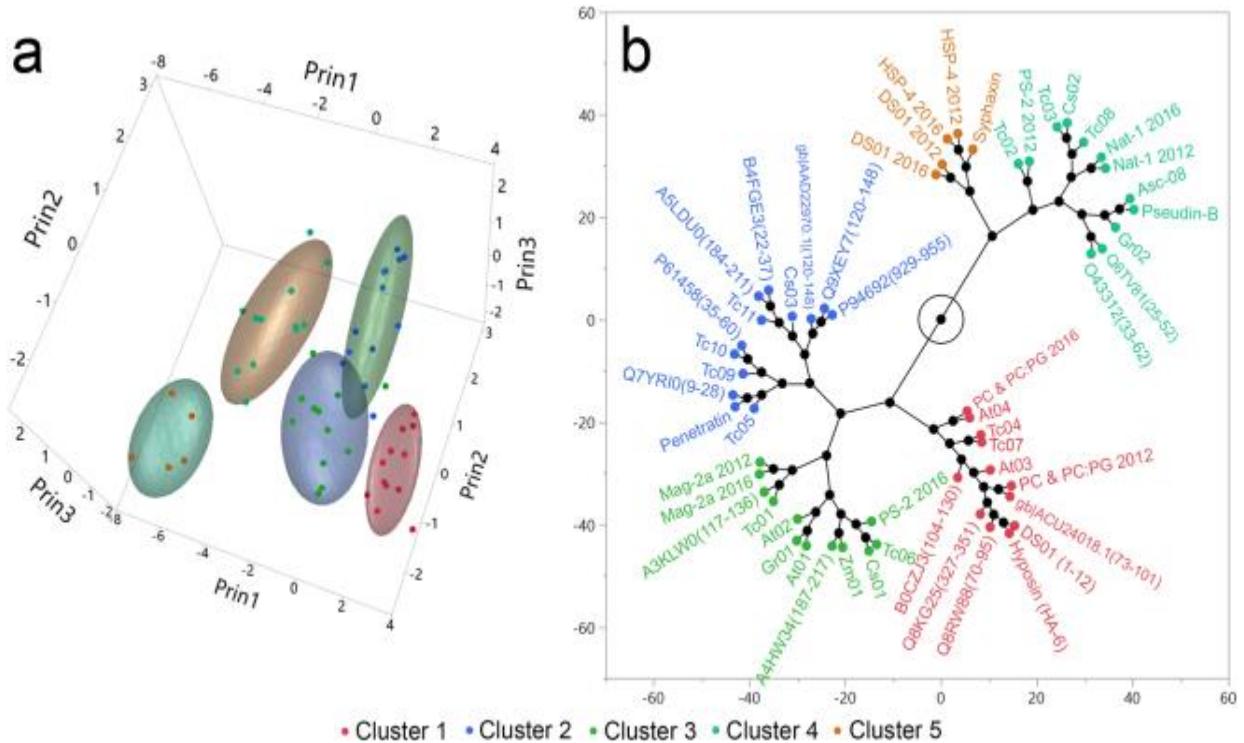


Figura 11:(a) Clusters formados após a análise estatística dos dados referentes a estudos de DSC da interação de 52 peptídeos com vesículas de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG. Cada cluster é representado por uma cor diferente, conforme apresentado na figura. (b) Diagrama de constelação categorizando peptídeos em clusters. (BRAND et al., 2018)

Os dados de perturbação de fase de transição de membrana foram então comparados com o potencial antimicrobiano dos 52 peptídeos. Mostrou-se haver uma correlação entre a interação com vesículas de DMPC e a atividade antimicrobiana dos peptídeos. Isto é, aqueles peptídeos previstos como pertencentes aos clusters 3 e 4 apresentavam atividade antimicrobiana.

Utilizando a técnica de DSC e também a de Dicroísmo Circular (CD), pode-se estudar tanto a forma como os peptídeos sintetizados se estruturam na superfície de modelos de membrana, como estimar o tipo de interação quando em contato com tais modelos. De forma geral, o comportamento da molécula frente a essas duas técnicas, notadamente quanto aos resultados de DSC, permitem situar o peptídeo em *clusters* de AMPs (BRAND et al., 2012, 2018). A categorização de peptídeos permite a separação das moléculas em *clusters* relacionados com sua interação e perturbação dos modelos de membrana (STURTEVANT, 1982).

Baseando-se nos mesmos princípios, tal metodologia apresentada por Brand e colaboradores (BRAND et al., 2018) para classificação experimental de AMPs pode ser expandida para a classificação de CPPs e PATs, propiciando a descoberta de fragmentos proteicos com atividade penetradoras e pré-amilóides e também fornecendo uma abordagem experimental unificada para moléculas membrano-ativas.

3.7 – Ensaios com extravasamento de Carboxifluoresceína (CF)

Um outro método para se avaliar a interação peptídeo-membrana é através da técnica de extravasamento de carboxifluoresceína, que pode ser bastante informativa para o conhecimento da atividade do peptídeo estudado, através da análise da taxa de extravasamento de CF. Para melhor compreensão da técnica, alguns conceitos devem ser discutidos, o que é feito a seguir.

3.7.1 – Fluorescência

O fenômeno da fluorescência é observado quando uma substância passa a emitir luz após sofrer um estímulo luminoso. Em outras palavras, substâncias fluorescentes absorvem radiação (invisível ao olho humano) e, como resposta, passam a emitir luz visível (LAKOWICZ; MASTERS, 2008).

A fluorescência ocorre quando um elétron é excitado para um estado quântico mais elevado, e então emite luz a partir desse estado excitado singlet, no qual o elétron excitado não muda a orientação de spin, continuando desemparelhado. Consequentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente via emissão de um fóton.

O comprimento de onda da radiação emitida é sempre maior (possui menor energia) que o comprimento de onda da radiação incidente, pois há conversões internas, não radiativas, entre a excitação e a emissão, como pode ser observado no Diagrama de Jablonski, mostrado na figura 12 (LAKOWICZ; MASTERS, 2008).

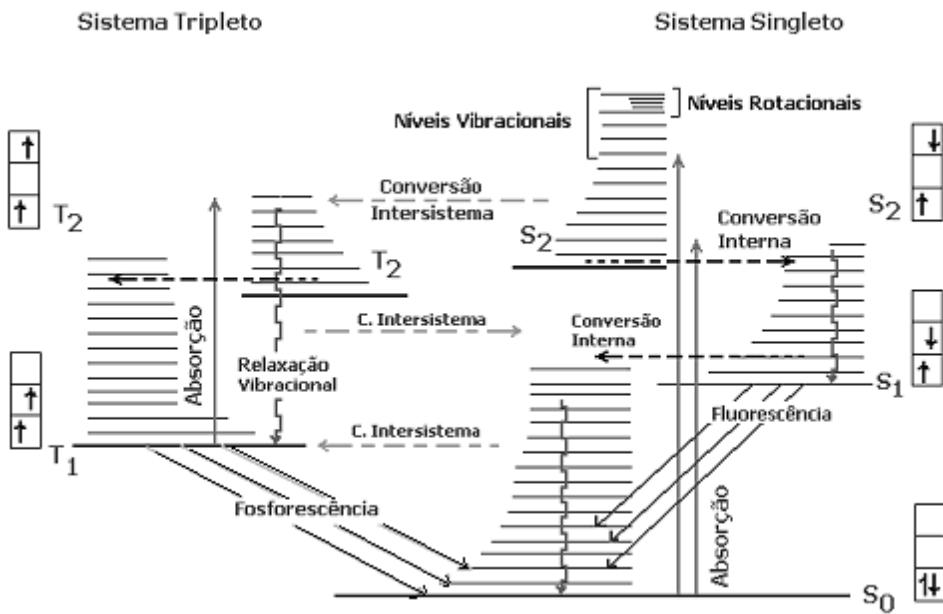


Figura 12: Diagrama de Jablonski (LEE, 2017)

3.7.2 – Fenômeno de “self-quenching”, realizado pela carboxifluoresceína

A carboxifluoresceína é uma substância fluorescente, ou seja, é capaz de emitir luz ao ser estimulada por radiação. A intensidade da fluorescência é proporcional à concentração de fluoróforos, num intervalo razoável de concentração. No entanto, à concentrações relativamente altas, a proporcionalidade fluorescência/concentração de fluoróforos não é mais obedecida devido ao surgimento do efeito de supressão, causado por colisões entre as moléculas dos fluoróforos.

Ou seja, de maneira geral, altas concentrações de fluoróforos pode gerar a auto-supressão de energia luminosa (do inglês “self-quenching”) onde as moléculas excitadas transferem energia às moléculas no estado fundamental, diminuindo a intensidade de fluorescência.

De maneira mais aprofundada, a auto-supressão ocorre entre duas moléculas idênticas (de fluoróforos), quando a primeira molécula – inicialmente em estado excitado – transfere energia (por colisão, por exemplo) à segunda molécula – inicialmente em estado fundamental –, resultando na mudança simultânea das duas moléculas para um estado intermediário, de energia intermediária entre os dois estados iniciais. A diminuição de energia da primeira molécula é igual ao aumento de energia da segunda molécula, conservando a energia na auto-supressão (LAKOWICZ; MASTERS, 2008).

Devido ao fenômeno de “self-quenching”, o sinal de fluorescência emitido pela carboxifluoresceína encapsulada – em alta concentração – nas vesículas, não é significativo. Com a adição de peptídeos membrano-ativos ao meio contendo essas vesículas, observa-se aumento do sinal de fluorescência, devido ao extravasamento da carboxifluoresceína para o exterior das vesículas, o que faz com que o *self-quenching* seja menos pronunciado, causando assim, aumento de fluorescência. Dependendo de como esse extravasamento ocorre – de maneira gradativa ou não –, é possível tirar conclusões sobre o tipo de interação peptídeo-membrana.

4 – Metodologia

4.1 – Síntese de peptídeos em fase sólida

Os peptídeos TAT e Pep-1 – já conhecidos na literatura como CPPs – foram sintetizados manualmente, de acordo com a metodologia padrão de síntese de peptídeo em fase sólida (SPPS, do inglês “Solid Phase Peptide Synthesis”), via estratégia Fmoc/tBu (CHAN; WHITE, 2000).

4.1.1 – Preparo da resina

A síntese foi realizada em uma seringa de polipropileno contendo uma membrana porosa que impede a saída de materiais sólidos. Utilizou-se a resina Rink Amide (MDHA) como suporte. Com o objetivo de produzir aproximadamente 0,15 mmol de peptídeo, utilizou-se 215 mg de resina (grau de substituição de 0,7 mmol.g⁻¹).

Para “ativação” da resina, adicionou-se 2 mL de diclorometano à seringa já contendo a resina e o sistema foi levado à agitação por 30 minutos.

4.1.2 – Desproteção

Com a resina ativada e lavada com dimetilformamida (DMF) e diclorometano (DCM), realizou-se o procedimento de “desproteção” da resina, para remoção do grupo protetor, deixando o grupo amino desprotegido, pronto para acoplamento do aminoácido desejado. Esse procedimento foi realizado adicionando-se aproximadamente 2 mL de 4-metilpiperidina em DMF (1:5, v/v) à seringa e levando o sistema à agitação por 15 minutos. Tal procedimento foi repetido para garantir a desproteção total da resina. Em seguida, realizou-se novamente a lavagem do material com DMF e DCM, 2 mL de cada, repetindo-se a lavagem três vezes.

4.1.3 – Teste de Kaiser

Para confirmar a desproteção do grupo amino, realizou-se o teste de Kaiser (ou de ninhidrina), teste qualitativo utilizado para detectar o grupo amino livre. O teste

foi feito transferindo-se alguns grãos da amostra para um tubo de ensaio, onde adicionou-se duas gotas de uma solução de ninhidrina a 5% (m/v) em etanol, duas gotas de uma solução de fenol a 80% (m/v) em etanol e duas gotas de uma solução preparada com 2 mL de KCN (1 mmol.L⁻¹) e 98 mL de piridina (CHAN; WHITE, 2000). A mistura foi aquecida a 120 °C por aproximadamente 2 minutos. A mudança de cor dos grãos da amostra para roxo ou vermelho indicou a presença do grupo amino livre, confirmando a desproteção da resina (CHAN; WHITE, 2000).

4.1.4 – Acoplamento de aminoácidos

Após confirmada a desproteção da resina, o primeiro aminoácido pôde ser acoplado. Por se tratar de uma resina com o grupo –NH₂, o acoplamento do primeiro aminoácido ocorre pelo ataque do grupo carboxila de um aminoácido ao grupo amino da resina. Ou seja, a síntese foi realizada no sentido do C-terminal para o N-terminal, adicionando-se o último resíduo de aminoácido, do peptídeo sendo sintetizado, à seringa. Para que a ligação peptídica seja formada, foi preciso “ativar” o grupo carboxi do aminoácido para que reagisse com o grupo amino. Isso foi feito com o auxílio do reagente Oxyme Pure, que reage com o C-terminal na presença de carbodiimida, ativando-o (CHAN; WHITE, 2000). A quantidade de aminoácido adicionada varia para cada aminoácido, sendo que as massas foram previamente calculadas, com o objetivo de se utilizar aproximadamente 0,15 mmol de aminoácido. A massa calculada para cada aminoácido foi então pesada e adicionada ao meio reacional (seringa). Além da massa de aminoácido, adicionou-se 85 mg de “Oxyme Pure”, 2 mL de DMF e 93 µL de diisopropilcarbodiimida (DIC) à seringa. O meio foi então submetido à agitação constante por 1h30.

Após esse tempo, o produto foi filtrado à vácuo e novamente lavado. Realizou-se então o teste de Kaiser, dessa vez para verificar se ocorreu o acoplamento do aminoácido, que foi indicado pela ausência de mudança de cor da amostra após o teste, ou seja, os grãos permaneceram incolores já que não havia mais um grupo amino livre.

Assim, repetindo essas etapas para cada aminoácido, foi possível sintetizar os peptídeos.

Um esquema simplificado da síntese em fase sólida é mostrado abaixo, na figura 13:

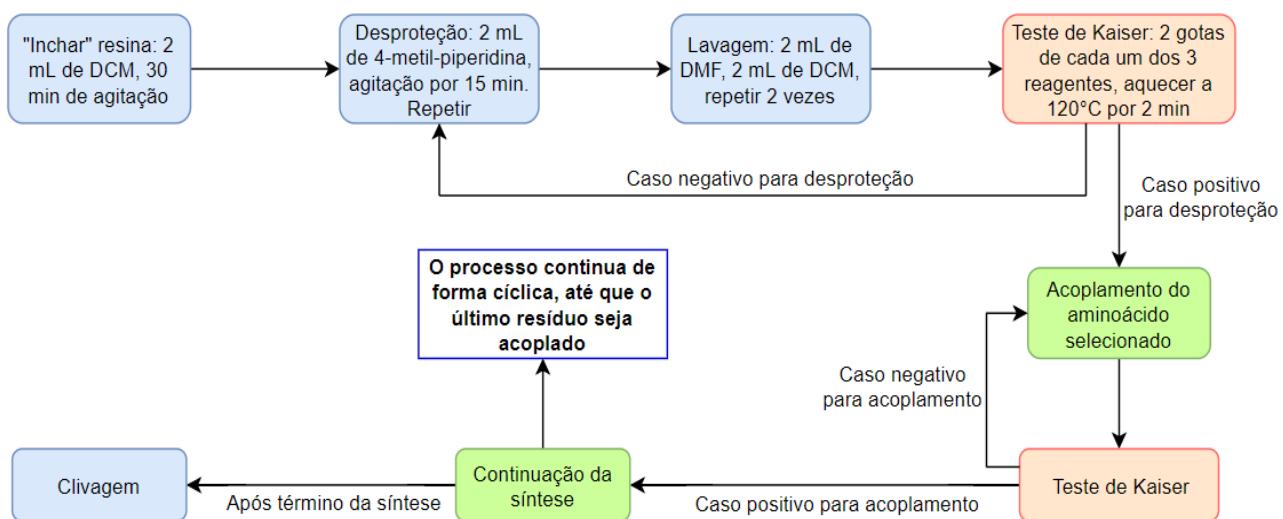


Figura 13: Fluxograma da Síntese em Fase Sólida

4.1.5 – Clivagem

Finalizada a síntese do peptídeo, partiu-se para a clivagem da resina. Para isso, preparou-se um “coquetel” de clivagem, composto por TFA/tioanisol/água/fenol/etanoditiol na proporção 82,5:5:5:2,5 (v/v) conforme apresentado na literatura (CHAN; WHITE, 2000). A clivagem de peptídeos mediada por TFA ancorados em resinas trialcoxibenzil-amina leva à clivagem do peptídeo da resina com concomitante eliminação dos grupos protetores dos aminoácidos da cadeia. Assim, foi obtido o peptídeo livre da resina e dos grupos protetores.

A inserção de reagentes como tioanisol, água, fenol e etanoditiol visa evitar a reação secundária dos grupos de proteção clivados com outros aminoácidos da mesma molécula. Isso é necessário pois os grupos retirados do peptídeo podem reagir com aminoácidos contendo grupos ricos em elétrons, tais como metionina e triptofano.

4.2 – Purificação dos peptídeos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A purificação dos peptídeos foi feita por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês “High Performance Liquid Chromatography”), em fase reversa, com monitoramento em dois comprimentos de onda: 216 nm e 280 nm (o primeiro comprimento de onda está relacionado à absorção da ligação peptídica e o segundo com cadeias laterais com moléculas aromáticas), em uma coluna preparativa Jupiter 00G-4055-P0 C18 300 Å em gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (v/v). Isso foi feito no NuPMIA (Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia), na Faculdade de Medicina da UnB.

4.3 – Caracterização dos peptídeos por Espectrometria de Massa (MS)

Para obtenção do produto bruto em fase sólida, o produto da clivagem foi lyophilizado. A caracterização dos peptídeos sintetizados foi feita com base na razão massa/carga esperada, e a sequência foi verificada conforme fragmentação do peptídeo, utilizando um Espectrômetro de Massa do tipo MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Extreme, Bruker Daltonics) disponibilizado pelo Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia. Uma mistura de solução de matriz de 10 mg.mL⁻¹ de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico em 50% (v/v) de acetonitrila e 0,3 (v/v) de TFA com cada um dos peptídeos, em uma proporção 3:1, foi aplicada a placa de MALDI. A mistura foi seca a atmosfera ambiente. Após a calibração do equipamento, os produtos foram analisados em modo refletor positivo. O íon de massa/carga esperado para cada peptídeo foi então fragmentado, via LIFT, para possibilitar o sequenciamento do mesmo, visando a confirmação da identidade.

4.4 – Quantificação dos peptídeos sintetizados

Após purificação e confirmação da quantidade, os produtos puros foram ressuspensos em água ultrapura para quantificação por espectroscopia de absorção de UV-Vis. A massa total obtida de peptídeo foi solubilizada e uma alíquota foi retirada e diluída, também em água ultrapura. Essa diluição se faz necessária devido à necessidade de que os comprimentos de onda selecionados apresentem valores de absorbância que respeitem os limites impostos pela Lei de Lambert-Beer. Foi considerada a absorbância associada aos comprimentos de onda de 205, 215 e 225 nm para o TAT e 280 nm para o Pep-1, devido à alta presença de triptofano em sua estrutura.

Para a quantificação do TAT foi usada a fórmula empírica mostrada abaixo:

$$Cp (\mu\text{g.mL}^{-1}) = \frac{(X + Y).Fd}{2}$$

Onde: Cp é a concentração do peptídeo

$$X = (Abs\ em\ 215 - Abs\ em\ 225) * 144 \text{ (WADDELL W. J., 1956)}$$

$$Y = (Abs\ em\ 205) * 31 \text{ (K SCOPES, 1974)}$$

$$Fd = \text{Fator de diluição}$$

Para a quantificação do Pep-1, foi utilizada a fórmula:

$$Cp (\text{mmol/L}) = \frac{Abs\ em\ 280}{\varepsilon} \times Fd$$

Onde: Cp é a concentração do peptídeo

$$Fd = \text{Fator de diluição}$$

ε = Coeficiente de extinção molar, também conhecido como absorvividade molar.

Para o Pep-1, o $\varepsilon = 27500$

4.5 – Síntese de vesículas fosfolipídicas

A síntese das vesículas fosfolipídicas se deu da seguinte maneira: os fosfolipídeos foram dissolvidos em clorofórmio, que foi posteriormente evaporado por meio de rotaevaporação para a formação de um filme multilamelar de vesículas nas paredes do balão de vidro usado. O filme foi submetido ao vácuo por duas horas para evaporação do solvente remanescente. Posteriormente esse filme de vesículas foi dissolvido em tampão de 20 mM de fosfato com NaCl a 150 mM (pH 7,4, força iônica de 150 mM, corrigida com NaOH e HCl) e a solução obtida foi submetida ao processo de extrusão, visando a conversão do produto multilamelar em vesículas grandes e unilamelares.

Sua quantificação foi realizada utilizando espectroscopia de absorção UV-Vis por meio de um método de complexação com ferrotiocianato.

4.6 – Testes de interação de CPPs com membranas fosfolipídicas

Para melhor entender a possível interação dos peptídeos sintetizados com membranas biológicas, foi primeiramente investigada a sua relação com membranas sintéticas. Para isso, foram utilizadas vesículas de DMPC e DMPG como modelos de membrana. A interação foi estudada por meio da técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC).

Os termogramas foram obtidos usando um equipamento VP-DSC (MicroCal, GE Healthcare – Disponibilizado pelo LEM - Embrapa Recursos Energéticos e Biotecnologia) à temperatura ambiente, usando uma rampa de temperatura de 10 a 40 °C em uma taxa de varredura de 0,5 °C/min. Foi analisada a interação dos peptídeos com dois tipos de membranas, diferentes em sua composição. Uma composta por DMPC e a outra composta por DMPC:DMPG. A amostra analisada era composta pelas vesículas (de DMPC ou DMPC:DMPG) em tampão fosfato, na concentração de 500 µM. Os peptídeos foram então inseridos à concentração de 20 µM e levados para análise.

4.7 – Estudo de Dicroísmo Circular

A análise foi feita considerando a adição de concentrações crescentes de vesícula, de forma a estudar o limite de saturação de estruturação dos peptídeos. Para isso, foram preparadas sete amostras com diferentes concentrações de vesícula – 0 µM, 40 µM, 80 µM, 160 µM, 320 µM, 640 µM e 1280 µM – e uma concentração fixa de peptídeo – 40 µM.

Tais amostras foram lidas em um espectropolarímetro Jasco J-850 (Jasco International Co., Japão) no alcance espectral de 200 – 260 nm em quatro varreduras a temperatura ambiente em uma cubeta de quartzo de 1 mm, com um intervalo de 0,2 nm e tempo de resposta de 0,5 s.

Os dados relativos aos espectros do tampão e de DMPC foram subtraídos dos espectros de cada peptídeo.

Os dados foram tratados de maneira a calcular a elipcidez residual média (MRE) em relação a parâmetros inerentes ao peptídeo sendo analisado, conforme a fórmula (CORRÊA; RAMOS, 2009) abaixo:

$$MRE = \frac{\theta \times 100 \times MM}{C \times l \times n}$$

Onde: θ é a elipcidez (em graus) relacionada ao comprimento de onda

MM é a massa molar do peptídeo sendo analisado

C é a concentração do peptídeo em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

n é o número de resíduos do peptídeo

l é o caminho óptico em cm

Na literatura encontram-se alguns métodos que possibilitam a predição da estrutura secundária de uma proteína/peptídeo a partir do seu espectro de CD, baseando-se em sua estrutura primária e informações estatísticas e/ou físico-químicas.

Em geral, a fração de helicidade de uma proteína/peptídeo é calculada (MARQUSEE; BALDWIN, 1987) em relação à elipcidade residual média em 222 nm, obtida experimentalmente. Um dos métodos mais simples e confiáveis para estimar a quantidade de α -hélice é a avaliação do sinal em 222 nm usando a seguinte fórmula(MORRISETT et al., 1973):

$$\% \text{ Hel (222 nm)} = \frac{([\theta]_{222} - 3000)}{(-36000 - 3000)}$$

Onde: $[\theta]_{222}$ é a elipcidade residual média (MRE) em 222 nm (dada em $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$)
-36000 seria o valor teórico máximo para uma proteína toda em α -hélice

4.8 – Experimentos de Extravasamento de Carboxifluoresceína (CF)

Para realização de ensaios de extravasamento de carboxifluoresceína (CF), foram gerados filmes fosfolipídicos capazes de encapsular CF, que atuou como marcador fluorescente.

Experimentalmente, foi medido o sinal de fluorescência da carboxifluoresceína antes da adição dos peptídeos ao meio, ou seja, quando a CF estava toda encapsulada nas vesículas, e também foi medido o sinal quando toda a carboxifluoresceína foi extravasada, utilizando-se para isso o detergente Triton X-100, que promove a lise completa das vesículas.

Após isso, foi realizada a mesma medição do sinal de fluorescência conforme a adição gradual de peptídeos membrano-ativos ao meio contendo as vesículas.

Os peptídeos membrano-ativos perturbam a integridade da membrana, causando microdefeitos em sua estrutura, que permitem o extravasamento de CF. Isso causa diminuição da supressão, levando ao aumento da intensidade de fluorescência e, conforme aumenta-se a concentração de peptídeos, espera-se um aumento da emissão de fluorescência.

A porcentagem de CF extravasada é calculada da seguinte forma:

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

4.9 – Análises Estatísticas

Análise exploratória de dados e Testes de hipóteses foram realizados utilizando o software JMP®. Para a análise de PCA2, a normalização dos dados foi realizada independentemente, para o conjunto de dados de 2012 e de 2016, como uma maneira de compensar as possíveis variações analíticas na aquisição dos dados. As primeiras cinco componentes principais das análises de PCA1 e PCA2 foram submetidas a um algoritmo de agrupamento hierárquico (hierarchical clustering algorithm), usando o método Ward sem uma segunda normalização de dados. O número de Clusters no agrupamento hierárquico foi escolhido arbitrariamente. Comparações não-paramétricas para todos os pares usando o método Stell-Dwass também foram calculadas utilizando o software JMP®.

5 – Resultados e Discussão

5.1 – Síntese e purificação dos CPPs

A síntese dos peptídeos TAT e Pep-1 foi feita pela metodologia de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.

Os produtos brutos de cada síntese foram clivados utilizando TFA, extraídos e lyophilizados, sendo posteriormente submetidos a purificação por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Abaixo apresenta-se os cromatogramas obtidos utilizando-se uma coluna Jupiter 00G-4055-P0 C18 300 Å e um gradiente de acetonitrila + 0,1% TFA (v/v) seguindo os procedimentos apresentados no subitem 4.2:

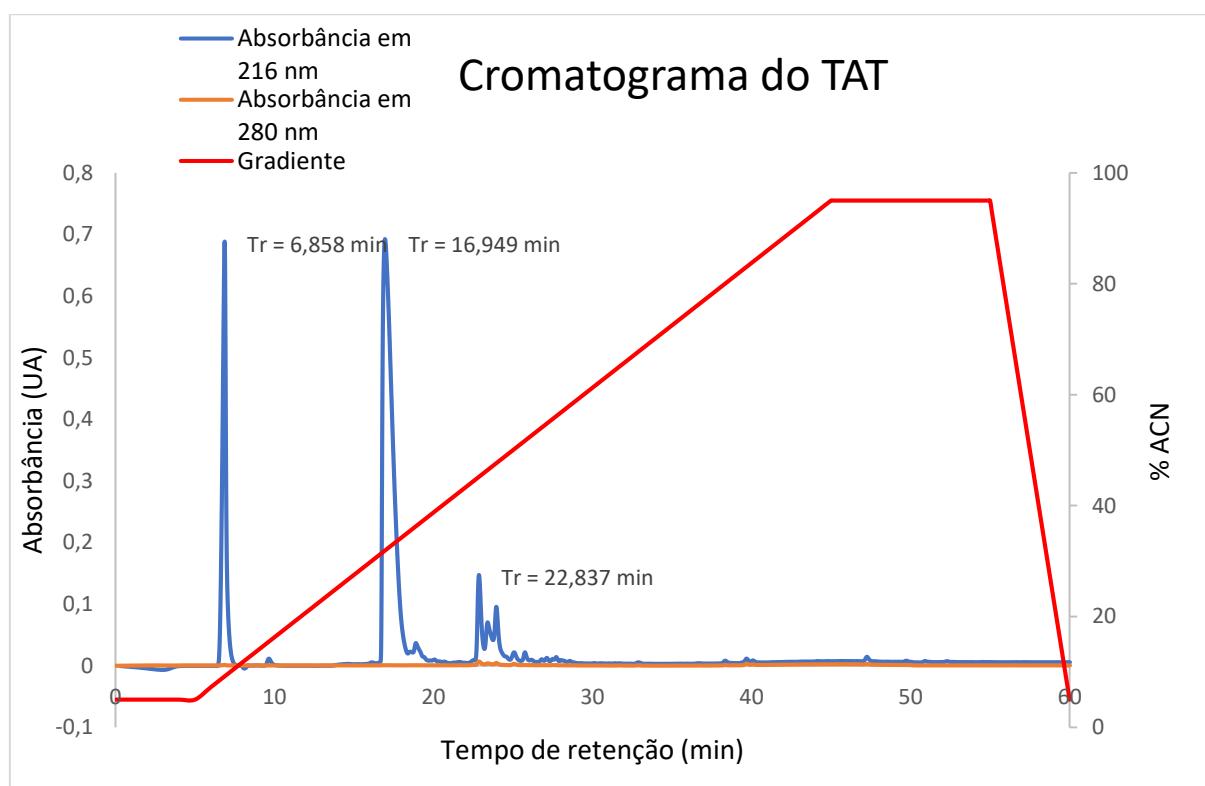


Figura 14: Cromatograma do peptídeo TAT. Peptídeo eluído em gradiente de acetonitrila + 0,1% (v/v) TFA, em coluna preparativa Jupiter 00G-4055-P0 C18 300 Å. O pico em aproximadamente 17 minutos corresponde ao peptídeo TAT, com os outros picos representando subprodutos de síntese. O TAT, por não possuir triptofano em sua estrutura, não apresenta absorção em 280 nm, apresentando absorção em 216 nm, referentes às ligações peptídicas.

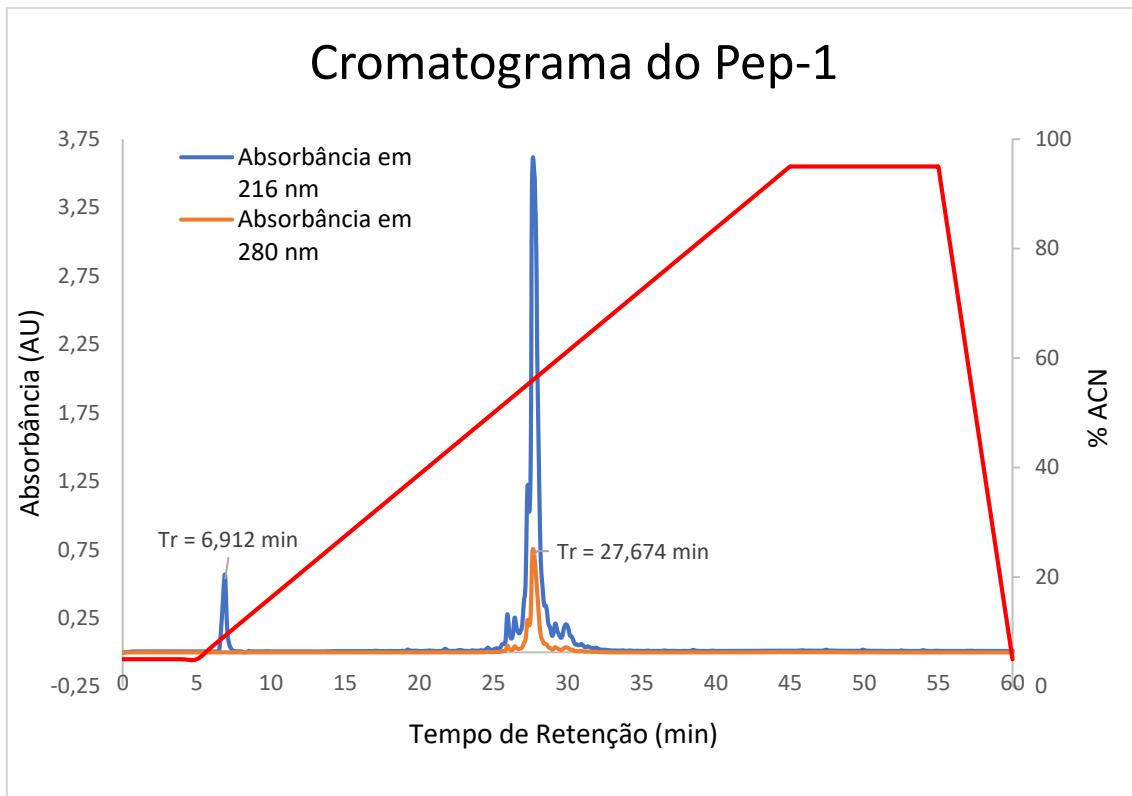


Figura 15: Cromatograma do peptídeo Pep-1. Peptídeo eluído em gradiente de acetonitrila + 0,1% (v/v) TFA, em coluna preparativa Jupiter 00G-4055-P0 C18 300 Å. O pico em aproximadamente 27 minutos corresponde ao peptídeo Pep-1, com os outros picos representando subprodutos de síntese. O Pep-1 absorve em 280 nm devido à presença de triptofano em sua estrutura primária.

De acordo com os cromatogramas das figuras 14 e 15, pode-se considerar a síntese dos dois peptídeos satisfatória, uma vez que os picos mais abundantes são aqueles contendo os produtos de síntese esperados, além de notar-se poucos picos decorrentes de subprodutos de síntese. Em ambos os cromatogramas observa-se um pico em aproximadamente 7 minutos, sendo eluído em 9,5% de ACN, que corresponde a algum subproduto resultante das reações de síntese, como algum excesso de grupo protetor que não foi removido por completo pelo éter di-isopropílico na etapa de clivagem.

É possível observar que os peptídeos são eluídos em % de ACN diferentes, indicando diferenças em suas propriedades físico-químicas, como sua hidrofobicidade. O fato do TAT ter sido eluído em aproximadamente 35% de ACN e o Pep-1 em aproximadamente 60 % de ACN está de acordo com hidrofobicidade dos peptídeos em estudo, sendo o TAT mais hidrofílico que o Pep-1, e por isso, eluído em um menor percentual de ACN.

5.2 – Caracterização dos CPPs por MS

Utilizando-se a técnica de Espectrometria de Massa foram analisadas as estruturas primárias dos peptídeos sintetizados.

Após síntese e purificação foram obtidos os espectros de massa dos produtos brutos. Os espectros obtidos das frações de peptídeo bruto corroboram com os dados obtidos por cromatografia. Os picos principais correspondem aos íons $[M+H]^+$ dos peptídeos sintéticos e poucos picos adicionais são observados.

Abaixo é mostrada uma tabela contendo a estrutura primária dos peptídeos sintetizados, acompanhadas de suas massas monoisotópicas – teórica e obtida experimentalmente.

TABELA 3 – $[M+H]^+$ experimentais e teóricas dos peptídeos em estudo

Peptídeo	Sequência	$[M+H]^+$ teórica	$[M+H]^+$ experimental
TAT	GRKKRRQRRPPQ	1718,075	1718,216
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	2846,489	2846,731

A seguir, os espectros de massa para cada um dos peptídeos são apresentados, com aproximação na área do íon relacionado com o produto, evidenciando a distribuição isotópica.

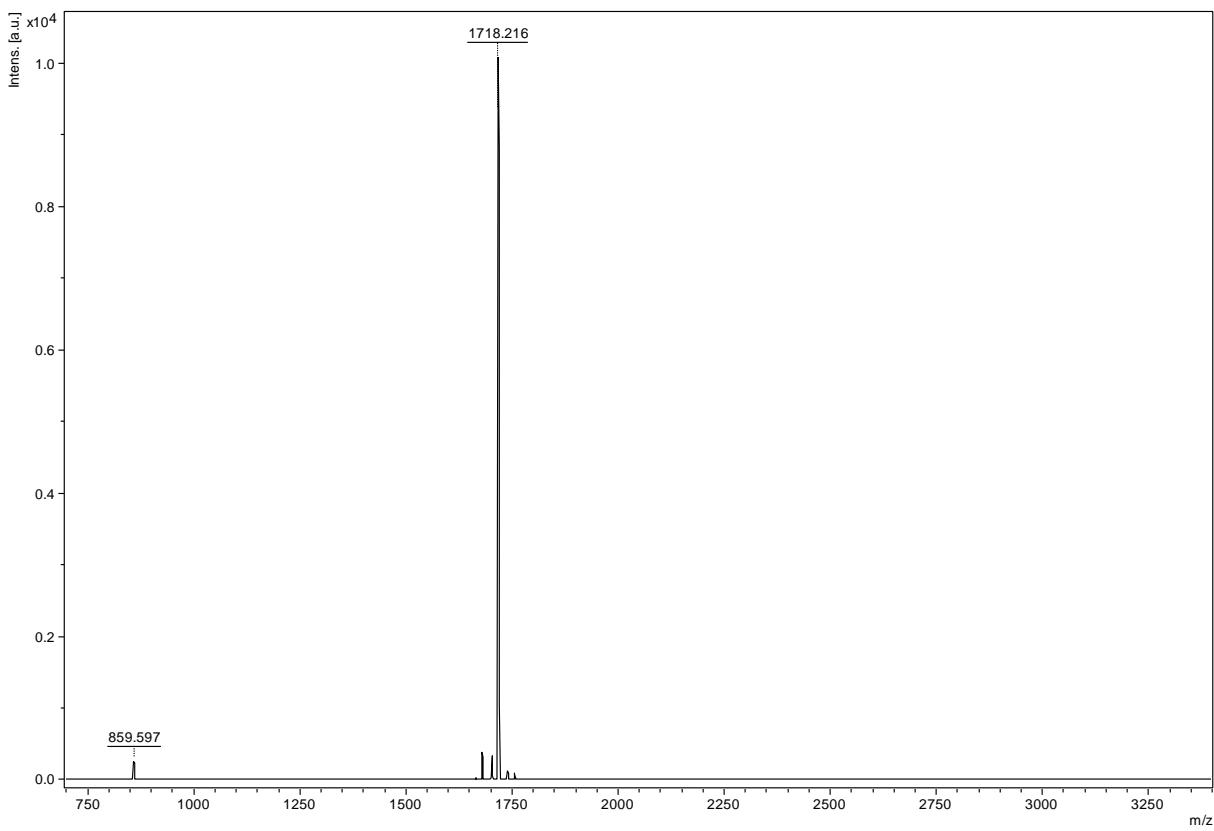


Figura 16: Espectro de MS do TAT obtido por meio de MALDI-TOF/TOF. A massa do íon $[M+H]^+$ obtida foi 1718,216 Da.

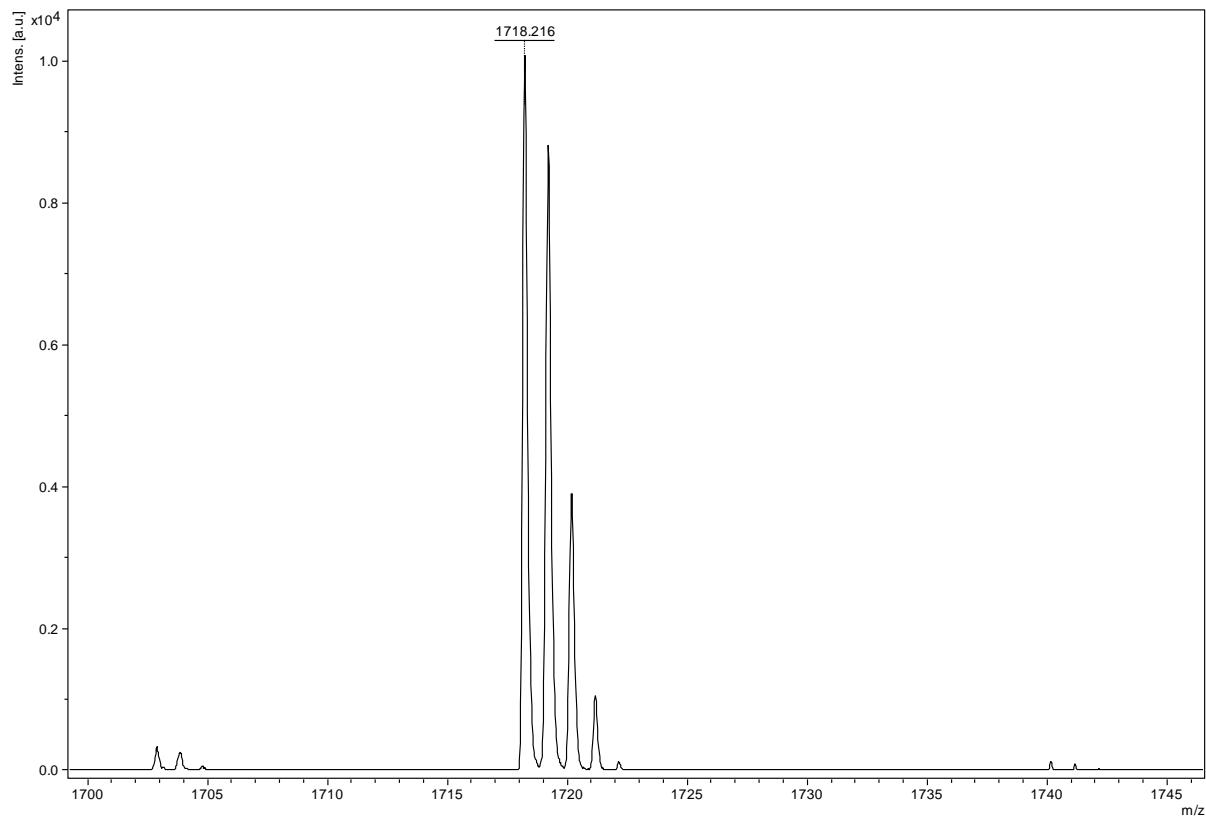


Figura 17: Zoom na faixa de m/z 1700 a m/z 1745 visando evidenciar a presença do íon de massa carga esperada para o TAT ($[M+H]^+ = 1718,075$ Da). A diferença entre a massa esperada e aquela apresentada no espectro se dá devido à calibração do equipamento.

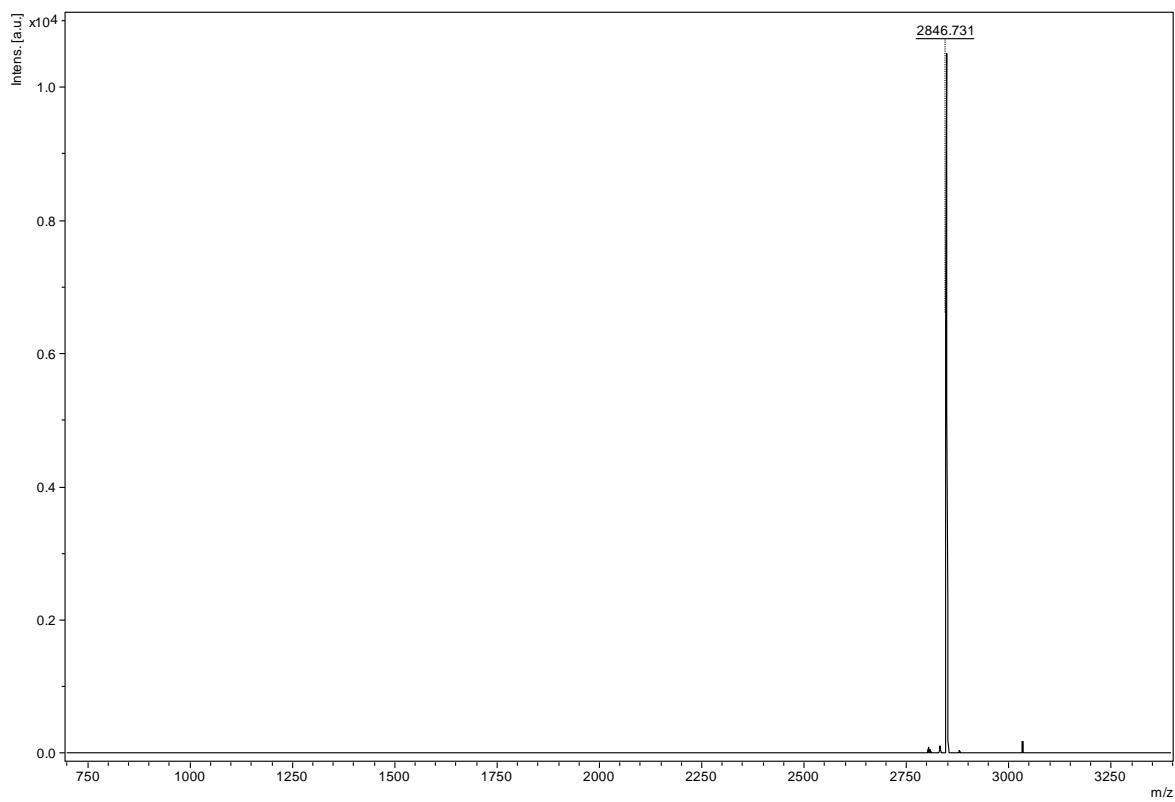


Figura 18: Espectro de MS do Pep-1 obtido por meio de MALDI-TOF/TOF. A massa do íon $[M+H]^+$ obtida foi 2846,731 Da.

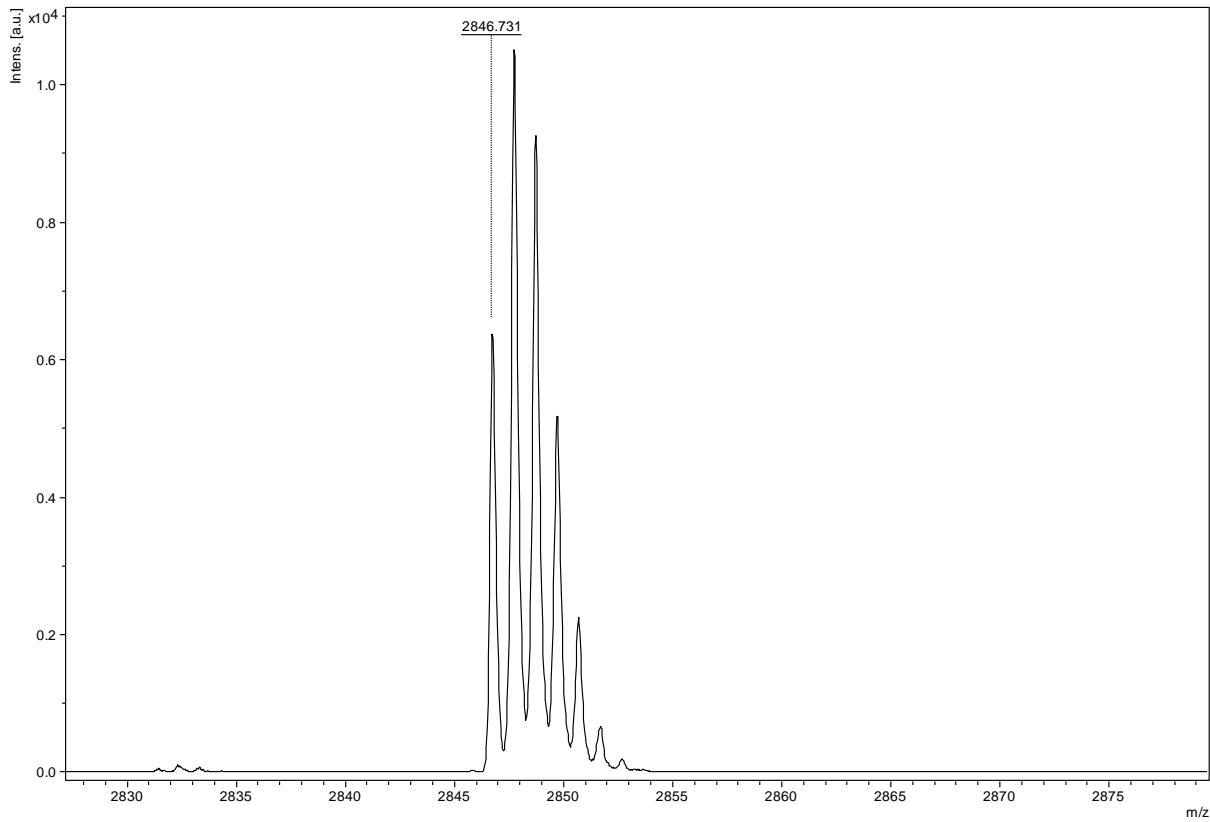


Figura 19: Zoom na faixa de m/z 2830 a m/z 2875 visando evidenciar a presença do íon de massa carga esperada para o Pep-1 ($[M+H]^+ = 2846,489$ Da). A diferença entre a massa esperada e aquela apresentada no espectro se dá devido à calibração do equipamento. Devido a massa do íon precursor ser relativamente alta, é observada a perda de resolução.

A identidade dos peptídeos sintetizados pôde ser confirmada por meio análise da fragmentação dos íons precursores de cada peptídeo em um Espectrômetro de Massa MALDI-TOF/TOF (UltraFlex Extreme, Bruker Daltonics).

Sobre o sequenciamento dos peptídeos é válido ressaltar alguns pontos importantes:

O aumento da energia interna dos íons gera fragmentação primariamente na ligação peptídica, produzindo duas séries de íons principais: a série y e a série b, de modo que a diferença de valores de m/z entre dois íons consecutivos do mesmo tipo pode revelar a identidade do resíduo de aminoácido em questão. As séries complementares podem ser utilizadas para sequenciamento tanto $N \rightarrow C$ terminal ou $C \rightarrow N$ terminal.

Sempre que um íon determinado (por exemplo, um íon -b) apresenta o íon correspondente (íon -y), a determinação ganha muito em confiabilidade (CANTÚ et al., 2008).

O íon $-b_1$ é raramente observado no espectro, por isso a determinação da ordem dos dois primeiros aminoácidos da região N-terminal é bastante difícil (CANTÚ et al., 2008), não aparecendo nos espectros MS/MS obtidos.

Nos sequenciamentos mostrados a seguir, obteve-se a correta estrutura primária dos CPPs sintetizados. A sequência dos peptídeos em questão foi confirmada por meio da interpretação da série y (lida da direita para a esquerda a partir do íon precursor) e da série b (lida da esquerda para a direita).

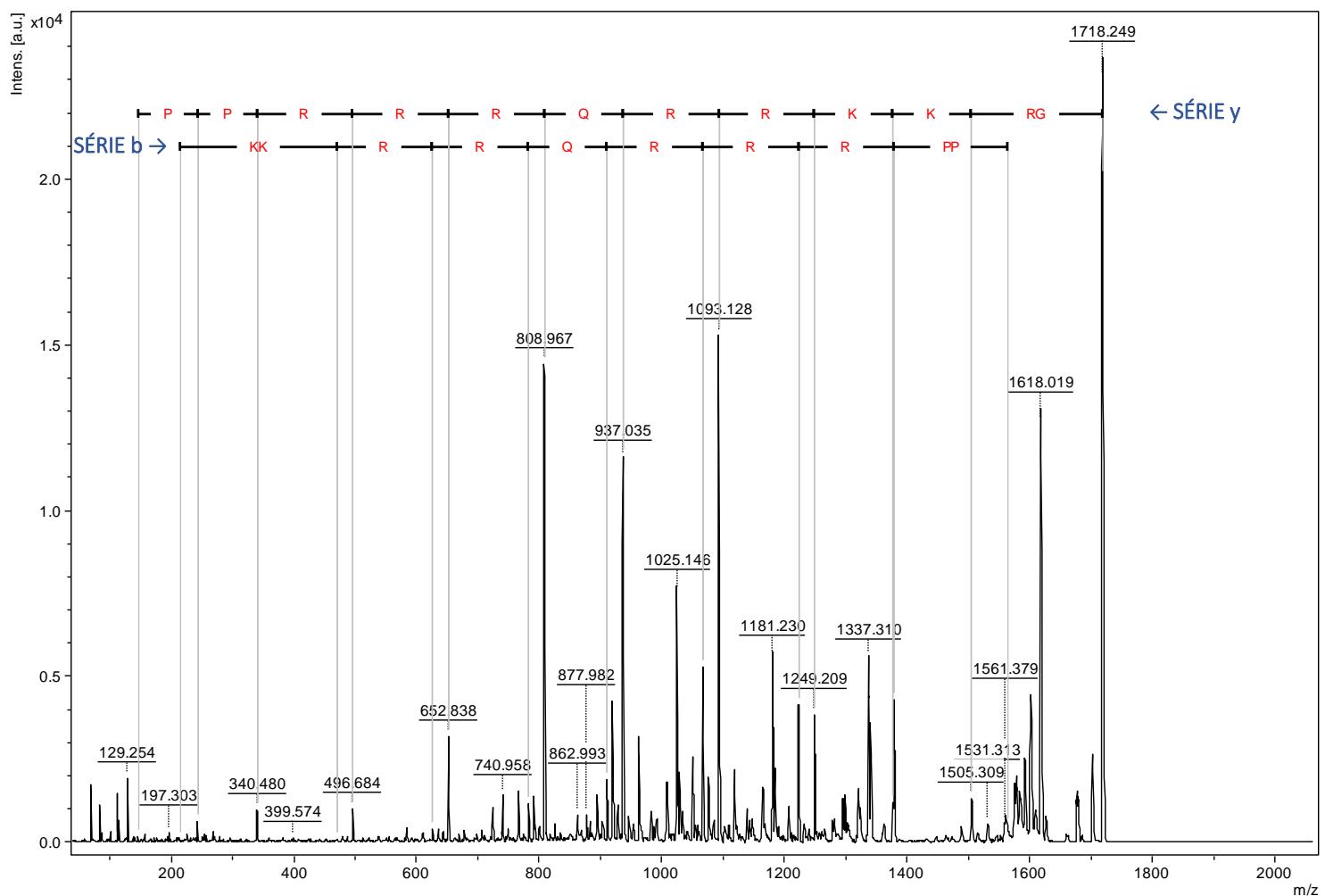


Figura 20: Espectro de MS/MS do TAT obtido por meio da fragmentação do íon de massa molecular em um MALDI-TOF/TOF. A sequência peptídica pelo código de uma letra seguindo as séries y e b é mostrada na parte superior do espectro. Estrutura primária: GRKKRQRRRPPQ.

Como mencionado anteriormente, a determinação da ordem dos dois primeiros aminoácidos da região N-terminal é bastante difícil, por isso, não aparecem os resíduos G e R no início da série b.

No sequenciamento do TAT foi possível observar as séries complementares y e b, de modo que o sequenciamento pôde ser considerado satisfatório.

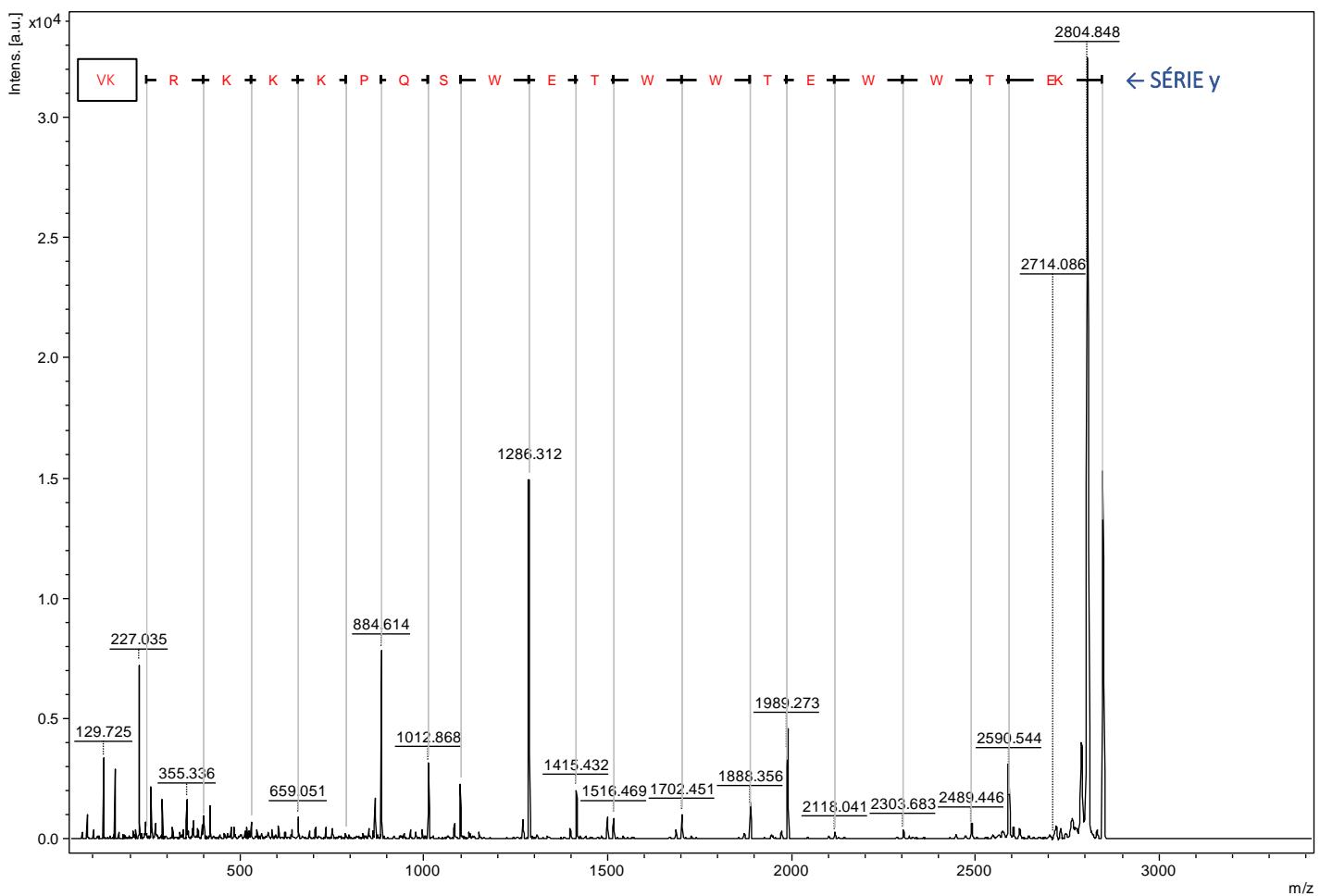


Figura 21: Espectro de MS/MS do Pep-1 obtido por meio da fragmentação do íon de massa molecular em um MALDI-TOF/TOF. A sequência peptídica pelo código de uma letra seguindo a série y é mostrada na parte superior do espectro. Estrutura primária:
KETWWETWWTEWSQPKKKRKV.

No caso do Pep-1, não foi observada a formação da série de íons -b. Isso se dá pelo fato de os mecanismos de formação dos íons -y e -b serem competitivos, de modo que uma das situações mais comumente enfrentadas na análise de peptídeos oriundos de digestão tríptica (R ou K na posição C-terminal) é a formação da série de íons -y ser favorecida (em relação à série -b), devido à elevada basicidade desses resíduos de aminoácidos (CANTÚ et al., 2008). Observando a estrutura primária do Pep-1 nota-se alta presença desses resíduos (R e K), explicando o fato observado.

Resumidamente, o mecanismo de fragmentação de peptídeos (com formação de íons -y e -b), se dá como mostrado no esquema a seguir:

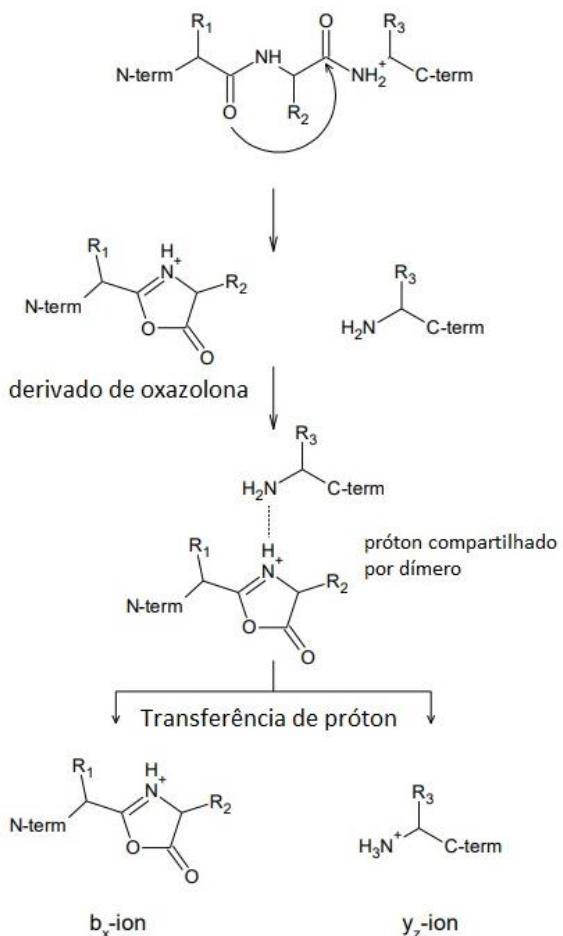


Figura 22: Esquema do mecanismo de fragmentação que forma os íons -y e -b. Imagem retirada de (PATTERTON, 2009) e adaptada.

Segundo o esquema da figura 22, ocorre um ataque nucleofílico do oxigênio da porção N-terminal do peptídeo, gerando uma espécie cíclica: um derivado de oxazolona e um peptídeo truncado. Após um rearranjo da molécula, um próton é compartilhado tanto pelo íon -y nascente quanto pelo íon -b. Se a afinidade por prótons for equivalente entre as espécies, tanto a série y quanto a série b são observadas, como no caso do TAT (figura 20). No entanto, se uma das espécies apresentar maior afinidade por prótons do que a outra, então uma série se sobressai.

No caso do mecanismo de fragmentação do Pep-1, a espécie que gera os íons -y apresenta maior afinidade por prótons do que a espécie que gera os íons -b, devido à grande presença de resíduos básicos (R e K) no C-terminal. Sendo assim, a série y é favorecida em relação a série b, no caso do Pep-1.

Apesar de não serem observadas ambas as séries, por se tratar de um peptídeo sintético, de estrutura primária conhecida, a análise do espectro MS/MS mostrou-se satisfatória no sequenciamento do peptídeo.

5.3 – Quantificação dos peptídeos sintetizados

Após purificação e liofilização, os peptídeos foram solubilizados em água para quantificação. As seguintes absorbâncias foram obtidas ao submeter as amostras a um espectrômetro de absorção UV-Vis:

TABELA 4 – Comprimentos de onda analisados e absorbâncias obtidas

Comprimento de onda (nm)	Absorbância TAT	Absorbância Pep-1
205	0,419	-
215	0,206	-
225	0,113	-
280	-	0,307

Conhecendo-se as absorbâncias, as concentrações foram calculadas de acordo com as fórmulas apresentadas no subitem 4.4 da metodologia (pg. 34), e seus valores estão apresentados na tabela 5 abaixo:

TABELA 5 – Concentrações obtidas dos peptídeos sintetizados

Peptídeo	Concentração (mM)
Pep-1	2,233
TAT	7,678

A quantificação dos peptídeos foi necessária para a realização das análises de CD e DSC.

5.4 – Estruturação dos peptídeos quando em interação com membranas modelo

A interação dos peptídeos sintetizados com modelos de vesícula fosfolipídica foi estudada utilizando-se a técnica de Dicroísmo Circular (CD). Tal análise foi feita considerando a adição de concentrações crescentes de vesícula, de forma a estudar o limite de saturação de estruturação dos peptídeos, conforme exposto no subitem 4.7 da metodologia (pg. 36).

Os dados obtidos através do experimento de dicroísmo celular são apresentados nos termos de elipcidez residual média (MRE). No entanto, foi feita a normalização dos resultados. Essa normalização permite que comparações independentes sejam realizadas através de resultados obtidos em diferentes análises, laboratórios ou ainda espetropolarímetros.

Abaixo são apresentados os espectros de CD obtidos experimentalmente para os peptídeos sintetizados:

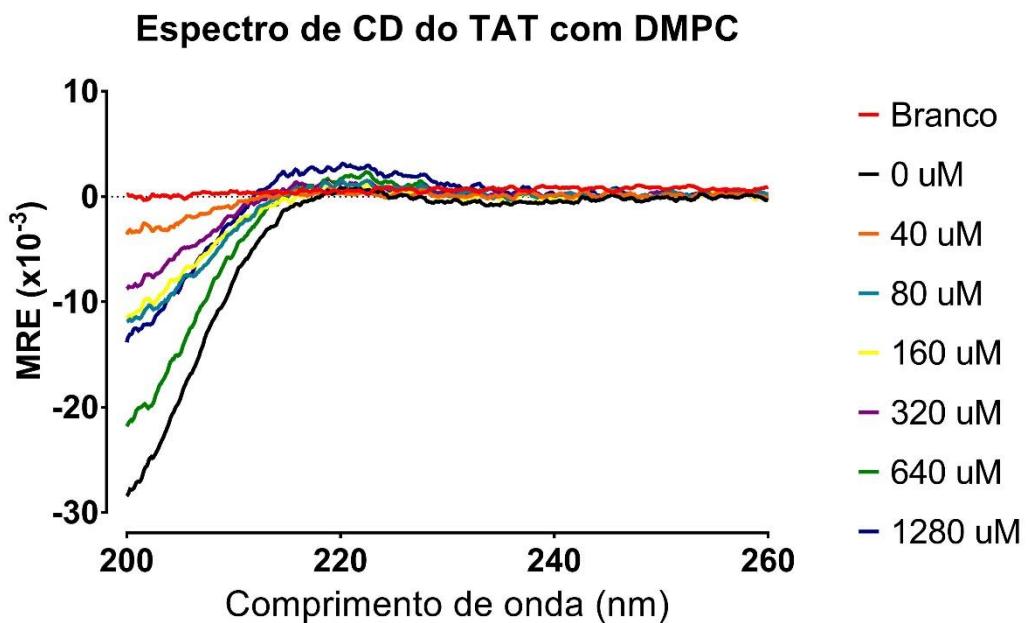


Figura 23: Espectro de dicroísmo circular (CD) do TAT em tampão fosfato e na presença de concentrações crescentes de LUVs de DMPC. A concentração do TAT foi mantida em 40 μM e o efeito de diluição corrigido.

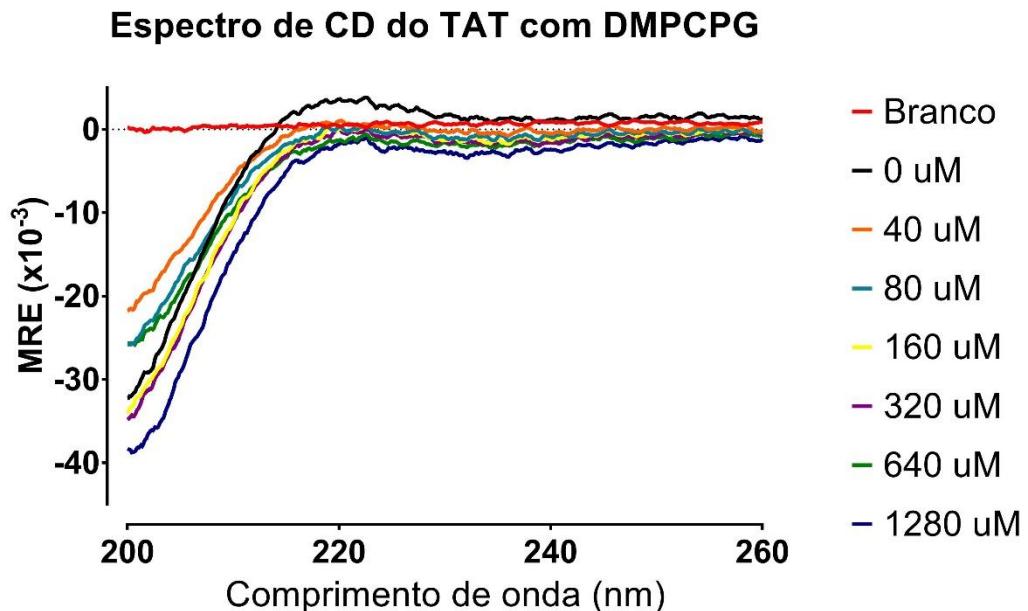


Figura 24: Espectro de dicroísmo circular (CD) do TAT em tampão fosfato e na presença de concentrações crescentes de LUVs de DMPC:DMPG (2:1). A concentração do TAT foi mantida em 40 μM e o efeito de diluição corrigido.

Espectro de CD do Pep-1 com DMPC

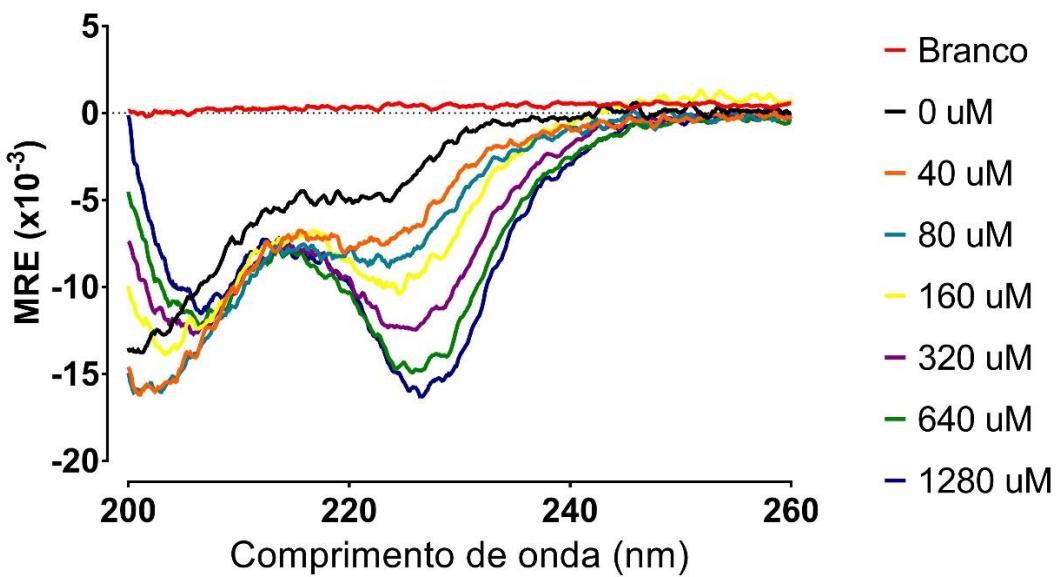


Figura 25: Espectro de dicroísmo circular (CD) do Pep-1 em tampão fosfato e na presença de concentrações crescentes de LUVs de DMPC. A concentração do Pep-1 foi mantida em $40 \mu M$ e o efeito de diluição corrigido.

Espectro de CD do Pep-1 com DMPCPG

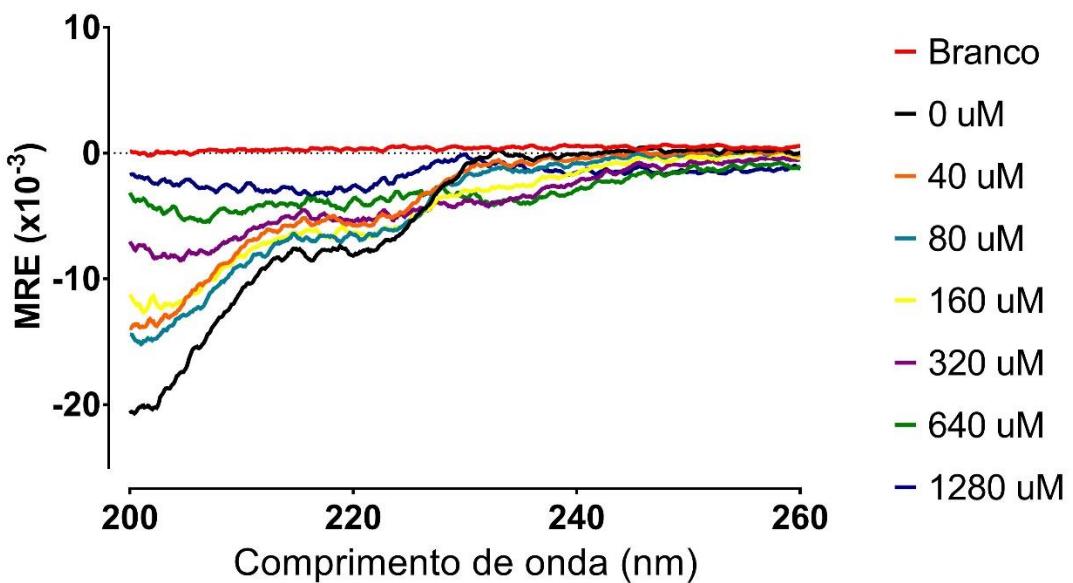


Figura 26: Espectro de dicroísmo circular (CD) do Pep-1 em tampão fosfato e na presença de concentrações crescentes de LUVs de DMPC:DMPG (2:1). A concentração do Pep-1 foi mantida em $40 \mu M$ e o efeito de diluição corrigido.

Como os peptídeos estudados assumem uma conformação randômica (sem uma estrutura definida) quando em solução aquosa, o agente de estruturação neste caso seriam as vesículas de DMPC ou 2:1 DMPC:DMPG adicionadas ao meio.

A análise dos espectros de CD permite determinar essa estrutura secundária adotada pelo peptídeo quando na presença da vesícula. Sendo assim, com base nos espectros apresentados acima, pôde-se inferir que o TAT, quando em contato com modelos de membranas lipídicas, não assume uma estrutura definida. Os espectros de CD do TAT (figura 23 e 24) mostram padrão característico de “random coil”. Já no caso do Pep-1, observou-se que o peptídeo apresentou certo grau de estruturação quando em contato com as vesículas, no entanto, não apresentou um padrão característico de α -hélice. Sendo assim, concluiu-se que o Pep-1, diferentemente da estrutura aleatória do TAT, apresentou discreto grau de estruturação, não podendo ser caracterizado, no entanto, como α -hélice usual, de acordo com os espectros de CD para o Pep-1 (figuras 25 e 26) e com as porcentagem de α -hélice do Pep-1 com DMPC calculadas como descrito na metodologia (pg. 37) e apresentadas abaixo:

TABELA 6 – Percentual de estruturação do peptídeo Pep-1 quando em contato com modelos de membrana fosfolipídica

Concentração de DMPC	0 μ M	40 μ M	80 μ M	160 μ M	320 μ M	640 μ M	1280 μ M
222 nm	20,20 %	26,03 %	29,91 %	32,24 %	36,16 %	39,67 %	39,94 %

Analizando os valores da tabela 6 (acima), nota-se que a estrutura α -hélice do Pep-1 com DMPC não é formada em grande quantidade, fato que corrobora com a observação de que o espectro de CD obtido para essa análise não apresentou padrão característico de α -hélice. Além disso, observa-se que o percentual de peptídeo estruturado em α -hélice aumenta com o aumento da concentração de vesículas.

O fato de não terem sido obtidos espectros de CD com perfis característicos de α -hélice – com intensos sinais indicativos de estruturação em α -hélice em 208 nm e 222 nm –, pode estar relacionado à alta presença de triptofano, onde a cadeia lateral relativamente volumosa, distorce discretamente a estrutura da α -hélice. Além disso, foi observado que a presença de prolina no peptídeo pode alterar o espectro de CD característico de α -hélice.

5.5 – Testes de interação de CPPs com membranas fosfolipídicas

A interação dos CPPs em estudo com vesículas de fosfolipídeos foi estudada por meio da técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

Utilizando esse método, é possível estudar o comportamento de uma amostra contendo vesículas unilamelares grandes “LUVs” (de DMPC ou de 2:1 DMPC:DMPG) e o peptídeo em análise frente à um padrão, quando um gradiente de temperatura é aplicado ao meio (10 a 40 °C). A interação do peptídeo com a membrana modelo é indicada pela mudança no comportamento de transição de fase $P'\beta \rightarrow L\alpha$.

A análise do efeito de cada peptídeo sobre a estabilidade das vesículas modelo (LUVs) de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG foi realizada mediante aquisição e interpretação dos termogramas respectivos às LUVs na presença e na ausência dos peptídeos TAT e Pep-1, obtidos na relação molar de 4mol% de peptídeo em fosfolipídeos.

A seguir são apresentados os termogramas obtidos experimentalmente, bem como a discussão dos mesmos:

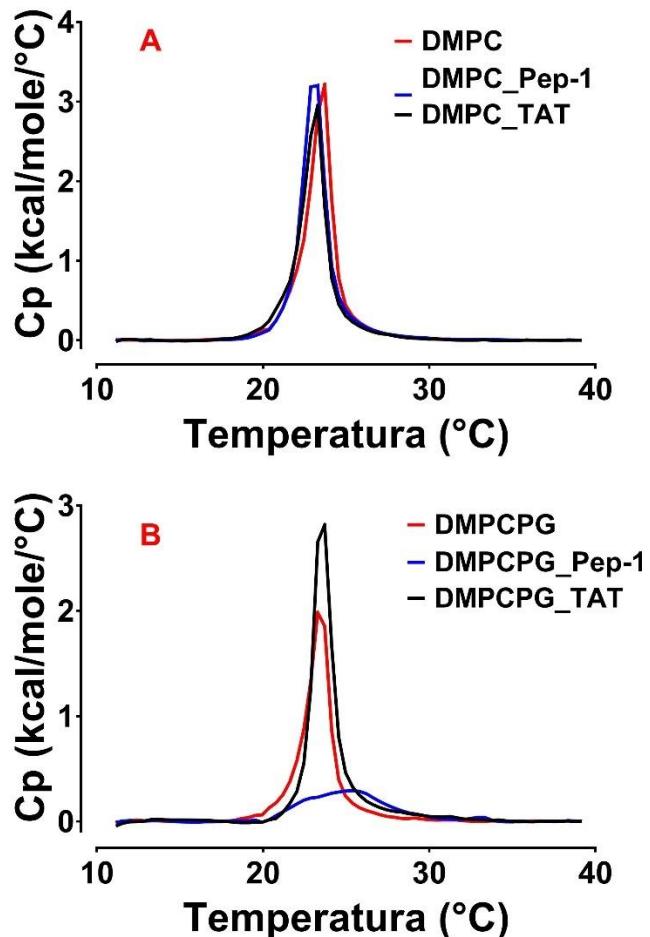


Figura 27: Termogramas da análise calorimétrica de vesículas (LUVs) de DMPC (A) e de 2:1 DMPC:DMPG(B) (500 μ M) antes e após a adição dos peptídeos TAT e Pep-1 (termogramas sobrepostos). As linhas vermelhas correspondem ao perfil termotrópico das vesículas somente em tampão fosfato (pH = 7,4), as linhas pretas correspondem ao perfil termotrópico das vesículas na presença do TAT e as linhas vermelhas correspondem ao perfil termotrópico da vesícula na presença de Pep-1. Os termogramas controle, obtidos com tampão, foram subtraídos de todos os dados.

Na figura 27 (A) é possível notar que a adição de ambos CPPs às LUVs de DMPC não provocou alterações significativas no comportamento termotrópico da vesícula, indicando que, como esperado para peptídeos penetradores de carga positiva (BRAND et al., 2018) , os peptídeos parecem não interagir com a membrana a ponto de interferir na interação das cadeias acil dos ácidos graxos.

Em concordância com esses resultados, o padrão randômico dos peptídeos TAT e Pep-1 em contato com as vesículas de DMPC prevaleceu mesmo após a adição de grandes quantidades de vesícula, conforme dados mostrados no subitem 5.4 dos resultados (pg.

50). Além disso, essa ausência de estruturação também é observada para um CPP já conhecido, a Penetratina, como mostrado em estudo já existente (BRAND et al., 2012).

Já no caso da adição dos CPPs às LUVs de 2:1 DMPC:DMPG, foi possível observar alterações significativas no comportamento termotrópico da vesícula, indicando que os peptídeos interagem com a membrana.

O fato dos CPPs em estudo não interagirem com as vesículas de DMPC e interagirem com as vesículas de 2:1 DMPC:DMPG pode ser explicado por ambos os peptídeos apresentarem alta carga positiva em sua estrutura, o que facilita a interação com vesículas com carga negativa, como as de fosfatidilglicerol, que apresenta carga -1 em pH fisiológico, enquanto que vesículas de fosfatidilcolina são neutras. Além disso, existem outros fatores relevantes, como o volume dos grupamentos cabeça.

Em outras palavras, o TAT e o Pep-1 requerem presença de carga negativa na membrana para interação perceptível.

Nas figuras 28 e 29, mostradas abaixo, são expostos os termogramas isolados para cada leitura, isso é, para cada análise das vesículas (de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG) com cada um dos CPPs.

A transição de fase das LUVs de DMPC e de 2:1 DMPC:DMPG foi deconvoluída em dois componentes: fino e largo, de acordo com estudo previamente realizado (EPAND; STURTEVANT, 1981). O componente fino de transição (sharp component) representa os eventos mais cooperativos do processo, enquanto aqueles menos cooperativos figuram no componente mais largo (broad component). Ao deconvoluir a curva em um componente fino e um largo, não se tem mais um comportamento único/homogêneo, pois o ajuste lida com mais de uma população. Tal heterogeneidade é inevitável na população de vesículas, mesmo após processo de extrusão.

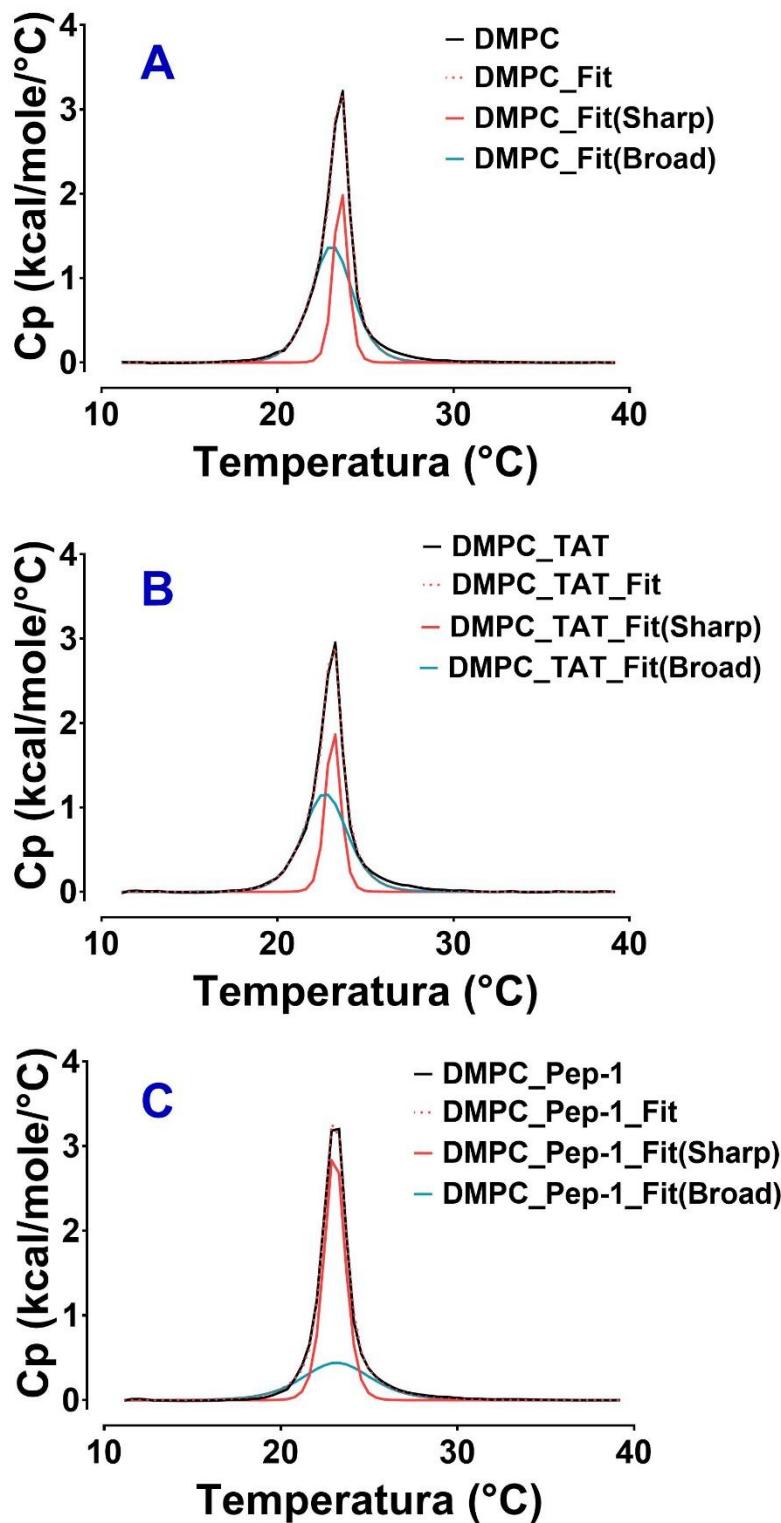


Figura 28: Termogramas da análise calorimétrica de vesículas (LUVs) de DMPC (500 μ M) antes (A) e após a adição dos peptídeos TAT (B) e Pep-1 (C). A transição de fases $P'_{\beta} \rightarrow L_a$ da vesícula determinada experimentalmente (linha preta) foi descrita mediante aplicação do modelo de ajuste “non-two state” (linha vermelha pontilhada, “DMPC_CpFit”), seguida pela distinção de dois componentes: sharp (linha vermelha) e broad (linha azul). Os termogramas controle, obtidos com tampão, foram subtraídos de todos os dados.

TABELA 7 – Dados associados aos termogramas apresentados na figura 28

		Parâmetro termodinâmico						
		T _{m1}	ΔH ₁	ΔH _{V1}	T _{m2}	ΔH ₂	ΔH _{V2}	Heat
Vesículas de DMPC	Ausência de peptídeo (referência)	23,11	4316	2,241x10 ⁵	23,59	2197	6,663x10 ⁵	6512
	Na presença do TAT	22,91	3906	2,073x10 ⁵	23,35	2173	6,287x10 ⁵	6269
	Na presença do Pep-1	23,24	2279	1,351x10 ⁵	23,11	4609	4,487x10 ⁵	6898

T_m = temperaturas de transição, em °C

ΔH = entalpias calorimétricas, em kcal.mol⁻¹

ΔH_V = entalpias de van't Hoff

Subíndice 1: relativos ao componente largo (broad componente)

Subíndice 2: relativos ao componente fino (sharp componente)

Como previamente discutido, não foram observadas alterações consideráveis no comportamento termotrópico das LUVs de DMPC após adição dos peptídeos TAT e Pep-1, isoladamente.

Mais especificamente, na figura 28 é possível notar a grande semelhança entre o termograma A (antes da adição de CPP) e o termograma B (após adição do TAT), indicando que tal adição não alterou a transição de fase da membrana, o que aponta ausência de interação peptídeo-membrana.

No termograma C da figura 28, obtido após a adição do Pep-1 às LUVs de DMPC, é possível notar alterações discretas nos componentes fino e largo, indicando que há interação peptídeo-membrana, porém que tal interação não tão pronunciada, isto é, não existe uma interação profunda do peptídeo com a porção acil do fosfolipídeo, sendo uma interação de caráter mais superficial.

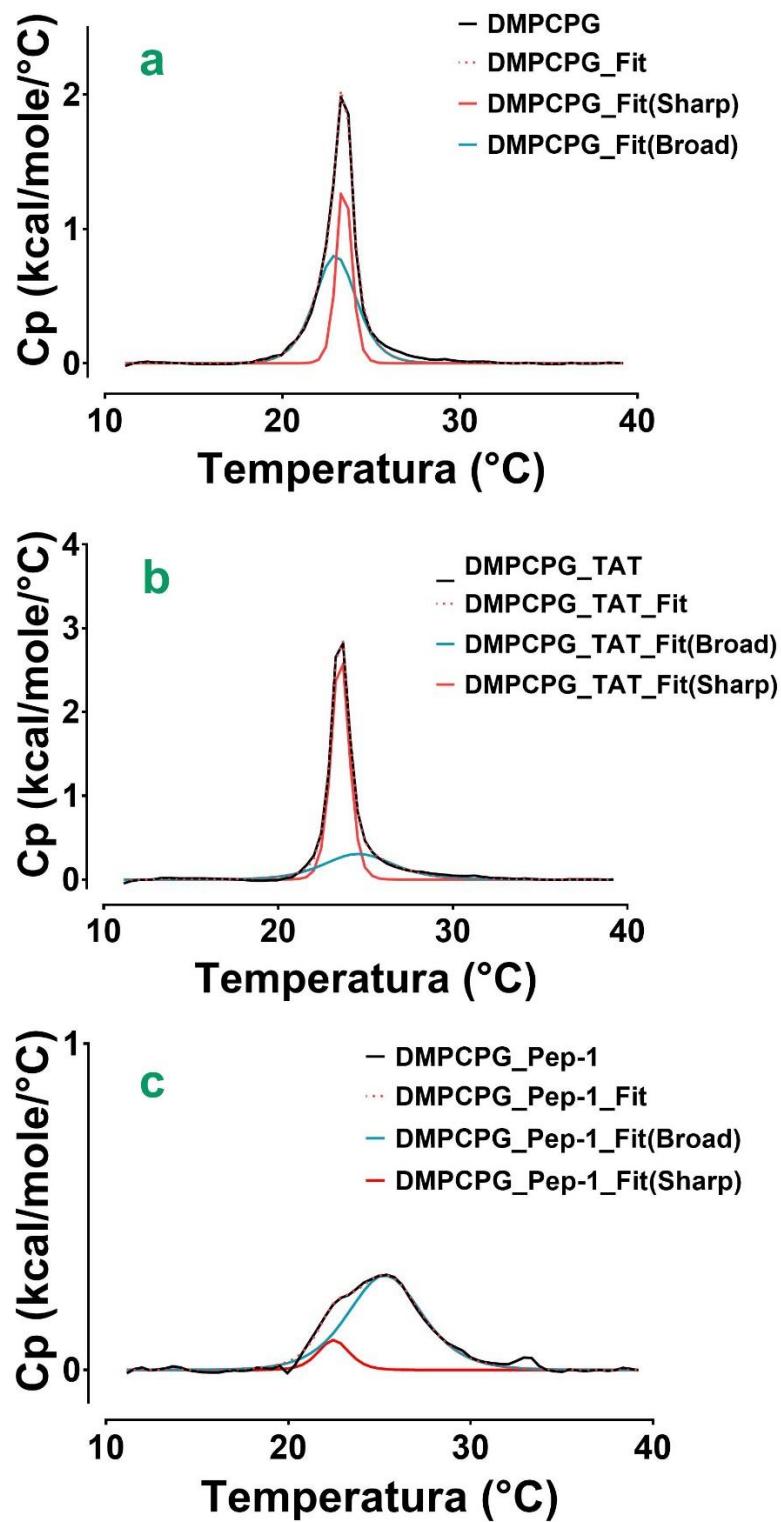


Figura 29: Termogramas da análise calorimétrica de vesículas (LUVs) de 2:1 DMPC:DMPG ($500 \mu M$) antes (a) e após a adição dos peptídeos TAT (b) e Pep-1 (c). A transição de fases $P'_{\beta} \rightarrow L_a$ da vesícula determinada experimentalmente (linha preta) foi descrita mediante aplicação do modelo de ajuste “non-two state” (linha vermelha pontilhada, “DMPCPG_CpFit”), seguida pela distinção de dois componentes: sharp (linha vermelha) e broad (linha azul). Os termogramas controle, obtidos com tampão, foram subtraídos de todos os dados.

TABELA 8 – Dados associados aos termogramas apresentados na figura 29

		Parâmetro termodinâmico						
		T _{m1}	ΔH ₁	ΔH _{V1}	T _{m2}	ΔH ₂	ΔH _{V2}	Heat
Vesículas de DMPCPG	Ausência de peptídeo (referência)	23,32	2517	2,225x10 ⁵	23,80	1512	6,487x10 ⁵	4201
	Na presença do TAT	24,82	1617	1,332x10 ⁵	23,76	3615	5,306x10 ⁵	5299
	Na presença do Pep-1	25,65	1566	1,313 x10 ⁵	22,82	206	3,092x10 ⁵	1786

T_m = temperaturas de transição, em °C

ΔH = entalpias calorimétricas

ΔH_V = entalpias de van't Hoff

Subíndice 1: relativos ao componente largo (broad componente)

Subíndice 2: relativos ao componente fino (sharp componente)

Em contraste ao que foi observado sobre a interação dos CPPs em estudo com as LUVs de DMPC, as análises por DSC indicaram que tais CPPs interagem significativamente com as LUVs de 2:1 DMPC:DMPG, fato observado pela interpretação dos termogramas exibidos na figura 29.

Da adição do TAT às LUVs de 2:1 DMPC:DMPG, observou-se aumento da T_{m1}, como mostrado na tabela 8, além de alterações significativas de entalpia, como a diminuição de entalpia do componente largo e aumento da entalpia do componente fino. No entanto, não foi observada alteração significativa na área embaixo da curva.

Já no caso da adição do Pep-1 às LUVs de 2:1 DMPC:DMPG foi observado que a componente fina passa a compor uma parcela considerável da transição de fase, indicando maior cooperatividade no processo e, portanto, maior dependência da temperatura, o que pode ser verificado pela redução da ΔH_{V2} (tabela 8, mostrada acima). Além disso, para ambas as componentes, são observadas alterações consideráveis na temperatura de transição de fase, onde a T_m do componente largo aumenta e a T_m do componente fino diminui. Alterações nas entalpias também foram observadas – diminuição da entalpia do componente largo e drástica diminuição da entalpia do componente fino. Outra grande diferença observada após a adição do Pep-1 é a diminuição considerável do calor do sistema. Todos esses fatores indicam que ocorre

profunda interação entre o Pep-1 e os fosfolipídeos, interagindo com a porção acil dos mesmos.

5.6 – Sistema de classificação experimental de peptídeos

O objetivo principal do presente trabalho era o enriquecimento de um sistema de predição experimental de peptídeos membrano-ativos (BRAND et al., 2018), visando tornar possível a predição *in silico* de novos peptídeos com capacidade de penetração em células.

Para isso, foram realizados os ensaios biofísicos, como CD e DSC, para melhor compreensão da interação dos CPPs estudados com as membranas modelo. Aos resultados obtidos, foi aplicada uma análise de componentes principais (PCA), que é uma ferramenta descritiva valiosa para redução de dimensionalidade, necessária para identificar similaridades entre os efeitos na transição de fase das membranas causadas pelos peptídeos em estudo.

O que se fez na prática, foi a inserção dos dados exibidos nas tabelas 6 e 7 (pg. 55 e 57) a um banco de dados contendo dados de 59 peptídeos previamente estudados (BRAND et al., 2018).

Após redução de dimensionalidade aplicando-se PCA, foi possível classificar os CPPs TAT e Pep-1, quanto ao efeito que causam na transição das LUVs de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG. Tais CPPs foram agrupados em clusters, juntamente com peptídeos membrano-ativos estudados previamente (BRAND et al., 2018). A figura 30 mostra esse agrupamento em clusters:

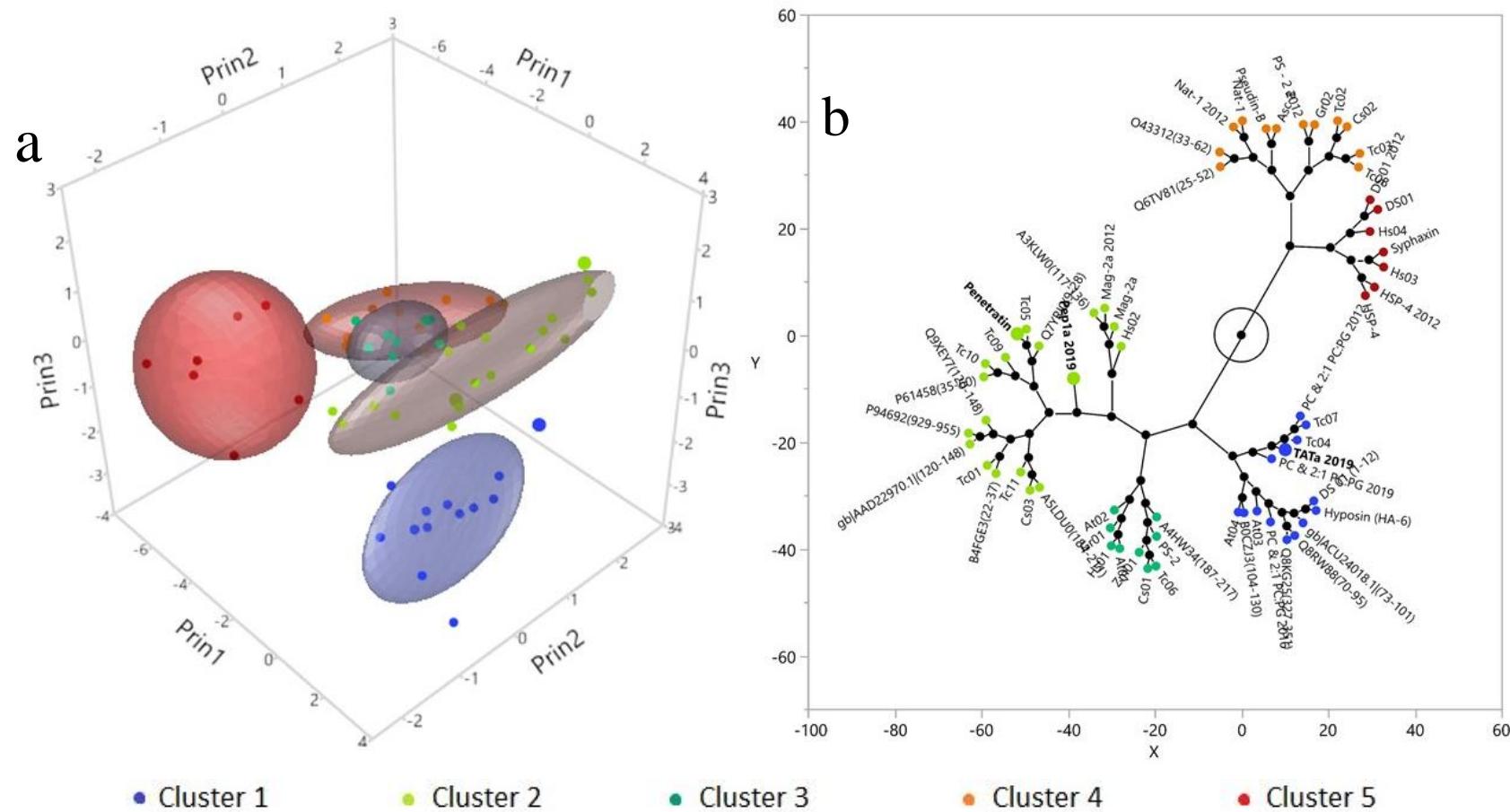


Figura 30: (a) Clusters formados após a análise estatística dos dados referentes a estudos de DSC da interação de 61 peptídeos com vesículas de DMPC e 2:1 DMPC:DMPG. Cada cluster é representado por uma cor diferente, conforme apresentado na figura, obtidos aplicando-se HCA (Hierarchical cluster analysis) aos dados coletados. (b) Diagrama de constelação categorizando peptídeos em clusters. (BRAND et al., 2018)(BRAND et al., 2018)(BRAND et al., 2018)(BRAND et al., 2018)(BRAND et al., 2018). No diagrama de constelação (b), é possível visualizar a posição da Penetratina e do Pep-1 no cluster verde-claro, e do TAT no cluster azul

De acordo com o exposto em estudo de Brand e colaboradores (BRAND et al., 2018):

O cluster 1 é composto por peptídeos que apresentaram alteração pouco significativa na transição de fase das membranas modelo, e apenas mostraram tal alteração quando presentes os fosfolipídios negativamente carregados de DMPG. O TAT foi englobado nesse cluster.

O cluster 2 é composto por peptídeos que não apresentaram interação significativa com LUVs de DMPC, no entanto foram capazes de causar alterações significativas na transição de fase de LUVs de 2:1 DMPC:DMPG. Os peptídeos Penetratina e Pep-1 foram englobados nesse cluster.

Os clusters 3 e 4 englobam IAPs e AMPs que alteram a transição de fase de LUVs de DMPC e LUVs de 2:1 DMPC:DMPG e que apresentam ampla atividade antimicrobiana.

O cluster 5 é composto somente por AMPs.

Além disso, sobre os resultados obtidos por CD, foi observado que os peptídeos dos clusters 1 e 2 permaneceram sem estruturação definida após adição das LUVs, enquanto os peptídeos dos demais clusters passaram a assumir estruturas mais helicoidais.

De dados também obtidos por estudos prévios de Brand e colaboradores, sabe-se que a Penetratina não apresenta interação apreciável com LUVs de DMPC, mas altera a transição de fase da vesícula significativamente quando essa apresenta em sua composição fosfatidilglicerol, que tem carga -1 em pH neutro. Esse padrão característico da Penetratina também foi observado para o Pep-1, como discutido no subitem 5.5 (pg. 50) do presente estudo. Em outras palavras, sabendo que a proximidade entre os pontos no diagrama dos clusters indica similaridade no efeito causado na transição de fase das membranas-modelo estudadas, pode-se dizer que o Pep-1 e a Penetratina causam efeitos similares na transição de fase das LUVs estudadas, indicando que, de alguma forma, interagem com as membranas de maneira similar. No caso desses CPPs especificamente, essa interação possui caráter penetrador.

Uma conexão lógica é a de que, se os peptídeos interagem de forma similar com essas membranas modelo, significa que, de alguma forma, o que é relevante físico-quimicamente para a interação dos peptídeos com a membrana é conservado, apesar da

diferença entre suas estruturas primárias. De fato, ambos CPPs são caracterizados como anfifílicos (MILLETTI, 2012).

Dessa observação, surge o questionamento: será que os peptídeos que apresentam perfil de interação similar, isso é, encontram-se próximos no diagrama dos clusters, também apresentam atividade biológica semelhante? Ou seja, será que os demais peptídeos do cluster 2, com maior projeção no segundo componente principal, próximos à Penetratina, também possuem capacidade penetradora? E, mais importantemente, será que peptídeos inseridos futuramente se localizarem próximos a esse CPP, podem ser também classificados como tal? Para o caso do Pep-1 isso se mostrou válido, no entanto, tal fato não é suficiente para afirmar que será válido para todos os casos. Um estudo mais extenso de CPPs e um enriquecimento do sistema de classificação ajudariam a esclarecer tal questão. Além disso, uma reavaliação dos demais peptídeos do cluster 2 quanto à sua capacidade penetradora de membranas seria pertinente, o que pode ser feito por ensaios de extravasamento de carboxifluoresceína, alvo de estudo futuro.

No caso do TAT, observando a figura 30, nota-se que o mesmo foi englobado no cluster 1, o que está de acordo com o discutido no subitem 5.5 (pg. 50), que diz que o TAT não apresentou interação com LUVs de DMPC e apresentou interação discreta com LUVs de 2:1 DMPC:DMPG.

Apesar de já constatada extensamente na literatura a capacidade penetradora do TAT, não era esperado que o mesmo se localizasse próximo à Penetratina no diagrama de clusters, devido à diferenças significativas em suas propriedades físico-químicas, sendo a Penetratina, assim como o Pep-1, um peptídeo anfifílico, enquanto o TAT é caracterizado como um peptídeo catiônico (MILLETTI, 2012). Tal diferença resulta em padrões de interação com as LUVs relativamente diferentes, não sendo observada essa proximidade entre o TAT e os demais CPPs abordados.

Um próximo passo pertinente também seria a reavaliação dos peptídeos próximos ao TAT no diagrama de clusters, quanto a sua capacidade penetradora e suas propriedades físico-químicas.

OBSERVAÇÃO: Um dos objetivos do trabalho era a realização de ensaios de extravasamento de carboxifluoresceína para constatar a capacidade penetradora dos peptídeos, sendo essa capacidade já descrita na literatura. No entanto, não houve tempo suficiente para a realização de tais ensaios, e por isso, tal assunto não é abordado nos resultados.

6 – Conclusões

O trabalho teve como objetivo a investigação da interação de peptídeos já descritos na literatura como peptídeos penetradores de célula, de modo que fosse analisada a possibilidade de predição de atividade biológica de peptídeos com atividades desconhecidas, baseando-se no perfil de interação de tais peptídeos com membranas-modelo e sua similaridade com perfis de interação de peptídeos com atividade biológica já descrita. Em outras palavras, a interação dos peptídeos selecionados para este estudo foi investigada visando a obtenção de um perfil de interação com membranas-modelo que fosse característico aos CPPs.

Para isso, foram selecionados os CPPs TAT e Pep-1, e como membranas foram usadas vesículas grandes unilamelares em duas composições, uma composta apenas por fosfatidilcolina (DMPC) e outra composta por uma mistura de fosfatidilcolina e fosfatidilglicerol (2:1 DMPC:DMPG), bons modelos para esse estudo com CPPs. Embora a extração desse conhecimento para a interação com outros sistemas (ambientes) careça de cautela e entendimento das limitações, os resultados obtidos nas análises são indícios relevantes da ação dos peptídeos em estudo sobre a estabilidade de membranas biológicas mais complexas.

Assim, a análise do efeito de cada peptídeo sobre a estabilidade das membranas-modelo foi realizada mediante aquisição e interpretação dos termogramas respectivos às LUVs na presença e na ausência dos CPPs, isoladamente. Da análise dos termogramas obtidos, constatou-se que tanto o TAT quanto o Pep-1 não apresentam interação significativa, a ponto de interferir na interação das cadeias acil dos ácidos graxos das LUVs de DMPC. Por outro lado, ambos os peptídeos apresentaram interação com as LUVs de 2:1 DMPC:DMPG – o Pep-1 em maior extensão que o TAT. Tal observação pode ser explicada devido ao fato do fosfatidilglicerol apresentar carga -1 em pH neutro, facilitando a interação com esses peptídeos, que apresentam alta carga positiva. Além disso, existem outros fatores relevantes, como o volume dos grupamentos cabeça, por exemplo.

Em concordância com esse resultado da análise por DSC, pela técnica de CD foi observado, assim como em estudos prévios (EIRÍKSDÓTTIR et al., 2010), que o padrão randômico desses peptídeo em contato com as vesículas prevaleceu mesmo após a adição de grandes quantidades de material lipídico.

Em posse dos resultados das análises por DSC e após redução de dimensionalidade por PCA, foi feita a inserção dessas informações em um banco de dados de peptídeos membrano-ativos previamente desenvolvido (BRAND et al., 2018), de modo que os CPPs estudados fossem agrupados com outros peptídeos, de acordo com o efeito que causam na transição de fase dessas membranas em estudo, ou seja, de acordo com o modo como interagem com essas membranas. Desse agrupamento, notou-se que o Pep-1 apresenta perfil de interação com LUVs de DMPC:DMPG similar ao apresentado pela Penetratina – um CPP já conhecido – dando fundamento à hipótese de que peptídeos que apresentam padrão de interação similar, possam apresentar também atividade biológica similar. O TAT, apesar de ter mostrado um perfil de interação com membranas-modelo similar ao Pep-1, foi agrupado em um cluster diferente. Tal fato se dá devido a diferença em suas propriedades físico-químicas, sendo o Pep-1 classificado como um peptídeo anfifílico e o TAT apresentando um caráter mais catiônico (MILLETTI, 2012).

Essa análise pelo ponto de vista da físico-química dos peptídeos é pertinente, pois indica a necessidade de uma reavaliação dos peptídeos já inseridos nesse sistema de classificação de peptídeos, de modo a estudar a relação entre as propriedades físico-químicas do peptídeo e o seu efeito na transição de fase das membranas-modelo. Além disso, um próximo passo necessário para reforçar a ideia do estudo, seria estudar a capacidade penetradora dos demais peptídeos pertencentes ao clusters 2, que perturbam a estabilidade de membranas-modelo de maneira similar ao Pep-1 e à Penetratina.

Em suma, pôde-se concluir do presente trabalho que o fato de os peptídeos estudados, bem como a Penetratina, apresentarem padrão de interação com membranas-modelo similares entre si, dá suporte a ideia de predição *in silico* de novos peptídeos com capacidade de penetração em células, de acordo com seu perfil de interação com membranas-modelo. No entanto, tal relação exige cautela, pois a observação da existência de uma relação entre padrão de interação com membranas e atividade biológica não é suficiente para afirmar que todos os peptídeos que apresentem perfil de interação similar ao da Penetratina, por exemplo, apresentarão também capacidade penetradora, mas já é um indício. Por isso, o enriquecimento desse sistema de classificação de peptídeos membrano-ativos com peptídeos penetradores de célula é um passo importante.

Referências

AMBLARD, M. et al. **Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis****Molecular Biotechnology**, 2006.

APOSTOLIDOU, M.; JAYASINGHE, S. A.; LANGEN, R. Structure of α -helical membrane-bound human islet amyloid polypeptide and its implications for membrane-mediated misfolding. **Journal of Biological Chemistry**, 2008.

BIGELOW, C. C. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. **Journal of Theoretical Biology**, 1967.

BRAND, G. **Estratégias para prospecção e predição de peptídeos bioativos**. [s.l: s.n].

BRAND, G. D. et al. Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. **PLoS ONE**, 2012.

BRAND, G. D. et al. Towards an experimental classification system for membrane active peptides. **Scientific Reports**, 2018.

BROOKS, H.; LEBLEU, B.; VIVÈS, E. **Tat peptide-mediated cellular delivery: Back to basics****Advanced Drug Delivery Reviews**, 2005.

CANTÚ, M. D. et al. **Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático****Química Novascielo**, , 2008.

CHAN; WHITE. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach**. [s.l: s.n].

CHIU, Y. L. et al. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. **Chemistry and Biology**, 2004.

CHUGH, A.; EUDES, F.; SHIM, Y. S. **Cell-penetrating peptides: Nanocarrier for macromolecule delivery in living cells****IUBMB Life**, 2010.

CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding , form and function. **African Journal of Biochemistry Research Vol.3**, 2009.

D'URSI, A. M. et al. A membrane-permeable peptide containing the last 21 residues of the G alpha(s) carboxyl terminus inhibits G(s)-coupled receptor signaling in intact cells: correlations between peptide structure and biological activity. **Molecular pharmacology**, 2006.

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. **Structural features of helical antimicrobial peptides: Their**

potential to modulate activity on model membranes and biological cells*Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1999.

DING, B.; CHEN, Z. Molecular interactions between cell penetrating peptide pep-1 and model cell membranes. **Journal of Physical Chemistry B**, 2012.

DUMONT, M. E.; RICHARDS, F. M. Insertion of apocytochrome c into lipid vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 7, p. 4147–4156, 10 abr. 1984.

EIRÍKSDÓTTIR, E. et al. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 2010.

EISENBERG, D.; WEISS, R. M.; TERWILLIGER, T. C. The helical hydrophobic moment: A measure of the amphiphilicity of a helix. **Nature**, 1982.

EPAND, R. F. et al. Interactions of the antimicrobial β -peptide β -17 with phospholipid vesicles differ from membrane interactions of magainins. **European Journal of Biochemistry**, 2003.

EPAND, R. M.; STURTEVANT, J. M. A Calorimetric Study of Peptide-Phospholipid Interactions: The Glucagon-Dimyristoylphosphatidylcholine Complex. **Biochemistry**, 1981.

FAWELL, S. et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1994.

FRANKEL, A. D.; PABO, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. **Cell**, 1988.

GENNIS, R. B. Biomembranes : molecular structure and function. **new york, Springer**, 1989.

GREGORY, S. M. et al. A quantitative model for the all-or-none permeabilization of phospholipid vesicles by the antimicrobial peptide cecropin A. **Biophysical Journal**, 2008.

GROS, E. et al. A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 2006.

HUANG, C. H.; LI, S. **Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids***Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1999.

JAIN, M. K.; WU, N. M. Effect of small molecules on the dipalmitoyl lecithin liposomal bilayer: III. Phase transition in lipid bilayer. **The Journal of Membrane Biology**, 1977.

JIANG, T. et al. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2004.

JOHNSON, K. E. **Histology and Cell Biology**. 2th. ed. Baltimore, Maryland: [s.n.].

K SCOPES, R. Scopes, R.K. **Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. Anal. Biochem.** **59**, 277-282. [s.l: s.n.]. v. 59

KALAFATOVIC, D.; GIRALT, E. **Cell-penetrating peptides: Design strategies beyond primary structure and amphipathicityMolecules**, 2017.

KNIGHT, J. D.; HEBDA, J. A.; MIRANKER, A. D. Conserved and cooperative assembly of membrane-bound ??-helical states of islet amyloid polypeptide. **Biochemistry**, 2006.

KRAUTWALD, S. et al. **Inhibition of regulated cell death by cell-penetrating peptides****Cellular and Molecular Life Sciences**, 2016.

LADBURY, J. E.; DOYLE, M. L. **Biocalorimetry 2 Applications of Calorimetry in the Biological Sciences**. [s.l: s.n.].

LAKOWICZ, J. R.; MASTERS, B. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, Third Edition. **Journal of Biomedical Optics**, 2008.

LAST, N. B.; RHOADES, E.; MIRANKER, A. D. Islet amyloid polypeptide demonstrates a persistent capacity to disrupt membrane integrity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2011.

LAST, N. B.; SCHLAMADINGER, D. E.; MIRANKER, A. D. **A common landscape for membraneactive peptides****Protein Science**, 2013.

LEE, J. **Bioluminescence, the Nature of the Light**. [s.l: s.n.].

LI, Y. Selective induction of apoptosis in mutant p53 premalignant and malignant cancer cells by PRIMA-1 through the c-Jun-NH₂-kinase pathway. **Molecular Cancer Therapeutics**, 2005.

LUO, X. G. et al. Fusion with pep-1, a cell-penetrating peptide, enhances the transmembrane ability of human epidermal growth factor. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 2016.

MÄE, M.; LANGEL, Ü. **Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery****Current Opinion in Pharmacology**, 2006.

MARASSI, F. M. et al. Orientation of cecropin A helices in phospholipid bilayers determined by

solid-state NMR spectroscopy. **Biophysical Journal**, 1999.

MARQUEE, S.; BALDWIN, R. L. Helix stabilization by Glu-...Lys+ salt bridges in short peptides of de novo design. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1987.

MCELHANEY, R. N. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, 1982.

MILLETTI, F. Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape (CPP). **Drug Discovery Today**, 2012.

MORRIS, M. C. et al. A Peptide Carrier for the Delivery of Biologically Active Proteins into Mammalian Cells: Application to the Delivery of Antibodies and Therapeutic Proteins. In: **Cell Biology, Four-Volume Set**. [s.l: s.n.].

MORRISETT, J. D. et al. Interaction of an Apolipoprotein (ApoLP-Alanine) with Phosphatidylcholine. **Biochemistry**, 1973.

MUNYENDO, W. L. L. et al. **Cell penetrating peptides in the delivery of biopharmaceuticals****Biomolecules**, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de Bioquímica de Lehninger 6th ed.** [s.l: s.n.].

NEW, R. R. C. **Liposomes: a practical approach**. Oxford: [s.n.].

PATTERTON, H.-G. Low energy peptide fragmentation pathways. **Advanced Biomolecular Research Cluster**, 2009.

PEREA, S. E. et al. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). **Cancer Research**, 2004.

PIRES, D. A. T.; BEMQUERER, M. P.; DO NASCIMENTO, C. J. Some mechanistic aspects on Fmoc solid phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 2014.

PLESCIA, J. et al. Rational design of sheperdin, a novel anticancer agent. **Cancer Cell**, 2005.

RUBEN, S. et al. Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus tat protein. **Journal of Virology**, 1989.

RYSER, H. J. P.; HANCOCK, R. Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture. **Science**, 1965.

SENATUS, P. B. et al. Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells in vitro and in vivo by a p53 COOH-terminal peptide. **Molecular cancer therapeutics**, 2006.

SHOKOLENKO, I. N. et al. TAT-mediated protein transduction and targeted delivery of fusion proteins into mitochondria of breast cancer cells. **DNA Repair**, 2005.

SNYDER, E. L. et al. Enhanced targeting and killing of tumor cells expressing the CXC chemokine receptor 4 by transducible anticancer peptides. **Cancer Research**, 2005.

STURTEVANT, J. M. A scanning calorimetric study of small molecule-lipid bilayer mixtures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1982.

THEISEN, D. M. et al. Targeting of HIV-1 Tat traffic and function by transduction-competent single chain antibodies. **Vaccine**, 2006.

TOSSI, A; SANDRI, L.; GIANGASPERO, A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. **Peptide Science**, 2000.

VERLY. **Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

WADDELL W. J. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. **J Lab Clin Med.**, n. 48(2):311–4, p. 48(2)?311–4, 1956.

WADIA, J. S.; STAN, R. V.; DOWDY, S. F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. **Nature Medicine**, 2004.

WHITE, S. H.; WIMLEY, W. C. **Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces***Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1998.

YANDEK, L. E. et al. Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. **Biophysical Journal**, 2007.

YEAMAN, M. R. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, 2003.

YIN, L. M. et al. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. **Journal of Biological Chemistry**, 2012.