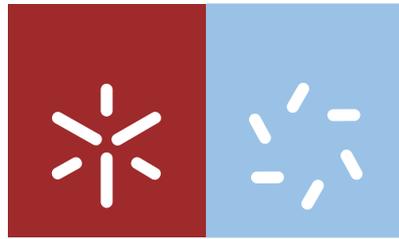


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

José do Egípto Ferreira Antunes

**Estudo da Interação entre Péptidos e Membranas Celulares por Dinâmica Molecular e Ensaio Experimental: o caso dos Péptidos com Atividade Membranar**



**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

José do Egípto Ferreira Antunes

**Estudo da Interação entre Péptidos e  
Membranas Celulares por Dinâmica  
Molecular e Ensaio Experimentais:  
o caso dos Péptidos com Atividade  
Membranar**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação do  
**Professor Doutor Artur Cavaco Paulo**  
e co orientação da  
**Professora Doutora Andreia Gomes**

Outubro 2012

## DECLARAÇÃO

Nome José do Egípto Ferreira Antunes

Endereço electrónico: pg18362@alunos.uminho.pt

Título dissertação

Estudo da Interação entre Péptidos e Membranas Celulares por Dinâmica Molecular e Ensaio Experimentais: o caso dos Péptidos com Atividade Membranar.

Orientador(es): Professor Doutor Artur Cavaco Paulo, Professora Doutora Andreia Gomes

Ano de conclusão: 2012

Designação do Mestrado ou do Ramo de Conhecimento do Doutoramento: Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas.

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, 10/10/2012

Assinatura: José do Egípto Ferreira Antunes

## ***Agradecimentos***

Em primeiro lugar no final desta etapa gostava agradecer imenso à minha família, em especial à minha mãe, Maria Judite Ferreira, e meu pai, Baltazar Pinto Antunes, por todos os seus esforços para criar e principalmente educar cinco filhos. Observando atualmente as minhas irmãs, meu irmão, meus sobrinhos e sobrinhas é perceptível que esse esforço foi algo de bastante difícil mas conseguido com muito sucesso, meus pais não puderam dar tudo que meus irmãos e eu queríamos, mas todos nós percebemos que a riqueza interior que nos foi transmitida é algo sem preço. Agradeço pelo apoio da minha família sempre que precisei, por nunca porem em causa as minhas opções e sempre confiarem em mim, pela educação, valores e saberes que me transmitiram e que permitiram me tornar na pessoa que sou.

Agradeço também à minha namorada Telma Silva, que esteve sempre a meu lado nesta jornada. Agradeço pelo seu apoio, carinho, amor, dedicação, e pela sua compreensão pelo tempo que muitas vezes não lhe dedicava devido ao trabalho necessário nesta dissertação.

Agradeço ao professor Artur Cavaco-Paulo, meu orientador, por me aceitar no seu laboratório, acreditar nas minhas competências e potencialidades, pelo seu incentivo e elogios. Agradeço também à professora Andreia Gomes, minha co-orientadora, que também contribuiu para esta oportunidade, agradeço pelo seu apoio, pela sua orientação e ajuda no trabalho efetuado. Aos meus orientadores um muito obrigado pela oportunidade, será algo que nunca esquecerei.

Agradeço a toda à gente que faz parte do Laboratório de Bioprocessos do departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho onde decorreu a maioria do trabalho desta dissertação, pela sua simpatia, pela forma como me receberam e sempre me trataram, por me ajudarem sempre que precisei, servindo o mesmo agradecimento para toda a gente do departamento de Biologia da Universidade do Minho que me ajudaram no decorrer desta dissertação.

Agradeço imenso ao Doutor Nuno Azoia. Foi a pessoa que mais me ajudou ao longo deste ano. Agradeço pelos seus ensinamentos, pelo seu apoio quer laboral quer pessoal, pela sua análise crítica, por me mostrar as suas opiniões, pelos seus conselhos e ajuda e pela sua disponibilidade. Acredito que sem a sua ajuda este trabalho ficaria empobrecido.

Agradeço também à Doutora Teresa Matamá pela sua ajuda em alguns dos ensaios laboratoriais efetuados, um muito obrigado pelo trabalho efetuado, pelos seus ensinamentos, e pela sua ajuda na análise dos resultados.

Por fim um sincero muito obrigado a toda a gente que de qualquer forma me ajudaram neste trabalho, obrigado por tudo, e por me permitirem atingir mais esta etapa na minha vida.



# **Estudo da Interação entre Péptidos e Membranas Celulares por Dinâmica Molecular e Ensaio Experimentais: o caso dos Péptidos com Atividade Membranar.**

## **Resumo**

A interação entre péptidos e membranas tem um papel fundamental num elevado número de processos, tais como nas funções das proteínas de membrana, na atividade antimicrobiana, nas infeções virais, bem como em processos que originam doenças graves como as neuro-degenerativas Alzheimer e Parkinson.

Péptidos penetrantes de células (do Inglês “Cell-penetrating peptides” - CPPs) e péptidos antimicrobianos (do Inglês “Antimicrobial peptides” - AMPs) são geralmente definidos como pequenos péptidos catiónicos com a propriedade de interagirem com membranas lipídicas, num processo dirigido pelas suas propriedades eletrostáticas e de hidrofobicidade. A interação de CPPs com membranas leva à sua translocação através desta, enquanto que os AMPs as costumam danificar. Uma nova classificação engloba CPPs e AMPs num grande grupo denominado por péptidos com atividade membranar (do Inglês “Membrane active peptides” - MAPs).

Neste trabalho foram desenhados três péptidos, o GA10 (GAGAGAGAGAGAGAGAGA), o LK10 (LKLKLLKLLKLLKLLKLLK) e o LE10 (LELELELELELELELELE), para o estudo das suas interações com membranas lipídicas, por simulações de dinâmica molecular (do Inglês “Molecular Dynamics” - MD) e ensaios laboratoriais, nomeadamente ensaios de caracterização físico-química e de fluorescência com lipossomas, ensaios de citotoxicidade e testes de atividade antimicrobiana. O objetivo de estudo é contribuir para uma melhor caracterização dos mecanismos responsáveis pela atuação de MAPs em membranas celulares.

Os resultados de MD mostraram uma interação evidente do péptido LE10 com as membranas simuladas, que leva à dobra das membranas à volta deste péptido. Essa interação foi confirmada pelos estudos laboratoriais. O péptido LE10, carregado negativamente, apresenta características de CPP (translocação através de membranas) e de AMP (disrupção membranar) nos estudos realizados, apontando para que a carga positiva possa não ser uma propriedade fundamental, e para que a classificação de MAPs seja a mais adequada a estes tipos de péptidos.

Tendo em conta as propriedades aqui demonstradas pelo péptido LE10, modificações na sua estrutura podem torná-lo num vector promissor na entrega dirigida de fármacos.



# **Study of the Interaction Between Peptides and Membranes by Molecular Dynamics and Experimental Assays: the case of Membrane Active Peptides.**

## **Abstract**

The interaction between peptides and membranes plays a fundamental role in many processes, such as in membrane proteins functions, in antimicrobial activity, in viral infections, and in process that leads to diseases like the neurodegenerative Alzheimer and Parkinson.

Cell-penetrating peptides (CPPs) and antimicrobial peptides (AMPs) are generally defined as small cationic peptides that have the property of interacting with lipidic membranes, in a process driven by their electrostatic and hydrophobicity features. The interaction with CPPs is known to lead to its translocation across the membrane, while with AMPs by lead to membrane damage. One new classification includes the CPPs and AMPs in one big group denominated by membrane active peptides (MAPs).

This work reports the design of three peptides, the GA10 (GAGAGAGAGAGAGAGAGA), the LK10 (LKLKLLKLKLLKLKLLKLK) and the LE10 (LELELELELELELELELELE) for the study of their interactions with lipidic membranes, by molecular dynamics (MD) simulations and laboratory assays, namely assays of physicochemical characterization and of fluorescence of liposomes, cytotoxic assays and antimicrobial activity tests. The objective of this work is to contribute towards a better characterization of the mechanisms behind the MAPs actuation over cell membranes.

The MD results showed one evident interaction of the LE10 peptide with the simulated membranes, which leads to the membrane bending around the peptide. This interaction was also confirmed by laboratory experiments. The LE10 peptide, negatively charged, shows features of CPP (translocation through membranes) and AMP (membrane disruption) in the performed studies, indicating that the positive charge may not be a fundamental property, with the classification of MAP being more suitable for this type of peptides.

Based on the LE10 properties here demonstrated, modifications in its structure may make it a very promising tool as a drug delivery vector.



1. Introdução Teórica.....	3
1.1. Membranas Biológicas.....	3
1.1.1. História.....	3
1.1.2. Composição.....	5
1.1.2.1. Lípidos.....	5
1.1.2.2. Hidratos de Carbono.....	11
1.1.2.3. Proteínas.....	13
1.2 Péptidos com Atividade Membranar (“Membrane Active Peptides” - MAPs).....	20
1.2.1. Péptidos Antimicrobianos (“AntiMicrobial Peptides”- AMPs).....	20
1.2.2. Características Estruturais e Modos de Atuação Gerais dos AMPs.....	22
1.2.3. Péptidos Penetrantes de Células (“Cell-Penetrating Peptides” - CPPs).....	24
1.2.4. AMPs e CPPs, Diferentes Classes de Péptidos com Atividade Membranar?.....	26
1.3 Modelação e Simulação Molecular Computacional.....	28
1.3.1. Mecânica Molecular.....	30
1.3.2. Dinâmica Molecular.....	32
1.3.3. Monte Carlo.....	34
1.3.4. Evolução da Simulação Molecular.....	35
1.4 Motivação da Dissertação.....	38
2. Materiais e Métodos.....	43
2.1. Estudos Computacionais.....	43
2.1.1. Construção dos Modelos Computacionais dos Péptidos e Membranas.....	43
2.1.2. Simulações de Dinâmica Molecular.....	43
2.1.3. Simulações “Coarse Grained”.....	48
2.2. Estudos Laboratoriais.....	51
2.2.1. Ensaio com Lipossomas.....	51
2.2.2. Ensaio In Vitro.....	52
2.2.2.1 Ensaio do MTT.....	53
2.2.2.2. Ensaio da LDH.....	54
2.2.2.3 Testes Antimicrobianos.....	55
3. Resultados e Discussão.....	59
3.1 Modelos Computacionais.....	59
3.1.1. Péptidos.....	59
3.1.2. Modelos Membranares.....	62
3.2 Simulações da Interação dos Péptidos com as Membranas.....	65
3.2.1 Simulações com Sistemas S.....	65
3.2.1.1. Interação do Péptido GA10 com a Membrana S.....	65
3.2.1.2. Interação do Péptido LK10 com a Membrana S.....	70
3.2.1.3. Interação do Péptido LE10 com a Membrana S.....	75
3.2.1.4. Comparação da Interação dos Três Péptidos com a Membrana S.....	80
3.2.2. Simulações com Sistemas P.....	88
3.2.2.1. Interação dos Péptidos GA10, LK10 e LE10 com Membranas de POPC.....	88
3.2.3. Simulações Entre o Péptido LE10 e as Membranas M e L.....	95
3.2.4. Simulação da Interação Entre o Péptido LE10 e a Membrana CG.....	100
3.3 Ensaio Laboratoriais.....	103
3.3.1. Ensaio com Lipossomas.....	103
3.3.1.1. Estudos de DLS.....	103
3.3.1.2. Estudos de Espectroscopia e Microscopia.....	105

3.3.2. Ensaio In Vitro.....	107
3.4 Discussão Global dos Resultados.....	111
4. Trabalho Futuro.....	119
5. Conclusão.....	123
6. Referências Bibliográficas.....	127

## Lista de Abreviaturas

Para simplificar a leitura deste documento foram usadas as abreviaturas inglesas sempre que essas sejam comuns na área abordada. Assim na lista de abreviaturas estão presentes os termos correspondentes às abreviaturas em português, seguido pelos termos em inglês quando as siglas usadas no texto foram as correspondentes a esses termos.

**AMP** - Péptido antimicrobiano (antimicrobial peptide)

**AAMP** - Péptido antimicrobiano aniônico (anionic antimicrobial peptide)

**CAMP** - Péptido antimicrobiano catiónico (cationic antimicrobial peptide)

**CDO** - Comprimento de onda

**CG** - Granulação grosseira (coarse-grained)

**CM** - Centro de massa

**COL** - Colesterol

**CPP** - Péptido penetrante de células (cell penetrating peptide)

**DLS** - Espalhamento de luz dinâmico (dynamic light scattering)

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)

**EPC** - Fosfatidilcolina de lecitina de ovo ( egg phosphatidylcholine)

**FF** - Campo de forças (force field)

**GROMACS** - Groningen machine for chemical simulations

**LDH** - Lactato desidrogenase (lactate dehydrogenase)

**MAP** - Péptidos com atividade membranar (membrane Active Peptids)

**MC** - Monte carlo

**MD** - Dinâmica molecular (molecular dynamics)

**MM** - Mecânica molecular

**NPT** - Ensemble isotérmico-isobárico

**MQ** - Mecânica quântica

**MTT** - Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

**NR** - Nile red

**NVT** - Ensemble canônico

**PBC** - Condições periódicas de fronteira (periodic boundary conditions)

**PDB** - Protein data bank

**PDI** - Polidispersividade

**PH** - Ponte de hidrogénio

**PMF** - Potencial de força média (potential of mean force)

**POPC** - 1-Palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina ( 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine)

$\zeta$  - Potencial zeta

**RDF** - Distribuição radial de pares (radial distribution function)

**Rg** - Raio de giração

**RMSD** - Desvio quadrático médio (root mean square deviation)

**RMSF** - Flutuação do valor quadrático médio (root mean square fluctuation)

**RNA** - Ácido ribonucleico (ribonucleic acid)

# ***Capítulo 1***

## ***Introdução Teórica***



## **1. Introdução Teórica**

### **1.1. Membranas Biológicas**

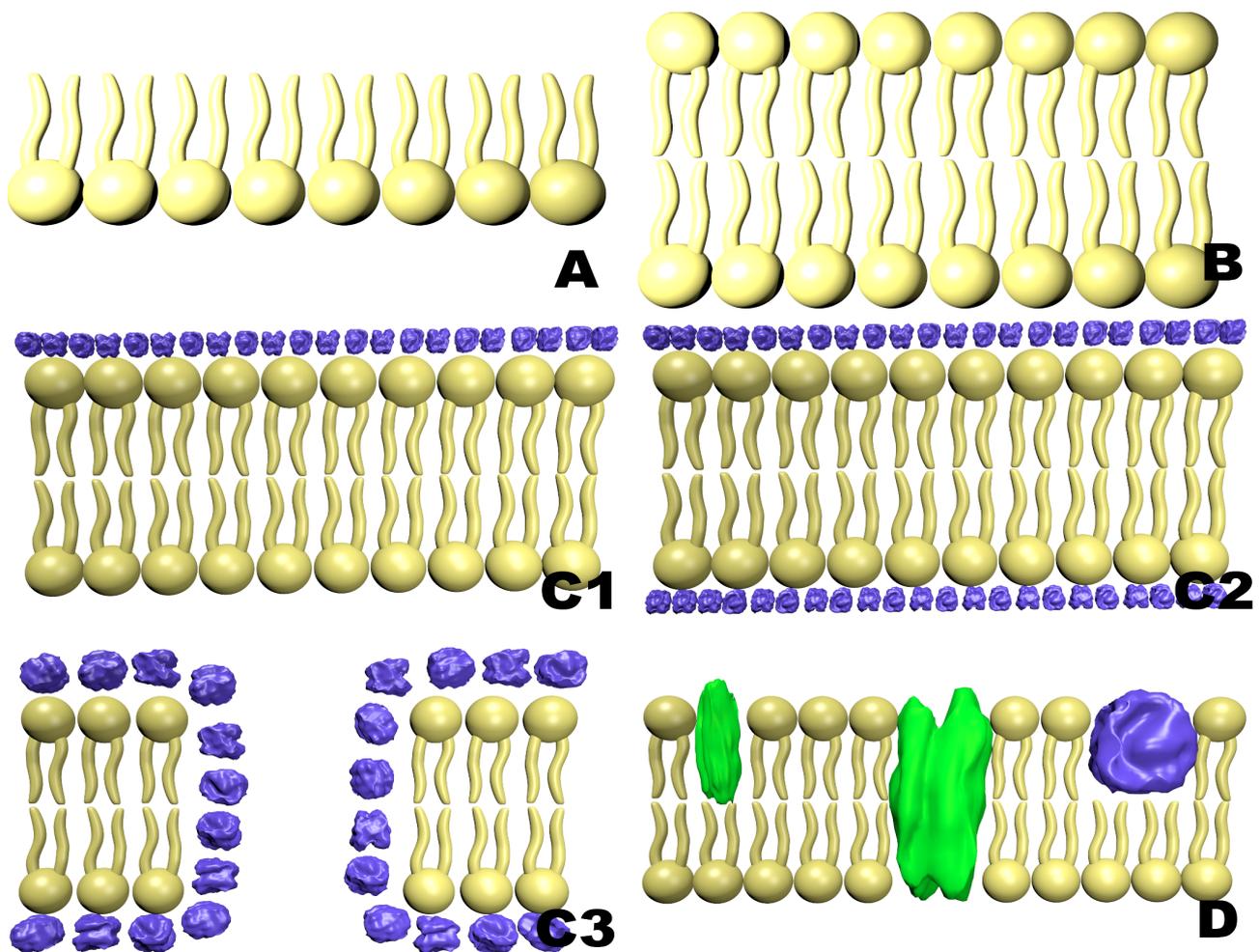
#### **1.1.1. História**

A vida, em toda a sua diversidade, apenas se tornou possível depois de na natureza se formar uma estrutura denominada de membrana. A membrana permitiu a separação do seu conteúdo de ambientes hostis e sem vida, mas salvaguardando a troca seletiva de materiais entre esses dois mundos. Com isto se deu a evolução das células, cujas funções são dependentes de um controle ótimo da troca de material entre compartimentos, que por sua vez têm diferentes funções. Além disto as biomembranas evoluíram também no sentido de se tornarem em locais específicos de funções bioquímicas, como a fosforilação oxidativa e a biossíntese proteica.

As membranas celulares consistem basicamente de uma bicamada de aproximadamente 5 a 10nm, constituídas de moléculas anfifílicas (parte da sua estrutura é polar e como tal solúvel em água, e parte é apolar, insolúvel em água) como lípidos, proteínas e hidratos de carbono<sup>1</sup>.

Langmuir (1917) foi um dos primeiros investigadores a propor um modelo representativo das membranas celulares, segundo esse modelo estas seriam compostas de um filme monomolecular de lípidos<sup>2</sup> (ver Figura 1.1A). Gorter e Grendel (1925), depois de investigarem a área superficial de filmes lipídicos monomoleculares de glóbulos vermelhos, concluíram que o modelo anteriormente proposto por Langmuir não explicava os seus resultados, sendo o dobro a área obtida nos seus estudos para a área calculada com base no modelo de Langmuir. Assim estes investigadores propuseram um novo modelo. No novo modelo as membranas celulares são constituídas de duas monocamadas de lípidos, com as caudas lipídicas voltadas para o interior da membrana e as cabeças polares voltadas para os ambientes aquosos<sup>3</sup> (ver Figura 1.1B). Mais tarde Danielli e Davson (1935) propuseram o primeiro modelo da estrutura da biomembrana com proteínas incluídas<sup>4</sup> (ver Figura 1.1C). Este modelo foi proposto tendo em conta estudos de solubilidade proteica destes autores, bem como resultados de estudos anteriores de outros autores, com membranas de ouriços-do-mar, onde a tensão superficial obtida seria demasiado baixa se as membranas apenas fossem compostas de lípidos. O primeiro modelo proposto por Danielli e Davson consistia de uma estrutura tendo por base a estrutura proposta por Gorter e Grendel, com a inclusão de uma camada de proteínas associada sob a parte externa da membrana, (ver Figura 1.1C1) que com os resultados de posteriores investigações foi alterado para um modelo semelhante ao anterior mas com uma camada proteica em cada superfície da membrana (ver Figura 1.1C2). Como com este modelo substâncias polares, fundamentais para a célula, não conseguiriam penetrar

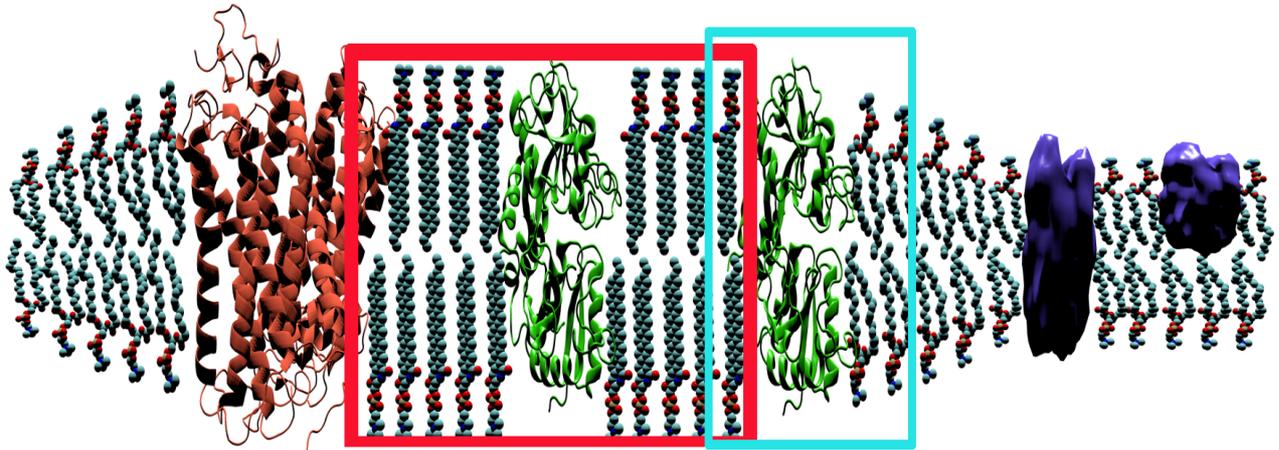
a membrana, Danielli e Davson incluíram nele poros hidrofílicos compostos de proteínas (ver Figura 1.1C3). Com o advento da microscopia eletrônica investigadores como Robertson estudaram as membranas biológicas à luz desta técnica. Robertson escreveu em 1959<sup>5</sup> uma revisão sobre os seus estudos, onde confirmou a bicamada lipídica de Gorter e Grendel e a presença de proteínas indicada por Danielli e Davson, além de mostrar que estes modelos são comuns a membranas plasmáticas e de organelos como as membranas do núcleo e de mitocôndrias. Com o conhecimento acumulado até este ponto, e a informação proveniente de cristalografia de raio-X, Singer e Nicolson concluíram que as proteínas podem também estar inseridas na membrana, desenvolvendo assim o modelo de mosaico fluido<sup>6</sup>. Segundo o modelo de Singer e Nicolson (ver Figura 1.1D) as membranas seriam constituídas de lípidos e proteínas, as proteínas poderiam ser periféricas (apenas ligadas à superfície membranar, e facilmente removíveis desta) ou integrais (proteínas que atravessam os dois folhetos lipídicos e dificilmente são separadas da membrana). Além da informação estrutural estes autores também propuseram que as membranas estão num estado fluido lipídico, no qual as proteínas podem difundir livremente, o que está na origem do nome do modelo.



**Figura 1.1.** Representação esquemática da evolução histórica dos modelos de membrana celular propostos.

O modelo de mosaico fluido foi largamente aceite pela comunidade científica, e os modelos

atuais pouco diferem deste, no entanto este modelo não tinha em conta o efeito da diferença de tamanho hidrofóbico (“Hydrophobic Mismatch”), onde a largura da bicamada lipídica na vizinhança de proteínas pode ser “alterada”, devido a tensões inerentes a diferenças de largura entre a zona hidrofóbica de proteínas e a zona hidrofóbica da bicamada lipídica (ver Figura 1.2), bem como a existência de domínios lipídicos na membrana (ver Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Representação do modelo atual de uma membrana celular. O retângulo azul indica uma diferença de tamanho hidrofóbico, e o vermelho um domínio ou jangada lipídica.

Uma visão moderna de membranas biológicas consiste então de uma bicamada lipídica, onde proteínas integrais ou periféricas estão apoiadas, bem como açúcares. Estes componentes membranares difundem livremente devido à fluidez da membrana, sendo no entanto de notar a presença de domínios onde a rigidez e consequente fluidez possa variar devido à sua composição ser diferente. Tal como acontece com os domínios de jangadas lipídicas (“Lipid Rafts Domains”) onde existe uma maior concentração de determinados lípidos e proteínas que conferem diferentes características a essa zona membranares (como fluidez e largura da bicamada) em comparação com a vizinhança(ver Figura 1.2)<sup>7</sup>.

### 1.1.2. Composição

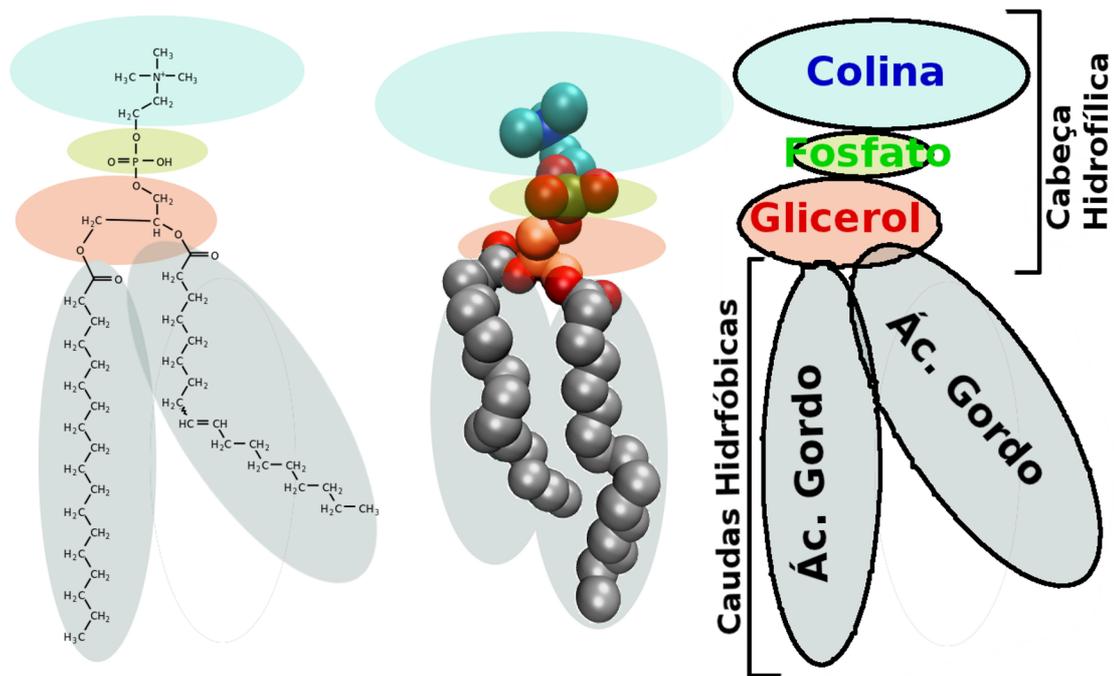
As membranas biológicas apresentam uma composição muito complexa com vários lípidos, proteínas e açúcares diferentes. De seguida estas moléculas serão abordadas, sendo a abordagem aos lípidos e proteínas mais aprofundada, devido à temática deste trabalho.

#### 1.1.2.1. Lípidos

Lípidos são moléculas de média ou baixa massa molecular, sendo geralmente definidos por

uma característica vaga: são moléculas insolúveis em água. São anfifílicos com um grupo cabeça polar, e uma região de cadeia(s) hidrocarbonada(s) apolar(es). Os grupos cabeça são polares devido a usualmente conterem grupos carregados, como fosfatos e colinas, enquanto que a não polaridade das cadeias se deve ao seu número elevado de ligações apolares carbono-hidrogénio, que provocam o efeito hidrofóbico. Estas longas cadeias não podem enovelar-se, como as proteínas, para sequestrar as suas porções apolares do meio aquoso circundante. Assim, quando colocados em água, os lípidos formam espontaneamente agregados, de tal forma que os seus componentes polares fiquem expostos à água e as suas regiões apolares fiquem sequestradas no interior do agregado. Tradicionalmente a agregação de moléculas anfifílicas é tida como devendo-se à fraca solubilidade de hidrocarbonetos na água, originando o que é conhecido como o efeito hidrofóbico <sup>8</sup>. A presença de resíduos de hidrocarbonetos induz a formação de estruturas que melhor os “escondam” da água, o que aumenta o grau de ordem e, conseqüentemente, diminuem significativamente a entropia da água <sup>9,10</sup>. O grupo hidrofílico é responsável pela formação de uma interface com a água (apesar de não dirigir a agregação), e contribui para determinar, em princípio, o tamanho e a forma dos agregados através das interações entre as moléculas. Considerações geométricas de empacotamento simples permitem a previsão da conformação final global do agregado, dadas algumas informações elementares estruturais das moléculas anfifílicas <sup>11</sup>.

Os lípidos de organelos biológicos exibem uma grande variedade de estruturas químicas, apesar de na sua maioria possuírem apenas duas cadeias hidrocarbonadas e um grupo cabeça hidrofílico. Além disso a composição lipídica de membranas varia bastante entre células do mesmo organismo, ou mesmo entre organelos da mesma célula. A esta variação de composição corresponde uma variação de propriedades termodinâmicas, como a fluidez, a compactação, a largura, que por fim irão determinar, direta ou indiretamente, muitas propriedades das células que envolvem, como a forma, a pressão citosólica, e a composição do citoplasma.



**Figura 1.3.** Três representações esquemáticas da estrutura de um fosfolípido de 1-Palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina.

Os fosfolípidos são o tipo de lípidos mais abundante, e das moléculas mais importantes das células pois compõem a base de todas as membranas biológicas. Um fosfolípido individual consiste em três subunidades (ver Figura 1.3), nomeadamente:

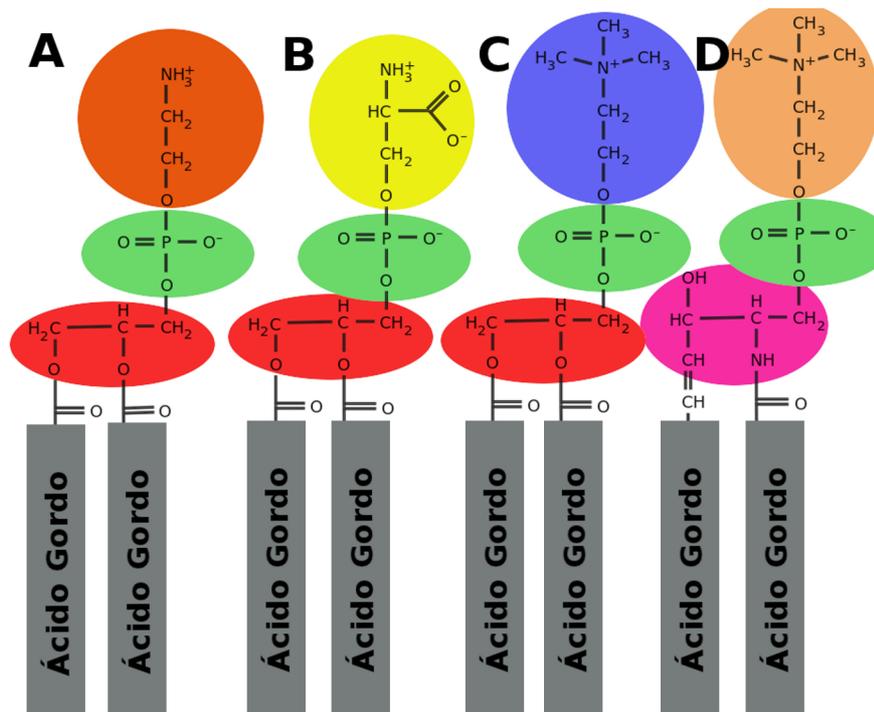
-Glicerol, álcool de três carbonos, em que cada um possui um grupo hidroxílico. O grupo glicerol forma a “espinha dorsal” da molécula de fosfolípido.

-Ácidos gordos, longas cadeias de ligações carbono-hidrogénio (cadeias hidrocarbonadas) que terminam num grupo carboxílico (-COOH). Dois ácidos gordos estão ligados ao glicerol de base numa molécula de fosfolípido.

-Grupo fosfato, ligado a uma terminação do grupo glicerol. O fosfato carregado geralmente tem ligado a si uma molécula orgânica com carga elétrica, como a colina, a etanolamina, ou até o amino ácido serina. A molécula ligada ao grupo fosfato irá determinar a natureza do lípido em termos de carga. Moléculas carregadas positivamente como a colina e a etanolamina tornam os lípidos moléculas zwitteriônicas, pois globalmente têm carga neutra devido à existência de uma carga negativa do grupo fosfato, e uma carga positiva do grupo colina ou etanolamina. Os fosfolípidos podem também ter carga negativa, o que acontece quando moléculas neutras, como a serina, se ligam ao grupo fosfato, ou simplesmente quando nenhuma molécula se liga a esse grupo, como acontece nos fosfolípidos de ácido fosfatídico.

Na Figura 1.4 estão representados alguns fosfolípidos mais comuns, como se pode verificar as três subunidades atrás referidas estão sempre presentes. Na figura os ácidos gordos não estão

especificados, pois o mesmo grupo cabeça polar fosfolípídico pode ser encontrado com diferentes caudas de cadeias hidrocarbonadas. Diferentes membranas mostram diferente composição de fosfolípidos, que influenciam as suas características físico-químicas. Por exemplo, a membrana mitocondrial contém cerca de 14% de cardiolipina (fosfolípido carregado com duas cargas negativas), enquanto que nenhum outro organelo possui mais que ínfimas quantidades deste lípido<sup>12</sup>, sendo apenas encontrado em elevadas quantidades em membranas bacterianas. Este facto torna a membrana mitocondrial bastante negativa, sendo a cardiolipina essencial aos mecanismos da fosforilação oxidativa<sup>13</sup>.



**Figura 1.4.** Representação esquemática de quatro dos fosfolípidos mais comuns. A: Fosfatidiletanolamina; B: Fosfatidilserina; C: Fosfatidilcolina; D: Esfingomielina.

Na Tabela 1 estão descritos alguns dos ácidos gordos mais comuns. A composição de cadeias hidrocarbonadas das membranas lipídicas é, tal como no grupo cabeça polar, muito diversificada. Estas cadeias variam em comprimento (número de carbonos) e saturação (cadeias com apenas ligações simples, como no ácido láurico, correspondem a cadeias saturadas, pois têm o número máximo de hidrogénios para uma cadeia com o correspondente comprimento, já cadeias com ligações duplas na sua estrutura correspondem a cadeias insaturadas, sendo polinsaturadas quando possuem mais que uma ligação dupla).

Nome	Comprimento da cadeia:número de ligações duplas	Fórmula
Láurico	12:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COO-
Mirístico	14:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COO-
Miristoléico	14:1	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COO-
Palmítico	16:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COO-
Palmitoléico	16:1	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COO-
Esteárico	18:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COO-
Oléico	18:1	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COO-
Linoléico	18:3	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COO-
Araquídico	20:0	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> COO-
Araquidónico	20:4	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH=CHCH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COO-

**Tabela 1:** Nomes, comprimento, saturação e fórmula química de alguns ácidos gordos mais comuns.

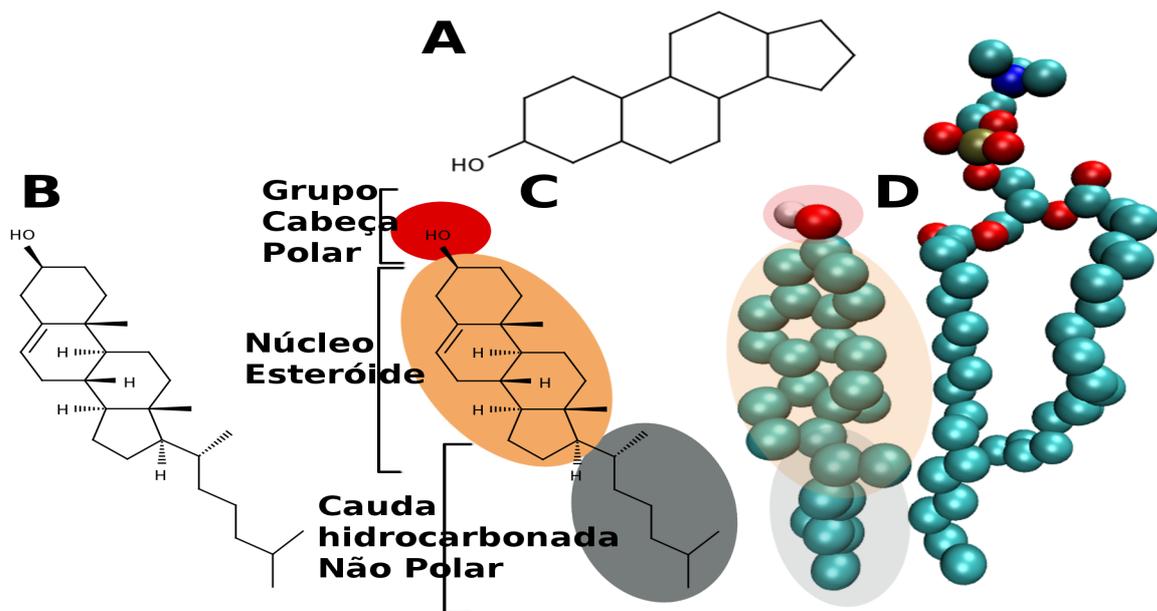
Apesar de lípidos com determinados grupos polares variarem na composição das suas cadeias hidrocarbonadas, estes grupos podem ter tendência para determinada composição das caudas. Por exemplo esfingomielinas tendem a ter cadeias hidrocarbonadas longas (24 carbonos) enquanto que fosfatidilcolinas tendem para cadeias curtas (entre 16 a 18 carbonos) em membranas celulares de eritrócitos<sup>12</sup> (ver Tabela 2). Além disso a composição das cadeias varia também em organelos da mesma célula. Segundo os dados obtidos por White para células de fígado<sup>14</sup>, cadeias saturadas de 15 carbonos (15:0) correspondem a 37% do peso da membrana plasmática, baixando para 27% na membrana mitocondrial. Já cadeias 16:1 correspondem a cerca de 31% do peso da membrana plasmática e 18% da mitocondrial.

Grupo Cabeça lipídico	16:0	18:0	18:1	18:2	20:3	20:4	22:0	22:4	22:5	22:6	24:0	24:1
Fosfatidilcolina	31	12	19	22	2	7	-	-	2	-	-	-
Fosfatidiletanolamina	13	12	18	7	2	24	2	8	4	8	-	-
Fosfatidilserina+ fosfatidilinositol	3	37	8	-	3	24	3	4	3.5	10	-	-
Esfingomielina	24	6	-	3	-	1.4	9.5	-	-	-	23	24
Total	20	17	13	9	1.5	13	2	3	2	4	5	4

**Tabela 2:** Distribuição em percentagem de peso, dos ácidos gordos pelos diferentes grupos cabeças em membranas de eritrócitos. Tabela retirada de <sup>12</sup>.

Outro género de lípidos importantes presentes na composição membranar são os esteróis. Os

esteróis compõem uma classe lipídica que partilha um motivo estrutural, o núcleo esteroide. Tal núcleo consiste de uma estrutura tetracíclica com quatro anéis adjacentes, três ciclohexanos e um ciclopentano (ver Figura 1.5A). Estes lípidos não possuem ácidos gordos, mas sim uma cadeia curta hidrocarbonada ligada ao núcleo esteroide. Os esteróis distinguem-se dos esteroides por possuírem um grupo hidróxilo (HO-) ligado ao primeiro ciclohexano. O colesterol (COL,  $C_{27}H_{46}O$ ) é o esteroide mais conhecido, e o principal esteroide de membranas celulares animais (constitui 20% do peso das membranas de eritrócitos), enquanto que o ergosterol é um componente importante nas membranas de fungos, e o lanosterol é o esteroide de procariontes (organismos unicelulares que não possuem um núcleo bem delimitado) e o precursor químico dos dois outros<sup>15</sup>. O COL é, tal como os fosfolípidos, uma molécula anfifílica, sendo o grupo hidróxilo polar e a curta cadeia hidrocarbonada apolar, assim sendo o COL posiciona-se em membranas biológicas de forma a que o grupo polar (HO-) fique voltado para o exterior membranar e que a cadeia hidrocarbonada fique voltada para o interior da membrana (ver Figura 1.5B e C). Além disso devido às suas propriedades estruturais e ao seu menor comprimento que os outros lípidos que compõem a membrana, o COL fica situado mais no centro da bicamada, de tal forma que as cabeças dos fosfolípidos cobrem o seu grupo hidróxilo (ver Figura 6D). A percentagem destes lípidos na composição membranar irá influenciar as propriedades das membranas, sendo os fatores relativos à fluidez (membranas com maior percentagem de colesterol são menos fluidas<sup>15</sup>) e a permeabilidade (membranas com maior percentagem de colesterol são menos permeáveis à água<sup>16</sup>) os mais destacáveis. Os esteróis desempenham vários papéis, sendo precursores de vários compostos importantes, como hormonas esteroides, de entre as quais as hormonas sexuais (testosterona e progesterona), bem como vitamina D e sais biliares.



**Figura 1.5.** Representação da estrutura e composição do colesterol (A-C), bem como da sua conformação espacial em membranas celulares ao lado de um fosfolípido de POPC.

A não homogeneidade da composição lipídica membranar não se resume apenas às variações nas diferentes células e nos diferentes organelos. Mesmo entre os dois folhetos da mesma membrana biológica existe diferenças de composição lipídica. Por exemplo, também nas membranas de eritrócitos, o fosfolípido de carga negativa fosfatidilserina encontra-se quase exclusivamente no folheto interno, e o fosfolípido fosfatidiletanolamina é maioritariamente encontrado nesse mesmo folheto<sup>17</sup>. Pelo contrário os fosfolípidos fosfatidilcolina e esfingomiélinea estão em muito maior quantidade no folheto externo da membrana de eritrócitos<sup>17</sup>. Este facto indica que as propriedades físico-químicas serão diferentes nos dois folhetos, o que permite que muitas células possuam um gradiente voltaico ou de pH através da sua membrana. Por exemplo o potencial negativo de uma célula nervosa deve-se às diferenças de distribuição de lípidos carregados entre os folhetos da sua membrana plasmática.

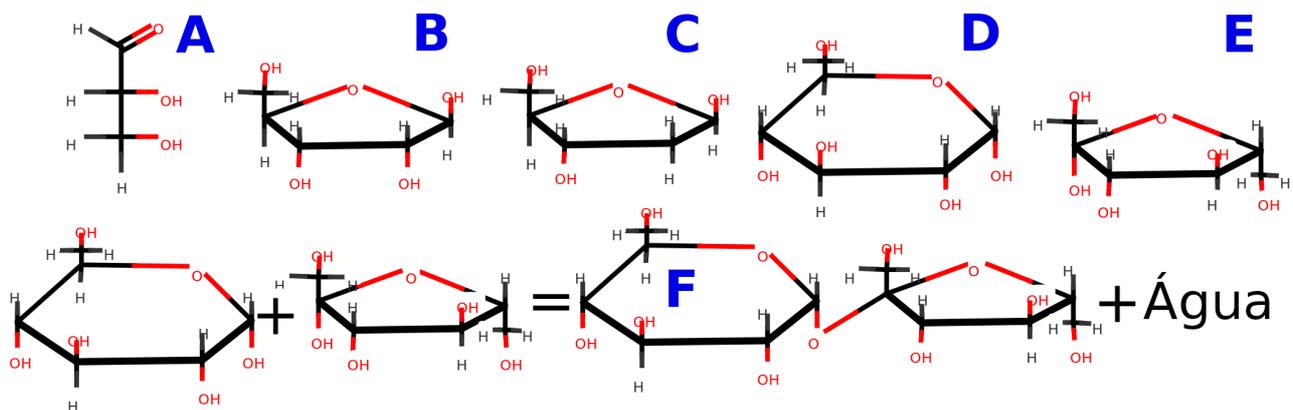
Além de tudo isto, a composição lipídica das membranas não é homogénea nem mesmo em cada folheto lipídico. Os lípidos tendem a agregar em domínios devido a fenómenos de separação de fase, o que leva à formação de locais de diferentes composições e conseqüente propriedades, tais como as “jangadas lipídicas” já referidas. Assim, com a informação até aqui abordada sobre os lípidos das membranas, e juntando a informação relativa aos, também muito diversificados, constituintes membranares que de seguida serão abordados (proteínas e açúcares), já é possível adquirir uma noção da diversidade e complexidade membranar, dando à ideia de a membrana ser mais um mosaico que um fluído um valor e uma veracidade ainda maior.

#### **1.1.2.2. Hidratos de Carbono**

Hidratos de carbono, também conhecidos como carboidratos, açúcares, sacarídeos, oses entre outros, são, tal como o nome indica, moléculas compostas de carbonos hidrogénios e oxigénios. No entanto, alguns hidratos de carbono podem também conter átomos de azoto ou enxofre na sua composição. A proporção atómica em hidratos de carbono é de 1:2:1 (carbono:hidrogénio:oxigénio), tendo assim uma fórmula química geral de  $C_nH_{2n}O_n$  ou simplesmente  $(CH_2O)_n$ . Hidratos de carbono e seus conjugados são biomoléculas essenciais à vida, estando presentes em todos os sistemas vivos, de plantas a animais, são assim as biomoléculas mais abundantes na natureza<sup>18</sup>. Apesar de serem compostos apenas de três compostos diferentes possuem uma elevada diversidade estrutural, e conseqüentemente uma diversidade de propriedades biológicas, desde funcionarem como elementos estruturais e fonte de energia (a quebra de ligações carbono-carbono liberta uma energia elevada e os hidratos de carbono contêm muitas ligações deste

tipo) a promoverem a adesão, o crescimento e diferenciação celular, além de terem propriedades anti-inflamatórias, anticoagulantes, etc<sup>19</sup>.

Os hidratos de carbono elementares são os açúcares simples, ou monossacarídeos. Os monossacarídeos podem conter apenas três carbonos como o gliceraldeído (ver Figura 1.6A), no entanto os mais relevantes têm cinco, como a ribose e a desoxirribose (ver Figura 1.6B e C) que fazem parte do RNA e DNA, e seis carbonos, como a glucose e a frutose (ver Figura 1.6D e E) que funcionam como fornecedores de energia às nossas células. Estes açúcares simples podem ser lineares, ou formarem estruturas como pentágonos e hexágonos (pentoses e hexoses) de acordo com o número de carbonos na sua composição. Exemplo disso é a glucose, que é um monossacarídeo de 6 carbonos linear, mas que em solução converte-se a uma cadeia hexagonal. Quando um monossacarídeo se liga a outro forma-se um dissacarídeo. Dissacarídeos, bem como hidratos de carbono de três a dez sacarídeos pertencem à classe dos Oligossacarídeos. Por fim a classe de Polissacarídeos abarca os carboidratos com mais de dez açúcares simples. Estes sacarídeos podem ser ramificados e compreender dezenas, milhares (como na Celulose), ou até mesmo dezenas de milhar (como no Glicogénio) de monossacarídeos. As ligações químicas que permite a junção de sacarídeos são glicosídicas. Neste tipo de reação o grupo OH do carbono anomérico (único carbono ligado a dois oxigénios em estruturas cíclicas de carboidratos) de um sacarídeo ataca um átomo de carbono de outro açúcar, levando à saída do grupo OH ligado a esse carbono alvo, libertando-se assim uma molécula de água (ver Figura 1.6 F).



**Figura 1.6.** Representação da estrutura de alguns hidratos de carbono mais conhecidos (A-E) e de uma reação glicosídica para a formação de um dissacarídeo (F). A: gliceraldeído; B: ribose; C: desoxirribose; D: glucose; E: frutose; F: reação glicosídica entre os sacarídeos glucose e frutose, originando o dissacarídeo sacarose.

Nas células animais as cadeias de hidratos de carbono podem ligar-se tanto a lípidos, formando Glicolípídios, como a proteínas, formando Glicoproteínas, e podem variar de monossacarídeos a cadeias de 30 açúcares podendo ser ramificadas<sup>20</sup>.

Tal como nos fosfolípidos, os glicolípidos contêm glicerol ou esfingosina ligada a duas cadeias de ácidos gordos, a diferença reside no facto de os últimos possuírem açúcares (como a glucose ou galactose) em vez do fosfato e do restante grupo cabeça dos fosfolípidos. Os glicolípidos de membranas de células animais contêm geralmente esfingosina, enquanto que os de células vegetais e bacterianas contêm maioritariamente glicerol<sup>21</sup>. O glicolípido mais simples é o cerebrosídeo, que consiste de uma esfingosina com um açúcar simples de glucose ou galactose.

A maioria das proteínas membranares que contactam com o exterior celular têm ligadas covalentemente a si hidratos de carbono, que em geral possuem 4 a 15 sacarídeos, que podem ser ramificados. Existem duas formas mais comuns de ligação entre as proteínas e os hidratos de carbono, nomeadamente através do grupo  $-CONH_2$  da cadeia lateral de um amino ácido de asparagina da proteína, ou através do grupo  $-OH$  da cadeia lateral de um amino ácido de serina ou treonina. Uma glicoproteína pode conter oligossacarídeos apenas ligados pelos grupos  $-CONH_2$ , apenas ligados pelos grupos  $-OH$ , ou por ambos<sup>22</sup>. Uma glicoproteína pode ter várias cadeias de oligossacarídeos, enquanto que os glicolípidos apenas uma<sup>19</sup>.

Como já foi referido, alguns lípidos membranares e a maioria das proteínas, que estão em contacto com o exterior da célula estão glicosilados. Assim a superfície da célula está coberta com um revestimento de hidratos de carbono, que é conhecido como o glicocálice.

A comunidade científica aponta para que o glicocálice esteja envolvido em vários fenómenos celulares, no entanto devido à rica diversidade de diferentes sacarídeos que o compõe, muito estudo é ainda necessário nesta área. Apesar disto há funções do glicocálice que já bem documentadas. Dentro destas temos a função de proteção da superfície celular, e a função de marcação, pois o glicocálice é diferente para cada célula. A função de marcação, dos hidratos de carbono à superfície da célula, é muito importante pois a distinção adequada de células é fundamental para vários processos, como interações entre células (por exemplo a interação de células do endotélio de vasos sanguíneos e glóbulos brancos, mediada pela proteína selectina que reconhece hidratos de carbono específicos) ou como a diferenciação de tipos sanguíneos (os quatro tipos sanguíneos A, B, AB e O refletem variações nos hidratos de carbono de glicoproteínas de eritrócitos)<sup>23</sup>. Os oligossacarídeos expostos na superfície membranares fornecem assim um conjunto de marcadores que ajudam a identificar tipos celulares distintos de organismos multicelulares.

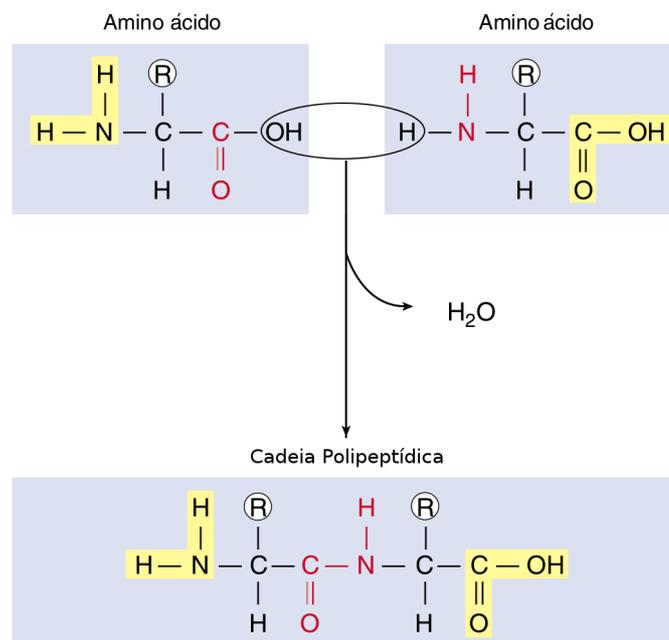
### **1.1.2.3. Proteínas**

As proteínas são compostos orgânicos bioquímicos poliméricos. São compostas por polipéptidos que por sua vez são polímeros de aminoácidos<sup>21</sup>. Apesar de não existir alguma

convenção ou regulamentação o termo proteína é usualmente aplicado para polímeros de mais de 50 aminoácidos, e abaixo desse valor é aplicado o termo péptido ou polipéptido. Um péptido consiste de dois a dez aminoácidos (por vezes também chamados de oligopéptidos), enquanto que uma cadeia continua e não ramificada de dez ou mais péptidos corresponde a um polipéptido<sup>24</sup>. As proteínas são compostas de um ou mais polipéptidos num arranjo biologicamente funcional, e geralmente estão ligadas a cofactores e a outras proteínas.

Aminoácidos (ver Figura 1.7) são biomoléculas que contêm um grupo amina (-NH<sub>2</sub>), um grupo carboxílico (-COOH), uma cadeia lateral (também denominada de grupo R), e um átomo de hidrogénio, tudo ligado a um átomo central de carbono, o denominado carbono alfa (C $\alpha$ ). Cada aminoácido tem propriedades únicas determinadas pela natureza da sua cadeia lateral, que se encontra ligada covalentemente ao carbono alfa, e por isso cada aminoácido é denominado de acordo com o seu grupo R. Existem 20 cadeias laterais diferentes mais comuns, ou seja 20 aminoácidos diferentes.

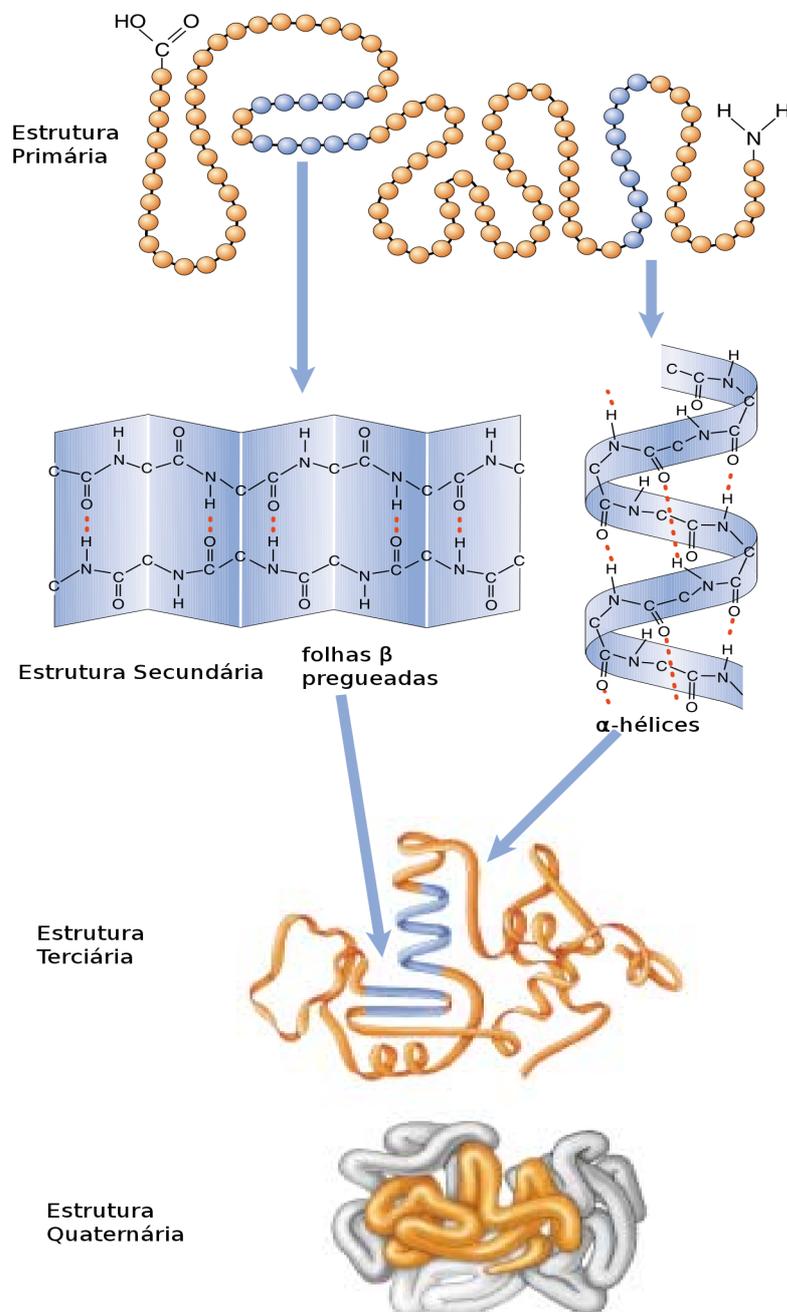
Para uma maior simplificação os aminoácidos podem ser representados por uma abreviatura de três letras ou por um código de uma letra. Por exemplo o aminoácido glicina (aminoácido mais simples pois a sua cadeia lateral consiste apenas de um átomo de hidrogénio) pode ser representado pela abreviatura “Gly” (abreviatura em Inglês, usada universalmente) ou pela letra “G”.



**Figura 1.7.** Representação da estrutura geral dos aminoácidos (em cima) e da formação de uma ligação peptídica entre a terminação COOH de um aminoácido e a terminação NH<sub>2</sub> de outro formando uma cadeia polipeptídica (em baixo). Figura adaptada de <sup>1</sup>.

De acordo com a sua carga a pH neutro (pH=7) é possível classificar os aminoácidos como

ácidos, básicos, polares e não polares. Quando os aminoácidos apresentam carga resultante positiva a pH neutro são aminoácidos básicos. Pelo contrário quando a carga resultante é negativa temos aminoácidos ácidos. Nos restantes dois grupos os aminoácidos têm uma carga resultante neutra a pH neutro. Os aminoácidos não polares geralmente possuem cadeias laterais com grupos  $-CH_2$  e/ou  $CH_3$ . Os polares apresentam oxigénios nos seus grupos R.



**Figura 1.8.** Representação esquemática dos níveis de estruturação proteica. Figura adaptada de <sup>1</sup>.

Todos os aminoácidos, com exceção da glicina, são quirais<sup>21</sup>, ou seja o seu reflexo no espelho não é sobreponível com si mesmo (tal como as nossas mãos)<sup>24</sup>, pois o carbono possui quatro ligantes diferentes. Os enantiómeros (as duas moléculas que são reflexo uma da outra mas não

sobreponíveis)<sup>24</sup> têm propriedades semelhantes, diferindo apenas na interação com luz polarizada (são moléculas opticamente ativas), e na interação com outras moléculas quirais. Os aminoácidos quirais são levogiros, ou *l*-aminoácidos, quando desviam o plano da luz polarizada para a esquerda<sup>25</sup>. Quando o mesmo plano é desviado para a direita temos os aminoácidos destrogiros ou *d*-aminoácidos<sup>25</sup>. Apesar de serem encontrados na natureza ambos os tipos de isômeros óticos apenas *l*-aminoácidos estão presentes em proteínas de mamíferos<sup>21</sup>.

A junção de dois ou mais aminoácidos por meio de ligações entre o grupo carboxílico e o grupo amina de aminoácidos adjacentes (denominadas ligações peptídicas), resulta na formação dos péptidos ou proteínas e de moléculas de água (ver Figura 1.7). O aminoácido terminal do péptido ou proteína que possui um grupo amina livre é chamado de N-terminal ou resíduo amino-terminal. Já no lado oposto, o resíduo terminal com o grupo carboxílico livre denomina-se por C-terminal ou resíduo carboxi-terminal.

A maioria das proteínas enovelam-se (formam um arranjo) numa estrutura tridimensional única. Esta estrutura é conhecida como conformação nativa<sup>26</sup>. Muitas proteínas enovelam-se automaticamente, devido às propriedades dos aminoácido que as compõem, no entanto o enovelamento de outras é auxiliado por outras proteínas como nos mamíferos, onde cerca de metade das suas proteínas são auxiliadas por chaperonas no seu processo de conformação estrutural<sup>26</sup>. Os bioquímicos costumam referir-se a quatro aspetos distintos da estrutura proteica, nomeando esses aspetos como estruturas primária, secundária, terciária e quaternária<sup>26</sup> (ver Figura 1.8). A sequência de aminoácidos que compõe a proteína determina a sequência primária. Esta sequência é determinada pela sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína. Como o grupo R de cada aminoácido não está envolvido na ligação peptídica, uma proteína pode ser constituída de qualquer sequência de aminoácidos, o que permite uma enorme diversidade de sequências proteicas. Por convenção a estrutura primária é representada de N-terminal para C-terminal.

A estrutura secundária é determinada pela conformação estrutural de curtos segmentos de aminoácidos (três a trinta aminoácidos) em unidades geométricas ordenadas. Tal estrutura é estabilizada por pontes de hidrogénio que ocorrem entre o grupo amina e o grupo carboxílico da cadeia principal. Os exemplos mais conhecidos de tais unidades são as alfa-hélices ( $\alpha$ -hélices) e as folhas beta (folhas  $\beta$ ).

A estrutura resultante do enovelamento de estruturas secundárias e estruturas sem formas regulares (sem estruturas ordenadas ou secundárias definidas) é denominada por terciária<sup>27</sup>. A estrutura terciária refere-se então à forma global da proteína, ao relacionamento espacial das estruturas secundárias (definidas como as alfa-hélices ou não definidas). Ela indica como no espaço tridimensional as estruturas secundárias se “montam” para formarem domínios e como estes

domínios estão espacialmente relacionados uns com os outros. É geralmente estabilizada por interações não locais como interações hidrofóbicas e eletrostáticas, mas também podem intervir interações locais como pontes de hidrogénio, pontes salinas, pontes dissulfídicas e até mesmo modificações pós-translacionais (modificações químicas de uma proteína depois de sua tradução, como a glicosilação). A estrutura terciária está intrinsecamente relacionada com a função biológica proteica pois é a conformação espacial da proteína que controla a sua função<sup>27</sup>.

Cada polipéptido tem a sua estrutura tridimensional, ou seja a sua estrutura terciária, no entanto as proteínas podem ser compostas de vários polipéptidos. Os vários polipéptidos irão se arranjar espacialmente, guiados pelas mesmas forças que induzem a estrutura terciária, formando um complexo com várias subunidades. O arranjo espacial deste complexo é denominado por estrutura quaternária<sup>28</sup>. A proteína hemoglobina é formada por quatro subunidades ou cadeias polipeptídicas, assim o seu arranjo espacial corresponde à sua estrutura quaternária.

As proteínas membranares são de extrema importância para a célula pois são elas que permitem que informações ou compostos químicos atravessem a membrana, para além de que são fatores chave em eventos bioquímicos que acontecem tanto na superfície celular como em organelos ligados a membranas<sup>29</sup>. Duas peculiaridades que confirmam esta importância são o facto de que cerca de 40% de todos os genes de eucariontes, eubactérias e arqueobactérias codificarem proteínas de membrana<sup>30</sup>, e do facto de cerca de 60% de drogas terapêuticas usadas atualmente nos Estados Unidos da América terem como alvo estas proteínas<sup>31</sup>. Além disso devido à sua diversidade funcional e ubiquidade, defeitos ou problemas em proteínas membranares podem ter graves consequências, existindo várias patologias humanas relacionadas com proteínas membranares defeituosas. Exemplos de tais patologias são a fibrose cística, várias formas de cancro, a Alzheimer e várias cardiomiopatias<sup>29</sup>.

Os fosfolípidos formam o núcleo da membrana, mas são as proteínas que determinam muitas das suas funções. Diferente tipos celulares contêm diferente composição membranar, e mesmo membranas da mesma célula variam a sua coleção proteica.

Como foi referido anteriormente existem duas classes principais de proteínas, as integrais e as periféricas. As proteínas integrais penetram na parte hidrofóbica no interior da membrana<sup>32</sup>. A maioria são transmembranares, atravessando a membrana de uma ponta a outra, no entanto outras apenas se estendem no interior hidrofóbico membranar. As zonas destas proteínas que se encontram no interior hidrofóbico membranar são compostas de uma ou várias cadeias de aminoácidos hidrofóbicos (de cerca de 20 aminoácidos de comprimento), muitas vezes em forma de  $\alpha$ -hélices, enquanto que as possíveis zonas proteicas expostas ao citoplasma e exterior celular são maioritariamente compostas de aminoácidos hidrofílicos<sup>33</sup>. Algumas destas proteínas formam canais

hidrofílicos no seu centro possibilitando a passagem de substâncias como a água.

As proteínas periféricas não se encontram incorporadas na bicamada lipídica como as anteriores. Elas estão fracamente ligadas à superfície membrana<sup>32</sup>. São quatro os tipos mais comuns de ligação destas proteínas à membrana, assim algumas ligam-se à zona periférica das proteínas integrais, outras ligam-se covalentemente a fosfolípidos, outras enterram numa zona membrana hidrofóbica perto da superfície motivos proteicos hidrofóbicos, e por fim outras apenas estão adsorvidas à superfície membrana devido a interações eletrostáticas ou iônicas entre a proteína periférica e a superfície lipídica<sup>33</sup>.

Na abordagem dos hidratos de carbono já foi descrita a existência de um revestimento externo da membrana denominado glicocálice. Uma parte deste revestimento é constituída de proteínas. Além deste revestimento exterior, algumas células, como as animais, contêm do lado oposto da membrana um revestimento proteico, neste caso denominado por citoesqueleto pois, e com a ajuda do glicocálice, fornece às células uma estrutura mais rígida e definida do que a que proviria da existência de apenas a membrana lipídica<sup>28</sup>.

Dependo do contexto biológico, as proteínas de membrana podem agir como moléculas recetoras, enzimáticas, de canais, transportadoras, estruturais e de adesão celular, bem como contribuir para uma diversidade de funções, tais como sinalização transmembrana, homeostasia e conservação energética<sup>29</sup>. As mais representativas serão o transporte, atividade enzimática, reconhecimento celular, transdução de sinal, junção intercelular e ligação ao citoesqueleto e matriz extra-celular (malha interligada de proteínas fibrosas e glicocálice). Estas funções estão sucintamente discutidas de seguida:

Proteínas transportadoras – proteínas de membrana que vão de uma ponta a outra da bicamada lipídica, podem fornecer um canal hidrofílico no seu interior permitindo a passagem de determinados solutos. Outras transportam substâncias através da alteração da sua forma, sendo que algumas destas hidrolizam a adenosina-trifosfato (“adenosine triphosphate” - ATP) como fonte de energia para bombear as substâncias ao longo da membrana<sup>34</sup>.

Proteínas com atividade enzimática – proteínas membranares podem agir como enzimas com o seu local ativo exposto a substâncias presentes nas soluções adjacentes<sup>33</sup>. Em alguns casos formam-se complexos enzimáticos na membrana, onde várias enzimas estão organizadas para levar a cabo uma reação metabólica dependente de vários passos sequenciais (como acontece na fosforilação oxidativa que acontece na membrana mitocondrial)<sup>21</sup>.

Proteínas intervenientes na transdução de sinal – proteínas membranares podem ter um local de ligação com uma forma específica onde um mensageiro químico como uma hormona encaixe, servindo assim de recetor de mensagem<sup>35</sup>. O mensageiro externo (a molécula sinal) pode levar à

alteração da forma da proteína, permitindo assim a libertação da mensagem para o interior celular<sup>35</sup>.

Proteínas intervenientes no reconhecimento celular – como já foi referido algumas glicoproteínas servem como marcos de identificação da célula. Estes marcos são reconhecidos por proteínas de membrana de outras células<sup>27</sup>.

Proteínas que permitem a junção intercelular – células adjacentes podem ficar ligadas através das suas proteínas de membrana<sup>36</sup>. Estas junções podem ser de vários tipos, tais como junções comunicantes (“gap junctions”), junções apertadas (“tight junctions”) e junções aderentes (“adherens junctions”)<sup>36,37</sup>.

Proteínas que se ligam ao citoesqueleto e matriz extra-celular – as proteínas membranares podem estar ligadas aos microfilamentos do citoesqueleto bem como aos constituintes da matriz extra-celular. Esta ligação ajuda a manter a forma celular, a estabilizar a localização de algumas proteínas, além de poder induzir mudanças intra e extra-celular<sup>27</sup>.

Tal como nos lípidos e nos hidratos de carbono presentes nas membranas biológicas, as proteínas apresentam uma variedade tanto estrutural como funcional. Esta diversidade torna o estudo das membranas um processo complexo, difícil e trabalhoso, mas ao mesmo tempo apaixonante, pois devido à sua elevada importância em contexto biológico, onde pequenas descobertas podem permitir grandes feitos como desenvolver tratamentos para várias doenças ou simplesmente aumentar o conhecimento sobre esta interessante área.

## **1.2 Péptidos com Atividade Membranar (“Membrane Active Peptides” - MAPs)**

Péptidos consistem de curtos heteropolímeros em que as conformações que adotam tendem a ser restritas a estruturas terciárias típicas. Podem ser anfífilico e/ou anfipáticos, e possuem uma diversidade físico-química enorme.

Quando péptidos e lípidos interagem, muitas vezes associam-se, influenciando-se uns aos outros. Esta interação pode levar, em casos mais intensos, à disrupção membranar e, em casos interessantes, à translocação de péptidos através da membrana. Tais efeitos estão por trás de fenómenos de extrema importância nas ciências da vida, como por exemplo a fusão viral, a ação de compostos antimicrobianos inatos ao homem, a transfecção génica e interações recetor-ligando.

Os investigadores já há muito tempo se aperceberam da aplicabilidade dos péptidos em diversas áreas, desde a nanotecnologia, onde, por exemplo, são usados para a criação de estruturas poliméricas organizadas<sup>38,39</sup>, ao anti envelhecimento<sup>40,41</sup>, à engenharia de tecidos<sup>42</sup>.

De entre todos os sectores da ciência peptídica o desenvolvimento de péptidos com atividade membranar (“Membrane Active Peptides”-MAPs) é provavelmente a área mais promissora e em maior crescimento. O estudo dos MAPs é um desafio, pois possuem uma elevada diversidade estrutural e porque interagem com um sistema altamente heterogéneo, a membrana.

Os MAPs cobrem uma elevada faixa de substâncias, desde péptidos naturais e sintéticos, a pequenas moléculas orgânicas ou mesmo estruturas poliméricas maiores. Os elementos desta grande família partilham a propriedade de interagirem com os lípidos das membranas celulares (podendo interagir também com outros elementos como ácidos nucleicos). Existem duas classes de MAPs mais conhecidas e que estão a ser extensivamente estudadas, os péptidos antimicrobianos (“AntiMicrobial Peptides” AMPs) e os péptidos penetrantes de células (“Cell-Penetrating Peptides”-CPPs). Alguns autores consideram estas classes como uma divisão artificial, existindo apenas uma classe conjunta de MAPs de maior diversidade, esta discussão será abordada mais à frente. Além dos AMPs e CPPs fazem parte do grupo de MAPs péptidos fusogénicos e amilóides.

### **1.2.1. Péptidos Antimicrobianos (“AntiMicrobial Peptides”- AMPs)**

Todos os organismos, em homeostase, vivem em harmonia com micro-organismos, a córnea dos olhos de animais está geralmente livre de infeções, os insetos são dos grupos mais diversificados e sobrevivem sem linfócitos e a produção de anti-corpos, as sementes germinam em

solos em que abundam micróbios. Isto só é possível devido à existência de AMPs, que possuem um potente e largo espectro de atuação contra micro-organismos como bactérias, fungos, vírus e protozoários.

Foi a descoberta dos AMPs que chamou atenção para o grande potencial, em termos de aplicações, de pequenas proteínas ou péptidos. O termo que os classifica refere-se à primeira e mais relevante característica descrita, no entanto demonstram uma grande variedade de propriedades. De facto a atividade antimicrobiana de secreções, sangue, leucócitos e tecidos linfáticos é conhecida desde o início do século XIX<sup>43</sup>. Entre 1920 e 1950 vários compostos antimicrobianos isolados dessas secreções mostraram ter atividade seletiva contra bactérias Gram positivas e Gram negativas<sup>43</sup>. Apesar da denominação, que perdura até hoje, estes péptidos possuem um espectro muito vasto de atividades, sendo exemplos destas a promoção de migração celular, a supressão da indução por moléculas bacterianas de citocinas pro inflamatórias, inibição ou promoção da apoptose dependente do tipo celular, promoção da cicatrização de feridas, promoção de diferenciação e efeitos na angiogénese, impacto na sinalização celular, promoção da fagocitose sem opsonização (tipo de fagocitose em que os macrófagos não necessitam de moléculas do hospedeiro, as opsinas, para reconhecer os invasores patogénicos), bem como as mais conhecidas atividades diretas antibacteriana, anti viral, anti fúngica e anti parasítica<sup>44-46</sup>.

Estudos em anfíbios demonstraram que a sua exposição a micro-organismos patogénicos provoca um aumento da secreção de AMPs, que atuam como uma barreira primária contra esses organismos<sup>47</sup>. Por outro lado em certos invertebrados como aranhas e camarões, a síntese de AMPs é constitutiva em hemócitos e são armazenados nos seus grânulos<sup>48</sup>. A atividade antimicrobiana de AMPs de secreções e tecidos descrita em estudos como os referidos facilmente levou à associação dos AMPs com o sistema imunitário. Assim nasceu a área de investigação em péptidos antimicrobianos, que teve um significativo aumento de interesse aquando do isolamento das famílias antimicrobianas de cecropinas de insetos, magaininas de anfíbios e defensinas de humanos, por Hans Boman<sup>49</sup>, Michael Zasloff<sup>50</sup> e Robert Lehrer<sup>51</sup>, respetivamente. Atualmente é estabelecido que estas moléculas fazem parte do sistema imunitário inato de organismos vivos, tendo um papel que varia de importância conforme o organismo e a organização do seu sistema imune<sup>46,52,53</sup>.

Quase 2000 AMPs fazem parte, atualmente, da mais conhecida base de dados deste tipo de péptidos, a qual se denomina “The Antimicrobial Peptide Database” (<http://aps.unmc.edu>)<sup>54</sup>. Esses quase 2000 péptidos incluem AMPs produzidos em vários tipos de tecidos e células de muitas espécies de invertebrados plantas e animais<sup>55-57</sup>, algumas citocinas e quimiocinas<sup>58,59</sup>, hormonas peptídicas<sup>60</sup>, neuro péptidos<sup>61</sup>, e fragmentos de proteínas maiores<sup>62,63</sup>.

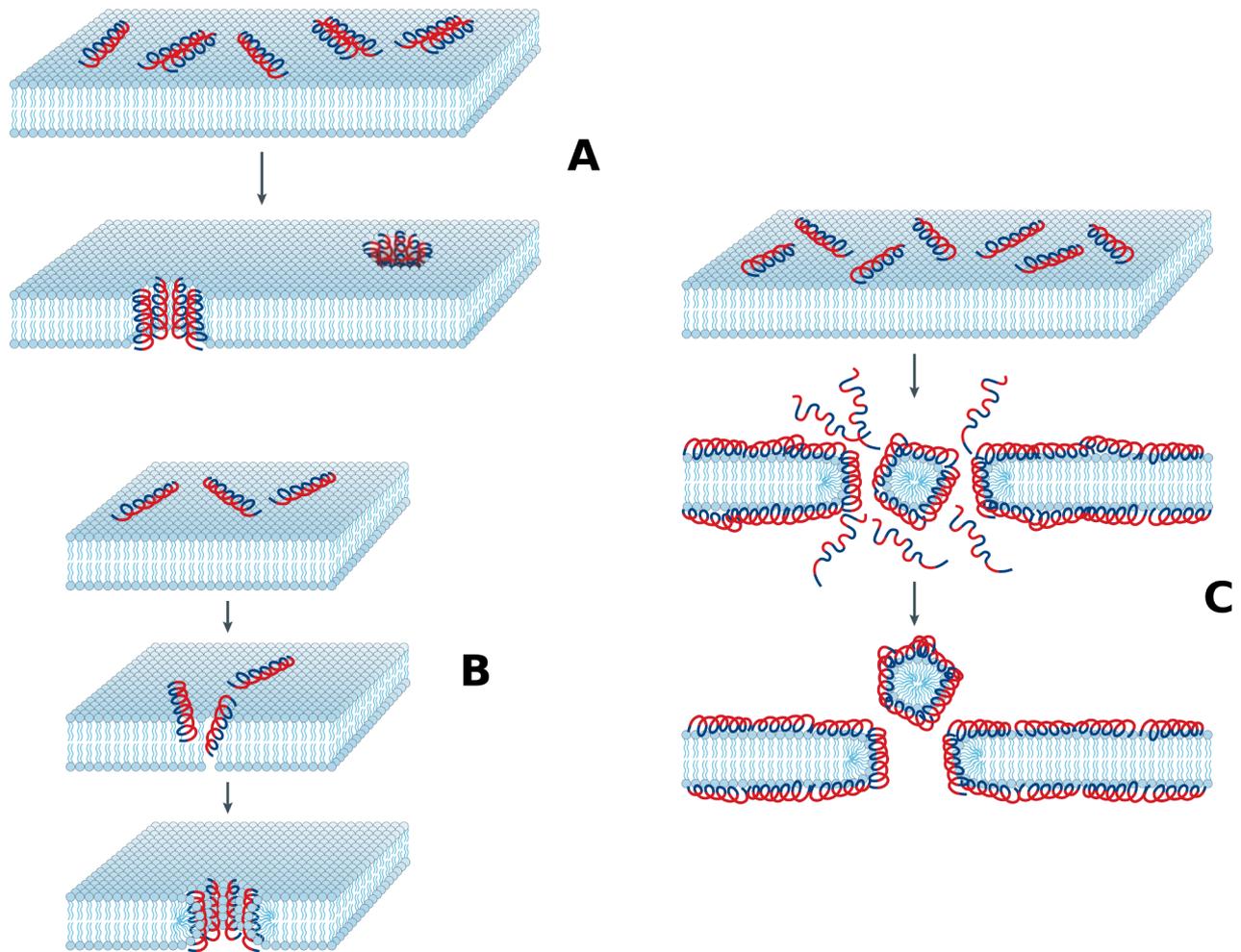
### 1.2.2. Características Estruturais e Modos de Atuação Gerais dos AMPs

Caracterizar os AMPs com base nas suas propriedades gerais é uma tarefa complicada devido à diversidade do grupo. Existem AMPs de carga global positiva<sup>64</sup>, outros com carga negativa<sup>65</sup>, uns têm uma sequência com menos de 10 aminoácidos<sup>66</sup>, outros de quase 100<sup>67</sup>, uns possuem estrutura secundária bem definidas (como alfa-hélices<sup>68</sup>), outros apenas estruturas lineares indefinidas<sup>69</sup>. Apesar disso, na literatura os AMPs são descritos, em geral, como sendo curtos, formados por 12 a 50 aminoácidos, catiónicos (com uma carga entre +4 e +6), e com uma proporção substancial de resíduos hidrofóbicos na sua composição (o que torna esses péptidos anfipáticos)<sup>70-72</sup>.

De acordo com a sua carga, os AMPs são classificados como catiónicos (“Cationic Antimicrobial Peptides” - CAMPs), que em geral têm uma carga global na gama de +4 a +6 devido à presença dos aminoácidos lisinas e argininas, e como aniônicos (“Anionic Antimicrobial Peptides” - AAMPs), normalmente péptidos com uma carga global entre -1 e -7 devido à presença de ácidos glutâmicos e aspárticos.

Na maioria dos casos, os AMPs são catiónicos, e interagem com membranas num mecanismo que envolve interações entre os resíduos carregados dos péptidos e componentes aniônicos da superfície membranar alvo<sup>73</sup>, matando o organismo por disrupção ou permeabilização da membrana, ou, menos comumente, por interação com outros alvos intra celulares depois de atravessada a membrana do organismo alvo. Inibição da síntese de DNA e RNA, bloqueio de chaperonas, inibição da atividade ribossomal, indução de espécies reativas de oxigénio e a disrupção da membrana mitocondrial são alguns dos mecanismos que levam à morte dos organismos alvo por AMPs em que a sua atividade antimicrobiana não se deve a eventos ao nível da membrana desses organismos<sup>72</sup>.

A maioria dos estudos sobre a causa da atividade letal dos AMPs para micro-organismos apontam para que esta se deva, predominantemente, à perda da integridade membranar dos patogénicos, pela interação dos AMPs com os seus lípidos membranares<sup>74-76</sup>. Muitos modelos de ação antimicrobiana ao nível da membrana têm sido propostos, principalmente para CAMPs de estrutura de alfa-hélice, pois são dos mais estudados. Os mais comuns são o modelo poro tábua de barril (do inglês, “barrel stave pore model”), o modelo poro toroidal (“toroidal pore model”), o modelo carpete (“carpet model”) e o modelo detergente (“detergent model”), esquematizados na Figura 1.9.



**Figura 1.9.** Representação do modelo poro tábua de barril (A), modelo poro toroidal (B) e modelo de carpete (C) propostos para a ação de AMPs. As bolas com dois traços (a azul claro) representam fosfolípidos membranares, as estruturas em hélice representam AMPs anfipáticos, com as suas zonas hidrofílicas (vermelho) e hidrofóbicas (azul escuro). Figura adaptada de <sup>73</sup>.

No primeiro modelo, os péptidos inserem-se na membrana lado a lado, como tábuas de um barril, formando um poro, no qual os resíduos hidrofóbicos dos péptidos estão voltados para os lípidos membranares circundantes e os hidrofílicos para o interior aquoso do poro<sup>77,78</sup> (ver Figura 1.9 A). No modelo de poro toroidal, os péptidos também penetram a membrana perpendicularmente, mas neste caso não existem interações laterais entre péptidos. Pelo contrário, as zonas polares dos AMPs interagem com as cabeças polares dos fosfolípidos e esta interação promove a torção da monocamada lipídica, acabando por se formar um poro, onde tanto os péptidos como as cabeças polares dos lípidos estão voltados para o interior<sup>79,80</sup> (ver Figura 1.9 B). No modelo de carpete, os AMPs aderem paralelamente à superfície da membrana e, com o aumento da concentração, formam uma camada de péptidos que cobre a bicamada (como uma carpete), o que leva à permeabilização através da destabilização global da membrana<sup>81,82</sup> (ver Figura 1.9 C). Alguns autores apenas abordam o modelo de carpete não referindo o modelo de detergente quando

discutem o modo de ação destes péptidos<sup>73</sup>. Isto porque no modelo de tapete os AMPs desintegram a membrana lipídica tal como um detergente, assim o modelo de detergente pode ser entendido como um estágio avançado do modelo de tapete. Outros autores, no entanto, distinguem os dois modelos<sup>74,83</sup>, apesar do princípio destes dois mecanismos ser o mesmo, ou seja, elevadas concentrações do péptido levam à destabilização membranar<sup>83,84</sup>.

Apesar de terem sido identificados AAMPs em variados grupos de organismos, de plantas a vertebrados, o número de estudos sobre estes péptidos de carga global negativa é bastante inferior em comparação com estudos sobre CAMPs, o que justifica que o seu mecanismo de ação seja ainda pouco conhecido. Alguns estudos mostraram que alguns AAMPs agem formando pontes salinas catiónicas com as cargas negativas da superfície de micróbios<sup>85</sup>, usando íons metálicos, o que explica a necessidade da presença do íon de zinco ( $Zn^{2+}$ ) de vários AAMPs para a sua atividade microbida<sup>66</sup>. Este facto ajudou a elucidar algumas questões, embora existam outros AAMPs que não têm a necessidade de íons metálicos para exibir esta atividade, e os seus mecanismos de ação são assim desconhecidos.

### 1.2.3. Péptidos Penetrantes de Células (“Cell-Penetrating Peptides” - CPPs)

No Capítulo I foi explanado que a membrana celular, devido às suas propriedades únicas, constitui uma barreira bastante efetiva contra muitas macro moléculas, principalmente moléculas hidrofílicas. Apesar disso, em 1965 constatou-se que histonas e poliaminas catiónicas e polilisinas estimulam a absorção da proteína albumina por parte de células tumorais em cultura<sup>86,87</sup>. Mais tarde observou-se que o transporte de algumas proteínas seria mais eficaz se essas proteínas fossem conjugadas com polilisina<sup>88</sup>. Posteriormente, em 1988, foi reportado que uma proteína policatiónica do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), também é capaz de atravessar muito eficazmente a membrana celular de células de mamíferos<sup>89,90</sup>. Esta proteína, a HIV-1 TAT, foi assim a primeira descrita como capaz de penetrar células, reconhecendo-se mais tarde que 11 aminoácidos da sua sequência (YGRKKRRQRRR) compunham a sequência mínima responsável pela sua entrada na célula<sup>91</sup>. No início dos anos 90, um fragmento derivado do homeodomínio (domínio proteico estrutural que liga a DNA ou RNA de uma forma específica, geralmente encontrado em fatores de transcrição) da proteína Antennapedia da mosca *Drosophila melanogaster* (com a sequência aminoacídica RQIKIWFQNRRMKWKK) mostrou também possuir propriedades semelhantes<sup>92,93</sup>. Devido à sua curiosa propriedade de atravessar a membrana lipídica este fragmento peptídico ficou conhecido como penetratina.

Estas duas descobertas impulsionaram novas investigações constatando-se assim que os dois

péptidos anteriores não seriam casos isolados mas faziam parte de uma família de péptidos que conseguem atravessar membranas celulares, os CPPs. Desde então foram descobertos vários outros CPPs, alguns naturais e outros sintéticos, como o “transportan” (GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL) poliargininas e polilisininas de diferentes comprimentos<sup>94</sup>. O grande interesse da comunidade científica nestes péptidos não reside apenas na sua capacidade de atravessarem membranas lipídicas sem toxicidade associada, mas também no facto de conseguirem carregar biomoléculas durante a translocação.

Péptidos penetrantes de células (CPPs), as vezes referidos como domínios proteicos de transdução (“protein transduction domains” - PTDs), podem ser brevemente descritos como moléculas que rapidamente atravessam membranas celulares de forma não tóxica, e, neste processo, podem transportar macro-moléculas para o interior de células vivas<sup>95</sup>. Tal como nos AMPs, são em geral pequenos péptidos, com até cerca de 30 aminoácidos, com carga positiva, devido a serem ricos em lisina e arginina<sup>96</sup>.

Os mecanismos subjacentes à translocação dos CPPs permanecem ainda pouco claros. Resultados contraditórios têm sido reportados, alguns indicam que o processo de translocação acontece através de um caminho de endocitose dependente de energia, enquanto outros apontam para uma endocitose independente de energia<sup>97</sup>. Ambas as hipóteses são insuficientes: a falta de especificidade dos CPPs enfraquece a ideia de que os CPPs possam interagir com recetores membranares específicos, enquanto que a possibilidade de difusão passiva de CPPs através da membrana é difícil de aceitar, tendo em conta que estas moléculas possuem zonas hidrofílicas, e como tal, a translocação através do centro hidrofóbico da membrana requereria um elevado custo energético, além do que o transporte de moléculas associadas a CPPs implicará um custo de energia<sup>97</sup>. É conhecido que os AMPs são também capazes de atravessar membranas plasmáticas bacterianas de forma independente de energia<sup>98,99</sup>, formando em alguns casos poros estáveis com elevados tempos de vida, na ordem dos milissegundos<sup>100,101</sup>, podendo esses poros ser responsáveis pela morte da bactéria<sup>102</sup>. Como alguns estudos apontam para um mecanismo independente de energia, a translocação de CPPs pode se dever também à formação de poros num processo semelhante ao dos AMPs. No entanto, existem indicações contrárias a esta hipótese, nomeadamente o facto de os CPPs, em geral, não terem o elevado conteúdo em resíduos hidrofóbicos característico de muitos AMPs, além disso a formação de poros leva à libertação de conteúdo citoplasmático que pode resultar em morte celular. No entanto, a formação de poros explicaria a translocação das moléculas associadas a CPPs, na medida em que tais moléculas poderiam atravessar o poro sem o requisito de energia extra.

Existe assim uma grande controvérsia sobre os mecanismos de translocação dos CPPs,

embora na literatura se proponham três mecanismos principais, sendo eles a translocação direta<sup>103</sup> (envolvendo interações eletrostáticas entre as cargas positivas dos péptidos e cargas negativas membranares que permitem a translocação da membrana devido à sua desestabilização), diferentes tipos de endocitose (tais como a macropinocitose<sup>104</sup>, a endocitose mediada por clatrina<sup>105</sup>, e a endocitose mediada por jangadas lipídicas ou caveolar<sup>106</sup>) e, por fim, a penetração através da formação de estruturas transitórias na membrana como micelas<sup>93</sup> e poros<sup>107</sup>. Os mecanismos pelos quais os CPPs atravessam a membrana podem variar de acordo com a carga associada e o mesmo CPP pode usar mais que um dos mecanismos descritos e em simultâneo.

Apesar de CPPs serem usados com diversas finalidades, todas elas se baseiam numa ou em ambas as propriedades características deste péptidos, ou seja, na propriedade de translocação da membrana e no transporte de carga para o interior da célula. Assim a grande aplicabilidade destes péptidos consiste na entrega para o interior da célula de diferentes moléculas, conforme a finalidade de interesse. Exemplos de cargas transportadas para o interior celular são variados compostos farmacológicos<sup>108,109</sup>, péptidos ou proteínas<sup>110</sup>, oligonucleótidos/DNA/RNA<sup>111,112</sup>, nano-partículas<sup>113</sup>, anticorpos<sup>114</sup>, lipossomas<sup>115</sup>, bacteriófagos<sup>116</sup>, biossensores<sup>117</sup>, sondas fluorescentes<sup>118</sup> e pontos quânticos<sup>119</sup>. Os propósitos da entrega destas cargas são inúmeros, desde servirem como agentes contrastantes em imagiologia<sup>120,121</sup>, passando pela luta contra o cancro<sup>122</sup>, a provocarem efeitos bioactivos como a modulação da resposta imune<sup>123</sup> ou a inibição da apoptose<sup>124</sup>.

Os CPPs são assim, tal como os AMPs, péptidos interatuantes com membranas biológicas que, devido a tal peculiaridade e à já abordada importância das membranas, se tornaram alvo de muito estudo e investigação. Já muita informação foi revelada sobre estas moléculas, sobre suas propriedades, sobre seus mecanismos de ação, e possíveis aplicações, embora permaneça por revelar muita mais informação. A problemática abordada de seguida é exemplo disso.

#### **1.2.4. AMPs e CPPs, Diferentes Classes de Péptidos com Atividade Membranar?**

Serão os AMPs e CPPs duas classes facilmente separáveis de péptidos com atividade membranar? Ou a sua divisão em duas classes diferentes será meramente artificial? Se são duas classes diferentes o que dizer sobre a existência de AMPs que penetram a célula antes de romperem as suas membranas, ou de CPPs que também provocam a disrupção membranar como consequência da sua atividade? Estas são algumas questões que surgem com o aprofundar de conhecimento sobre estes péptidos. Os AMPs e CPPs são provavelmente as classes de péptidos com atividade membranar que mais se sobrepõem<sup>125</sup>. No entanto, esta dificuldade de classificação não se resume apenas a estes dois grupos, pois alguns CPPs provaram auxiliarem a fusão e agregação de

vesículas<sup>126</sup> apesar destas propriedades serem geralmente usadas na descrição de domínios de fusão (péptidos) de proteínas virais<sup>127</sup>.

Alguns autores apontam para que estes dois grupos de moléculas sejam na realidade apenas um. Esta hipótese apoia-se em factos como a similaridade estrutural e de propriedades, a partilha de alguns mecanismos de ação ao nível membranar<sup>125,128,129</sup>. Além disso, existem casos reportados de CPPs com atividade antimicrobiana, como o péptido TAT<sup>130-132</sup> e penetratina<sup>133,134</sup>, e de AMPs que conseguem penetrar células alvo sem danificar a sua membrana, como o péptido Bac7<sup>135</sup>.

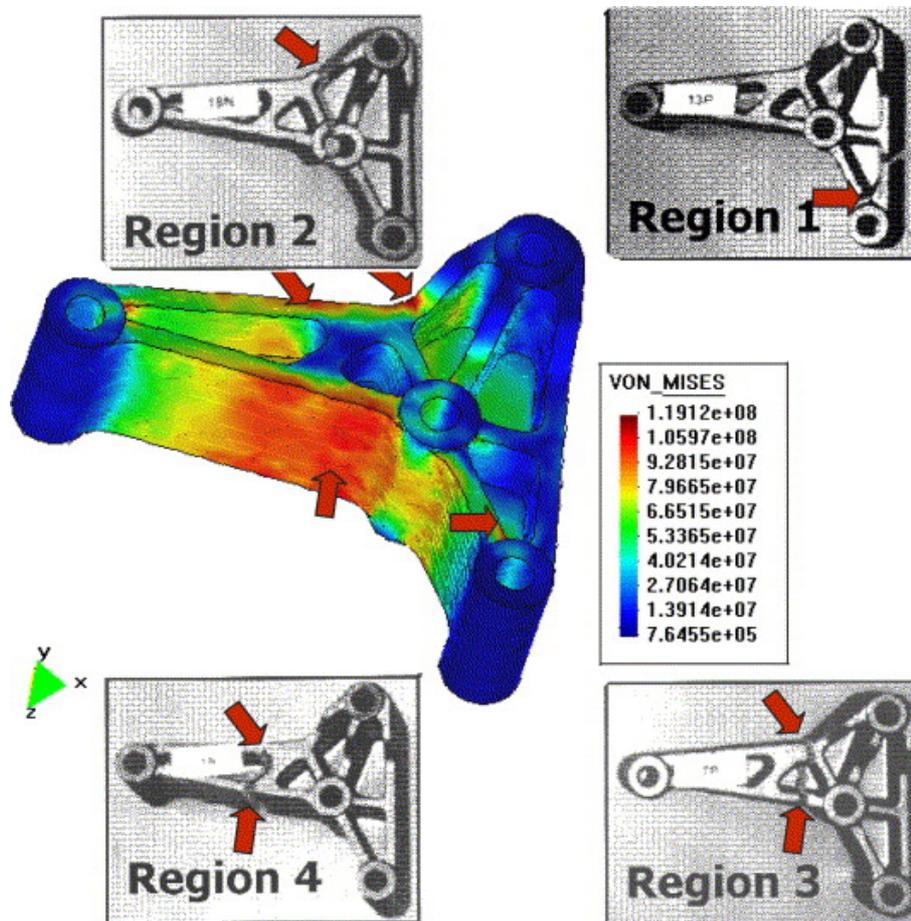
A concentração suficientemente elevada vários CPPs conseguem permeabilizar membranas<sup>134</sup>, enquanto que vários AMPs podem atingir alvos intra-celulares antes da permeabilização das membranas, o que não é muito surpreendente visto a similaridade estrutural entre AMPs e CPPs. A atenção devotada a estes péptidos é justificada pelas suas aplicações, o que levou à sua divisão classificativa. Os AMPs foram, e são, estudados principalmente como uma ferramenta para lutar contra infeções, e os CPPs são direcionados para terapia genética e entrega de drogas. No entanto do ponto de vista molecular e de mecanismos de ação, a separação em dois grupos é puramente académica<sup>125</sup>. Além disso, as membranas nas quais a interação com os AMPs e CPPs é estudada são igualmente vistas de forma enquadrada pelas aplicações, ou seja, a interação entre membranas e AMPs é avaliada usando em geral membranas de micro-organismos embora no mesmo estudo para CPPs são geralmente utilizadas membranas de células de mamíferos. No entanto, as membranas são diferentes e, como tal, diferentes efeitos reportados para CPPs e AMPs podem dever-se a diferenças na composição membranar, a qual modula a afinidade peptídica e a sua propensão à permeabilização.

Com o avolumar de conhecimento sobre esta área, a hipótese de que AMPs e CPPs sejam um grande grupo heterogéneo de MAPs torna-se mais sustentada. Esta divisão na classificação deve-se a razões sociológicas. Devido à imensidão da ciência, a maioria dos cientistas tendem a focarem-se em determinadas áreas, como a transfeção celular ou a microbiologia. Um microbiologista classificará um péptido que demonstre capacidade de interagir com membranas de micro-organismos e possivelmente matá-los como um péptido com propriedades antimicrobianas, enquanto que um biotecnologista que estude culturas *in vitro* de células animais pode olhar para o mesmo péptido como um péptido com capacidade de atravessar a membrana. Assim, e apesar de o péptido ser o mesmo, cada um dos cientistas irá classificar o péptido de acordo com o que para eles será a sua aplicação mais importante, resultando assim uma divisão de classificação artificial.

Com tudo isto, pode ser que num futuro próximo AMPs, CPPs, péptidos fusogénicos e amilóides tenham as suas fronteiras tão indefinidas tal como têm as suas interações com as membranas, que apenas o título abrangente de MAPs faça sentido.

### 1.3 Modelação e Simulação Molecular Computacional

Com o advento da tecnologia informática, os computadores têm cada vez maiores capacidades de processamento. Esta capacidade de processamento é essencial para a investigação nos dias de hoje. Com a quantidade de dados que são gerados todos os dias por investigadores (hoje em dia qualquer aparelho de medição de parâmetros, como por exemplo um simples espectrofotómetro, gera um número elevado de dados que posteriormente têm de ser processados por computador para ser possível retirar informação útil) os computadores tornam-se “parceiros” indispensáveis, permitindo avanços na ciência que de outra forma seriam impossíveis.



**Figura 1.10.** Representação dos resultados de uma simulação computacional do stress e fadiga experimentados por uma peça metálica. Imagem retirada de <sup>136</sup>.

Apesar da importância do uso de computadores no tratamento de dados, falar apenas deste facto é extremamente redutor para as capacidades dos mesmos. Atualmente os computadores têm capacidades incríveis, que cientistas e investigadores souberam explorar. Uma dessas capacidades é a possibilidade de processamento de funções matemáticas complexas. O tratamento estatístico de dados é um processo que exige muito pouco de um computador moderno, no entanto os cálculos

matemáticos podem exigir bastante, dependendo da sua complexidade, obrigando muitas vezes ao uso de super computadores. A capacidade de cálculo de um computador ou super computador é limitada, mas no entanto permite obter resultados em segundos ou minutos, de cálculos que brilhantes matemáticos não são sequer capazes de realizar.

Esta capacidade de cálculo/processamento permite a resolução numérica de modelos matemáticos (baseados em fatores experimentais, em fatores empíricos e nos princípios da física, química e matemática), para a realização de testes computacionais. Assim hoje em dia é possível, por exemplo, um engenheiro prever a fadiga de uma peça<sup>136</sup> recorrendo a software criado para esse tipo de estudo. O engenheiro pode projetar a peça com uma arquitetura diferente ou com diferentes materiais e testar qual das peças terá melhor resposta à fadiga, tudo isto computacionalmente, levando posteriormente para ensaios físicos apenas o material com melhores índices calculados. Isto evita a necessidade de produzir e testar laboratorialmente todas as versões desenhadas da peça, reduzindo custos e tempos de produção (ver Figura 1.10).

Vários tipos de testes computacionais são possíveis, desde que as abordagens e modelos matemáticos sejam adequados. Um tipo de teste/simulação que atualmente, devido as suas potencialidades, está a ganhar um elevado impacto na comunidade científica das ciências da vida, são os testes ou simulações moleculares.

Este tipo de testes é geralmente agrupado na classificação de modelação ou simulação molecular. De forma simples, a simulação molecular pode ser entendida como uma ferramenta de trabalho com escalas de tempo e espaço tão pequenas, que consegue oferecer informação micro e nanoscópica de uma forma direta. Esta recente abordagem experimental tem sido amplamente usada para o conhecimento da transição conformacional proteica ao nível molecular<sup>137,138</sup>, bem como na análise de interações entre moléculas, e demonstra ser um complemento potencial a estudos experimentais e teóricos<sup>139-143</sup>. Na atualidade a simulação molecular vem se tornando mais popular devido ao aumento do poder de computação e da sua velocidade.

As simulações moleculares são usadas, então, em diversos tipos de estudos com o intuito de compreender propriedades de moléculas e agregados moleculares em termos de estrutura e de interações, servindo assim como complemento às convencionais atividades experimentais laboratoriais, com a possibilidade de compreender fenómenos aos quais não temos acesso com a tecnologia atual na experimentação tradicional. A raiz desta área foi implementada quando a comunidade científica se apercebeu que a geometria molecular, energia e várias propriedades moleculares podem ser calculadas por modelos do tipo mecânico, sujeitos às forças físicas elementares, nascendo assim a Mecânica Molecular.

### 1.3.1. Mecânica Molecular

O termo Mecânica Molecular (MM) refere-se ao uso de funções de energia potencial (por exemplo potenciais Coulomb) para modelar sistemas moleculares. Abordagens de MM são amplamente usadas em refinamento de estruturas, simulações de Dinâmica Molecular, simulações de Monte Carlo e simulações de “docking” (simulações onde são determinadas as energias de afinidade entre proteínas e ligandos)<sup>144</sup>.

As bases da MM surgiram quando a comunidade científica se apercebeu que as moléculas podem ser representadas como um sistema mecânico no qual partículas (os átomos) estão ligadas por “molas” (ligações químicas) sendo possível realizar uma amostragem da distribuição dos seus estados conformacionais e respectivas energias. A molécula então roda, vibra e translaciona para atingir conformações no espaço, como resposta coletiva a forças inter e intra-moleculares que agem sobre a mesma<sup>145</sup>. As forças experimentadas pelo modelo são descritas por funções matemáticas simples como:

- soma de funções do tipo harmónicas (a partir da lei de Hooke, que determina que a força é igual à característica constante da mola vezes o deslocamento da massa,  $F = k \cdot \Delta l$ ), para desvios dos valores de equilíbrio de referência em termos de comprimento e ângulo de ligação;

- funções de torção trigonométricas para explicar a rotação interna (rotação de subgrupos moleculares à volta da ligação que os conecta);

- como forças de van der Waals e potenciais elétricos<sup>145</sup> (ver Figura 1.11).

Ao contrário da mecânica quântica (MQ), na MM os elétrons não estão implícitos, sendo os cálculos energéticos aplicados em função das posições nucleares dos átomos. Este princípio torna a MM muito adequada à descrição de sistema moleculares com elevado número de átomos, onde cálculos de MQ seriam muito dispendiosos computacionalmente. O cálculo das funções que descrevem o sistema apenas dependem das posições atômicas, o que implica que a dinâmica dos átomos será desvendada através de mecânica clássica com base nas leis de Newton. Estas aproximações facilitam a descrição das interações do sistema por parte das funções matemáticas, cujos parâmetros definem o tipo de interação. O conjunto de funções e parâmetros utilizados aplicados ao modelo mecânico, para cálculo da energia potencial total do sistema é denominado de campo de força (FF, do Inglês “force field”) (ver Figura 1.11).

Um FF biomolecular corresponde ao somatório de todas as energias das interações ligantes, como a energia da vibração das ligações, da variação dos ângulos de ligação, e das interações não ligantes, como van der Waals e eletrostáticas (as interações não ligantes não se aplicam apenas entre diferentes moléculas, mas também dentro da mesma molécula, entre átomos afastados entre si mais

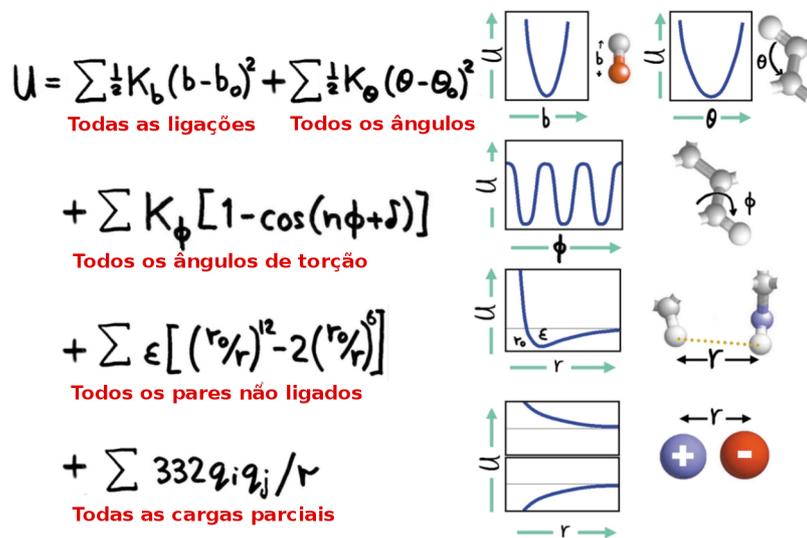
de três ligações covalentes)<sup>146</sup>.

Assim, num FF de mecânica molecular clássica a energia potencial ( $V$ ) pode ser transcrita pela seguinte equação:

$$V = V_{\text{ligações}} + V_{\text{ângulos}} + V_{\text{diedros próprios}} + V_{\text{diedros impróprios}} + V_{\text{van der Walls}} + V_{\text{eletrostáticas}}$$

Esta equação pode ser detalhada nos seguintes termos:

$$V(r^N) = \sum_{\text{Ligações}} x \frac{K_l}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{Ângulos}} x \frac{K_\theta}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{Torções}} x \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N (4\epsilon_{ij} [(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}})^{12} - (\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}})^6] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}})$$



**Figura 1.11.** Representação gráfica de um campo de forças (FF) de mecânica molecular clássica. Representação dos elementos que compõem a função matemática (esquerda) e representação visual dos mesmos (direita). Imagem adaptada de <sup>147</sup>.

É necessário ter em conta que esta função é dependente da posição ( $r$ ) das  $N$  partículas que compõem o sistema, e que as incógnitas representam constantes de forças e parâmetros de equilíbrio para as várias interações existentes no sistema. Na MM, cada molécula ou conjunto de moléculas necessita de um ficheiro que descreva tais constantes e parâmetros, sendo designado por ficheiro de topologia. O ficheiro de topologia descreve então todos os parâmetros físicos das moléculas, como o tipo de átomo, a sua carga pontual, a força a distância e o ângulo de equilíbrio de cada ligação entre átomos, bem como os ângulos de equilíbrio dos diedros.

Existem duas técnicas principais de amostragem, nomeadamente Dinâmica molecular (MD, do inglês “Molecular Dynamics”) e Monte Carlo (MC). Existem no entanto várias técnicas que combinam características de ambas anteriores. Cada técnica tem as suas vantagens e desvantagens.

Por exemplo a técnica de MD permite movimento contínuo ao contrário da técnica de MC (ver Tabela 3).

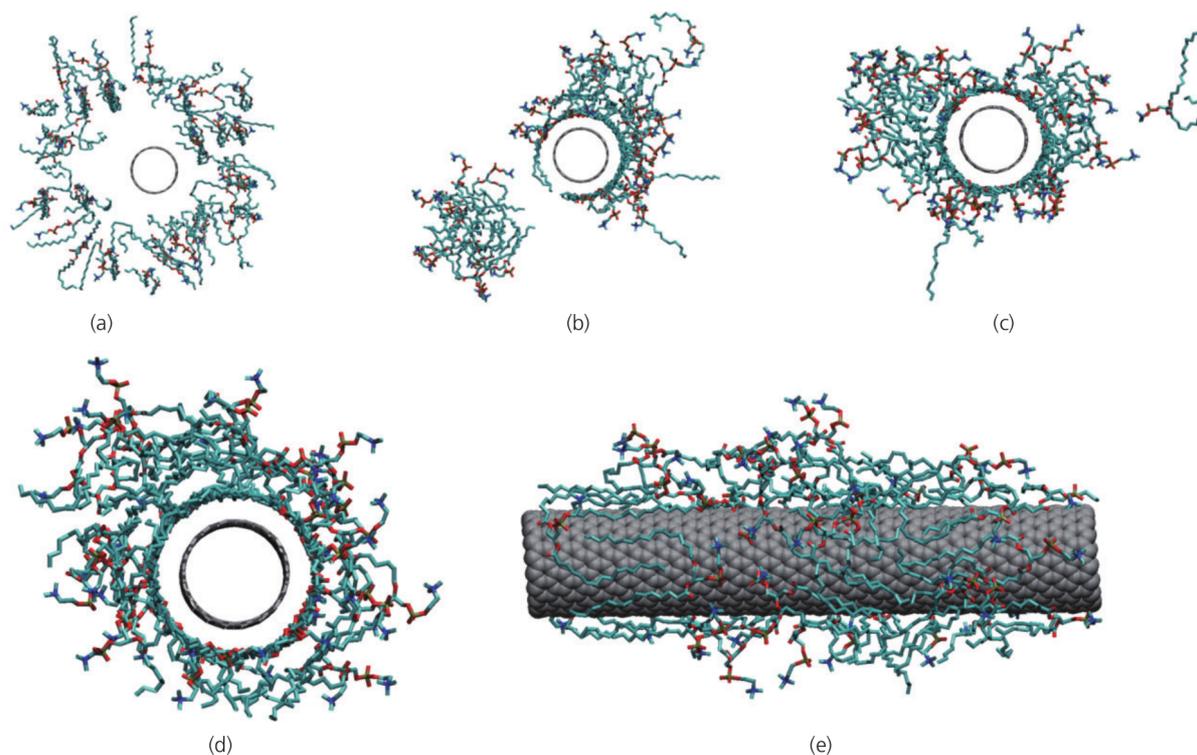
<b>Método/ Técnica usada</b>	<b>Prós</b>	<b>Contras</b>	<b>Poder de computação necessário</b>
<b>MD</b>	Movimento contínuo; ligação experimental entre estruturas e dados cinéticos macroscópicos Ligação entre dois estados; útil para ultrapassar conflitos estéricos e elevadas barreiras	Caro; processos simulados de curta duração	Elevado
<b>TMD (“traged MD”)</b>	Usa a força média potencial que aproxima ao ambiente dos processos e reduz o “custo” do modelo; útil em atmosferas experimentais iônicas e associações intermoleculares	Não é necessariamente físico	Médio
<b>Solvatação contínua (construções empíricas)</b>		Aproximado	Médio
<b>Dinâmica Browniana (BD)</b>	Larga escala e duração elevada de movimento	Hidrodinâmica aproximada; limitado a sistemas de baixa inércia	Médio
<b>MC</b>	Larga escala; estatisticamente útil Informação de equilíbrios valiosa; permite incorporar restrições experimentais	Definir movimentos é difícil; vias não físicas	Baixo
<b>Minimização</b>		Sem informação dinâmica	Baixo

**Tabela 3:** Diferentes técnicas de amostragem e alguns prós e contras (em termos comparativos entre as diferentes técnicas) do seu uso. Tabela adaptada de <sup>145</sup>.

### 1.3.2. Dinâmica Molecular

A simulação por dinâmica molecular constitui uma das principais ferramentas computacionais para estudos de sistemas atômicos e moleculares, como sistemas físicos, químicos e biológicos constituídos por um elevado número de átomos ou moléculas em que os processos envolvem energias da ordem  $K_B T$  ( $K_B$ : constante de Boltzman;  $T$ : temperatura)<sup>146</sup>. Esta abordagem determina os movimentos dos átomos e /ou moléculas de sistemas em que o potencial de interação entre essas partículas seja conhecido, bem como as equações que descrevem o seu movimento. Assim é possível estudar evoluções ao longo do tempo de configurações dos sistemas, tal como determinar propriedades macroscópicas dos mesmos, seguindo os fundamentos de mecânica estatística. As partículas interatuantes no sistema irão mover-se da posição inicial de acordo com os potenciais intermoleculares, e conhecendo-se posições e velocidades de todas as partículas num

instante específico ( $t_0$ ), é possível computar as forças resultantes em cada partícula, e portanto determinar posições e velocidades num instante superior ( $t_0 + \Delta t$ ), usando equações de movimento Newtonianas. Depois procede-se a uma computação de ciclos, ou seja novas forças são calculadas num novo instante ( $t_0 + 2\Delta t$ ), através das velocidades e posições das partículas no instante anterior. Desta forma vão ser geradas trajetórias moleculares para todos os sistemas<sup>148</sup> (ver Figura 1.12 com exemplo de estudo por MD).



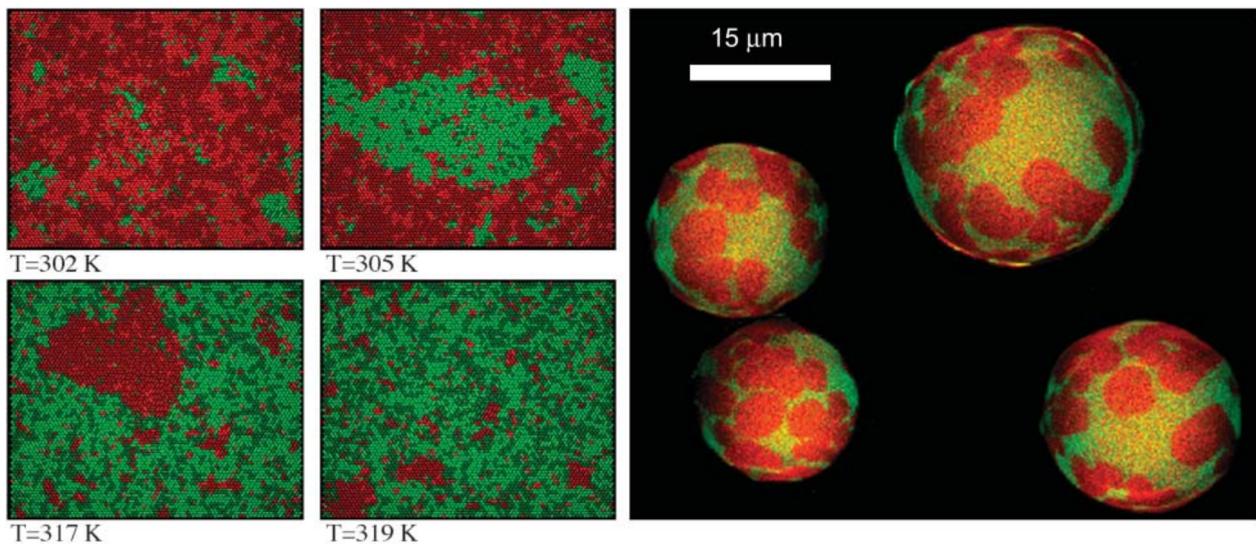
**Figura 1.12.** Representação de um estudo da auto-agregação de fosfolípidos e nanotubos de carbono de parede simples por dinâmica molecular (MD). As imagens a, b, c e d mostram a vista radial do sistema simulado a 0, 1, 2 e 3ns. A imagem e mostra a vista lateral do sistema a 15ns. Figura retirada de <sup>149</sup>.

As propriedades do equilíbrio do sistema em estudo são determinadas em escalas de tempo muito pequenas (da ordem de pico e nanosegundos), que no entanto são relativamente grandes na escala atômica. O tempo do processo a simular bem como o número e o tipo de partículas que podem ser incluídas dependem das propriedades determinar, dos processos dinâmicos envolvidos, da convergência estatística e da capacidade computacional, mas o importante é que o sistema seja representativo da capacidade computacional<sup>150</sup>. Como já está explícito na Tabela 3, uma grande vantagem do uso de MD consiste na ponte possível entre os seus resultados e estudos experimentais. Resultados experimentais no geral guiam e motivam os estudos de MD e por sua vez os resultados de MD explicam detalhadamente a nível nanoscópico os fenômenos observados experimentalmente. Outra grande vantagem, que não foi referida na Tabela 3, reside na diversidade de sistemas que podem ser estudados via MD, desde sistemas homogêneos (gases, fluidos,

líquidos, etc) a sistemas pouco ou quase nada homogêneos (interfaces, filmes, biomembranas, polímeros, proteínas, micelas, argilas, nanomateriais)<sup>150</sup>.

### 1.3.3. Monte Carlo

Técnicas estatísticas coletivamente conhecidas como Monte Carlo são ferramentas poderosas de resolução de problemas. Curiosamente, disciplinas tão díspares como política, economia, biologia, e física confiam em ferramentas de MC para lidarem com as suas tarefas diárias<sup>145</sup>. Vários problemas que possam ser elaborados como fenômenos estocásticos e estudados por amostragem aleatória são solucionados por simulações de MC, e este tipo de simulações vem sendo usado à bastante tempo como forma de obter aproximações numéricas de funções bastante complexas. Basicamente é processado um jogo de probabilidades, mas com regras práticas e teóricas da teoria probabilística, de processos estocásticos e de física estatística (cadeias de Markov, movimento Browniano, hipótese ergódica), oferecendo estas regras utilidade prática a tal jogo (ver na Figura 1.13 um exemplo de resultados de uma simulação molecular de MC).



**Figura 1.13.** Representação de um estudo do processo de difusão de dois lipídios em membranas onde coexistem domínios em fase gel e fluída. No painel esquerdo, resultados de simulações por Monte Carlo (MC) de membranas com os dois tipos de lipídios (50:50), e à direita imagens de microscopia confocal de vesículas formadas por esses lipídios (70:30). A cor vermelha indica fases em gel e a cor verde fases fluidas. Segundo os autores os resultados de MC são concordantes com os experimentais. Figura retirada de <sup>151</sup>.

Métodos MC são usados em integração numérica, otimização global, teoria das filas, mecânica estrutural, e na solução de grandes sistemas de diferenciais, ou equações integrais. São também empregues amplamente em física e química estatística, onde são estudados comportamentos de sistemas complexos de milhares de átomos no espaço e no tempo. Esta abordagem é apelativa pela sua simplicidade, eficiência e fundamentação teórica<sup>145</sup>.

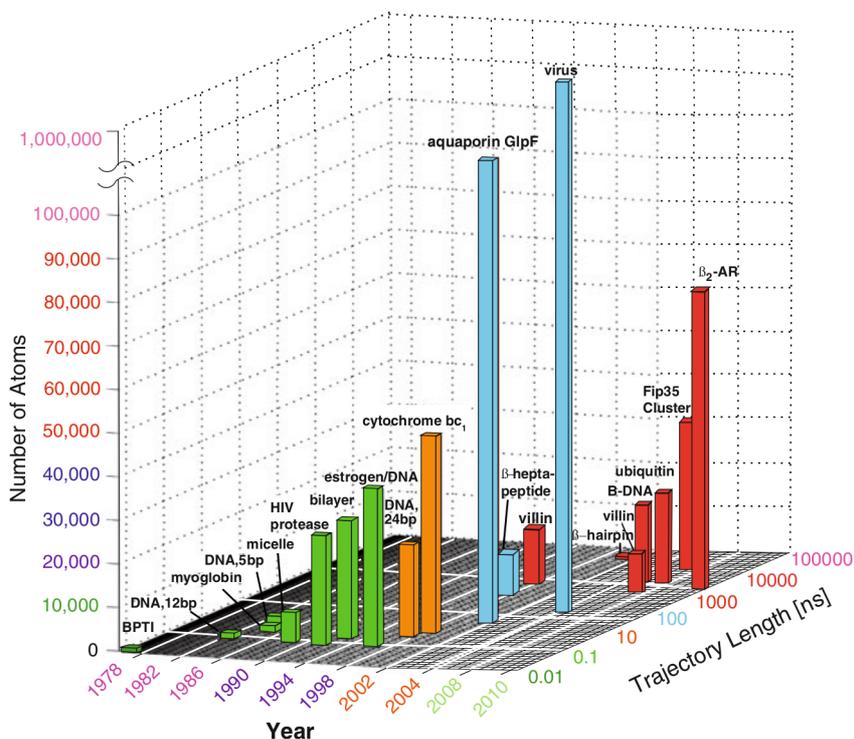
A diferença entre os métodos MC e MD reside na teoria subjacente a cada um. O método de MC baseia-se em mecânica estatística e não em dinâmica de partículas como o MD, ou seja em vez de gerar estados representativos da dinâmica do sistema, gera estados baseados em probabilidades.

A escolha entre MC ou MD é então determinada pelo fenómeno a investigar. Por exemplo simulações de gases ou sistemas de baixa densidade são preferíveis de efetuar com métodos de MC<sup>152</sup>, isto porque podem existir, nesses sistemas elevadas energias de barreira a rotações de torção (várias vezes superior a energia de  $K_B T$ ), que levariam as moléculas a ficarem presas em poucas conformações de baixa energia numa simulação MD, obtendo-se resultados conformacionais de fraca qualidade (tal não é tão problemático em MC pois os movimentos aleatórios gerados facilmente atravessam essas barreiras). Para simulações de líquidos a opção apropriada já é a de uso de MD, pois nesses sistemas as colisões moleculares provocam a permuta de energia entre moléculas, permitindo geralmente ultrapassar as barreiras referidas atrás. Além disso, neste caso simulações MC têm uma larga probabilidade de seleção de movimentos aleatórios, em que duas ou três moléculas se sobrepõem. Isto leva a uma rejeição de um grande número de movimentos e consequente decréscimo da eficiência da simulação (no entanto como métodos MC permitem movimentos não físicos, por vezes compensam este efeito). A MD também lida melhor com movimentos coletivos que MC, mas métodos recentes de MC (Monte Carlo Bias e Monte Carlo Híbrido) melhoraram a sua performance<sup>153</sup>. Existem casos em que só um dos métodos é adequado, como o uso de MD na determinação de propriedades de transporte, tais como coeficientes de viscosidade, pois MC não possui uma definição objetiva de tempo (excetuando casos especiais). MC também pode ser usado para simulações com variações do número de partículas por adição de movimentos para criação e destruição das mesmas.

#### **1.3.4. Evolução da Simulação Molecular**

Decorreram apenas 35 anos desde a primeira publicação sobre dinâmica molecular de interesse biológico<sup>154</sup>. No entanto, tal como a computação evoluiu imenso, a modelação e simulação molecular também o fez. Na Figura 1.14 é possível, através de uma representação gráfica, obter uma noção da evolução deste tipo de estudos em relação ao número de átomos do sistema e do tempo simulado. Em 1985 foi simulado um sistema modelando uma molécula de mioglobina em vácuo (ver “myoglobin” na Figura 1.14), envolvia 1423 átomos e o tempo simulado foi de 0,3 nanosegundos (300 picosegundos), demorando 50 dias a ser calculada num computador VAX-11/780 (CPU a 5 Mhz)<sup>155</sup>. Posteriormente, já em 1997, procedeu-se a simulações da ligação do recetor do estrogénio ao DNA (ver “estrogen/DNA” na figura 1.14), com água como solvente

implícito (o solvente é tido como um meio contínuo ao invés de moléculas individuais explícitas), em sistemas de 36000 átomos, com um tempo de simulação de 0,10 ns calculado em 22 dias num computador HP-735 (a 125 MHz com 8 núdulos)<sup>156</sup>. Recentemente foram realizadas simulações da proteína recetora adrenérgica  $\beta_2$  embebida numa bicamada lipídica hidratada (ver “ $\beta_2$ -AR” na Figura 1.14). Estes sistemas continham entre 55000 a 99000 átomos e o solvente seria água explícita, os cálculos foram realizados por 32 processadores (a 2.66 GHz) durando até 28 dias, permitindo simular de 0,5 a 2 microsegundos<sup>157</sup>. Estes três exemplos retratam a evolução das simulações da dinâmica molecular, sendo facilmente observável o enorme aumento da complexidade dos sistemas e do tempo simulado. Enquanto que inicialmente os sistemas eram simples, pois envolviam poucos milhares de átomos em vácuo, e as simulações se ficavam pelas poucas centenas de picosegundos, atualmente sistemas com por exemplo 1 milhão de átomos<sup>158</sup>(ver “virus” na Figura 1.14), atingindo 10 microsegundos (10000 ns)<sup>159</sup> (ver “Fip35” na Figura 1.14), com solventes explícitos são passíveis de serem simulados.

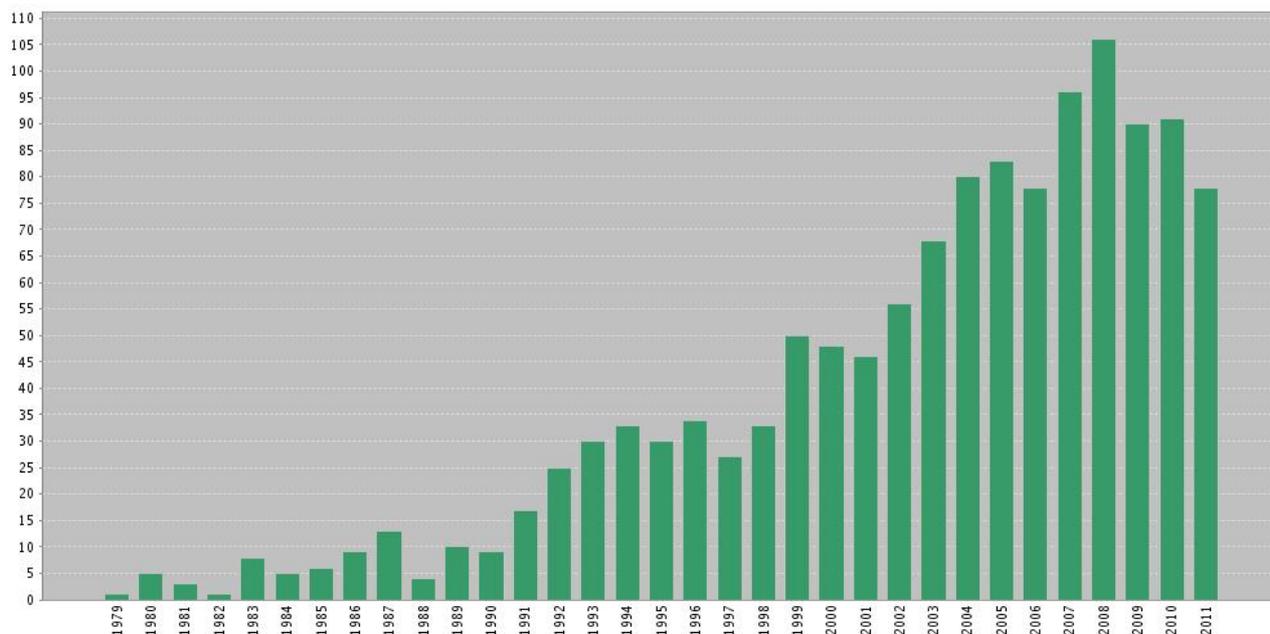


**Figura 1.14.** Evolução ao longo dos anos das simulações de dinâmica molecular, em termos do tamanho dos sistemas (Número de átomos - “Number of Atoms”), e duração do processo simulado (em nanosegundos, “Trajectory Length [ns]”). Imagem de <sup>145</sup>.

A Figura 1.15 permite por sua vez visualizar graficamente o aumento do uso de MD em estudos científicos de 2000 a 2011. A figura representa os artigos publicados de 1979 a 2011 que incluíam as palavras “molecular dynamics” e “protein” nos seus títulos, segundo a base de dados “ISI Web of Science” (<http://apps.webofknowledge.com>).

Note-se que não se deve analisar o valor do número de artigos publicados por ano, pois a

inserção da palavra “protein” nos termos de pesquisa limita bastante os resultados (1273 resultados totais com a sua inclusão e 28602 resultados com apenas o termo de pesquisa “molecular dynamics” no título dos artigos). Apenas se deve analisar o comportamento, e este demonstra que até à década de 90 eram publicados menos de 15 artigos por ano com estes termos, número que aumentou para cerca do dobro a meio desta década, e que posteriormente voltou a aumentar até estabilizar em valores acima de 75 a partir de 2003.



**Figura 1.15.** Evolução ao longo entre 1979 e 2011 de artigos científicos publicados com os termos “molecular dynamics” e “protein” nos seus títulos segundo a base de dados “ISI Web of Science”.

Desta forma a comunidade científica foi atribuindo cada vez mais importância a esta técnica, sendo que atualmente o crescimento desta área parece ter estabilizado. No entanto, o poder de computação continua aumentando, bem como os algoritmos usados pelos programas de simulação molecular que são cada vez melhores e mais eficazes e, como tal, continuarão a ser publicados trabalhos científicos com simulações de sistemas cada vez mais complexos, o que provavelmente incentivará cada vez mais cientistas a enveredarem por esta área.

## **1.4 Motivação da Dissertação**

É conhecida a importância das interações específicas entre péptidos e membranas, estando estas relacionadas com vários processos biológicos, tais como na atividade antimicrobiana, nas infeções virais, bem como em processos que culminam em doenças graves como as neurodegenerativas Alzheimer e Parkinson<sup>160</sup>. Apesar de tamanha importância deste tipo de interações, o seu estudo dificilmente contempla toda a evolução do processo, baseando-se apenas em resultados de parâmetros estruturais e termodinâmicos dos estados iniciais e finais. Este facto leva à perda da informação sobre a dinâmica dos processos. Devido a esta problemática, a caracterização dos estados intermédios que descrevem a evolução dos sistemas é usualmente realizada com base em métodos teóricos, como a simulação por computador.

Além disso, é facilmente perceptível a importância da modelação molecular assistida por computador, bem como os proveitos que podem advir desta robusta área de investigação. Com o uso da MD é possível determinar propriedades micro e mesoscópicas (propriedades à escala entre um conjunto de átomos como uma molécula e materiais medindo micrómetros) com detalhe atomístico, é possível testar condições experimentais difíceis ou mesmo impraticáveis em laboratório (como simulações a temperatura e pressão muito elevadas), é possível resolver problemas impossíveis de descrever analiticamente entre outras possibilidades. Uma abordagem de MD bem elaborada, como por exemplo utilizando métodos de alto débito (“high-throughput methods”), permite também a obtenção de uma quantidade inimaginável de dados em relativamente pouco tempo, o que traz vantagens como o aumento da velocidade de aquisição de conhecimento, ou a redução de custos, pois para obter a mesma quantidade de dados com atividades laboratoriais seriam necessários muito mais investigadores, muito mais tempo e muitos mais recursos.

Simulações de MD podem fornecer muitos detalhes ao nível molecular necessários à compreensão dos mecanismos envolvidos na ação de AMPs e CPPs. A interação entre as cargas positivas destes péptidos e as cargas negativas à superfície de membranas, além da necessidade de conteúdo hidrofóbico na sua composição, constituem dados conhecidos já há bastante tempo. No entanto, esses conhecimentos básicos são insuficientes para uma compreensão mais profunda sobre estes MAPs, o que impossibilita, por exemplo, uma aplicação mais eficaz na terapia génica ou no desenho de novos antibióticos. Consequentemente é difícil definir regras intuitivas para o desenho de novos AMPs e CPPs com propriedades melhoradas para fins pré-definidos.

Assim, a técnica de MD tem sido amplamente usada no estudo desta área pois, além das

vantagens atrás enumeradas, o objeto de estudo, nomeadamente os mecanismos de interação entre estes péptidos e membranas, decorrem ao nível atómico, encaixando perfeitamente com as gamas de tamanho dos sistemas passíveis de serem estudados por MD, além de ser das poucas técnicas que permite estudar a evolução temporal do processo pois, como já foi referido, este tipo de estudo só é possível atualmente por métodos teóricos. A técnica de MD é reconhecida como provedora de resultados facilmente comparáveis com resultados de atividades laboratoriais, o que lhe fornece maior robustez, facilitando a validação das simulações.

Apesar das inúmeras vantagens, é necessário ter em conta que as simulações de MD têm uma curva acentuada de aprendizagem, tal como qualquer técnica experimental sofisticada, e que o trabalho por de trás de uma simulação pode ser difícil, moroso e desafiante, desde a construção do sistema a simular, passando pela escolha das condições e tipo de integrações a aplicar ao sistema. Também o tratamento, no final das simulações, do enorme volume de dados obtidos pode ser bastante moroso. No entanto, o prazer da descoberta, aliado ao emprego de uma técnica que permite, entre muitas coisas, a visualização direta do sistema em estudo ao longo do tempo, superam em muito as adversidades.

O motivo deste trabalho passa então por contribuir para uma caracterização e descrição mais aprofundadas dos processos responsáveis pela interação de MAPs com membranas celulares, a nível atómico, usando para tal a técnica de MD e atividades experimentais de suporte.

Para atingir este objetivo foram desenhados três péptidos sintéticos, nomeadamente o LK10 (LKLKLLKLKLLKLKLLKLK), o LE10 (LELELELELELELELELELE) e o GA10 (GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA). Estes péptidos são constituídos por dez repetições de um par de resíduos, mais concretamente o par leucina(L)-lisina(K), leucina(L)-ácido glutâmico(E) e glicina(G)-alanina(A). A escolha de tais sequências deve-se a vários fatores. Um deles foi o tamanho: os péptidos consistem em sequências de 20 resíduos, correspondendo sensivelmente à média de número de resíduos nos MAPs conhecidos; A carga é outro dos fatores - a literatura descreve a carga como um fator fundamental para a atividade dos MAPs (ver secção 1.2), sendo a carga positiva apontada como mais favorável. Por isso um dos péptidos é carregado positivamente, outro negativamente e outro é neutro. A sequência é repetitiva com o propósito de permitir mais facilmente estabelecer relações de causa efeito entre as propriedades estudadas e os resultados. A escolha da leucina deve-se à observação que é um aminoácido hidrofóbico muito comum em AMPs de animais<sup>161</sup>, e ao facto de a composição dos AMPs incluir cerca de 50% de conteúdo hidrofóbico<sup>161</sup>. A lisina é um aminoácido carregado positivamente e muito comum em MAPs catiónicos, daí ter sido escolhida. Já o ácido glutâmico (E) é comum em AMPs aniónicos<sup>73</sup>, e como tal foi escolhido para o péptido aniónico. A glicina e alanina foram escolhidas para a obtenção de

um péptido contendo igualmente 50% de resíduos hidrofóbicos (devido à alanina) e sem carga.

Depois de projetada a composição dos péptidos foram realizadas simulações de MD, usando o pacote GROMACS, de modelos destes péptidos interagindo com modelos de diferentes membranas lipídicas nomeadamente membranas de 1-Palmitoil-2-oleil-fosfatidilcolina (POPC,  $C_{42}H_{82}NO_8P$ ) e COL, e membranas de apenas POPC. As membranas de POPC e COL serão modelos mais próximos de membranas celulares de mamíferos, enquanto que as membranas contendo apenas POPC serão modelos mais semelhantes a membranas de micro-organismos. Como discutido no capítulo 1 (secção 1.1), as membranas de mamíferos são compostas maioritariamente por lípidos zwitteriónicos como fosfatidilcolinas e por colesterol, pelo que membranas compostas por POPC e COL são bons modelos computacionais de membranas de células de mamíferos e o seu uso é bastante comum. Por sua vez os micro-organismos têm muitas vezes carga superficial negativa devido à presença de lípidos carregados negativamente como cardiolipinas e fosfatidilinositóis, pelo que o uso de membranas de POPC como modelo computacional de membranas celulares de micro-organismos pode parecer menos adequado que o uso de modelos com a inclusão de lípidos com carga negativa. É, no entanto, comum o uso de membranas de POPC como modelos de membranas celulares de micro-organismos em estudos computacionais, e tal facto prende-se com limitações inerentes aos procedimentos de MD, como a falta de parametrização de determinados lípidos para os campos de força usados. Neste trabalho foram utilizadas, como modelo de membranas de micro-organismos, bicamadas constituídas apenas pelo lípido POPC, pois não existem modelos computacionais de lípidos carregados negativamente, parametrizados para o campo de forças utilizado nas simulações, e porque usando apenas este lípido é possível estudar o efeito do colesterol na interação dos péptidos com as membranas por comparação com as membranas de POPC e COL.

A motivação do uso de membranas de POPC e COL prende-se com o facto de além de serem um bom modelo de estudo, os lípidos que a constituem são comuns e bastante usados laboratorialmente, existindo já bastante conhecimento e experiência do uso desses lípidos no laboratório onde o trabalho foi consumado, o que facilitava a sua parte laboratorial.

Por fim, e em simultâneo com algumas das simulações, foram efetuadas várias atividades experimentais, como testes de interações entre lipossomas e péptido, microscopia, fluorescência, testes antimicrobianos e testes em linhas celulares. As atividades experimentais tinham como propósito a validação dos resultados de simulação, a investigação dos mecanismos de interação entre MAPs e membranas lipídicas e o desenvolvimento de futuras aplicações baseadas nas propriedades apresentadas pelos péptidos.

# ***Capítulo 2***

## ***Material e Métodos***



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Estudos Computacionais

#### 2.1.1. Construção dos Modelos Computacionais dos Péptidos e Membranas

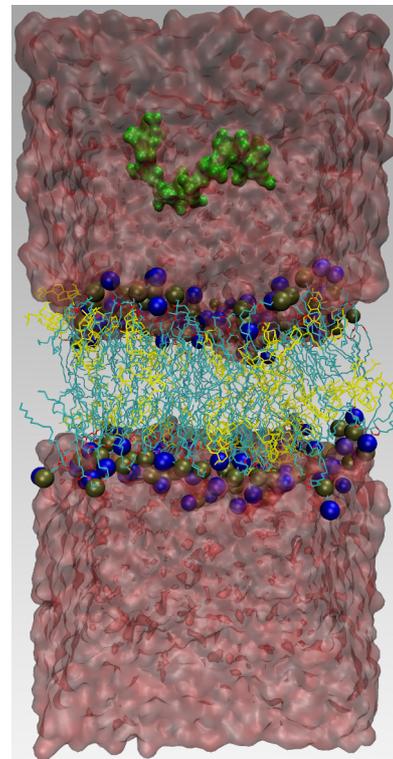
Os péptidos estudados foram desenhados especificamente para este trabalho, não existindo assim modelos cristalográficos disponíveis. Os seus modelos computacionais tiveram então de ser construídos recorrendo a software de modelação computacional. Os modelos em formato PDB foram construídos com o software Pymol 1.1<sup>162</sup>, e posteriormente convertidos ao formato gro (ficheiro que contem a estrutura molecular no formato Gromos87), através do programa pdb2gmx.

Os modelos membranares foram construídos usando o software CELLmicrocosmos 2.2<sup>163</sup> que exportava diretamente os modelos para formato gro.

#### 2.1.2. Simulações de Dinâmica Molecular

Todas as simulações MD foram realizadas com o pacote de simulação por dinâmica molecular GROMACS (“GRONingen MACHine for Chemical Simulations”)<sup>164</sup>. Este pacote foi originalmente desenvolvido na Universidade de Groningen, Holanda. É um software de código aberto, que usa ficheiros de coordenadas como ficheiros PDB (do “Protein Data Bank”) ou gro, e uma vez configurado pode correr simulações de várias moléculas (realiza os cálculos das interações muito rapidamente, em comparação com outros pacotes de MD, no entanto as simulações podem ser morosas dependendo do sistema) produzindo ficheiros de trajetórias, que descrevem os movimentos dos átomos ao longo do tempo. Posteriormente os ficheiros de trajetórias podem ser analisados e visualizados com várias ferramentas.

Depois da obtenção dos modelos dos péptidos e das membranas, estes foram simulados em



**Figura 2.1.** Representação da conformação inicial característica das simulações efetuadas da interação dos péptidos com as membranas lipídicas. A água está representada como uma superfície translúcida (vermelho), o péptido como uma superfície (verde), os grupos cabeça do POPC como esferas azuis (grupos colina) e castanhas (grupos fosfato). Os lipídios POPC (ciano) e COL (amarelo) estão representados como traços.

água o tempo suficiente para permitir o relaxamento e a equilibração das estruturas. Posteriormente, as estruturas dos péptidos eram adicionadas às estruturas das membranas em solução, para simular a interação dos péptidos com as membranas em ambiente biológico (ver Figura 2.1 com a representação do estado inicial de uma simulação). No final das simulações, a sua evolução temporal foi avaliada e analisada visualmente e através de várias ferramentas do GROMACS.

As condições de simulação foram globalmente as mesmas para todos os sistemas, e estão descritas de seguida:

Todas as simulações foram realizadas com o FF GROMOS96 43a1-S3<sup>165</sup>, com o pacote GROMACS 4.07<sup>166</sup>, usando como integrador o algoritmo “*Leap-Frog*” (algoritmo que resolve numericamente e de forma simples as equações diferenciais de movimento, que são divididas em pequenos passos, os passos de integração) com um tempo de integração de 2fs, em condições periódicas de fronteira, a temperatura (300 Kelvins) e pressão constante (1 bar).

Em MD as simulações são realizadas em caixas virtuais, que simplificam muito os problemas inerentes ao tipo de cálculos efetuados, mas provoca outros, como o facto de os átomos no centro e átomos perto dos limites da caixa de simulação experimentarem forças diferentes, ou o facto de o sistema simulado ter um número muito pequeno de átomos em relação a um sistema físico real. Assim, para minimizar estes efeitos, são aplicadas à caixa de simulação condições periódicas de fronteira (“periodic boundary conditions”-PBC). Estas condições traduzem-se na replicação da caixa e seu conteúdo em todas as direções, originando-se assim um arranjo tridimensional periódico infinito, ultrapassando as limitações anteriores (ver Figura 2.2). As caixas de simulação foram no formato dodecaédrico para simulações de péptidos em água e triclinicas (caso da Figura 2.1) para simulações de membranas em água e de membranas com péptidos em água. O tamanho das caixas bem como o número de águas mudava de acordo com o comprimento das membranas e com o espaço necessário à inserção dos péptidos. Nas primeiras simulações da interação dos péptidos com membranas de POPC e COL (60-40% mol), estes foram adicionados a aproximadamente 2,5nm (suficientemente distante para que não sentissem forças atrativas ou repulsivas por parte das membranas para não induzir artificialmente a possível interação entre os péptidos e a bicamada). Nas simulações seguintes esta distância foi reduzida (devido à constatação nas primeiras simulações, que os péptidos mais tarde ou mais cedo interagem com as membranas) para diminuir o número de águas no sistema simulado, levando à diminuição do custo computacional.

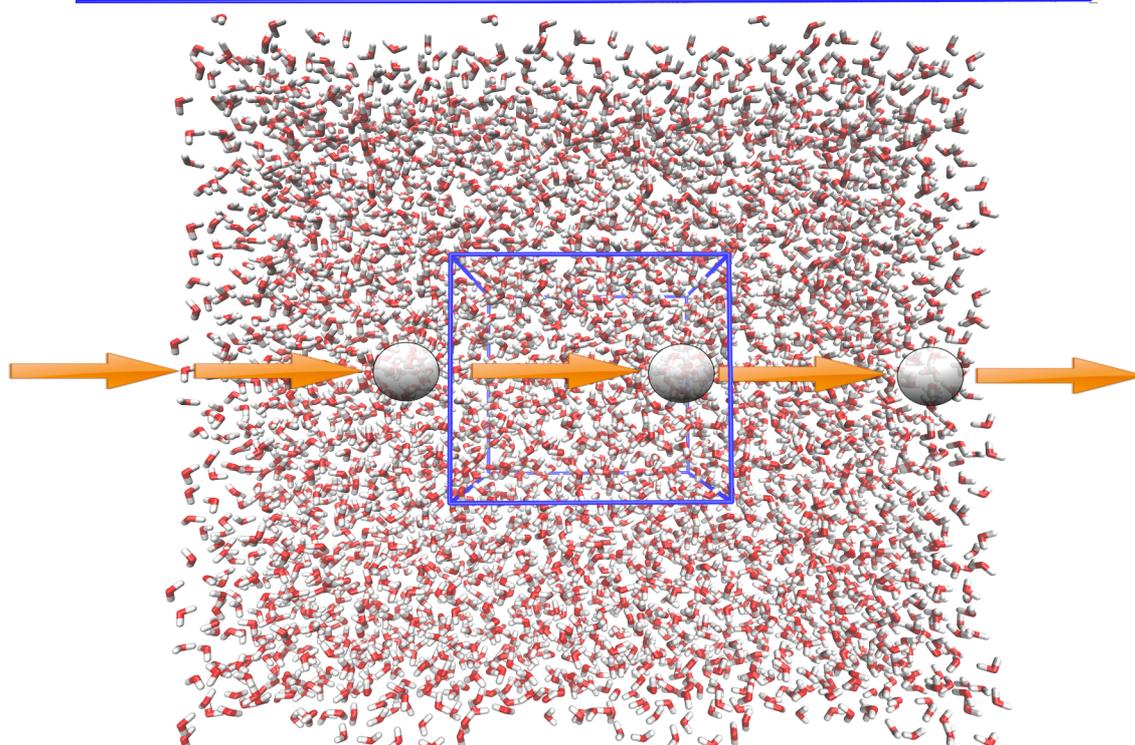
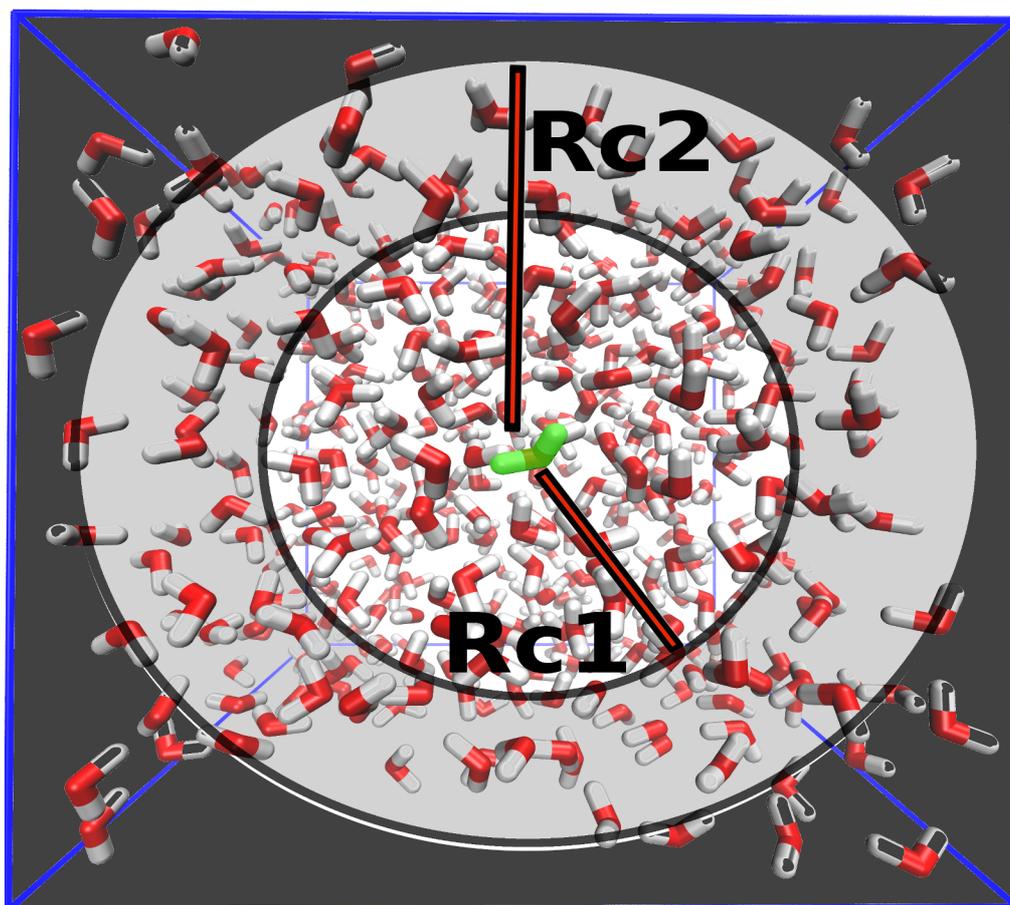
O modelo computacional usado para as águas foi o SPC (“single point charge”)<sup>167</sup>.

Todos os sistemas foram inicialmente minimizados energeticamente por cerca de 2000 a 3000 passos usando o algoritmo “steepest descendent” (calcula um mínimo local próximo para a

energia potencial do sistema), com todos os átomos pesados restringidos harmonicamente com uma força de  $10^3 \text{kJ/mol nm}^2$ . O comprimento de ligação de hidrogénios foi constringido nos lípidos através do algoritmo "LINCS"<sup>168</sup>, e nas águas com o "SETTLE"<sup>169</sup>, estes algoritmos tentam fixar os comprimentos de ligação de hidrogénios a outros átomos (H-C; H-O; H-N), conferindo menos graus de liberdade ao sistema o que permite um passo de integração maior.

As interações eletrostáticas são, em geral, a porção que mais consome os recursos computacionais em MD<sup>170</sup>, e com o aumento do número de cargas no sistema estas interações aumentaram o quadrado desse número, podendo tornar os cálculos bastante demorados. Assim os primeiros protocolos de simulações aplicavam raios de corte ("cut-off's"), onde eram ignoradas as interações eletrostáticas após essa distância de corte que atuam sobre cada partícula (ver Figura 2.2). No entanto, esta aproximação introduz descontinuidade energética no sistema que pode levar a simulações instáveis, e devido a esse facto são usualmente aplicados esquemas de corte menos abruptos. Nas simulações deste trabalho foi aplicado o método de corte "Twin-Range" para o cálculo de interações não ligantes (eletrostáticas e de van der Waals). Este esquema aplica dois raios de corte, no de mais curto alcance são calculadas as interações em todos os passos de simulação, enquanto que entre este e o de longo alcance as interações são calculadas apenas a cada 5 a 10 passos (intervalo de atualização da lista de vizinhos), e entre tais passos são consideradas constantes<sup>171</sup>(ver Figura 2.2). Para este tipo de cálculos, é calculada pelo software de MD uma lista de vizinhos, que consiste de uma lista com os átomos não ligados que estão a uma distância inferior ao raio de corte pré-especificado de determinado átomo. Os cálculos das interações não ligantes para determinado átomo terão apenas em conta a influência dos átomos da sua lista de vizinhos. Esta lista é atualizada ao longo da simulação, com um intervalo de tempo pré-definido, devido ao constante movimento dos átomos no sistema.

Além do esquema de corte "Twin-Range" aplicou-se aos sistemas uma correção "Reaction Field" para as forças eletrostáticas, usando uma constante dielétrica da água de 54<sup>172</sup>. Na correção "Reaction Field" é assumido que após o raio de corte o sistema é tratado como um contínuo dielétrico. Além disso a ocorrência de qualquer dipolo na molécula no interior da esfera de corte induz a polarização do contínuo dielétrico, o qual por sua vez reage interagindo com a molécula (daí a designação atribuída a este método). Esta correção permite uma boa aproximação à ação deste tipo de forças, diminuindo o custo computacional pois grande parte do meio é considerado um contínuo.



**Figura 2.2.** Representação esquemática dos raios de corte aplicados nas simulações (em cima), e das condições periódicas de fronteira (em baixo). O sistema em cima é o mesmo de o de baixo (as linhas azuis delimitam a caixa de simulação), mas em baixo estão incluídas cópias periódicas do sistema (nas direções Y e Z). A bola branca (que representa uma ou várias moléculas), se hipoteticamente se deslocar para a direita terá todas as suas réplicas desviadas igualmente para a direita, e se nesse desvio atingir o limite da caixa de simulação, “saindo” desta, a cópia da bola à esquerda irá “entrar” na caixa do lado oposto, mantendo-se assim o número de partículas no sistema.

Assim foram aplicados às simulações raios de corte de curto e longo alcance de 0,8 e 1,4nm, respetivamente, e a lista de vizinhos era atualizada a cada 5 passos de integração.

A MD não fornece apenas informação da evolução temporal do sistema, pois relaciona-se com a mecânica estatística através da hipótese ergódica, permitindo o cálculo de quantidades termodinâmicas, como a energia livre, através das trajetórias. A hipótese ergódica assume que, em sistemas ergódicos (como os sistemas químicos e biológicos em geral), a média temporal de variáveis microscópicas equivale às médias dos *ensembles* correspondentes<sup>173</sup>. Um *ensemble* ou amostra (com conotação estatística) corresponde a um conjunto de inúmeras cópias de um sistema, onde cada uma dessas cópias descrevem um possível estado (conformação do sistema e respetiva energia) de tal sistema. Assim, de forma simplificada a hipótese ergódica diz que a análise de uma molécula ao longo do tempo equivale à análise de um conjunto dessas moléculas (*ensemble*) num instante.

No final da minimização de energia dos sistemas procedeu-se a uma simulação no *ensemble* canónico ou NVT onde o número de átomos (N), o volume (V) e a temperatura (T) permanecem constantes, o que é bom para início de equilíbrio do sistema pois a não existência de um baróstato permite menos perturbações do mesmo. As simulações NVT foram realizadas por 0,05 a 0,2ns com uma força constante de constrangimento harmónica de  $10^3 \text{kJ/mol nm}^2$  para todos os átomos pesados. De seguida os sistemas eram sujeitos a simulações no *ensemble* isotérmico-isobárico ou NPT onde o número de partículas (N), a pressão (P) e a temperatura (T) são constantes ao longo do tempo. Este *ensemble* deve ser aplicado quando as condições de pressão, temperatura e densidade são importantes, como no de simulações de sistemas biológicos. Neste caso, o tempo de simulação variou entre 0.05 a 1ns e os átomos pesados eram restringidos com a mesma constante de força anterior. Estas simulações com constrangimentos aplicados a determinados átomos, terminavam neste ponto para sistemas de apenas membranas em solução. No entanto, os sistemas de péptidos em solução e péptidos e membranas em solução foram sujeitos a mais uma simulação NPT onde, neste caso, era aplicada a constrição, com a mesma constante de força anterior, mas apenas aos carbonos alfa do péptido (ao invés de a todos os seus átomos pesados) e aos átomos pesados da bicamada lipídica (como nos casos anteriores). As corridas de iniciação nos *ensembles* NVT permitem que o sistema atinja a temperatura alvo, enquanto que as simulações NPT permitem que o sistema atinja a densidade correta. Estas duas ou três corridas, bem como a minimização de energia inicial, servem como inicialização, permitindo um equilíbrio lento das estruturas nos sistemas simulados, para depois se proceder às simulações de interesse sem restringimentos, o que permite iniciar estas simulações sem artificios estruturais (como por exemplo estruturas muito compactas devido a artefactos nos modelos tridimensionais provenientes de cristalização) que de outra forma

poderiam comprometer as simulações (simulações mal equilibradas podem em poucos passos colapsar ou originar estados artificiais).

Para os *ensembles* serem os desejados eram aplicados termóstatos nos *ensembles* NVT e NPT, e baróstatos nos *ensembles* NPT. O controlo da temperatura foi conseguido através do uso do termóstato "V-rescale" ("velocity-rescaling")<sup>174,175</sup> com uma constante de acoplamento de 0,1ps, e por sua vez o baróstato de "Berendsen"<sup>174</sup> foi usado para manter a pressão constante com um tempo de relaxamento de 0,5ps e uma compressibilidade de  $4,5 \times 10^{-5} \text{bar}^{-1}$ , sendo isotrópico (o baróstato neste caso aplica a compressibilidade de forma igual em todas as direções da caixa de simulação) para simulações de péptidos em solução, e semi-isotrópico para membranas e membranas com péptidos em solução (neste caso apenas as direções *X* e *Y* (plano da membrana) são acopladas em conjunto, sendo a compressibilidade na direção *Z* (plano normal à membrana) controlada separadamente).

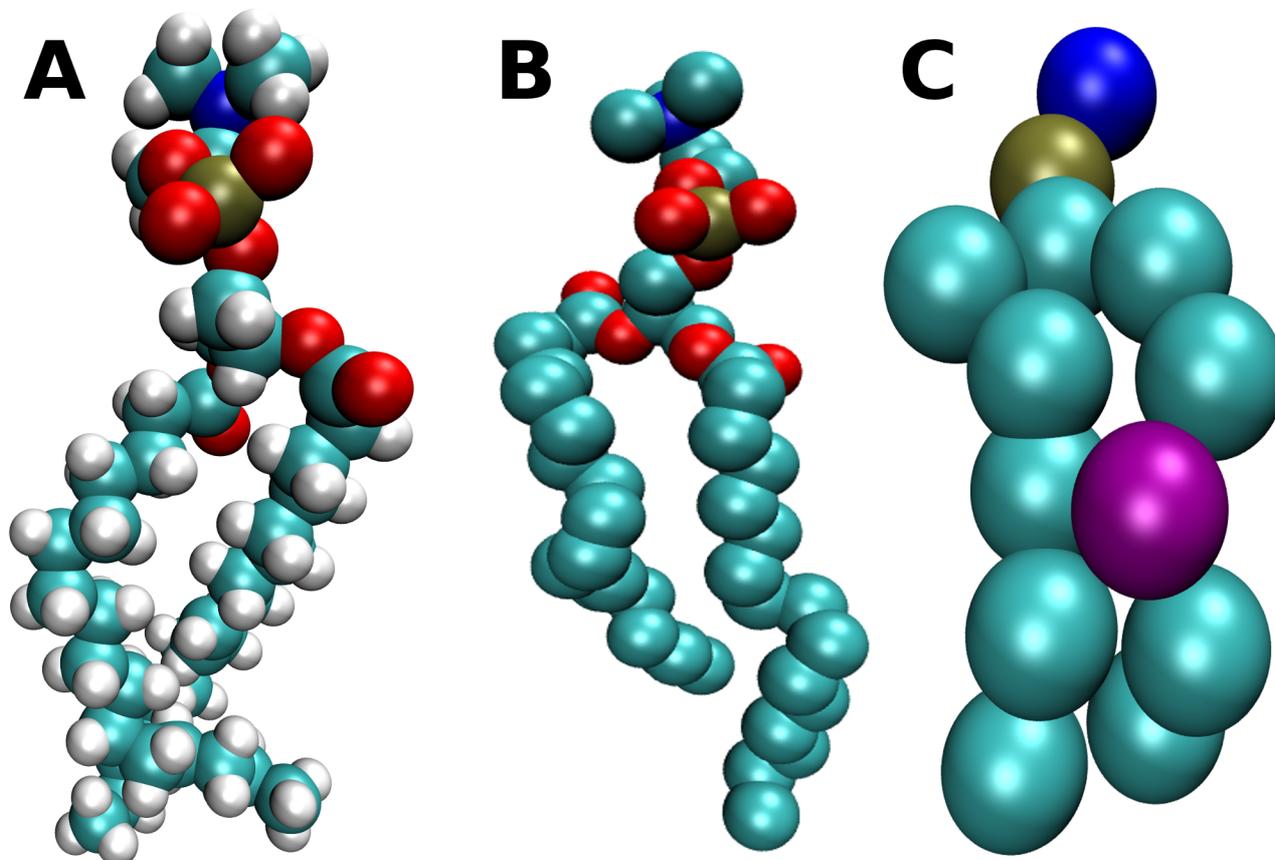
Após as simulações de minimização/equilíbrio procedeu-se à extensão das simulações sem restrições, em condições NPT, por tempo variável (tempo necessário para o sistema não mostrar evolução significativa).

### 2.1.3. Simulações "Coarse Grained"

Como já foi referido, um campo de forças consiste em um conjunto de parâmetros e equações que descrevem as interações entre átomos ou partículas. Os níveis de detalhe dos diferentes FF variam, assim existem FF classificados como "all-atom" (todos os átomos), "united-atom" (átomos unidos) e "coarse-grained" (granulação grosseira). Os FF "all-atom" possuem o maior detalhe na descrição dos sistemas pois tratam cada átomo deste de forma explícita (a cada átomo do sistema a simular corresponderá uma esfera no modelo computacional). FF "united-atom" combinam cada carbono alifático (carbonos de sequências de hidrocarbonetos não aromáticos) com os seus hidrogénios ligados numa única partícula no modelo computacional (um grupo CH<sub>3</sub> em vez de ser representado computacionalmente por três esferas de hidrogénio ligadas a uma de carbono será representado apenas por uma esfera com características que representam tal grupo, esta esfera terá por exemplo um raio maior que uma esfera de carbono ou mesmo uma esfera para um grupo CH<sub>2</sub>). Os FF com menor detalhe são os "coarse-grained" onde unidades moleculares como aminoácidos e águas são tratadas como partículas singulares<sup>176</sup>. Na Figura 2.3 estão representados os modelos de um lípido descritos pelos três tipos de campos de forças discutidos.

O campo de forças GROMOS96 43a1-S3, usado nas simulações anteriores, pertence à classe "united-atom". Este tipo de FF permite um ganho computacional elevado em simulações com vários

lípidos, como em membranas (permite uma redução de cálculos por um factor de 4 em comparação com um campo “all-atom”. Exemplificando as nove interações dos hidrogénios entre dois grupos metil são reduzidas para uma.



**Figura 2.3.** Representação do modelo computacional do lípido de POPC em FF “all-atom” (A), “united-atom” (B) e “coarse-grained” (C). Nesta dissertação foram usados os modelos “united-atom” (simulações com o FF GROMOS96 43a1-S3) e “coarse-grained (FF MARTINI).

FF “coarse-grained” com a sua grande redução de detalhe da descrição dos sistemas tornam as simulações extremamente mais rápidas, permitindo atingir escalas de tempo superiores bem como simular sistemas maiores. No entanto, essa perda de detalhe é também a sua maior desvantagem, pois existem processos que dependem de mecanismos ao nível do detalhe perdido, o que resulta assim também na impossibilidade de simular esses processos. Apesar de tudo, este tipo de simulações tem vindo a aumentar de popularidade, pois com a otimização destes FF essa perda de informação tem sido cada vez menor e a aproximação dos resultados das simulações com dados experimentais é cada vez maior. Devido à melhoria destes FF e aliado ao facto de, experimentalmente, o tempo requerido para a translocação de alguns MAPs através de membranas ser da ordem de minutos<sup>95</sup> (o que ultrapassa em muito as escalas de tempo acessíveis por simulações), consideramos pertinente efetuar também simulações da interação do péptido LE10 com uma bicamada de POPC e COL com o FF “coarse-grained” MARTINI<sup>177</sup>. O FF MARTINI foi escolhido por ter um espírito semelhante ao GROMOS na sua parametrização, pois assenta numa

extensiva calibração de acordo com dados termodinâmicos como coeficientes de partição óleo/água<sup>177</sup>. Além disso o procedimento e parâmetros a definir com o MARTINI são equivalentes aos usados nas simulações com o GROMOS, pois ambos os FF são usados com o pacote GROMACS. O MARTINI tem sido bastante usado em vários tipos de simulações com resultados muito satisfatórios<sup>177</sup>. A descrição do procedimento usado será breve, pois a realização destas simulações saem do âmbito principal desta dissertação, permitindo no entanto avaliar se a realização do tipo de estudo proposto (interação de MAPs com membranas lipídicas) é viável com este tipo de FF.

Para a realização das simulações o modelo da membrana de POPC e COL (60-40% mol) foi construído novamente com o software CELLmicrocosmos 2.2, usando neste caso os modelos “coarse-grained” destes lípidos fornecidos com o FF (<http://md.chem.rug.nl/cgmartini/>). O modelo do péptido LE10 foi obtido através do script “Martinize” (script para gerar ficheiros de topologia e estrutura de proteínas usando ficheiros de estrutura atomísticos, também é fornecido com o FF no seu site), usando o modelo criado para as simulações “united-atom”. Após a obtenção dos modelos “coarse-grained”, a membrana e o péptido foram simulados com água como solvente (cerca de 100ns para a membrana e 50ns para o péptido) e, posteriormente, quatro péptidos foram adicionados a uma caixa de simulação com a membrana de POPC e COL, depois preenchida com água para a simulação da interação do péptido com a membrana por cerca de 300ns.

Todas as simulações foram efetuadas com o GROMACS 4.0, usando o FF MARTINI 2.1 e condições PBC.

O tempo de integração usado foi de 20fs para o péptido e membrana em água, e de 30fs para a simulação dos péptidos com a membrana em água. Todos os sistemas foram inicialmente minimizados energeticamente por cerca de 800 passos com o algoritmo “steepest descent”. O termóstato de Berendsen<sup>174</sup> foi usado para manter a temperatura a 323K, com uma constante de acoplamento de 0,3 ps, enquanto que o baróstato de Berendsen manteve a pressão a 1bar, com um tempo de relaxamento de 0,3 ps e uma compressibilidade de  $3 \times 10^{-5} \text{bar}^{-1}$ , sendo como nas simulações “united-atom” isotrópico para a simulação do péptido LE10 em água e semi-isotrópico para as simulações envolvendo a membrana.

## **2.2. Estudos Laboratoriais**

Nas simulações de MD o péptido LE10 foi o que mostrou uma interação mais pronunciada com as bicamadas lipídicas, o que se traduzia num efeito muito claro. Para os estudos laboratoriais a seguir descritos foi utilizado então esse péptido, devido a mostrar o efeito mais dramático, sendo assim em princípio menos difícil validar ou não os resultados computacionais. Assim nos laboratoriais apenas o péptido LE10 foi usado, com exceção de um dos testes antimicrobianos onde também se empregou o péptido LK10. As razões do uso destes péptidos estão devidamente justificadas no decorrer do capítulo dos resultados e discussão.

Para a validação dos resultados de MD, e para um maior entendimento dos mecanismos de ação de MAPs, foram inicialmente usados lipossomas, de composição semelhante à composição das membranas empregues nas simulações, que foram incubados com LE10. A interação do péptido com os lipossomas foi primeiramente avaliada por técnicas de espalhamento de luz dinâmico (do Inglês “dynamic light scattering”, DLS), avaliando as variações de tamanho, potencial zeta ( $\zeta$ ) e polidispersividade (PDI). A incubação dos lipossomas com LE10 serviu também para estudos de espectrofotometria (cinéticas e espectros de fluorescência), e de microscopia (visualização da evolução temporal da incubação de lipossomas gigantes com LE10), pois os lipossomas foram produzidos com a inclusão da sonda fluorescente e hidrofóbica *Nile Red* (NR). Por fim, foram realizados testes com células de fibroblastos humanos e micro-organismos (bactérias e leveduras) para avaliar a citotoxicidade induzida pelo péptido (nos testes antimicrobianos o péptido LK10 também foi utilizado pois possui carga positiva e em estudos com péptidos de apenas leucina e lisina obtiveram-se péptidos com elevado poder antimicrobiano).

### **2.2.1. Ensaio com Lipossomas**

Os péptidos LE10 e LK10 foram sintetizados pela empresa GenScript USA Inc. (de New Jersey, EUA). O lípido fosfatidilcolina de lecitina de ovo (EPC, do Inglês “egg phosphatidylcholine”) foi adquirido à Lipoid (Alemanha), o COL ( $C_{27}H_{46}O$ ) à Sigma (Espanha) e a sonda fluorescente Nile Red ( $C_{20}H_{18}N_2O_2$ ) à Invitrogen (Espanha). As aquisições dos espectros e cinéticas de fluorescência foram realizadas num espectrofluorímetro “Synergy Mx” da BioTek (Alemanha). A aquisição da cinética de fluorescência do NR foi realizada a 25°C durante 2 horas com um comprimento de onda (CDO) de excitação de 495nm. A leitura do espectro de

fluorescência foi efetuada também a 25°C, no intervalo de 500 a 700nm, com 495nm como CDO de excitação, pouco tempo depois da incubação do péptido LE10 com os lipossomas.

O tamanho, PDI e  $\zeta$  dos lipossomas foram medidos usando um “zetalyzer” “Nano Series” da Malvern (Inglaterra), a 25°C. Os lipossomas foram visualizados com recurso a um microscópio de epi-fluorescência “DM500 B” da Leica Microsystems (Alemanha), com uma lâmpada de mercúrio de 100W e com parâmetros para os filtros apropriados. As imagens digitais foram adquiridas com uma câmara digital “DFC350 FX” usando o software “Leica Microsystems LAS AF” versão 2.0.

Todos os lipossomas foram preparados na proporção de 60% de EPC e 40% de COL (mol:mol), com NR, através do método de hidratação de filme lipídico, para uma concentração final de 3000 $\mu$ M de lípidos e 3 $\mu$ M de sonda NR (0,1% de concentração final). O método de hidratação de filme lipídico consiste no uso de clorofórmio (98,9%) para dissolver os lípidos e NR, sendo a solução evaporada num evaporador rotativo durante aproximadamente 2 horas e, posteriormente, numa bomba de alto vácuo (para evaporar completamente a solução remanescente). Por fim o filme lipídico depositado no fundo do balão volumétrico foi hidratado com 15mL de água com agitação vigorosa seguido de 1 a 2 segundos de banho de ultra-sons para uma hidratação completa.

O resultado deste método é uma dispersão de vesículas multi-lamelares, que foi usada diretamente ou foi extrudida, de acordo com os testes a realizar. Para obter uma população de lipossomas grandes o suficiente para serem observados no microscópio de fluorescência, a dispersão anterior foi usada diretamente. Para evitar possíveis problemas com a fluorescência (como fluorescência inespecífica) parte da dispersão foi usada apenas depois de filtrada através de uma coluna de filtração (“PD-10 Desalting Column” contendo 8,3mL de “Sephadex<sup>TM</sup>” da GE Heltcare), obtendo-se assim uma população de vesículas com teor reduzido de NR em excesso na solução.

Para obter uma população homogénea de lipossomas parte da dispersão anterior foi extrudida cerca de 20 vezes através de uma membrana de poli-carbonato com um diâmetro de poros de 100nm, num extrusor “Mini-Extruder” da Avanti.

Para avaliar as características de interesse (tamanho, PDI,  $\zeta$ , fluorescência, cinética e imagem) com e sem incubação com LE10, as diferentes soluções de lipossomas obtidas eram diluídas de uma solução padrão de 3000 $\mu$ M para 500 $\mu$ M na solução final, tendo em conta o volume necessário da solução padrão do péptido (300 $\mu$ M de LE10 em água), para uma concentração final de 3, 30 e 300 $\mu$ M de péptido.

### **2.2.2. Ensaio *In Vitro***

Para avaliar a interação do péptido LE10 com membranas de células de mamíferos foram realizados os testes de integridade membranar e de viabilidade metabólica em fibroblastos humanos cultivados *in vitro*. A linha celular BJ5ta, uma linha de fibroblastos de prepúcio imortalizados via h-TERT (“human-telomerase reverse transcriptase”), foi adquirida à ATCC através da LGC Standards, e foi mantida de acordo com as recomendações do fornecedor. O meio de cultura usado era composto de uma mistura 4:1 de DMEM (“Dulbecco's Modified Eagle's Medium”) e Meio 199, tendo a mistura como suplementos soro fetal bovino (10% (v/v)), higromicina B (10µg/mL) e uma solução dos antibióticos penicilina e estreptomicina (1% (v/v)). O meio DMEM em pó, contendo L-glutamina (4mM) e glucose (4,5 g/L), foi previamente reconstituído com a adição de bicarbonato de sódio para uma concentração final de 1,5 g/L. O soro fetal bovino foi adquirido à Lonza (Walkersville, Inc, Maryland, EUA), o meio de cultura e restantes suplementos à Sigma-Aldrich (Buchs, Suíça).

As células foram cultivadas a 37°C numa atmosfera humedecida com 5% de CO<sub>2</sub>. A incubação com LE10 foi efetuada um dia depois do plaqueamento dos fibroblastos numa placa de cultura (TPP, Suíça) de 24 poços (55000 células/poço). O péptido foi solubilizado em água e esterilizado através de filtração, e depois diluído no meio de cultura para concentrações de 3 e 300µM. As células foram incubadas em duplicado com 500µL de cada diluição do péptido durante 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para os testes de citotoxicidade, as células incubadas com dimetilsulfóxido (DMSO, 30%) serviram como controlo positivo (o DMSO é extremamente tóxico para as células, provocando a sua morte), e células sem tratamento foram consideradas como controlo negativo. A citotoxicidade do péptido LE10 foi então avaliada através da medição da viabilidade metabólica dos fibroblastos pelo ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e através da medição da integridade membranar pelo ensaio da perda da lactato desidrogenase (LDH).

### **2.2.2.1 Ensaio do MTT**

O ensaio do MTT baseia-se na quantificação do dano induzido pelos compostos a estudar no metabolismo celular através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais<sup>178</sup>. Na realidade, o que se avalia é a viabilidade mitocondrial, que se relaciona diretamente com a viabilidade celular, sendo essa avaliação feita através da quantificação da redução do sal MTT (sal amarelo solúvel em água) a formazano (sal roxo insolúvel em água) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH. A redução do MTT leva à formação de cristais de formazano intensamente coloridos no interior das células, que podem ser observados ao microscópio, ou dissolvidos com

solventes orgânicos como o DMSO para quantificação através de espectrofotometria. A redução do MTT traduzida na formação dos cristais será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e viabilidade celular. Compostos que afetem a viabilidade celular levam à uma menor taxa de redução do MTT e conseqüentemente a formação de cristais de formazano diminuirá, o que se reflete nos resultados de espectrofotometria.

Depois de um dia de exposição dos fibroblastos ao péptido, uma solução de MTT (50µL, 5mg/mL) foi adicionada a cada poço de cultura, sendo então a placa de cultura incubada mais duas horas nas condições já descritas. No fim da incubação, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se uma mistura de DMSO e etanol (500µL, 1:1 (v/v)). Depois da solubilização completa dos cristais de formazano, a solução resultante (150µL) foi transferida para uma placa de 96 poços e a absorvância foi lida a 570nm e 690nm num espectrofotômetro leitor de micro-placas. A viabilidade celular relativa foi calculada tendo o controlo negativo como referência.

#### **2.2.2.2. Ensaio da LDH**

A enzima solúvel LDH é muito abundante e estável no citoplasma de vários tipos de células. A existência de danos na membrana celular ou lise, leva à libertação da enzima para o meio circundante, pelo que a LDH é usada para a avaliação da integridade membranar e conseqüente citotoxicidade medindo a sua actividade<sup>179</sup>. A LDH catalisa a reação da formação de lactato e NAD<sup>+</sup> (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) através de piruvato e NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido), sendo a atividade catalítica da enzima avaliada com o desaparecimento do NADH por espectrofotometria.

Para determinar a concentração da LDH no meio extracelular, o meio de cultura foi recolhido e mantido a -80°C até à altura da quantificação. As células foram lisadas usando o tampão tris(hidroximetil)aminometano (TRIS, 15mM). O lisado foi recolhido e mantido a -80°C até quantificação. A atividade da LDH foi quantificada pela diminuição da absorvância do NADH a 340nm durante 3 minutos a 30°C, usando um leitor de micro-placas. O volume final de reação (300µL) consistia em NADH (250µM) e piruvato (280µM) em tampão fosfato de pH 7,4 (50mM). Para medir a atividade intracelular da LDH foi usado o lisado celular (45µL), enquanto que para a atividade extracelular se usou o meio de cultura (90µL). A percentagem de LDH libertada para o meio extracelular foi expressa como a relação entre a atividade da LDH extracelular e a sua atividade total.

### **2.2.2.3 Testes Antimicrobianos**

#### **Testes em Placa de Cultura**

Para determinar a atividade antimicrobiana dos péptidos LE10 e LK10, foram realizados ensaios com microrganismos em meio de cultura sólido em placas de cultura. Para tal, os microrganismos foram repicados da coleção da Universidade do Minho e colocados a crescer em meio de cultura líquido, meio Müeller-Hinton para as bactérias e o meio YEPD para leveduras, numa estufa a 37°C para bactérias e numa outra estufa a 30°C para as leveduras. Quando os microrganismos atingiram a fase exponencial de crescimento (2 dias após o início do cultivo) foi lida a sua densidade ótica e a sua concentração otimizada (para ser equivalente entre microrganismos). Foram novamente repicados para o mesmo meio de cultura, mas com teor reduzido em agar (0,5% para bactérias e 0,7% para leveduras), em placas de cultura que já continham uma camada desse meio de cultura, neste caso com concentrações usuais de agar (1-1.5%). Assim, as placas de cultura ficavam com uma camada inferior de meio de cultura solidificado e uma camada superior menos sólida do mesmo meio.

O cultivo dos micro-organismos em placas com duas camadas de meio de cultura tinha o propósito de facilitar a inserção dos discos de aplicação (discos de celulose onde eram dispensadas as soluções a testar, nos casos em que foram usados), e de homogeneizar a distribuição dos micro-organismos.

As soluções foram dispensadas nos discos de aplicação (150µL), ou sobre poços criados na camada superficial de meio de cultura, e correspondiam às soluções com as diferentes concentrações dos péptidos e aos controlos positivos e negativos. Os controlos positivos corresponderam a culturas expostas ao antibiótico ampicilina (100mg/mL - bactérias) e ao antimicótico higromicina (50mg/mL - leveduras). No controlo negativos foi aplicada água. Previamente à dispensa das soluções estas eram filtradas para evitar problemas de contaminação, no entanto num dos testes também foram incluídas soluções peptídicas não filtradas (para evitar a hipótese de em resultado do processo de filtração a concentração peptídica final ser muito diminuída) As placas eram então colocadas em estufa para o crescimento dos micro-organismos. Dois dias depois as placas foram retiradas e fotografadas para verificar a presença ou ausência de halos de inibição de crescimento.

#### **Testes em Solução**

Os testes em placa são adequados para compostos com elevado poder antimicrobiano. No entanto, testes em solução são bastante mais sensíveis, como se pode verificar no facto de a concentração dos antibióticos usados para controlo positivo ser 1000 vezes inferior em ensaios antimicrobianos em solução em relação aos anteriores. Devido à maior sensibilidade foram realizados ensaios em solução.

Para a sua realização os micro-organismos foram repicados e colocados a crescer tal como nos testes em placa, mas neste caso apenas em meio de cultura de Mueller-Hinton. Quando os micro-organismos atingiam a fase exponencial de crescimento, foi registada a sua densidade ótica e a sua concentração otimizada. Posteriormente foram repicados para placas de cultura de 24 poços e incubados numa estufa com as soluções de diferentes concentração do péptido LE10 (3, 30 e 300 $\mu$ M) e com as soluções controlo. Os controlos positivos e negativos utilizados foram os mesmos dos testes em placa de cultura descritos anteriormente. A concentração de ampicilina e higromicina foi de 0,1mg/mL e 0,05mg/mL, respetivamente. Esta incubação durou 24 horas, durante a qual foram lidos os valores de absorvância em intervalos de 30 minutos até 7h de incubação.

# ***Capítulo 3***

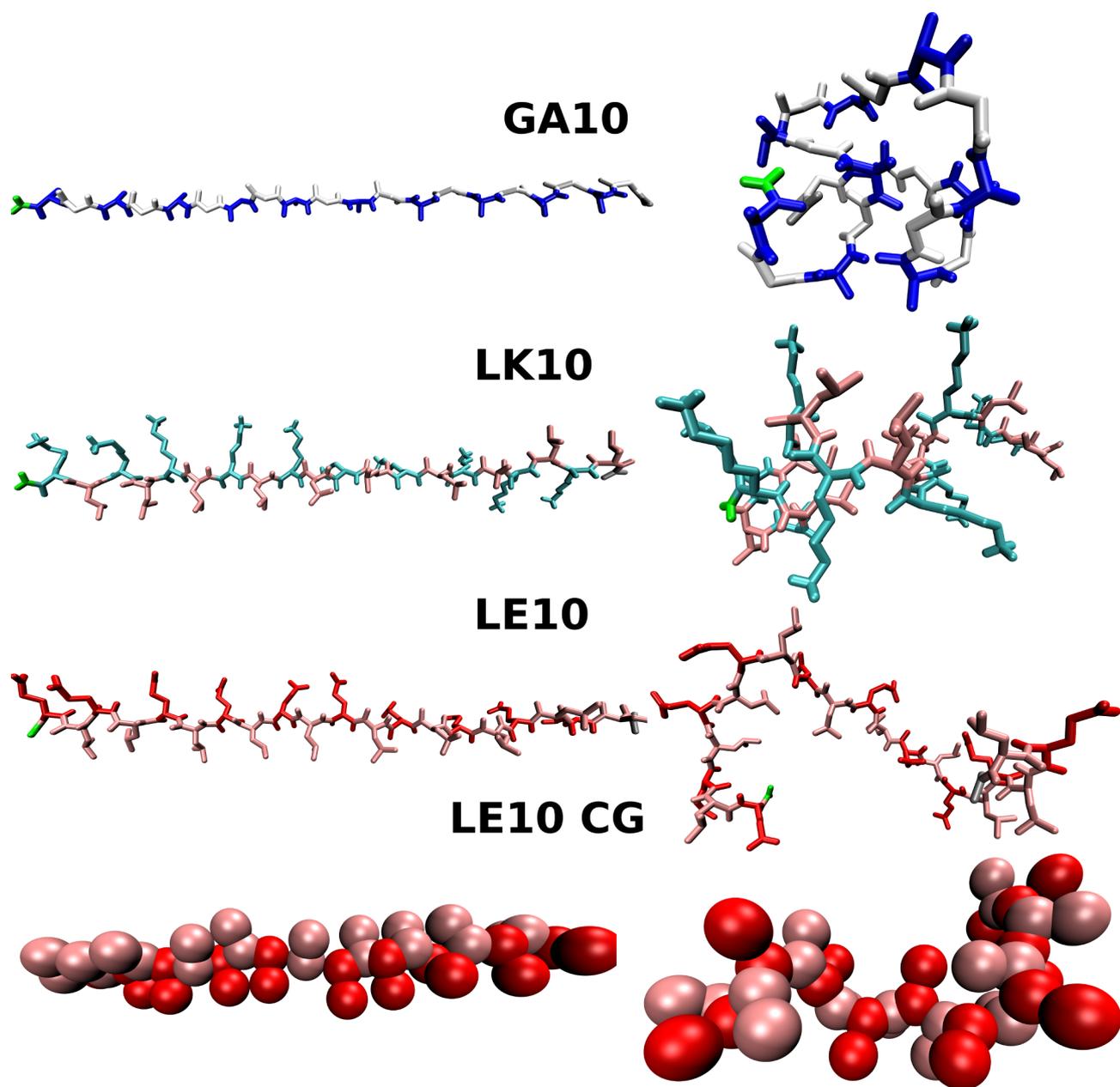
## ***Resultados e Discussão***



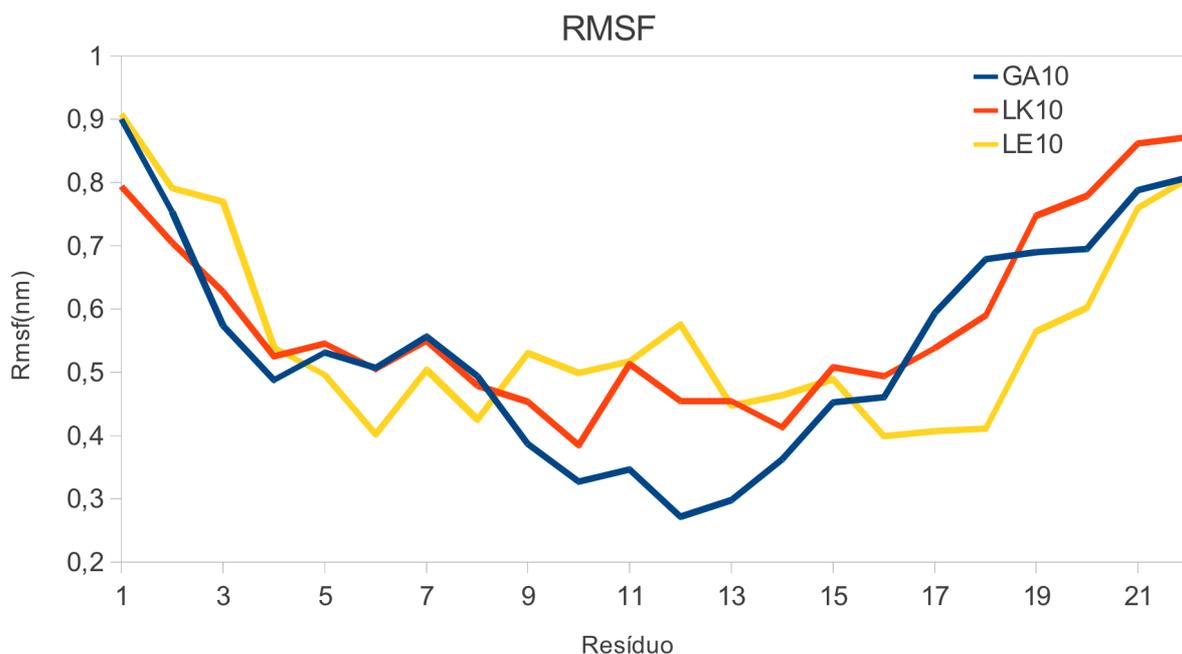
##### **3.1.1. Péptidos**

A construção dos modelos peptídicos no formato PDB foi elaborada com o software Pymol, que simplesmente junta as estruturas dos resíduos constituintes, sendo os modelos resultantes, que estão representados na Figura 3.1, estruturas lineares sem qualquer conformação espacial (estrutura peptídica primária). A conversão dos modelos PDB para gro efetuada pelo programa do GROMACS `pdb2gmx`, teve em conta o campo de forças escolhido, sendo o resultado da conversão as mesmas estruturas lineares, agora em formato gro, e ficheiros de parametrização necessários para a realização das simulações.

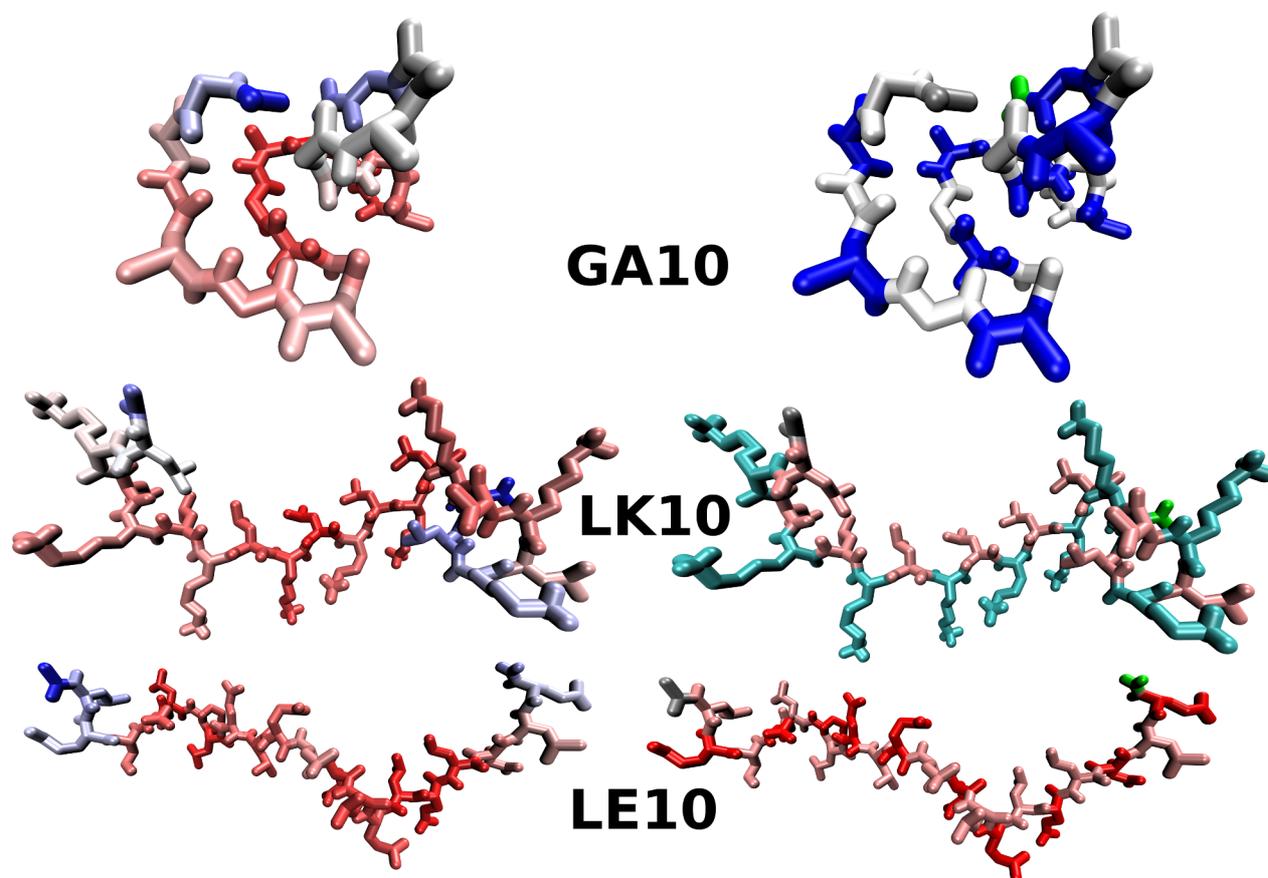
Na Figura 3.1 estão representados os modelos peptídicos antes e depois da simulação MD dos péptidos em água. O modelo “coarse grained” do péptido LE10 não será aqui discutido (ver secção 3.2.4). No final das simulações os péptidos adquiriram conformações estruturais que minimizam a energia total do sistema, sendo a conformação guiada pelas propriedades do mesmo. Os péptidos adquiriram alguma conformação espacial, pois as estruturas iniciais, devido à sua linearidade, eram energeticamente desfavoráveis (todos os resíduos, com os seus grupos polares, apolares, carregados, etc., estavam bastante expostos às moléculas de água). No entanto, como se pode verificar nas imagens, nenhum adquiriu estruturas terciárias (alfa-hélices ou folhas beta), o que é compreensível visto a alternância de resíduos nas sequências peptídicas, o que não permite a agregação de resíduos para a formação desse tipo de estruturas. Este facto também leva a que os péptidos não atinjam conformações estruturais estáveis, mais concretamente que não atinjam uma conformação global que se mantenha ao longo da simulação, o que leva a elevados valores de flutuação do valor quadrático médio (RMSF, do Inglês “root mean square fluctuation”). O RMSF corresponde à diferença média entre todas as partículas e suas posições médias ao longo de determinado tempo. Assim, valores elevados de RMSF indicam variações maiores da partícula ao longo do tempo.



**Figura 3.1.** Representação dos modelos computacionais peptídicos (representação de esferas para o péptido LE10 CG e de esqueleto para os restantes) aquando da sua construção no software Pymol (à esquerda) e depois da simulação MD dos seu comportamento em água (5ns para os modelos “united-atoms” e 50ns para o modelo “coarse-grained”). Código de cores: azul escuro – alaninas; branco – glicinas; roxo – leucinas; azul claro – lisinas; vermelho ácidos glutâmicos.



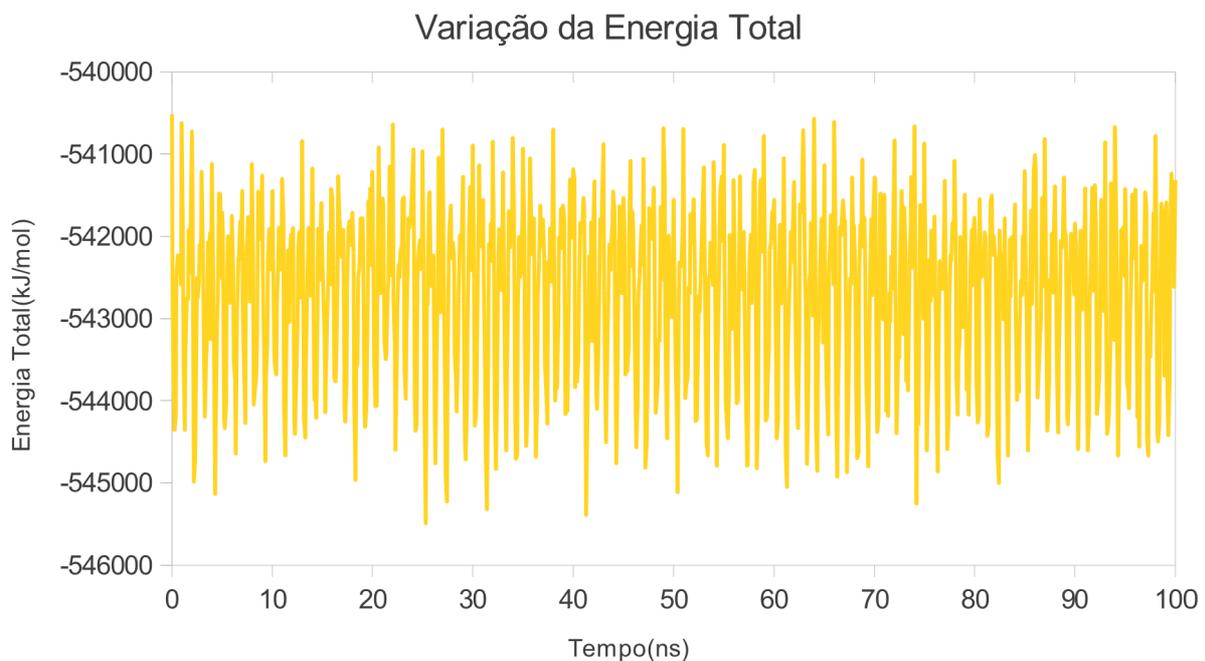
**Figura 3.2.** Valores de flutuação do valor quadrático médio (RMSF) dos péptidos GA10, LK10 e LE10 ao longo de 5ns de simulação. Valores calculados tendo por base toda a estrutura peptídica.



**Figura 3.3.** Representação estrutural dos valores de RMSF (à esquerda) e da conformação final peptídica (à direita) no final das simulações dos péptidos em água. Para as figuras da esquerda cores mais claras como o branco o cinzento e o azul claro indicam resíduos com elevados RMSF, enquanto que cores mais escuras (roxo, vermelho) indicam valores de RMSF menores. O código de cores das figuras da direita é igual ao da figura 3.1. Os péptido estão representados como modelo esqueleto.

Como é possível verificar na Figura 3.2, todos os péptidos apresentam valores elevados de RMSF por resíduo, além do seu padrão de RMSF por resíduo ser semelhante entre os três, sendo os resíduos mais interiores os que apresentam menor flutuação (ver também Figura 3.3). Os três péptidos contêm resíduos hidrofóbicos, mas não se conseguem estruturar de forma a "esconder" esses resíduos da água, o que minimizaria a energia do sistema, pois para cada resíduo não hidrofóbico existe outro hidrofóbico. Daqui resulta que o péptido não consegue rodar ou torcer a sua estrutura de forma a não expor resíduos hidrofóbicos. Por isso, os péptidos estão em constante variação estrutural, o que se traduz em elevados RMSF.

O tempo de simulação de 5ns foi considerado suficiente para a amostragem do sistema, visto a conformação dos péptidos não demonstrar qualquer tendência. Isto foi posteriormente confirmado por uma extensão da simulação do péptido LE10 até 100ns, a qual mostrou que o péptido variava sempre a sua conformação ao longo do tempo, não mostrando nenhuma tendência para um mínimo de energia (ver Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Representação dos valores de Energia total do sistema com o péptido LE10 em água, ao longo dos 100ns de simulação.

### 3.1.2. Modelos Membranares

Depois da construção dos modelos membranares pelo software CELLmicrocosmos, estes eram incluídos em caixas de simulação, nas quais se adicionavam moléculas de água, sendo por fim simulado o seu comportamento para equilíbrio energética e estabilização da estrutura dos lípidos na membrana. Para esta dissertação cinco membranas lipídicas principais foram construídas, quatro modelos de membranas de POPC e COL de diferentes tamanhos (para simplificar serão de aqui em

diante denominados como S para o modelo de menor tamanho, M para o de tamanho intermédio, L para o maior e CG para o modelo “coarse grained”), e um modelo de bicamada de apenas POPC (denominado por P de aqui em diante). Na Tabela 4 estão representadas algumas informações sobre os sistemas membranares simulados.

Sistema	Rótulo aplicado	Tamanho (x:y:z (nm))		Constituintes (n° de moléculas)			Tempo de simulação em água (ns)
		Inicial	Final	POPC	COL	Água	
Membrana pequena de POPC e COL	S	7,4:7,4:13,4	6,6:7,0:14,9	124	84	17524	10
Membrana média de POPC e COL	M	14,2:14,2:10,9	12,5:12,5:11	460	308	47286	10
Membrana grande de POPC e COL	L	26:26:12	-	1344	897	85891	-
Membrana de POPC	P	9,3:9,3:9,3	9:9:10,5	266	-	16913	15
Membrana “coarse grained” de POPC e COL	CG	49,9:49,9:9	36,5:36,5:6,8	3451	2302	103960	100

**Tabela 4:** Descrição dos sistemas membranares simulados e algumas das suas propriedades.

Visualmente e através dos valores da largura do sistema (sensivelmente equivalentes ao comprimento membranar) observa-se claramente que os primeiros modelos de membranas criados no CELLmicrocosmos (modelos S e M) têm uma área por lípido elevada, o que se traduz numa compactação ao longo da simulação em água, o que também aconteceu com o modelo “coarse grained”. Tal não se deveu a limitações do software, apenas à inexperiência no seu uso no caso dos modos S e M, pois os modelos posteriores já mostraram muito pouca compactação (no caso do modelo P a simulação de 15ns não provocou diferenças significativas ao modelo criado no software, em comparação com os modelos anteriores). A compactação observada no modelo CG já pode ser imputada a limitações do software pois, apesar de o mesmo possibilitar a construção de modelos CG, está otimizado para modelos “all-atom” ou “united-atom”. O software mostrou ser extremamente útil, pois permite a criação das membranas muito facilmente usando uma interface gráfica robusta, informativa e intuitiva, com várias opções e vários formatos de saída, permitindo criar um modelo membranar numa questão de minutos com uma conformação já aproximada da resultante da simulação dos lípidos em água.

Note-se que a membrana L não foi simulada sozinha em água, como as anteriores, pois não seria possível simular uma membrana tão grande em água e depois com os péptidos em água em tempo útil para a dissertação, e devido ao facto de o modelo membranar P pouco se ter alterado na simulação em água (os parâmetros aplicados no CELLmicrocosmos foram otimizados). Assim optou-se por simular de imediato o modelo da membrana grande com um e quatro péptidos de LE10

em água, tendo sido esta simplificação efetuada devido à potencial relevância dos resultados.

Os valores da espessura e comprimento membranar ao fim dos cerca de 10ns de simulação das membranas S,M e P em água variavam pouco o que, em conjunto com a pouca variação de valores da energia total calculados (não apresentados), levou a que o tempo simulado fosse considerado adequado para o relaxamento das estruturas.

## **3.2 Simulações da Interação dos Péptidos com as Membranas**

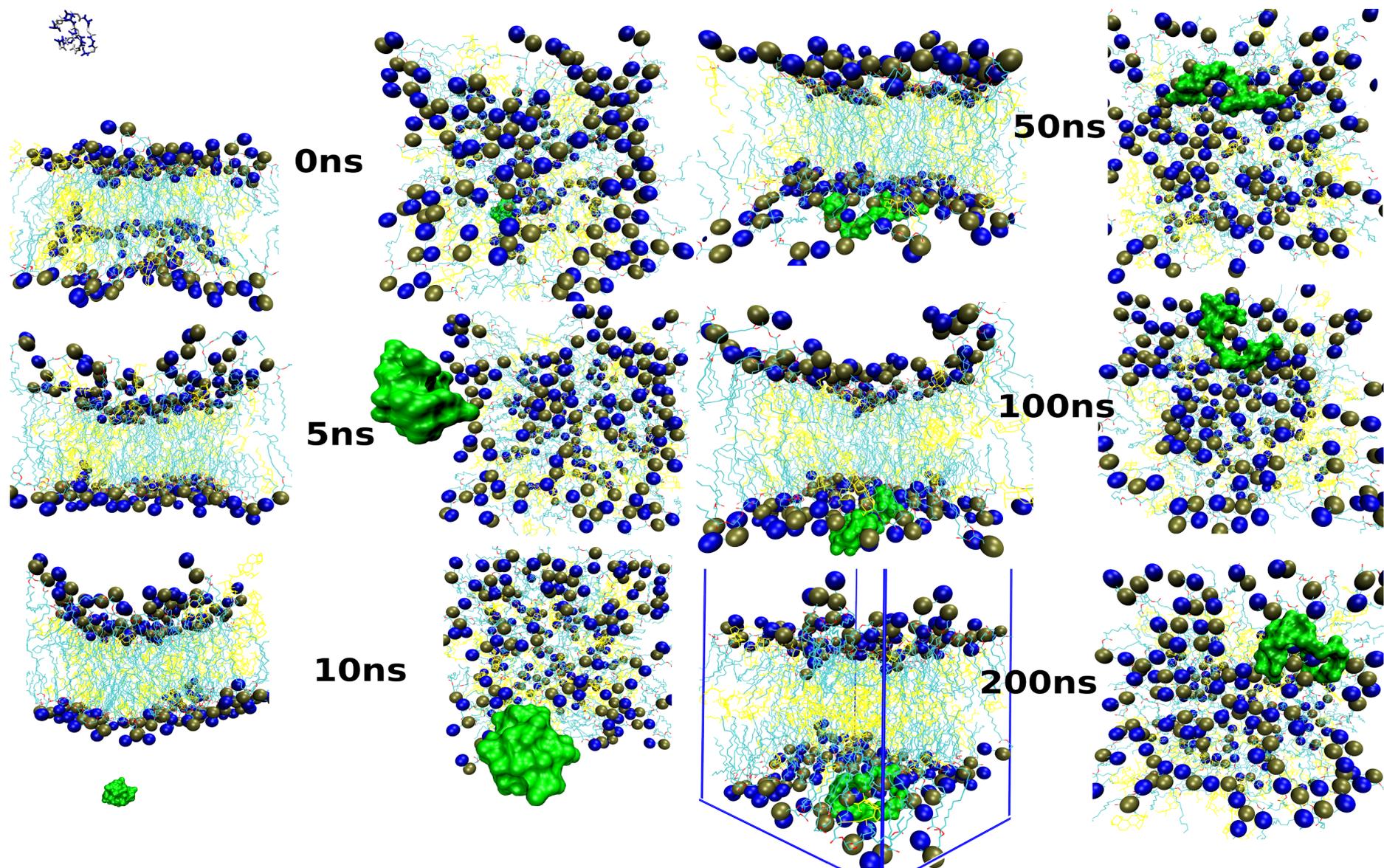
No final das simulações anteriores, foram inseridos numa caixa de simulação os modelos computacionais dos péptidos em conjunto com os modelos membranares, sendo a caixa preenchida com água. Procedeu-se então às simulações da interação dos modelos computacionais dos péptidos e membranas.

### **3.2.1 Simulações com Sistemas S**

#### **3.2.1.1. Interação do Péptido GA10 com a Membrana S**

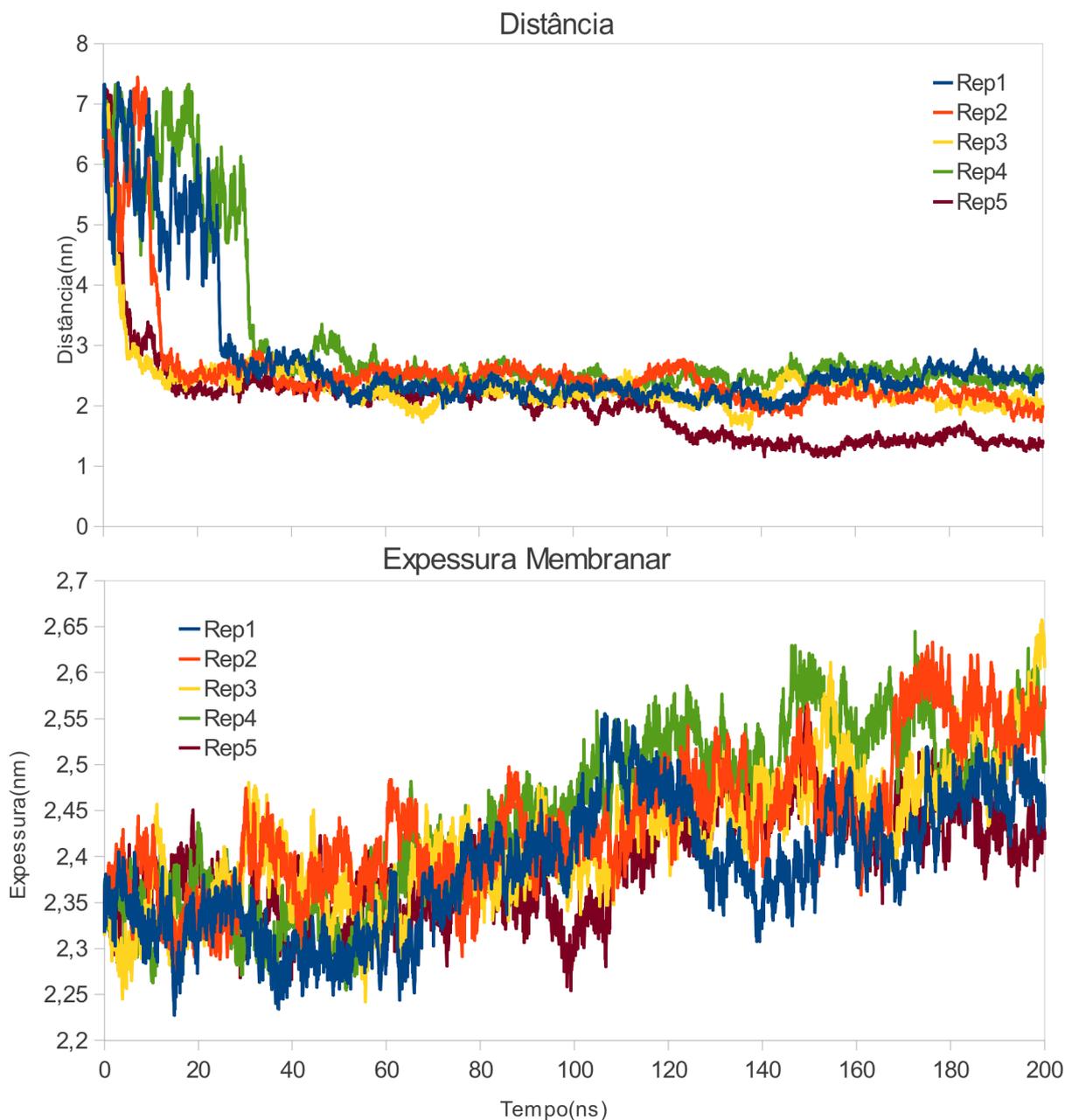
O péptido GA10 é constituído por 10 aminoácidos de glicina e alanina intercalados. Para esta dissertação será considerado como controlo negativo em termos do estudo da influência da carga peptídica nas interações membranares. O comportamento da interação deste péptido com bicamadas lipídicas foi inicialmente avaliado através da simulação do modelo peptídico com o modelo membrana S (sistema GA10\_S, ver Figura 3.5).

Avaliando visualmente o comportamento das simulações deste péptido com o modelo S, o primeiro facto perceptível é que não existe nenhuma atracção ou repulsão significativa entre o péptido GA10 e a membrana de POPC e COL (ver Figura 3.5). Este facto leva a que, apesar de em todas as réplicas o péptido ter sido colocado à mesma distância da membrana, este contacte com ela a diferentes tempos em cada réplica, devido às diferentes direções da deriva do péptido em cada uma, o que é evidente na análise gráfica da Figura 3.6. Além disso, nas réplicas 2, 3 e 4 o péptido vai ao encontro do folheto lipídico superior da bicamada, enquanto as réplicas 1 e 5 vão ao encontro do folheto inferior, pois as PBC assim o permitem (nas réplicas onde os péptidos se dirigem para o limite superior da caixa de simulação vão surgir no limite inferior, mantendo a direção da deriva). O tempo até o GA10 entrar em contacto com a membrana S é mesmo a principal diferença entre as 5 réplicas, sendo o comportamento do sistema ao longo do tempo, no que diz respeito às suas conformações finais, e as propriedades analisadas, globalmente semelhantes.



**Figura 3.5.** Evolução, ao longo de 200ns, da simulação da réplica nº 3 do sistema GA10\_S. Representação frontal (esquerda) e de topo (direita) de cada estado. O código de cores e tipo de representação são iguais à Figura 2.1 (com exceção do modelo de esqueleto peptídico, no 1º estado, que foi representado tal como na Figura 3.1). As moléculas de água foram omitidas para uma maior claridade.

Na representação gráfica da distância dos centros de massa (CM) dos péptidos à bicamada lipídica (relativa à normal da membrana, direção Z) da Figura 3.6 é visível uma grande variação nos nanosegundos iniciais, que correspondem à já referida deriva do péptido no solvente. As réplicas 3 e 5 são onde se verifica que o péptido GA10 contacta mais cedo com a membrana (após cerca de 5ns de simulação), a réplica 4 corresponde ao sistema onde o péptido mais tempo leva até contactar com a membrana (só o faz depois de cerca de 32ns), enquanto que as replicas 1 e 2 levaram um tempo intermédio aos anteriores para o contacto entre péptido e bicamada (cerca de 25ns e 12ns para a réplica 1 e 2, respetivamente)



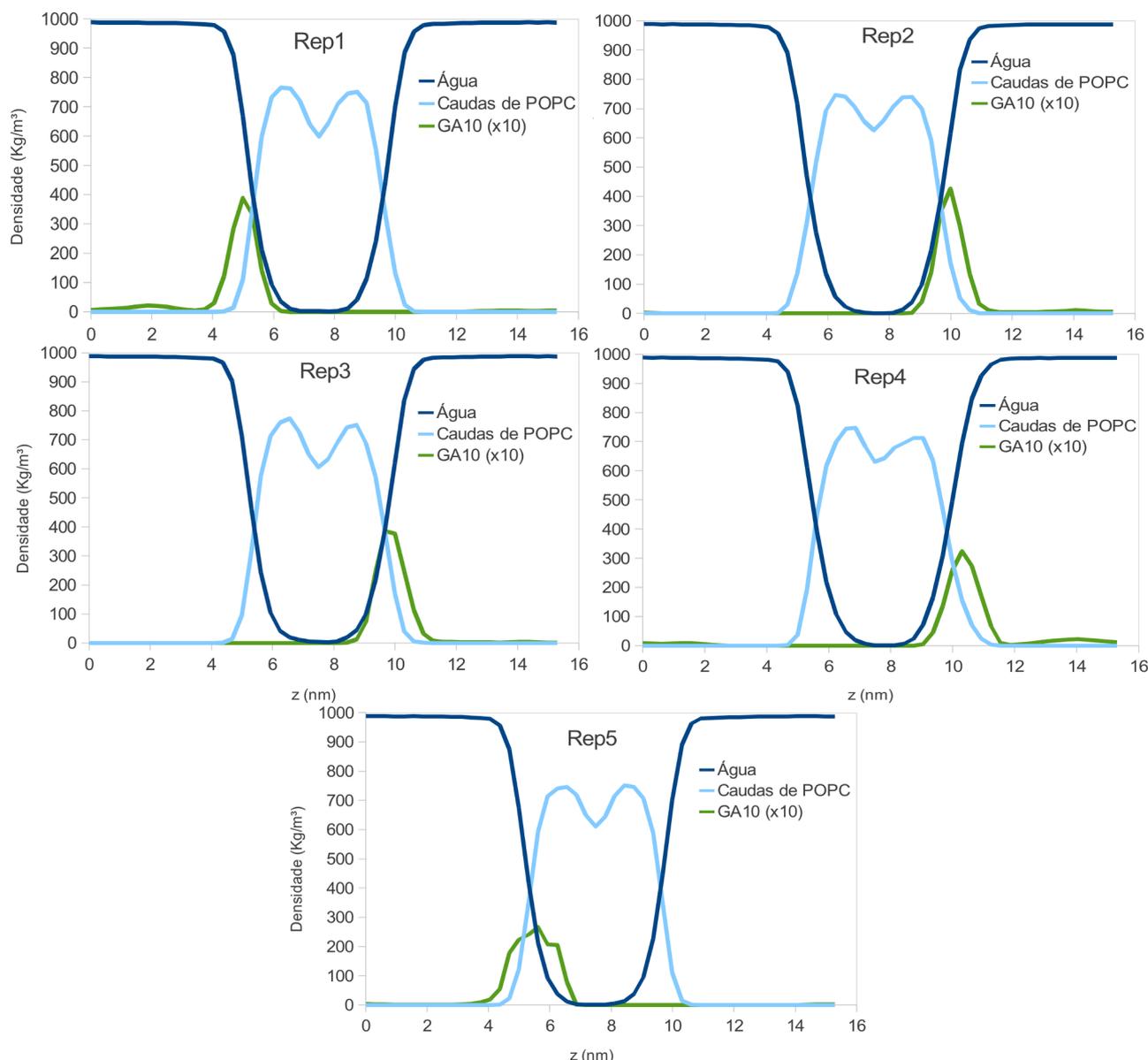
**Figura 3.6.** Valores de distância entre os CM dos péptidos e bicamada lipídica (em cima), e entre os CM dos dois folhetos lipídicos da bicamada (em baixo) para as 5 réplicas da simulação GA10\_S. Os valores são relativos à direção Z dos sistemas.

Posteriormente ao contacto do péptido com a bicamada a distância entre os CM dos dois elementos do sistema simulado mantém-se sensivelmente constante entre valores de 2 e 3nm de distância, à exceção da réplica número 5, que por volta dos 120ns de simulação atinge valores inferiores que se mantêm até ao final da simulação. Os valores médios desta distância, excluindo o tempo de deriva, foram de 2,4(+/- 0,2nm), 2,4 (+/-0,2nm), 2,3(+/-0,2nm), 2,5(+/-0,2) e 1,9(+/-0,5) para as réplicas 1,2,3,4 e 5, respetivamente. Tais valores espelham bem o comportamento acima discutido, tendo os valores médios das 4 primeiras réplicas pouca diferença entre si, com desvios padrão pequenos indicando que a distância entre os CM do péptido e membrana lipídica variava no máximo pouco mais que 2 ångströms. A réplica 5 apresentou uma variação maior da distância, por atingir valores significativamente inferiores.

A análise da espessura membranar mostrou que, relativamente a esta propriedade, a diferença entre réplicas é muito pequena. O comportamento evidenciado em todas as réplicas é semelhante, podendo dividir-se o gráfico da variação da espessura membranar em três zonas. A primeira corresponde aos primeiros 60-65ns de simulação, onde os valores da espessura vão variando entre os 2,25 e 2,45nm (aproximadamente), posteriormente, entre os 60-65ns e os 110-115ns existe uma tendência de aumento em todas as réplicas da espessura membranar e, chegando a tais tempos de simulação, todos os sistemas parecem atingir um *plateau* na variação desta propriedade e os valores de espessura passam a variar entre os 2,35 e 2,6nm (aproximadamente). Este comportamento é provocado pela interação com o péptido GA10, a bicamada expande-se para acomodar a inserção do péptido à sua superfície. Por isso, inicialmente, quando o péptido está difundido na água ou contacta apenas superficialmente com a membrana, a variação da espessura é pequena e estável pois deve-se apenas ao ajuste natural dos lípidos na membrana. No entanto, quando o péptido começa a inserir-se no ambiente lipídico, sensivelmente quando o valor da distância do CM do péptido ao CM da bicamada, anteriormente discutido, se torna inferior a 2,3 nm, atinge-se a fase de tendência do aumento da espessura, pois o péptido começa a ocupar o espaço anteriormente ocupado apenas pelos lípidos POPC e COL. Mais tarde, a espessura volta a estabilizar, devido à máxima inserção do péptido na bicamada. Seguindo tal raciocínio de análise, seria de esperar que a réplica do sistema com menor distância do CM peptídico ao CM membranar fosse a mesma com a bicamada de maior espessura. No entanto, analisando a réplica 5 vê-se que exhibe a menor distância e também a menor espessura (tendo em conta os últimos 80ns de simulação). Tal incongruência deriva dos dados analisados serem referentes a CM e mudanças na distribuição dos átomos levarem ao deslocamento dos mesmos. Como a bicamada não é um paralelepípedo perfeito, apresentando ligeiras curvaturas e lípidos a diferentes alturas na bicamada,

é necessário ter em conta a forma da bicamada e também do péptido, e a réplica 5 apresenta uma curvatura membranar que deve afetar os valores calculados. Além disso a membrana também pode aumentar o seu tamanho longitudinal (pode aumentar o seu tamanho nas direções de  $X$  e  $Y$ ), permitindo menores aumentos de espessura para comportar o volume ocupado pelo péptido. Estes aspetos são conhecidos à priori, mas só agora abordados, mostram que este tipo de estudo que aparenta ser passível de uma análise direta destes resultados, necessita na realidade de uma análise bastante cuidada.

A disposição dos átomos das moléculas de água, das caudas lipídicas de POPC e das moléculas do péptido foi analisada calculando os seus perfis de densidade ao longo da direção  $Z$  (normal à membrana) representados na Figura 3.7.



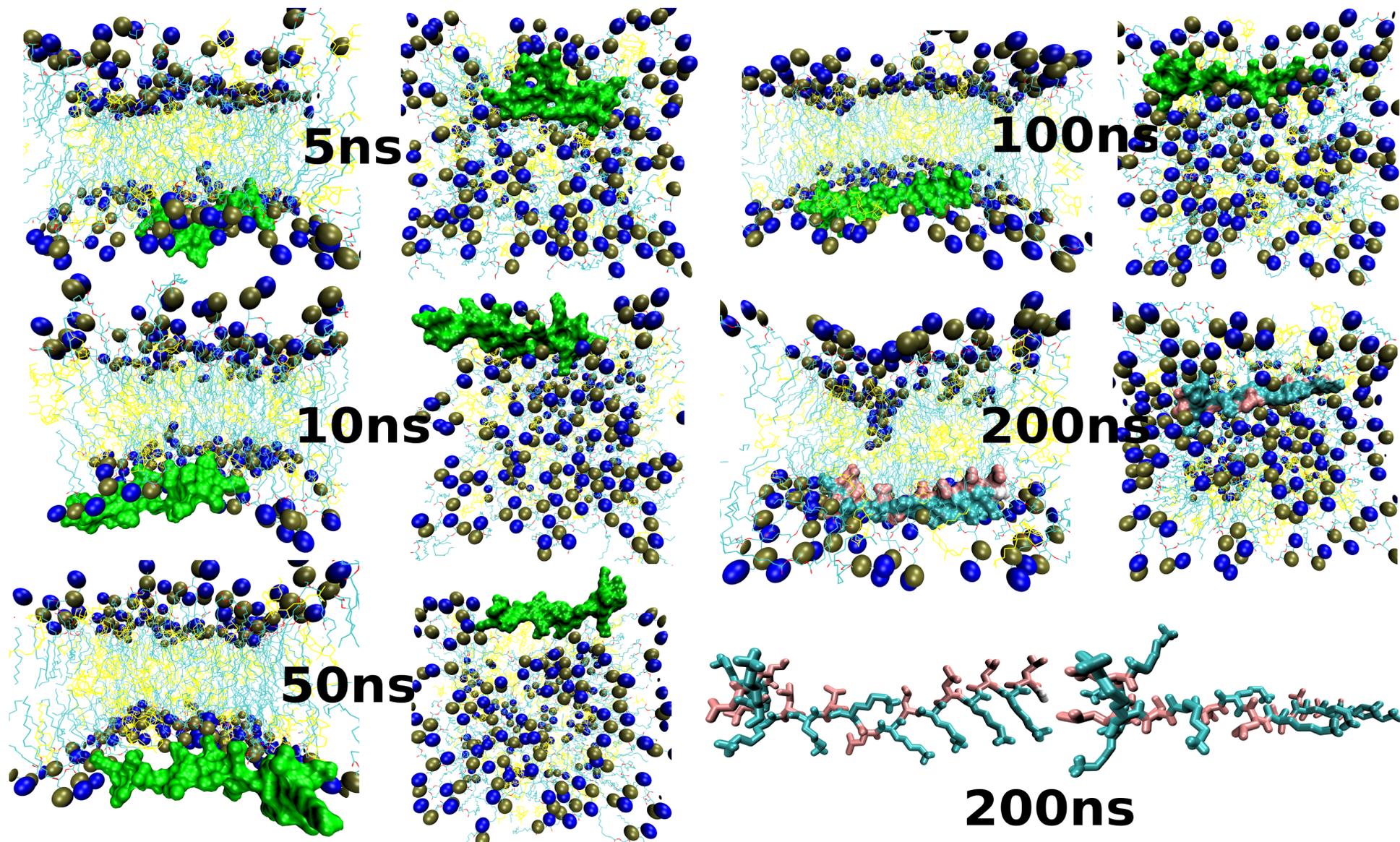
**Figura 3.7.** Perfis de densidade das moléculas de água (azul escuro), das caudas de POPC (azul claro) e do péptido de GA10 (verde). Os perfis são relativos à direção  $Z$  do sistema (0 corresponde ao fundo da caixa de simulação). Os valores relativos às moléculas do péptido foram multiplicados por dez.

Como o número de átomos do péptido GA10 é bastante inferior em relação ao número das outras moléculas analisadas, os seus valores de densidade foram multiplicados por dez, para retirar uma maior informação gráfica dos perfis de densidade (o mais importante nesta análise são as posições relativas dos átomos e não tanto o valor da densidade). Tal como nas propriedades anteriores não existe grande diferença entre as 5 réplicas. A única diferença facilmente perceptível entre as réplicas reside na posição do péptido em relação à membrana. Como tal, para as réplicas 2, 3 e 4 o pico de densidade do péptido está localizado a valores de  $Z$  maiores (os péptidos estão adsorvidos no folheto lipídico superior), e as restantes 1 e 5 a valores de  $Z$  menores (péptidos adsorvidos no folheto inferior). Os perfis de densidade permitem confirmar que o péptido GA10 tende a situar-se na interface bicamada/água, pois os seus picos de densidade ficam próximos à intersecção entre a densidade das caudas de POPC e das águas, sendo os picos peptídicos das réplicas 4 e 5 os mais distantes de tal intersecção; na réplica 4 o pico peptídico é mais exterior à intersecção, o que indica que é nesta réplica onde existe menos inserção peptídica, e na réplica 5 o pico peptídico é interior à intersecção, indicando a réplica com maior inserção. Estes valores são perfeitamente concordantes com os valores da distância entre os CM do péptido e membrana anteriormente apresentados, indicando que a ordem decrescente da inserção do péptido na membrana é a seguinte, réplica 5 > réplica 3 > réplica 2 > réplica 1 > réplica 4. Os perfis de densidade da água são sensivelmente iguais em todas as réplicas, enquanto que para as caudas de POPC os seus picos são ligeiramente diferentes entre réplicas devido à interação com o péptido.

O péptido GA10 serve como controlo negativo em relação à influência da carga peptídica na interação de MAPs com membranas, e como foi possível observar nestas análises, não aparenta ter alguma atividade de disrupção ou penetração membranar, apesar de ficar adsorvido na interface água bicamada e de provocar alguma desordem no arranjo lipídico membranar. Mais à frente serão analisadas outras propriedades das simulações da interação do péptido GA10 com a membrana S, mas essa análise será em conjunto com os péptidos LK10 e LE10, para um estudo comparativo, sendo nessa altura feita uma discussão mais completa.

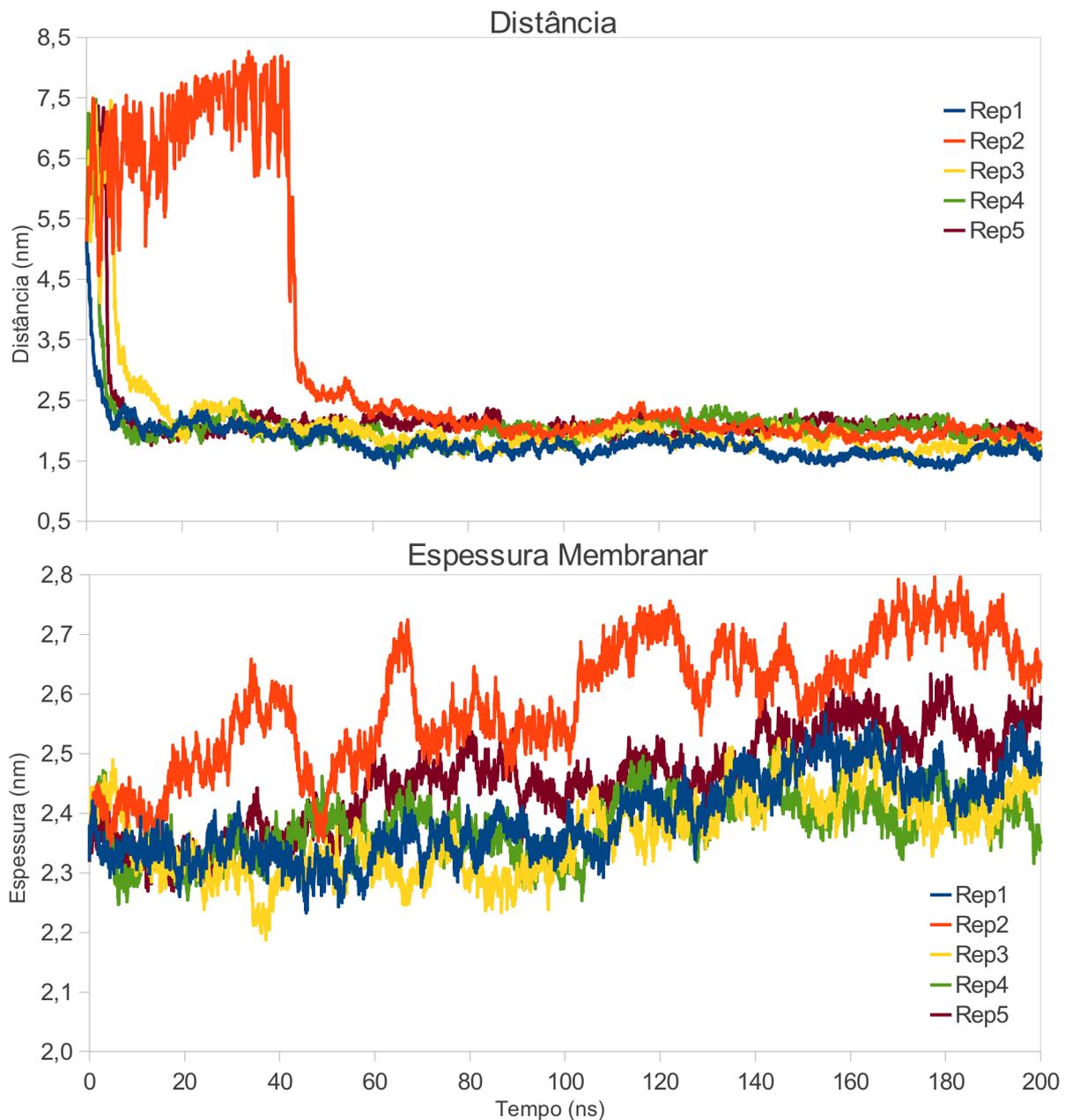
### **3.2.1.2. Interação do Péptido LK10 com a Membrana S**

Depois de analisada a interação do péptido GA10 com a membrana S será agora analisada e discutida a interação com o péptido LK10. Este péptido, devido ao seu conteúdo hidrofóbico (resíduos de leucina) e carregado positivamente (resíduos de lisina), será o que mais se aproximará de um MAP. O comportamento do sistema LK10\_S encontra-se representado na Figura 3.8.



**Figura 3.8.** Evolução, ao longo de 200ns, da simulação da réplica nº 3 do sistema LK10\_S. Representação frontal (esquerda) e de topo (direita) de cada estado. O código de cores e tipo de representação são iguais à Figura 2.1, com exceção do péptido no último estado, onde para uma melhor percepção da sua conformação, os seus resíduos foram coloridos tal como na Figura 3.1, e a membrana foi omitida da última representação com o mesmo intuito. As moléculas de água foram omitidas para uma maior claridade.

Ao contrário do que aconteceu com o péptido GA10, o péptido LK10 rapidamente atingiu a superfície membranar interagindo com a mesma. A réplica 2 foi a exceção a este facto pois levou cerca de 44ns até interagir com a membrana, enquanto que as restantes réplicas 1, 3, 4 e 5 levaram apenas 2, 7, 3 e 5ns, tempos no geral inferiores aos observados nas diferentes réplicas do péptido anterior (ver Figura 3.9).



**Figura 3.9.** Valores de distância entre os CM dos péptidos e bicamada lipídica (em cima), e entre os CM dos dois folhetos lipídicos da bicamada (em baixo) para as 5 réplicas da simulação LK10\_S. Os valores são relativos à direção Z dos sistemas.

A explicação destes tempos de deriva menores parece prender-se com as interações eletrostáticas. O péptido LK10 é carregado positivamente, o que não acontece com o GA10, as cargas positivas dos resíduos de lisina sentem atracção pelas cargas negativas dos grupos fosfato presentes nas cabeças

dos fosfolípidos de POPC. Assim, quando os resíduos de lisina, durante a sua deriva pelo solvente, atingem zonas suficientemente próximas dos grupos fosfato carregados, inicia-se a atração entre o péptido e bicamada, guiando a deriva do péptido LK10 em direção à membrana, o que resulta em menores tempos de simulação até os péptidos atingirem a membrana.

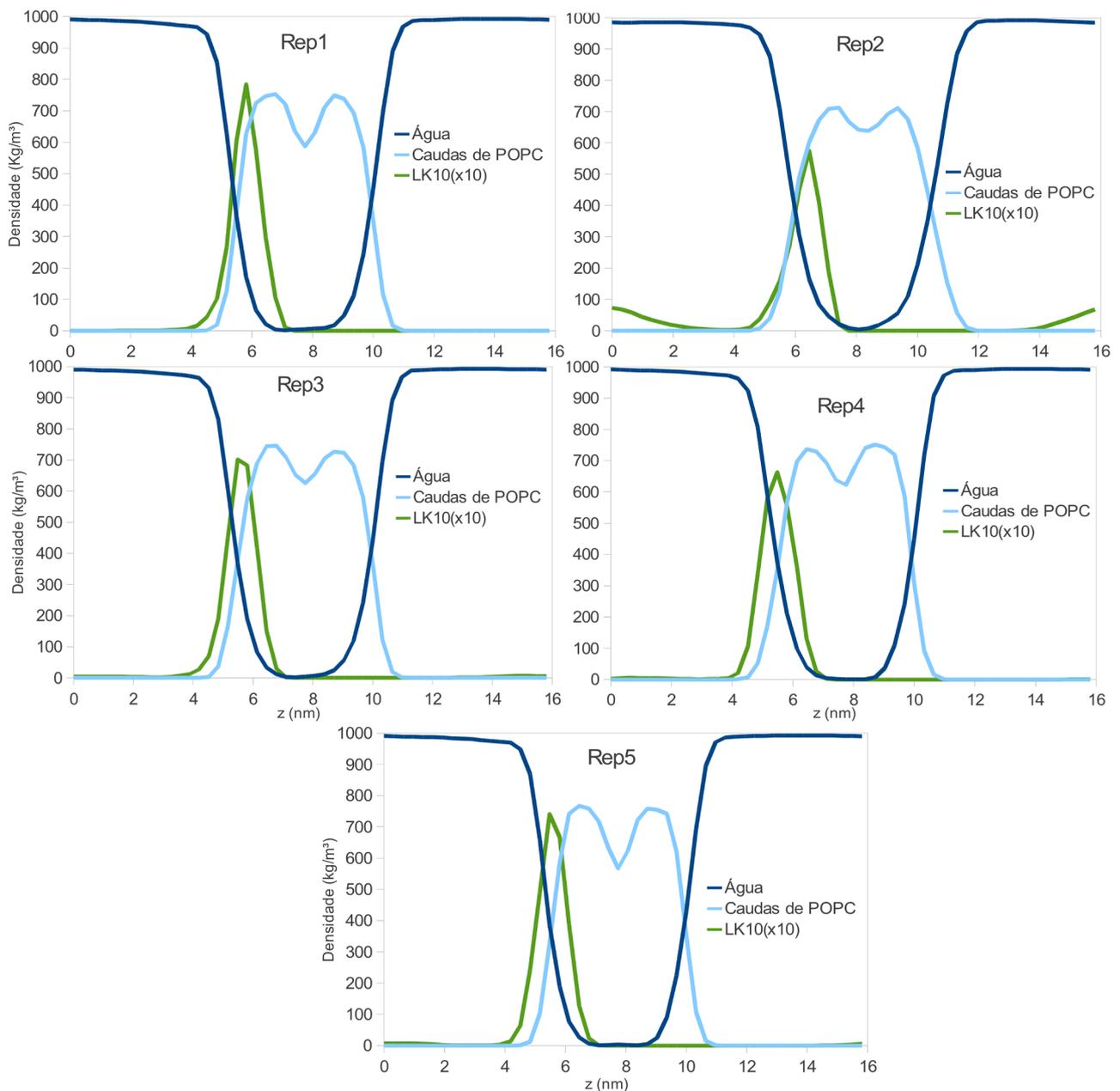
Mesmo sem analisar os dados de distâncias entre CMs e perfis de densidade é perceptível visualmente que o péptido LK10 tem tendência de se localizar numa zona mais interior à membrana que o péptido GA10, localizando-se pouco abaixo das cabeças dos fosfolípidos de POPC. Outro facto que é visível é a diferente tendência de localização dos dois resíduos que compõem o péptido, percebendo-se que os resíduos de lisina ficam em posições menos interiores, mais próximos dos grupos fosfato dos POPCs, enquanto que os resíduos de leucina tendem para zonas mais interiores da membrana, ficando na zona das caudas lipídicas dos lípidos de POPC (ver últimas representações da Figura 3.8). A tendência mostrada pelos dois tipos de resíduos está de acordo com as suas propriedades pois a lisina, sendo carregada positivamente, é atraída pelos grupos fosfato negativos e, por sua vez, a leucina, sendo hidrofóbica, tende para a zona membranar com a mesma propriedade.

Na Figura 3.9 estão representadas as distâncias entre os CM do péptido e da bicamada ao longo do tempo das 5 réplicas simuladas. Tal como com o péptido GA10, a diferença entre réplicas é pequena, sendo neste caso ainda menor por apenas uma réplica levar um tempo de simulação até à interação do péptido LK10 com a membrana significativamente diferente das outras réplicas (réplica 2). Após a fase inicial de estabilização o comportamento da distância entre os dois CMs é semelhante entre todas as réplicas, existindo uma variação à volta do valor de 2nm. Os valores médios para esta distância, excluindo o tempo de difusão pelo solvente, foram de 1,8 (+/- 0,2), 2,2 (+/- 0,2), 1,9 (+/- 0,2), 2,0 (+/- 0,1) e 2,0(+/- 0,1)nm para as réplicas 1, 2, 3, 4 e 5, respetivamente. Apesar de a dispersão desta medida ao longo do tempo ser semelhante à obtida com o péptido neutro (os valores de desvio padrão das diferentes réplicas com ambos os péptidos são próximos), a distância média é inferior, o que visualmente já era perceptível. A semelhança entre os resultados da dispersão dos dois péptidos indica que o comportamento observado de ambos os péptidos será o mais provável nas simulações e não representa um comportamento ocasional.

Os valores da distância entre os CM dos dois folhetos lipídicos da membrana, que indicam a espessura membranar, tiveram um comportamento semelhante ao longo do tempo com exceção da réplica 2, tal como no caso anterior (ver Figura 3.9). A divisão dos resultados da espessura membranar ao longo do tempo em três zonas, como aconteceu com os mesmos resultados para o péptido GA10, é menos evidente. No entanto, se forem excluídos os valores da réplica 2 tal divisão também pode ser aplicada, mas neste caso a primeira zona prolonga-se até cerca de 100ns de

simulação, a zona em que os valores sofrem um pequeno aumento encontra-se entre 100 e 140ns e, atingido tais tempos os valores de espessura parecem estabilizar. Os valores da espessura após a interação com este péptido são pouco superiores aos obtidos nas simulações com o péptido GA10, o que está de acordo com a discussão anterior, onde se afirma que quanto maior a inserção peptídica maior a espessura. No entanto, o péptido LK10 insere-se bastante na bicamada, ao contrário do anterior, sendo de esperar valores mais elevados da espessura. Apesar disto, é necessário ter em conta que este péptido se insere na bicamada, mas numa conformação linear, enquanto que o anterior se compactava e torcia. Assim o péptido LK10 pode inserir-se na membrana com uma conformação estrutural que a membrana consegue acomodar melhor, afetando menos a espessura da bicamada lipídica. Além disso, convém lembrar que os valores são entre CM e, como os péptidos têm uma conformação e massa diferentes, os valores obtidos para os dois péptidos não são diretamente comparáveis.

A análise dos perfis de densidade (Figura 3.10) vem confirmar a maior inserção na bicamada deste péptido em comparação com o péptido GA10. Ao contrário dos perfis obtidos para os sistemas com o péptido GA10, os picos relativos às diferentes réplicas do péptido LK10 estão localizados em zonas interiores, ou na mesma zona, à intersecção entre os perfis das moléculas de água e das caudas de POPC. Segundo estes perfis, a ordem de inserção peptídica das diferentes réplicas será: réplica 2 > réplica 1 > réplica 4 > réplica 3 > réplica 5. Estes valores parecem contradizer os valores da distância entre os CM do péptido e bicamada, pois segundo os valores médios dessa distância a ordem de inserção peptídica seria réplica 1 > réplica 3 > réplica 4 > réplica 5 > réplica 2. Com uma análise mais cuidada, percebe-se que excluindo a réplica 2 de ambas as ordens se obtêm sequências semelhantes em que apenas a ordem entre as réplicas 3 e 4 difere. No entanto, as réplicas 3, 4 e 5 têm valores médios da distância muito semelhantes, tal como os perfis de densidade, o que torna o processo de ordenar estas réplicas de acordo com a sua inserção peptídica uma tarefa difícil. A exclusão da réplica 2 não foi efetuada com o intuito de facilitar a análise mas sim porque o péptido LK10 circulou dissolvido em solução quase um quarto do tempo simulado. Isto terá uma grande influência nos valores médios calculados e no perfil de densidade, o que neste último se traduz num perfil das caudas de POPC mais largo, um pico peptídico mais baixo e numa zona de baixa densidade das moléculas da água mais curta, relativamente às outras réplicas, não permitindo uma comparação direta entre réplicas.



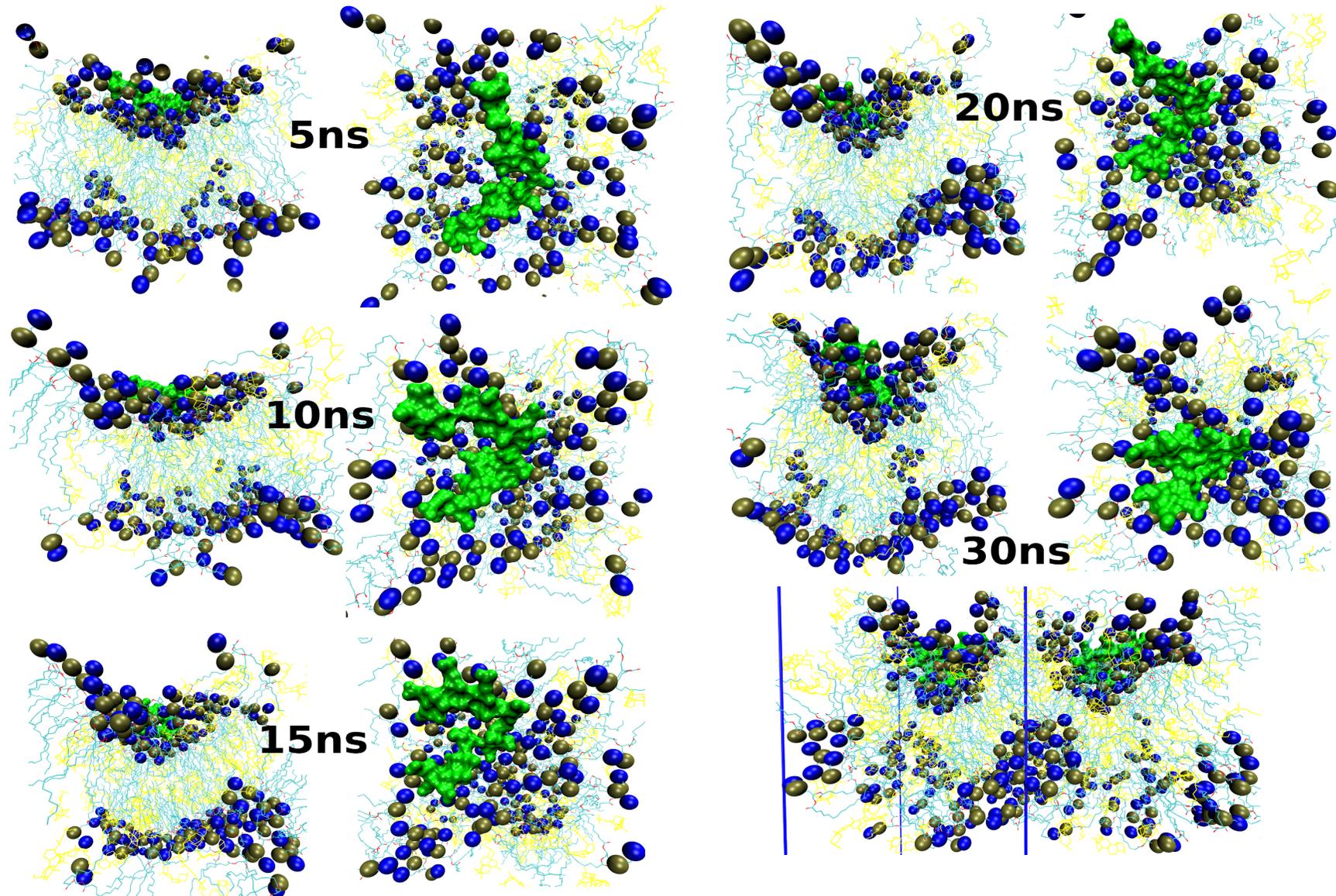
**Figura 3.10.** Perfis de densidade das moléculas de água (azul escuro), das caudas de POPC (azul claro) e do péptido de LK10 (verde). Os perfis são relativos à direção Z do sistema. Os valores relativos às moléculas do péptido foram multiplicados por dez.

### 3.2.1.3. Interação do Péptido LE10 com a Membrana S

O péptido LE10 é hidrofóbico devido à presença de resíduos de leucina, e carregado negativamente devido aos resíduos de ácido glutâmico. Assim, a diferença entre este péptido e o péptido LK10 reside na carga presente em cada um. Como já foi referido, o péptido LK10 será o que mais se aproximará de um MAP, e apesar de existirem AMPs negativos, a existência de CPPs carregados negativamente apenas foi descrita por uma vez, do que é do nosso conhecimento. Nessa descrição o péptido é sintético e derivado de um CPP conhecido onde alteraram os seus resíduos

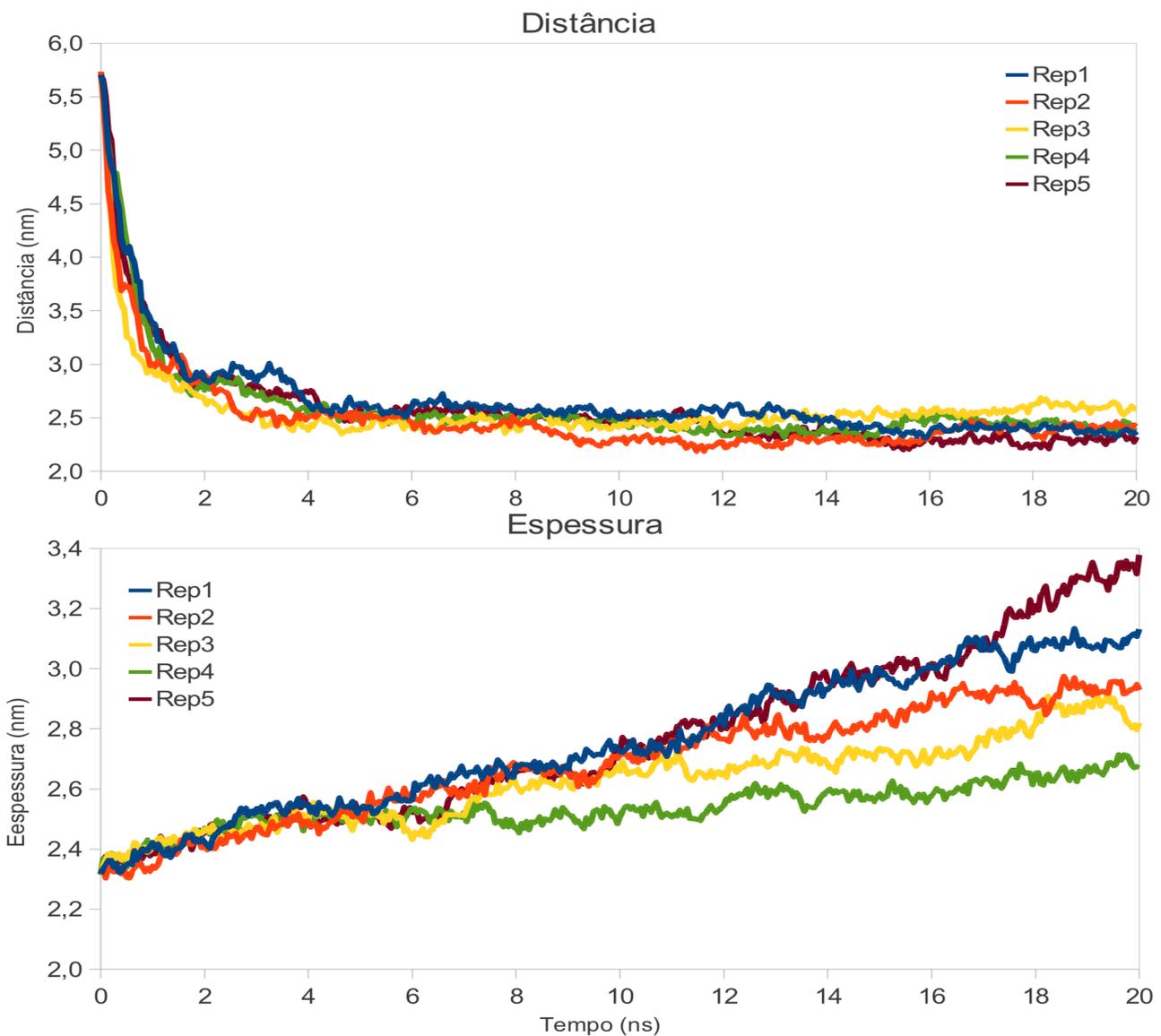
carregados positivamente por aminoácidos carregados negativamente<sup>180</sup>. O péptido LE10, apesar de não se enquadrar na descrição geral de AMPs e CPPs, pode mostrar ser um MAP, pois a existência de péptidos carregados negativamente que interagem com membranas é admitida, apesar de pouco estudada.

A representação da evolução temporal das simulações do sistema LE10\_S mostram uma clara interação entre o péptido e a bicamada que se traduz numa deformação intensa desta última (ver Figura 3.11). A análise visual, aliada aos resultados da distância entre os CM do péptido e da membrana, permite também concluir que o péptido LE10 demonstra uma grande atracção pela bicamada pois em todas as réplicas atinge a superfície membranar no primeiro nanosegundo de simulação. Além disso, é notório que o péptido LE10 de alguma forma obriga a membrana a dobrar na zona de contacto e que, como a membrana vai dobrando, o péptido nunca se insere na mesma, ficando sempre adsorvido à superfície membranar. Esta dobra da membrana leva a que a caixa de simulação se alongue na direcção do eixo dos Z, encurtando nas outras na mesma proporção (as simulações foram efetuadas no *ensemble* NPT, logo mantêm o volume). Esta variação da forma da caixa de simulação vai criar um problema, o aparecimento de artefactos relacionados com as PBC, porque com a dobra da membrana e diminuição do tamanho da caixa no plano XY (plano membranar), as interações entre as cópias periódicas do sistema vão ser alteradas. Inicialmente, com a membrana linear nas fronteiras da caixa de simulação, os lípidos de uma cópia periódica contactavam lateralmente os lípidos das cópias adjacentes nas direcções X e Y, mas com o dobrar da membrana os lípidos ficam inclinados. Assim, os lípidos perto das fronteiras da caixa de simulação passam a contactar com os adjacentes das cópias periódicas de uma forma não natural em membranas lipídicas (ver representação do estado do sistema a 30ns na Figura 3.11), o que leva a que os sistemas comecem a comportar-se de forma artificial, originando artefactos. Neste caso, os artefactos mostram uma desestabilização global da membrana com o evoluir da simulação, razão pela qual nestas réplicas as simulações foram estendidas apenas até cerca de 100ns, e a análise será baseada apenas nos 20ns iniciais, onde a dobra membranar é menos pronunciada não levando a artefactos.



**Figura 3.11.** Evolução, ao longo de 200ns, da simulação da réplica nº 2 do sistema LE10\_S. Representação frontal (esquerda) e de topo (direita) de cada estado. O código de cores e tipo de representação são iguais à Figura 2.1. O estado de 30ns apresenta também uma representação do sistema com uma réplica de si mesmo, para uma percepção dos problemas com as PBC relatados no texto (as linhas azuis indicam os limites da caixa de simulação). As moléculas de água foram omitidas para uma maior clareza.

Os valores da distância entre os CM do péptido LE10 e da bicamada confirmam a forte atracção do péptido pela membrana pois em todas as réplicas estes valores diminuem com elevados declives até cerca de 3nm em 2ns (ver Figura 3.12). Posteriormente, entre os 2 e 4ns de simulação, os valores descem para valores próximos a 2,5nm, mantendo-se constantes durante os 20ns de simulação. A média da distância dos 20ns simulados, excluindo o primeiro nanosegundo (tempo de deriva), é de 2,6 (+/- 0,2), 2,4 (+/-0,2), 2,5 (+/- 0,1), 2,5 (+/- 0,1) e 2,5 (+/- 0,2) para as réplicas 1, 2, 3, 4, e 5, respetivamente. A pouca variação dos valores da distância entre os CM do péptido e membrana confirmam que o péptido fica adsorvido na superfície membrana não se inserindo em nenhuma zona membrana, ao contrário do péptido GA10, que insere algumas zonas da sua sequência no ambiente lipídico membrana ou do péptido LK10, que se inseria bastante na membrana.

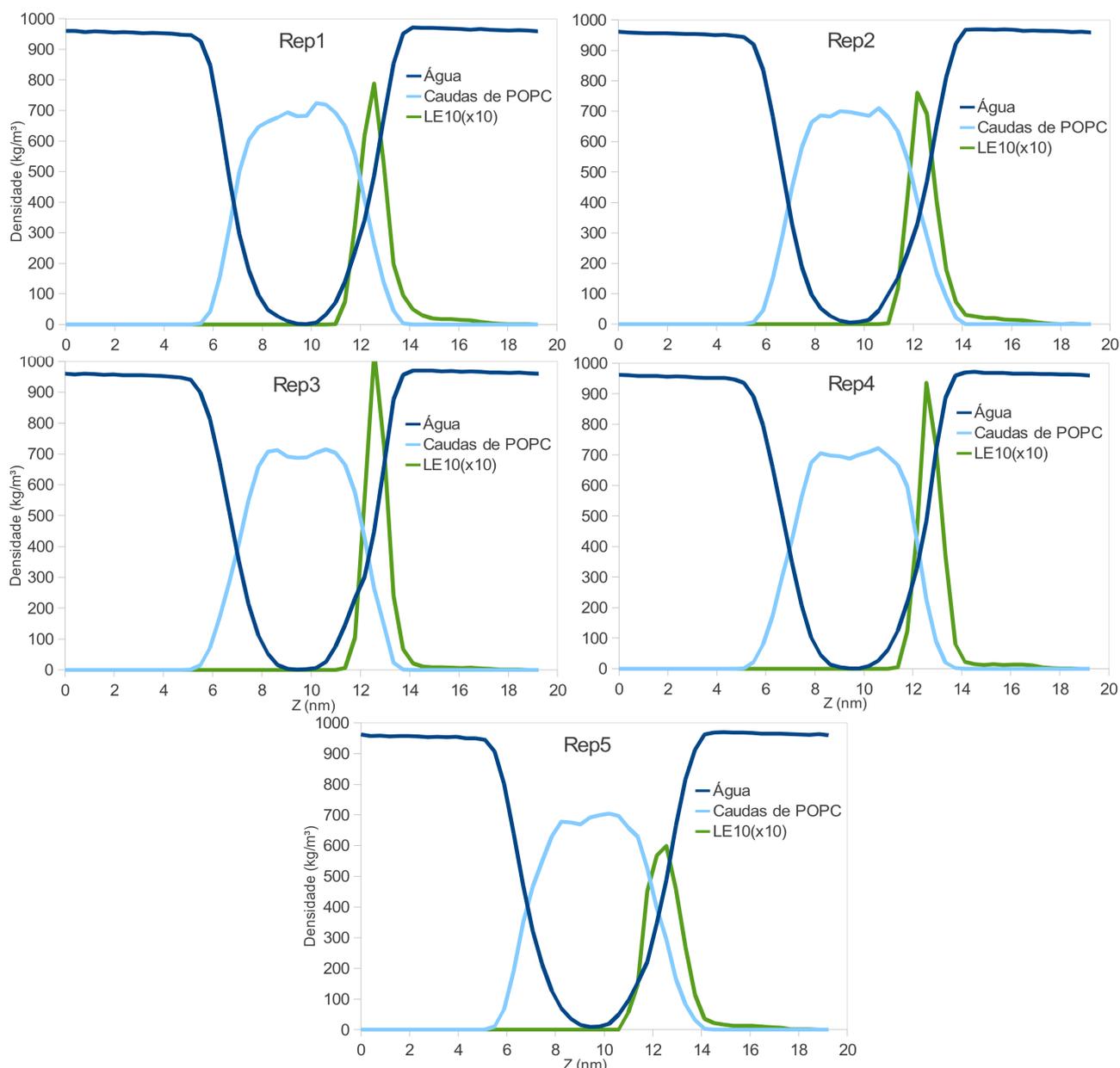


**Figura 3.12.** Valores de distância entre os CM dos péptidos e bicamada lipídica (em cima), e entre os CM dos dois folhetos lipídicos da bicamada (em baixo) para as 5 réplicas da simulação LE10\_S. Os valores são relativos à direção Z dos sistemas.

Enquanto que a variação entre as diferentes réplicas era pequena para a distância analisada anteriormente, para os valores da distância entre os CM dos dois folhetos lipídicos (equiparada à espessura membranar) a variação foi significativa. Como é visível na representação gráfica destes valores (Figura 3.12) a distância entre os CM dos dois folhetos vai aumentando ao longo do tempo simulado até valores de entre 2,7 e 3,3nm (aproximadamente). Isto não significa que os folhetos membranares se vão separando ao longo do tempo, ou que a membrana vai aumentando a sua espessura, apenas que a curvatura da membrana provocada pelo péptido leva a um deslocamento constante dos CM calculados, não podendo assim ser dada relevância a esta análise nas simulações com este péptido.

Tal como a análise das distâncias entre CMs, a análise dos perfis de densidade não permitem uma discussão equivalente à efetuada nas mesmas simulações com a membrana S mas com os outros dois péptidos. Neste caso, porque os perfis de densidade são calculados em relação às posições das moléculas na direção Z, e como a membrana vai sendo dobrada as posições dos seus lípidos vão variando, o que invalida a análise de perfis de densidade até agora efetuada que era baseada na posição relativa do péptido em relação à bicamada. Mesmo assim, estão representados os resultados obtidos, onde se observa que os picos de densidade peptídicos estão próximos da intersecção entre os perfis das caudas de POPC e das moléculas de água, o que não faria sentido se a membrana fosse linear, pois já foi referido que este péptido não se insere na bicamada, o que faz sentido neste caso devido à não linearidade membranar. Esta não linearidade leva também a que os dois picos das caudas de POPC representativos de cada folheto lipídico sejam agora difíceis de individualizar, em qualquer uma das 5 réplicas, ao contrário do que acontecia até agora.

Apesar dos resultados não permitirem retirar conclusões claras sobre o mecanismo que leva ao fenómeno observado da dobra da membrana, parece que o comportamento observado se deve a interações eletrostáticas, mais precisamente devido à carga negativa dos resíduos de ácido glutâmico. Esta afirmação baseia-se no facto de com o péptido anterior não se observar este efeito, sendo a diferença entre ambos o resíduo que lhes confere carga (no péptido LK10 os 10 resíduos de lisina e no LE10 os 10 resíduos de ácido glutâmico) e de a interação ser rápida e forte. Parece que os resíduos de ácido glutâmico sentem uma forte atracção pelas cargas positivas dos grupos colina dos lípidos de POPC, no entanto a atracção é contrabalançada pela repulsão entre as cargas negativas desses resíduos e as cargas negativas dos grupos fosfatos das moléculas de POPC. Esta oposição de forças leva a que a membrana se deforme de maneira a equilibrar o jogo de forças, resultando numa dobra cada vez maior da membrana.

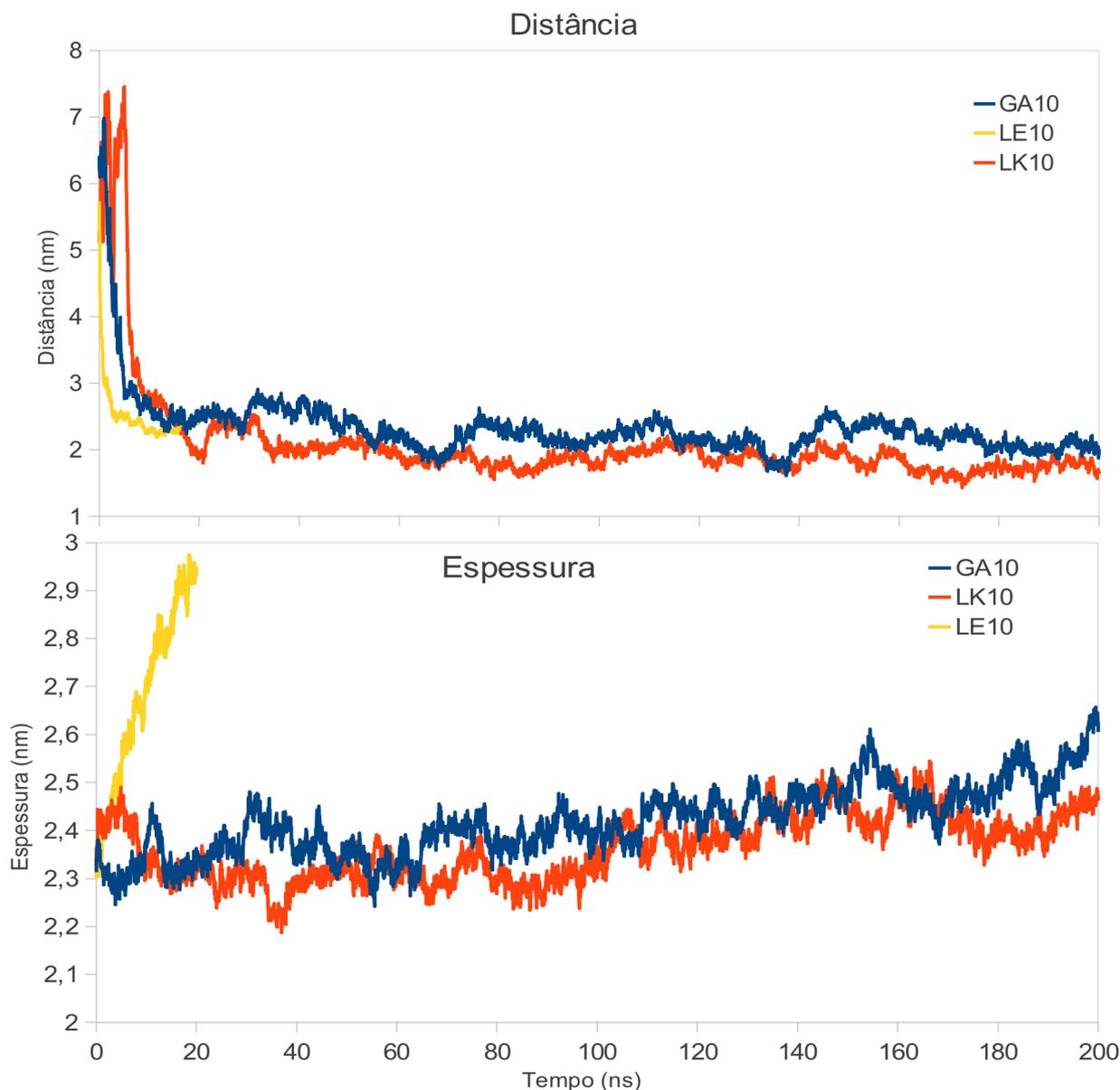


**Figura 3.13.** Perfis de densidade das moléculas de água (azul escuro), das caudas de POPC (azul claro) e do péptido de LE10 (verde). Os perfis são relativos à direção Z do sistema. Os valores relativos às moléculas do péptido foram multiplicados por dez.

### 3.2.1.4. Comparação da Interação dos Três Péptidos com a Membrana S

O comportamento evidenciado por estes sistemas de bicamadas de POPC e COL com péptidos de LE10 em água mostra que, apesar de estudos de MD fornecerem uma miríade de ferramentas de análise dos seus dados, é necessário, na projeção dos estudos, definir muito bem os objetivos e propriedades a estudar, pois por vezes certas análises não são possíveis ou fornecem informação sem interesse ou sem possibilidade de comparação com outras análises. O objetivo principal das análises já descritas não foi a comparação entre os diferentes péptidos mas sim a determinação de padrões de comportamento, como a inserção peptídica, entre as diferentes réplicas,

escolhendo para esse fim o estudo de propriedades relacionadas com as posições moleculares. Nesta secção serão descritas as mesmas propriedades anteriores e ainda outras mas, ao invés da secção anterior onde o estudo era entre réplicas do mesmo sistema, aqui as propriedades serão comparadas entre péptidos para uma comparação de resultados e comportamentos. Para tal foi selecionada uma réplica de cada um dos três sistemas, tendo sido selecionada aquela que apresentava um comportamento intermédio no conjunto das propriedades atrás estudadas, com o objetivo de analisar a réplica mais representativa da tendência de comportamento de cada tipo de sistema. As réplicas escolhidas foram então a número 3 para o sistema com o péptido GA10, a número 3 para o sistema com o péptido LK10 e a número 2 para o sistema com o péptido LE10.



**Figura 3.14.** Valores de distância entre os CM dos péptidos e bicamada lipídica (em cima), e entre os CM dos dois folhetos lipídicos da bicamada (em baixo) para as 3 réplicas representativas dos sistemas GA10\_S, LK10\_S e LE10\_S. Os valores são relativos à direção Z dos sistemas.

Na Figura 3.14 estão representados os resultados relativos às distâncias entre os CM dos 3 péptidos e bicamada, e entre os 2 folhetos lipídicos (equivalente à espessura membranar). A comparação entre os resultados para os diferentes péptidos vem confirmar a análise já efetuada.

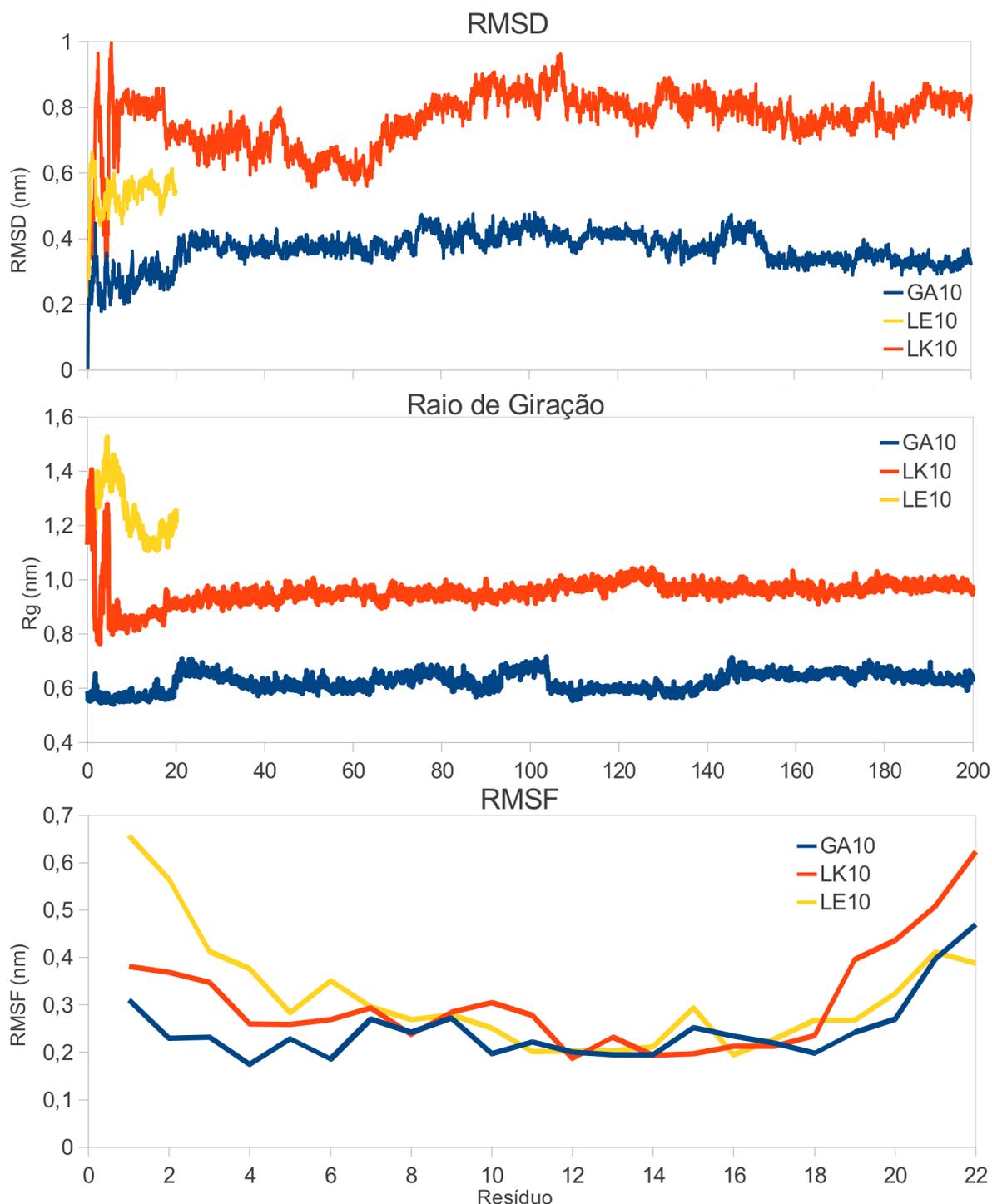
Relativamente à distância entre os CM dos péptidos e da bicamada confirma-se que o péptido LK10 é o que se insere com maior profundidade na bicamada de POPC e COL. O gráfico da Figura 3.14 aponta para que o péptido GA10 seja o que menos se insere no tipo de membrana simulado (a diferença é ligeira), no entanto tal não se verifica, pois como já foi indicado o péptido LE10 não se insere na zona hidrofóbica membranar, ao contrário do péptido GA10. Mais uma vez esta incongruência se explica pela variação da forma da membrana que afeta o cálculo do CM e posterior distância. Em relação à espessura membranar, o problema com a variação da forma da membrana volta a surgir, traduzindo-se num aumento da espessura com o tempo de simulação decorrido para o sistema com o péptido LE10, enquanto que os valores para os restantes 2 péptidos foram aumentando ligeiramente, sendo semelhantes entre si.

Os valores do desvio quadrático médio (RMSD, do Inglês “root mean square deviation”) correspondem a uma medida da variação da estrutura proteica ao longo do tempo de simulação. Como se pode ver na Figura 3.15, os valores de RMSD são bastante diferentes entre os 3 diferentes sistemas, sendo o sistema com o péptido GA10 o que menor variação estrutural ao longo da simulação sofre. O sistema com o péptido LK10 é aquele que apresenta maior variação e o sistema com o péptido LE10 o que demonstra valores de variação estrutural intermédios. Os valores representados no gráfico estão de acordo com o comportamento dos sistemas observado, pois o péptido LK10 parte de uma estrutura indefinida em solução para uma estrutura mais linear à medida que se insere na membrana, o que se traduz numa grande variação da sua estrutura. Os péptidos GA10 e LE10 partem de estruturas indefinidas que não se alteram muito com o passar do tempo de simulação, resultando esse comportamento em valores menores de variação da estrutura peptídica. Os valores de RMSD nos últimos nanosegundos variavam pouco, o que indica que as simulações foram longas o suficiente para atingirem um estado estável (ou metaestável). Já em relação aos valores de RMSF, a variação entre péptidos não é tão elevada (ver Figura 3.15). O mesmo comportamento é verificado com todos os péptidos, existindo maior flutuação dos valores do desvio quadrático médio nos resíduos mais exteriores das 3 estruturas peptídicas, e a zona entre os resíduos 11 a 18 apresenta os menores valores de flutuação nos 3 péptidos. Relativamente as zonas limites da estrutura peptídica, junto ao terminal N é o péptido LE10 que maior flutuação apresenta, seguido do LK10 e do GA10, enquanto que no terminal C a maior flutuação pertence ao péptido LK10 seguido do GA10 e do LE10. Visto os resíduos mais exteriores possuírem mais graus de liberdade, o padrão de RMSF é aceitável. A medida do raio de giração ( $R_g$ ) de um péptido ao longo do tempo indica o

grau de compactação dos mesmos. Péptidos com valores de  $R_g$  mais elevados correspondem a péptidos menos compactos, e pelo contrário valores de  $R_g$  menores indicam péptidos com a sua estrutura mais compactada. Nos momentos iniciais das simulações dos 3 sistemas é visível uma variação expressiva dos valores de  $R_g$ , principalmente para o sistema LK10\_S, o que é natural visto ser neste onde péptido leva mais tempo até interagir com a membrana (ver Figura 3.15). Depois desta variação inicial, os sistemas com os péptidos LK10 e GA10 apresentam um comportamento semelhante, existindo pouca variação dos seus valores, com uma tendência de aumento muito ligeiro com o aumento do tempo simulado. O sistema com o péptido LE10 apresenta um comportamento distinto, pois após a variação inicial, os seus valores de  $R_g$  baixam significativamente (0,3 a 0,4 nm) até cerca de 17ns e, posteriormente, aumentam até ao fim do tempo analisado. Em média, os valores de  $R_g$  superiores pertencem ao péptido LE10, seguido dos valores relativos ao LK10 e do GA10, sendo a diferença entre os péptidos GA10 e LK10 superior à existente entre o LK10 e LE10. Tais valores vão de acordo ao constatado até agora, pois os péptidos LK10 e LE10 mostraram um enovelamento menor que o péptido GA10 (isto se deve ao facto de os resíduos de glicina e alanina serem pequenos, e o resíduo de glicina ser um aminoácido mais flexível, o que leva a que este péptido se enovele/compacte mais).

A análise das pontes de hidrogénio (PHs) existentes nos sistemas simulados fornece informações bastante pertinentes. Olhando para o número de PHs presentes no sistema ao longo do tempo de simulação (ver Figura 3.16) percebe-se que o sistema com o péptido LE10 é o que possui o menor número de pontes, enquanto que o sistema com o péptido GA10 possui o maior. A variação deste número em todos os sistemas, apesar de ser elevada, é constante. Isto tudo se deve ao facto de a maioria das PHs se estabelecerem entre as moléculas de água, que se encontram em número muito superior às restantes moléculas no sistema. As PHs entre os 3 péptidos e as moléculas de água apresentam um comportamento diferente, como seria de esperar (ver Figura 3.16). Em todos os péptidos existe uma descida do número de PHs entre estes e as moléculas de águas, o que é compreensível visto que os péptidos irão interagir com a bicamada, estabelecendo também PHs com ela, diminuindo o número de PHs com moléculas de água. O sistema com menor número de PHs entre o péptido e a água é o GA10\_S, o que se compreende visto as cadeias laterais dos resíduos que compõem este péptido não serem recetores ou dadores de hidrogénios. O péptido LK10 tem uma média de PHs formadas entre si e a água superior ao dobro da média para o péptido GA10, pois os resíduos de lisina possuem nas suas cadeias laterais grupos  $NH_3$ , que são dadores de PHs para moléculas de água. O sistema com o péptido LE10 é o que apresenta maior número deste tipo de PHs, com valores muito superiores aos dos outros sistemas, o que se deve à presença do grupo carboxílico nas cadeias laterais dos resíduos de ácido glutâmico deste péptido. O estabelecimento de

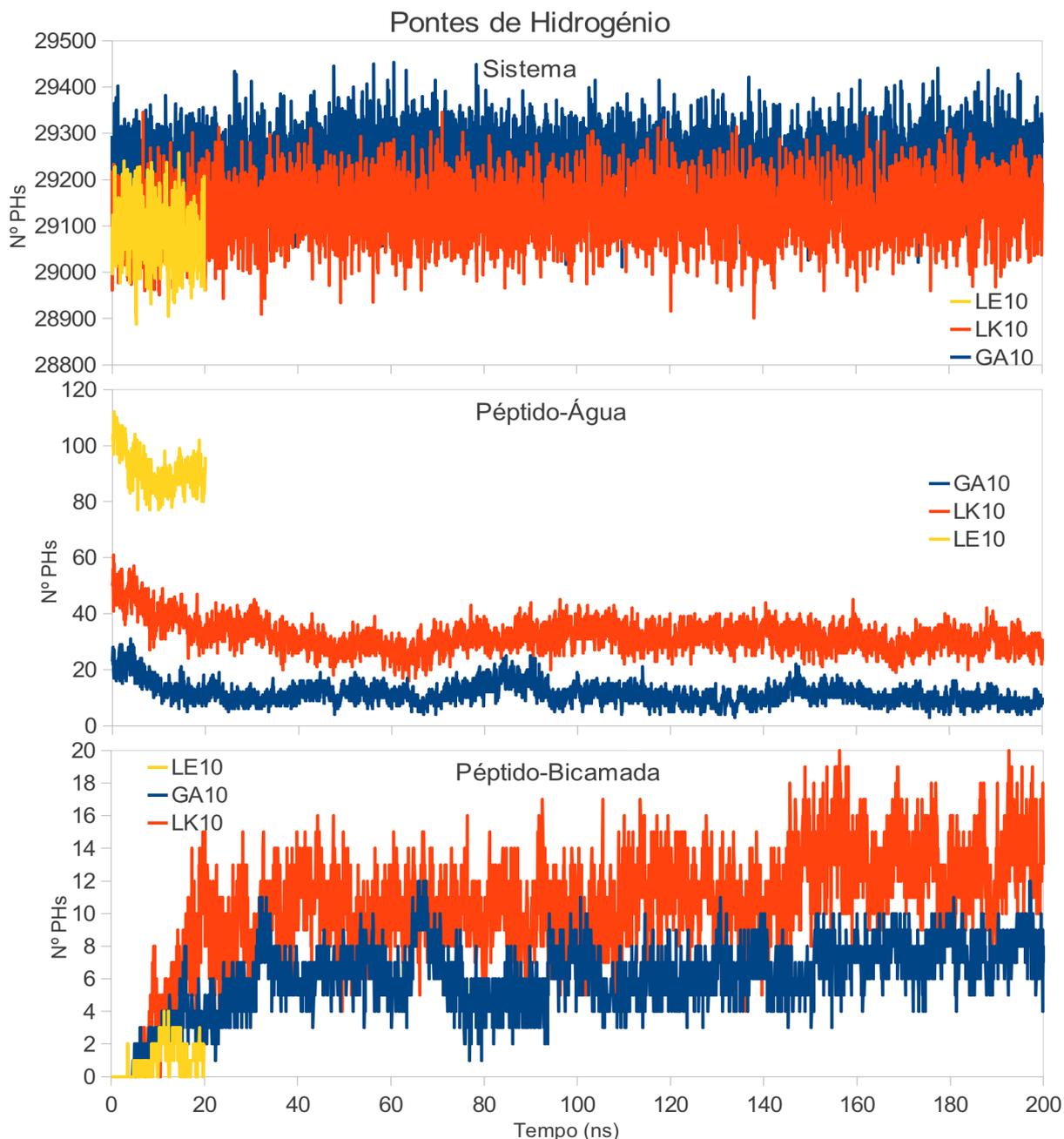
um elevado número de pontes de hidrogénio entre o péptido LE10 e as moléculas de água pode ajudar a explicar o fenómeno observado na interação deste péptido com a membrana.



**Figura 3.15.** Valores de RMSD (em cima), de Raio de giração (ao meio) e de RMSF (em baixo) das réplicas seleccionadas para representação dos sistemas GA10\_S, LK10\_S e LE10\_S. Valores calculados tendo por base toda a estrutura peptídica.

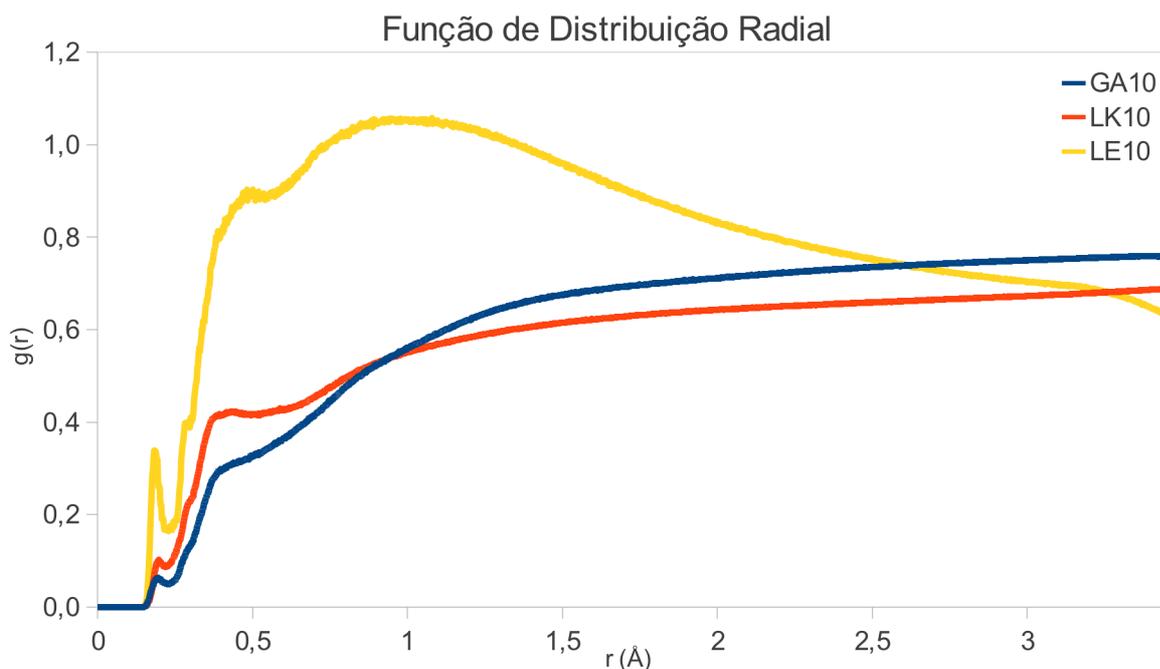
As PHs de hidrogénio, apesar de não serem das interações mais fortes, conseguem criar uma rede de interações com efeitos significativos. Como foi referido atrás, as cargas negativas dos resíduos de ácido glutâmico deste péptido sentem-se atraídas pelas cargas positivas presentes nos

grupos colinas das moléculas de POPC e sentem uma repulsão das cargas negativas dos grupos fosfato destes mesmos lípidos, resultando numa oposição de forças. Como o péptido LE10 realiza muitas PHs com as moléculas de água, quando o péptido é atraído pelas cargas positivas das colinas pode arrastar consigo moléculas de água, o que pode levar a que membrana dobre em resposta ao ambiente polar criado, em conjunto com o balanço de forças já abordado. Isto pode explicar o facto de o péptido LE10 nunca chegar a inserir-se na membrana, apesar de o péptido LK10 se inserir bastante, tendo em conta que ambos contêm 50% de resíduos hidrofóbicos (leucina (L)) no seu conteúdo.



**Figura 3.16.** Número de pontes de hidrogénio (PHs) existentes nos sistemas (em cima), formadas entre os péptidos e as moléculas de água (ao centro) e entre os péptidos e as bicamadas (em baixo).

Este número elevado de PHs também incute mais força à hipótese do comportamento evidenciado nos sistemas com péptidos de LE10 ser devido, além destas PHs, à oposição de atrações e repulsões eletrostáticas, pois existia um facto que contrariava esta hipótese, nomeadamente a existência de carga no péptido LK10. Os péptido LK10 e LE10 são semelhantes, diferindo apenas nos resíduos que lhes conferem carga, pelo que a oposição de forças eletrostáticas poderia também acontecer no LK10, observando-se a dobra membranas, o que não se verificou. A única explicação, excluindo o fator das PHs, de maior relevo para a diferença de comportamentos entre sistemas com estes 2 péptidos carregados seria que a posição das cargas positivas dos grupos colina e negativas dos grupos fosfatos fossem relevantes para o efeito observado. Assim, apesar de o péptido LK10 ser carregado, possibilitando um equilíbrio de forças eletrostáticas, esse balanço não levaria à dobra membranas por ser diferente do que surge com o LE10, devido a esses péptidos terem cargas opostas. Como tal, a explicação do comportamento de dobra membranas pode dever-se a sinergismos dos fatores relativos às forças eletrostáticas, tendo em conta a especificidade das mesmas (como a posição relativa das cargas) e às PHs entre o péptido LE10.



**Figura 3.17.** Valores de RDF calculados entre os péptidos e as moléculas de águas durante o tempo de simulação de cada sistema (200ns para os sistemas GA10\_S e LK10\_S e 20ns para LE10\_S).

O número de PHs entre os diferentes péptidos e a bicamada lipídica demonstra um comportamento contrário ao anterior, uma vez que existe uma subida inicial e posterior estabilização desse número nos 3 sistemas, devido à interação dos 3 péptidos com a membrana. O péptido LE10 é o que estabelece menos PHs com a membrana, o que se compreende devido a estar sempre rodeado de água e não se inserir na membrana. O péptido LK10 por sua vez é o que maior número de PHs estabelece com a bicamada, o que está de acordo com a sua maior propensão em

efetuar PHs e em se inserir na bicamada. O péptido GA10 tem um número intermédio deste tipo de PHs, pois apresenta alguma inserção peptídica, principalmente nas suas extremidades, que no caso deste péptido são os locais mais propensos a estabelecerem PHs.

Para um estudo mais aprofundado sobre as PHs entre água e os péptidos, foi calculada a distribuição radial de pares (RDF, do Inglês “radial distribution function”) entre essas moléculas, para cada um dos sistemas. Na Figura 3.17 estão presentes o resultado desses cálculos para o conjunto de tempos de simulação analisados até agora. A RDF é definida como a razão entre a concentração local de partículas/moléculas de um tipo (a determinada distância de uma outra partícula/molécula central), e a concentração média das primeiras partículas/moléculas, o que fornece informações sobre a estrutura local dos sistemas estudados. Neste caso, a RDF corresponderia à razão entre a concentração local de moléculas de água (que estejam a uma determinada distância do péptido em estudo) e a sua concentração média. Como podemos ver na Figura RDF\_S, o comportamento dos valores de RDF calculados para os sistemas com os péptidos LK10 e GA10 é muito semelhante, sendo por sua vez o comportamento do sistema LE10\_S bastante diferente. Para todos os 3 sistemas, o valor de RDF é zero até valores de distância entre os péptidos e as águas de cerca de  $0,15\text{\AA}$ , pois até esta distância existe uma forte repulsão de van der Waals entre essas moléculas. De seguida os valores de RDF aumentam rapidamente em todos os sistemas atingindo um pico local a cerca de  $0,2\text{\AA}$ , que corresponde à primeira camada de hidratação dos péptidos pela água. Já aqui se nota uma diferença significativa dos valores de RDF entre o sistema com o péptido LE10 e os outros dois, pois o pico a cerca de  $0,2\text{\AA}$  é, neste sistema, cerca de 3 vezes superior e acontece a valores de distância ligeiramente inferiores, indicando uma interação menos repulsiva entre o péptido LE10 e a água em comparação com os outros péptidos e uma probabilidade de encontrar moléculas de água a tais distâncias do péptido LE10 muito superior. Depois desse primeiro pico local, os valores de RDF descem ligeiramente para depois aumentar muito. Esse aumento volta a ser diferente entre os sistemas com o péptido LE10 e os restantes. Para os sistemas com os péptidos LK10 e GA10, o aumento é menos acentuado, sendo cada vez menor com o aumento da distância, parecendo os valores de RDF estarem a tender para algum valor superior ao de  $0,6/0,7$ . Este valor foi obtido para a distância até onde foram efetuados os cálculos (essa distância foi de  $0,35\text{\AA}$ , sendo definida automaticamente pelo software GROMACS de acordo com as dimensões das caixas de simulação). Tal comportamento está de acordo com o esperado, pois esta análise estatística faz os seus cálculos usando como comparação sistemas de gases ideais, onde a os valores de RDF seriam constante e iguais a 1. No entanto, estes sistemas estão longe de serem gases ideais e, como tal, só tendem para o valor de 1 a distâncias elevadas. O sistema com o péptido LE10 tem um comportamento diferente, depois do primeiro pico local os valores de RDF

descem um pouco e voltam a subir, tal como nos sistemas anteriores, embora neste caso a subida envolva valores muito superiores, mostrando um pico bastante largo que atinge valores superiores a um, a distâncias compreendidas entre os valores de 0,8 e 1,2Å. Os valores para este sistema, entram depois numa fase descendente, chegando mesmo a atingir valores de RDF inferiores aos dos outros sistemas nas distâncias finais. A presença desse pico largo com valores elevados de RDF indica que a essas distâncias do péptido de LE10 a probabilidade de encontrar moléculas de água é muito elevada, sendo esse pico talvez devido à propensão deste péptido de realizar PHs com moléculas de água, e comprovando que existe uma camada de moléculas de água a rodear o péptido LE10 que se mantêm durante toda a simulação, que podem ajudar a provocar a dobra da membrana. Neste sistema a fase final do comportamento dos valores de RDF tem um tendência de diminuição, ao contrário dos anteriores sistemas. Isto no entanto não significa algo de errado, apenas os valores de distância para os quais foram calculados os valores de RDF são pequenos para se observar a tendência dos valores de RDF para 1, o que vai ser possível de se observar na análise seguinte ao sistema LE10\_M.

A análise dos sistemas S já forneceram muita informação, existindo ainda muitas mais análises possíveis. No entanto para estes sistemas a análise efetuada foi considerada suficiente para o estudo da interação entre os três péptidos e este tipo de membrana.

### **3.2.2. Simulações com Sistemas P**

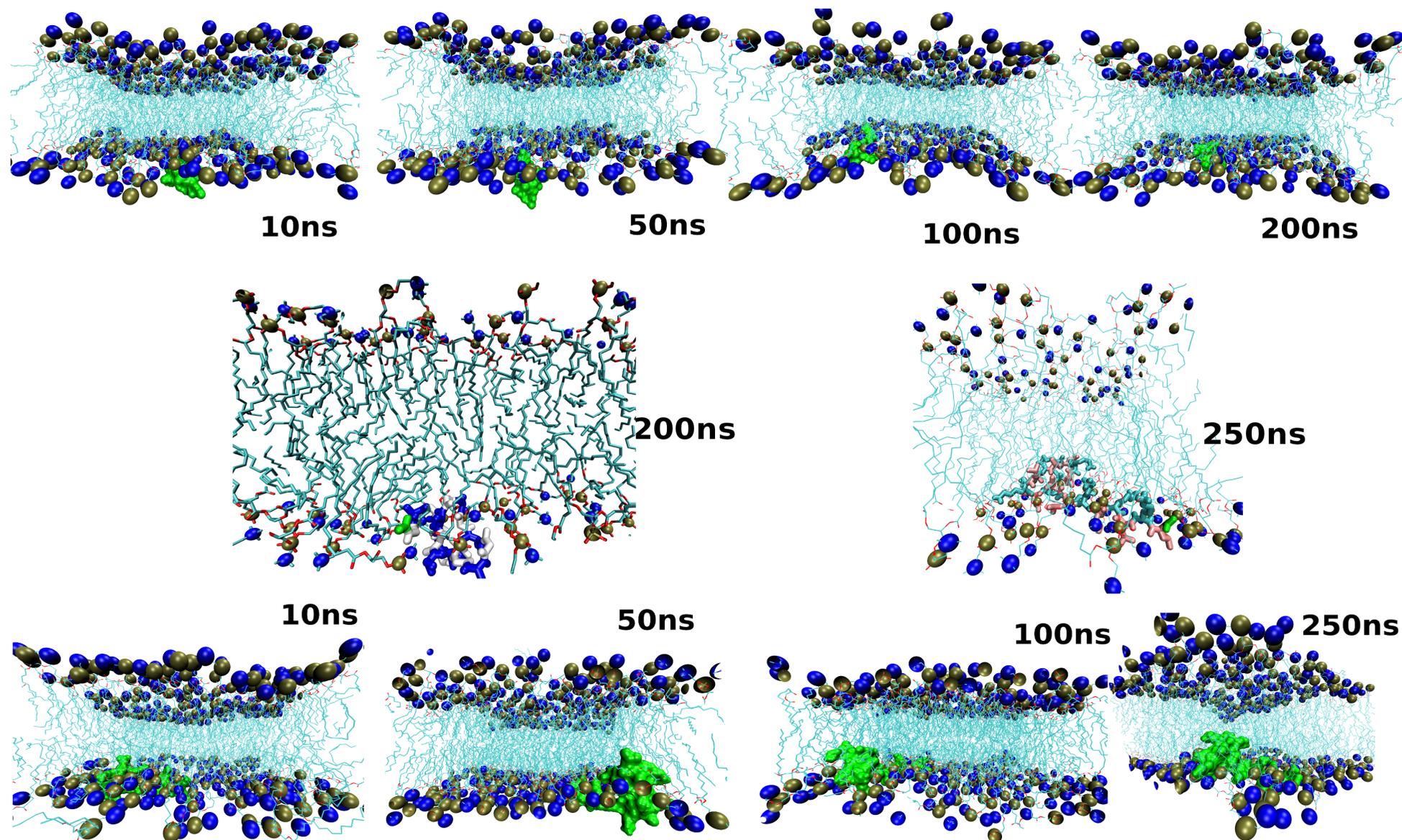
#### **3.2.2.1. Interação dos Péptidos GA10, LK10 e LE10 com Membranas de POPC**

Como foi abordado na introdução, o COL tem um papel muito forte na identidade membranar, o que leva a que a sua presença, concentração e localização determinem propriedades importantes das membranas lipídicas. Nesse sentido, procurou-se estudar a influência desse importante lípido nas interações dos 3 péptidos modelo. Além disso, este tipo de modelo membranar é mais próximo a membranas de micro-organismos, permitindo assim tentar descortinar algumas pistas sobre os mecanismos de atividade antimicrobiana. Para este estudo foram usados modelos membranares cerca de 2nm maiores (nas direções *X* e *Y*), sendo os modelos peptídicos nestes sistemas inseridos nas caixas de simulação a menor distância com o objetivo de diminuir o custo computacional associado ao solvente. Cada sistema consistia de uma membrana lipídica em água com um péptido de cada sistema, tal como os sistemas S, com a exceção do sistema com o péptido LE10, que neste caso foi simulado com um, dois e três péptidos. O tempo de simulação foi cerca de 200, 250 e 50 ns para os sistemas GA10\_P, LK10\_P e LE10\_P, respetivamente, existindo 3 réplicas

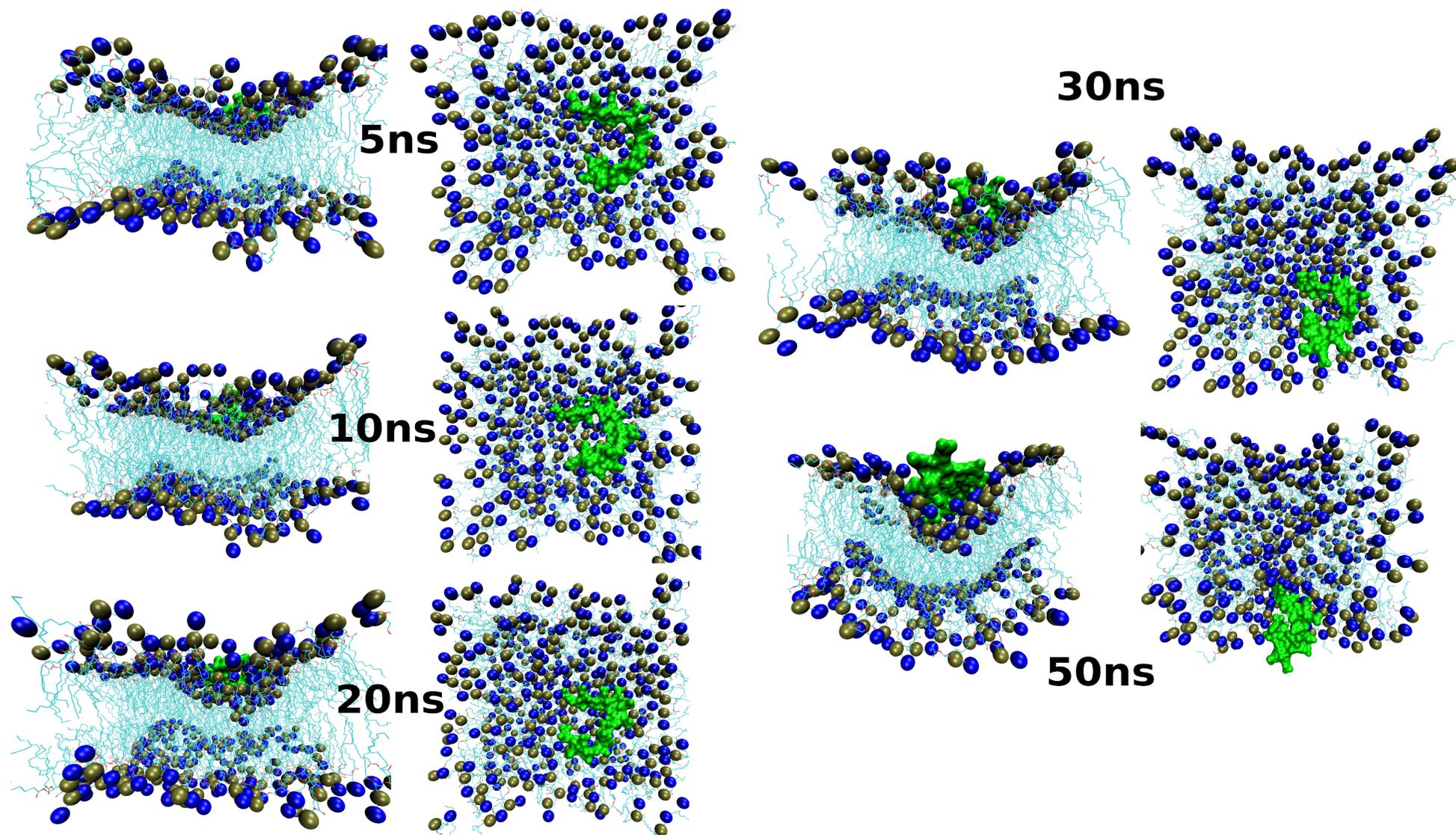
de cada sistema. A Figura 3.18 apresenta a evolução das simulações dos sistemas GA10\_P e LK10\_P, a Figura 3.19 apresenta a evolução para o sistema 1\_LE10\_P, enquanto que a Figura 3.20 apresenta a evolução dos sistemas 2\_LE10\_P e 3\_LE10\_P.

Os sistemas com mais de um péptido de LE10 foram apenas analisados visualmente. Para os restantes, e tal como na análise comparativa dos sistemas S, foram escolhidas as réplicas mais representativas do comportamento dos sistemas simulados. Essas réplicas são a número 2, 3 e 3 para os sistemas GA10\_P, LK10\_P e 1\_LE10\_P, respetivamente.

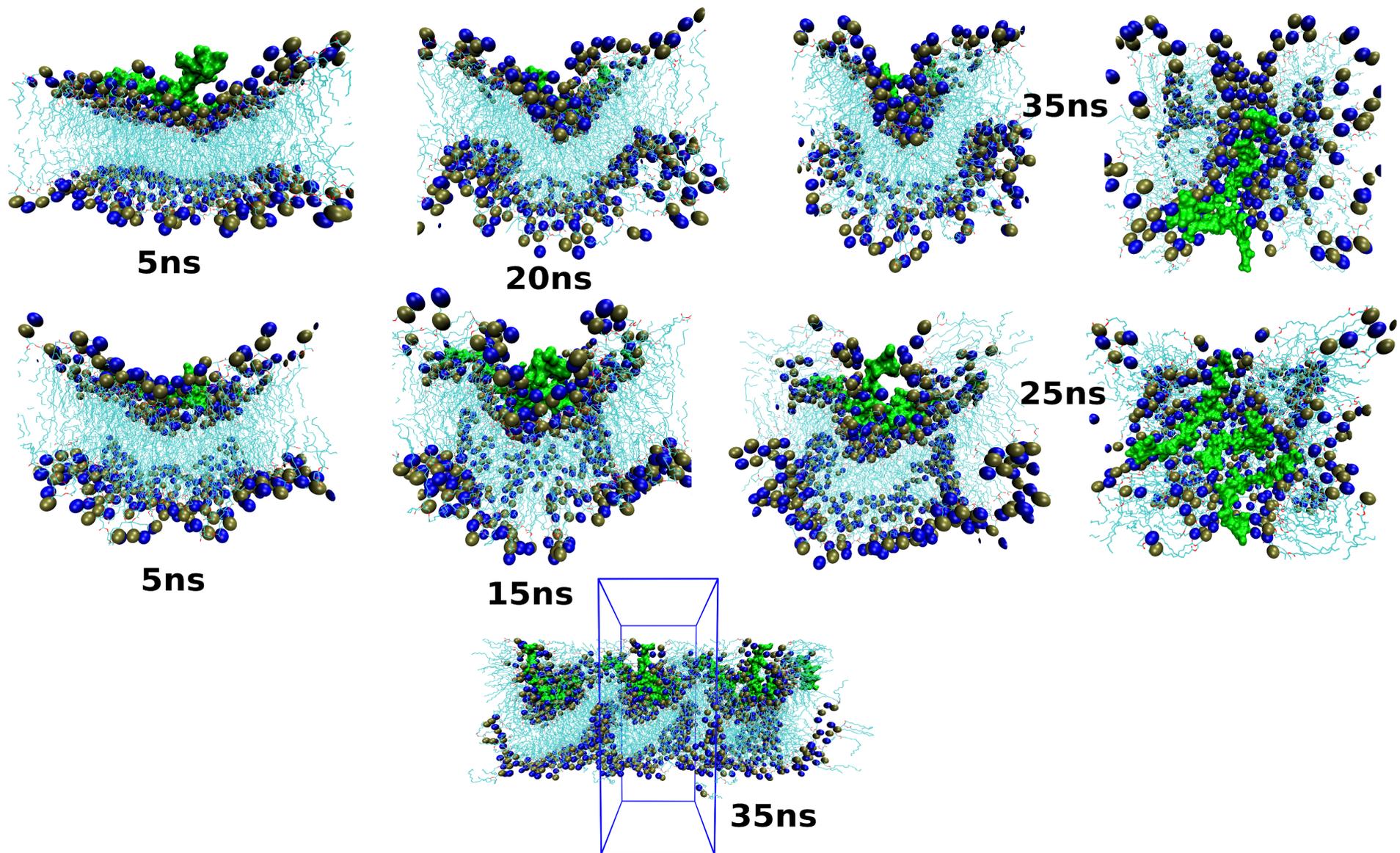
A análise da espessura membranar (calculada através da distância entre os CM dos dois folhetos lipídicos) da Figura 3.21, aponta valores médios muito próximos entre os sistemas GA10\_P e LK10\_P e superiores para o sistema 1\_LE10\_P, devido à dobra membranar que volta a surgir nas simulações com o péptido LE10 (ver Figura 3.19). Relativamente à variação dos valores de espessura, esta é elevada no sistema LK10\_P e menor nos outros dois, estando esta diferença de comportamento provavelmente relacionada com a maior inserção do péptido LK10 na membrana.



**Figura 3.18.** Representação da evolução dos sistemas GA10\_P (cima) e LK10\_P (baixo) ao longo do tempo de simulação. O código de cores e tipo de representação são os mesmos da Figura 2.1 com exceção das imagens centrais que correspondem a cortes das estruturas finais dos sistemas (GA10\_P à direita e LK10\_P à esquerda) para uma melhor percepção da conformação final. Nestes cortes os péptidos estão representados como modelo esqueleto com os resíduos coloridos de acordo com a Figura 3.1. As moléculas de águas foram omitidas para uma maior claridade.

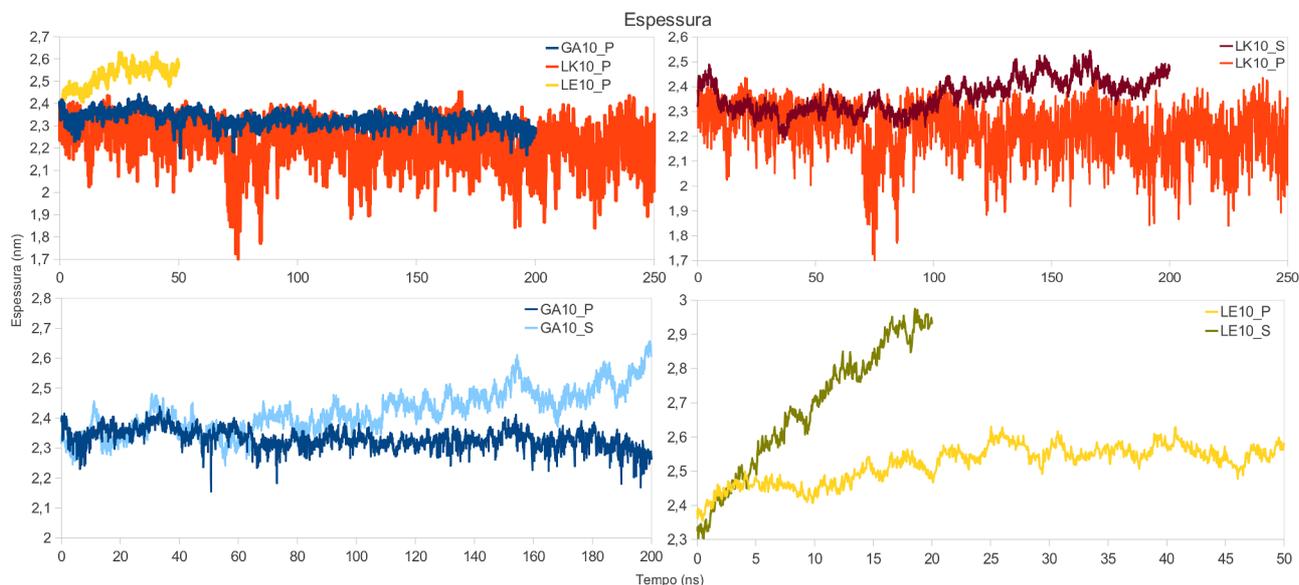


**Figura 3.19.** Representação da evolução do sistemas 1\_LE10\_P ao longo de 50ns de simulação. Visão frontal e de topo do sistema, à esquerda e direita da indicação temporal, respetivamente. O código de cores e tipo de representação são os mesmos da Figura 2.1. As moléculas de águas foram omitidas para uma maior clareza.



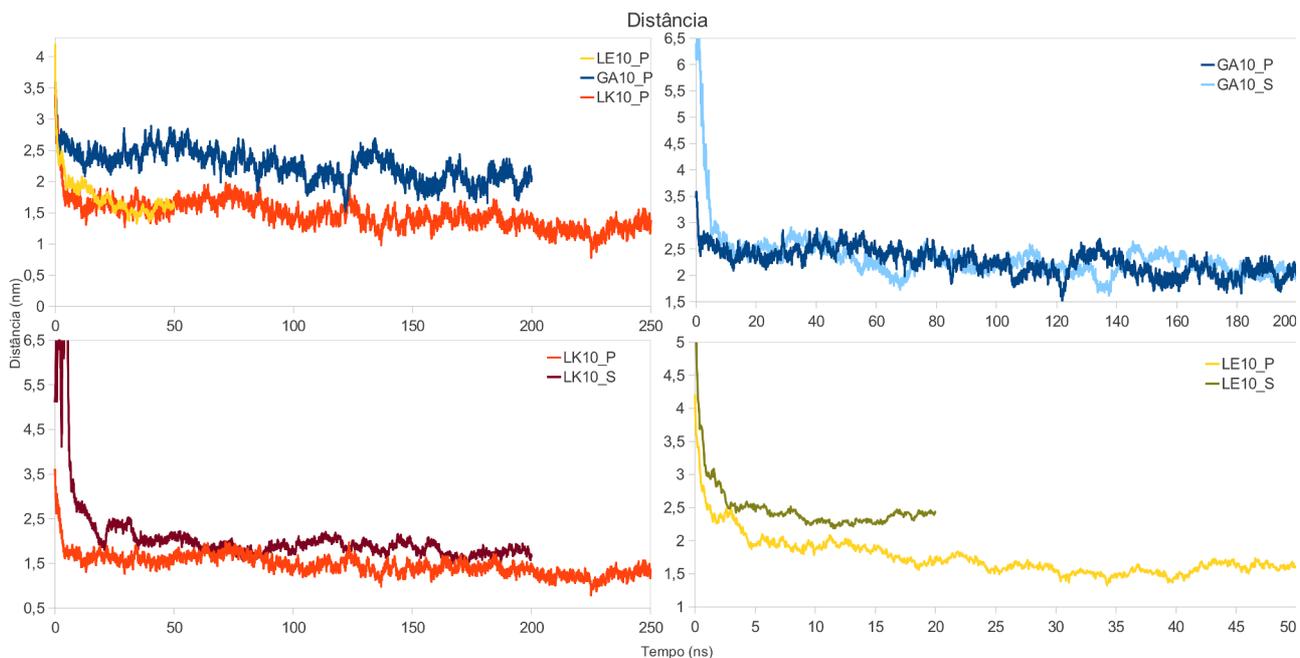
**Figura 3.20.** Representação da evolução dos sistemas 2\_LE10\_P (cima) e 3\_LE10\_P (centro) ao longo de 35 e 25ns de simulação, respetivamente. Os últimos estados representados possuem uma representação vista de topo adicional. Em baixo está representado o estado final do sistema 2LE10\_P com duas cópias de si próprio (as linhas azuis indicam o limite da caixa de simulação) para uma melhor perceção dos problemas com as PBC que surgem nestes sistemas. O código de cores e tipo de representação são os mesmos da Figura 2.1. As moléculas de águas foram omitidas para uma maior claridade.

Para estudar o efeito do colesterol nesta propriedade estão também representados na Figura 3.21 os valores da espessura das membranas S e P para cada péptido. Analisando os gráficos para os três péptidos fica claro que enquanto nos sistemas com membranas P os valores variam, com maior ou menor intensidade, à volta de um valor médio, enquanto que nos sistemas S existe uma tendência para o aumento da espessura com o avançar das simulações.



**Figura 3.21.** Valores de distância entre os CM dos dois folhetos lipídicos da bicamada. Valores para os sistemas GA10\_P, LK10\_P e LE10\_P no gráfico em cima à esquerda, e valores comparativos entre os sistemas P e S nos restantes gráficos. Os valores são relativos à direção Z dos sistemas.

Visto que a grande diferença entre os sistemas S e P é a presença ou ausência de COL, as diferenças de comportamento dos valores de espessura entre os dois sistemas devem-se a tal facto. É sabido que a presença de COL em membranas torna-as, em geral, menos fluidas<sup>15</sup>, assim a membrana P poderá rearranjar os seus lípidos em resposta ao stress induzido pela interação dos péptidos com ela própria, não se refletindo assim a interação dos péptidos com a membrana nos valores desta propriedade. No sistema 1\_LE10\_P é também observado este comportamento, apesar de os valores da espessura aumentarem ao longo do tempo de simulação, mas em comparação com o sistema LE10\_S o aumento é muito menor. Além disso analisando as imagens da evolução de ambos os sistemas observa-se que o efeito do péptido LE10 na membrana P é muito menos pronunciado e mais lento. Isto aponta para que a presença de moléculas de COL na membrana seja um facto a ter em conta, apesar de não ser essencial, para o mecanismo de indução de curvatura na membrana pelo péptido LE10. A diferença de fluidez explicada atrás pode explicar o porquê da diminuição da invaginação membranar, pois no caso da membrana P a ausência de colesterol permite que os lípidos se arranjam de forma a neutralizar algum do stress induzido pelo péptido na membrana, resultando em maiores tempos de simulação para atingir a mesma curvatura apresentada nos sistemas LE10\_S.



**Figura 3.22.** Valores de distância entre os CM dos péptidos e da bicamada. Valores para os sistemas GA10\_P, LK10\_P e LE10\_P no gráfico em cima à esquerda, e valores comparativos entre os sistemas P e S nos restantes gráficos. Os valores são relativos à direção Z dos sistemas.

A distância entre os péptidos e as membranas estão representadas na Figura 3.22, e apresentam resultados semelhantes aos observados nos sistemas S, mostrando uma menor distância para o sistema LK10\_P, seguido do LE10\_P e por fim do sistema GA10\_P. Novamente surge a incongruência de o LE10 apresentar menores valores de distância entre os CM do péptido e a bicamada que o péptido GA10 apesar de ser visível, nas imagens da evolução temporal das simulações (ver Figura 3.18 e 3.19), que o péptido GA10 contacta com a membrana, chegando a inserir algumas partes da sua cadeia aminoacídica, enquanto que o péptido LE10 nunca se insere na bicamada lipídica. Tal incongruência prende-se com o já referido facto de estes valores serem calculados entre CM, que são influenciados pela forma da membrana levando a valores que não podem ser comparados diretamente. Quando comparando os valores péptido a péptido desta propriedade entre os sistemas P e S, verifica-se que em todos os péptidos a distância entre o seu CM e o CM da membrana é menor (em maior ou menor grau) para os sistemas com membranas P. A explicação das diferenças entre os sistemas S e P deve ser comum à abordada para as diferenças encontradas no estudo da espessura. Neste caso a maior fluidez das membranas P deve permitir uma maior inserção peptídica, sendo mais fácil aos aminoácidos dos péptidos LK10 e GA10 abrirem espaços entre os lípidos atingindo zonas mais interiores da membrana. Em relação ao péptido LE10 como este não se insere na membrana as diferenças da distância não se devem ao colesterol mas sim as diferentes formas da membrana nos sistemas LE10\_P e LE10\_S, pois como as membranas têm diferentes tamanhos, sendo o péptido o mesmo, a forma da curvatura será diferente resultando em diferentes CM.

A inserção de mais que um péptido de LE10 nos sistemas simulados mostrou que o efeito de curvatura da membrana induzido pelo péptido é dependente da concentração deste, pois como se pode ver na Figura 3.20 a curvatura é mais pronunciada com o aumento do número de péptidos LE10. A última imagem da Figura 3.20 permite também ver os problemas relativos às PBC, pois observa-se que nas zonas limítrofes do sistema (que estão delimitadas pelas linhas azuis) os lípidos não contactam com os adjacentes das suas cópias periódicas lado a lado, induzindo o sistema a atingir estados artificiais. A análise do efeito da concentração do péptido LE10 na invaginação membranar será discutida na secção seguinte.

Como o objetivo desta análise é o de investigar o papel do COL nas interações dos péptidos com a membrana lipídica, e os resultados até agora discutidos não mostram diferenças significativas, para além das já abordadas, não será efetuada uma análise tão aprofundada como a efetuada para os sistemas com membranas S. No entanto a análise efetuada aponta para que o principal efeito da ausência do lípido COL reside no aumento da fluidez membranar que por sua vez não altera em muito as interações entre os péptidos e a membrana, pois estas aparentam ser maioritariamente de carácter eletrostático.

### **3.2.3. Simulações Entre o Péptido LE10 e as Membranas M e L**

As simulações da interação dos péptidos GA10 e LK10 com a membrana S permitiram estudar aprofundadamente como se processa essa interação e que resultados provoca. Como foi possível observar nos dois tipos de sistemas (S e P) estudados nas secções anteriores, só o péptido LE10 apresentou atividade membranar forte (estes aspetos serão discutidos mais adiante), devido a isso, e na tentativa de ultrapassar as limitações anteriores do estudo da interação do péptido LE10 com as membranas, nomeadamente o aparecimento de artefactos devidos a problemas inerentes às PBC, apenas se prosseguiu com estudos de MD com este péptido. Para tal foi construído um modelo com a mesma composição da membrana S, mas com um tamanho superior (aproximadamente o dobro nas direções *X* e *Y*, ver Tabela 4), o modelo M. Além disso foram simulados sistemas com um, dois e quatro péptidos de LE10 com a membrana M (os sistemas 1\_LE10\_M, 2\_LE10\_M e 4\_LE10\_M, cada um com três réplicas), estando os péptidos próximos uns dos outros nos sistemas com dois e quatro péptidos (ver Figura 3.23).

A análise deste sistema será quase exclusivamente aqui apresentada e discutida através da observação da evolução dos sistemas simulados, pois análises como espessura membranar e distância entre péptido e membrana não fazem sentido neste caso pois como já foi discutido o cálculo destas propriedades baseia-se nos CM e estes variam com a forma. Análises de RMSD,

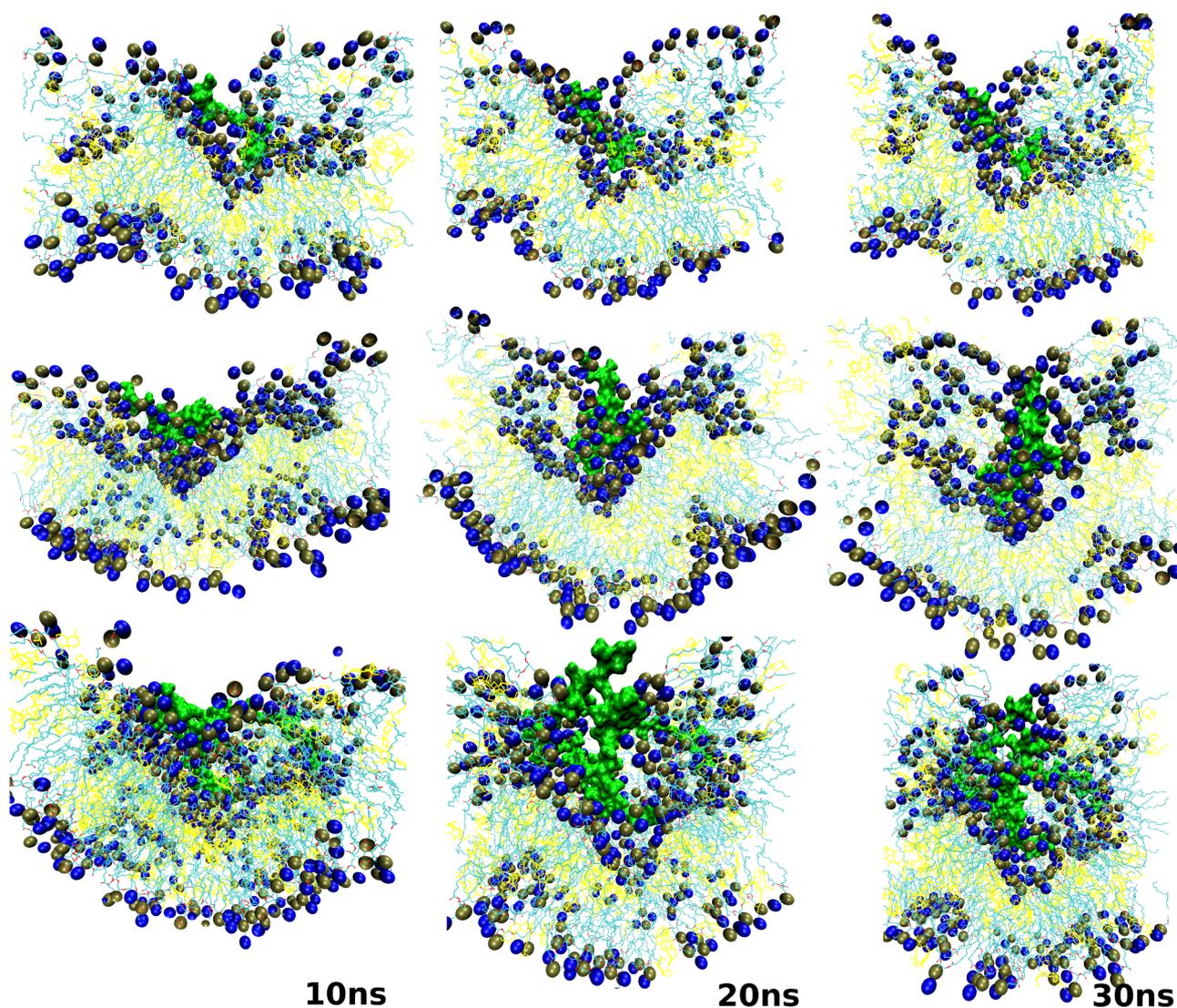
RMSF e  $R(g)$  indicam alterações nos péptidos provocadas pela interação com a membrana, quando o interesse desta dissertação é o contrário (alterações na membrana), e a análise de PHs não traz informações novas.

A evolução temporal das simulações de uma réplica de cada sistema está representada na Figura 3.23. As observações mais significativas são a forma da curvatura da membrana observado nestes caso, enquanto que na membrana S o péptido LE10 parecia provocar curvaturas na membrana de forma mais ou menos desordenada, na membrana M a curvatura origina uma estrutura mais ordenada. A membrana vai-se dobrando à volta do péptido LE10 formando uma espécie de vesícula à volta do péptido, uma vesícula incompleta.

Também é claro que a concentração do péptido tem uma elevada influência no efeito observado. O sistema 4\_LE10\_M é o sistema onde a curvatura membranar aumenta mais rapidamente. Já no sistema 2\_LE10\_M a velocidade de curvatura superior à do sistema 1\_LE10\_M.

Estas observações demonstram mais uma vez que é necessário ter bastante cuidado com as condições de fronteira aplicadas aos sistemas. Neste caso a membrana é maior o que faz com que as fronteiras do sistema estejam mais longe da zona onde o péptido interage com a membrana. Assim a influência das zonas de fronteira é menor no sistema, o que se nota facilmente comparando os sistemas LE10\_S e LE10\_M. No entanto os problemas relativos às PBC voltam a surgir, isto porque com o evoluir da dobra da membrana a caixa de simulação vai diminuindo nas direções  $X$  e  $Y$ , levando a resultados artificiais tal como acontecia no sistema LE10\_S. Neste caso os artefactos surgem bem mais tarde devido ao maior tamanho lateral deste sistema.

O facto de o efeito de curvatura membranar ser dependente da concentração do péptido está em concordância com os mecanismos propostos para explicar esse efeito. Existindo um maior número de péptidos de LE10 existirá um maior número de cargas negativas, de resíduos hidrofóbicos e de PHs entre a água e o péptido (maior número de moléculas de água arrastadas na direção da membrana), que irão em conjunto levar à deformação da membrana como já foi discutido.

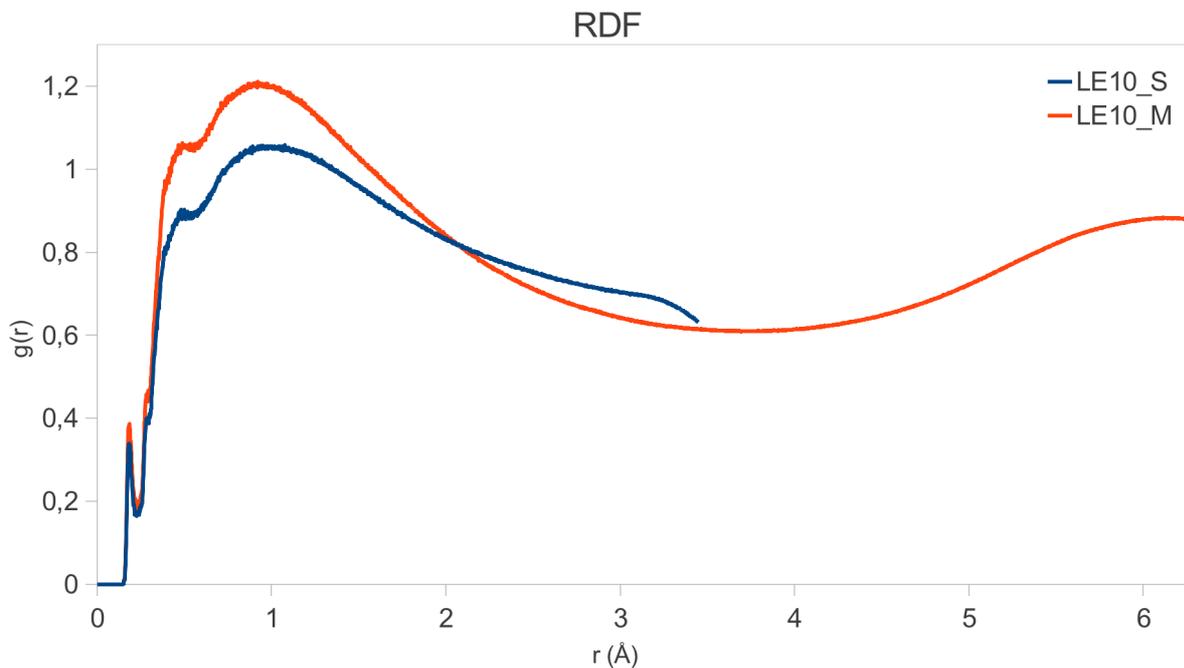


**Figura 3.23.** Representação dos sistemas 1\_LE10\_M (cima), 2\_LE10\_M (centro) e 4\_LE10\_M (baixo), a 10 20 e 30ns de simulação. O código de cores e tipo de representação são os mesmos da Figura 2.1. Note-se que foram aplicados cortes nas representações dos sistemas para uma melhor visualização da zona central. As moléculas de águas foram omitidas para uma maior claridade.

Para termo de comparação com o sistema LE10\_S foi calculada a RDF entre o péptido LE10 e as moléculas de água no sistema 1\_LE10\_M, e os resultados encontram-se representados ns Figura 3.24. Observa-se que os perfis de RDF são semelhantes, e que como o perfil de RDF do sistema 1LE10\_M abrange distâncias maiores é visível que a distâncias do péptido elevadas o perfil começa a tender para um valor próximo de um (comportamento normal, tal como foi afirmado na análise do sistema LE10\_S). As diferenças mais significativas entre as RDF dos dois sistemas acontecem no pico largo a cerca de 1Å de distância, onde o sistema 1LE10\_M apresenta valores ligeiramente superiores, o que está relacionado com o maior tamanho deste sistema.

A dobra membranar aqui observada leva a uma estrutura semelhante a uma micela incompleta. A formação desta vesícula levanta a questão se o péptido é internalizado pela membrana. É de lembrar que estes péptidos foram desenhados com o objetivo de serem MAPs

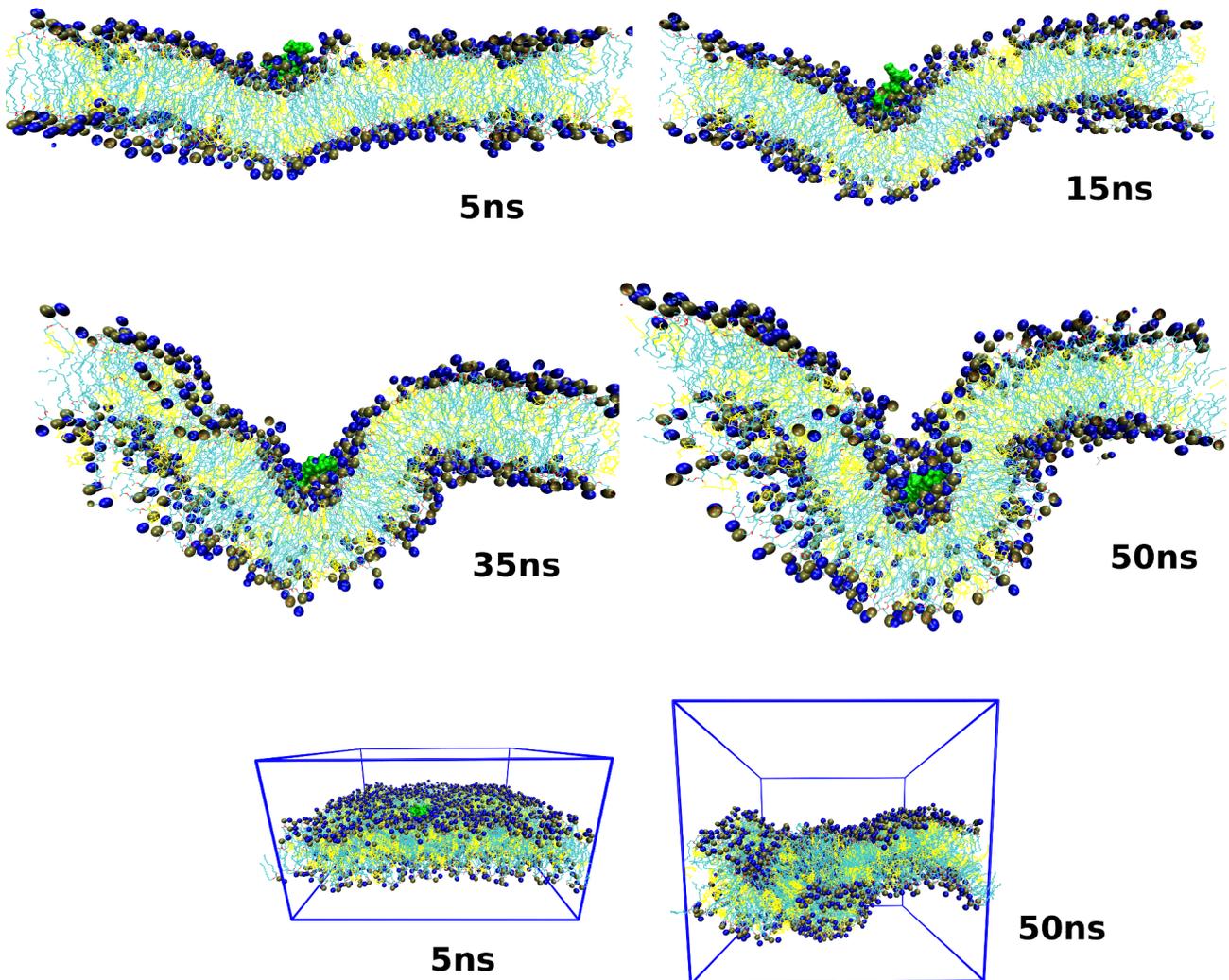
simples, e a internalização de péptidos por vesículas ou micelas é um dos mecanismos de internalização de CPPs bastante descrito na literatura<sup>93</sup>. Como tal para se ter a certeza se este corpo vesicular que se formou nestas simulações é real e não um artefacto, um novo modelo membranar, o modelo L, com a mesma composição membranar, mas bastante maior (maior que o dobro do tamanho lateral da membrana M) foi construído. Foram então simuladas a interação de um e quatro péptidos de LE10 (os quatro péptidos estavam próximos uns dos outros, ver Figura 3.26) com a membrana L.



**Figura 3.24** Valores de RDF calculados entre os péptidos de LE10 e as moléculas de águas durante o tempo de simulação de cada sistema (20ns para o sistema LE10\_S e 30ns para o sistema 1\_LE10\_M).

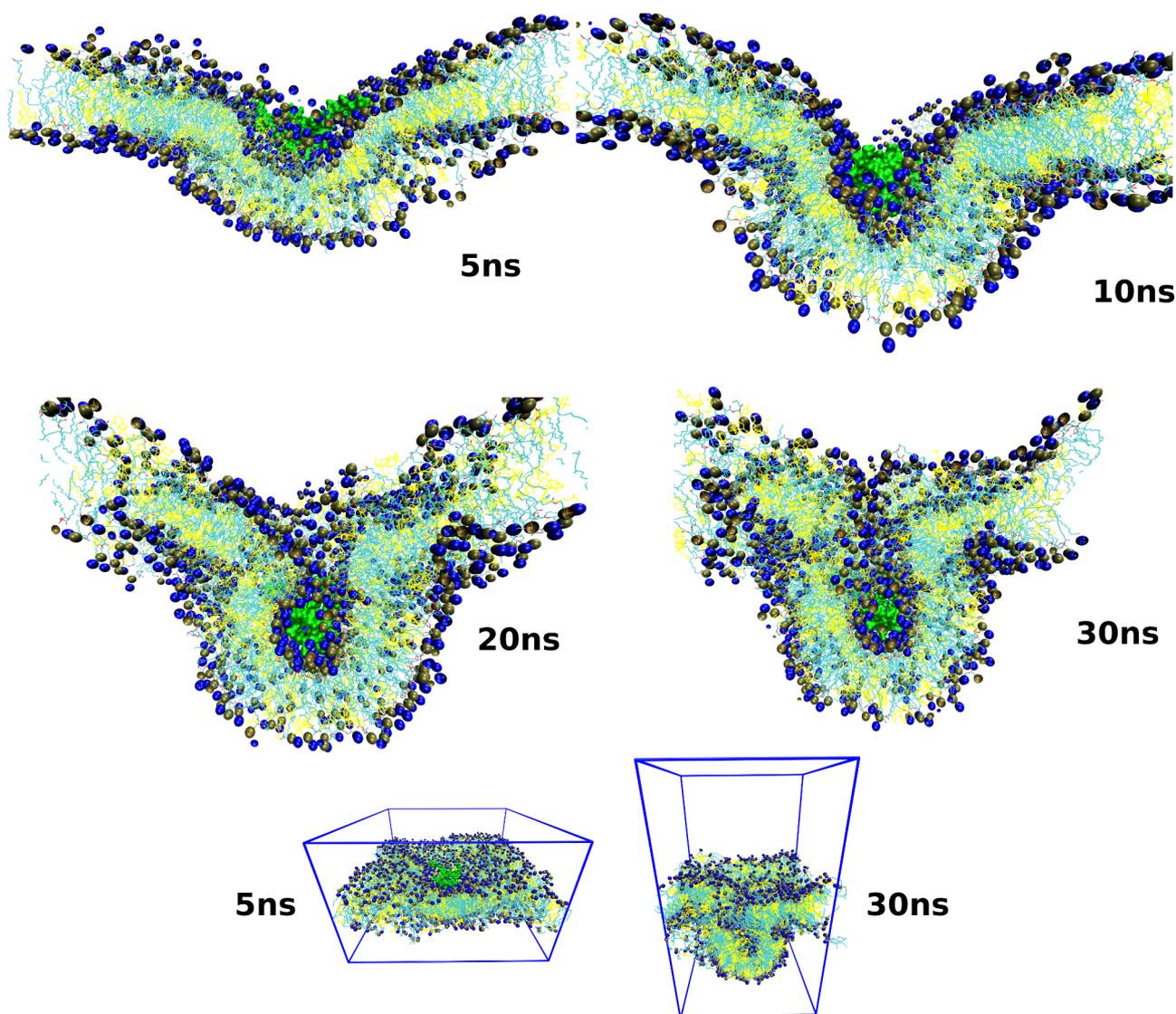
Na Figura 3.25 está então representada a evolução do sistemas 1\_LE10\_L em 30ns de simulação e na Figura 3.26 do sistema 4\_LE10\_L. Torna-se claro com as simulações destes sistemas grandes que, devido à interação com o péptido LE10, a membrana evolui de uma estrutura plana para uma estrutura com uma curvatura negativa, formando uma protuberância arredondada a envolver o péptido. Estas simulações demonstram, tal como as simulações com a membrana M, que o efeito é dependente da concentração peptídica. A evolução do sistema 4\_LE10\_L mostra que a membrana rapidamente se curva à volta dos quatro péptidos apresentando pouca evolução posterior, atingindo um equilíbrio. Esse decréscimo do grau de evolução acontece aquando do englobamento completo dos péptidos pela membrana. Neste ponto a reorientação lipídica para uma eventual coalescência do corpo vesicular e sua separação do resto da membrana exigiria um elevado nível de energia, uma vez que esses processos têm uma barreira de energia livre elevada<sup>181</sup>. Os investigadores Hyung-June Woo e Anders Wallqvist estudaram o AMP Magainina 2 através de simulações de MD com FF “coarse grained”<sup>182</sup>, e apesar de atingirem escalas de tempo da ordem de

microsegundos não observaram a separação de corpos vesiculares que surgiam nas suas simulações.



**Figura 3.25.** Representação da evolução do sistemas 1\_LE10\_M ao longo de 50ns de simulação. O código de cores e tipo de representação são os mesmos da Figura 2.1. Note-se que foram aplicados cortes nas representações dos sistemas para uma melhor visualização da zona central. Foram incluídas duas representações do sistema a 5 e 50ns (em baixo) sem cortes e com a caixa de simulação delimitada por linhas azuis para uma melhor perceção das diferenças globais entre os estados iniciais e finais desta simulação. As moléculas de águas foram omitidas para uma maior claridade.

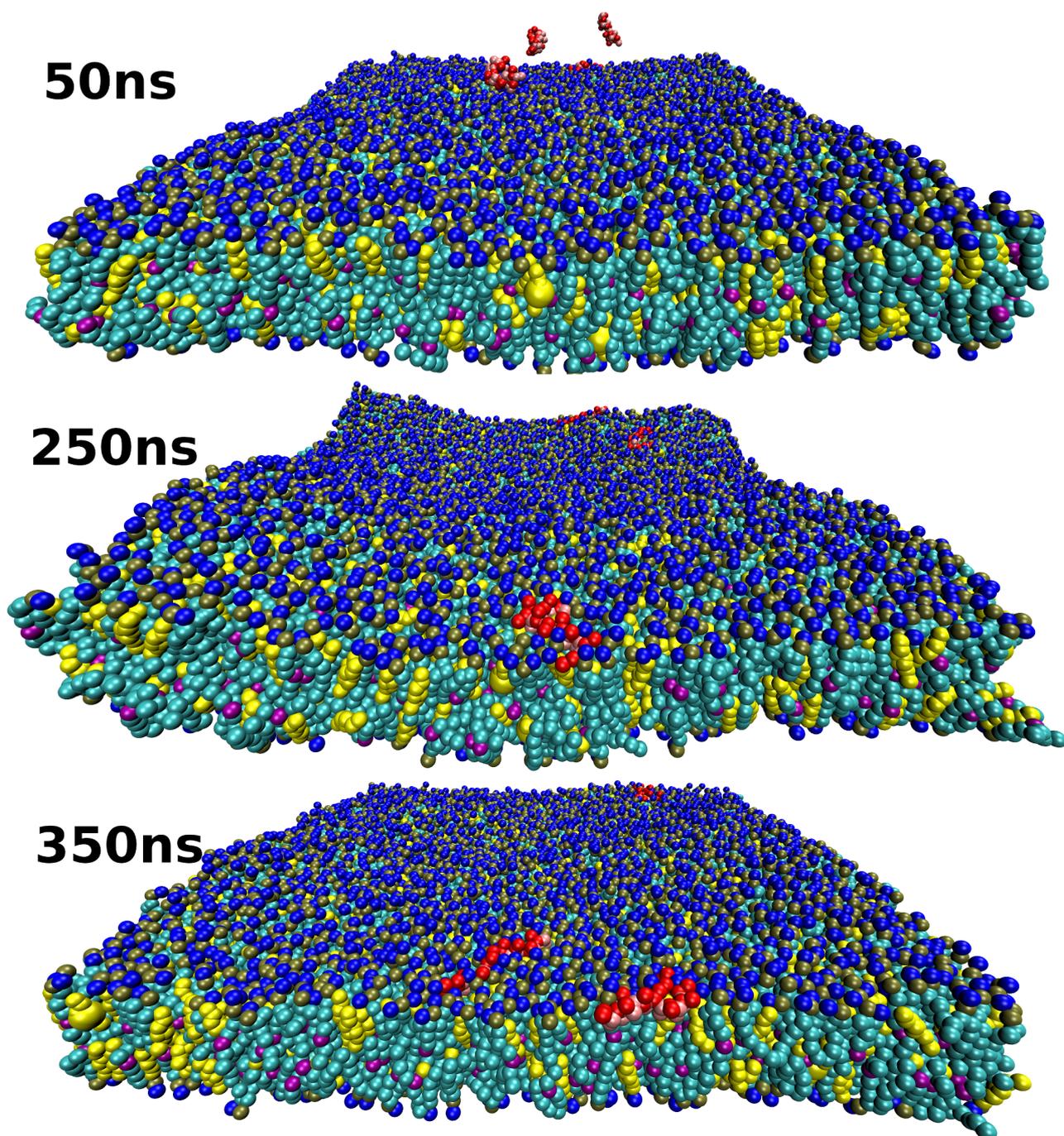
Claro que é necessário ter em conta que nesse estudo as membranas e péptidos estudados são diferentes, e os corpos vesiculares surgem quando existe uma concentração muito elevada desse AMP pois os investigadores queriam estudar o modelo carpete de atuação de AMPs. Nesse estudo os péptidos de Magainina 2 ficam no exterior do corpo vesicular, ao contrário do que sucede nas simulações efetuadas aqui, no entanto tal estudo mostra o quão difícil é observar a separação completa de corpos vesiculares por estudos de MD. Apesar de a separação da protuberância da membrana não ser observada não significa que não ocorra na realidade, podendo este péptido ser considerado um CPP (estes aspetos serão discutidos mais adiante).



**Figura 3.26.** Representação da evolução do sistemas 4\_LE10\_M ao longo de 30ns de simulação. O código de cores e tipo de representação são os mesmos da Figura 2.1. Note-se que foram aplicados cortes nas representações dos sistemas para uma melhor visualização da zona central. Foram incluídas duas representações do sistema a 5 e 30ns (em baixo) sem cortes e com a caixa de simulação delimitada por linhas azuis para uma melhor percepção das diferenças globais entre os estados iniciais e finais desta simulação. As moléculas de águas foram omitidas para uma maior clareza.

### 3.2.4. Simulação da Interação Entre o Péptido LE10 e a Membrana CG

Apesar de o estudo atrás referido com o AMP Magainina 2 com modelos “coarse grained” não ter mostrado a separação do corpo vesicular formado da membrana lipídica, foi decidido efetuar também um estudo “coarse grained” sobre a interação do péptido LE10 com uma membrana de POPC e COL. Esta decisão foi tomada na medida em que o sistema aqui descrito é diferente do estudado por Hyung-June Woo e colegas. Foram então construídos modelos “coarse grained” do péptido LE10 e de uma membrana, a membrana CG, bastante maior que as anteriores (aproximadamente o dobro da membrana L).



**Figura 3.27.** Representação do sistema 4\_LE10\_CG a 50, 250 e 350ns de simulação. O código de cores para os lípidos é o mesmo da Figura 2.1, e para os péptidos o mesmo da Figura 3.1, com todas as partículas representadas como esferas. As moléculas de águas foram omitidas para uma maior clareza.

A evolução do sistema LE10\_CG está presente na Figura 3.27. Verifica-se que, apesar de serem simulados 350ns, o péptido LE10 não provoca qualquer efeito na membrana de POPC e COL, ficando apenas adsorvido à superfície da membrana. Existe uma ligeira ondulação membranar que é natural e não provocada pelos péptidos (desaparece no final da simulação). A própria atracção entre o péptido LE10 e membranas de POPC deixou de ser forte (aos 50ns de simulação 3 dos 4 péptidos ainda se encontravam dissolvidos no solvente), e a forma como os péptidos de LE10 estão

adsorvidos à superfície membranar mostra que o jogo de forças eletrostáticas não acontece da mesma forma. Neste caso, os péptidos ficam com os resíduos de ácido glutâmico “virados” para as moléculas de água e os resíduos de leucina “virados” para o interior da membrana, apontando que para este caso a interação mais preponderante será a de hidrofobia (ver último estado apresentado na Figura 3.27).

A ausência do comportamento observado nas simulações “united-atom” anteriores deve-se muito provavelmente a algumas limitações que ainda existem no uso de FF “coarse grained”. Os FF “all-atom” ou “united-atom” são metodologias preferíveis no estudo de MAPs, uma vez que a habilidade de os FF “coarse grained” reproduzirem aspetos como alterações conformacionais é muito menor<sup>183</sup>. Além disso, as águas no campo de forças MARTINI, são representadas de uma forma específica, onde uma esfera com determinadas propriedades representa quatro moléculas de água<sup>177</sup> no sistema, o que acarretará inconvenientes relativos a graus de liberdade<sup>184</sup>. Estas partículas de água sem estrutura definida e sem carga são incapazes de descrever o ordenamento da água na vizinhança de superfícies hidrofóbicas ou de orientar as suas moléculas em resposta a campos eléctricos levando a que vários processos na interação péptido-membrana sejam descurados por este FF<sup>185</sup>. Como já foi discutido as interações entre o péptido LE10 e as moléculas de água circundantes, como a formação de PHs, parecem ter um papel importante no fenómeno de curvatura membranar provocado por este péptido. Assim os problemas acima referidos podem estar na origem da ausência do efeito de invaginação membranar nesta simulação com o FF “coarse grained” MARTINI.

O propósito das simulações com o FF MARTINI era perceber se é possível o estudo da interação de MAPs com membranas celulares. Apesar de a literatura mostrar vários exemplos de estudos desse tipo<sup>182,185,186</sup>, no caso aqui estudado tal não se verificou. O estudo das diferenças entre os campos de força utilizados estão fora dos propostos desta dissertação, por isso a análise do sistema 4LE10\_CG fica por aqui.

O sistema 4LE10\_CG foi o último estudo de MD. Uma discussão geral mais alargada será feita depois de apresentados e discutidos os resultados dos estudos laboratoriais a seguir descritos.

Para determinar se o comportamento demonstrado pelo péptido LE10 nos estudos de MD acontece na realidade ou é um artefacto, para validar as simulações efetuadas, e para uma melhor compreensão da interação do péptido LE10 com membranas biológicas, foram elaborados vários estudos laboratoriais, que serão de seguida apresentados e discutidos.

#### **3.3.1. Ensaaios com Lipossomas**

##### **3.3.1.1. Estudos de DLS**

Lipossomas de EPC e COL foram preparados com uma proporção de 60-40% (mol:mol), com a sonda hidrofóbica NR para o estudo da interação entre péptidos de LE10 e membranas lipídicas. A proporção lipídica nestes lipossomas é igual à presente nos modelos computacionais. O tamanho, PDI e  $\zeta$  foram medidos para soluções de lipossomas e lipossomas incubados durante três dias com péptidos de LE10 (30 e 300 $\mu$ M de concentração do péptido). Os resultados mostram claramente que o péptido interage com as membranas lipídicas dos lipossomas (ver Tabela 5). A solução de menor concentração peptídica (30 $\mu$ M) não afeta significativamente o tamanho lipossomal, quer aquando da incubação quer após três dias de incubação, tendo a PDI aumentado ligeiramente enquanto que o  $\zeta$  diminui significativamente. A redução do  $\zeta$ , que aumenta ao longo do tempo de incubação, indica que os lipossomas vão ficando mais instáveis devido ao péptido LE10. Na presença concentração peptídica mais elevada (300 $\mu$ M) os lipossomas são imediatamente afetados, o que pode ser comprovado pelos três parâmetros medidos. Após três dias de incubação, a interação dos péptidos com os lipossomas é ainda mais evidente. A população de lipossomas mudou dramaticamente, o que pode ser comprovado não só pelo elevado aumento dos valores médios do tamanho dos lipossomas, mesmo comparando com os valores finais obtidos para a dispersão de lipossomas sem incubação, como também pelo aumento da PDI.

Parâmetros	Lipossomas		Lipossomas com LE10 [30 $\mu$ M]		Lipossomas com LE10 [300 $\mu$ M]	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Tamanho (nm)	110,2 $\pm$ 0,4	111,8 $\pm$ 0,2	111,2 $\pm$ 0,03	114,4 $\pm$ 0,5	130,9 $\pm$ 2,6	262,8 $\pm$ 91,9
PDI	0,06 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,00	0,11 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,31
$\zeta$ (mV)	27,8 $\pm$ 3,6	20,7 $\pm$ 0,0	21,1 $\pm$ 1,1	12,7 $\pm$ 1,1	16,6 $\pm$ 0,0	13,8 $\pm$ 0,7

**Tabela 5:** Resultados de DLS de lipossomas de POPC e COL com NR, com e sem incubação com o péptido LE10 por três dias.

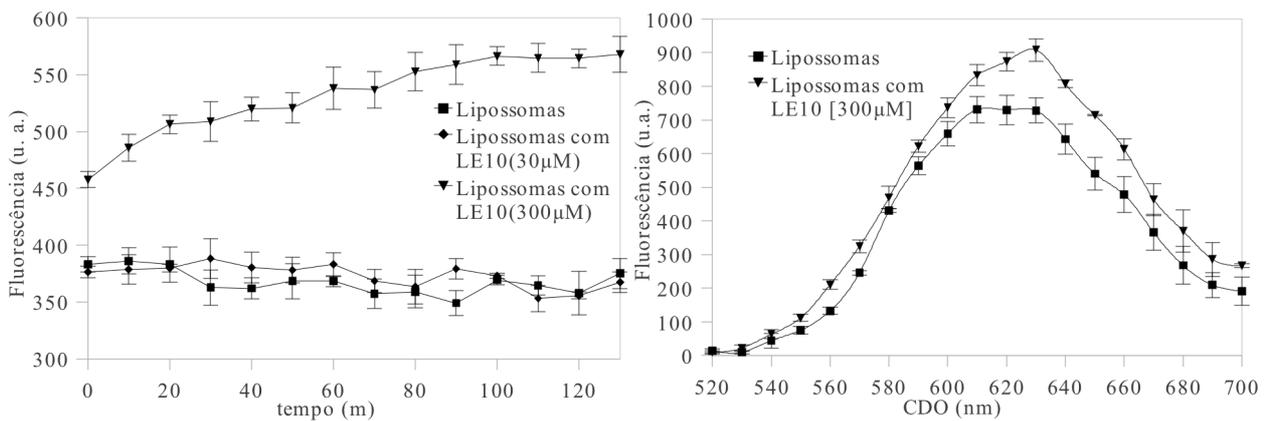
Os resultados da incubação com LE10 fornecem algumas indicações sobre os mecanismos de interação deste péptido com membranas. Os lipossomas sem incubação são estáveis durante o período de tempo estudado, mas os lipossomas com três dias de incubação mostram um comportamento diferente para as duas diferentes concentrações, o que está em acordo com os resultados das simulações, onde foi possível observar que a interação é dependente da concentração peptídica. Para a menor concentração peptídica os resultados mostraram um ligeiro aumento no tamanho lipossomal no final da incubação, no entanto para a concentração mais elevada existe um aumento desse tamanho logo depois da adição do péptido. Este aumento é ainda mais evidente no fim de três dias de incubação, e é acompanhado por um aumento da PDI, pois inicialmente a solução é monodispersa ( $PDI \leq 0,1$ ) e após a incubação com a concentração peptídica mais elevada, a solução torna-se polidispersa. Um valor tão elevado de PDI, como o obtido para a solução mais concentrada, pode ser explicado pela disrupção lipossomal e subsequente agregação dos lípidos em outras estruturas como agregados lipídicos desordenados, lipossomas gigantes, micelas ou vesículas, que terão uma distribuição de tamanhos muito larga, devido ao rearranjo aleatório dos lípidos. Aparentemente o péptido induz um aumento inicial do tamanho dos lipossomas, mas com a evolução da incubação os lipossomas parecem sofrer disrupção.

Estes resultados de DLS não contradizem os mecanismos evidenciados nas simulações de MD. De facto eles até podem ser explicados por as observações feitas nesses estudos, uma vez que a interação inicial do péptido com a membrana, visualizada nas simulações, pode aumentar o diâmetro dos lipossomas devido à desestabilização da membrana lipossomal. Além disso, nas simulações de MD as protuberâncias formadas que rodeavam os péptidos de LE10 continham várias moléculas de água (os péptidos tinham tendência a arrastar águas consigo) o que também poderia levar ao aumento do tamanho dos lipossomas. Elevadas concentrações do péptido podem provocar a sua disrupção, devido à desestabilização, observada nas simulações, que a concentrações peptídicas elevadas pode ser de tal nível que é intolerável para os lipossomas.

### 3.3.1.2. Estudos de Espectroscopia e Microscopia

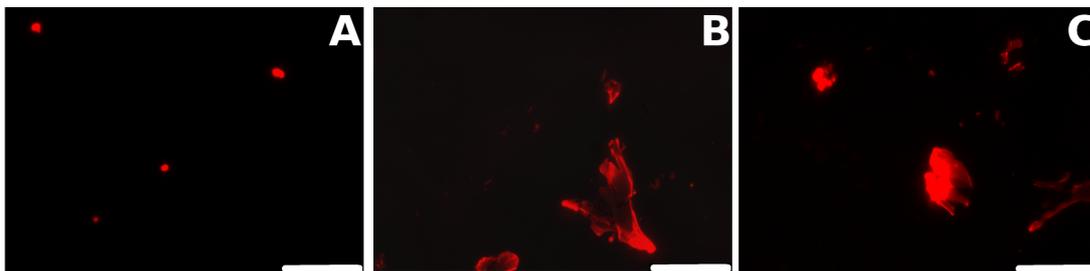
Os resultados de DLS mostram que o péptido interage com os lipossomas, mas não dão muita informação sobre os mecanismos por de trás dessa interação. Estudos de fluorescência com o corante NR foram efetuados na tentativa de desvendar alguns factos sobre esses mecanismos. A sonda NR é um corante lipofílico, pouco solúvel e fluorescente em água. Este composto foi adicionado na preparação dos lipossomas, e devido à sua lipofilicidade é esperado que se localize nas membranas dos lipossomas (único local com ambientes lipofílicos). O rendimento de fluorescência desta sonda aumenta bastante em ambientes hidrofóbicos, e mudanças de localização dos seus valores máximos de emissão de fluorescência são indicativos de conversões de fases lipídicas<sup>187</sup>. O autor Sturart e colegas<sup>188</sup> mostraram que, quando o NR se encontra nas fases lipídicas dos lipossomas (onde se localiza perto da interface entre os grupos cabeça dos lípidos e as molécula de água), o NR sofrerá um desvio do CDO do seu máximo de emissão de fluorescência para valores mais longos de CDO (o NR contacta com ambientes mais polares) indicando que fases lipídicas lamelares são convertidas em fases micelares, enquanto que desvios para CDO mais curtos (o NR contacta com ambientes mais apolares) indicam conversões para fases micelares invertidas.

A Figura 3.28 apresenta os resultados dos estudos de espectroscopia com o NR. Se o comportamento observado por MD acontecer na realidade, e a nossa interpretação dos resultados de DLS estiverem corretos, é expectável que o NR experimente desvios do CDO do seu máximo de emissão de fluorescência para CDO mais longos antes da disrupção dos lipossomas. Isto porque devido à curvatura da membrana, envolvendo os péptidos de LE10, mais moléculas de água conseguem inserir-se na interface de grupos cabeça/águas, o que leva a que o NR sinta um ambiente mais polar. O gráfico do espectro de emissão de fluorescência mostra um pequeno desvio batocrómico (desvio para CDO maiores, desvio para o vermelho) para as amostras incubadas com LE10, o que esta de acordo com o esperado. A cinética de fluorescência do NR mostra que a sua emissão para os lipossomas incubados com LE10 a 30 $\mu$ M é semelhante a emissão de fluorescência do NR nos lipossomas sem incubação. A emissão de fluorescência para os lipossomas incubados com o péptido a 300 $\mu$ M foi, no entanto distinta, aumentando ao longo do tempo de aquisição dos dados, sendo sempre significativamente superior quando comparada com os outros lipossomas. Estes resultados também são passíveis de serem explicados pelos fenómenos observados nas simulações, uma vez que a disrupção dos lipossomas e consequente rearranjo lipídico pode criar estruturas lipídicas que fornecem ambientes mais hidrofóbicos ao corante NR.



**Figura 3.28.** Cinética de fluorescência (direita) ao longo de 130 minutos e espectro de emissão (esquerda) da sonda NR, adquiridos a 25°C, de amostras de lipossomas com e sem incubação com o péptido LE10.

Na expectativa de confirmar a disrupção dos lipossomas pelos péptidos de LE10 foram preparadas amostras de lipossomas com NR, mas sem extrusão (para permitir a formação de lipossomas/vesículas maiores), para serem analisadas por microscopia de fluorescência. O tamanho da dispersão lipídica obtida variava entre 2 a 5µm (dados obtidos por DLS, não apresentados). À dispersão de lipossomas foi adicionada uma solução de LE10, de modo à concentração peptídica final fosse de 300µM, aquando da visualização ao microscópio de fluorescência da dispersão. A evolução temporal dessa dispersão foi seguida por 25m (ver Figura 3.29).



**Figura 3.29.** Imagens de microscopia de fluorescência de uma amostra de lipossomas com a sonda NR, incubada com o péptido LE10 (300µM), visualizada ao longo de 25 minutos. O péptido foi adicionado imediatamente antes da visualização. As barras brancas correspondem a 100µm. As imagens A, B e C foram adquiridas a aproximadamente 2, 12 e 25 minutos de incubação, respetivamente.

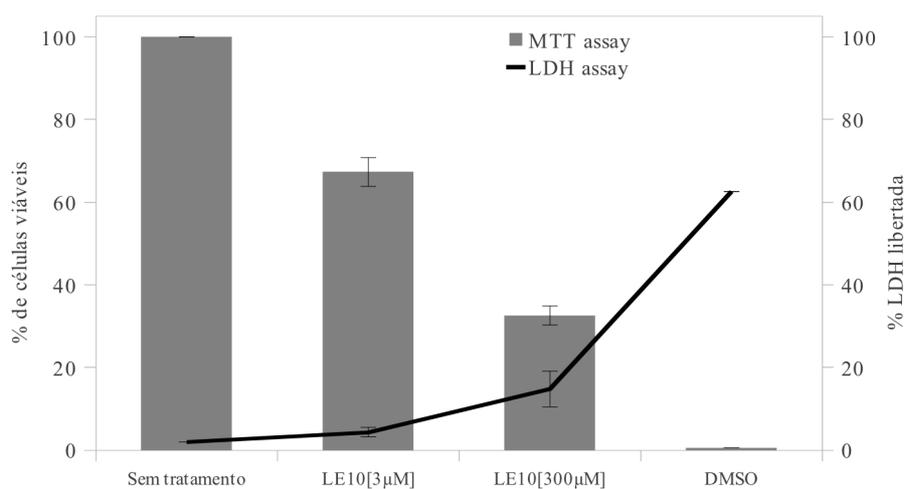
Como se pode constatar na Figura 3.29 A, inicialmente é apenas possível observar poucos pontos vermelhos, com um tamanho estimado de 2 a 7µm, que devem corresponder a lipossomas enormes, ou agregados de lipossomas. Com o aumento do tempo de exposição da dispersão ao péptido, surgem estruturas enormes na forma de grandes agregados e/ou filmes avermelhados, e os anteriormente numerosos pontos pequenos diminuem a sua ocorrência (ver Figura 3.29 B). Nas últimas imagens adquiridas a frequência de ocorrência das estruturas enormes aumentam, enquanto que as pequenas partículas vermelhas passaram a ser raramente observadas. As estruturas maiores estão coradas de vermelho (coradas com o NR) indicando que são compostas por lípidos, e podem de facto ser filmes lipídicos enormes (ver a maior estrutura presente na Figura 3.29 B) e agregados lipídicos aleatórios (ver a grande estrutura mais central da Figura 3.29 C). Assim estes resultados,

tal como os de DLS apontam para uma disrupção global dos lipossomas de EPC e COL pelo péptido LE10 a concentrações elevadas (300 $\mu$ M), fornecendo mais força à hipótese dos mecanismos observados nas simulações acontecerem na realidade, validando por consequência as simulações efetuadas.

### 3.3.2. Ensaio *In Vitro*

Para avaliar a interação do péptido LE10 com membranas celulares, a sua possível atividade anti-microbial e anti-celular foram elaborados testes preliminares com uma linha celular humana (linha celular BJ5ta) e com seis micro-organismos incubados com o péptido.

O estudo da interação do péptido com a linha celular BJ5ta, mais concretamente o estudo da eventual citotoxicidade do LE10, foi elaborado através da realização do ensaio da redução do MTT, que espelha a atividade vital metabólica de enzimas presentes na membrana mitocondrial das células, e através do ensaio da perda celular da enzima LDH, que é indicadora da integridade membranar das células. Os resultados estão expostos na Figura 3.30.



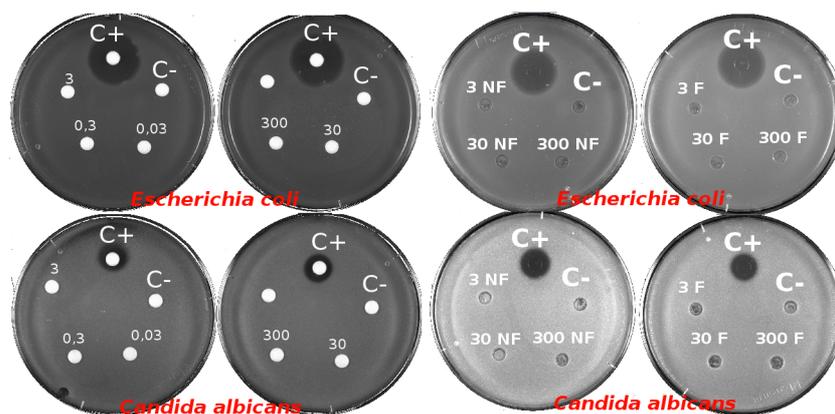
**Figura 3.30.** Resultados dos ensaios celulares da redução do MTT (colunas) e da libertação de LDH (linha) elaborados na linha celular humana BJ-5ta.

Para esta linha celular o péptido LE10 mostrou interagir com a membrana celular, comprometendo um pouco a sua integridade, uma vez que a libertação para o meio extracelular da enzima citosólica foi de aproximadamente 4 e 15% para as concentrações peptídicas de 3 e 300 $\mu$ M, respetivamente. Por sua vez, a toxicidade deste péptido no metabolismo das células BJ5ta revelou-se elevado, na medida em que a percentagem de células viáveis depois de 24h de incubação com o péptido LE10 decresceu para valores de 67% e 32% para as concentrações de 3 e 300 $\mu$ M de péptido, respetivamente. Tais valores indicam que o péptido LE10 é citotóxico, mesmo nas menores concentrações testadas, para estas células e eventualmente para muitas outras células de mamífero,

e sugerem que o mecanismo que leva à sua toxicidade pode não se dever apenas à disrupção membranar. Alguns investigadores que estudaram a toxicidade de MAPs em linhas celulares cancerígenas propuseram outros mecanismos, além da disrupção/desestabilização membranar, que levam à morte celular como a desintegração da mitocôndria<sup>189</sup>, a produção de espécies reativas de oxigénio, alterações na atividade das caspases e do potencial mitocondrial, entre outros<sup>190</sup>.

A comparação destes resultados com os obtidos nos estudos de MD não pode ser direta, uma vez que a membrana celular é uma entidade bastante complexa e dinâmica, o que foi abordado nas secções introdutórias, e não apenas um conjunto de lípidos ordenados, como foi simulado. No entanto, o lípido de POPC é zwitteriónico, correspondendo ao tipo de lípido mais comum em células eucarióticas<sup>27</sup>, e o COL está presente nos modelos computacionais em proporções semelhantes às presentes em células de mamíferos<sup>27</sup>, fazendo dos modelos membranares simulados uma boa aproximação para este tipo de estudos. Assim, a possibilidade de internalização do péptido LE10 via vesículas, sugerida nas simulações, pode ser o mesmo que leva ao resultados de MTT e LDH, uma vez que estes mostram que a membrana perde ligeiramente a sua integridade, o que pode dever-se a uma possível internalização do péptido por endocitose mas que, a elevadas concentrações do péptido, leva a uma desestabilização da membrana lipídica devido ao elevado número de péptidos a internalizar (o que está em concordância com os resultados com lipossomas). A toxicidade do péptido pode dever-se (além da pequena perda da integridade membranar) à propensão do péptido LE10 em interagir com membranas lipídicas observada nas simulações e nos ensaios com lipossomas. O péptido pode, por exemplo, uma vez internalizado, interagir com a membrana mitocondrial onde de facto a reação por trás do ensaio do MTT acontece.

Embora as atividades experimentais realizadas tenham mostrado claramente que o péptido LE10 promove a desestabilização membranar, a disrupção lipossomal e a morte celular nas membranas estudadas, os testes antimicrobianos realizados com quatro bactérias e duas leveduras não mostraram que o péptido possua atividade antimicrobiana. As bactérias testadas foram as Gram-positivas *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, e as Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. As leveduras foram as comuns *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. A Figura 3.31 à esquerda mostra os resultados dos primeiros testes de atividade antimicrobiana efetuados em placas de cultura, onde os micro-organismos eram colocados a crescer em meio de cultura sólido, e eram inseridos discos de celulose no interior desse meio sobre os quais eram colocadas as soluções com o péptido LE10 a diferentes concentrações e os controlos positivos (antibióticos potentes) e negativo (água). São apenas apresentados os resultados para os micro-organismos *Escherichia coli* e *Candida albicans* pois são exemplificativos aos resultados obtidos para todos os micro-organismos.



**Figura 3.31.** Resultados dos testes antimicrobianos em placas de cultura para os micro-organismos *Escherichia coli* e *Candida albicans*. À esquerda testes efetuados com discos de celulose e à direita testes efetuados com poços no meio sólido. Os números indicam a concentração peptídica, em  $\mu\text{M}$ , aplicada nessa zona, C+ o controlo positivo (ampicilina para bactérias e higromicina para leveduras) e C- o controlo negativo (água).

Como se pode ver, o péptido LE10 não provocou qualquer halo de inibição no crescimento de qualquer um dos microrganismos. Para excluir a possibilidade de a não obtenção de atividade antimicrobiana ser devido a uma possível retenção do péptido nos discos de celulose, foram elaborados novamente testes em cultura mas desta vez sem os discos. Neste caso eram criados uns poços manualmente na superfície do meio de cultura sólido, onde foram colocadas as soluções a testar. Como se pode ver na Figura 3.31 à direita o resultado foi o mesmo, isto é, ausência de atividade antimicrobiana.

Estes testes detetam atividades antimicrobianas fortes, não sendo de desconsiderar que o péptido possuísse alguma atividade deste tipo. Para avaliar essa possibilidade foram também efetuados testes antimicrobianos com os micro-organismos cultivados em meios líquidos. Os resultados desses testes também não mostraram atividade antimicrobiana para este péptido (resultados não apresentados).

Assim conclui-se que de facto o péptido não apresenta esta atividade, apesar da interação forte do péptido LE10 observada até este momento. Este facto é muito provavelmente devido às diferenças na composição e estrutura das membranas dos micro-organismos e da presença da parede celular. A presença de fosfolípidos aniónicos ou dos grupos fosfatos de lipossacarídeos nas bactérias Gram-negativas, ou de polissacarídeos ácidos, ácidos teicóicos e ácidos lipoteicóicos nas bactérias Gram-positivas, além de fosfomananos, cadeias de quitina e a camada de beta-1,3-glucano nas leveduras fornecem uma carga superficial negativa às paredes celulares e membranas destes microorganismos<sup>191</sup>. A parede celular com os seus constituintes e sua carga superficial negativa, fornece uma barreira cobrindo a membrana lipídica, barreira essa que pode ser intransponível pelo péptido LE10. A carga negativa pode evitar que o péptido contacte com a membrana celular desses organismos devido a repulsões eletrostáticas, e os próprios constituintes da parede celular podem

bloquear a passagem do péptido ou aprisiona-lo.

### **3.4 Discussão Global dos Resultados**

Depois de apresentados e discutidos todos os resultados, mostra-se adequado uma discussão global dos aspetos mais importantes a reter nesta dissertação. Resumidamente, os objetivos ou motivação desta dissertação passavam pelo estudo de interações entre modelos de MAPs e membranas celulares, devido à elevada importância deste tipo de interação (ver secção 1.4 Motivação da Dissertação). Essa interação começou por ser estudada por simulações de MD, que além das inúmeras vantagens e possibilidades, é dos poucos tipos de estudo que permite a caracterização de toda a evolução temporal deste tipo de interações.

As simulações de MD mostraram que o péptido GA10 tem tendência a ser adsorvido à superfície das membranas lipídicas testadas. Esta constatação está de acordo com o esperado olhando para a sua estrutura aminoacídica, pois metade dela é composta por resíduos hidrofóbicos, as alaninas, que irão induzir o péptido a interagir com a membrana, devido ao seu interior ser o único local dos sistemas simulados onde existe uma zona hidrofóbica. No entanto, e apesar de este péptido conter vários resíduos de glicina que conferem mais flexibilidade ao péptido, a inserção do péptido no núcleo hidrofóbico membranar é energeticamente desfavorável, pois a energia para ultrapassar a barreira hidrofílica das cabeças lipídicas é elevada para este péptido, o que se traduz na adsorção do péptido à superfície membranar com algumas zonas mais inseridas na mesma (as extremidades do péptido). Este péptido é eletricamente neutro, servindo como controlo negativo para o estudo da propriedade carga superficial na interação de MAPs com membranas, e mostrou não ser um MAP como era o objetivo aquando da sua projeção.

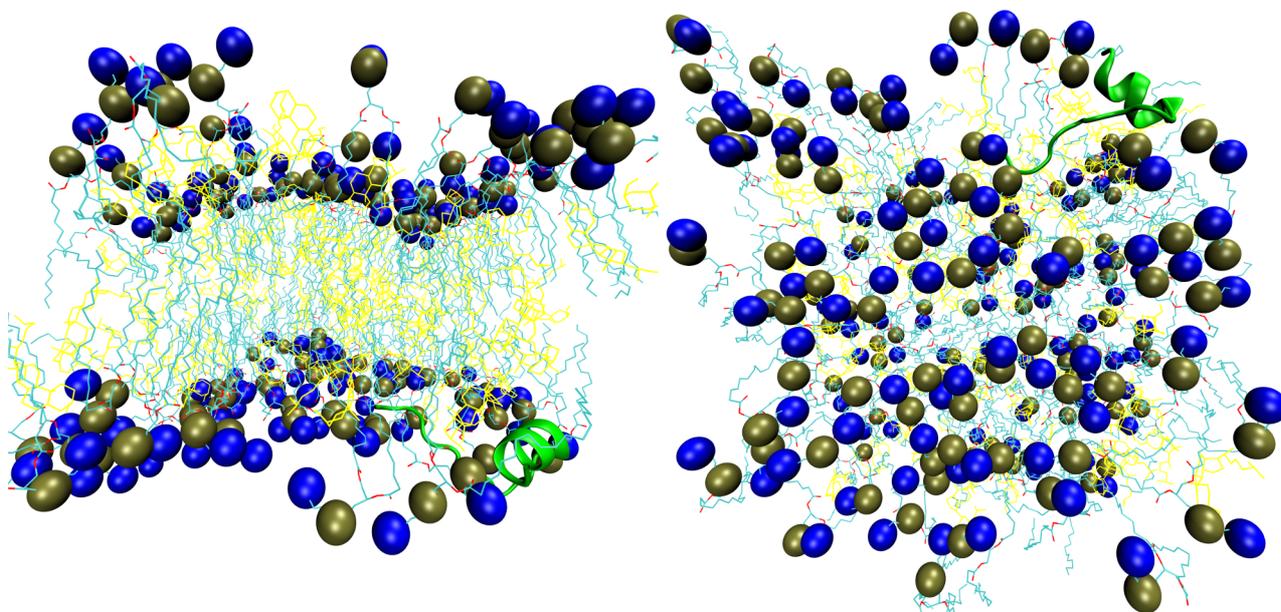
O péptido LK10 tem elevada carga superficial positiva devido às lisinas na sua constituição, e possui uma percentagem elevada de conteúdo hidrofóbico, sendo assim projetado para ser um modelo representativo de MAPs. Os estudos de MD mostraram que este péptido interage mais com as membranas lipídicas estudadas, inserindo-se bastante na zona hidrofóbica da membrana numa conformação curiosa, pois o péptido LK10 era de entre os três o que apresentava uma estrutura menos enovelada (o péptido GA10 ficava com a conformação mais enovelada, talvez devido aos resíduos de glicina), com os seus resíduos de leucina em geral localizados mais no interior da membrana, como que apontando para o centro da mesma, devido a serem resíduos hidrofóbicos e como tal mais energeticamente favoráveis a se inserirem no interior lipídico, e com os resíduos de lisina em geral localizados mais superficialmente, como que apontando para as cabeças dos lípidos de POPC, devido à atracção entre a carga positiva destes resíduos e a negativa dos grupos fosfato

dessas cabeças.

Este péptido poderá ser considerado um MAP, mas seria necessário um estudo mais aprofundado, uma vez que os resultados obtidos por MD são inconclusivos. Apesar de em vários estudos de MD se observar AMPs a criarem poros nas membranas ou CPPs a passarem através delas, as escalas de tempo simuladas, que andam na ordem das centenas de nanosegundos, podem não ser suficientemente longas para o estudo adequado destes fenómenos. Estudos experimentais apontam para que, por exemplo, as escalas de tempo necessárias para que CPPs atravessem membranas celulares sejam da ordem dos minutos<sup>95,192</sup>. Isto significa que apesar de estes fenómenos poderem ser observados em simulações de MD, a sua não observação não indica com certeza que estes fenómenos não aconteçam, pode a escala de tempo simulada não ter permitido chegar a tais estados, ou o sistema estar preso num mínimo de energia local, iniciando-se assim um jogo de probabilidades. É necessário ter em conta que em nenhuma das simulações efetuadas com este péptido, que ultrapassaram a dezena (incluindo simulações efetuadas com os sistemas S usando o GROMACS 4.5.5 não apresentadas e discutidas nesta dissertação), os sistemas evoluíram no sentido do atravessamento ou formação de poros ou elevada desestabilização membranar, por parte do péptido LK10. Além disso, foram elaborados alguns testes antimicrobianos preliminares, seguindo o mesmo procedimento dos primeiros testes em placa de cultura efetuados para o péptido LE10, com as mesmas concentrações e com os mesmos micro-organismo. Tal como para o péptido LE10 este péptido não mostrou qualquer atividade antimicrobiana forte. Assim analisando em conjunto ambos os tipos de estudo, parece que o péptido LK10 não é um MAP forte.

A projeção do péptido LK10 não foi ocasional. Para além dos propósitos já enunciados, a escolha deste resíduos deveu-se ao facto de existir alguma literatura sobre o desenho de péptidos contendo apenas leucina e lisina na tentativa de se obterem AMPs sintéticos potentes. Nesses casos os péptidos são compostos de leucina e lisina devido à carga superficial positiva, e devido à conhecida apetência destes tipo de péptidos em se estruturarem em alfa-hélice<sup>193</sup>, e péptidos em alfa-hélice com carga positiva são muito comuns entre AMPs, quer naturais quer sintéticos, para além de serem os mais estudados e caracterizados (o que é comprovado com o número de vezes que péptidos com alfa-hélice fazem parte do título dos artigos científicos nas referências bibliográficas desta dissertação). Exemplos deste tipo de estudo são dados pelo autor Béven e colegas que desenharam a sequência peptídica KLLKLLKLLKLLK, de 15 aminoácidos que demonstrou uma atividade antimicrobiana forte<sup>194</sup>, ou dos investigadores Blondelle e Houghten<sup>195</sup> que desenharam vários modelos peptídicos de 8 a 22 aminoácidos de leucina e lisina nas suas estrutura primárias, de forma a serem anfipáticos e em alfa-hélice, demonstrando a sequência acetil-KKLLKLLKLLKLLK-NH<sub>2</sub> a atividade antimicrobiana mais forte. Existem também outros autores

que às sequência peptídicas de leucina e lisina adicionam um ou outro aminoácido com determinado objetivo, como Su-Jin Kang e colegas<sup>196</sup> que adicionaram resíduos de triptofano (W) devido a este ter um papel importante nas interações com membranas, pois tem elevada propensão em se inserir em membranas e se particionar na interface membrana/água<sup>197</sup>, além de estabilizar a estrutura de alfa-hélice<sup>193</sup>. Estes autores obtiveram também algumas sequências de péptidos com atividade antimicrobiana considerável, como o péptido KLLKWLLKL-NH<sub>2</sub>. Apesar da existência de alguma literatura sobre péptidos de leucina e lisina poucos artigos estudam ou revelam pormenores sobre a interação entre os péptidos e a membrana ao nível estudado nesta dissertação. Os estudos são mais direcionados para a obtenção de péptidos com atividade antimicrobiana forte e baixa atividade hemolítica (a principal desvantagem à aplicação terapêutica de muitos AMPs devido ao facto que vários AMPs destroem os glóbulos vermelhos ou são citotóxicos para células de mamíferos<sup>198</sup>), e não direcionados para obter noções de causa-efeito da composição e estrutura peptídica na atividade membranar.



**Figura 3.32.** Representação frontal (esquerda) e inferior (direita) da réplica 1 do sistema LK10\_S após 50ns de simulação. O código de cores e tipo de representação são os mesmos da Figura 2.1. As moléculas de águas foram omitidas para uma maior claridade.

Como foi discutido na simulação do péptido LK10 em água, ele não apresenta nenhuma tendência estrutural, muito provavelmente a alternância constante entre resíduos não permite a criação de domínios, como acontece na formação de alfa-hélices. No entanto em alguns momentos das simulações com os sistemas LK10\_S o péptido, na sua interação com a membrana, adquire alguma conformação em alfa-hélice (ver Figura 3.32), mostrando que realmente este tipo de péptidos tem tal tendência. Essa conformação é apenas transitória e afeta apenas alguns dos aminoácidos do péptido. Assim todos estes factos mostram que desconsiderar o péptido LK10 um

MAP pode ser um erro, tendo em conta os resultados obtidos nesta dissertação e todo o conhecimento já obtido nos estudos com este tipo de péptidos.

O péptido LE10 é claramente um MAP potente. Nas simulações mostrou uma interação com a membrana tão forte que esta deforma-se, curvando de forma a envolver o péptido. Esta interação parece ser devida a uma oposição de forças eletrostáticas atrativas e repulsivas entre as cargas negativas dos resíduos de ácido glutâmico, as cargas positivas dos grupos colina e as cargas negativas dos grupos fosfatos dos lípidos de POPC. Além disso o resíduo de leucina, devido à sua elevada hidrofobicidade, e as PHs que o péptido LE10 forma com as moléculas de água parecem ter também um papel importante nessa interação.

Com o aumento do tamanho das membranas simuladas, as protuberâncias membranares formadas pela sua curvatura à volta do(os) péptido(s) de LE10 apresentam uma forma esférica, parecendo um processo de endocitose. No entanto, o fecho e separação dessas protuberâncias esféricas não é observado.

Classificar este péptido como AMP ou CPP (seguindo a classificação clássica e não a de MAP) é controverso, tal como a própria divisão desses dois grupos. O péptido LE10 é pequeno e possui carga negativa proveniente dos seus resíduos de ácido glutâmico. Estas características correspondem à classe de AAMPs de acordo com as classes de AMPs definidas num trabalho de Kim A. Brogden<sup>73</sup>. Além disso, este péptido mostrou atacar a integridade membrana da linha celular BJ5ta (ainda que de forma ligeira), e ser citotóxico para com essas mesmas células, e é conhecida a atividade citotóxica de muitos AMPs para com células de mamíferos, o que aponta para uma classificação de AMP. Outro argumento a favor da classificação do péptido como AMP é o facto de a descrição de AMPs carregados negativamente ser comum, ao contrário dos CPPs, e os resultados de DLS e fluorescência dos estudos com lipossomas mostram que as suas membranas lipídicas sofrem disrupção com o aumento da concentração de LE10, o que é característico de AMPs. No entanto, alguns dos poucos estudos sobre AAMPs propõem que um dos mecanismos principais responsável pela sua atividade antimicrobiana é a formação de pontes salinas catiónicas entre iões metálicos, como o de zinco ( $Zn^{2+}$ ). O efeito observado nas simulações e nos ensaios com lipossomas não se deve à formação de pontes salinas com iões metálicos, visto que, apesar de nos ensaios *in vitro* existirem vestígios de iões metálicos nos meios de cultura, eles não existem nas simulações ou nas soluções usadas nos ensaios com lipossomas.

A invaginação membrana observada nas simulações, bem como os testes antimicrobianos apontam para uma classificação de CPP, uma vez que existem vários CPPs que são internalizados por diferentes formas de endocitose, fenómeno que explica o que é observado nas simulações de MD, pelo menos as suas fases iniciais. Além disso a morte celular provocada por este péptido

parece ser devida a fenómenos já no interior celular, pois a perda da integridade membranar é pequena, o que indica que o péptido será internalizado. A carga positiva é descrita como uma característica essencial dos CPPs, no entanto Martín e colegas desenharam o péptido aniónico SAP(E), com a sequência VELPPPVELPPPVELPPP. O péptido SAP(E) é sintético e surge como resultado de uma investigação do papel da carga superficial dos péptidos nas suas propriedades de penetração de células<sup>180</sup>. Os investigadores trocaram os resíduos de arginina com carga positiva por resíduos de ácido glutâmico de um CPP bem conhecido, o SAP (VRLPPPVRLPPPVRLPPP). Os resultados dos testes que efetuam mostraram claramente que a carga positiva não é uma característica essencial da atividade do SAP, uma vez que o péptido SAP(E) mostrou propriedades de internalização semelhantes, como a sua eficiência e mecanismo, facto que pode ser estendido a outros CPPs. Esse estudo em conjunto com esta dissertação mostram que a carga positiva pode não ser uma característica essencial à atuação de CPPs.

Isto não quer dizer que o péptido LE10 possa ser considerado um CPP. Aliás os resultados controversos obtidos nos estudos com o péptido LE10 trazem mais argumentos para a recente discussão sobre se AMPs e CPPs são diferentes tipos de péptidos, ou se são um grande grupo e diversificado de péptidos que interagem com membranas. Este péptido, como outros referidos na secção 1.2.4, possui propriedades ambíguas o que torna a sua classificação numa dos dois grupos clássicos muito difícil. Os resultados aqui mostrados estão de acordo com a hipótese de AMPs e CPPs pertencerem na realidade apenas a um grupo denominado MAP, fazendo do LE10 um MAP com forte atividade.

Um facto interessante nesta dissertação foi o desenho um péptido que demonstrou características interessantes, o LE10. Este péptido pode com alguma variação na sua estrutura ser um vetor promissor para entrega de fármacos a células. Muito estudo seria necessário para que tal sucedesse, principalmente para diminuir a sua citotoxicidade. No entanto nenhum dos vetores ou fármacos desenvolvidos, sem bases naturais, usados atualmente foram desenhados sem muito trabalho. Além disso uma vez que este péptido leva à disrupção de membranas lipídicas em lipossomas pode também, com modificações na sua estrutura, ser aplicado na área do design de antibióticos, ou na terapia de cancro (o estudo de AMPs como agentes indutores de morte de células cancerígenas não é algo novo<sup>189</sup>, pois podem atacar a membrana dessas células) para induzir a morte ou transportar fármacos em tumores.



# ***Capítulo 4***

## ***Trabalho Futuro***



A projeção desta dissertação parece ter sido adequada, pois permitiu todos os estudos propostos bem como alguns estudos adicionais. É necessário ter em conta que todo o trabalho foi realizado em apenas um ano letivo, o que limita bastante o tipo de estudos possíveis ou o seu aprofundamento sobre os temas a investigar. Assim, e porque um investigador nunca se dá por satisfeito com as suas descobertas, serão agora discutidos alguns aspetos, tais como possíveis estudos, que poderão ser efetuados de futuro para determinar alguns aspetos aqui não abordados. Algo que pode intrigar nesta dissertação foi o facto de os estudos laboratoriais terem sido efetuados apenas com o péptido LE10 (com exceção de testes antimicrobianos preliminares efetuados também com o péptido LK10). Isto explica-se no forte efeito que o péptido apresentou, que sendo forte seria mais facilmente comprovado experimentalmente, ficando para trabalho futuro efetuar testes laboratoriais também com os outros dois péptidos (ou futuros péptidos desenhados) para também comparar os resultados de MD destes péptidos com resultados experimentais.

As propriedades demonstradas do péptido LE10 fazem dele um vetor promissor para entrega de fármacos. Assim o trabalho futuro, em continuação dos estudos aqui elaborados, terá forçosamente de passar pela modificação estrutural deste péptido para melhorar as suas propriedades como vetor. Isto porque, apesar de o estabelecimento de relações de causa-efeito entre a estrutura e composição peptídica ser de extrema importância, a possibilidade de aliar esse estudo à construção de um elemento com possibilidade terapêutica terá tanta ou mais importância, pois no final de contas o que mais importa é a obtenção de um efeito que possa de alguma forma dar uma pequena ajuda à vida das pessoas ou animais.

Os péptidos projetados permitiram adquirir várias informações sobre os mecanismos por detrás das interações entre MAPs e membranas celulares. O desenho de outros péptidos, partindo destes como base (principalmente dos péptidos LK10 e LE10), mas com menos alternância peptídica (para permitir a aquisição de estrutura terciária) e com possíveis adições de outros aminoácidos (como o triptofano) são bons projetos de futuro, além de que a projeção de péptidos com elevada propensão para a formação de PHs com a água para descortinar o papel destas interações seria também um estudo muito pertinente.

As simulações por MD efetuadas permitem uma análise muito variada e aprofundada sobre os sistemas estudados. Neste caso, como o objetivo passava por realizar também estudos laboratoriais algumas ferramentas de análise de simulações MD que poderiam fornecer informações

relevantes não foram usadas. Um desses casos é o cálculo do potencial de força média (PMF, do Inglês “potential of mean force”). O cálculo do PMF é efetuado adicionando uma força ao péptido em estudo obrigando-o a atravessar a membrana lipídica, obtendo durante esse processo os valores de energia livre do péptido ao longo da direção que o péptido é obrigado a tomar, descortinando assim qual o local onde a energia livre é mínima, ou seja onde o péptido tem tendência a se localizar. A grande vantagem desta técnica é que evita os problemas relacionados com as escalas de tempo simuladas (neste caso não se espera que o péptido se dirija para o seu mínimo de energia), o que faz desta análise algo a fazer de futuro.

Muitos outros estudo poderão ser efetuados, aqui foram abordados alguns dos mais significativos, não esquecendo que a maior limitação à investigação/estudo de qualquer tema é a falta de criatividade e inovação.

# ***Capítulo 5***

## ***Conclusão***



Neste trabalho descreveu-se a interação de três modelos peptídicos com membranas celulares por estudos de MD, sendo posteriormente efetuados estudos com lipossomas e estudos *in vitro* para um deles. Os péptidos foram desenhados como modelos de MAPs.

As simulações de MD mostraram que o péptido GA10 não tem atividade membranar significativa, ao contrário do péptido LK10 que mostrou alguma atividade e do péptido LE10 que mostrou uma forte interação com a membrana, indicando que o primeiro não é um MAP, o segundo pode ser um MAP e o último é um MAP forte. A interação do péptido LE10 com as membranas de POPC e COL e de apenas POPC evidenciada nas simulações, parece mostrar estados iniciais de endocitose, invaginado-se a membrana à volta do péptido. Os estudos experimentais estão em concordância com as simulações, demonstrando o poder de estudos de MD, e mostraram que o péptido LE10 a elevadas concentrações leva à ruptura de membranas lipossomais, compromete ligeiramente a integridade membranar de células de fibroblastos, sendo citotóxico para elas mas não para micro-organismos.

Os resultados desta dissertação indicam que a carga positiva não é uma característica essencial para a ação de CPPs, e por consequente a ação de MAPs, e dão também mais força à classificação de CPPs e AMPs como MAPs.

Devido às características do péptido LE10, modificações na sua estrutura podem lhe fornecer propriedades promissoras para as áreas de design de antibióticos, terapia de cancro e principalmente entrega de fármacos.



# ***Capítulo 6***

## ***Referências Bibliográficas***



## 6. Referências Bibliográficas

1. Peter Raven; George Johnson. *Biology*. (McGraw-Hill Companies, Inc.: 2001).
2. Langmuir, I. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. II. Liquids.1. *Journal of the American Chemical Society* **39**, 1848–1906 (1917).
3. Gorter, E. & Grendel, F. On Bimolecular Layers of Lipoids on the Chromocytes of the Blood. *Journal of Experimental Medicine* **41**, 439–443 (1925).
4. Danielli, J. F. & Davson, H. A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **5**, 495–508 (1935).
5. ROBERTSON, J. D. The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochemical Society symposium* **16**, 3–43 (1959).
6. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**, 720–731 (1972).
7. Engelman, D. M. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**, 578–80 (2005).
8. Clarke, S. The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes, 2nd edition (Tanford, Charles). *Journal of Chemical Education* **58**, A246 (1981).
9. Willard, A. P. & Chandler, D. The role of solvent fluctuations in hydrophobic assembly. *The journal of physical chemistry. B* **112**, 6187–92 (2008).
10. Chandler, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature* **437**, 640–7 (2005).
11. Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J. & Ninham, B. W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* **72**, 1525 (1976).
12. Jamieson, G. A. & Robinson, D. M. *Mammalian cell membranes. Volume 2: The diversity of membranes*. (Butterworth: London, 1977).
13. Haines, T. H. & Dencher, N. A. Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Letters* **528**, 35–39 (2002).
14. White, D. A. The phospholipid composition of mammalian tissues. *Form and function of phospholipids*. 441–482 (1973).
15. Henriksen, J. *et al.* Universal behavior of membranes with sterols. *Biophysical journal* **90**, 1639–49 (2006).
16. Mathai, J. C., Tristram-Nagle, S., Nagle, J. F. & Zeidel, M. L. Structural determinants of water permeability through the lipid membrane. *The Journal of general physiology* **131**, 69–76 (2008).
17. Rothman, J. & Lenard, J. Membrane asymmetry. *Science* **195**, 743–753 (1977).
18. Hricovini, M. Structural aspects of carbohydrates and the relation with their biological properties. *Current Medicinal Chemistry* **11**, 2565–2583 (2004).
19. S.A. Brooks, Dwek, M. V. & Schumacher, U. *Functional and molecular glycobiology*. (BIOS Scientific: Oxford, 2002).
20. Fukuda, M. Cell surface carbohydrates: cell type-specific expression. *Molecular and Cellular Glycobiology* (2000).
21. Jeremy M. Berg, Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Biochemistry*. (New York : W.H. Freeman: 2002).
22. Goochee, C. F., Gramer, M. J., Andersen, D. C., Bahr, J. B. & Rasmussen, J. R. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Biotechnology Nature Publishing Company* **9**, 1347–1355 (1991).
23. Yamamoto, F. Review: ABO blood group system--ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. *Immunohematology / American Red Cross* **20**, 3–22 (2004).
24. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. (IUPAC: Research Triangle Park, NC, 2009).
25. Moss, G. P. Basic terminology of stereochemistry (IUPAC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry* **68**, 2193–2222 (1996).
26. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. & Rodwell, V. W. *Harper's illustrated biochemistry*. (New York : McGraw-Hill Medical: New York, 2003).
27. Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell*. 1616 (Garland Science: New York, 2002).
28. Lodish, H. *et al.* *Molecular Cell Biology, 4th Edition*. (W H Freeman & Co: New York, 2000).
29. Ubarretxena-Belandia, I. & Stokes, D. L. Present and future of membrane protein structure determination by electron crystallography. *Advances in protein chemistry and structural biology* **81**, 33–60 (2010).
30. Wallin, E. & von Heijne, G. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein science : a publication of the Protein Society* **7**, 1029–38 (1998).
31. Drews, J. Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science* **287**, 1960–1964 (2000).
32. Hedin, L. E., Illergård, K. & Elofsson, A. An introduction to membrane proteins. *Journal of proteome research* **10**, 3324–31 (2011).
33. Luckey, M. *Membrane Structural Biology: With Biochemical and Biophysical Foundations*. 344 (Cambridge University Press: Cambridge, 2008).

34. Sadée, W., Drübbisch, V. & Amidon, G. L. Biology of membrane transport proteins. *Pharmaceutical Research* **12**, 1823–1837 (1995).
35. Branden, C. & Tooze, J. *Introduction to Protein Structure*. 410 (Garland Science: New York, 1999).
36. Cavey, M. & Lecuit, T. Molecular bases of cell-cell junctions stability and dynamics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a002998 (2009).
37. Niessen, C. M. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 2525–32 (2007).
38. Fairman, R. & Akerfeldt, K. S. Peptides as novel smart materials. *Current opinion in structural biology* **15**, 453–63 (2005).
39. Ryadnov, M. G. & Woolfson, D. N. MaP peptides: programming the self-assembly of peptide-based mesoscopic matrices. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 12407–15 (2005).
40. Hipkiss, A. R. Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **30**, 863–868 (1998).
41. Anti-aging effects observed in new synthetic peptide. *Journal of the American Academy of Dermatology* **56**, AB25–AB25 (2007).
42. Yu, T. T. & Shoichet, M. S. Guided cell adhesion and outgrowth in peptide-modified channels for neural tissue engineering. *Biomaterials* **26**, 1507–14 (2005).
43. Skarnes, R. C. & Watson, D. W. Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bacteriological reviews* **21**, 273–94 (1957).
44. Hancock, R. E. W. & Sahl, H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology* **24**, 1551–7 (2006).
45. Castanho, M. A. R. B. *Membrane Active Peptides: Methods and Results on Structure and Function*. 730 (International University Line: USA, 2009).
46. Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O. & Terán, L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **135**, 1–11 (2010).
47. Nascimento, A. C. C., Fontes, W., Sebben, A. & Castro, M. S. Antimicrobial peptides from anurans skin secretions. *Protein and peptide letters* **10**, 227–38 (2003).
48. Bachère, E. *et al.* Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunological reviews* **198**, 149–68 (2004).
49. Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H. & Boman, H. G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**, 246–248 (1981).
50. Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 5449–53 (1987).
51. Ganz, T. *et al.* Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *The Journal of clinical investigation* **76**, 1427–35 (1985).
52. Epanand, R. M. & Vogel, H. J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta* **1462**, 11–28 (1999).
53. Hancock, R. E. & Diamond, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in microbiology* **8**, 402–10 (2000).
54. Wang, G., Li, X. & Wang, Z. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic acids research* **37**, D933–7 (2009).
55. Lehrer, R. I. Primate defensins. *Nature reviews. Microbiology* **2**, 727–38 (2004).
56. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389–95 (2002).
57. Vizioli, J. & Salzet, M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in pharmacological sciences* **23**, 494–6 (2002).
58. Cole, A. M. *et al.* Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **167**, 623–7 (2001).
59. Yang, D. Many chemokines including CCL20/MIP-3 display antimicrobial activity. *Journal of Leukocyte Biology* **74**, 448–455 (2003).
60. Allaker, R. P. & Kapas, S. Adrenomedullin and mucosal defence: interaction between host and microorganism. *Regulatory peptides* **112**, 147–52 (2003).
61. Kowalska, K., Carr, D. B. & Lipkowsky, A. W. Direct antimicrobial properties of substance P. *Life sciences* **71**, 747–50 (2002).
62. Liepke, C. *et al.* Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **791**, 345–56 (2003).
63. Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P. & von Fellenberg, R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine alpha-lactalbumin molecule. *Biochimica et biophysica acta* **1426**, 439–48 (1999).
64. Hancock, R. E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet infectious diseases* **1**, 156–64 (2001).
65. Harris, F., Dennison, S. R. & Phoenix, D. A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current protein & peptide science* **10**, 585–606 (2009).
66. Brogden, K. A. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 412–416 (1996).
67. Zhang, X., Clark, C. A. & Pettis, G. S. Interstrain inhibition in the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoeae*: purification and characterization of a highly specific bacteriocin and cloning of its structural gene. *Applied and environmental microbiology* **69**, 2201–8 (2003).

68. Gudmundsson, G. H. *et al.* The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *European journal of biochemistry / FEBS* **238**, 325–32 (1996).
69. Rozek, A., Friedrich, C. L. & Hancock, R. E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* **39**, 15765–74 (2000).
70. Powers, J.-P. S. & Hancock, R. E. W. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **24**, 1681–91 (2003).
71. Hancock, R. E. W. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 8856–8861 (2000).
72. Peters, B. M., Shirliff, M. E. & Jabra-Rizk, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS pathogens* **6**, e1001067 (2010).
73. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology* **3**, 238–50 (2005).
74. Shai, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **66**, 236–48 (2002).
75. Huang, H. W., Chen, F.-Y. & Lee, M.-T. Molecular mechanism of Peptide-induced pores in membranes. *Physical review letters* **92**, 198304 (2004).
76. Jelinek, R. & Kolusheva, S. Membrane interactions of host-defense peptides studied in model systems. *Current protein & peptide science* **6**, 103–14 (2005).
77. Rapaport, D. & Shai, Y. Interaction of fluorescently labeled pardaxin and its analogues with lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **266**, 23769–23775 (1991).
78. Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1462**, 55–70 (1999).
79. Ludtke, S. J. *et al.* Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* **35**, 13723–8 (1996).
80. Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N. & Miyajima, K. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* **35**, 11361–8 (1996).
81. Gazit, E., Miller, I. R., Biggin, P. C., Sansom, M. S. & Shai, Y. Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *Journal of molecular biology* **258**, 860–70 (1996).
82. Oren, Z. & Shai, Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **47**, 451–63 (1998).
83. Bechinger, B. & Lohner, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* **1758**, 1529–39 (2006).
84. Ladokhin, A. S. & White, S. H. “Detergent-like” permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochimica et biophysica acta* **1514**, 253–60 (2001).
85. Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray, P. B. & Tack, B. F. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents* **22**, 465–478 (2003).
86. Ryser, H. J.-P. & Hancock, R. Histones and Basic Polyamino Acids Stimulate the Uptake of Albumin by Tumor Cells in Culture. *Science* **150**, 501–503 (1965).
87. Ryser, H. J. Uptake of protein by mammalian cells: an underdeveloped area. The penetration of foreign proteins into mammalian cells can be measured and their functions explored. *Science (New York, N.Y.)* **159**, 390–6 (1968).
88. Shen, W. C. & Ryser, H. J. Conjugation of poly-L-lysine to albumin and horseradish peroxidase: a novel method of enhancing the cellular uptake of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 1872–6 (1978).
89. Green, M. & Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **55**, 1179–88 (1988).
90. Frankel, A. D. & Pabo, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**, 1189–93 (1988).
91. Vivès, E., Brodin, P. & Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *The Journal of biological chemistry* **272**, 16010–7 (1997).
92. Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. & Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 1864–8 (1991).
93. Calvet, S. Cell Internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Is Receptor-independent. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 18188–18193 (1996).
94. Futaki, S. *et al.* Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *The Journal of biological chemistry* **276**, 5836–40 (2001).
95. Zorko, M. & Langel, U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced drug delivery reviews* **57**, 529–45 (2005).
96. Brooks, N. A., Pouniotis, D. S., Tang, C.-K., Apostolopoulos, V. & Pietersz, G. A. Cell-penetrating peptides: application in vaccine delivery. *Biochimica et biophysica acta* **1805**, 25–34 (2010).
97. Herce, H. D. & Garcia, A. E. Cell penetrating peptides: how do they do it? *Journal of biological physics* **33**, 345–56 (2007).
98. Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. & Shai, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* **31**, 12416–23 (1992).
99. Gazit, E., Lee, W. J., Brey, P. T. & Shai, Y. Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry* **33**, 10681–92 (1994).

100. Kourie, J. I. & Shorthouse, A. A. Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *American journal of physiology. Cell physiology* **278**, C1063–87 (2000).
101. Duclouhier, H., Molle, G. & Spach, G. Antimicrobial peptide magainin I from *Xenopus* skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers. *Biophysical journal* **56**, 1017–21 (1989).
102. Matsuzaki, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et biophysica acta* **1462**, 1–10 (1999).
103. Liu, B. R., Huang, Y., Winiarz, J. G., Chiang, H.-J. & Lee, H.-J. Intracellular delivery of quantum dots mediated by a histidine- and arginine-rich HR9 cell-penetrating peptide through the direct membrane translocation mechanism. *Biomaterials* **32**, 3520–37 (2011).
104. Kaplan, I. M., Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* **102**, 247–53 (2005).
105. Richard, J. P. *et al.* Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *The Journal of biological chemistry* **280**, 15300–6 (2005).
106. Fittipaldi, A. *et al.* Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *The Journal of biological chemistry* **278**, 34141–9 (2003).
107. Herce, H. D. & Garcia, A. E. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 20805–10 (2007).
108. Dubikovskaya, E. A., Thorne, S. H., Pillow, T. H., Contag, C. H. & Wender, P. A. Overcoming multidrug resistance of small-molecule therapeutics through conjugation with releasable octaarginine transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 12128–33 (2008).
109. Rothbard, J. B. *et al.* Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nature medicine* **6**, 1253–7 (2000).
110. Pero, S. C., Shukla, G. S., Cookson, M. M., Flemer, S. & Krag, D. N. Combination treatment with Grb7 peptide and Doxorubicin or Trastuzumab (Herceptin) results in cooperative cell growth inhibition in breast cancer cells. *British journal of cancer* **96**, 1520–5 (2007).
111. Crombez, L. *et al.* A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* **17**, 95–103 (2009).
112. Turner, J. J. *et al.* RNA targeting with peptide conjugates of oligonucleotides, siRNA and PNA. *Blood cells, molecules & diseases* **38**, 1–7 (2007).
113. Berry, C. C. Intracellular delivery of nanoparticles via the HIV-1 tat peptide. *Nanomedicine (London, England)* **3**, 357–65 (2008).
114. Hu, M. *et al.* 123I-labeled HIV-1 tat peptide radioimmunoconjugates are imported into the nucleus of human breast cancer cells and functionally interact in vitro and in vivo with the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21(WAF-1/Cip-1). *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* **34**, 368–77 (2007).
115. Kale, A. A. & Torchilin, V. P. “Smart” drug carriers: PEGylated TATp-modified pH-sensitive liposomes. *Journal of liposome research* **17**, 197–203 (2007).
116. Wei, B. *et al.* Development of an antisense RNA delivery system using conjugates of the MS2 bacteriophage capsids and HIV-1 TAT cell-penetrating peptide. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie* **63**, 313–8 (2009).
117. Bozym, R. A., Thompson, R. B., Stoddard, A. K. & Fierke, C. A. Measuring picomolar intracellular exchangeable zinc in PC-12 cells using a ratiometric fluorescence biosensor. *ACS chemical biology* **1**, 103–11 (2006).
118. Fischer, R., Waizenegger, T., Köhler, K. & Brock, R. A quantitative validation of fluorophore-labelled cell-permeable peptide conjugates: fluorophore and cargo dependence of import. *Biochimica et biophysica acta* **1564**, 365–74 (2002).
119. Chen, B., Liu, Q., Zhang, Y., Xu, L. & Fang, X. Transmembrane delivery of the cell-penetrating peptide conjugated semiconductor quantum dots. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* **24**, 11866–71 (2008).
120. Santra, S. *et al.* Rapid and effective labeling of brain tissue using TAT-conjugated CdS:Mn/ZnS quantum dots. *Chemical communications (Cambridge, England)* 3144–6 (2005).
121. Yeh, H.-Y., Yates, M. V., Mulchandani, A. & Chen, W. Visualizing the dynamics of viral replication in living cells via Tat peptide delivery of nuclease-resistant molecular beacons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17522–5 (2008).
122. Bolhassani, A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1816**, 232–46 (2011).
123. Hotchkiss, R. S. *et al.* TAT-BH4 and TAT-Bcl-xL peptides protect against sepsis-induced lymphocyte apoptosis in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **176**, 5471–7 (2006).
124. Orzáez, M. *et al.* Conjugation of a novel Apaf-1 inhibitor to peptide-based cell-membrane transporters: effective methods to improve inhibition of mitochondria-mediated apoptosis. *Peptides* **28**, 958–68 (2007).
125. Henriques, S. T., Melo, M. N. & Castanho, M. A. R. B. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *The Biochemical journal* **399**, 1–7 (2006).
126. Henriques, S. T. & Castanho, M. A. R. B. Consequences of nonlytic membrane perturbation to the translocation of the cell penetrating peptide pep-1 in lipidic vesicles. *Biochemistry* **43**, 9716–24 (2004).
127. Gibbons, D. L. *et al.* Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Nature* **427**, 320–5 (2004).

128. Splith, K. & Neundorff, I. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. *European biophysics journal : EBJ* **40**, 387–97 (2011).
129. Bobone, S. *et al.* The thin line between cell-penetrating and antimicrobial peptides: the case of Pep-1 and Pep-1-K. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **17**, 335–41 (2011).
130. Jung, H. J., Park, Y., Hahm, K.-S. & Lee, D. G. Biological activity of Tat (47-58) peptide on human pathogenic fungi. *Biochemical and biophysical research communications* **345**, 222–8 (2006).
131. JUN, J. & JEONG, K. Effective antibacterial action of Tat (47-58) by increased uptake into bacterial cells in the presence of trypsin. *Journal of microbiology and* **18**, 990–996 (2008).
132. Zhu, W. L. & Shin, S. Y. Effects of dimerization of the cell-penetrating peptide Tat analog on antimicrobial activity and mechanism of bactericidal action. *Journal of Peptide Science* **15**, 345–352 (2009).
133. Zhu, W. L. & Shin, S. Y. Antimicrobial and cytolytic activities and plausible mode of bactericidal action of the cell penetrating peptide penetratin and its lys-linked two-stranded peptide. *Chemical biology drug design* **73**, 209–215 (2009).
134. Palm, C., Netzereab, S. & Hällbrink, M. Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides* **27**, 1710–1716 (2006).
135. Sadler, K., Eom, K. D., Yang, J.-L., Dimitrova, Y. & Tam, J. P. Translocating Proline-Rich Peptides from the Antimicrobial Peptide Bactenecin 7 †. *Biochemistry* **41**, 14150–14157 (2002).
136. Oller, S., Salomón, O. & Oñate, E. A continuum mechanics model for mechanical fatigue analysis. *Computational Materials Science* **32**, 175–195 (2005).
137. Karplus, M. Molecular dynamics of biological macromolecules: a brief history and perspective. *Biopolymers* **68**, 350–8 (2003).
138. Karplus, M. & McCammon, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature structural biology* **9**, 646–52 (2002).
139. Daggett, V. Protein Folding—Simulation. *ChemInform* **37**, (2006).
140. Qiao, B., Zhao, X., Yue, D., Zhang, L. & Wu, S. A combined experiment and molecular dynamics simulation study of hydrogen bonds and free volume in nitrile-butadiene rubber/hindered phenol damping mixtures. *Journal of Materials Chemistry* (2012).
141. Feller, S. E. Molecular dynamics simulations as a complement to nuclear magnetic resonance and X-ray diffraction measurements. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **400**, 89–102 (2007).
142. Thomas, J. O. & Zendejas, M. A. Molecular dynamics simulation as a complement to diffraction in the study of disorder in crystals. *Journal of computer-aided molecular design* **3**, 311–25 (1989).
143. Fang, T.-H., Chang, W.-J., Lin, C.-M. & Lien, W.-C. Molecular dynamics and experimental studies on deposition mechanisms of ion beam sputtering. *Applied Surface Science* **254**, 3436–3441 (2008).
144. Adcock, S. a & McCammon, J. A. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical reviews* **106**, 1589–615 (2006).
145. Schlick, T. *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*. 768 (Springer: New York, 2010).
146. van Gunsteren, W. F. *et al.* Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **45**, 4064–92 (2006).
147. Levitt, M. The birth of computational structural biology. *Nature structural biology* **8**, 392–3 (2001).
148. Frenkel, D. & Smit, B. *Understanding Molecular Simulation, Second Edition: From Algorithms to Applications (Computational Science)*. 664 (Academic Press: London, 2001).
149. Wang, H., Michielssens, S., Moors, S. L. C. & Ceulemans, A. Molecular dynamics study of dipalmitoylphosphatidylcholine lipid layer self-assembly onto a single-walled carbon nanotube. *Nano Research* **2**, 945–954 (2010).
150. MORGON, N. H. *Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular*. 540 (Editora Livraria da Física: São Paulo, 2007).
151. Hac, A. E., Seeger, H. M., Fidorra, M. & Heimburg, T. Diffusion in two-component lipid membranes--a fluorescence correlation spectroscopy and monte carlo simulation study. *Biophysical journal* **88**, 317–33 (2005).
152. Jorgensen, W. L. & Tirado-Rives, J. Monte Carlo vs Molecular Dynamics for Conformational Sampling. *The Journal of Physical Chemistry* **100**, 14508–14513 (1996).
153. Leach, A. R. *Molecular Modelling: Principles and Applications (2nd Edition)*. 784 (Prentice Hall: Edinburg, 2001).
154. McCammon, J. A., Gelin, B. R. & Karplus, M. Dynamics of folded proteins. *Nature* **267**, 585–590 (1977).
155. Levy, R. M. *et al.* Molecular dynamics of myoglobin at 298 degrees K. Results from a 300-ps computer simulation. *Biophysical journal* **48**, 509–18 (1985).
156. Kosztin, D., Bishop, T. C. & Schulten, K. Binding of the estrogen receptor to DNA. The role of waters. *Biophysical journal* **73**, 557–70 (1997).
157. Dror, R. O. *et al.* Identification of two distinct inactive conformations of the 2-adrenergic receptor reconciles structural and biochemical observations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 4689–4694 (2009).
158. Freddolino, P. L., Arkhipov, A. S., Larson, S. B., McPherson, A. & Schulten, K. Molecular dynamics simulations of the complete satellite tobacco mosaic virus. *Structure (London, England : 1993)* **14**, 437–49 (2006).
159. Freddolino, P. L., Liu, F., Gruebele, M. & Schulten, K. Ten-microsecond molecular dynamics simulation of a fast-folding WW domain. *Biophysical journal* **94**, L75–7 (2008).

160. Fantini, J. & Yahi, N. Molecular insights into amyloid regulation by membrane cholesterol and sphingolipids: common mechanisms in neurodegenerative diseases. *Expert reviews in molecular medicine* **12**, e27 (2010).
161. Wang, G. *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies (Advances in Molecular and Cellular Microbiology)*. 240 (CABI Publishing: 2010).
162. Schrodinger LLC The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.1. (2010).
163. Sommer, B. *et al.* CELLmicrocosmos 2.2 MembraneEditor: A Modular Interactive Shape-Based Software Approach To Solve Heterogeneous Membrane Packing Problems. *Journal of chemical information and modeling* 1165–1182 (2011).
164. Van Der Spoel, D. *et al.* GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry* **26**, 1701–18 (2005).
165. Chiu, S.-W., Pandit, S. A., Scott, H. L. & Jakobsson, E. An improved united atom force field for simulation of mixed lipid bilayers. *The journal of physical chemistry. B* **113**, 2748–63 (2009).
166. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D. & Lindahl, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *Journal of Chemical Theory and Computation* **4**, 435–447 (2008).
167. Hermans, J., Berendsen, H. J. C., Van Gunsteren, W. F. & Postma, J. P. M. A consistent empirical potential for water-protein interactions. *Biopolymers* **23**, 1513–1518 (1984).
168. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C. & Fraaije, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* **18**, 1463–1472 (1997).
169. Miyamoto, S. & Kollman, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *Journal of Computational Chemistry* **13**, 952–962 (1992).
170. Harvey, S. C. Treatment of electrostatic effects in macromolecular modeling. *Proteins* **5**, 78–92 (1989).
171. van Gunsteren, W. F. & Berendsen, H. J. C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition in English* **29**, 992–1023 (1990).
172. Smith, P. E. & van Gunsteren, W. F. Consistent dielectric properties of the simple point charge and extended simple point charge water models at 277 and 300 K. *The Journal of Chemical Physics* **100**, 3169 (1994).
173. Balescu, R. C. *Equilibrium and Non-Equilibrium Statistical Mechanics*. 742 (John Wiley & Sons: New York, 1975).
174. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. & Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* **81**, 3684 (1984).
175. Bussi, G., Donadio, D. & Parrinello, M. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics* **126**, 014101 (2007).
176. Marrink, S. J., de Vries, A. H. & Tieleman, D. P. Lipids on the move: simulations of membrane pores, domains, stalks and curves. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 149–68 (2009).
177. Marrink, S. J., Risselada, H. J., Yefimov, S., Tieleman, D. P. & de Vries, A. H. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *The journal of physical chemistry. B* **111**, 7812–24 (2007).
178. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55–63 (1983).
179. Wolterbeek, H. T. & van der Meer, A. J. G. M. Optimization, application, and interpretation of lactate dehydrogenase measurements in microwell determination of cell number and toxicity. *Assay and drug development technologies* **3**, 675–82 (2005).
180. Martín, I., Teixidó, M. & Giralt, E. Design, synthesis and characterization of a new anionic cell-penetrating peptide: SAP(E). *Chembiochem: a European journal of chemical biology* **12**, 896–903 (2011).
181. Miao, L., Seifert, U., Wortis, M. & Döbereiner, H.-G. Budding transitions of fluid-bilayer vesicles: The effect of area-difference elasticity. *Physical Review E* **49**, 5389–5407 (1994).
182. Woo, H.-J. & Wallqvist, A. Spontaneous buckling of lipid bilayer and vesicle budding induced by antimicrobial peptide magainin 2: a coarse-grained simulation study. *The journal of physical chemistry. B* **115**, 8122–9 (2011).
183. Langham, A. & Kaznessis, Y. N. Molecular simulations of antimicrobial peptides. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **618**, 267–85 (2010).
184. Bond, P. J., Wee, C. L. & Sansom, M. S. P. Coarse-grained molecular dynamics simulations of the energetics of helix insertion into a lipid bilayer. *Biochemistry* **47**, 11321–31 (2008).
185. Gkeka, P. & Sarkisov, L. Interactions of phospholipid bilayers with several classes of amphiphilic alpha-helical peptides: insights from coarse-grained molecular dynamics simulations. *The journal of physical chemistry. B* **114**, 826–39 (2010).
186. Thøgersen, L., Schiøtt, B., Vosegaard, T., Nielsen, N. C. & Tajkhorshid, E. Peptide aggregation and pore formation in a lipid bilayer: a combined coarse-grained and all atom molecular dynamics study. *Biophysical journal* **95**, 4337–47 (2008).
187. Greenspan, P. & Fowler, S. D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *Journal of lipid research* **26**, 781–9 (1985).
188. Stuart, M. C. a., van de Pas, J. C. & Engberts, J. B. F. N. The use of Nile Red to monitor the aggregation behavior in ternary surfactant-water-organic solvent systems. *Journal of Physical Organic Chemistry* **18**, 929–934 (2005).
189. Slaninová, J. *et al.* Toxicity study of antimicrobial peptides from wild bee venom and their analogs toward mammalian normal and cancer cells. *Peptides* **33**, 18–26 (2012).
190. Ghavami, S. *et al.* Brevinin-2R(1) semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. *Journal of cellular and molecular medicine* **12**, 1005–22 (2008).

191. Teixeira, V., Feio, M. J. & Bastos, M. Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in lipid research* **51**, 149–77 (2012).
192. Deshayes, S., Morris, M. C., Divita, G. & Heitz, F. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **62**, 1839–49 (2005).
193. Chou, P. Y. & Fasman, G. D. Conformational parameters for amino acids in helical,  $\beta$ -sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* **13**, 211–222 (1974).
194. Béven, L., Castano, S., Dufourcq, J., Wieslander, A. & Wróblewski, H. The antibiotic activity of cationic linear amphipathic peptides: lessons from the action of leucine/lysine copolymers on bacteria of the class Mollicutes. *European journal of biochemistry / FEBS* **270**, 2207–17 (2003).
195. Blondelle, S. E. & Houghten, R. A. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochemistry* **31**, 12688–12694 (1992).
196. Kang, S.-J., Won, H.-S., Choi, W.-S. & Lee, B.-J. De novo generation of antimicrobial LK peptides with a single tryptophan at the critical amphipathic interface. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* **15**, 583–8 (2009).
197. Kachel, K., Asuncion-Punzalan, E. & London, E. Anchoring of tryptophan and tyrosine analogs at the hydrocarbon-polar boundary in model membrane vesicles: parallax analysis of fluorescence quenching induced by nitroxide-labeled phospholipids. *Biochemistry* **34**, 15475–9 (1995).
198. Polyansky, A. A. *et al.* N-terminal amphipathic helix as a trigger of hemolytic activity in antimicrobial peptides: a case study in laticins. *FEBS letters* **583**, 2425–8 (2009).