

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA – CAMPUS DE ARARAQUARA**

FÁBIO TURRA PIGOSSI

**INFLUÊNCIA DA CARGA DA EXTREMIDADE AMINO-TERMINAL DA
ESTICOLISINA II – ATIVIDADE BIOLÓGICA E INTERAÇÃO COM
MIMÉTICOS DE MEMBRANA**

ARARAQUARA
2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA – CAMPUS DE ARARAQUARA**

FÁBIO TURRA PIGOSSI

**INFLUÊNCIA DA CARGA DA EXTREMIDADE AMINO-TERMINAL DA
ESTICOLISINA II – ATIVIDADE BIOLÓGICA E INTERAÇÃO COM
MIMÉTICOS DE MEMBRANA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

ARARAQUARA
2006

“O que for a profundidade do teu ser assim será teu desejo.

O que for teu desejo, assim será tua vontade.

O que for tua vontade, assim serão teus atos.

O que forem teus atos, assim será teu destino.”

Brihadaranyaka Upanishad IV

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Gerson e Noely** e aos meus avós, **Mário e Elenice**, meus exemplos de vida, a quem agradeço pelo amor dedicado, pelo projeto de sucesso a mim desejado, pela compreensão nos momentos mais difíceis e por terem, sobretudo em mim acreditado. Lutamos, sorrimos, choramos, mas vencemos sempre juntos.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS por ter me dado sempre muita saúde e sabedoria.

Ao amigo e orientador Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli por ter acreditado em mim e neste trabalho desde o seu início, pelo apoio, orientação e amizade e principalmente pelas oportunidades concedidas e pela liberdade permitida para a concretização desse.

"Liderança não é imposição, mas sim despertar no próximo a vontade de fazer."

Feliz do professor que faz honrar a profissão destacando-se pelo respeito, dedicação e compromisso com os alunos.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto, pela amizade, incentivo, e conhecimentos transmitidos.

*"Algo é só impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário."
Albert Einstein*

Aos Professores do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) pela formação acadêmica e intelectual, e em especial à Profa. Dra. Márcia Helena de Rizzo da Matta pelo incentivo e amizade e pela orientação dedicada durante minha introdução à ciência mostrando sempre com grande otimismo que com dedicação se consegue grandiosos feitos.

À minha querida namorada Alessandra pelo amor, compreensão e amizade dedicados, mesmo durante o tempo em que estivemos distante.

Aos meus amigos: Felipe Orofino, Ana Eliza Wanczinski, Saulo Garrido, Édson Crusca, Eliane Trovatti, Eduardo Vicente, Daniel Rinaldo, Lisinéia Zanardi, Magno Trindade, João Batista Gomes, Fernando César, Fábio Conceição, Karine Campoi, Renato Pontelli, Júnior Modesto entre vários outros.

Agradecimentos

A amizade é um sentimento mais nobre do que o amor, eis que permite que o objeto dela se divida em outros afetos, enquanto o amor tem intrínseco o ciúme, que não admite a rivalidade.

Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!

Aos técnicos do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara.

Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação do Instituto de Química de Araraquara pelos esclarecimentos, dedicação e paciência prestados.

Ao CNPq pela bolsa de Mestrado concedida.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO..... | VIII |
| ABSTRACT..... | III |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | X |
| LISTA DE FIGURAS..... | XIII |
| LISTA DE TABELAS..... | XVII |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. OBJETIVOS..... | 9 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 13 |
| 3.1. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA..... | 13 |
| 3.2. PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS..... | 17 |
| 3.3. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS..... | 20 |
| 3.4. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY (ESIMS)..... | 21 |
| 3.5. ATIVIDADE HEMOLÍTICA..... | 22 |
| 3.6. ESPECTROFLUORIMETRIA..... | 23 |
| 3.6.1. <i>Estudo de Conformacionais com Surfactantes</i> | 24 |
| 3.6.2. <i>Supressão por Acrilamida</i> | 26 |
| 3.6.3. <i>Estudo com Trifluoetanol (TFE)</i> | 26 |
| 3.7. DICROÍSMO CIRCULAR..... | 27 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 30 |
| 4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS..... | 30 |
| 4.1.1. <i>Síntese dos Peptídeos em Fase Sólida</i> | 30 |
| 4.1.2. <i>Caracterização por Espectrometria de Massas (ESI-MS)</i> | 34 |
| 4.2. ATIVIDADE HEMOLÍTICA..... | 40 |
| 4.3. ESPECTROFLUORIMETRIA..... | 45 |
| 4.3.1. <i>Estudos Conformacionais com Surfactantes</i> | 46 |
| 4.3.1.1. <i>Estudos com SDS</i> | 46 |
| 4.3.1.2. <i>Estudos com HPS</i> | 51 |
| 4.3.1.3. <i>Estudos com LPC</i> | 55 |
| 4.3.2. <i>Estudo de Supressão de Fluorescência</i> | 60 |
| 4.3.3. <i>Estudo em Trifluoroetanol</i> | 64 |
| 4.4. DICROÍSMO CIRCULAR (CD)..... | 69 |
| 4.4.1. <i>Estudo em Trifluoroetanol</i> | 69 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 73 |
| 6. REFERÊNCIAS..... | 75 |

RESUMO

A *Stichodactyla helianthus* é uma anêmona relativamente abundante nos mares de Cuba apresentando grande potencialidade como fonte de peptídeos biologicamente ativos. Dentre estes peptídeos, estão duas citolisinas: as esticolisinas I (St I) e II (St II). Essas duas toxinas possuem como principal característica a capacidade de formação de poros em eritrócitos, ou seja, alta atividade hemolítica (AH), no entanto a St II é mais hemolítica que a St I. Tendo em vista que as principais alterações que diferenciam estas citolisinas (St I e St II) estão na região amino-terminal (primeiros 30 resíduos), este trabalho teve como um dos objetivos sintetizar e comparar fragmentos amino-terminais destes polipeptídeos, visando entender a diferença de atividade hemolítica. Os resultados obtidos mostraram que os peptídeos St I 12-31 e St II 11-30 possuem a mesma atividade hemolítica. Esse dado mostra que a alteração de Glu por Gly e de Gln por Glu não afeta a atividade hemolítica dos mesmos. Já os peptídeos St I 1-31 e St II 1-30, respectivamente, mostraram diferenças em suas atividades hemolíticas, estas diferenças de atividade podem estar relacionadas à região dos resíduos de 1 a 10 da seqüência peptídica. Outro resultado interessante foi que o peptídeo St I 2-31 (sem o resíduo de serina N-terminal) apresentou AH intermediária entre os St I 1-31 e St II 1-30, mostrando que a adição da serina à St I é responsável por parte da perda da atividade desta citolisina.

Outro objetivo deste trabalho foi avaliar a importância da polaridade da extremidade amino-terminal da esticolisina II. Para isto, fragmentos peptídicos contendo a região amino-terminal da St II, marcado com Trp na posição 2, foi sintetizado alterando-se a carga desta extremidade (acetilado, acrescido de Ser, Asp ou Lys). Independentemente das modificações feitas nos peptídeos da série W2, todos mostraram interação com os diferentes tipos de surfactantes, podendo ser observado que em todos os detergentes o peptídeo Ac-W2 foi o que mostrou maiores deslocamentos dos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão (blue shift) e menor valor de K_{sv} , indicando assim, uma maior interação do mesmo com as micelas. Concomitante a isto, os estudos de fluorescência em trifluoroetanol (TFE) dos peptídeos mostraram que o fato dos peptídeos adquirirem estrutura na presença de TFE não altera significativamente os valores de $\lambda_{\text{máx}}$. Este dado confirma que o deslocamento obtido da titulação com os detergentes é devido a interação do peptídeo com a micela e não de sua estruturação. Complementando esses resultados os estudos de CD mostraram que a adição gradativa de TFE faz com que os peptídeos adquiram estrutura em α -hélice, no entanto, com diferentes teores. A análise conjunta de AH, interação com miméticos de membranas e estruturação em α -hélice parece indicar uma maior relação entre AH e teor de α -hélice, sendo que a interação com a membrana é um fator importante, mas secundário para a atividade biológica.

Palavras chave: Esticolisina II, Síntese de Peptídeos em fase Sólida, Actinoporinas, *Stichodactyla helianthus*.

ABSTRACT

Stichodactyla helianthus is a relatively abundant sea anemone found in the seas of Cuba, presenting a largely potent source of biologically active peptides. Among these peptides, are two citolysins: the sticholysins I (St I) and II (St II). These two toxins possess as main characteristic the capacity of forming pores in erythrocytes, in other words, high hemolytic activity (HA), however, the St II is more hemolytic than the St I. As far as we know that the main alterations that differentiate the proteins St I and St II are in the region amino-terminal (first 30 residues), this study has as one of the objectives the synthesizing and comparing of amino-terminal fragments of those polypeptides aiming to understand the difference of hemolytic activities. The results obtained had shown that the peptides St I 12-31 and St II 11-30 possess the same hemolytic activity. This data sample shows that the alteration of Glu for Gly and Gln for Glu does not affect the hemolytic degree of the same ones. Even then the peptides St I 1-31 and St II 1-30, respectively, had sample differences in its hemolytic activity, indicating that the different activities can be related within the region of 1 the 10 of the sequence. Another interesting result was that the peptides St I 2-31 (without the serine residue N-terminal) presented intermediary AH between St I 1-31 and St II 1-30, showing that the addition of the serine to St I is responsible for part of the losing activity in this citolysin.

Another objective of this study is to evaluate the importance of polarity of the extremity amino-terminal of sticholysin II. To do this, the peptides containing the region amino-terminal of St II, marked with Trp in position 2, was synthesized changing the load of this extremity (acetylated, increased of Ser, Asp or Lys). Independent of the modifications made in the peptides of the W2 series, all had shown interaction with the different types of micelles, being able to be observed that in all the detergents the peptides Ac-W2 was the one showed the greatest displacements of the values $\lambda_{\text{máx}}$ (blue shift) and less value of K_{sv} , thus indicating a bigger interaction of the same with micelles. Concomitant to this, the studies of blossom in trifluoretanol (TFE) of the peptides had shown that the fact of the peptides acquire structure in the present of TFE does not modify the values $\lambda_{\text{máx}}$ significantly. This data confirms that the obtained displacement of the titration with the detergents is due to the interaction of the peptides with surfactants and not about the structuring. Complementing these results the studies of CD has shown that the gradual addition of TFE makes the peptides acquire structure in α -helix, however, with different concentrations. The conjuncture analysis of HA, joint with membranes mimetics and structuring in α -helix, seems to indicate a bigger relation between AH and α -helix content, being that the interaction with the membrane is an important factor, but secondary for the biological activity.

Key-Words: Sticholysin II, Solid Phase Peptides Synthesis, Actinoporins, *Stichodactyla helianthus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

Aminoácidos

| | |
|----------|-----------------|
| Ala (A) | Alanina |
| Arg (R) | Arginina |
| Asn (N) | Asparagina |
| Asp (D) | Ácido aspártico |
| Cys (C) | Cisteína |
| Gln (Q) | Glutamina |
| Glu (E) | Ácido glutâmico |
| Gly (G) | Glicina |
| Hys (H) | Histidina |
| Ile (I) | Isoleucina |
| Leu (L) | Leucina |
| Lys (K) | Lisina |
| Met (M) | Metionina |
| Phe (F) | Fenilalanina |
| Pro (P) | Prolina |
| Ser (S) | Serina |
| Thr (T) | Treonina |
| Trp (W) | Triptofano |
| Tyr (Y) | Tirosina |
| Val (V) | Valina |

Lista de Abreviaturas

Demais Abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| ACN | Acetonitrila |
| DCM | Diclorometano |
| DIC | N,N'- Diisopropilcarbodiimida |
| DIEA | N,N-Diisopropiletilamina |
| DMF | N,N - Dimetilformamida |
| DPPC | Dipalmitoil Fosfatidilcolina |
| EDT | 1,2-Etanoditiol |
| ESI – MS | Espectrometria de Massas de Ionização por Eletrospray |
| Fmoc | O-(7-Azabenzotriazol-1-ila)-N, N,N'N'-tetrametilurônio |
| HATU | hexafluorofosfato |
| HBTU | O- (1-H-benzotriazol-1-ila)-1,1,3,3-tetrametilurônio |
| HOBt | hexafluorofosfato |
| HPS | N-Hidroxibenzotriazol |
| LPC | N-Hexadecil-N,N-Dimetil-3-Amônio-1-Propano-Sulfonato |
| OPA | 1-Palmitoil-2-Hidroxi-sn-Glicero-3-Fosfocolina |
| Pbf | Orto-ftalaldeído |
| RP-HPLC | 2,2,4,6,7-pentametila-dihidrobenzofurano-sulfonila |
| SDS | Cromatografia Líquida de Alta Performance de Fase Reversa |
| SPFS | Dodecil-Sulfato de Sódio |
| <i>t</i> -Boc | Síntese de Peptídeos em Fase Sólida |
| | <i>t</i> -Butiloxicarbonila |

Lista de Abreviaturas

| | |
|------|--|
| TBTU | Tetrafluoroborato 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio |
| tbut | Terc-butila |
| TEA | Trietilamina |
| TFA | Ácido Trifluoroacético |
| TFE | Trifluoroetanol |
| Trt | Tritila |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1: Estruturas primárias das esticolisinas I e II | 3 |
| Figura 2: Modelo da formação do poro toroidal visto a partir da secção lateral (A) e visto de cima (B)..... | 5 |
| Figura 3: Modelo estrutural da Esticolisina II demonstrando um elevado conteúdo e folhas β | 5 |
| Figura 4: Modelo demonstrativo da região do cluster aromático da St II visto por diferentes ângulos, responsável pela ligação com a fosfocolina. | 6 |
| Figura 5: Visualização de um grão de resina, passando pelas cadeias poliméricas que a compõe até a formula molecular do poliestireno | 15 |
| Figura 6: Diagrama da estratégia Fmoc de síntese em fase sólida utilizada na obtenção dos peptídeos | 17 |
| Figura 7: Aminograma da amostra padrão de aminoácidos utilizado na calibração do equipamento..... | 21 |
| Figura 8: Estrutura química dos detergentes utilizados. (a) SDS, (b) HPS e (c) LPC. | 26 |
| Figura 9: Espectros de CD característicos das estruturas secundárias (a) α -hélice, (b) folha β pregueada e (c) estrutura randômica. | 28 |
| Figura 10: Perfis cromatográficos obtidos, após purificação, por HPLC dos peptídeos variantes da seqüência W2. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA . H ₂ O e B: 0,036% TFA . ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm. | 32 |
| Figura 11: Perfis cromatográficos obtidos, após purificação, por HPLC dos peptídeos com 20 aminoácidos e do peptídeo St I 1-31. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA . H ₂ O e B: 0,036% TFA . ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm..... | 33 |
| Figura 12: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro W2 de peso molecular 3200 Da (carga +1), 1601 Da (carga +2) Da, 1068 Da (carga +3). | 35 |
| Figura 13: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro Ac-W2 de peso molecular 3243 Da (carga +1), 1622 Da (carga +2) Da, 1081 Da (carga +3)..... | 35 |
| Figura 14: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro K-W2 de peso molecular 3330 Da (carga +1), 1665 Da (carga +2) Da, 1110 Da (carga +3)..... | 36 |
| Figura 15: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro S-W2 de peso molecular 3289 Da (carga +1), 1644 Da (carga +2) Da, 1096 Da (carga +3)..... | 36 |

Lista de Figuras

- Figura 16:** Espectro de massas obtido para o peptídeo puro D-W2 de peso molecular 3315 Da (carga +1), 1658 Da (carga +2).**37**
- Figura 17:** Espectro de massas obtido para o peptídeo puro St II 11-30. Peso molecular teórico de 2290 Da (carga +1) e 1145 Da (carga +2).**37**
- Figura 18:** Espectro de massas obtido para o peptídeo puro St I 12-31 de peso molecular 2217 Da (carga +1), 1109 Da (carga +2).**38**
- Figura 19:** Espectro de massas obtido para o peptídeo puro St II 1-30 de peso molecular de peso molecular 3129 Da (carga +1), 1565 Da (carga +2), 1043 Da (carga +3), 783 Da (carga +4).**38**
- Figura 20:** Espectro de massas obtido para o peptídeo puro St I 1-31 de peso molecular 3246 Da (carga +1), 1623 Da (carga +2).**39**
- Figura 21:** Espectro de massas obtido para o peptídeo puro St I 2-31 de peso molecular 3158 Da (carga +1), 1580 Da (carga +2).**39**
- Figura 22:** Atividade hemolítica dos peptídeos St I 1-31, St I 2-31 e St II 1-30, apresentadas graficamente como a extinção da absorvância medida a 600 nm em função do tempo.**43**
- Figura 23:** Atividade hemolítica dos peptídeos St I 12-31 e St II 11-30, apresentadas graficamente como a extinção da absorvância medida a 600 nm em função do tempo.**43**
- Figura 24:** Atividades hemolíticas dos peptídeos, St II 1-30 e W2 apresentadas graficamente como a extinção da absorvância medida a 600 nm em função do tempo.**44**
- Figura 25:** Atividades hemolíticas dos peptídeos modificados na extremidade amino-terminal (39 μ M) apresentadas graficamente como a extinção da absorvância medida a 600 nm em função do tempo.**44**
- Figura 26:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo Ac-W2 na presença de SDS**48**
- Figura 27:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo K-W2 na presença de SDS.**49**
- Figura 28:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo S-W2 na presença de SDS.**49**
- Figura 29:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo D-W2 na presença de SDS.**50**
- Figura 30:** Variação do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da concentração de SDS em pH [7,0].**50**

Lista de Figuras

- Figura 31:** Variação da intensidade de fluorescência dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da concentração de SDS em pH [7,0].51
- Figura 32:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo Ac-W2 na presença de HPS.52
- Figura 33:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo K-W2 na presença de HPS.53
- Figura 34:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo S-W2 na presença de HPS.53
- Figura 35:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo D-W2 na presença de HPS.54
- Figura 36 :** Variação do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da concentração de HPS em pH [7,0].55
- Figura 37 :** Variação da intensidade de fluorescência dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da concentração de HPS em pH [7,0].55
- Figura 38:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo Ac-W2 na presença de LPC.56
- Figura 39:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo K-W2 na presença de LPC.57
- Figura 40:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo S-W2 na presença de LPC.57
- Figura 41:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo D-W2 na presença de LPC.58
- Figura 42:** Variação do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da concentração de LPC em pH [7,0].58
- Figura 43:** Variação da intensidade de fluorescência dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da concentração de LPC em pH [7,0].59
- Figura 44:** Variação dos valores de supressão de fluorescência F_0/F dos peptídeos em solução aquosa em função da concentração de acrilamida em pH [7,0] onde W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆).....643
- Figura 45:** Variação dos valores de supressão de fluorescência F_0/F dos peptídeos na presença de micelas de LPC (10mM) em função da concentração de acrilamida em pH [7,0] onde W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆).....64

Lista de Figuras

- Figura 46:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo Ac-W2 na presença de TFE em pH 7,065
- Figura 47:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo K-W2 na presença de TFE em pH 7,066
- Figura 48:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo S-W2 na presença de TFE em pH 7,066
- Figura 49:** Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo D-W2 na presença de TFE em pH 7,067
- Figura 50:** Variação do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão para os peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da porcentagem de TFE pH [7,0].67
- Figura 51:** Variação da intensidade de fluorescência em função da porcentagem de TFE pH [7,0] para os peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆).68
- Figura 52:** Espectro de CD dos peptídeos em solução aquosa a pH 7.71
- Figura 53:** Espectro de CD dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆) em solução aquosa contendo 60% de TFE a pH 7,0.71
- Figura 54:** Representação gráfica do θ^{222} em função da concentração de TFE, indicando a estabilização estrutural dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆) após a concentração de 60% de TFE em água a pH 7,0.72
- Figura 55:** Representação gráfica do percentual de α -hélice em função da concentração de TFE para os peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆) em solução pH 7,0.72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peptídeos obtidos modificando-se a extremidade N-terminal da StII.....**31**

Tabela 2: Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) e dos $\lambda_{m\acute{a}x}$ de emissão de fluorescência nos estudos de supressão de fluorescência em solução e em LPC em pH [7,0].....**61**

1. INTRODUÇÃO

“Os oceanos ainda guardam muitos segredos a serem descobertos, sendo um deles as substâncias produzidas ou armazenadas pelos organismos que os habitam. Estas substâncias adaptativamente são utilizadas na comunicação, defesa, predação, inibição do desenvolvimento de competidores, reprodução ou simplesmente como produto de seu metabolismo. Além disso, uma mesma substância que, por um lado, pode apresentar-se como uma toxina, por outro, pode ser a esperança para o tratamento, e possivelmente a cura, de determinadas doenças. A constatação de que substâncias isoladas de uma esponja marinha (*Cryptotethya crypta*) serviram de matéria prima para a síntese do medicamento D-Arabinosilcitosina ou ARA-C (Citarabina ou Aracytin da Upjohn Co.), empregado há muitas décadas na quimioterapia da leucemia. Além disso, o conhecido medicamento AZT (3-azido-3-deoxitimidina), que inibe a enzima viral transcriptase reversa e é empregado para o tratamento de aids, são estímulos que levam a continua pesquisa de novas substâncias provenientes de organismos marinhos. Outro exemplo é a substância latrunculina A, isolada de outra esponja marinha e comercializada pela empresa americana Molecular Probes. Devido à sua ação específica em despolimerizar micro filamentos de actina, esta vem sendo empregada como um potente instrumento para utilização em laboratórios de bioquímica” (FREITAS, J. C. 2003)

A descoberta destes compostos aliada à grande biodiversidade marinha vêm estimulando cada vez mais a prospecção de novas drogas que possam melhorar a qualidade de vida dos seres humanos. Dessa forma, o estudo da relação estrutura-

atividade compõe passos fundamentais no estudo destes tipos de substâncias principalmente quando são de origem protéica.

Entre os mais variados tipos de substâncias, as Actinoporinas tiveram destaque em estudos recentes. Estas moléculas, de massa molecular entre 18–20 kDa encontradas em anêmonas da ordem actiniária, constituem um grupo de proteínas citolíticas, que se inserem espontaneamente em membranas celulares. Estas toxinas são particularmente interessantes devido ao fato de que elas agem quase que exclusivamente em membranas que contém esfingomiélin, embora se sabe que o colesterol pode trocar de lugar com a mesma em alguns casos (PARKER et al., 2005). As Actinoporinas diferem das toxinas antibacterianas nos seguintes aspectos: elas são mais potentes, o poro formado é de menor tamanho e são resistentes à degradação proteolítica (HINDS et al., 2002).

Uma fonte destas toxinas marinhas é a *Stichodactyla helianthus*. Esta anêmona é relativamente abundante nos mares de Cuba e apresenta grande potencialidade como fonte de peptídeos biologicamente ativos. Desde que, em 1974 foi detectada pela primeira vez a presença, neste organismo, de um polipeptídeo com atividade lítica sobre eritrócitos, muitos esforços têm sido dirigidos para a caracterização das moléculas tóxicas produzidas por esta anêmona. Dentre os polipeptídeos que compõe a toxina liberada por esta anêmona se encontram os inibidores de proteases (DELFIN et al., 1994), um bloqueador de canais de K⁺ (CASTANEDA et al., 1995), uma fosfolipase (PAZOS et al., 1996) e duas citolisinas: Esticolisina I (St I) e a Esticolisina II (St II) (GOMEZ et al., 1986).

O interesse deste trabalho está no estudo das duas citolisinas citadas acima, a St I e a St II. Estas moléculas são polipeptídeos básicos de PI = 9,2 e 9,8,

respectivamente, e apresentam pesos moleculares da ordem de 20 kDa (GOMEZ et al., 1986). Ambas apresentam alta atividade hemolítica tendo um mecanismo de lise que passa pela formação de um poro oligomérico toroidal com um raio funcional da ordem de 1 nm originado pela agregação provável de 3 ou 4 monômeros (figura 2); (TEJUCA et al., 2001; LOS RIOS et al., 1999; LOS RIOS et al., 1998). Elas são homólogas em 93% de sua seqüência de aminoácidos, sendo observadas três substituições não-conservativas e nove substituições conservativas-semiconservativas. Isto indica que ambas são isoformas da mesma hemolisina (HUERTA et al., 2001; LANIO et al., 2001). A comparação da seqüência N-terminal (primeiros 30 resíduos) destas toxinas revela após o alinhamento, quatro substituições (figura 1), três delas não-conservativas: ácido glutâmico na posição 2 (St I) por alanina, ácido aspártico na posição 9 por alanina, glicina na posição 23 por ácido glutâmico e uma semi-conservativa: ácido glutâmico na posição 16 por glutamina. Além disso, a St I exibe um resíduo de serina extra localizado como posição N-terminal (I'INA et al., 2005; HUERTA et al., 2001).

```

St I  SELAGTIIIDGASLTFEVLDKVLGELGKVSARKIAVGDIDNESGGTWTALNAYF
St II ALAGTIIAAGASLTFQVLDKVLEELGKVSARKIAVGDIDNESGGTWTALNAYF

St I  RSGTTDVILPEVVPNTKALLYSGRKSSEGFVATGAVAAFAYYMSNGNTLGV
St II RSGTTDVILPEFVVPNTKALLYSGRKDTGFVATGAVAAFAYYMSSGNTLGV

St I  MFSVVPFDYNWYSNWDVKIYEGKRRADQGMIEDIYYGNPYRGDNGWYCKN
St II MFSVVPFDYNWYSNWDVKIYSKRRADQGMIEDIYYGNPYRGDNGWHEKN

St I  LGYGLRMKGIMTSAGEAKMQIKISR
St II LGYGLRMKGIMTSAGEAKMQIKISR

```

Figura 1: Estruturas primárias das esticolisinas I e II.

Espectros de dicroísmo circular (CD) de ambas as esticolisinas (LANIO et al., 2001; MANCHENO et al., 2001; MARTINEZ et al., 2001) ilustram que elas apresentam predominância da estrutura em folha β , com pequeno conteúdo de α -hélice. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) confirma essa predominância de folha β . A maioria dos dados de fluorescência apresentados para St I e St II indicam que a St II possui estrutura terciária ligeiramente mais aberta em pH neutro. Entretanto, medidas espectroscópicas de NMR, cristalografia e fluorescência, aliados a experimentos de estabilidade mostraram uma similaridade estrutural muito próxima. Estudos recentes de cristalografia de raios-x (figura 2) demonstram que a St II é uma proteína globular de dimensões 45 x 32 x 27 Å, e constituída de um β -sanduíche, com dez estruturas em β -conformação ladeadas por duas seqüências em α -hélice (MANCHENO et al., 2003). Além disso, análises de espectroscopia de RMN mostraram a presença de um “cluster” de aminoácidos aromáticos composto por Tyr¹⁰⁶, Trp¹¹⁰, Tyr¹¹¹, e Trp¹¹⁴ (presentes no “loop” compreendido entre as folhas β_6 e β_7), e Tyr¹³¹, Tyr¹³⁵, e Tyr¹³⁶ da hélice α_2 (figura 3). Estes resíduos são conhecidos por terem uma afinidade pelo grupo fosfocolina pertencente a esfingomielina existentes em membranas biológicas, tendo participação na fixação da proteína na membrana (MANCHENO et al., 2003). Outros trabalhos confirmam estes resultados, indicando que a esfingomielina é um receptor de baixa afinidade para ambas as proteínas, agindo no mecanismo de ligação entre a proteína e a membrana-alvo (MANCHENO et al., 2003; ALVAREZ et al., 2001; TEJUCA et al., 1996).

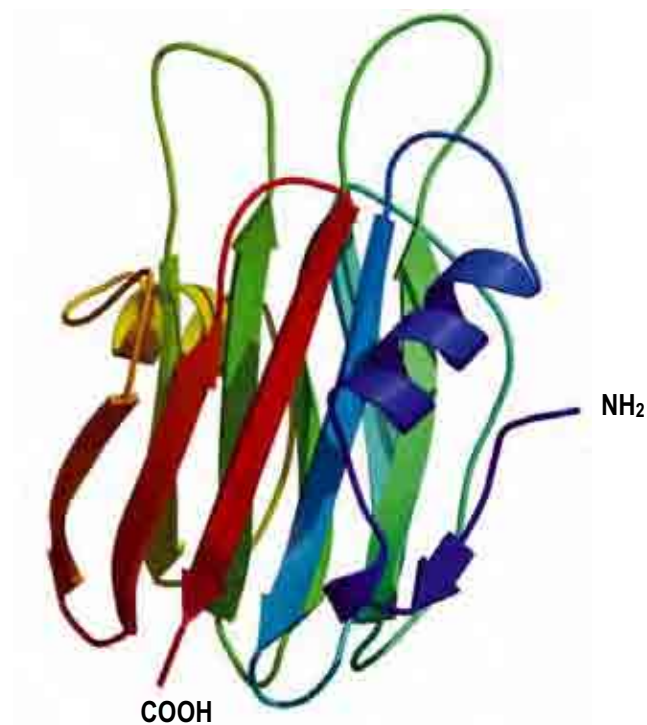


Figura 2: Modelo estrutural da Esticolisina II demonstrando um elevado conteúdo de folhas β . (MANCHENO et al., 2003)

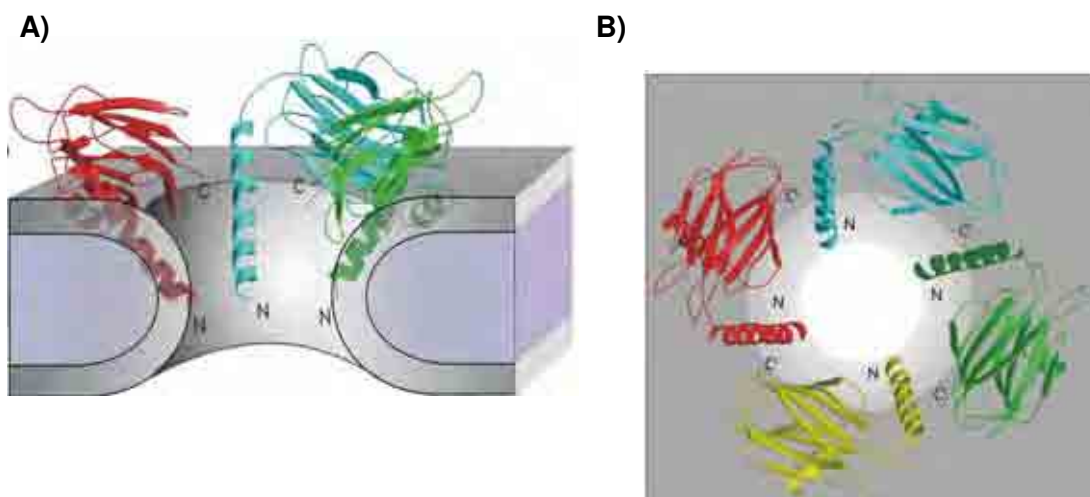


Figura 3: Modelo da formação do poro toroidal. A) Secção lateral do poro. B) Poro formado visto de cima. (MANCHENO et al., 2003)

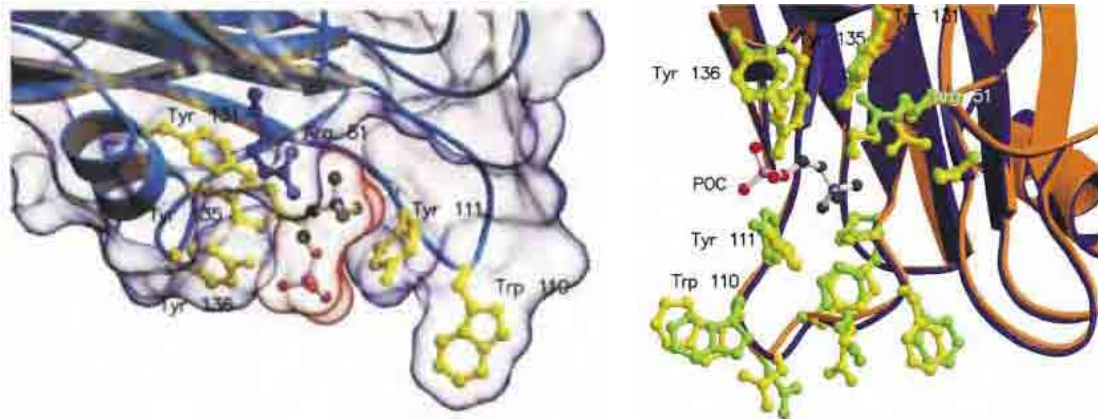


Figura 4: Modelo demonstrativo da região do cluster aromático da St II visto por diferentes ângulos, responsável pela ligação com a fosfocolina (MANCHENO et al., 2003).

Estudos conformacionais da St II demonstram que uma parte de sua estrutura se insere em membranas modelo, em estado de bicamada ou não (LANIO et al., 2001; MARTINEZ et al., 2001). Além disto, mudanças da fluorescência intrínseca e nos espectros de CD em UV próximo, e ainda na presença de vesículas de dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC): esfingomiéline (SP) em temperaturas acima e abaixo da temperatura de transição de fase comprovam a existência de, no mínimo, dois estados conformacionais da proteína ligada à membrana (MARTINEZ et al., 2002).

Das regiões da St II com maior potencial de estudo, a região amino-terminal mostra-se parte importante da proteína a ser analisada, dado o fato de ser a região mais variável de citolisinas de anêmonas; (ANDERLUH et al., 2002; ANDERLUH et al., 1997). Nesta extremidade, estão situadas boa parte das diferenças entre a St II e a St I. A estas modificações é atribuída a maior atividade hemolítica da St II em relação a St I, medida tanto em termos de saída de potássio interno de eritrócitos quanto da cinética de hemólise (MARTINEZ et al., 2001). Esta diferente capacidade

de formação de poros entre as esticolisinas tem sido explicada pela diferença de cargas na região N-terminal, o que reduziria a velocidade de inserção da St I, diminuindo assim, sua capacidade hemolítica. Experimentos de N-truncamento com outra hemolisina relacionada (63% de identidade), Equinatoxina II (Eqt II), isolada da anêmona *Actinia equina*, sugerem que esta região fica inserida na membrana lipídica (ANDERLUH et al., 1997), hipótese corroborada pela determinação de sua estrutura tridimensional (MANCHENO et al., 2003).

Os trabalhos citados acima têm mostrado que o estudo de Actinoporinas é importante não apenas para entender suas propriedades tóxicas, mas também, em um senso mais geral, para investigação de mecanismos básicos da interação lipídio-proteína, assim como a modulação da conformação da proteína pela ligação com o lipídio. Além disso, estas toxinas também podem ser ferramentas importantes para a construção de imuno-conjugados para o combate a células carcinogênicas (TEJUCA et al., 2004). Portanto, o entendimento dos mecanismos básicos envolvendo a interação toxina-célula é essencial para um desenho racional destas imunotoxinas (ALVAREZ et al., 2003). Somado a isto, a incorporação das toxinas na membrana depende do estado físico-químico da mesma, assim como ocorrências de mudanças conformacionais na transição da forma aquosa para o estado de inserção, fenômeno por si só interessante de ser estudado (MENESTRINA et al., 1999).

Nosso grupo tem estudado até o momento a região N-terminal da St II. Os resultados obtidos até agora mostram que um peptídeo contendo os 30 aminoácidos desta região apresenta atividade hemolítica, embora muito menor que a da proteína original. Apesar desta baixa atividade, o fato deste peptídeo - muito menor que a da proteína inteira - apresentar atividade funcional semelhante à proteína completa isto é, forma poro de mesmo tamanho (CASALLANOVO et al., 2006) que a toxina,

permite estudos mais detalhados do modo de formação dos poros, visto que os dados obtidos não são influenciados pelo restante da esticolisina.

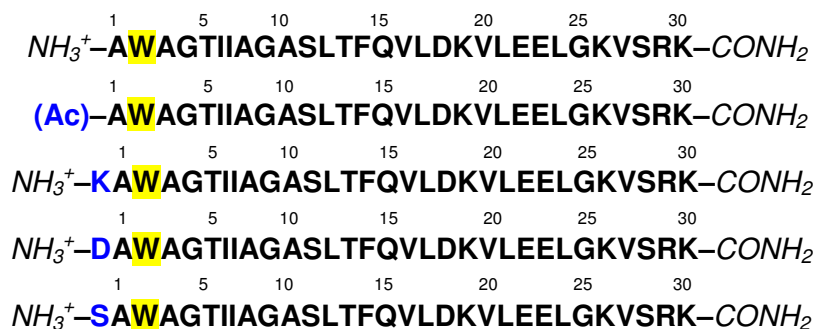
Outro objetivo deste trabalho foi o de verificar a importância da polaridade da extremidade amino-terminal destas proteínas. Para isto, diferentes seqüências, contendo os 30 resíduos da região amino-terminal da St II foram sintetizadas alterando-se a carga de sua extremidade N-terminal. Este estudo é importante não só pelo fato de que uma das principais diferenças entre a St I e a St II é a inclusão de uma serina em sua extremidade, mas também pelo fato de que uma variante recombinante da St II contendo resíduos de histidina em sua extremidade não apresenta a mesma capacidade de formar poros que a proteína original, apesar de apresentar maior ligação com pequenas vesículas unilamelares (PAZOS et al., 2003).

As alterações que foram realizadas para este estudo estão descritas abaixo.

- 1) Por meio de adição do grupo acetila (acetilação), removemos a carga positiva do grupo protonado NH_3^+ (em pH 7,0) da extremidade amino-terminal deixando-a com carga neutra.
- 2) Para aumentar a carga positiva desta ponta, foi adicionado um resíduo de lisina que possui em sua cadeia lateral um grupo amino que em pH fisiológico apresenta carga positiva.
- 3) Para conferir a esta extremidade um caráter dipolar em pH fisiológico, foi adicionado um resíduo de ácido aspártico. Este aminoácido possui além de seu amino-grupo (carga positiva) um grupo carboxila na cadeia lateral de sua estrutura (carga negativa).
- 4) Para estudo comparativo com a proteína St I foi colocado um resíduo de serina, pois esta é uma das diferenças entre estas proteínas.

Adicionalmente, na posição 2 destas seqüências um resíduo de leucina foi substituído por triptofano (fluorescente) (CRUSCA E JR, 2006). Esta modificação foi realizada para permitir o uso da técnica de espectrofluorimetria nos estudos de interação destes peptídeos com miméticos de membrana - micelas e lipossomas. Este tipo de abordagem é uma das estratégias mais bem sucedidas e viáveis neste tipo de análise (ANDERLUH et al., 1999; NAKAMURA et al., 1999; MACEK et al., 1994) sendo esta técnica aplicada.

Dessa forma as seqüências de peptídicas estudadas neste bloco foram:



Como mencionado anteriormente o projeto de mestrado teve como principais objetivos:

- 1) Sintetizar e comparar peptídeos contendo as regiões N-terminais da St I e St II, visando o entendimento da maior atividade da St II em relação a St I.
- 2) Modificar o peptídeo com 30 resíduos da St II adicionando-se grupos em sua extremidade N-terminal, de tal forma que a polaridade desta ponta seja modificada. Este estudo visa determinar a influência da carga nesta extremidade.
- 3) Analisar as atividades biológicas das seqüências acima descritas.

- 4) Estudar a conformação e a interação dos peptídeos na presença dos surfactantes [dodecil-sulfato de sódio (SDS), N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano-sulfonato (HPS) e 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC)], definindo o grau da interação com estes detergentes.

- 5) Estudos de conformacionais, por fluorescência e dicroísmo circular, dos fragmentos com diferentes concentrações de TFE (solvente indutor de estrutura).

- 6) Estudos de supressão de fluorescência em solução e em presença de micelas de LPC em pH 7,0.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

A descoberta de novas substâncias com atividades terapêuticas, até a alguns anos atrás, era realizada praticamente por meio de abordagens empíricas e básicas, uma vez que os compostos eram sintetizados, ou obtidos muitas vezes a partir de fontes naturais, sendo posteriormente testados. Esta abordagem necessita de quantidades significativas de produtos para os testes biológicos, levando à necessidade da realização de inúmeras sínteses, tornando todo o processo demorado e muito trabalhoso (MARQUARDT et al., 2001).

Há mais de três décadas, uma inovadora metodologia para a síntese de peptídeos foi apresentada à comunidade científica por Bruce Merrifield. Tal metodologia veio revolucionar a síntese orgânica por suas características peculiares, uma vez que abandonou a tradicional rotina, própria da síntese em solução, e introduziu o uso de polímeros insolúveis como suporte, ligados covalentemente aos substratos, geralmente peptídeos ou aminoácidos (MERRIFIELD, 1963; PINILLA et al., 1995). Método este que foi denominado de síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). A importância de suas descobertas, a partir de uma idéia aparentemente simples e, portanto, brilhante, o conduziu ao Prêmio Nobel de química em 1984, com a síntese da bradiginina (CAREY, 1996).

A síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) é constituída basicamente no crescimento da cadeia peptídica, adicionando-se um aminoácido de cada vez, a uma matriz polimérica inerte (resina), que dependendo de seu grau de solvatação pode determinar o sucesso ou não da síntese (MERRIFIELD, 1963). Este tipo de metodologia de síntese de peptídeos foi descrita em diversas revisões (KIMMERLIN

et al., 2005; ALBERICIO, 2000; SARIN et al., 1980; STEWART, 1980; ATHERTON et al., 1980).

As duas estratégias utilizadas na SPFS, consistem na proteção do grupo α -amino dos aminoácidos por meio de dois protetores: o *t*-Butiloxicarbonila (Boc) e o 9-Fluorenilmetiloxicarbonila (Fmoc). A estratégia escolhida por nós neste trabalho foi o método que utiliza o grupo Fmoc para a proteção do grupo α -amino e os grupos *tert*-butila (Tbut), *tr*itila (Trt), 2,2,4,6,7-pentametiladihidrobenzofurano-sulfonila (Pbf) e *tert*-butiloxicarbonila (Boc) como protetores de cadeias laterais dos resíduos trifuncionais: Lisina-(Boc), Arginina-(Pbf), Serina-(Tbut), Ácido Glutâmico-(Tbut), Ácido Aspártico-(Tbut), Glutamina-(Trt), Treonina-(Tbut) e Triptofano-(Boc). O Fmoc tem a vantagem de ser base-lábil, o que significa que para a desproteção do grupo α -amino, a resina ligada ao peptídeo protegido é submetida a uma solução básica. Além disso, a ligação peptídeo-resina é passível de clivagem em condições ácidas mais fracas do que a outra estratégia - *t*-Butiloxicarbonila (Boc). Nesta outra estratégia, o grupo α -amino é protegido pelo protetor Boc (ácido-lábil), fazendo-se necessário o acréscimo de mais uma etapa, a de neutralização, em cada ciclo da síntese. Além disso, a clivagem para a liberação do peptídeo da resina é realizada com o fluoreto de hidrogênio, de manipulação mais complicada e perigosa.

A resina utilizada como base para a síntese foi do tipo Rink-amida. Este tipo de resina possui matriz polimérica composta por poliestireno com 1% de divinilbenzeno (figura 4). Esta resina possui a capacidade de solvatar-se na presença de determinados solventes expondo seus grupos funcionalizados e favorecendo assim a reação.

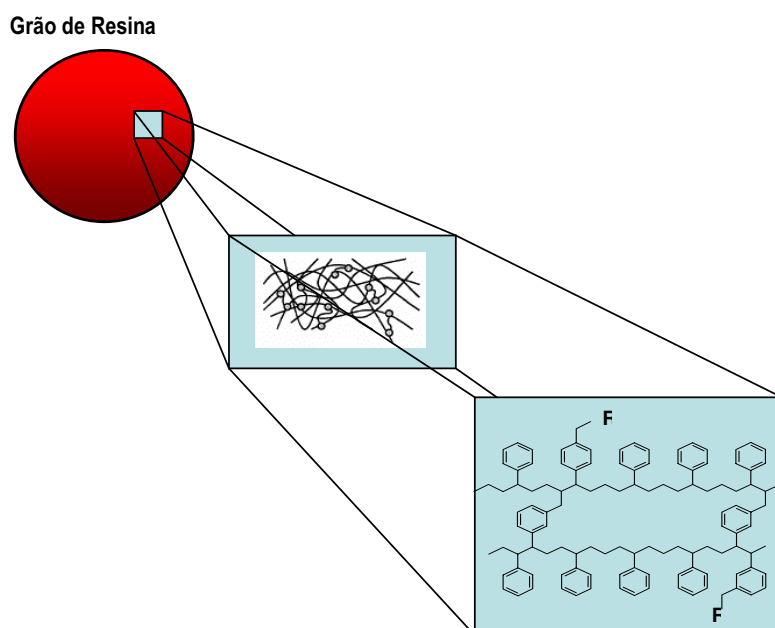


Figura 5: Visualização de um grão de resina, passando pelas cadeias poliméricas que a compõe até a fórmula molecular do poliestireno (MARQUARDT et al., 2001).

A estratégia Fmoc de síntese química em fase sólida utilizada está detalhada na figura 6 da página 17. Esta estratégia consiste de passos cíclicos seriados de acoplamento e desproteção do amino-grupo terminal. O acoplamento foi realizado pela ativação dos grupos carboxila com diisopropilcarbodiimida (DIC)/ 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) ou hexafluorofosfato de *O*-(Benzotriazol-1-ila)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU)/ *N,N*-Etildiisopropilamina (DIEA) ou ainda, hexafluorofosfato de *O*-(7-Azabenzotriazol-1-ila)-*N,N,N',N'*-tetrametilurônio (HATU)/DIEA, durante duas horas sob agitação moderada. Os aminoácidos e reagentes anteriormente mencionados foram utilizados com um excesso de 3 vezes em relação à quantidade calculada em referente ao grau de substituição da resina para garantir um acoplamento com maior eficiência. A desproteção do grupo α -amino dos aminoácidos foi realizada reagindo-se a resina com piperidina / dimetilformamida

(DMF) 2:8 v/v durante 20 minutos. Esta etapa deixa os grupos α -amino livres para o ataque nucleofílico ao grupo carboxila do aminoácido subsequente, efetivando-se assim o acoplamento. Entre cada passo de reação, foram efetuadas lavagens subsequentes com os solventes orgânicos DMF e diclorometano (DCM) para eliminação do excesso de reagentes utilizados. Após as etapas de acoplamento e desproteção a peptidil-resina foi submetida ao teste de ninidrina (KAISER et al., 1970). A ninidrina, em altas temperaturas, reage com grupos amino livres, liberando um composto de coloração azul. Este teste é, portanto, adequado para indicar a presença de grupos amino livres e, neste caso indicar a eficiência ou ineficiência dos passos de desproteção e acoplamento.

Ao final da síntese a clivagem do peptídeo da resina foi realizada através de um coquetel (10 mL/g de peptidil-resina) contendo água ultra pura 5%, fenol 4,5%, 1,2-etanoditiol (EDT) 2,5% e tioanisol 5%, em ácido trifluoroacético TFA – reagente K (DICK et al., 1994; KING et al., 1990) – durante duas horas. Após esse período, o peptídeo foi precipitado com éter etílico gelado e filtrado em placa porosa. O precipitado e resina foram lavados sucessivamente com este solvente para eliminação dos reagentes do coquetel e em seguida, o peptídeo foi extraído com uma solução de ácido acético 5% em água ultra pura. Após esta etapa a solução obtida foi congelada com nitrogênio líquido e liofilizada, obtendo-se um pó branco floculoso que foi chamado de peptídeo bruto.

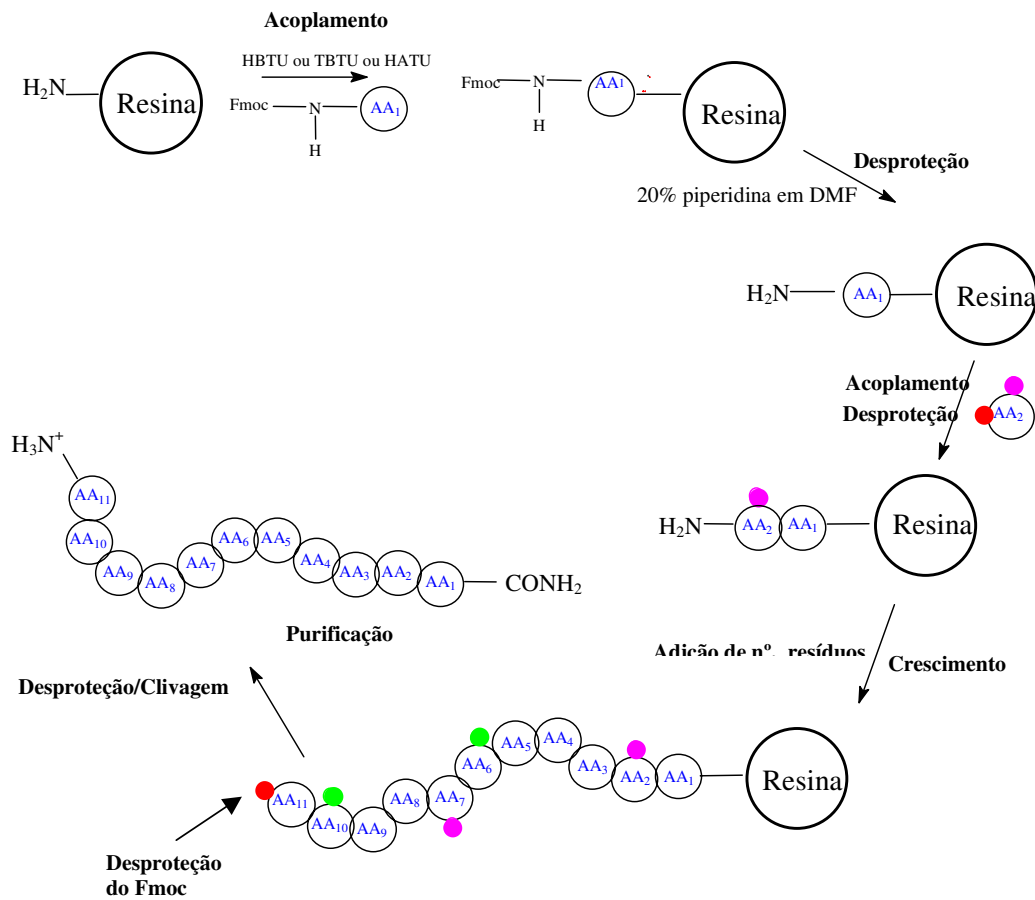


Figura 6: Diagrama da estratégia Fmoc de síntese em fase sólida utilizada na obtenção dos peptídeos.

3.2. PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Ao final da etapa de síntese e clivagem, estes compostos são invariavelmente obtidos na forma bruta ou precursora. Assim, obrigatoriamente eles devem ser manipulados, purificados e caracterizados química e biologicamente. Sem estas etapas, que permitem avaliar suas homogeneidades químicas, determinar suas concentrações efetivas e confirmar as suas identidades, os peptídeos deixam de ser

materiais confiáveis para aqueles que pretendem estudá-los (MACHADO et al., 2004).

Dessa forma necessita-se a obtenção de peptídeos com purezas iguais ou superiores a 95%. Assim, é comum combinar técnicas cromatográficas de baixa, média e alta pressão para obter peptídeos sintéticos com qualidade superior a 95%. As cromatografias líquidas de fase reversa, troca iônica, exclusão e de afinidade são as mais utilizadas na análise e purificação dos produtos brutos obtidos a partir das sínteses química e enzimática (MACHADO et al., 2004).

Uma das técnicas cromatográficas mais utilizadas hoje em dia é a Cromatografia Líquida de Alta Performance de Fase Reversa (RP-HPLC). Esta técnica baseia-se na adsorção dos peptídeos sintéticos a uma matriz estacionária hidrofóbica [sílica derivatizada pela introdução de cadeias alquílicas, tais como *n*-butila (C4), *n*-octila (C8), *n*-octadecila (C18), fenila, ciclohexila e outros], bem como na partição destes solutos entre esta matriz e a fase móvel ou eluente. As fases móveis geralmente empregadas são ácidas e com baixa força iônica, sendo que as mais usadas na química de peptídeos são a água acidulada com ácido trifluoroacético (TFA) solvente A, e a acetonitrila (ACN) também acidulada com TFA, solvente B. Os comprimentos de onda de detecção geralmente estão entre: 210-225 ou 275-280 nm. (MACHADO et al., 2004)

A purificação pode ser executada em escala preparativa (gramas) ou semipreparativa (miligramas). A escala analítica (microgramas) é usada na definição das condições da escala preparativa e subsequente análise das frações obtidas durante a purificação.

A purificação do peptídeo bruto foi realizada em RP-HPLC semipreparativo utilizando um System Gold BECKMAN, em uma coluna de fase reversa C18

Ultrasphere BECKMAN (10 x 250 mm). O grau de pureza das frações foi determinado por análise em RP-HPLC, no modo analítico, Prostar 400/Dynamax System VARIAN, em coluna de fase reversa C18 Ultrasphere BECKMAN (4,6 x 250 mm).

As condições cromatográficas utilizadas foram:

Modo Preparativo

Solventes: A: 0,045% TFA / H₂O

B: 0,036% TFA / ACN

Gradiente: 30% a 60% de solvente B em 90 minutos para os peptídeos com 30 aminoácidos e de 15 a 45% em 90 minutos para as seqüências com 20 resíduos.

Fluxo: 5 mL/min

Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

Modo Analítico

Solventes: A: 0,045% TFA / H₂O

B: 0,036% TFA / ACN

Gradiente: 5% a 95% de solvente B em 30 minutos

Fluxo: 1,5 mL/min

Comprimento de onda de detecção: 220 nm.

A confirmação do sucesso da síntese e purificação foi realizada através de análise de aminoácidos e por espectrometria de massas.

3.3. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

Para averiguar se a proporção entre os aminoácidos do peptídeo obtido era condizente com a esperada, os peptídeos foram hidrolisados e analisados.

As análises de aminoácidos foram efetuadas pelo método da derivatização pós-coluna por orto-ftalaldeído (OPA) em um analisador automático Shimadzu LC-10A/C-47A. O sistema é periodicamente calibrado com uma mistura padrão de aminoácidos (figura 7), obtendo-se um valor para o tempo de saída de cada aminoácido e um fator de conversão entre a área de cada pico e a concentração de aminoácidos da amostra.

Os peptídeos (0,2 - 1 mg) foram hidrolisados em 1 mL de HCl 6 N, na presença de 0,08 mL de fenol a 5% em H₂O, a 110°C por 72 h em atmosfera de N₂. Após a hidrólise, o material foi concentrado à vácuo, dissolvido em tampão de diluição citrato de sódio, pH 2,2 e filtrado em unidade filtrante GV Millex - Millipore antes de ser injetado no aparelho.

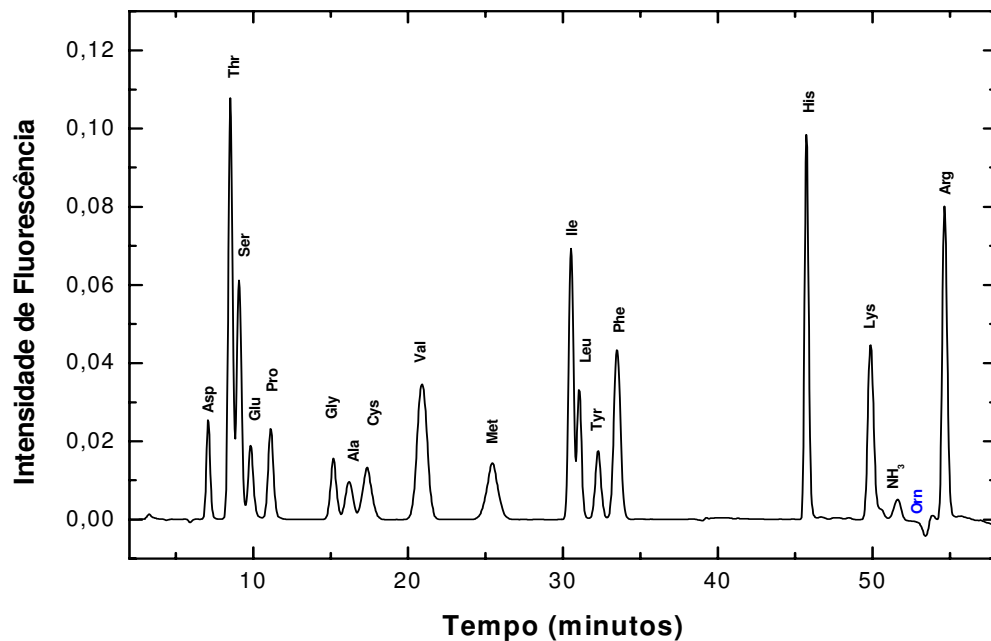


Figura 7: Aminograma da amostra padrão de aminoácidos utilizado na calibração do equipamento.

3.4. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY (ESI-MS)

A técnica de ESI-MS tem sido vastamente aplicada em estudos de proteínas quer em nível de estrutura primária, secundária, terciária e quaternária. No que diz respeito à estrutura primária a técnica permite não só a determinação da massa molecular como também a determinação da seqüência dos aminoácidos em uma determinada molécula. Técnica esta que se baseia em um analisador de massa de triplo quadrupolo que dá como resultado final a razão massa carga (m/z).

Os espectros de massas foram obtidos em: 1) um espectrômetro de massas Fisons Plataforma ESI, com injeção direta com uma bomba Shimadzu LC-10AD sistema controlado por uma workstation Compac modelo AP200 localizado no

Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista (UNESP); 2) um espectrômetro de massas Micromass modelo ZMD acoplado a um cromatógrafo líquido da Waters, constituído por um módulo Alliance modelo 2690 com injetor automático com capacidade para 120 amostras, detector “Photodiode Array” modelo 996 controlado por uma Workstation Compac localizado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP).

Nas análises foi utilizada uma coluna Waters Nova-Pack C18 (2,1 x 150 mm, 60 Å, 3,5 µm) tendo como fases móveis os solventes: A: 0,1% TFA/H₂O e B: 90% ACN + 0,09% TFA/H₂O. A eluição foi feita através de um gradiente de concentração de 5% a 95% de B em um tempo de 20 minutos sob fluxo de 0,4 mL/min. A faixa de comprimento de onda empregada foi de 190 a 300 nm.

3.5. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

No presente trabalho, eritrócitos humanos foram preparados a partir da mistura do sangue total obtido de vários doadores voluntários, através de lavagem e ressuspensão em solução salina fisiológica tamponada (TBS: 145 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4). A concentração da solução eritrocitária padrão foi ajustada com TBS até obter-se absorvância de 0,1 a 600 nm. As amostras de peptídeos foram diluídas duas vezes de maneira seriada, em microplacas de 96 poços de fundo plano. A quantidade de peptídeos variou entre 2 e 200 µM em um volume final de 200 µL. A hemólise se iniciou pela adição de um volume da suspensão de eritrócitos.

A atividade hemolítica (AH) foi medida pela diminuição da turbidez da suspensão a 600 nm a 25 ± 2°C ao longo do tempo, utilizando um leitor de

microplacas com agitação Multiscan EX (Labsystems, Finlândia). A AH relativa dos diferentes peptídeos foi calculada de maneira relativa à AH de St II, e foram expressas como o tempo necessário para diminuir de 10 ou 25% do valor inicial a turbidez da suspensão.

Esta etapa foi realizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Carlos Álvares da Universidade de Havana – Cuba.

3.6. ESPECTROFLUORIMETRIA (LAKOWICS, 1999)

Estudos de fluorescência em peptídeos e proteínas é uma das técnicas estruturais de grande destaque que vem sendo utilizadas atualmente nas mais variadas áreas da bioquímica e biologia molecular. A possibilidade de detecção das mais sensíveis perturbações apresentadas pelos grupos fluoróforos tal como ao ambiente que o mesmo está exposto, podendo fornecer indícios sobre a interação de uma determinada molécula.

A fluorescência de biomoléculas, tais como peptídeos e proteínas, é ocasionada por resíduos aromáticos de triptofano e tirosina. A fenilalanina também apresenta fluorescência, mas possui um rendimento quântico muito baixo e, por isso, a emissão deste resíduo raramente é observada. Experimentos de fluorescência de peptídeos são feitos excitando-se no comprimento de onda do máximo de absorção, em torno de 280 nm, onde o espectro de emissão se deve à contribuição tanto de Tyr como de Trp. Contudo, é possível excitar-se seletivamente o Trp entre 295 e 305 nm. Devido ao fato dos peptídeos estudados não possuírem resíduos de Tirosina e Fenilalanina a fluorescência foi devida somente a inserção do resíduo de Triptofano.

Como os fluoróforos são sensíveis ao ambiente que os circunda, a interação destes com moléculas do solvente altera a energia do estado excitado e, conseqüentemente, a frequência e intensidade de emissão. Assim, propriedades como comprimento de onda do máximo de emissão ($\lambda_{\text{máx}}$ de emissão), rendimento quântico (ϕ_F), tempo de vida do fluoróforo (τ_F), e propriedades de polarização podem ser utilizadas para caracterizar propriedades estruturais dos peptídeos. Desta maneira, o Trp desempenha o papel de um fluoróforo para estudar o ambiente em torno do peptídeo.

A aquisição dos dados de fluorescência foi realizada em um espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse VARIAN, e o comprimento de onda de excitação utilizado foi de 280 nm. O espectro de emissão de fluorescência foi adquirido em uma faixa de 300 a 500 nm, obtendo-se a intensidade de fluorescência e o comprimento de onda de emissão máximo para cada peptídeo em cada meio em estudo.

A concentração das soluções utilizadas nos experimentos de fluorescência foi determinada inicialmente pela absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro UV 1601 PC Shimadzu. O coeficiente de extinção molar (ϵ) utilizado foi de $5600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (CREIGHTON, 1997).

Os estudos de fluorescência foram realizados em uma sala termostatizada com temperatura de 25°C.

3.6.1. Estudos Conformacionais com Surfactantes

Lipídeos são moléculas anfífilas (cabeça polar e cauda apolar) que em contato com a água tendem a agregar-se através de sua cauda apolar fazendo com

que os grupos polares fiquem em contato com o solvente. A interação mais importante para este fato é o efeito hidrofóbico cauda apolar. Este efeito é principalmente de natureza entrópica, e tem sua origem na rede de ligações de hidrogênio na estrutura da água. A ordenação das moléculas de solvente causa perda de entropia configuracional. Outros termos a considerar são as forças de van der Waals (sobretudo de dispersão) e eventuais contribuições entálpicas das ligações de hidrogênio. Ambos são, contudo de menor importância, pois as forças de dispersão água-soluto apolar não diferem geralmente muito da soma das forças de dispersão água-água e soluto-soluto, e porque as ligações de hidrogênio não são quebradas apesar de sua estrutura se alterar (LOURA L. M. S. et al., 2004).

Nos estudos com micelas foram utilizados três tipos de detergentes para avaliar o comportamento estrutural do peptídeo. São eles: o detergente aniônico, dodecil-sulfato de sódio (SDS) - SIGMA e os detergentes zwitteriônicos (dipolares) N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano-sulfonato (HPS) - SIGMA e 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina - AVANTI POLAR LIPIDS (figura 8).

Foram preparadas soluções estoque concentradas dos detergentes (SDS 200 mM, HPS 100 mM e LPC 100 mM) e de peptídeos as quais foram armazenadas sob refrigeração. Dessas soluções foram retiradas pequenas alíquotas, necessárias para realização dos experimentos. Antes de cada experimento, o pH das soluções peptídicas e a de detergente foram ajustadas a 7,0, utilizando uma solução de NaOH para tal procedimento.

A adição de detergente foi realizada com auxílio de uma microsseringa da marca AGILENT. Após homogeneização, a solução obtida foi submetida à leitura de fluorescência e UV. As concentrações de detergentes utilizadas durante a titulação foram de 0 a 50 mM para SDS; de 0 a 10 mM para HPS e de 0 a 10 mM para LPC.

O resultado final foi obtido, subtraindo-se o espectro do peptídeo com o espectro do branco.

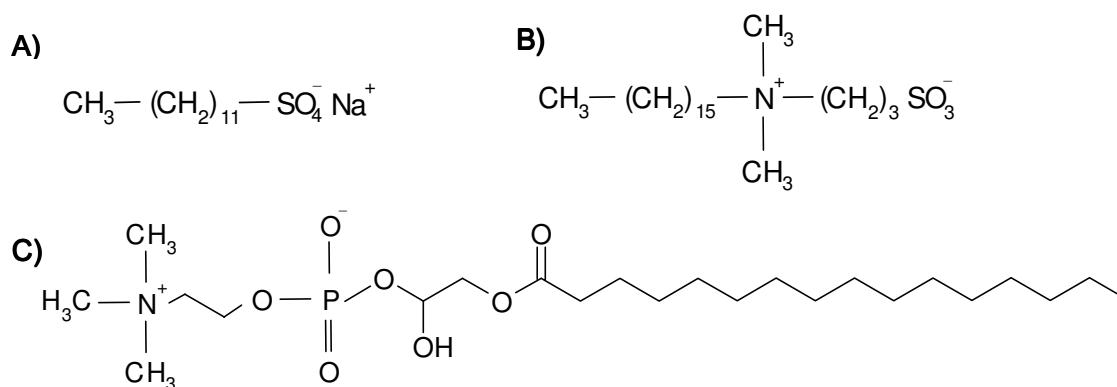


Figura 8: Estrutura química dos detergentes utilizados. (a) SDS, (b) HPS e (c) LPC.

3.6.2. Supressão por Acrilamida

Para complementar os estudos conformacionais com micelas e para maior compreensão das evidências sobre o mecanismo de inserção do peptídeo na membrana, realizamos experimentos de supressão de fluorescência. As análises foram realizadas em pH igual a 7,0, utilizando como agente supressor de fluorescência o composto acrilamida (hidrossolúvel).

As análises foram realizadas em solução aquosa e em presença de micelas do detergente LPC. A concentração de peptídeo utilizada foi de 10 μM , e a de detergente de 10 mM. A titulação deu-se pela adição de uma solução de acrilamida 6 M, até a concentração final de 50 mM.

3.6.3. Estudo com Trifluoretanol (TFE)

Ainda para simular o efeito da membrana na conformação do peptídeo, foi utilizado o solvente trifluoroetanol (TFE) (SONNICHSEN et al., 1992). Esse solvente possui um caráter parcialmente hidrofóbico e polaridade semelhante à encontrada na membrana, sendo utilizado como um simulador deste tipo de ambiente. Acreditamos que todos os peptídeos assumem a conformação de α -hélice neste solvente.

Neste experimento, de uma solução concentrada de peptídeo foram retiradas alíquotas e adicionadas a soluções contendo TFE/H₂O de modo que a concentração final de peptídeo seja de 10 μ M. As concentrações das soluções de TFE variaram para cada experimento entre 0 a 60%. A cada percentagem de TFE a amostra era homogeneizada e submetida à análise de fluorescência.

3.7. DICROÍSMO CIRCULAR

A técnica de dicroísmo circular (CD) é muito útil no estudo de macromoléculas. Este fenômeno é representado pela diferença de absorção entre a luz polarizada à direita e à esquerda. Em proteínas e em peptídeos os cromóforos responsáveis pelo espectro de CD são a ligação amida, os resíduos aromáticos de triptofano, tirosina e fenilalanina, e as pontes dissulfeto (MULKERRIN, 1996).

A rotação ao redor da ligação O=C-NH da amida peptídica é restrita devido ao caráter de dupla ligação resultante da coplanaridade dos átomos CONH. Existem apenas duas ligações cuja rotação é permitida: C α -NH, cujo ângulo de rotação é ϕ e CO- α -NH, cujo ângulo de rotação é Ψ . Os ângulos específicos ϕ e Ψ são os responsáveis pelo espectro de CD característico das estruturas secundárias, α -hélice, folha β paralela e antiparalela, vários tipos de dobras β e estrutura randômica. O

cromóforo amida apresenta as transições: $n \rightarrow \pi^*$, centrada próximo a 220 nm, com energia de transição menor, e $\pi \rightarrow \pi^*$ centrada em 190 nm.

Quando a proteína está enovelada, o arranjo tridimensional dos cromóforos afeta a estrutura eletrônica e, em conseqüência, o espectro da proteína ou peptídeo. Para as proteínas com estrutura ao acaso, as interações de longa distância são mínimas e seu espectro é composto das duas bandas, $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. A estrutura β apresenta uma banda $n \rightarrow \pi^*$ centrada em 215 nm e uma banda $\pi \rightarrow \pi^*$ centrada em 196 nm, as quais são originadas pelos elétrons desemparelhados do oxigênio da carbonila. O espectro de uma α -hélice possui essas mesmas bandas. Contudo, ele é mais complicado pois nele a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ é desdobrada em $\pi \rightarrow \pi^*$ (\perp), centrada em 191 nm, e $\pi \rightarrow \pi^*$ (\parallel) centrada em 208 nm. A transição $n \rightarrow \pi^*$ é deslocada para menor energia, centrada em 222 nm. A figura 9 apresenta espectros característicos de CD das estruturas secundárias acima mencionadas.

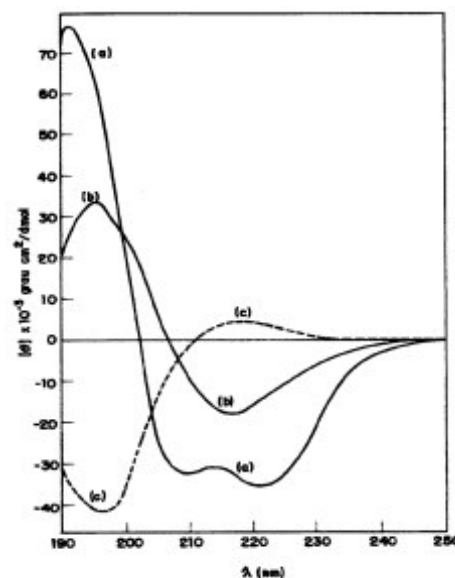


Figura 9: Espectros de CD característicos das estruturas secundárias (a) α -hélice, (b) folha β pregueada e (c) estrutura randômica (GREENFIE et al., 1969).

Os espectros de CD foram adquiridos em um espectropolarímetro CD6 Jobin-Yvon, em celas de 5,0 mm de caminho óptico. O número de varreduras variou de acordo com o experimento. Em geral, utilizamos 5 varreduras por espectro com tempo de integração de 3 segundos por ponto. Para todos os experimentos a leitura foi feita a cada 0,5 nm. O aparelho foi calibrado com ácido-(+)-10-canforsulfônico, conforme o manual do equipamento.

Os experimentos de CD foram realizados no laboratório de Biologia Estrutural da Prof^a. Dr^a. Shirley Schreier juntamente com sua aluna Joana Paulino localizado no Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo – USP na cidade de São Paulo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

4.1.1. Síntese dos Peptídeos em Fase Sólida

A síntese foi realizada em resina do tipo Rink-amida, de forma que o peptídeo obtido contém em sua extremidade C-terminal um grupo carboxiamida. Este tipo de peptídeo é mais resistente a ataques enzimáticos de proteases e mimetiza melhor a proteína, pois a ligação carboxiamida simula a ligação peptídica desta extremidade com o corpo da proteína.

Os peptídeos foram inicialmente sintetizados de duas formas:

- 1) A síntese dos peptídeos relacionados à St II e marcados com Trp na posição 2, por terem semelhante região carboxi-terminal, foram sintetizados de maneira simultânea. A escala inicial de síntese foi de 1,0 mmol, com uma massa de resina de 1,82 g (grau de substituição da resina = 0,55 mmol/g). A síntese foi realizada da posição 30 à posição 1 da seqüência, resultando ao final da síntese o peptídeo W2 protegido e ligado à resina. A partir desta peptidil-resina foram separadas 5 frações de 0,625 g. Destas 5, em 4 foram realizadas adições pontuais na posição zero N-terminal e a outra permaneceu como o peptídeo W2. Os grupos adicionados estão descritos na tabela 1.

Salientamos que após a adição do resíduo 11 da seqüência aproximadamente 15% da massa total de peptidil-resina foi separada resultando, após a clivagem, no peptídeo St II 11-30.

Tabela 1: Peptídeos obtidos modificando-se a extremidade N-terminal da St II.

| Resinas | Aminoácido ou Grupo Orgânico Adicionado | Peptídeo Final |
|---------|---|----------------|
| W2 | Acetila | (Ac)-W2 |
| W2 | Lisina | K-W2 |
| W2 | Serina | S-W2 |
| W2 | Ácido Aspártico | D-W2 |

2) Os peptídeos relacionados à St I também foram sintetizados de maneira simultânea a partir da região carboxi-terminal. A escala inicial de síntese foi de 0,4 mmol, com uma massa de resina de 0,727 g (grau de substituição da resina = 0,55 mmol/g).

A síntese foi realizada inicialmente da posição 31 a 12 da seqüência. Neste ponto a síntese foi interrompida e a resina dividida em duas partes: uma contendo 0,350 g de resina foi separada e clivada para obtenção do peptídeo St I 12-31. No restante da resina continuou-se a síntese até o resíduo 1, resultando ao final da síntese o peptídeo St I 1-31.

Com o andamento do projeto achamos interessante a obtenção do peptídeo St I 2-31, para evitar uma nova síntese, esta seqüência foi obtida da seguinte forma. Uma alíquota da peptidil-resina com o peptídeo St I 1-31 foi separada e submetida à Degradação de Edman. Neste procedimento, a peptidil-resina foi levada à reação com um coquetel composto por etanol absoluto / TEA / PITC (fenilisotiocianato) na proporção de 7:2:1 respectivamente. O PITC se liga covalentemente ao grupo amino N-terminal tornando a ligação peptídica entre o último resíduo e o resíduo seguinte mais ácido lábil. Após a reação com o coquetel (Etanol / TEA / PITC), a resina foi

lavada com DMF / DCM e submetida à clivagem com TFA, que além de romper a ligação do peptídeo com a resina e dos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos, também promoveu a hidrólise da ligação peptídica do último resíduo (serina) com o resíduo seguinte (ácido glutâmico) resultando no peptídeo St I 2-31 que foi posteriormente purificado e caracterizado.

As peptidil-resinas obtidas foram clivadas e os peptídeos purificados, apresentando na forma pura um rendimento de aproximadamente 30%. Após as etapas de purificação, obteve-se um grau de pureza maior que 95% para todos os peptídeos. Os cromatogramas dos peptídeos puros em coluna de Fase Reversa C-18 são mostrados nas figuras 10 e 11.

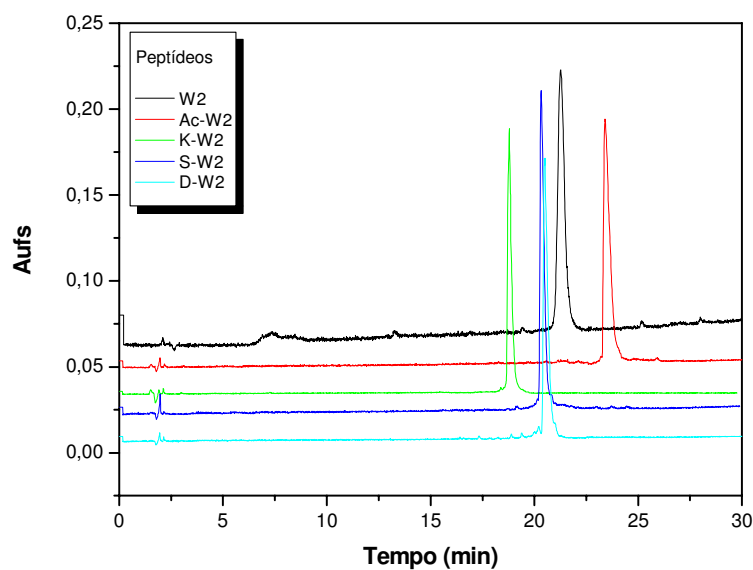


Figura 10: Perfis cromatográficos obtidos, após purificação, por HPLC dos peptídeos variantes da seqüência W2. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA / H₂O e B: 0,036% TFA . ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm.

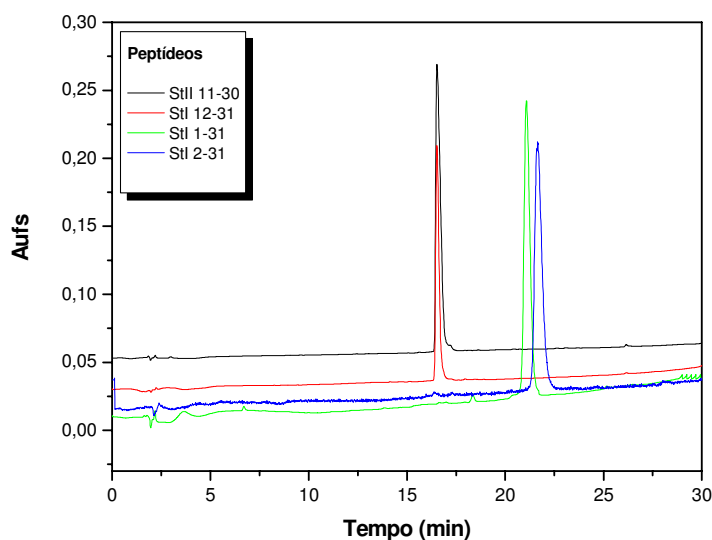


Figura 11: Perfis cromatográficos obtidos, após purificação, por HPLC dos peptídeos com 20 aminoácidos e do peptídeo St I 1-31. Programa: 5-95 % B em 30 min. Solvente A: 0,045% TFA . H₂O e B: 0,036% TFA . ACN. Fluxo de 1,5 mL e detecção em 220 nm.

Analisando comparativamente os cromatogramas sobrepostos como estão representados nas figuras 10 e 11 pode-se identificar que as modificações pontuais nas cargas desta região amino-terminal alteram os tempos de retenção dos mesmos. Quando comparamos os cromatogramas sobrepostos da figura 10, torna-se claro que os peptídeos menos polares possuem tempos de retenção maiores que os que apresentam maior polaridade. Este fato é devido a maior interação dos mesmos pela fase estacionária da coluna cromatográfica, que possui características apolares. Sendo assim, o peptídeo Ac-W2 é o que possui maior tempo de retenção seguido pelo W2. O peptídeo que mostrou menor tempo de retenção foi o K-W2 devido a sua dupla ionização, isto é, o grupo α -amino e o ϵ -amino da cadeia lateral da lisina. Os peptídeos S-W2 e D-W2 apresentaram tempos de retenção praticamente idênticos, indicando semelhança na polaridade.

Ao analisarmos a figura 11 também nos chama a atenção o fato de que os peptídeos com 20 resíduos tanto da St I quanto da St II apresentam tempos de retenção praticamente idênticos. Isto é atribuído, a carga semelhante de ambos peptídeos pois, apesar das diferentes posições, Glu¹⁶ da St I 12-31 e Glu²² da St II 11-30, a carga total não é alterada mesmo sabendo que a Gln¹⁵ (St II 11-30) é mais polar que a Gly²³ (St I 12-31). Por outro lado o peptídeo St I 1-31 possui tempo de retenção mais elevado devido a natureza predominantemente hidrofóbica dos primeiros 10 aminoácidos da cadeia. Novamente a ausência do aminoácido serina na extremidade aumenta levemente o tempo de retenção do peptídeo por se tratar de um resíduo polar.

Logo após a purificação, os peptídeos puros foram submetidos à análise de aminoácidos, obtendo-se a proporção e composição de aminoácidos esperadas. Em seguida utilizamos a técnica de espectrometria de massas para determinação do peso molecular. Estas duas técnicas confirmaram a obtenção dos peptídeos desejados.

4.1.2. Caracterização por Espectrometria de Massas (ESI-MS).

Como mencionado anteriormente, a técnica de espectrometria de massas por ionização electrospray (ESI-MS) foi utilizada para a confirmação de que a síntese e purificação ocorreram de maneira satisfatória.

Os espectros de massas mostraram que os pesos moleculares teóricos foram condizentes com os obtidos (figuras 12-21), confirmando a obtenção dos materiais desejados.

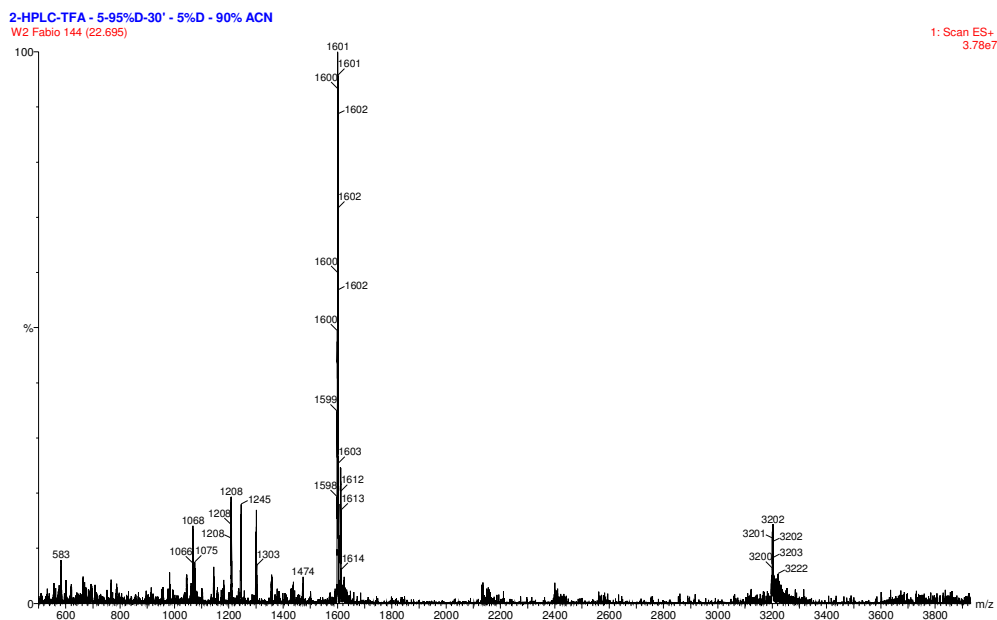


Figura 12: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro W2 de peso molecular 3200 Da (carga +1), 1601 Da (carga +2) Da, 1068 Da (carga +3).

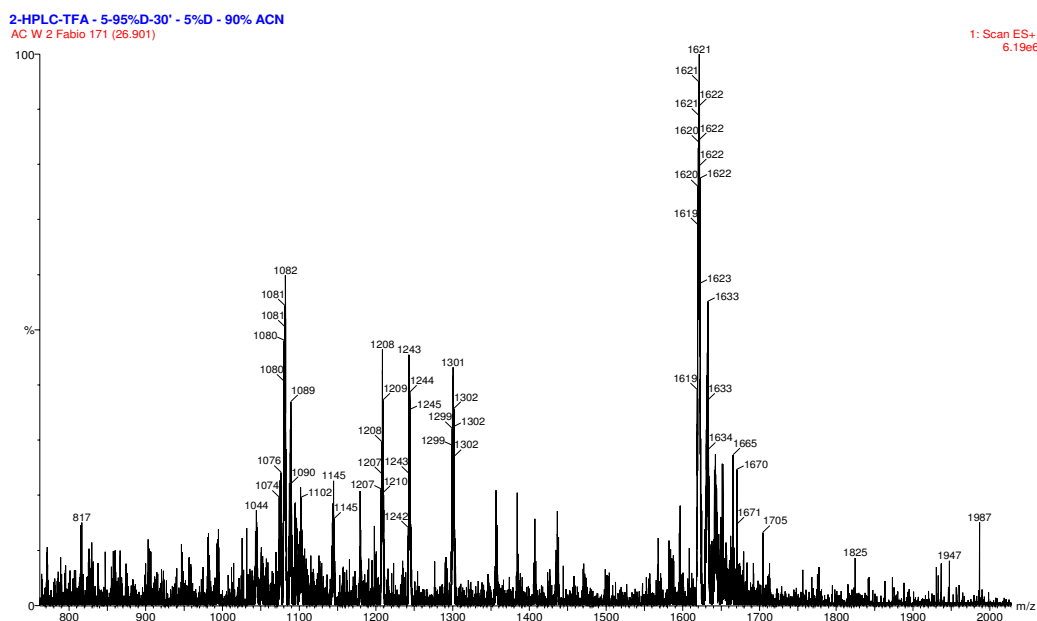


Figura 13: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro Ac-W2 de peso molecular 3243 Da (carga +1), 1622 Da (carga +2) Da, 1081 Da (carga +3).

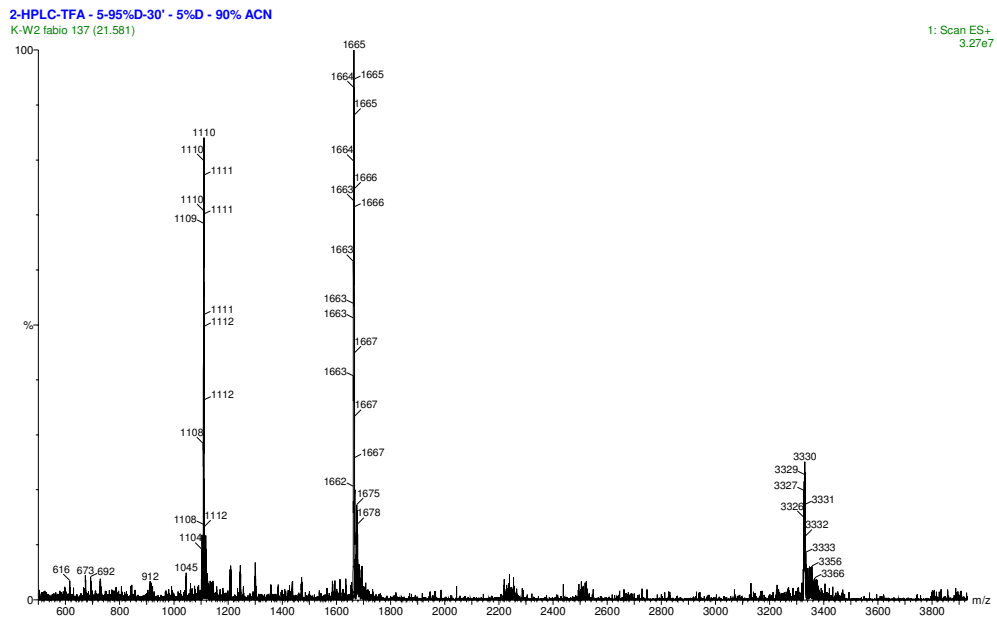


Figura 14: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro K-W2 de peso molecular 3330 Da (carga +1), 1665 Da (carga +2) Da, 1110 Da (carga +3).

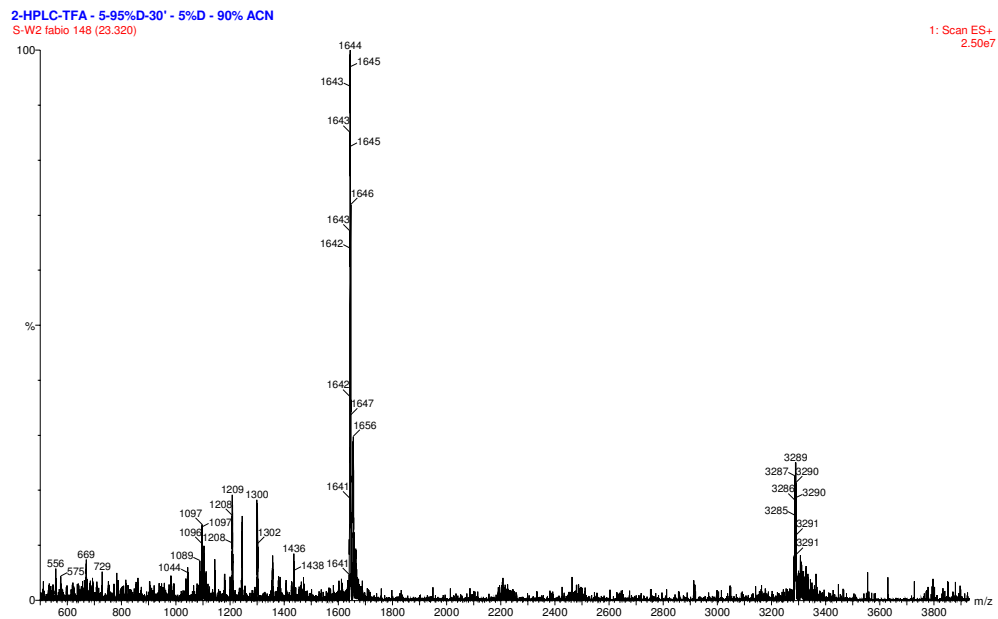


Figura 15: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro S-W2 de peso molecular 3289 Da (carga +1), 1644 Da (carga +2) Da, 1096 Da (carga +3).

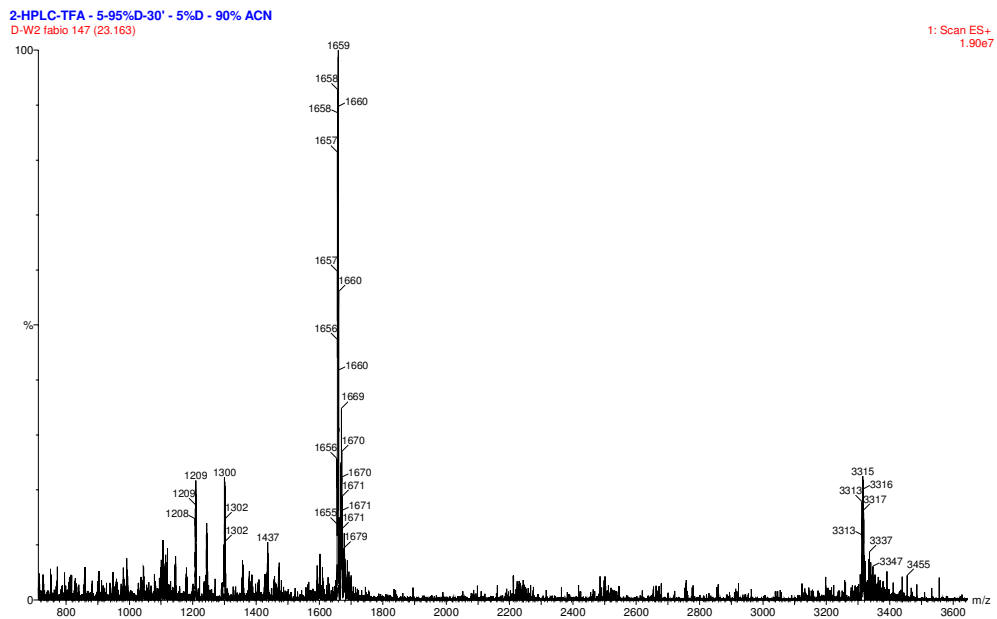


Figura 16: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro D-W2 de peso molecular 3315 Da (carga +1), 1658 Da (carga +2).

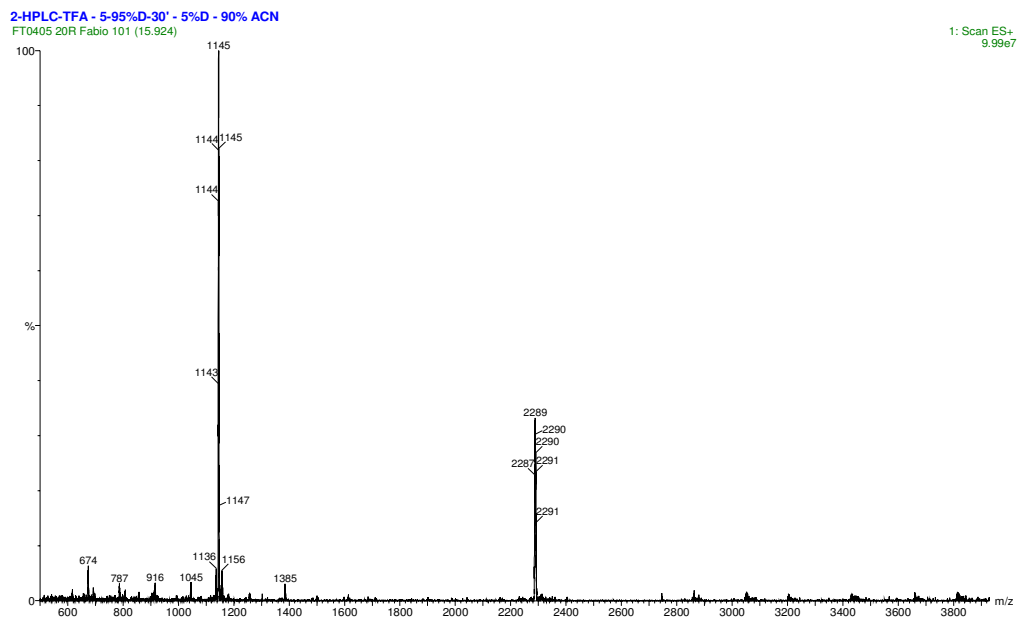


Figura 17: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro St II 11-30. Peso molecular teórico de 2290 Da (carga +1) e 1145 Da (carga +2).

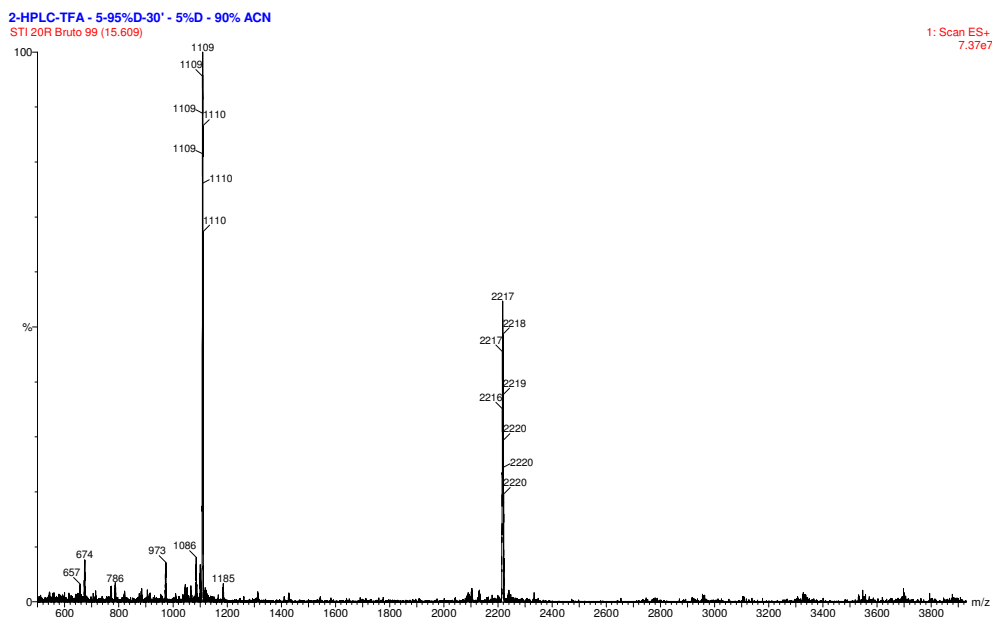


Figura 18: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro St I 12-31 de peso molecular 2217 Da (carga +1), 1109 Da (carga +2).

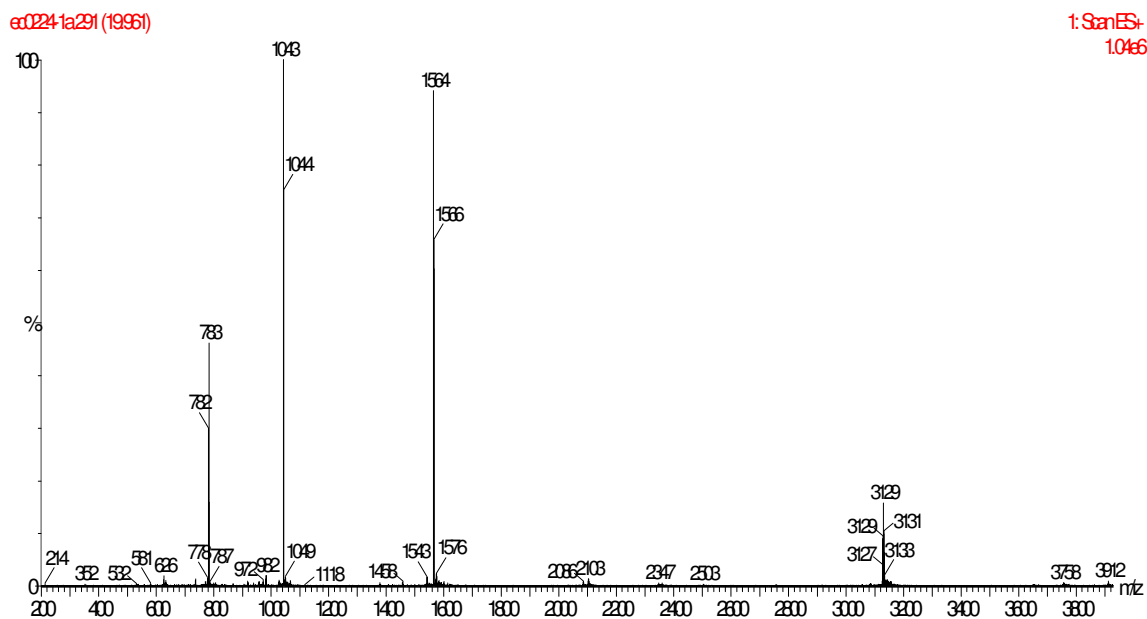


Figura 19: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro St II 1-30 de peso molecular de peso molecular 3129 Da (carga +1), 1565 Da (carga +2), 1043 Da (carga +3), 783 Da (carga +4).

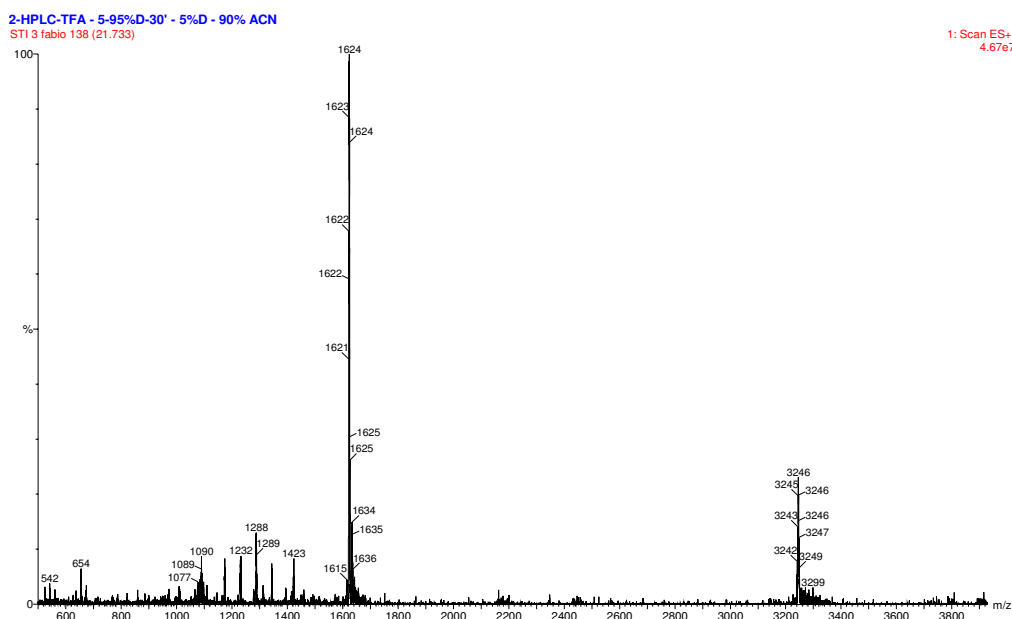


Figura 20: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro St I 1-31 de peso molecular 3246 Da (carga +1), 1623 Da (carga +2).

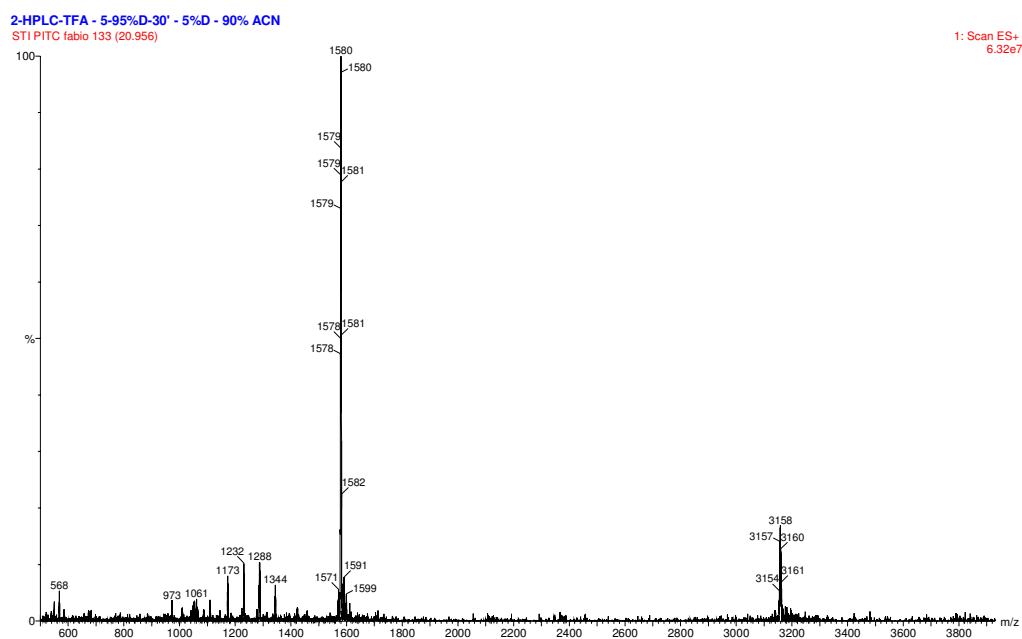


Figura 21: Espectro de massas obtido para o peptídeo puro St I 2-31 de peso molecular 3158 Da (carga +1), 1580 Da (carga +2).

4.2. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Em recentes trabalhos, o fragmento da St II contendo os primeiros 30 aminoácidos mostrou a formação de um poro similar ao da proteína inteira, porém em concentração muito superior ao da proteína nativa. Apesar desta menor atividade, o fato de formar poros de mesmo diâmetro mostra a utilidade destes peptídeos como modelos para o estudo do mecanismo de ação desta proteína (CASALLANOVO et al., 2006).

Tendo em vista que as principais alterações que diferenciam as proteínas St I e St II estão na região amino-terminal (primeiros 30 resíduos) e que estas proteínas possuem atividades diferentes, a comparação em termos de atividade hemolítica dos fragmentos oriundos desta região tornou-se importante. Ao compararmos os dois peptídeos provenientes da St I e St II com 31 (St I 1-31) e 30 (St II 1-30) resíduos, respectivamente, podemos notar uma diferença acentuada entre suas atividades hemolíticas (figura 22). O peptídeo St I 1-31 possui atividade hemolítica bem menor que a do peptídeo St II 1-30. Este dado reforça a tese que as diferenças nesta região podem ser as responsáveis pela menor atividade hemolítica da St I em comparação com a St II. As diferenças entre os dois peptídeos são: ácido glutâmico na posição 2 e ácido aspártico na posição 9 da St I por alaninas na St II, glicina na posição 23 por ácido glutâmico, ácido glutâmico na posição 16 por glutamina e um resíduo de serina extra localizado na extremidade N-terminal da St I. Ressaltamos porém, que ao relacionarmos estes peptídeos com as suas entidades protéicas nativas, a concentração para a obtenção da mesma atividade hemolítica é muito superior para os peptídeos – cerca de 1000 vezes (CASALLANOVO et al., 2006).

Para avaliar em pormenores a contribuição de cada alteração na atividade biológica, outros peptídeos foram testados, variando-se apenas algumas posições de cada vez. Desta forma, dois peptídeos contendo somente 20 resíduos e possuindo como alterações apenas os resíduos Glu¹⁶ e Gly²³ da St I modificados para Gln¹⁵ e Glu²² da St II foram avaliados. Estas seqüências, denominadas, de St I 12-31 e St II 11-30 mostraram a mesma atividade hemolítica (figura 23). Este resultado demonstra que as diferenças contidas nesta região da cadeia peptídica não são as responsáveis pela diferença de atividade entre estas proteínas.

Os resultados acima mostram que as modificações responsáveis pela menor atividade do peptídeo St I 1-31 provavelmente estariam concentradas na região dos 10 primeiros resíduos da proteína, isto é: 1) a serina adicional localizada na extremidade da St I; 2) a substituição do ácido glutâmico na posição 2 da St I por alanina na St II; 3) a alteração do ácido aspártico na posição 9 da St I por alanina na StII.

Com os resultados acima, resolvemos avaliar inicialmente a contribuição da adição do resíduo de serina na atividade da St I. Esta avaliação foi feita analisando a atividade hemolítica do peptídeo com 31 resíduos comparativamente com a seqüência sem o aminoácido de serina N-terminal. A figura 22 mostra que a atividade hemolítica deste peptídeo modificado é intermediária entre os peptídeos com 31 e 30 resíduos da St I e a St II, respectivamente, mostrando que a presença deste aminoácido é responsável por parte da perda de atividade hemolítica da St I em relação a St II. A perda do restante da atividade pode ser atribuída dessa forma aos resíduos de Glu na posição 1 ou Asp na posição 8.

Para confirmar o resultado acima e avaliar em pormenores a importância da extremidade N-terminal da St II na interação com membranas, sintetizamos um

análogo da seqüência N-terminal contendo um resíduo de Trp na posição 2 - peptídeo W2. Este peptídeo possui um resíduo de triptofano – fluorescente – substituindo uma leucina da seqüência original, e já tinha mostrado possuir atividade hemolítica superior ao peptídeo original (figura 24). A introdução deste resíduo permitiu o estudo dessas seqüências na interação com miméticos de membrana através da fluorescência. A este peptídeo também foram adicionados os outros grupos anteriormente citados, isto é, acetil, Asp e Lys. As atividades hemolíticas destes peptídeos confirmaram que a introdução do resíduo de serina realmente diminui a eficácia do peptídeo na lise de hemácias (figura 25). Os dados obtidos também mostraram que qualquer modificação nesta extremidade, seja diminuindo (acetil) ou aumentando (lisina) a polaridade, afeta negativamente a atividade hemolítica dos peptídeos. A ordem de atividade hemolítica neste experimento foi W2>D-W2>Ac-W2>K-W2>S-W2). Podemos verificar, desta forma que os peptídeos menos ativos foram os contendo a Ser e a lisina nesta posição. Os peptídeos contendo a extremidade acetilada ou com o grupo aspártico mostraram valores mais próxima ao peptídeo W2. Para avaliar o motivo destas alterações, estudos estruturais e de interação com miméticos de membrana foram realizados, como descritos a seguir.

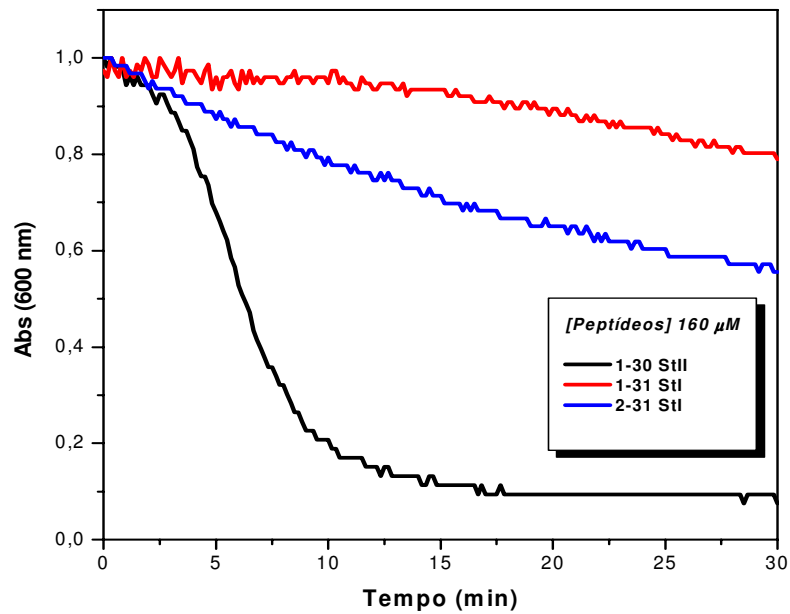


Figura 22: Atividade hemolítica dos peptídeos St I 1-31, St I 2-31 e St II 1-30, apresentadas graficamente como a extinção da absorbância medida a 600 nm em função do tempo.

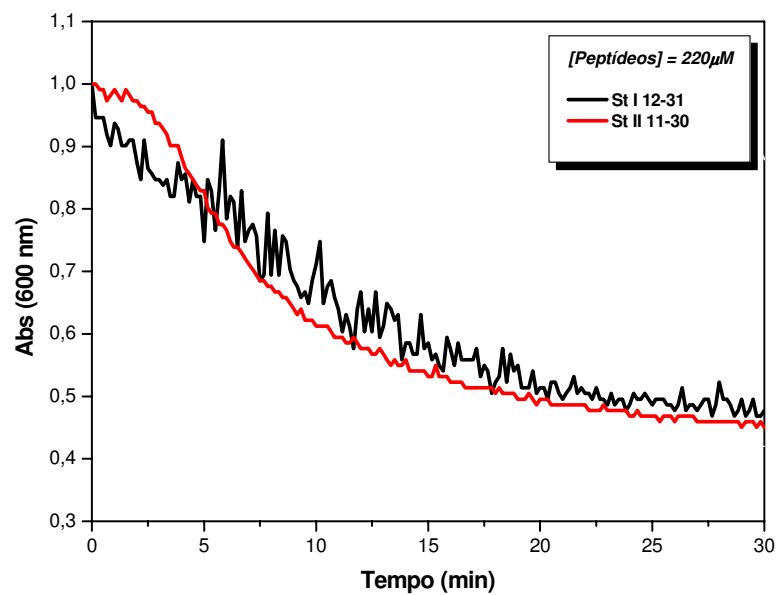


Figura 23: Atividade hemolítica dos peptídeos St I 12-31 e St II 11-30, apresentadas graficamente como a extinção da absorbância medida a 600 nm em função do tempo.

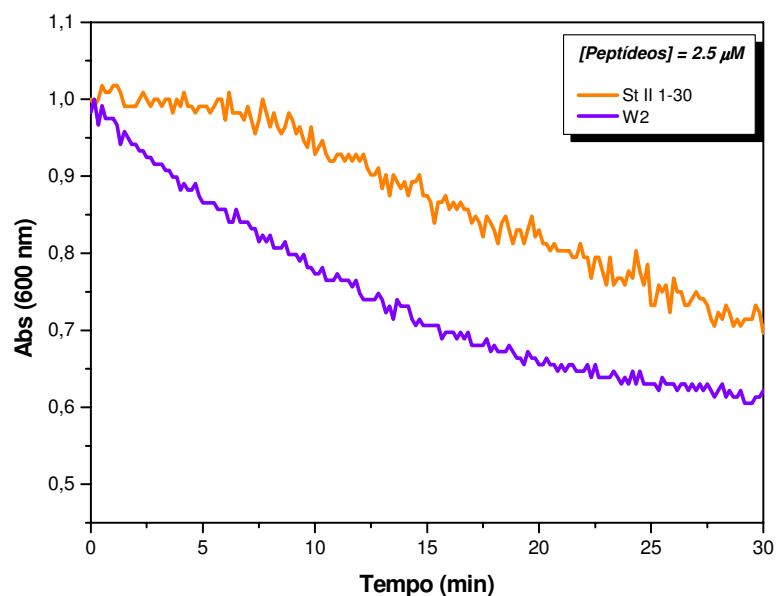


Figura 24: Atividades hemolíticas dos peptídeos, St II 1-30 e W2 apresentadas graficamente como a extinção da absorbância medida a 600 nm em função do tempo.

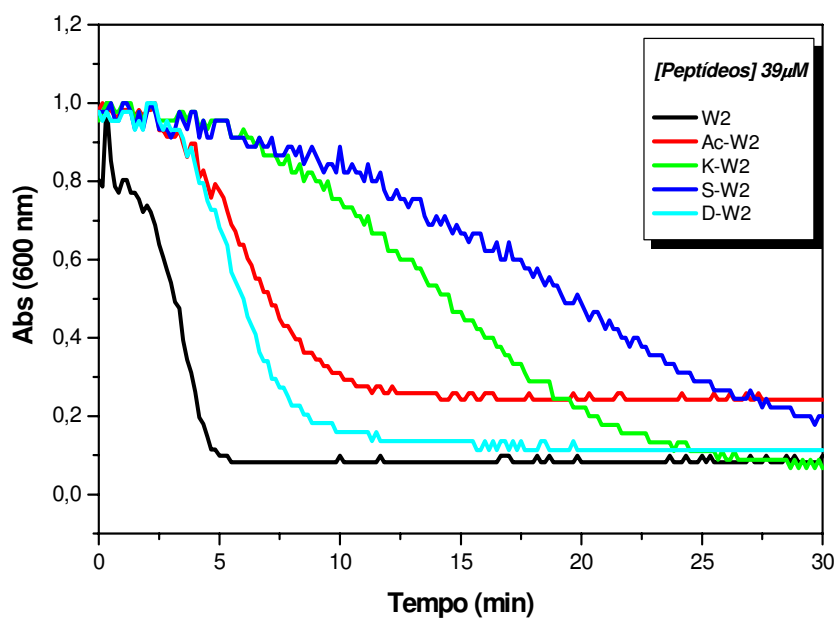


Figura 25: Atividades hemolíticas dos peptídeos modificados na extremidade amino-terminal apresentadas graficamente como a extinção da absorbância medida a 600 nm em função do tempo.

4.3. ESPECTROFLUORIMETRIA

Neste bloco estudamos a contribuição dos diferentes grupos adicionados na extremidade amino-terminal do peptídeo contendo os 30 primeiros resíduos da St II e contendo triptofano na posição 2, em função de sua interação com miméticos de membrana.

O triptofano é muito utilizado como fluoróforo em estudos topográficos de proteínas, pois sua presença nos mais variados tipos de proteínas é limitada em um número relativamente baixo. A cadeia lateral deste aminoácido apresenta um anel indol, que pode ser utilizado como sonda fluorescente para determinar o grau de exposição do peptídeo ao ambiente sofrendo perturbação do solvente (GHIRON et al., 1992). Desta maneira, as medidas realizadas devido à fluorescência do anel indólico do triptofano permitem obter pistas do comportamento do peptídeo em diferentes condições.

Os espectros de fluorescência foram obtidos de modo que a concentração de peptídeo final na cubeta ficasse em 10 μ M.

A utilização de uma solução tampão como, por exemplo, PBC (fosfato / borato / citrato) para a realização dos experimentos não foi viável devido as variações estruturais que o peptídeo sofre com a alteração da força iônica (CASALLANOVO et al., 2006), portanto, os estudos foram realizados em água deionizada tendo seu pH ajustado para 7,0.

Os parâmetros utilizados para analisar o comportamento estrutural do peptídeo foram o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão e a razão F/F_0 , para os dados obtidos nos experimentos de fluorescência. Destes dois o de maior relevância nas discussões foi o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão. Na intensidade de fluorescência, as mudanças conformacionais

que podem ocorrer nestas moléculas, podem provocar uma maior ou menor aproximação das cadeias laterais e / ou grupos ionizáveis do peptídeo com o triptofano, agindo como supressores e afetando este parâmetro (CHEN et al., 1998).

4.3.1. Estudos Conformacionais com Surfactantes

Para realização deste estudo foram utilizados o detergente aniônico, dodecil-sulfato de sódio (SDS), e os zwitteriônicos: N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano-sulfonato (HPS) e 1-palmitoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (LPC). Estes detergentes formam micelas, que neste caso, foram nossos modelos de membranas.

4.3.1.1. Estudos com SDS

O primeiro detergente estudado foi o SDS que forma micelas aniônicas. A queda dos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão (“blue shift”), migração para um ambiente apolar, demonstrou que todos os peptídeos interagem com as micelas de SDS como demonstrado nas figuras 26 a 31. Entretanto, ao contrário do esperado para um ambiente mais apolar, a intensidade de fluorescência decresce para os cinco peptídeos marcados com Trp (figura 31). Isto provavelmente é devido a interação das cadeias laterais dos aminoácidos constituintes do peptídeo e / ou do detergente com a cadeia lateral do triptofano, atuando como supressores da fluorescência, em especial os localizados na extremidade amino-terminal. Deste modo, para estudos comparativos entre os peptídeos em SDS, a intensidade de fluorescência relativa foi pouco utilizada (CHEN et al., 1998).

Neste detergente, todos os peptídeos contendo triptofano na posição 2 da seqüência apresentam uma queda inicial brusca no $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão e um forte aumento na intensidade de fluorescência em concentrações de SDS abaixo da micelar crítica. Isto ocorre devido a interação das moléculas de SDS na forma monomérica com os peptídeos. Esta interação provavelmente ocorre através da interação eletrostática do grupo sulfato negativo do SDS com o grupo amino-terminal positivo do peptídeo, e a interação hidrofóbica entre a região apolar do peptídeo (posição 1-10) com a cauda hidrocarbonada do SDS. Esta interpretação explica o fato do peptídeo acetilado apresentar a menor queda de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão e o menor aumento da razão F/F_0 em concentrações baixas de SDS pois, não possuindo a carga positiva a formação deste tipo de agregação não é eficiente. Em concentrações de detergentes acima de ≈ 8 mM (CMC – concentração micelar crítica) (LANIO et al., 2003) os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão se estabilizam, indicando uma estabilidade na interação peptídeo / membrana, independente da quantidade de SDS, que a partir deste valor se encontra todo na forma de micelas.

O “blue shift” obtido na titulação com SDS mostra que todos os peptídeos interagem com este detergente. Este resultado indica que todos os peptídeos se inserem nas micelas de SDS, comprovando a capacidade destes de interagirem com modelos de membranas biológicas e indicando um provável mecanismo de ação, onde a extremidade amino-terminal da cadeia peptídica interage com a membrana.

Comparativamente, o peptídeo Ac-W2 foi o que demonstrou maior interação com as micelas formadas (maior “blue shift”), seguidos das seqüências W2 e S-W2. Estes peptídeos apresentaram os menores valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão, indicando um maior deslocamento para o meio apolar (interior da micela). Os peptídeos K-W2 e D-W2 foram os que apresentaram menor interação, provavelmente devido a uma

menor capacidade de agregação destas moléculas com a bicamada lipídica, fato este ocasionado pela maior polaridade da cadeia lateral do resíduo situado na extremidade amino-terminal, estes dois aminoácidos possuem cadeia lateral ionizável.

Ressaltamos, que os dados do peptídeo W2 foram primeiramente estudados por Edson Crusca Junior, podendo ser encontrados em sua dissertação de mestrado (CRUSCA E JR, 2006).

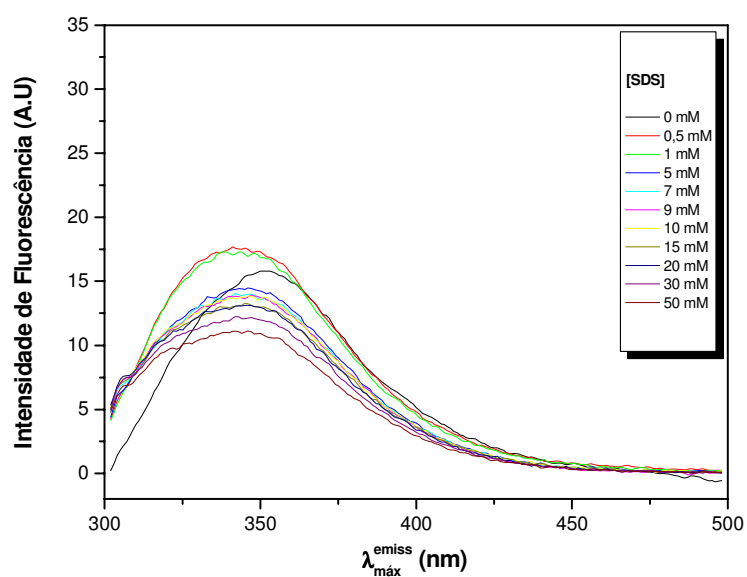


Figura 26: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo Ac-W2 na presença de SDS.

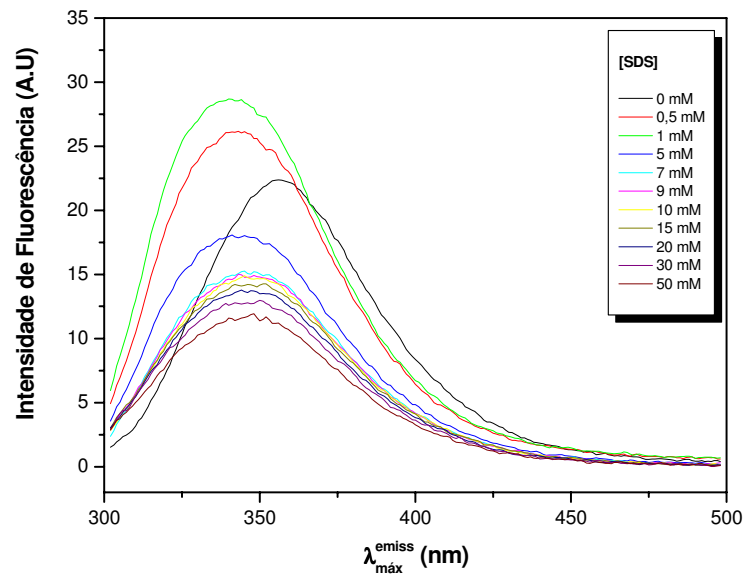


Figura 27: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo K-W2 na presença de SDS.

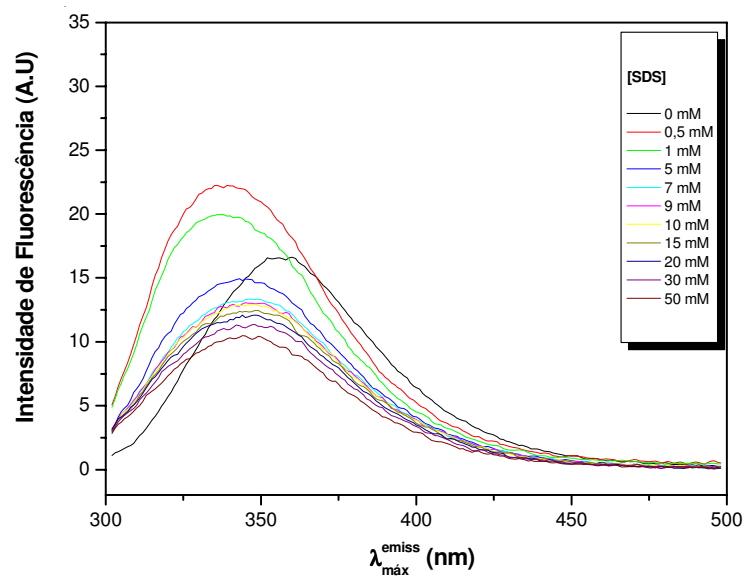


Figura 28: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo S-W2 na presença de SDS.

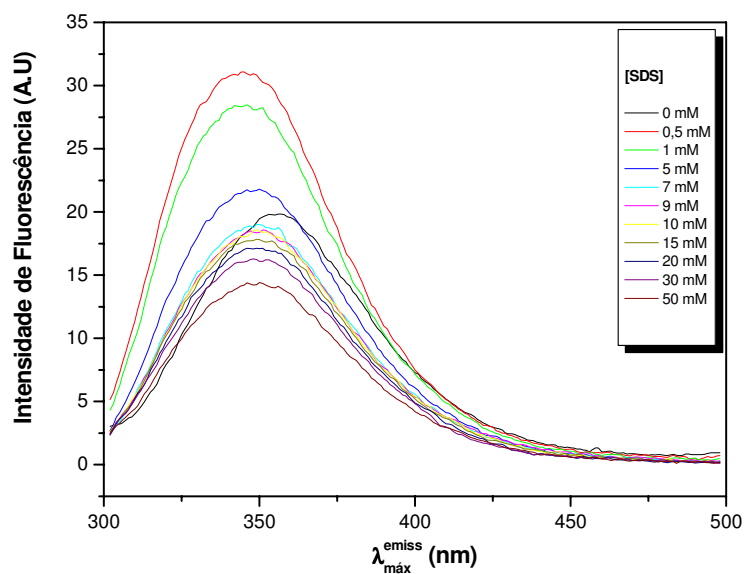


Figura 29: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo D-W2 na presença de SDS.

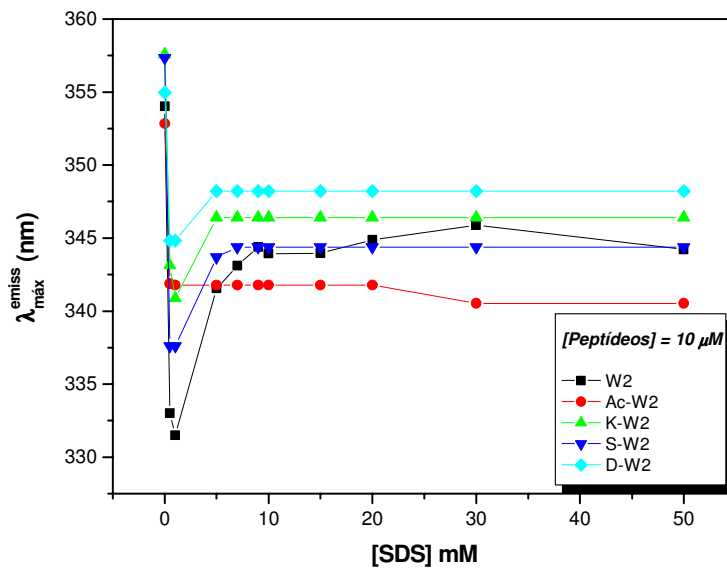


Figura 30: Variação do $\lambda_{\text{máx}}^{\text{emiss}}$ de emissão dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da concentração de SDS em pH [7,0].

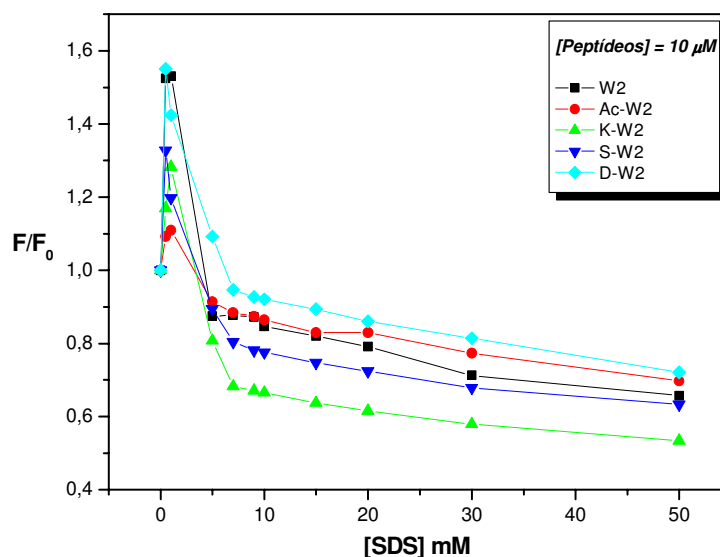


Figura 31: Variação da intensidade de fluorescência dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da concentração de SDS em pH [7,0].

4.3.1.2. Estudos com HPS

Na seqüência dos estudos em miméticos de membrana, analisamos a interação dos peptídeos com o detergente zwitteriônico HPS, que diferente das micelas formadas pelo SDS (carregadas negativamente), forma agregados dipolares.

Os resultados de titulações dos peptídeos por HPS (figuras 32-37) indicam, como o observado para os de SDS, a interação de todos os peptídeos com as micelas, indicando novamente uma maior inserção do peptídeo Ac-W2 – menores valores de comprimento de onda máximo (figura 37). Os dados obtidos, de modo similar aos obtidos com o SDS, mostram que a diminuição da carga da extremidade amino-terminal facilita a interação com a micela. Os peptídeos S-W2, W2 e D-W2 mostram uma interação semelhante para este tipo de micela sendo que o peptídeo

K-W2 foi o que apresentou menor interação. Ressaltamos que, a interação dos peptídeos com monômeros de detergentes, como visualizada em SDS, não ocorreu neste caso, provavelmente devido a natureza dipolar deste detergente.

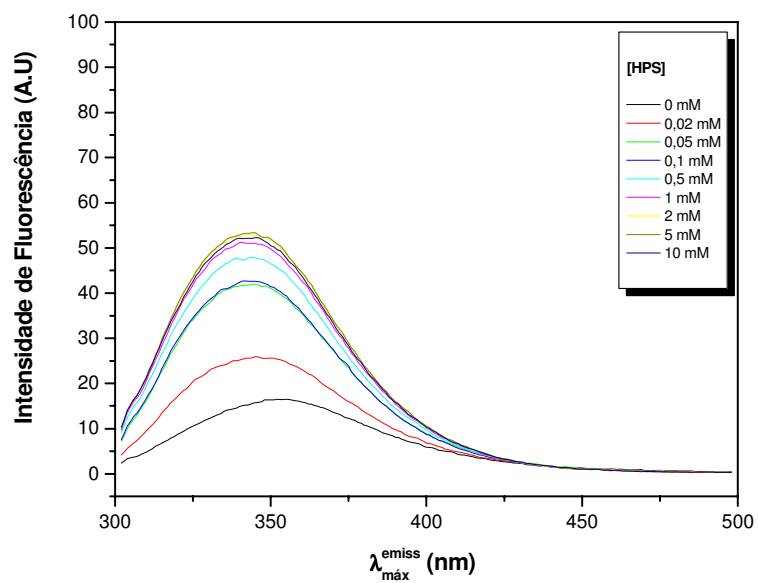


Figura 32: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo Ac-W2 na presença de HPS.

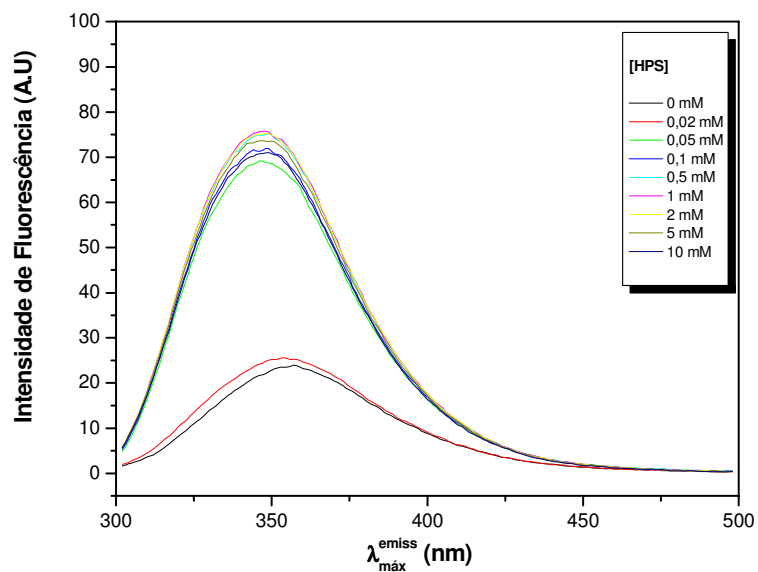


Figura 33: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo K-W2 na presença de HPS.

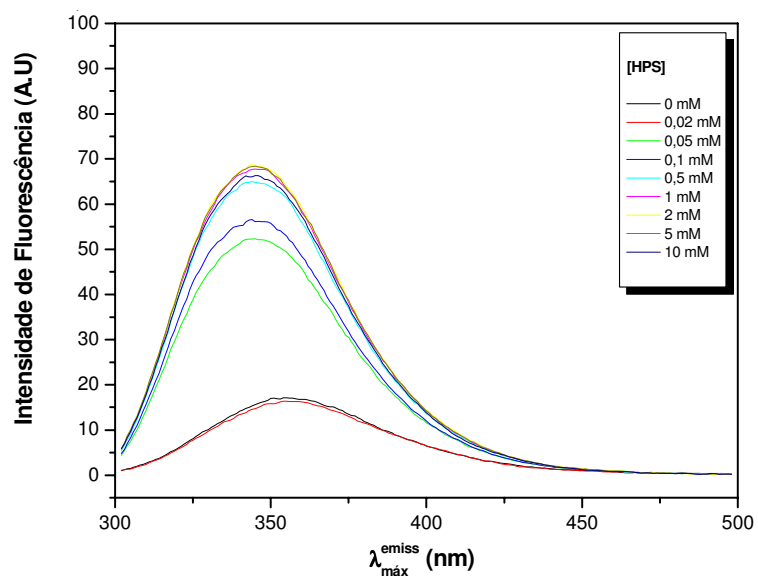


Figura 34: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo S-W2 na presença de HPS.

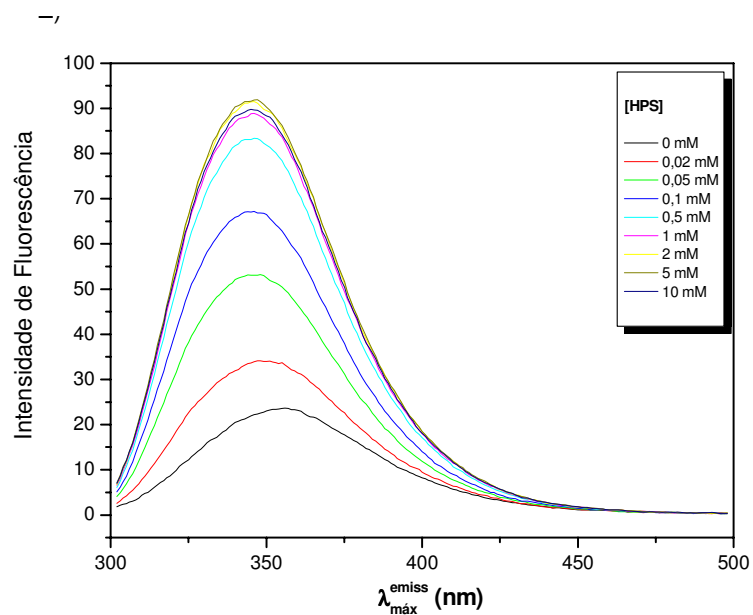


Figura 35: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo D-W2 na presença de HPS.

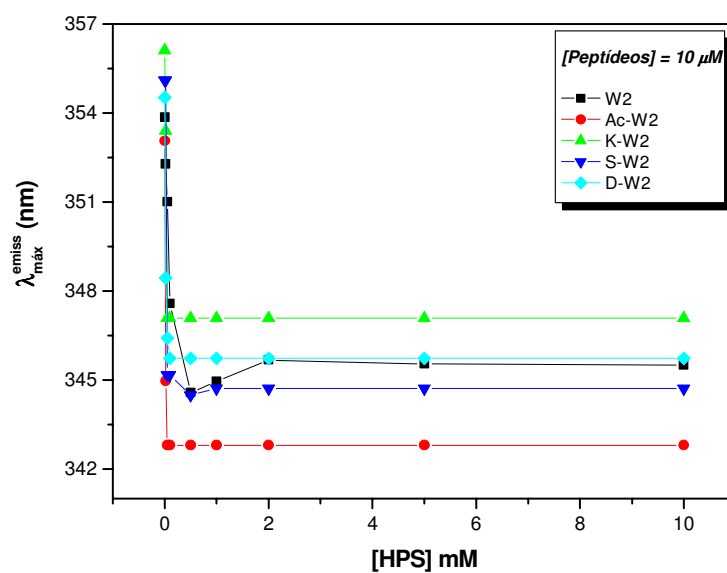


Figura 36 : Variação do $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da concentração de HPS em pH [7,0].

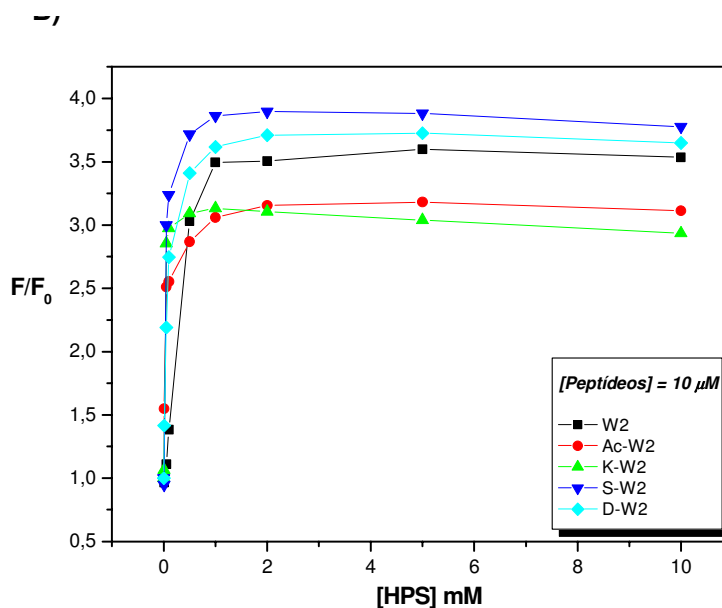


Figura 37 : Variação da intensidade de fluorescência dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da concentração de HPS em pH [7,0].

4.3.1.3. Estudos em LPC

O último detergente a ser estudado foi o LPC, que também é zwitteriônico, mas apresenta vetor de polaridade diferente do HPS, no LPC a carga negativa fica mais próxima da cadeia hidrocarbonada do ácido graxo. O LPC, desta maneira, apresenta a composição estrutural mais próxima de um fosfolípido componente de membrana. Este detergente, no entanto, difere dos lipídeos por conter uma única cauda acila e não formar bicamada, mas apresenta uma cabeça polar com um fosfato ligado à cauda acila e a um grupo colina, o que o torna quimicamente próximo à fosfatidilcolina, um fosfolípido presente na membrana celular de diversos tecidos vivos.

Novamente todos os peptídeos mostraram interação com as micelas de LPC (figuras 38-43). Sendo que o peptídeo Ac-W2 foi o que mostrou maior interação, apresentando valor de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão próximo de 338 nm (Figura 42). Os outros peptídeos, W2, S-W2, D-W2 e K-W2 apresentaram valores semelhantes de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão – similar interação com as micelas. No entanto uma pequena diferença pode ser visualizada para o peptídeo K-W2, que mostrou menor interação.

Comparando-se as micelas estudadas, podemos verificar que os peptídeos mostraram maior interação com as micelas de LPC em relação às de HPS e SDS. Enquanto que em SDS e em HPS os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão ficaram entre 342 nm e 344 nm, um maior “blue shift” foi encontrado neste ultimo detergente (338 nm).

Este comportamento foi atribuído a maior semelhança deste detergente com os fosfolipídios de membranas biológicas.

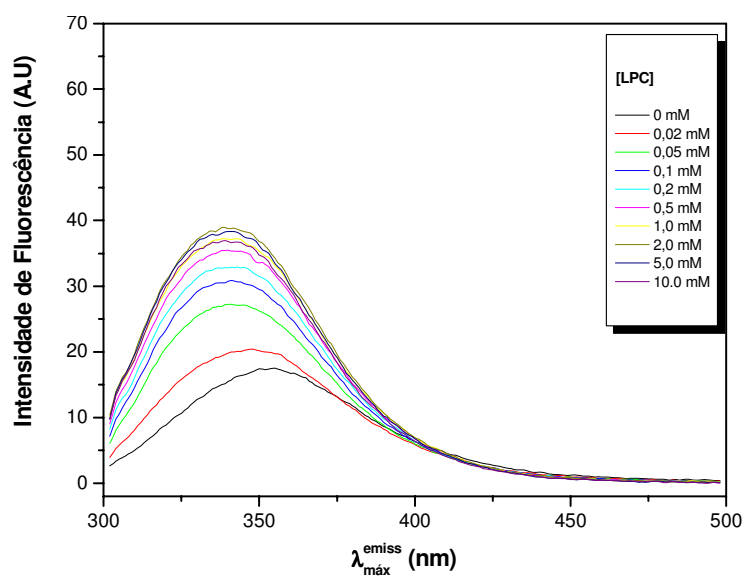


Figura 38: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo Ac-W2 na presença de LPC.

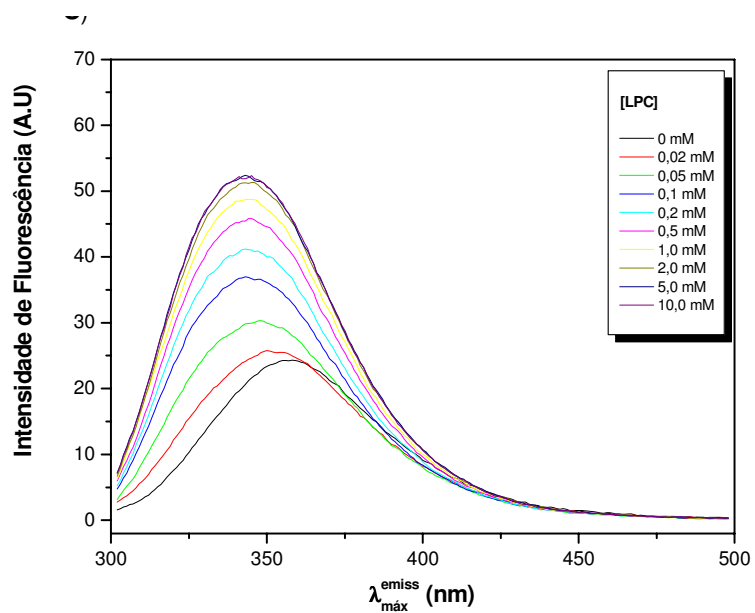


Figura 39: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo K-W2 na presença de LPC.

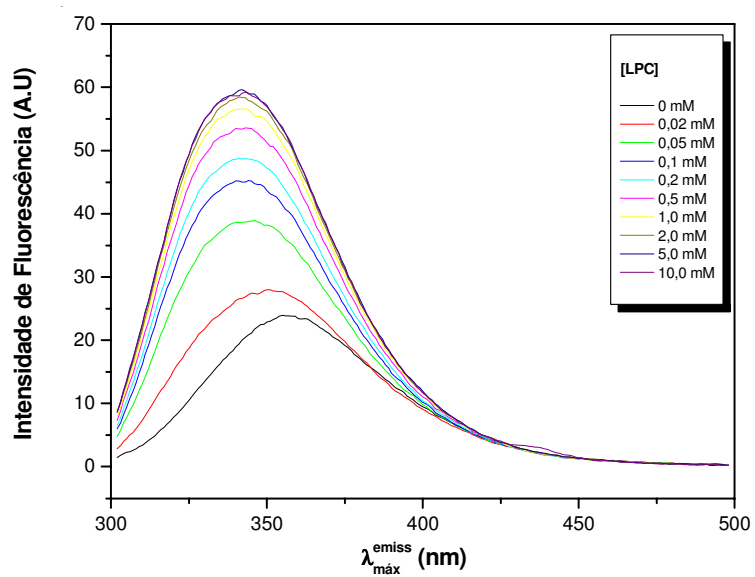


Figura 40: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo S-W2 na presença de LPC.

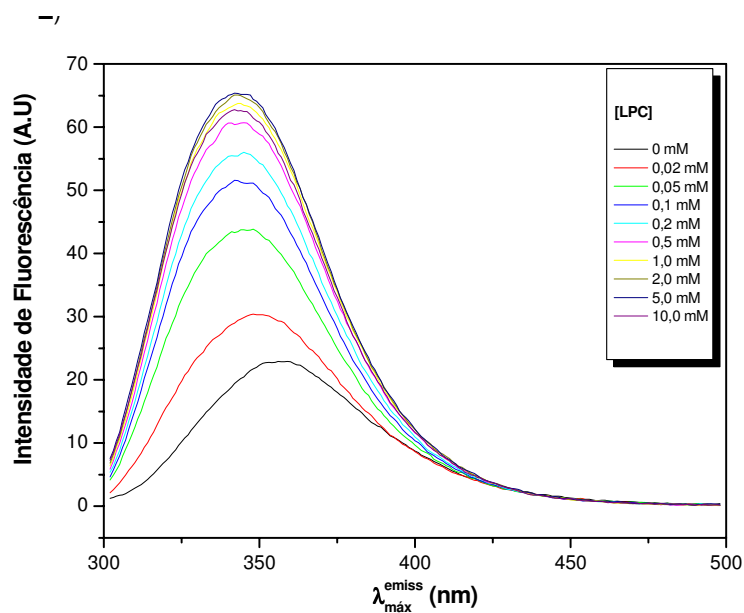


Figura 41: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo D-W2 na presença de LPC.

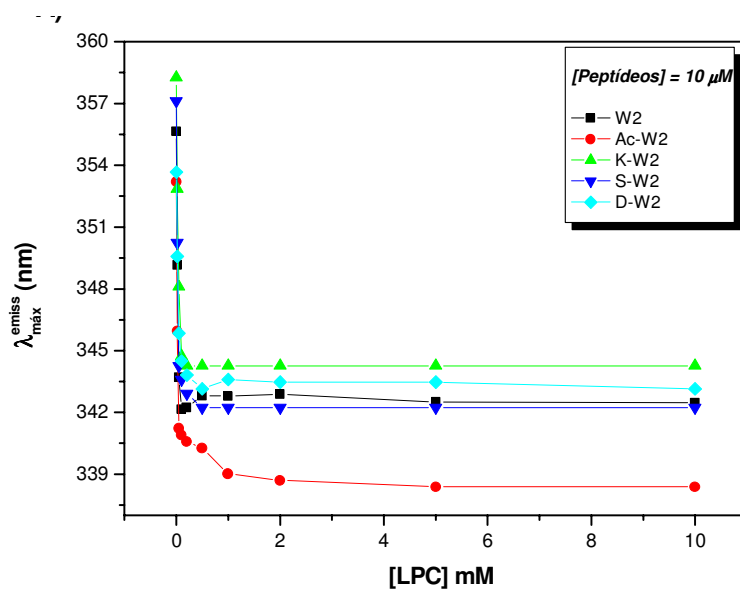


Figura 42: Variação do $\lambda_{\text{máx}}^{\text{emiss}}$ de emissão dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da concentração de LPC em pH [7,0].

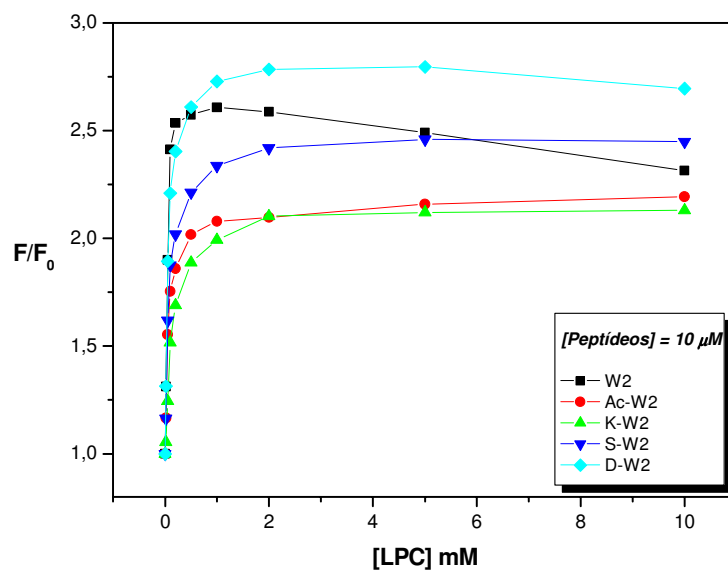


Figura 43: Variação da intensidade de fluorescência dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da concentração de LPC em pH [7,0].

4.3.2. Estudo de Supressão de Fluorescência

Para confirmar os resultados obtidos no último bloco utilizamos a técnica de supressão de fluorescência. Neste estudo são utilizados apagadores ou “quenchers” que em contato com o fluoróforo diminui a intensidade de emissão de fluorescência permitindo um estudo comparativo das mudanças estruturais induzidas por diferentes meios e do grau de inserção dos peptídeos nas micelas (EFTINK et al., 1976). Uma maior interação do peptídeo com a membrana dificulta o acesso de um apagador polar com o fluoróforo e conseqüentemente provoca um menor apagamento.

Neste estudo utilizamos como apagador da fluorescência do Trp a molécula de acrilamida. Esta molécula tem a capacidade de indicar a profundidade da inserção do fluoróforo em um sistema de membrana, uma vez que o acesso deste supressor de fluorescência aos sítios hidrofóbicos de micelas ou vesículas é extremamente limitado por seu caráter altamente polar. Este apagamento pode ser numericamente medido pela obtenção da constante de Stern-Volmer para cada um dos peptídeos nos diferentes sistemas miméticos de membrana e em solução aquosa (EFTINK et al., 1976). A constante de Stern-Volmer (K_{sv}) é um parâmetro obtido a partir da tangente da curva de supressão, dada pelo valor inicial da intensidade de fluorescência em relação aos valores pontuais obtidos (F_0/F).

Como todos os peptídeos sintetizados neste bloco possuem um resíduo de Trp (fluoróforo) na posição 2 de sua estrutura, as diferenças nos valores de K_{sv} foram devidas as maiores ou menores interações dos peptídeos com as micelas por conta das modificações pontuais realizadas na posição zero (N-terminal) de cada peptídeo. Conseqüentemente, um maior valor de K_{sv} implica numa maior supressão do

fluoróforo pela acrilamida (maior exposição do Trp ao meio polar), e um menor valor de K_{sv} indica uma menor supressão pelo fluoróforo (menor exposição ao meio polar).

Devido a semelhança do detergente LPC em relação a membrana biológica e a maior interação dos peptídeos neste tipo de micela, resolvemos realizar os estudos de supressão de fluorescência somente para este tipo de micela. Para efeito de comparação os valores de K_{sv} em solução também foram determinados. Estes valores estão descritos na tabela 2 e mostrados nas figuras 44 e 45.

Tabela 2: Valores das constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) e dos $\lambda_{m\acute{a}x}$ de emissão de fluorescência nos estudos de supressão de fluorescência em solução e em LPC em pH [7,0].

| | W2 | | Ac-W2 | | K-W2 | | S-W2 | | D-W2 | |
|----------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| | K_{sv} (M^{-1}) | $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) | K_{sv} (M^{-1}) | $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) | K_{sv} (M^{-1}) | $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) | K_{sv} (M^{-1}) | $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) | K_{sv} (M^{-1}) | $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm) |
| Solução | 21,8 | 353 | 22,3 | 352 | 73,8 | 357 | 39,5 | 357 | 54,2 | 355 |
| LPC | 6,4 | 342 | 4,9 | 338 | 5,9 | 344 | 5,1 | 342 | 6,2 | 343 |

Os resultados obtidos confirmam os da titulação com LPC, onde todos os peptídeos mostraram inserção com as micelas, neste caso indicado pelos menores valores de K_{sv} em LPC do que em solução.

Analisando comparativamente os valores de K_{sv} dos peptídeos inicialmente em solução aquosa, podemos notar que os menores valores foram encontrados para o W2 ($21,8 \text{ M}^{-1}$) e Ac-W2 ($22,3 \text{ M}^{-1}$), devido ao fato de não possuírem aminoácidos polares em suas extremidades N-terminais facilitando a agregação entre suas moléculas (CASALLANOVO et al., 2006). Já o peptídeo K-W2 ($70,2 \text{ M}^{-1}$), que possui duas cargas positivas em seu resíduo de Lys N-terminal, grupos α - e ϵ - amino, o valor de K_{sv} foi o maior encontrado. Isso provavelmente é devido a não agregação molecular desta região, resultante da repulsão eletrostática entre as cargas, o que ocasiona uma maior exposição do Trp à acrilamida. O peptídeo D-W2 possui o resíduo de Asp ($55,0 \text{ M}^{-1}$) que é dipolar a pH 7,0, mas apresenta cadeia lateral negativa e α -amino positivo. Acreditamos que estes grupos dificultam a agregação do peptídeo, permitindo um maior acesso da acrilamida ao resíduo de Trp. Em relação ao peptídeo S-W2 ($39,2 \text{ M}^{-1}$), que possui um valor intermediário de K_{sv} , pode estar relacionado ao fato do resíduo de serina (N-terminal) ser polar mas não carregado. Este aminoácido proporciona uma maior solubilidade em água em relação ao grupo acetila e menor em relação aos resíduos carregados.

Em micelas de LPC o peptídeo que apresenta maior interação é o Ac-W2 sendo este fato apresentado também nos ensaios de supressão de fluorescência. Este peptídeo apresenta o menor valor de K_{sv} indicando uma menor suscetibilidade do resíduo fluorescente à supressão pela acrilamida, ratificando a maior imersão do mesmo. Os mais expostos neste tipo de micela foram os contendo os aminoácidos com cadeia lateral ionizável em sua extremidade, isto é, Asp e Lys.

Analisando os dados de fluorescência em relação ao de atividade biológica, podemos observar que a interação com a membrana parece não ser o fator predominante na eficiência da atividade hemolítica, visto que não há uma relação clara entre estes dois parâmetros. Como exemplo podemos citar o Ac-W2, que apesar de apresentar a maior interação com os miméticos de membrana mostrou apenas a terceira melhor atividade hemolítica. Desta forma outros estudos foram necessários para explicar as diferenças na atividade hemolítica.

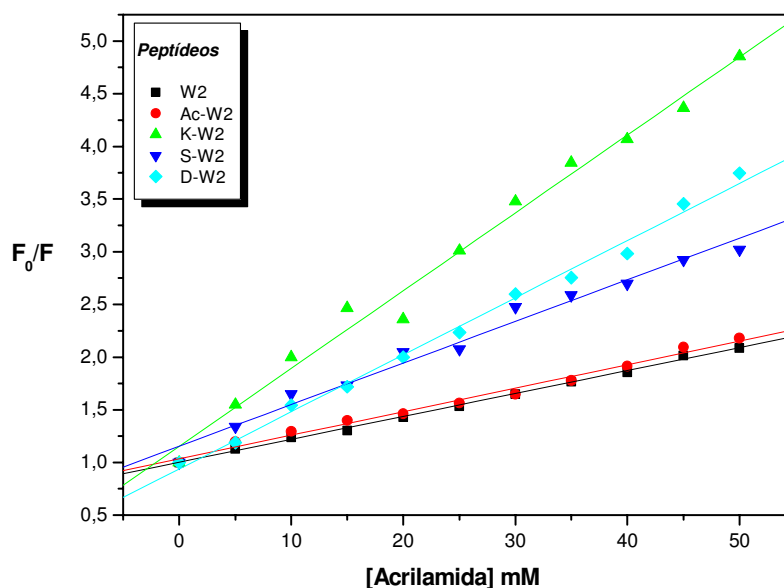


Figura 44: Variação dos valores de supressão de fluorescência F_0/F dos peptídeos em solução aquosa em função da concentração de acrilamida a pH [7,0], onde W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆).

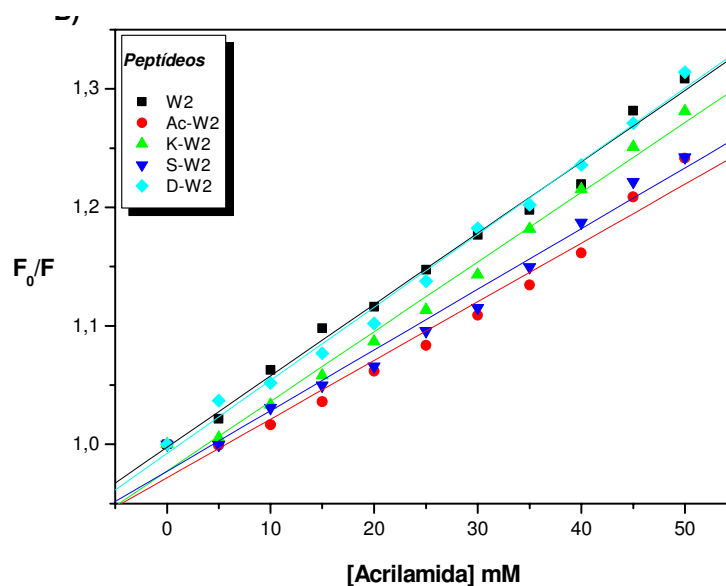


Figura 45: Variação dos valores de supressão de fluorescência F_0/F dos peptídeos na presença de micelas de LPC (10mM) em função da concentração de acrilamida em pH [7,0] onde W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆).

4.3.3. Estudo em Trifluoroetanol

Alguns estudos de predição estrutural tais como RMN e difração de raios X já mencionados anteriormente indicam um elevado conteúdo de α -hélice localizado na região N-terminal da proteína St II. Além disso, a disposição dos aminoácidos na seqüência peptídica sugere que os peptídeos estejam arranjados como α -hélices anfipáticas (uma face com resíduos polares e outra com resíduos apolares) de acordo com o modelo de roda helicoidal de Schiffer e Edmundson (SCHIFFER et al., 1967).

Dessa forma, para avaliar com maiores detalhes as mudanças conformacionais que as substituições na extremidade N-terminal poderiam ocasionar nesta estrutura, resolvemos estudar as alterações conformacionais dos peptídeos na

presença de trifluoretanol (TFE) (SONNICHSEN et al., 1992). Este solvente possui caráter parcialmente hidrofóbico e polaridade semelhante à encontrada na membrana, sendo utilizado como um simulador deste tipo de ambiente, além de ser um solvente conhecido como indutor de estrutura (ROCCATANO et al., 2002).

Os resultados obtidos através dos espectros de fluorescência durante a titulação dos peptídeos com TFE, não mostraram grandes mudanças conformacionais, exceto o Ac-W2 (figuras 50-51). Estes resultados sinalizam que a estruturação do peptídeo na forma de α -hélice não é a responsável pela diminuição do $\lambda_{\text{máx}}$, neste caso de aproximadamente 2 nm, comprovando que as diminuições encontradas das titulações com os detergentes são provocadas pela imersão dos peptídeos nestes miméticos de membrana.

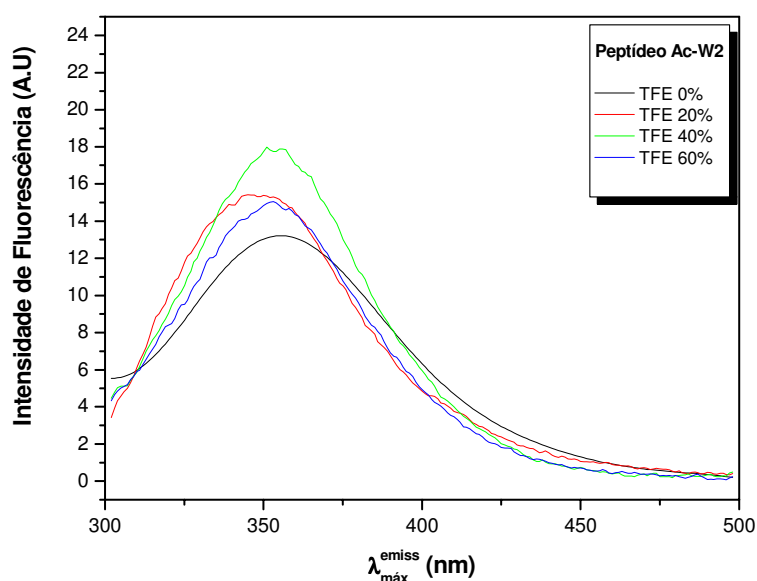


Figura 46: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo Ac-W2 na presença de TFE em pH 7,0.

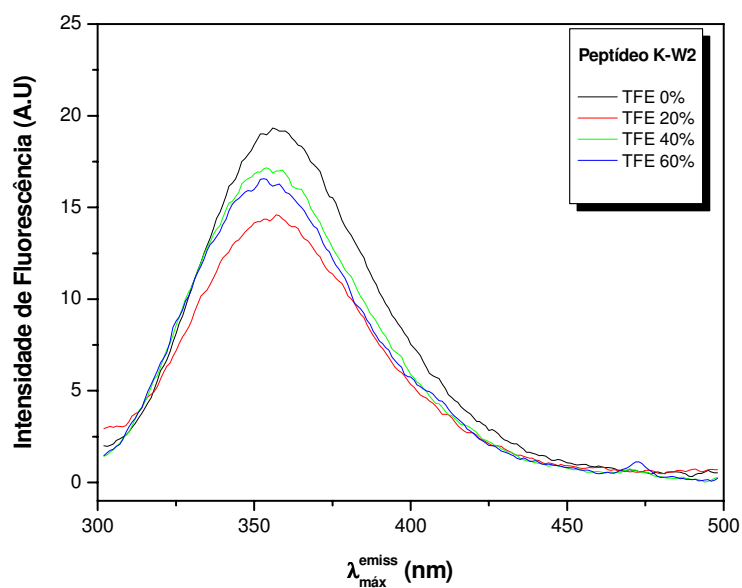


Figura 47: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo K-W2 na presença de TFE em pH 7,0.

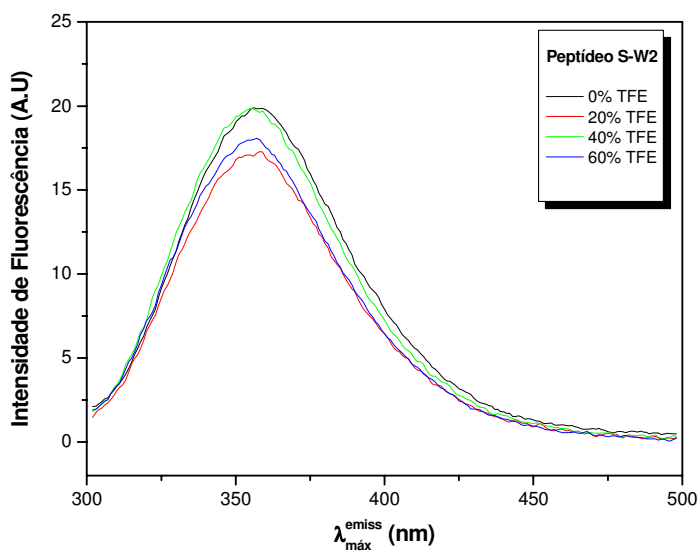


Figura 48: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo S-W2 na presença de TFE em pH 7,0.

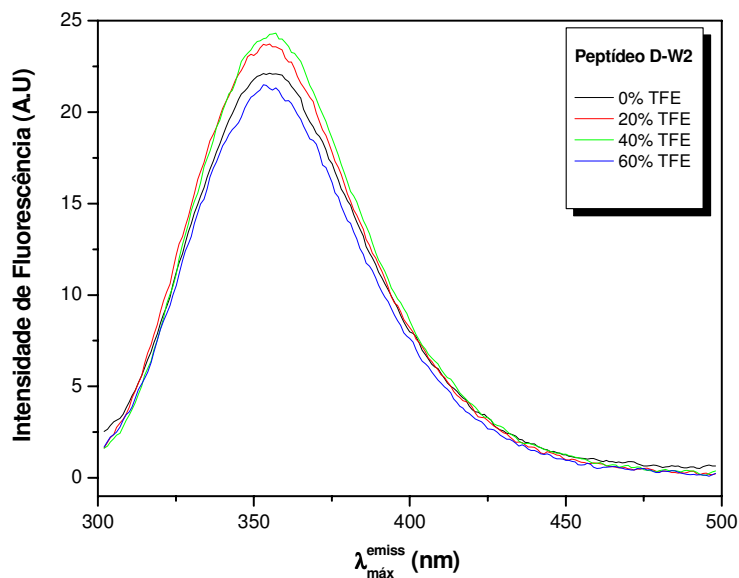


Figura 49: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo D-W2 na presença de TFE em pH 7,0.

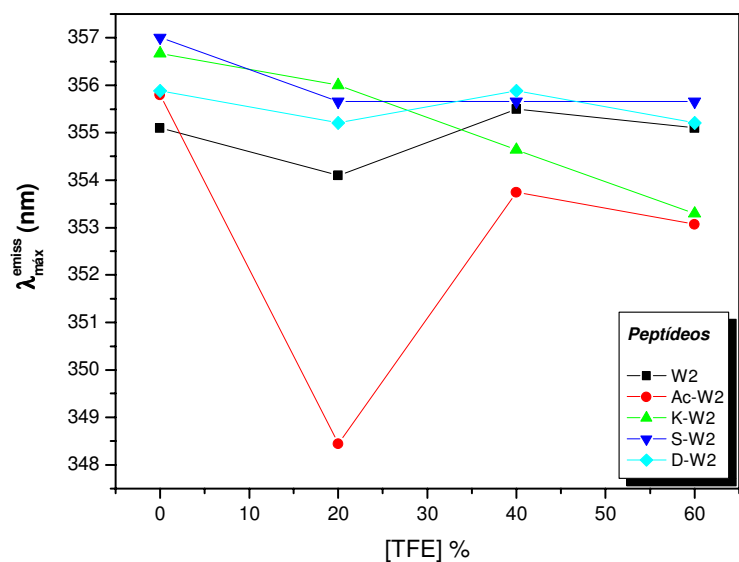


Figura 50: Variação do $\lambda_{\text{máx}}^{\text{emiss}}$ de emissão para os peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆), em função da porcentagem de TFE pH [7,0].

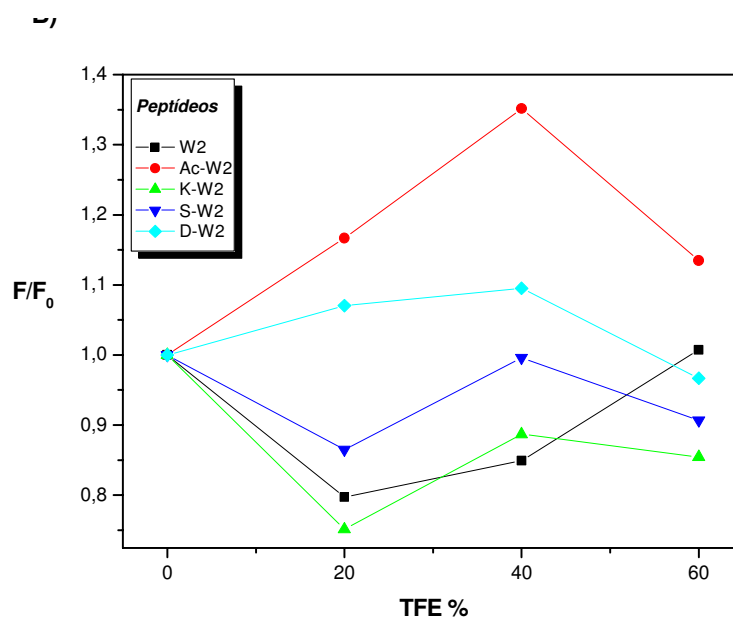


Figura 51: Variação da intensidade de fluorescência em função da porcentagem de TFE pH [7,0] para os peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆).

4.4. DICROÍSMO CIRCULAR (CD)

4.4.1. Estudo em Trifluoroetanol

Como a fluorescência não é uma técnica que permite quantificar o teor de α -hélice, mas sim se houve ou não mudança estrutural no peptídeo, resolvemos utilizar a técnica de dicroísmo circular (CD). Esta técnica permite determinar qualitativamente e quantitativamente as estruturas secundárias existentes no peptídeo.

Neste estudo os peptídeos foram titulados com TFE, variando-se a porcentagem de 0 a 60%. Resultados obtidos anteriormente mostram que o valor de 50% de TFE é o necessário para a completa estruturação da molécula (CHEN et al., 2005).

Para evitar agregação entre os peptídeos estudados, trabalhamos com uma concentração de 10 μ M. O pH escolhido foi o próximo do fisiológico, isto é 7,0.

Os resultados obtidos mostram que em água a maioria dos peptídeos não apresenta estruturas bem definidas (figura 52). Os espectros para estes peptídeos mostram duas bandas negativas, uma próxima de 205 nm e outra em 222 nm, sugerindo uma mistura de populações, uma estendida e outra parcialmente estruturada. Exceções são encontradas para o W2 e Ac-W2 que em solução já apresentam uma estrutura com um teor um pouco maior de α -hélice como indicam os mínimos encontrados, um próximo à 208 nm e outro em 222 nm.

Ao adicionarmos TFE o peptídeo vai gradativamente assumindo a estrutura de α -hélice (figura 53 e 54), como pode ser observado pela diminuição do $[\theta]_{222}$, estabilizando em 40% deste solvente. A figura 55 mostra o teor de α -hélice calculada em função do aumento do teor de TFE (ROHL et al., 1998). Entre os

peptídeos estudados, o que apresentou maior proporção foi o contendo Asp na extremidade amino terminal, seguido pela serina.

Estes dados mostram que todos os peptídeos apresentam o mesmo tipo de estruturação em TFE (α -hélice), mostrando que a alteração da carga na extremidade N-terminal não afeta qualitativamente a estrutura da molécula quando da interação com a membrana. No entanto, qualitativamente houve diferenças entre os peptídeos estudados.

Ao reunirmos todas as informações contidas nos estudos anteriormente discutidos, os resultados apresentados de AH podem ser avaliados de maneira que os demais apresentam participação fundamental na tentativa de explicá-los.

Desta forma, o primeiro fator que parece ser importante para a atividade do peptídeo é a sua estruturação. Por meio dos resultados de dicroísmo circular pudemos notar que a maior estruturação dos peptídeos em α -hélice ocorre para os peptídeos W2 e DW2, os dois peptídeos com maior atividade hemolítica. Sendo que os demais peptídeos apresentaram teores de α -hélice parecidos.

Por outro lado, o fato de possuírem estruturação semelhante e atividade hemolítica diferente, nos leva a concluir que outro fator importante, no entanto em menor intensidade, é a capacidade dos peptídeos interagirem com a membrana. Dessa forma, os resultados apresentados por meio dos estudos em micelas nos mostram que o peptídeo Ac-W2 foi o que demonstrou melhor interação com as micelas, sendo entre os três o peptídeo que apresentou maior atividade hemolítica.

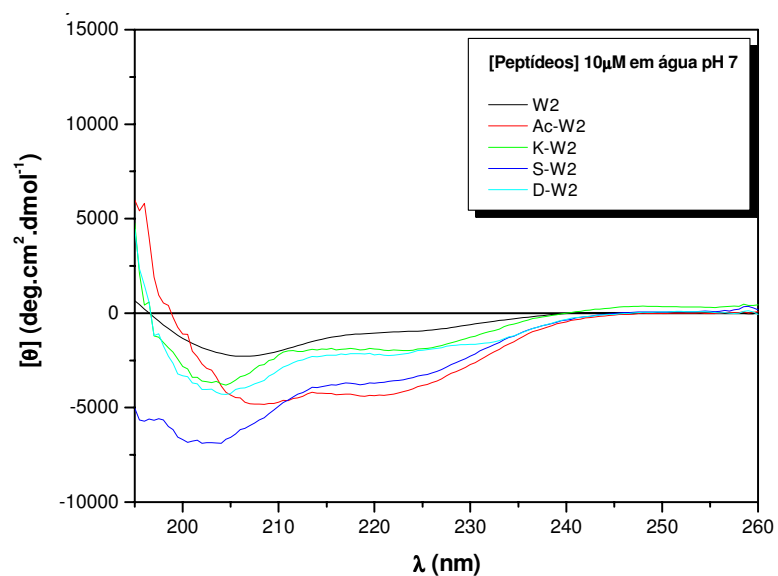


Figura 52: Espectro de CD dos peptídeos em solução aquosa a pH 7,0.

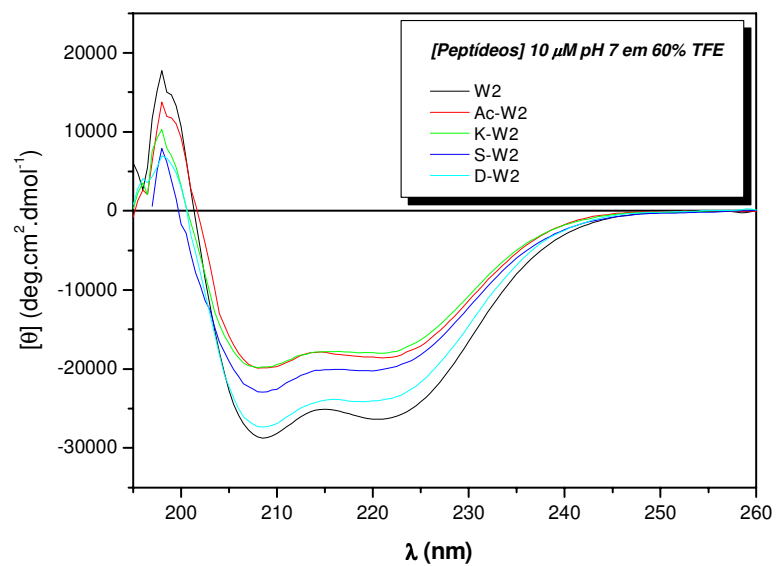


Figura 53: Espectro de CD dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆) em solução aquosa contendo 60% de TFE a pH 7,0.

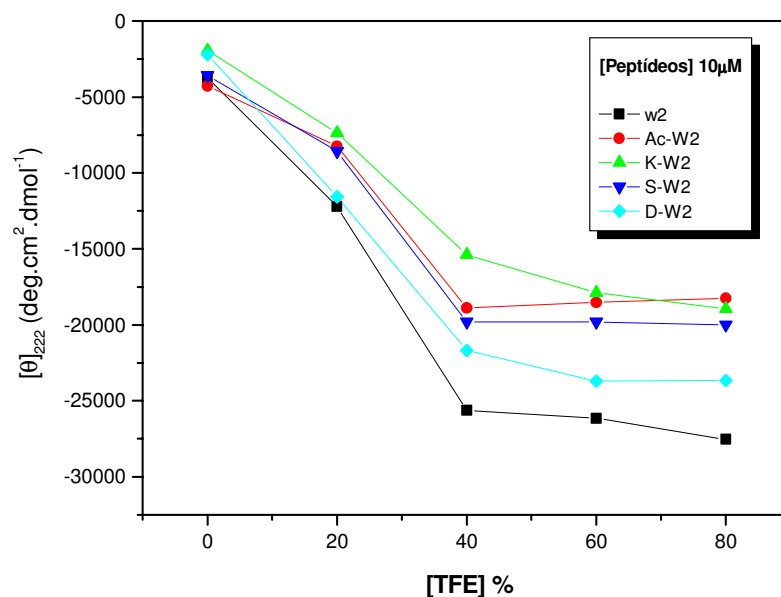


Figura 54: Representação gráfica do θ^{222} em função da concentração de TFE, indicando a estabilização estrutural dos peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆) após a concentração de 60% de TFE em água a pH 7,0.

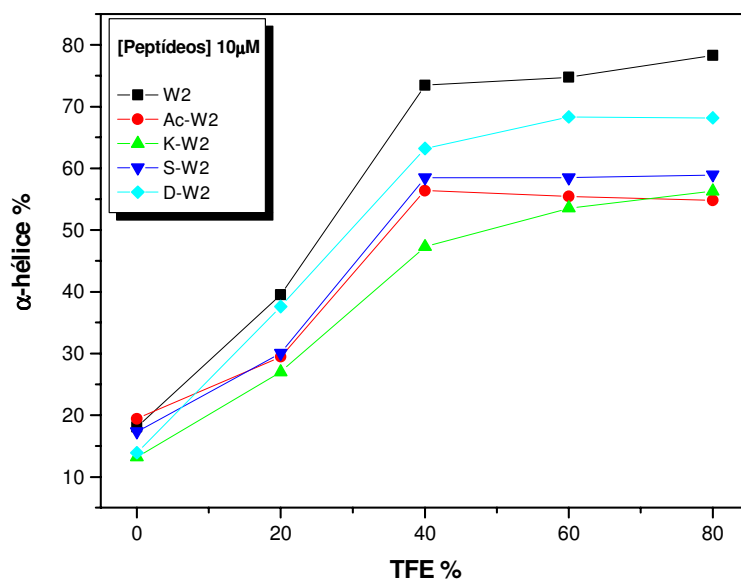


Figura 55: Representação gráfica do percentual de α -hélice em função da concentração de TFE para os peptídeos W2 (■), Ac-W2 (●), K-W2 (▲), S-W2 (▼), D-W2 (◆) em solução pH 7,0.

5. CONCLUSÕES

A metodologia empregada na obtenção dos peptídeos Fmoc/tBu foi considerada viável às nossas exigências. Todos os peptídeos foram obtidos com um rendimento em torno de 30%. O processo de purificação dos peptídeos por meio da técnica de RP-HPLC também se mostrou muito adequado, viabilizando a obtenção de um grau de pureza acima de 95% de todos os peptídeos o que é considerado muito bom.

Os peptídeos com 20 resíduos da St I e St II mostraram a mesma atividade hemolítica. Este dado mostra que as alterações Glu por Gly e Gln por Glu não afetam a atividade hemolítica dos mesmos. Já os peptídeos com 30 e 31 resíduos da St II e St I, respectivamente, mostraram diferenças acentuadas em suas atividades hemolíticas, indicando que a diferença de atividade pode estar relacionada a região de 1 a 10 da seqüência. O peptídeo da St II foi mais ativo que o da St I. O peptídeo St I 2-31 apresentou atividade hemolítica intermediária em relação aos peptídeos St I 1-31 e St II 1-30, indicando que a presença da serina na extremidade N-terminal é um dos fatores que afeta negativamente a formação do poro pelo peptídeo.

Os peptídeos modificados em sua posição zero (N-terminal) da série W2 também apresentaram atividade hemolítica, sendo sempre menor que o peptídeo sem modificação em sua extremidade. A adição de qualquer grupo nesta posição afeta negativamente a atividade do peptídeo, indicando que esta região é importante para a atividade do peptídeo.

Apesar das modificações feitas nos peptídeos da série W2, todos mostraram interação com os diferentes tipos de micelas, podendo ser observado que o peptídeo

Ac-W2 foi o que mostrou maior deslocamento dos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ indicando assim uma maior interação do mesmo com as micelas, Este fato pode explicado pela sua característica apolar, tendo desta maneira maior afinidade pelos miméticos de membrana estudados. Somado a isto, o estudo de supressão de fluorescência por acrilamida reforça este dado. O menor valor de K_{sv} para este peptídeo, mostra uma maior dificuldade de acesso da acrilamida ao resíduo fluorescente - maior inserção do peptídeo na micela.

Concomitante a isto, os estudos de fluorescência em TFE mostram que o fato dos peptídeos adquirirem estrutura na presença de TFE não altera significativamente os valores de $\lambda_{\text{máx}}$. Este dado confirma que o deslocamento obtido da titulação com os detergentes é devido a inserção do peptídeo na micela. Complementando esses resultados os estudos de CD mostraram que a adição gradativa de TFE faz com que os peptídeos adquiram estrutura em α -hélice. Os diferentes resíduos adicionados ao peptídeo W2 não influenciam o tipo de estruturação dos mesmos, mas afetam, no entanto, a quantidade de estrutura formada.

Desta forma, acreditamos que o primeiro fator que afeta a atividade hemolítica do peptídeo é o teor de estruturação – quanto maior o teor de α -hélice maior a atividade hemolítica. O segundo fator, com contribuição muito menor que o anterior, é a capacidade de estruturação com a membrana, com contribuição também positiva para a atividade hemolítica.

6. REFERÊNCIAS

- 1 ALBERICIO, F. Current perspectives in peptide chemistry. I. Synthesis. **Biopolymers**, v. 55, n. 2, p. 99-100, 2000.
- 2 ALVAREZ, C. et al. Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces - Modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 122, n. 1/2, p. 97-105, 2003.
- 3 ALVAREZ, C. et al. Effect of pH on the conformation, interaction with membranes and hemolytic activity of sticholysin II, a pore forming cytolyisin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **Toxicon**, v. 39, n. 4, p. 539-553, 2001.
- 4 ANDERLUH, G. et al. Cysteine-scanning mutagenesis of an eukaryotic pore-forming toxin from sea anemone-Topology in lipid membranes. **European Journal of Biochemistry**, v. 263, n. 1, p. 128-136, 1999.
- 5 ANDERLUH, G. et al. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). **Toxicon**, v. 40, n. 2, p. 111-124, 2002.
- 6 ANDERLUH, G. et al. N-terminal truncation mutagenesis of equinatoxin II, a pore-forming protein from the sea anemone *Actinia equina*. **Protein Engineering**, v. 10, n. 7, p. 751-755, 1997.
- 7 ATHERTON, E. et al. Internal association in solid-phase peptide-synthesis - synthesis of cytochrome-c residues 66-104 on polyamide supports. **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, n. 20, p. 970-971, 1980.
- 8 CAREY, F. A. **Organic chemistry**. 3rd ed. New York: MacGraw-Hill, 1996.
- 9 CASALLANOVO, F. et al. Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin sticholysin II. **Biopolymers**, v. 84, n. 2, p. 169-180, 2006.
- 10 CASTANEDA, O. et al. Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **Toxicon**, v. 33, p. 603-613, 1995.
- 11 CHEN, Y. et al. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. **Biochemistry**, v. 37, n. 28, p. 9976-9982, 1998.

- 12 CHEN, Y. X. et al. Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12316-12329, 2005.
- 13 CREIGHTON, T. E. **Protein structure: a practical approach**. 2nd ed. Oxford University Press, 1997. (Practical Approach Series).
- 14 CRUSCA, JR., E **Estudos das propriedades estruturais de análogos substituídos com Trp2, 7 ou 24 do fragmento com 30 resíduos da região amino terminal da esticolisina II**. 2006. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- 15 DELFIN, J. et al. Proteinase inhibitor from *Stichodactyla helianthus*: purification, characterization and immobilization. **Archives of Medical Research**, v. 25, n. 2, p. 199-204, 1994.
- 16 DICK, F. Peptide synthesis protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 35, 1994.
- 17 EFTINK, M. R. et al. Fluorescence quenching of indole and model micelle systems. **Journal of Physical Chemistry**, v. 80, n. 5, p. 486-493, 1976.
- 18 FREITAS, J. C. **O potencial farmacológico das toxinas marinhas**. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/litoral/lit20.shtml>>. Acesso em: 4 dez. 2006.
- 19 GHIRON, C. A. et al. Fluorescence studies with human epidermal growth-factor. **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 29-34, 1992.
- 20 GOMEZ, T. et al. Aislamiento y purificación parcial de dos toxinas y un inhibidor de proteasas de la anémona marina *Stichodactyla helianthus*. **Revista Cubana Investigaciones Biomédicas**, v. 5, p. 117-125, 1986.
- 21 GREENFIE, N. et al. Computed circular dichroism spectra for evaluation of protein conformation. **Biochemistry**, v. 8, n. 10, p. 4108-4116, 1969.
- 22 HINDS, M. G. et al. Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytotoxin equinatoxin II: Implications for pore formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 5, p. 1219-1229, 2002.

- 23 HUERTA, V. et al. Primacy structure of two cytolysin isoforms from *Stichodactyla helianthus* differing in their hemolytic activity. **Toxicon**, v. 39, n. 8, p. 1253-1256, 2001.
- 24 KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-&, 1970.
- 25 KIMMERLIN, T. et al. '100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to beta-peptide assemblies. **Journal of Peptide Research**, v. 65, n. 2, p. 229-260, 2005.
- 26 KING, D. S. et al. A Cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid-phase peptide synthesis. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 36, n. 3, p. 255-266, 1990.
- 27 LAKOWICS, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 2nd ed. New York: Kluwer Academic; Plenum, 1999. 698 p.
- 28 LANIO, M. E. et al. Effects of sodium dodecyl sulfate on the conformation and hemolytic activity of St I and St II, two isotoxins purified from *Stichodactyla helianthus*. **Toxicon**, v. 41, n. 1, p. 65-70, 2003.
- 29 LANIO, M. E. et al. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*. **Toxicon**, v. 39, n. 2/3, p. 187-194, 2001.
- 30 LOS RIOS, V. et al. Sticholysin II, a cytolysin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*, is a monomer-tetramer associating protein. **Febs Letters**, v. 455, n. 1/2, p. 27-30, 1999.
- 31 LOS RIOS, V. et al. Mechanism of the leakage induced on lipid model membranes by the hemolytic protein sticholysin II from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 252, n. 2, p. 284-289, 1998.
- 32 LOURA, L. M. S. et al. **Tópicos de biofísica de membranas**. Lisboa: Lidel, 2004. p. 24-25.
- 33 MACEK, P. et al. Mechanism of action of equinatoxin-li, a cytolysin from the sea-anemone *actinia-equina* I belonging to the family of actinoporins. **Toxicology**, v. 87, n. 1/3, p. 205-227, 1994.
- 34 MACHADO, A. A Síntese química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

- 35 MANCHENO, J. M. et al. Partially folded states of the cytolytic protein sticholysin II. **Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1545, n. 1/2, p. 122-131, 2001.
- 36 MANCHENO, J. M. et al. Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. **Structure**, v. 11, n. 11, p. 1319-1328, 2003.
- 37 MARQUARDT, M. A Síntese de peptídeos em fase sólida e os suportes poiliméricos mais empregados. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 846-855, 2001.
- 38 MARTINEZ, D. et al. Properties of St I and St II, two isotoxins isolated from *Stichodactyla helianthus*: a comparison. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1547-1560, 2001.
- 39 MARTINEZ, D. et al. Identity between cytolytins purified from two morphos of the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1219-1221, 2002.
- 40 MENESTRINA, G. et al. Secondary structure of sea anemone cytolytins in soluble and membrane bound form by infrared spectroscopy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 254, n. 1, p. 174-180, 1999.
- 41 MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis .1. synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.
- 42 MULKERRIN, N. G. Protein structure analysis using circular dichroism. In: HAVEL, H. A. **Spectroscopic methods for determining protein structure in solution**. New York: V.C.H., 1996. cap. 2., p. 5-27.
- 43 NAKAMURA, M. et al. Contribution of histidine residues to oligomerization of theta-toxin (perfringolysin O), a cholesterol-binding cytolytic protein. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n. 9, p. 1640-1643, 1999.
- 44 PARKER, M. W. et al. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 88, n. 1, p. 91-142, 2005.
- 45 PAZOS, I. F. et al. Purificación de una fosfolipasa A2 de la anémona marina *Stichodactyla helianthus*. **Revista Biología**, v. 19, p. 350-358, 1996.
- 46 PAZOS, I. F. et al. Comparison of pore-forming ability in membranes of a native and a recombinant variant of Sticholysin II from *Stichodactyla helianthus*. **Toxicon**, v. 42, n. 6, p. 571-578, 2003.

47 PINILLA, C. et al. A review of the utility of soluble peptide combinatorial libraries. **Biopolymers**, v. 37, n. 3, p. 221-240, 1995.

48 ROCCATANO, D. et al. Mechanism by which 2,2,2-trifluoroethanol/water mixtures stabilize secondary-structure formation in peptides: a molecular dynamics study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 19, p. 12179-12184, 2002.

49 ROHL, C. A. et al. Deciphering rules of helix stability in peptides. **Energetics of Biological Macromolecules, Pt B**, v. 295, p. 1-26, 1998.

50 SARIN, V. K. et al. Properties of swollen polymer networks-solvation and swelling of peptide-containing resins in solid-phase peptide-synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 17, p. 5463-5470, 1980.

51 SCHIFFER, M. et al. Use of helical wheels to represent structures of proteins and to identify segments with helical potential. **Biophysical Journal**, v. 7, n. 2, p. 121-135, 1967.

52 SONNICHSEN, F. D. et al. Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure - an NMR and CD study using a synthetic actin peptide. **Biochemistry**, v. 31, n. 37, p. 8790-8798, 1992.

53 STEWART, F. H. C. Some applications of competitive coupling in peptide-synthesis. **Australian Journal of Chemistry**, v. 33, n. 9, p. 2087-2095, 1980.

54 TEJUCA, M. et al. Sizing the radius of the pore formed in erythrocytes and lipid vesicles by the toxin sticholysin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **Journal of Membrane Biology**, v. 183, n. 2, p. 125-135, 2001.

55 TEJUCA, M. et al. Construction of an immunotoxin with the pore forming protein StI and ior C5, a monoclonal antibody against a colon cancer cell line. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 6, p. 731-744, 2004.

56 TEJUCA, M. et al. Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolytic toxin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. **Biochemistry**, v. 35, n. 47, p. 14947-14957, 1996.