

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Fábio Henrique Dyszy

**Estudos Estruturais de Histatina-5
e seu análogo, TOAC⁰-Histatina-5:
Interação com Metais e Sistemas Biomiméticos**

**São Paulo
10/07/2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Fábio Henrique Dyszy

**Estudos Estruturais de Histatina-5
e seu análogo, TOAC⁰-Histatina-5:
Interação com Metais e Sistemas Biomiméticos**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a. Shirley Schreier

**São Paulo
2008**

Fábio Henrique Dyszy

Estudos Estruturais de Histatina-5 e seu análogo, TOAC⁰-Histatina-5: Interação com Metais e Sistemas Biomiméticos.

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

Aprovado em / /

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Aos meus Pais, Henrique e Madalena, que tanto se sacrificaram – e se sacrificam –
para que eu chegasse onde estou.
Sem vocês, jamais conseguiria.*

*Aos meus Irmãos, Marcos e Ana, que suportaram minhas respostas monossilábicas
ou meu silêncio cortante, mas nunca
deixaram de lado o apoio e carinho.*

*E, finalmente, mas não menos importantes, à Shirlei e ao Matheus, sem os quais eu
certamente não trilharia meu caminho por completo.
Obrigado por tudo que vocês fizeram por mim.*

Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus e à minha família, em especial aos meus futuros sogros, José e Isabel.

Ao pessoal do laboratório, Joana, Edivânia, José Carlos, Nélida, Aisel, Gustavo e Viviane, pela amizade, ajuda e paciência, principalmente nos momentos finais.

À todos que já passaram pelo LBE, Felipe Jun, Fábio Casallanovo, Cláudio Shida, Aninha, Salay, Marcelo, Tatiana, Kelly, Mercedes e Lílian, obrigado pela companhia.

Aos responsáveis pela “invasão cubana”, Carlos Alvarez, Marilyn, Uris, Diana Martinez e Maria del Carmen, meu muito obrigado pelo rum, pelas conversas, pela ajuda.

À Prof^a. Dr^a. Sirlei Daffre e à Fernanda Dias da Silva, que muito me auxiliaram nos experimentos biológicos.

Aos amigos e funcionários do Instituto de Química e do Instituto de Ciências Biológicas, pelo auxílio sempre necessário.

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar de Almeida, que abriu as portas da Ciência para mim, e desde o começo foi muito mais do que um orientador.

À todos os amigos da Universidade de Mogi das Cruzes, onde tudo começou, obrigado pelas risadas e pela amizade, e que, apesar da distância, perdura até hoje.

Aos meus companheiros desde sempre, Gabriel, Beto, Luciana, Simon, Sheila, Nádima, Roberto (Sorocaba), Felipe e D. Maria (minha avó postiça) e do TBR, obrigado pela paciência, conselhos, conversas jogadas fora, pela amizade incomum, e minhas eternas desculpas pela longa ausência.

À Prof^a. Shirley, obrigado pela confiança, paciência, pelos ensinamentos científicos e de vida. Nossas conversas jamais serão esquecidas. Aprendi muito, graças à você. Sua postura e seriedade devem servir de exemplo. Muito obrigado mesmo! E viva à Máfia Polonesa.

À FAPESP, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

DYSZY, F.H. **Estudos Estruturais de Histatina-5 e seu análogo, TOAC⁰-Histatina-5: Interação com Metais e Sistemas Biomiméticos**. 2008, 185p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O mecanismo de ação da Histatina-5 (Hst-5), um peptídeo antimicrobiano da saliva humana com ação fungicida, não está esclarecido. Dicroísmo circular (CD), fluorescência e ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foram empregados para examinar as propriedades conformacionais de Hst-5 e seu análogo contendo o aminoácido paramagnético TOAC N-terminal (TOAC⁰-Hst-5) em solução aquosa, em função do pH, de TFE, e de íons metálicos, e em presença de membranas modelo de composição. Foi examinada a atividade dos dois peptídeos em membranas lipídicas planas, na permeabilização de membranas modelo e frente o fungo *Candida albicans* e eritrócitos humanos, com o objetivo de estabelecer correlações entre a atividade e a estrutura dos peptídeos.

Estudos de fluorescência mostraram a capacidade de TOAC de suprimir a fluorescência e que o pK dos resíduos de Tyr foram deslocados. Espectros de CD mostraram pequenas flutuações conformacionais, mas foram mantidas estruturas ao acaso. Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 mostraram a coexistência de duas populações, protonada e desprotonada, em troca lenta. A partir de medidas de desdobramento hiperfino (a_N), foram calculados pKs de TOAC; a relação de altura dos picos de campo central e alto também foi sensível à titulação do peptídeo.

Em TFE os peptídeos adotaram conformação α -helicoidal (CD). Espectros de fluorescência de Hst-5 mostraram aumento da fluorescência, e os de TOAC⁰-Hst-5 mostraram supressão, indicando aproximação de TOAC dos resíduos de Tyr. Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 também refletiram as mudanças conformacionais.

Estudos de fluorescência mostraram a interação de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 com Cu²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺, permitindo o cálculo de constantes de ligação. Espectros de CD refletiram pequenas variações conformacionais, sem aquisição de estrutura secundária. Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 na presença dos íons paramagnéticos Cu²⁺ e Mn²⁺ indicaram interações spin-spin, permitindo o cálculo das

distâncias metal-nitróxido. Curvas de tempo de correlação rotacional em função da concentração dos íons permitiram calcular constantes de ligação da mesma ordem de grandeza daquelas obtidas por fluorescência.

Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 ligaram-se em maior extensão a micelas negativas do que a zwitteriônicas num processo pH-dependente. Estudos de supressão de fluorescência por acrilamida confirmaram esses resultados, indicando a modulação por interações eletrostáticas. Espectros de CD mostraram que os peptídeos adotam conformação em dobra β tipo I. Estudos de RPE da interação de TOAC⁰-Hst-5 com vesículas de composição lipídica mimetizando membranas de *E. coli* e *C. albicans* (carga líquida negativa) e eritrócitos (carga líquida zero) confirmaram essa modulação. Na presença das membranas negativamente carregadas os espectros apresentaram extremos externos e internos, indicando que o eixo z do nitróxido orienta-se paralelamente à normal à bicamada.

Estudos funcionais utilizando bicamadas lipídicas planas mostraram que TOAC⁰-Hst-5, mas não Hst-5, forma poros. Também, TOAC⁰-Hst-5, mas não Hst-5, permeabiliza vesículas carregadas negativamente. Ainda, a atividade fungicida de TOAC⁰-Hst-5 foi maior do que a de Hst-5 na ausência de íons, porém foi a mesma na presença de Mn²⁺ e Zn²⁺. Finalmente, TOAC⁰-Hst-5 mostrou maior atividade hemolítica que Hst-5. Esses resultados sugerem uma possível diferença nos mecanismos de ação de Hst-5 e seu análogo marcado, apesar da semelhança no comportamento conformacional dos peptídeos.

Palavras-chave: Histatina-5, TOAC, técnicas espectroscópicas, íons metálicos, membranas modelo, membranas biológicas.

ABSTRACT

DYSZY, F.H. **Structural studies of Histatin-5 and its analogue, TOAC⁰-Histatin-5: Interaction with metals and biomimetic systems** 2008, 185p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The mechanism of action of histatin-5 (Hst-5), an antifungal antimicrobial peptide from human saliva is not completely clarified. Circular dichroism (CD), fluorescence, and electron paramagnetic resonance (EPR) were used to examine the conformational behavior of Hst-5 and its analogue containing the paramagnetic amino acid TOAC at the N-terminus (TOAC⁰-Hst-5). Conformational properties were investigated in aqueous solution, as a function of pH, TFE, and addition of metal ions, and in the presence of model membranes of variable lipid composition. The activity of both peptides was examined in planar lipid membranes and with regard to permeabilization of model membranes. Activity was also tested towards the fungus *Candida albicans* and human erythrocytes, with the scope of establishing structure-function correlations.

Fluorescence studies showed that TOAC⁰-Hst-5 is able to quench the peptide fluorescence and that the pK of the Tyr residues was shifted to lower values. CD spectra indicated that small conformational fluctuations occurred with increasing pH, but the overall unordered structure of the peptides was kept. EPR spectra of TOAC⁰-Hst-5 showed the coexistence of two populations, one protonated and one unprotonated, in slow exchange. The pK of TOAC was calculated from measurements of the isotropic hyperfine splitting (a_N); the ratios of heights of the mid-field line and the high-field line were also sensitive to the peptide titration.

In TFE, the peptides acquired α -helical conformation (CD). Fluorescence spectra of Hst-5 showed an increase of fluorescence, while those of TOAC⁰-Hst-5 revealed quenching, indicating that, on the average, the TOAC residue becomes closer to the Tyr residues as a consequence of the peptide acquiring α -helical conformation. EPR spectra also reflected the conformational changes undergone by the peptide.

Fluorescence studies indicated that Hst-5 and its spin labeled analogue interacted with Cu²⁺, Zn²⁺, and Mn²⁺ ions, allowing the calculation of binding

constants. CD spectra reflected the occurrence of small conformational fluctuations, without acquisition of stable secondary structure. EPR spectra of TOAC⁰-Hst-5 in the presence of the paramagnetic ions Cu²⁺ and Mn²⁺ evinced the occurrence of spin-spin interactions, allowing the calculation of metal-nitroxide distances. Curves of rotational correlation times as a function of ion concentration yielded values for the binding constants of the same order of magnitude as those calculated from fluorescence measurements.

Hst-5 and TOAC⁰-Hst-5 bound to a larger extent to negatively charged than to zwitterionic micelles, in a pH-dependent process. Studies of fluorescence quenching by water soluble acrylamide confirmed these results, pointing to the fact that binding is largely modulated by electrostatic interactions. CD spectra indicated that, upon binding to micelles, the peptides acquire a type I β -turn conformation. EPR studies of the interaction between TOAC⁰-Hst-5 and lipid vesicles whose composition mimicked those of *E. coli* and *C. albicans* (both with net negative surface charge) and erythrocytes (net zero surface charge) confirmed this modulation. In the presence of negatively charged membranes, the spectra presented outer and inner extrema, indicating that the nitroxide z axis is oriented parallel to the bilayer normal.

Functional studies with planar lipid bilayers showed that TOAC⁰-Hst-5, but not the native peptide, forms pores. Also, TOAC⁰-Hst-5, but not Hst-5, permeabilizes negatively charged vesicles. Moreover, the fungicidal activity of TOAC⁰-Hst-5 was greater than that of Hst-5 in the absence of metal ions. However, in contrast with the native peptide, whose activity increased in the presence of Zn²⁺ and Mn²⁺, that of the analogue was the same in the absence and presence of the ions. Finally, TOAC⁰-Hst-5 had a more pronounced hemolytic activity than Hst-5. These results suggest a possible difference in the mechanisms of action of Hst-5 and its spin labeled analogue, in spite of the similarity of their conformational behavior.

Key words: Histatin-5, TOAC, spectroscopic techniques, metal ions, model membranes, biological membranes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a_N	Desdobramento hiperfino
AII	Angiotensina II
ASO	Azolecitina
ATCUN	<i>Amino-terminal copper and nickel binding site</i> , sítio de ligação de cobre e níquel no N-terminal.
ATP	Trifosfato de adenosina
BK	Bradicinina
BLM	<i>Black lipid membranes</i> , Bicamadas lipídicas planas
CD	<i>Circular dichroism</i> , Dicroísmo circular
CL	Cardiolipina de coração bovino
CF	5,6-carboxifluoresceína
COL	Colesterol
CPP	<i>Cell penetrating peptide</i> , Peptídeo que penetra células
CSA	Ácido d-10-canforsulfônico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPhPC	Difitanoilfosfatidilcolina
ε	Coeficiente de extinção molar
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> , Imunoensaio enzimático
ERGO	Ergosterol
Hst	Histatina
ITC	<i>Isothermal titration calorimetry</i> , Titulação calorimétrica isotérmica
LPC	1-palmitoil-2-hidroxi- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
LPG	1-palmitoil-2-hidroxi- <i>sn</i> -glicero-3-[fosfo- <i>rac</i> -(1-glicerol)]
LUV	<i>Large unilamellar vesicles</i> , Vesículas unilamelares grandes
MIC	Concentração inibitória mínima
MLV	<i>Multilamellar vesicles</i> , Vesículas multiamelares
P	Coeficiente de partição
PA	Ácido fosfatídico
PBC	Tampão Fosfato-Borato-Citrato
PBS	Tampão 10 mM Na ₂ PO ₄ , NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM

PC	Fosfatidilcolina
PDB	<i>Potato-dextrose broth</i> , meio de cultura líquido obtido a partir de extrato de batata e amido de milho
PE	Fosfatidiletanolamina
ePE	L- α -fosfatidiletanolamina transfosfatidilada a partir de fosfatidilcolina de ovo de galinha
PAM	Peptídeo anti-microbiano
PI	Fosfatidilinositol
POPA	ácido 1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatídico
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
POPG	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-[fosfo- <i>rac</i> -(1-glicerol)]
bPS	L- α -fosfatidilserina de cérebro
PS	Fosfatidilserina
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
S	Parâmetro de ordem
SDS	Sulfato-dodecil de sódio
SM	Esfingomielina
SUV	<i>Small Unilamellar Vesicles</i> , Vesículas unilamelares pequenas
τ	Tempo de correlação rotacional
t-BOC	tert-butiloxicarbonil
TEMPOL	4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidínil-1-oxil
TFE	2,2,2-trifluoretanol
TOAC	Ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil-4-amino-4-carboxílico
UV-Vis	Luz ultra-violeta e visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS	13
1.2. HISTATINAS	22
1.3. O AMINOÁCIDO TOAC	27
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. MATERIAIS	33
3.1.1. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS	33
3.1.2. REAGENTES	33
3.2. MÉTODOS	37
3.2.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	37
3.2.2. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)	38
3.2.2.1. ESPECTROS DE RPE DE NITRÓXIDOS	39
3.2.2.2. DEPENDÊNCIA DOS ESPECTROS DE RPE DA MOBILIDADE	41
3.2.2.3. MOVIMENTO ANISOTRÓPICO EM BICAMADAS LIPÍDICAS	45
3.2.2.4. INTERAÇÃO SPIN-SPIN ENTRE NITRÓXIDOS E IONS METÁLICOS PARAMAGNÉTICOS	48
3.2.2.5. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE RPE	50
3.2.3. DICROÍSMO CIRCULAR (CD)	50
3.2.3.1. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE CD	53
3.2.4. FLUORESCÊNCIA	54
3.2.4.1. SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA	57
3.2.4.2. SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA POR NITRÓXIDOS	57
3.2.4.3. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA	58
3.2.5. BICAMADAS LIPÍDICAS PLANAS (BLM)	58
3.2.5.1. MEDIDAS ELÉTRICAS EM BLM	59
3.2.6. PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS MODELO	60
3.2.7. PERMEABILIZAÇÃO DE VESÍCULAS	60
3.2.8. ENSAIO LÍQUIDO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO ANTIMICROBIANO	61
3.2.9. ENSAIO HEMOLÍTICO	62
4. RESULTADOS	63
4.1. ESTUDOS CONFORMACIONAIS	63

4.1.1. ESTUDOS EM SOLUÇÃO.....	63
4.1.1.1. EFEITO DO PH.....	63
4.1.1.2. EFEITO DO TFE	74
4.1.1.3. INTERAÇÃO COM ÍONS METÁLICOS	82
4.1.2. ESTUDOS COM MEMBRANAS MODELO.....	102
4.1.2.1. MICELAS	102
4.1.2.2. VESÍCULAS UNILAMELARES PEQUENAS (SUV)	125
4.2. ESTUDOS FUNCIONAIS	138
4.2.1. BICAMADAS LIPÍDICAS PLANAS	139
4.2.2. PERMEABILIZAÇÃO DE VESÍCULAS	141
4.2.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	143
4.2.4. ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	143
5. DISCUSSÃO	144
5.1. EFEITO DO PH	146
5.2. EFEITO DE TFE	147
5.3. INTERAÇÃO COM ÍONS METÁLICOS	151
5.4. ESTUDOS COM MEMBRANAS MODELO – ASPECTOS CONFORMACIONAIS	156
5.5. ESTUDOS COM MEMBRANAS MODELO – ASPECTOS FUNCIONAIS	160
5.6. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E HEMOLÍTICA	160
5.7. IMPLICAÇÕES DOS RESULTADOS PARA O MECANISMO DE AÇÃO DA HST-5.....	161
6. CONCLUSÕES	163
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166

1. INTRODUÇÃO

1.1. PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS

O sistema imune dos humanos é constituído pelos mecanismos de defesa inatos (ou não específicos) e pelo mecanismo de defesa adaptativo. Os mecanismos de defesa inatos reagem de uma mesma forma quaisquer que sejam os patógenos, e é o mecanismo de defesa mais primitivo, sendo encontrado desde fungos até os mamíferos. O mecanismo de defesa adaptativo envolve a resposta dada pelas células B e T a antígenos específicos, com a subsequente produção de anticorpos. Uma das características mais importantes do sistema imune adaptativo é capacidade do organismo reconhecer um determinado antígeno após a primeira infecção, a chamada memória imunológica. Na imunidade inata, não há produção de anticorpos, resposta antígeno-receptor ou memória imunológica (Du Pasquier, 2001; Reddy *et al.*, 2004).

O mecanismo de defesa inato pode ser colocado em ação de diversas formas, como através de secreções cutâneas, lacrimais e salivares, onde encontram-se enzimas e peptídeos antimicrobianos (PAM). A fagocitose realizada pelos neutrófilos e macrófagos também é parte do sistema imune inato, bem como o sistema complemento e a resposta inflamatória (Du Pasquier, 2001; Reddy *et al.*, 2004).

Comparando-se ambas as respostas, a expressão de peptídeos antimicrobianos constitui-se em uma resposta rápida e eficaz de nosso organismo contra a invasão de um patógeno. Os peptídeos antimicrobianos podem ser classificados em peptídeos ribossômicos e não-ribossômicos (Hancock e Chapple, 1999).

Os peptídeos não-ribossômicos são encontrados em fungos e bactérias, são derivados peptídicos muito modificados, seja através de glicosilação, seja pela adição de ácidos graxos ou ainda pela adição de aminoácidos não usuais, como o ácido amino-isobutírico, a lantionina e a desidroalanina. Os peptídeos não-ribossômicos são sintetizados pelas sintetases de peptídeo não-ribossômico, podem ser lineares ou cíclicos, e podem agir tanto na membrana celular do patógeno, bem como em suas vias metabólicas (Hancock e Chapple, 1999).

Os peptídeos antimicrobianos ribossômicos são encontrados desde bactérias até vertebrados, passando por fungos e invertebrados. A ampla distribuição entre os seres vivos gera também uma grande diversidade na seqüência primária desses peptídeos antimicrobianos, mas, em comum, apresentam peso menor do que 10 kDa, possuem carga líquida positiva em pH fisiológico e são capazes de interagir com membranas biológicas, por apresentarem características anfipáticas (Hancock e Chapple, 1999; Jenssen *et al.*, 2006; Zasloff, 2002).

Os peptídeos antimicrobianos podem exibir atividade contra bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, fungos, protozoários, vírus e as próprias células de mamíferos, sejam elas tumorais ou não (Hancock e Chapple, 1999; Reddy *et al.*, 2004; Papo e Shai, 2005; Jenssen *et al.*, 2006), o que os torna alvo de desenvolvimento de possíveis drogas terapêuticas (Marr *et al.*, 2006), tendo em vista a crescente resistência dos patógenos aos antibióticos de primeira escolha (Mookherjee e Hancock, 2007; Yacoby e Benhar, 2007). Além disso, existem estudos que observam o potencial contraceptivo dos peptídeos antimicrobianos (Reddy, *et al.*, 2004; Zairi *et al.*, 2008).

Já foram identificados mais de 850 peptídeos antimicrobianos diferentes em diversos organismos (Wang e Wang, 2004), muitos já isolados e caracterizados;

outros tiveram sua seqüência predita a partir do genoma do hospedeiro. Os peptídeos antimicrobianos são expressos constitutivamente ou quando o hospedeiro é exposto ao patógeno na forma de pré-pró-peptídeos, que consistem de um peptídeo-sinal N-terminal, um pró-segmeneto e um peptídeo C-terminal catiônico, que demonstra possuir atividade antimicrobiana efetiva após a clivagem do restante do pré-propeptídeo (Hecht, 1999).

O uso de técnicas espectroscópicas, em particular a ressonância magnética nuclear (RMN), permite estudar detalhes estruturais de praticamente todos os peptídeos antimicrobianos, levando a um melhor entendimento de sua estrutura e de sua forma de ação. Assim, um segundo modo de classificar os PAM, baseado em estudos espectroscópicos, sugere agrupá-los em cinco grandes grupos (Epanand e Vogel, 1999; Reddy *et al.*, 2004):

- 1. Peptídeos que formam α -hélices:** são peptídeos anfipáticos, que formam uma α -hélice com superfícies hidrofóbicas e catiônicas. Hélices anfipáticas não catiônicas são menos seletivas, agindo tanto sobre microorganismo quanto sobre células de mamíferos. Cecropinas de insetos e magaininas de sapos são exemplos deste grupo de peptídeos antimicrobianos.
- 2. Peptídeos que formam estruturas β :** são peptídeos geralmente estabilizados por uma ou duas pontes dissulfeto. Podem exibir estruturas do tipo folhas β antiparalelas (como é o caso da tanatina isolada do hemíptero *P. maculiventris*), motivos do tipo β -hairpin (como os exibidos pelas taquipesinas e polifemusina II, obtidas a partir do caranguejo-ferradura), entre outros.
- 3. Peptídeos ricos em resíduos de cisteína:** os peptídeos HNP-1, HNP-2 e HNP-3 isolados de neutrófilos humanos são exemplos de peptídeos

antimicrobianos ricos em Cys. Neste caso específico, são peptídeos de 30 resíduos, dos quais seis são Cys, que formam três pontes dissulfeto intramoleculares, que resultam em uma estrutura de três folhas β antiparalelas.

4. Peptídeos ricos em um determinado aminoácido: as estruturas desses peptídeos podem variar entre α -hélices e estruturas do tipo β . Exemplos desses peptídeos são as Histatinas (Hsts), isoladas a partir da saliva humana, que são ricas em resíduos de His e as catelicidinas dos vertebrados, ricas em resíduos de Pro.

5. Peptídeos derivados da proteólise de proteínas: são peptídeos como o fragmento 33-61 da cadeia α da hemoglobina e a lactoferricina.

Os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos podem variar de acordo com o patógeno atacado. Seu alvo pode ser tanto a membrana celular quanto organelas intra-celulares.

Quando o alvo é um vírus, a distribuição das cargas em um peptídeo e a adoção de uma estrutura secundária, seja α -hélice, sejam estruturas β , parecem ser mais importantes do que sua carga total e a natureza dos resíduos aromáticos (Jenssen *et al.*, 2006). O bloqueio da ação viral pode ocorrer de várias formas. Na primeira delas, o PAM pode ligar-se eletrostaticamente ao heparan sulfato, o glicosaminoglicano mais importante no que diz respeito à interação entre vírus e célula, bloqueando a associação do vírus e não permitindo a infecção da célula (Andersen *et al.*, 2004). Os PAMs também podem impedir a infecção viral inibindo a interação entre os vírus e as junções celulares e/ou a formação de sincício (Murakami *et al.*, 1997). A interação de PAMs com receptores específicos da célula hospedeira, agindo como antagonistas do vírus, ou com glicoproteínas do envelope

viral também pode ser outro mecanismo de ação antiviral (Wang *et al.*, 2004). Interações com o envelope viral e com a membrana plasmática da célula hospedeira também foram observadas, sendo que a composição lipídica tanto da membrana celular quanto do envelope viral, se este for constituído por fosfolipídios, são primordiais para a interação (Robinson Jr. *et al.*, 1998). Por fim, PAMs podem atingir alvos intracelulares, como o núcleo, ribossomos e mitocôndrias, interferindo na replicação do DNA, síntese de proteínas e nível energético da célula, impedindo a infecção e replicação viral (Marcello e Palù, 1995).

Os PAMs com atividade bactericida são os melhor estudados na literatura. Mesmo que o PAM tenha como alvo uma organela intra-celular, o primeiro passo é a ligação à membrana celular da bactéria.

A primeira interação entre o PAM e a membrana citoplasmática da bactéria é eletrostática, pois o PAM tem carga positiva em pH fisiológico e a monocamada externa da membrana citoplasmática de bactérias tem carga líquida negativa (Yeaman e Yount, 2003). Esse aspecto é importante para a seletividade do PAM no que se refere à atividade hemolítica. Tomando-se a magainina, um PAM isolado do sapo *Xenopus laevis*, um aumento de cargas positivas aumenta sua atividade bactericida, sem aumentar sua atividade hemolítica. No entanto, essa relação não é linear, uma vez que, um aumento indiscriminado na carga positiva leva a uma diminuição da atividade antimicrobiana, provavelmente pela maior interação entre as cargas do peptídeo e as cabeças polares dos fosfolipídios, prevenindo a translocação do primeiro para o interior da célula (Dathe *et al.*, 2001). O potencial negativo da membrana atua como agente concentrador de peptídeos no entorno da membrana, de acordo com a teoria de Gouy-Chapman (Seelig, 2004)

Outro aspecto importante para a ação bactericida o momento hidrofóbico, que define o quão anfipático é um peptídeo; essa propriedade é definida pela soma vetorial das hidrofobicidades individual dos resíduos de aminoácidos. O momento hidrofóbico é bastante dependente da estruturação do peptídeo, seja em α -hélice, seja em estruturas β . A flexibilidade estrutural de um PAM também é um aspecto importante na ação do peptídeo, uma vez que costuma ocorrer uma transição conformacional entre a estrutura do peptídeo em solução e o peptídeo ligado à membrana plasmática (Yeaman e Yount, 2003).

Parece claro que o mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos (figura 01) depende do balanço entre as propriedades tanto do próprio peptídeo quanto da membrana plasmática da célula-alvo. Com base nessas variações, pode-se propor três formas de interação entre o PAM e a membrana citoplasmática:

1. **Modelo *barrel stave***: este modelo (Ehrenstein e Lecar, 1977; Breukink e de Kruijff, 1999) propõe a formação de canais e/ou poros transmembranares através da associação de PAMs anfipáticos, cujas faces hidrofóbicas interagem com as cadeias longas dos fosfolipídios e a porção hidrofílica está voltada para o interior do poro ou canal. São necessárias poucas moléculas do peptídeo para permitir a formação do poro, já que cada peptídeo ligado à membrana reconhece outro peptídeo, oligomerizando-se e formando o poro. A formação desse poro se dá por etapas, a saber (i) ligação do peptídeo na forma monomérica à membrana, assumindo uma estrutura secundária; (ii) recrutamento de outros peptídeos monoméricos para que ocorra a formação do poro; (iii) inserção dos peptídeos estruturados na porção hidrofóbica da membrana, perpendicularmente à superfície, e finalmente, (iv) vazamento do conteúdo

intracelular, levando a célula à morte. A alameticina, sintetizada pelo fungo *Trichoderma viride*, é um exemplo de PAM com esse mecanismo de ação (Beven *et al.*, 1999; Samsom, 1991; Yang *et al.*, 2001).

2. **Modelo do poro toroidal:** (Yang *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001) de forma análoga ao modelo *barrel stave*, os peptídeos ligam-se à membrana e estruturam-se. Devido à propensão a formar curvatura positiva da membrana na região da ligação do peptídeo, induzida por fosfolipídios como a fosfatidilcolina, a membrana também curva-se quando os peptídeos inserem-se paralelamente à normal da membrana citoplasmática, sendo que o poro é então constituído tanto pelos PAM quanto pelas cabeças polares dos fosfolipídios. A magainina 2, isolada do anfíbio *Xenopus laevis*, é um exemplo de PAM com esse tipo de mecanismo de ação (Ludtke *et al.*, 1996; Matsuzaki, 1998).
3. **Modelo carpete:** (Shai e Oren, 2001) neste modelo, os peptídeos antimicrobianos entram em contato com a cabeça polar dos fosfolipídios que compõem a membrana citoplasmática, até atingirem uma determinada concentração (e formando um carpete sobre as cabeças polares dos fosfolipídios). Este “carpete” de peptídeos permeia a membrana como se fosse um detergente, e não requer a formação de um poro propriamente dito, nem a conformação do peptídeo em uma estrutura específica. Um exemplo de PAM com essa atividade é a cecropina P1, isolada a partir de intestino de porco (Rozek *et al.*, 2000; Sitaram e Nagaraj, 1999).

Além disso, existem PAM que ligam-se a receptores de membrana e são internalizados em seguida. A nisina, sintetizada pela bactéria *Lactococcus lactis* e muito utilizada como conservante de alimentos, liga-se a um componente envolvido

na síntese do peptídeoglicano (Breukink e Kruijff, 1999). Hst-5 também parece ligar-se a duas proteínas de choque térmico de *C. albicans*, sendo internalizadas em seguida (Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006). Nesses casos, o PAM atravessa a membrana citoplasmática e acumula-se no citoplasma, e têm como alvo organelas e/ou processos intra-celulares. O PAM isolado a partir de plaquetas de mamíferos t-PMP-1, por exemplo, atravessa a membrana de *S. aureus* sem causar maiores danos, mas, uma vez no interior da célula-alvo, causa inibição da síntese de DNA e RNA (Xiong *et al.*, 2002). Outro exemplo de PAM com alvo intracelular é a buforina II, que liga-se ao DNA e RNA de *E. coli*, inibindo as funções celulares (Park *et al.*, 1998).

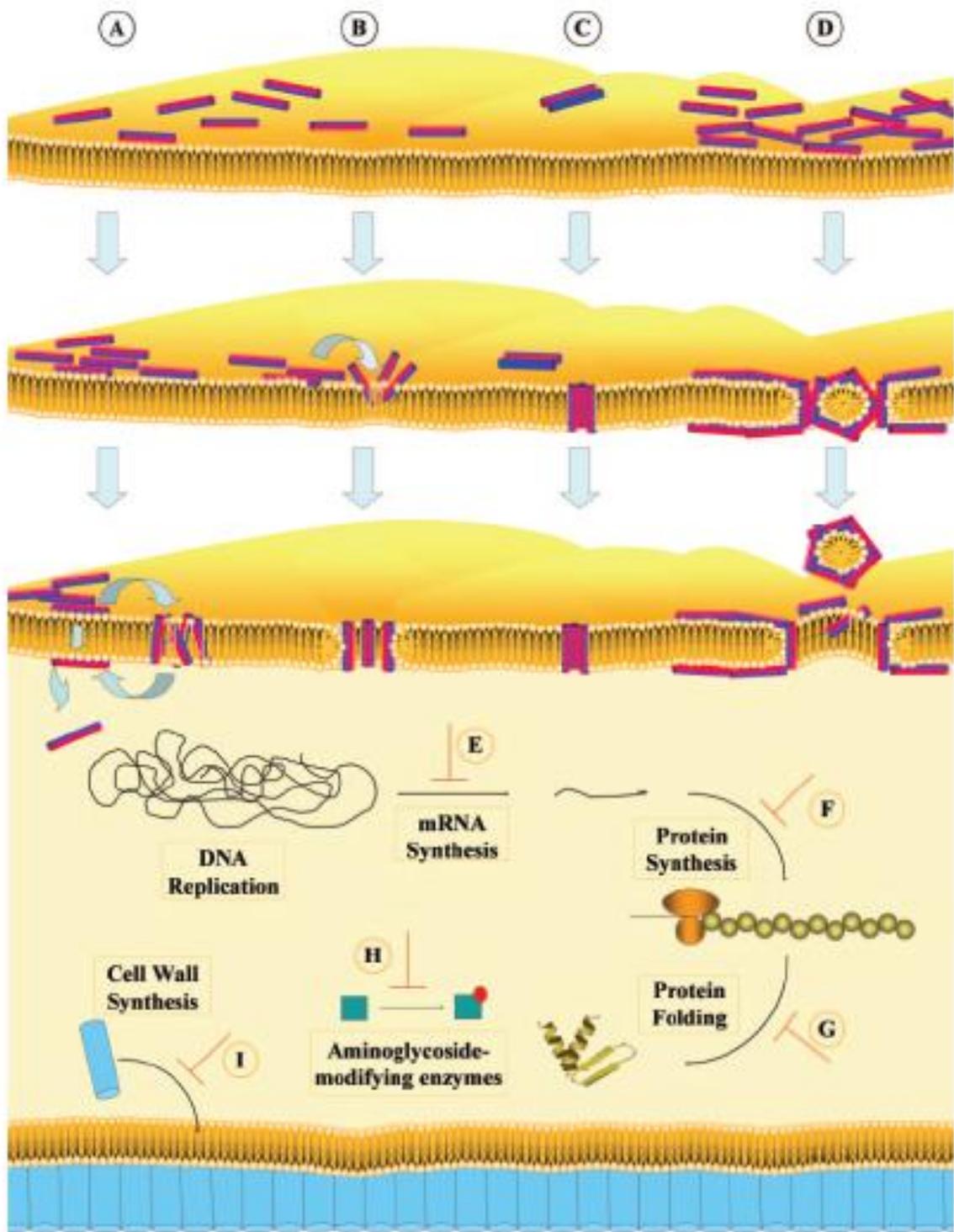


Figura 01. Representação pictórica dos mecanismos de ação de PAM. A membrana celular está representada em amarelo, e os PAM, representados em vermelho e azul. Os modelos indicados são: (A) peptídeos que não agem diretamente sobre a membrana celular, sendo internalizados após interação com receptores, (B), modelo do poro toroidal; (C), modelo *barrel stave* e (D), modelo *carpete*. Estão representados ainda os mecanismos de ação dos PAM não membranólíticos: (E), inibição da síntese de ácidos nucleicos; (F), inibição de síntese protéica; (G), inibição de enzimas envolvidas no dobramento de proteínas; (H) inibição de enzimas envolvidas na modificação de aminoglicosídeos e (I), inibição de enzimas envolvidas na síntese de componentes da parede celular (adaptado de Jensen *et al.*, 2006)

Nos últimos anos, vêm crescendo o conhecimento sobre peptídeos antifúngicos; em comum com os peptídeos bactericidas, os PAMs antifúngicos mostram grande diversidade de seqüência e estrutura secundária. Peptídeos antifúngicos freqüentemente apresentam motivos de ligação a moléculas como quitina e heparina (Huang *et al.*, 2000; McCabe *et al.*, 2002). Peptídeos bactericidas como a magainina, quando conjugados a ácidos graxos como o ácido palmítico, revelam possuir também atividade antifúngica (Avrahami e Shai, 2003).

De forma análoga à ação bactericida, muitos peptídeos agem sobre a membrana citoplasmática do fungo, ou sobre a parede celular (Jang *et al.*, 2006). No entanto, boa parte dos PAMs antifúngicos ainda não tem seu mecanismo de ação bem esclarecido. Os principais alvos apontados até o momento são a mitocôndria, gerando radicais livres, ou ligação a ácidos nucléicos, mas não existe consenso a esse respeito (Helmerhorst *et al.*, 1999a; Helmerhorst *et al.*, 2001a; Veerman *et al.*, 2004; Melino *et al.*, 2006).

1.2. HISTATINAS

Os peptídeos antimicrobianos da família das Histatinas (Hsts) foram isolados pela primeira vez em 1986 (Oppenheim *et al.*, 1986), e eram reconhecidos à época como polipeptídeos ricos em histidina (*histidine-rich polypeptide* – HRP, Pollock *et al.*, 1984), e somente em 1988 receberam o nome atual (Oppenheim *et al.*, 1988).

Isoladas a partir das secreções das glândulas salivares parótidas, as Hsts fazem parte de um sem-número de peptídeos antimicrobianos encontrados na saliva humana e de alguns primatas. Dentre os peptídeos identificados, podemos destacar as proteínas ricas em prolina (*proline-rich proteins* – PRP), estaterinas e S-cistatinas. Todos estes peptídeos são extremamente ricos em um ou dois aminoácidos específicos (Oppenheim *et al.*, 1988; tabela I).

Tabela I. Predominância de aminoácidos específicos em alguns dos PAM presentes na saliva humana.

Família de PAM	Aminoácidos predominantes
Hsts	His e Tyr
PRPs	Pro e Gli
Estaterinas	Pro e Tyr

A família das Hsts é formada por peptídeos de cerca de 3 a 4 kDa, que possuem carga positiva em pH fisiológico. Hsts apresentam ação bactericida e bacteriostática contra *Streptococcus mutans* (MacKay *et al.*, 1984), e inibem a formação do biofilme de *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis* e *Porphyromonas gingivalis* (Murakami *et al.*, 1991; Payne *et al.*, 1991) que dá origem à formação de cáries e placas bacterianas na cavidade oral (Lenander-Lumikari e Loimaranta, 2000; Hicks *et al.*, 2003). Histatina-5 (Hst-5) é gerada proteoliticamente a partir de Hst-3, durante a maturação dos grânulos nas glândulas salivares parótidas (Messana *et al.*, 2008), sendo que esses dois peptídeos são os mais estudados, por sua maior ação fungicida (Xu *et al.*, 1991).

A Hst-5, alvo deste projeto, é produto da proteólise do fragmento N-terminal da Hst-3 (tabela II) (Hardt *et al.*, 1995; Messana *et al.*, 2008).

Tabela II. Seqüência primária de algumas das Hsts encontradas na saliva humana, com destaque para a Hst-5.

Hst	Estrutura primária
Hst-1	DS ^P HEKRHHGYRRKFHEKHHSREFPFYGDYGSNYLYDN [#]
Hst-2	RKFHEKHHSREFPFYGDYGSNYLYDN
Hst-3	DSHAKRHHGYKRRKFHEKHHSRGRYSNYLYDN
Hst-4	RKFHEKHHSRGRYSNYLYDN
Hst-5	DSHAKRHHGYKRRKFHEKHHSRGRY
Hst-6	DSHAKRHHGYKRRKFHEKHHSRGRY
Hst-7	RKFHEKHHSRGRY
Hst-8	KFHEKHHSRGRY
Hst-9	RKFHEKHHSRGRY
Hst-10	KFHEKHHSRGRY
Hst-11	KRHHGYKR
Hst-12	KRHHGYK

[#]S^P representa um resíduo de serina fosforilado.

O fungo oportunista *Candida albicans* causa infecções sistêmicas e nas mucosas em seres humanos imunodeprimidos, como acontece em pacientes HIV positivos, transplantados e aqueles submetidos a tratamentos antitumorais agressivos (Edgerton *et al.*, 1998). Ao mesmo tempo em que aumentam em número as drogas para profilaxia e tratamento dessas infecções causadas por fungos, aumentam também o número de cepas resistentes a essas drogas (Sanglard e Odds, 2002). Por outro lado, drogas como a anfotericina B são extremamente eficientes, mas são também muito nefrotóxicas (Hartsel e Bolard, 1996). Dessa forma, a procura por novos antifúngicos, que sejam tanto eficientes como pouco tóxicos é um tema de importância crucial para uma melhora do tratamento de indivíduos imunodeprimidos.

Hst-5 surge como uma promessa entre essas novas drogas, pela sua notável ação contra *C. albicans* (Raj *et al.*, 1990; Edgerton *et al.*, 1998; Situ e Bobek, 2000). Diversos estudos relatam essa propriedade da Hst-5, e ressaltam a importância do domínio C-terminal do peptídeo, bem como da sua conformação para que a ação fungicida seja a desejada (Raj *et al.*, 1990; Ramalingam *et al.*, 1996). No entanto, existem estudos que consideram que a conformação α -helicoidal não é importante para a atividade antifúngica da Hst-5 (Situ *et al.*, 2000).

A conformação do peptídeo em solução aquosa é predominantemente ao acaso, enquanto que em solventes apolares, como trifluoroetanol, metanol ou dimetilsulfóxido, o peptídeo adota uma conformação em α -hélice (Brewer *et al.*, 1998; Raj *et al.*, 1998; Iovino *et al.*, 2001). Na presença de micelas constituídas de lisofosfatidilglicerol, Hst-5 adota uma conformação do tipo dobra β (Situ *et al.*, 2000), enquanto que em vesículas de carga líquida negativa e na presença de Zn^{2+} , o peptídeo estrutura-se em α -hélice (Melino *et al.*, 1999).

Apesar dos diversos estudos na presença de membranas modelo e *in vivo*, (Helmerhorst *et al.*, 2001b; Ruissen *et al.*, 2001; Petruzzelli *et al.*, 2003; den Hertog *et al.*, 2004; Veerman *et al.*, 2004; Wunder *et al.*, 2004; den Hertog *et al.*, 2005) o mecanismo de ação da Hst-5 ainda não está claro, mas sabe-se que o processo inicia-se quando o peptídeo liga-se a duas proteínas de choque térmico 70 kDa, Ssa1p e Ssa2p (Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006), presentes na membrana plasmática de *C. albicans*, sendo então internalizado. Essa hipótese já havia sido levantada em 1998 por Edgerton *et al.*. Cepas de *C. albicans* que não expressam ambas as proteínas são resistentes à ação da Hst-5 (Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006). A translocação da Hst-5 através da membrana é apenas residual (den Hertog *et al.*, 2004; den Hertog *et al.*, 2005). O alvo da Hst-5 é, provavelmente, a mitocôndria (Helmerhorst *et al.*, 1999a; Helmerhorst *et al.*, 2001b; Ruissen *et al.*, 2001; Helmerhorst *et al.*, 2002; Petruzzelli *et al.*, 2003;), interferindo no transporte de elétrons, gerando radicais livres e desencadeando a apoptose (Helmerhorst *et al.*, 2001a), mas dois trabalhos contrariam essa hipótese (Veerman *et al.*, 2004; Wunder *et al.*, 2004). Existe a hipótese que a exposição de *C. albicans* a inibidores de cadeia respiratória protege o fungo da ação de Hst-5 (Gyurko *et al.*, 2000; Gyurko *et al.*, 2001), mas existe um trabalho que atribui essa proteção não ao bloqueio da mitocôndria, mas sim ao impedimento da internalização do peptídeo pela maior rigidez da membrana na presença desses inibidores (Veerman *et al.*, 2007).

Hst-5 induz a expressão de genes ligados à adaptação ao estresse osmótico (Vylkova *et al.*, 2007) e também induz a saída de ATP e K⁺ através do canal de potássio TRK1 (Baev *et al.*, 2003; Koshlukova *et al.*, 2000; Vylkova *et al.*, 2006), mas esse último fenômeno não é determinante para a ação de Hst-5 (Baev *et al.*, 2003). Hst-5 não é hemolítica (Helmerhorst *et al.*, 1999b), e age como um peptídeo que

penetra células (*cell penetrating peptide*, CPP) contra *Leishmania*, sendo que a mitocôndria do protozoário é seu alvo (Luque-Ortega *et al.*, 2008). Hst-5 pode ainda agir contra outras espécies de *Candida* (Gyurko *et al.*, 2001), inibir a ação da leucotoxina produzida por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Murakami *et al.*, 2002), uma bactéria gram-negativa implicada em periodontite juvenil; seu C-terminal pode atuar como inibidor de metaloproteases de matriz extracelular (Gusman *et al.*, 2001a), além disso, foi determinada sua atividade inibitória sobre a cisteíno-protease clostripaína (Gusman *et al.*, 2001b), enzima esta utilizada pelo *Clostridium histolyticum* em sua atividade proteolítica, degradando células musculares do hospedeiro, levando à destruição em massa dos tecidos. A Hst-5 também demonstrou atividade inibitória sobre as colagenases e enzimas da família da tripsina do *Porphyromonas gingivalis* (Gusman *et al.*, 2001a). Além disso, foi demonstrada a capacidade de Hst-5 ligar-se ao DNA (Melino *et al.*, 1999).

A atividade bactericida de Hst-5 é apreciável apenas em meios de cultura com baixa força iônica. Nessas condições, o peptídeo é letal para *S. mutans*, *S. aureus*, *P. gingivalis*, *P. aeruginosa* e *A. actinomycetemcomitans* (Groenink *et al.*, 2003). Hst-5 não apresenta atividade hemolítica (Helmerhorst *et al.*, 1997). Fragmentos do C-terminal de Hst-5, com modificações pontuais que aumentam seu momento hidrofóbico, no entanto, apresentam atividade hemolítica e aumentam em três vezes sua letalidade contra *C. albicans* (Helmerhorst *et al.*, 1997).

A Hst-5 apresenta ainda outro aspecto interessante, que é a presença de motivos de ligação a íons metálicos, especialmente Zn^{2+} e Cu^{2+} (Brewer e Lajoie, 2000; Grogan *et al.*, 2001; Gusman *et al.*, 2001c, figura 02). Este aspecto é importante, uma vez que a saliva humana possui diversos íons metálicos em sua

composição, como por exemplo Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} , além do Ca^{2+} , que está presente em concentrações da ordem de milimolar (Gusman *et al.*, 2001c).

DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY

Figura 02. Domínios de ligação ao zinco (em vermelho) e ao cobre (em verde) encontrados na Hst-5 (REF).

O Zn^{2+} pode ligar-se ao domínio HEXXH no C-terminal da Hst-5. Este domínio é encontrado em metalo-proteases dependentes de zinco e em toxinas que se ligam ao zinco (Grogan *et al.*, 2001). Na presença de Zn^{2+} , a Hst-5 tem a capacidade de fundir vesículas unilamelares pequenas de carga negativa (Melino *et al.*, 1999), além de potencializar a ação contra *E. fecalis* (Rydengård *et al.*, 2006). Já Cu^{2+} pode ligar-se ao domínio DSH (figura 05), encontrado no N-terminal da Hst-5 (Grogan *et al.*, 2001; Gusman *et al.*, 2001c), e o fragmento sintético C-terminal de Hst-5 contendo os sítios acima descritos mostrou ser capaz de ligar-se ao DNA e hidrolisá-lo (Melino *et al.*, 2006). O fragmento sintético N-terminal de Hst-5 contendo o sítio de ligação de Cu^{2+} apresenta atividade oxidativa (Cabras *et al.*, 2007). O Ca^{2+} , que é o metal mais abundante na saliva humana, demonstrou não possuir afinidade com a Hst-5 (Grogan *et al.*, 2001; Gusman *et al.*, 2001c). No entanto, Ca^{2+} pode ser o responsável por diminuir a atividade antifúngica *in vivo* da Hst-5, pois diminui a capacidade de ligação do peptídeo à membrana de *C. albicans* (Dong *et al.*, 2003), e diminui a capacidade de manter o efluxo de ATP a partir do interior da célula (Dong *et al.*, 2003; Koshlukova *et al.*, 1999).

1.3. O AMINOÁCIDO TOAC

A síntese do aminoácido TOAC (ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil-4-amino-4-carboxílico, figura 03) foi descrita em 1967 (Rassat e Rey, 1967). Seu uso para o estudo de peptídeos através da espectroscopia de ressonância

paramagnética eletrônica (RPE) foi introduzido na década de 1980 (Nakaie *et al.*, 1981; Nakaie *et al.*, 1983). Inicialmente a técnica Boc permitiu apenas a introdução de TOAC na posição N-terminal. Com o desenvolvimento da técnica Fmoc foi possível incorporar TOAC em qualquer posição no peptídeo (Marchetto *et al.*, 1993).

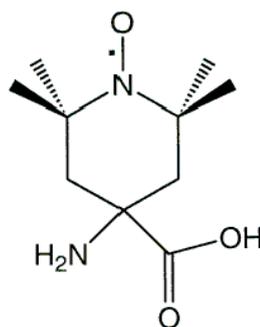


Figura 03. O aminoácido TOAC.

O TOAC é caracterizado por uma estrutura heterocíclica saturada contendo um grupamento paramagnético, um radical nitróxido estabilizado pela presença de dois átomos de carbono tetrassubstituídos. Rigidamente configurado, o TOAC estabiliza dobras β e hélices $3_{10}/\alpha$ em peptídeos lineares sintéticos (Toniolo *et al.*, 1998).

O TOAC possui uma banda de absorção relativamente fraca na região do visível entre 420 e 450 nm com coeficiente de extinção entre 5 e 20 relacionada à transição $n \rightarrow \pi^*$ do nitróxido (Toniolo *et al.*, 1998). Sendo o TOAC um radical livre, é um forte supressor de fluorescência, inclusive no caso de peptídeos que contém sondas fluorescentes naturais ou incorporadas. O grupamento nitróxido é capaz de sofrer um processo reversível de redução que pode ser monitorado por medidas de RPE (Nakaie *et al.*, 1983) e de voltametria cíclica (Toniolo *et al.*, 1998). Produz um alto grau de cristalinidade em seus derivados e em peptídeos que o contenham, permitindo até mesmo a determinação de estrutura por difração de raios-X. Mas, uma das principais vantagens do TOAC sobre outros marcadores de *spin* é seu

caráter rígido. A única limitação relevante de seu uso em estudos físico-químicos é a dificuldade da caracterização dos peptídeos contendo TOAC por RNM devido ao alargamento das linhas de ressonância de prótons nos espectros de ^1H -RMN desses peptídeos devido ao efeito paramagnético produzido pelo radical livre nitróxido (Toniolo *et al.*, 1998).

A primeira análise de propriedades conformacionais de um peptídeo marcado com TOAC através de RPE foi realizada com o hormônio biologicamente vasoativo angiotensina II (AII, DRVYIHPF). Análogos marcados no N-terminal apresentaram atividade biológica diminuída e seus espectros de RPE apresentaram sensibilidade a transições conformacionais induzidas pelas condições físico-químicas (Nakaie *et al.*, 1983). Os primeiros estudos com TOAC também demonstraram que os espectros de RPE do aminoácido isolado e de peptídeos onde TOAC foi incorporado na posição N-terminal são sensíveis ao estado de ionização dos grupos amino e carboxila (Nakaie *et al.*, 1981; Nakaie *et al.*, 1983). Posteriormente, o TOAC foi utilizado em vários outros estudos de peptídeos (Smythe *et al.*, 1995; Toniolo *et al.*, 1995; Hanson *et al.*, 1996). Em particular, os espectros de RPE de peptídeos duplamente marcados tem sido de muita utilidade no estabelecimento da conformação desses peptídeos, permitindo, por exemplo, a distinção entre α -hélice e hélice 3_{10} (Smythe *et al.*, 1995; Toniolo *et al.*, 1995). Como mencionado acima, nesses estudos foi verificado que o TOAC favorece a formação de dobras e hélices (Toniolo *et al.*, 1998). O TOAC também tem sido utilizado para monitorar a dinâmica de redes poliméricas durante a produção das cadeias peptídicas (Cilli *et al.*, 1997; Cilli *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2002).

Com vista a peptídeos biologicamente ativos, existem trabalhos que enfocam a tricogina GA IV, um antimicrobiano que contém vários resíduos de ácido amino

isobutírico (Aib) (Anderson *et al.*, 1999; Crisma *et al.*, 1997; Epand *et al.*, 1999; Monaco *et al.*, 1999). Considerando que tanto o TOAC quanto o Aib são glicinas dissustituídas, os resíduos Aib da tricogina foram substituídos por TOAC e suas propriedades conformacionais e funcionais foram investigadas por raios-X (Crisma *et al.*, 1997), RPE (Anderson *et al.*, 1999; Monaco *et al.*, 1999) e fluorescência (Epand *et al.*, 1999). Essa mesma abordagem vem sendo utilizada com a alameticina (Marsh *et al.*, 2007a; Marsh *et al.*, 2007b; Bartucci *et al.*, 2008). Outro PAM estudado através da inserção de TOAC é a gomesina, sendo que sua atividade antimicrobiana não foi afetada pela introdução do aminoácido paramagnético no N-terminal (Moraes *et al.*, 2007).

Também foram realizados estudos utilizando a técnica da inserção de TOAC para marcar a região do N-terminal de um peptídeo sintético de 14 resíduos, cuja seqüência corresponde aos resíduos 253 a 266 do receptor *mas*, uma proteína de membrana pertencente à família de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) que responde ao hormônio angiotensina (Pertinhez *et al.*, 1995; Pertinhez *et al.*, 1997). Espectros de RPE foram examinados em solução e em presença de membranas modelo. A partir desses estudos, foi proposto que o pH, a polaridade e o ambiente lipídico podem afetar a conformação das regiões de receptores transmembranares expostas à água e, dessa forma contribuir para as mudanças conformacionais que levam ao processo de transdução de sinal.

Mais recentemente, foram estudados peptídeos hormonais que se ligam a GPCRs. Nesse contexto, derivados marcados do hormônio melanócito estimulante (α -MSH) contendo TOAC na região do N-terminal (Barbosa *et al.*, 1999) e de seu análogo mais potente e de longa ação [Nle4, D-Phe7] α -MSH (Nakaie *et al.*, 2001) foram sintetizados e suas propriedades biológicas e espectroscópicas foram

examinadas. Esses foram os primeiros peptídeos marcados com TOAC que apresentaram 100% de atividade. Outros trabalhos (Bettio *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2005) tratam da síntese, atividade biológica, propriedades espectroscópicas e interação com sistemas modelo de vários análogos do neuropeptídeo Y contendo TOAC, um outro peptídeo que se liga aos GPCR.

Também foram sintetizados análogos do hormônio vasoativo bradicinina (BK) e da angiotensina II contendo TOAC na região N-terminal e também internamente. Os análogos da angiotensina II (AII) foram TOAC⁰-AII, TOAC¹-AII e TOAC³-AII, enquanto que os análogos de BK foram TOAC⁰-BK e TOAC³-BK (Nakaie *et al.*, 1983; Marchetto *et al.*, 1993; Barbosa *et al.*, 2001; Nakaie *et al.*, 2002). As propriedades biológicas dos hormônios marcados na região N-terminal foram comparáveis às dos nativos, enquanto que os hormônios marcados em outras posições não apresentaram atividade biológica, provavelmente devido a uma restrição conformacional imposta pela introdução do TOAC (Nakaie *et al.*, 2002). Estudos farmacológicos corroboraram essa hipótese (Nakaie *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2008). Análogos de angiotensina I marcados com TOAC foram utilizados como substratos para a enzima conversora de angiotensina, sendo que os peptídeos marcados no C-terminal não foram degradados, tendo sido a cinética enzimática acompanhada por RPE (de Deus Teixeira *et al.*, 2007).

Em outro trabalho (Schreier *et al.*, 2004) foram realizados estudos de CD, RPE e fluorescência de AII e seus análogos TOAC¹-AII e TOAC³-AII e ainda de BK e seus análogos TOAC⁰-BK e TOAC³-BK em solução aquosa, em função do pH e da adição de solvente trifluoroetanol (TFE). Foi observado que os peptídeos marcados na posição N-terminal apresentaram comportamento conformacional semelhante ao dos peptídeos nativos. Foi proposto que a ausência da atividade dos análogos

marcados interiormente era devido a uma dobra imposta pelo TOAC e que impede os peptídeos de adquirir a conformação adotada quando ligados aos receptores. Estudos de fluorescência desses peptídeos em solução e em presença de membranas modelo foram recentemente realizados no nosso laboratório (Marín, 2007). O exame da interação desses peptídeos com micelas através de CD e RPE foi também relatado (Vieira *et al.*, 2002; Vieira, 2004).

Mais recentemente, interação de peptídeos β -amilóides com membranas modelo também vem sendo estudados através da inserção do TOAC em sua seqüência (Esposito *et al.*, 2006). TOAC também vêm sendo utilizado para estudos dinâmicos de fosfolambana, que regula a bomba de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático cardíaco (Karim *et al.*, 2006; Nesmelov *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Neste caso, são sintetizados tanto peptídeos mimetizando fragmentos da fosfolambana (Zhang *et al.*, 2007) com também toda a proteína (Karim *et al.*, 2006), incorporando o aminoácido paramagnético nas posições 11 e 46, permitindo estudar as conformações R e T (Karim *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). Peptídeos que se inserem em membranas através de hélices inclinadas (Thomas e Bresseur, 2006) também são estudados incorporando TOAC às suas seqüências (Inbaraj *et al.*, 2006; Karp *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

Com o objetivo de contribuir para a elucidação do mecanismo de ação da Hst-5 e estabelecer relações estrutura-função, foram realizados estudos conformacionais e de atividade do peptídeo e de seu análogo contendo TOAC na posição N-terminal (TOAC⁰-Hst-5). Estudos estruturais foram realizados empregando-se as técnicas espectroscópicas de CD, fluorescência e RPE. Propriedades conformacionais dos peptídeos foram estudadas em solução aquosa, em função do pH, da adição de TFE

e da interação com íons complexantes de Hst-5, bem como em presença de membranas modelo – micelas e bicamadas - com diferentes composições lipídicas, em particular diferentes cargas superficiais. A atividade dos peptídeos foi investigada em sistemas modelo através de medidas de condução iônica em bicamadas lipídicas planas (black lipid membranes, BLM) e de permeabilização de vesículas lipídicas. Foi ainda examinada a atividade dos peptídeos *in vivo* contra o fungo *Candida albicans*, bem como sua ação hemolítica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS

Os peptídeos Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 (tabela III) foram sintetizados no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo pelo grupo do Prof. Dr. Clóvis R. Nakaie, empregando o método de síntese em fase sólida (Merrifield, 1963; Stewart e Young, 1984). A estratégia t-BOC (tert-butiloxicarbonil) foi empregada para a síntese do peptídeo marcado com TOAC no N-terminal.

Tabela III. Peptídeos estudados.

Peptídeo	Estrutura primária
Hst-5	DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY
TOAC ⁰ -Hst-5	TOAC-DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY

3.1.2. REAGENTES

Os sais utilizados para a preparação dos tampões foram citrato de sódio, da J.T. Baker Chemicals Co., ácido bórico e fosfato de sódio dibásico, da Merck S.A.. Na titulação com íons metálicos, foram utilizados cloreto de zinco e sulfato de cobre(II) da Merck S.A. e cloreto de manganês(II) da Labsynth. A acrilamida

(CH₂=CH-CONH₂) utilizada nos experimentos de supressão de fluorescência é da Bio-Rad, 5,6-carboxifluoresceína (CF) foi adquirida da Kodak.

Os lisofosfolipídios (Avanti Polar Lipids) utilizados foram 1-palmitoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (LPC) e 1-palmitoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (LPG) (figura 04).

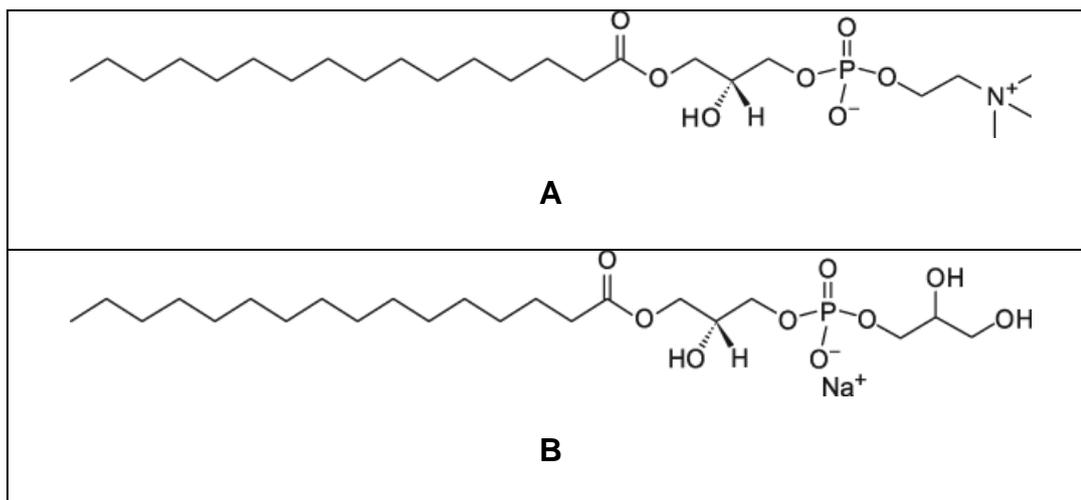
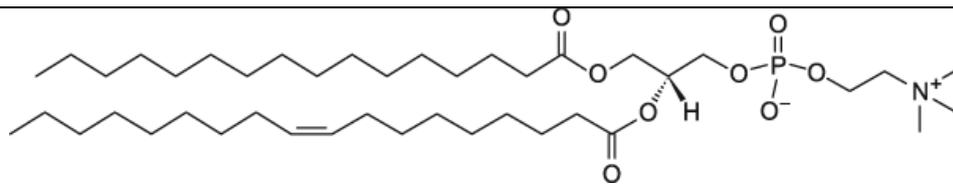
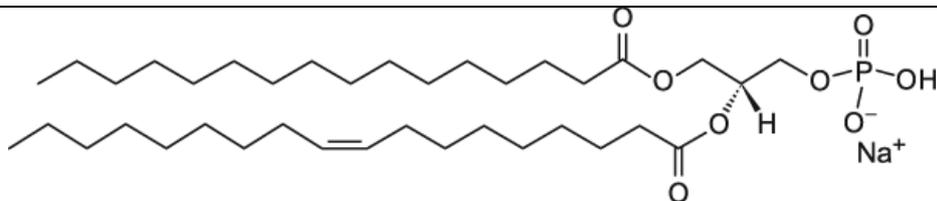


Figura 04. Estruturas químicas de LPC (A) e LPG (B).

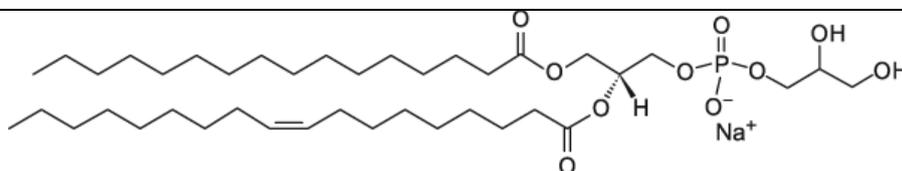
Os fosfolipídios (figura 05, Avanti Polar Lipids) utilizados foram 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC), ácido 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatídico (POPA), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-*rac*-(1-glicerol)] (POPG), L- α -fosfatidiletanolamina transfosfatidilada a partir de fosfatidilcolina de ovo de galinha (ePE) e L- α -fosfatidilserina de cérebro (bPS). Cardiopina (CL) de coração bovino foi adquirida da Sigma. Esfingomielina (SM) de cérebro de porco foi adquirida da Avanti Polar Lipids. Foram utilizadas ainda azolecitina (ASO) de soja, de composição fosfatidilcolina (PC), 29%; fosfatidiletanolamina (PE), 30%; fosfatidilinositol (PI), 26%; ácido fosfatídico (PA), 14%; fosfatidilserina (PS), 1%, apresentando cadeias hidrocarbonadas de diferentes comprimentos e grau de insaturação, com e sem ramificações, da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) e difitanoilfosfatidilcolina (DPhPC) da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).



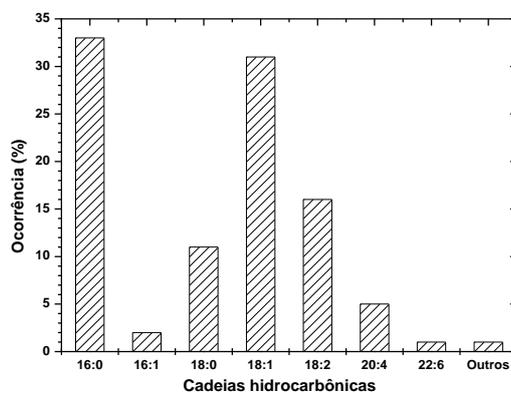
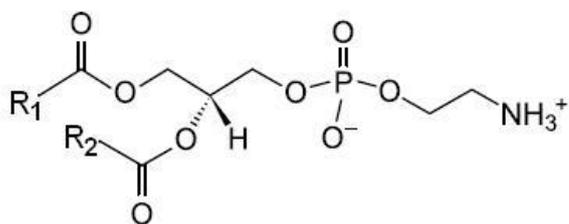
A



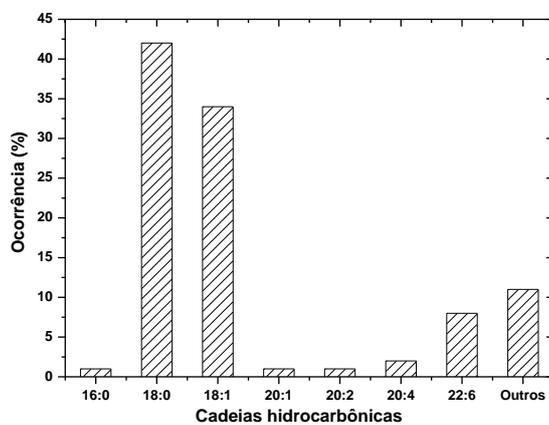
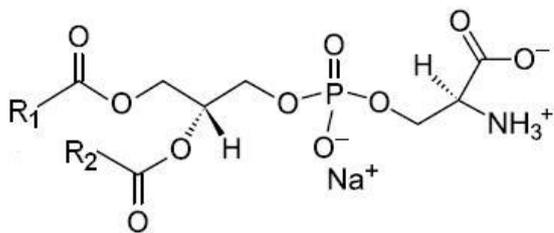
B



C



D



E

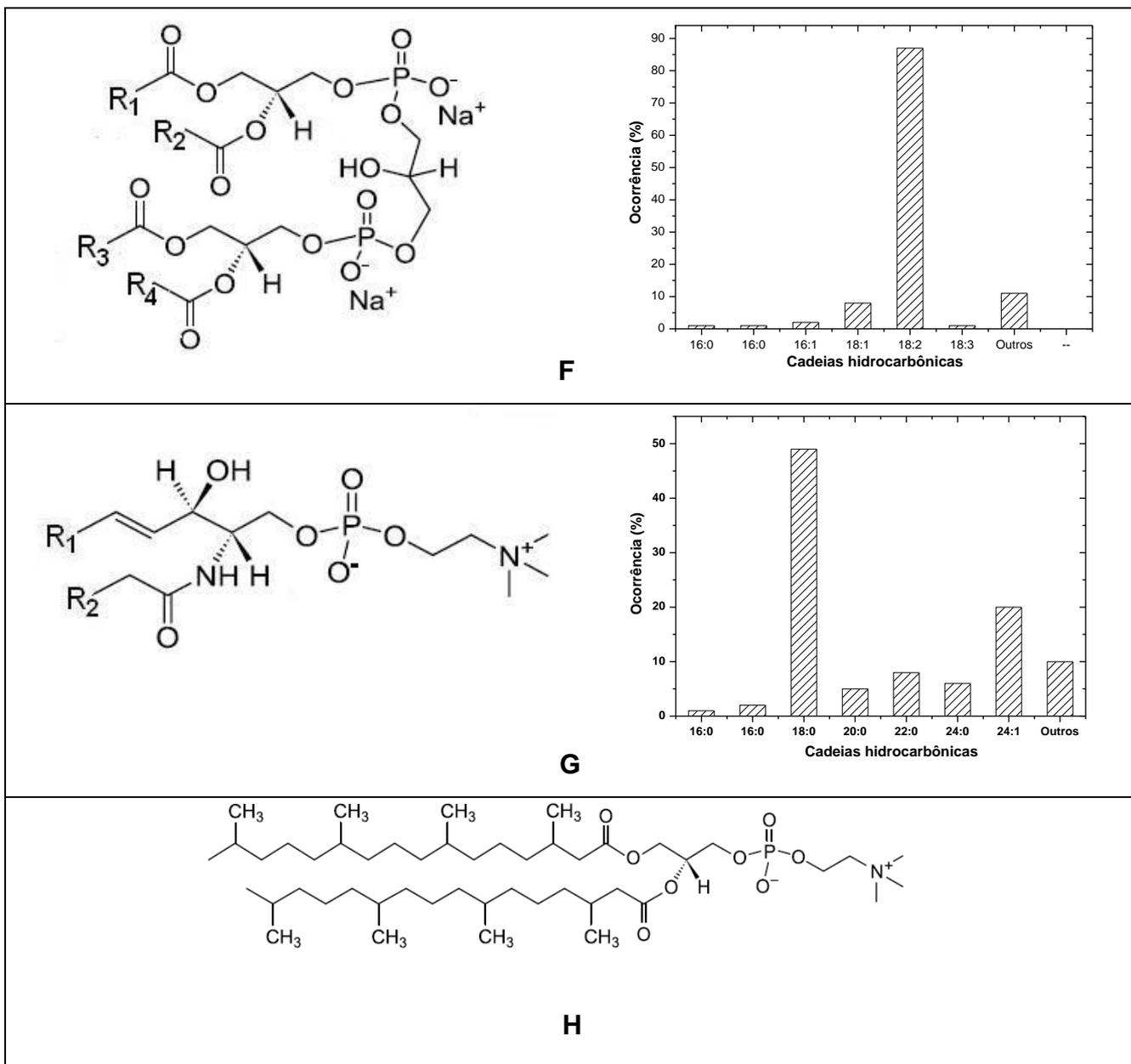


Figura 05. Estruturas químicas de POPC (A), POPA (B), POPG (C), PE (D), PS (E), CL (F) e SM (G) e DPhPC (H). Os esquemas de barras à direita das figuras D-G apresentam a composição de ácidos graxos dos fosfolipídios empregados.

Os esteróis (figura 06) utilizados foram colesterol (COL), adquirido da Sigma e ergosterol (ERGO), adquirido da Fluka and Riedel-de-Haën.

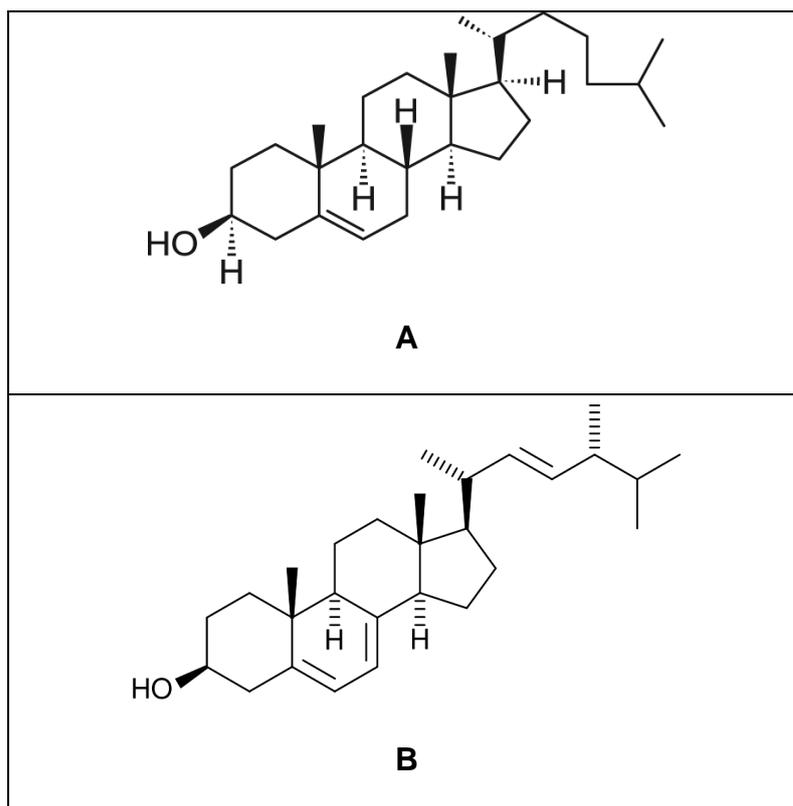


Figura 06. Estruturas químicas do colesterol (A) e ergosterol (B).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

As concentrações das amostras foram determinadas em espectrofotômetro UV-Vis Hitachi U-2010, lendo-se a absorvância a 280 nm, e utilizando-se um ϵ da ordem de $2560 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$, correspondendo a dois resíduos de tirosina ($\epsilon=1280 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Gill e von Hippel, 1989). O peptídeo marcado com TOAC também foi quantificado por RPE, utilizando-se como padrão o nitróxido TEMPOL (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidinil-1-oxil, Barr *et al.*, 1996). O tampão utilizado nos estudos de pH e micelas foi fosfato-borato-citrato (PBC) 5,0 mM, no pH desejado. Nos estudos em presença de íons metálicos, titulação com cloreto de sódio e titulação com SUVs, foi utilizada água deionizada, ajustando-se o pH para o valor desejado com pHmetros Metrohm 654 e Mettler-Toledo 320.

3.2.2. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE) (SCHREIER, 1979)

A RPE é uma técnica espectroscópica que depende da presença de espécies contendo pelo menos um elétron desemparelhado (espécies paramagnéticas). A técnica se baseia na aplicação de um campo magnético, H , sob a ação do qual os níveis de energia do momento magnético de spin (m_s) se tornam divergentes (figura 07, Carrington e McLachlan, 1967; Wertz e Bolton, 1972). No caso de um elétron desemparelhado, se for aplicada a energia adequada ($h\nu$, figura 07), é possível induzir a transição entre os dois níveis ($m_s = -\frac{1}{2}$ e $m_s = +\frac{1}{2}$). Essa absorção de energia vai gerar um espectro, normalmente registrado como derivada primeira da absorção (figura 07).

A condição necessária para que ocorra a transição entre os dois níveis é dada pela equação

$$h\nu = g\beta H \quad (1)$$

onde h é a constante de Planck ($6,62 \times 10^{-27}$ erg.s), ν é a frequência da radiação incidente, g é um fator característico do elétron ($g = 2,0023$ para o elétron livre), β é o magneton de Bohr ($\beta = 9,27408 \times 10^{-21}$ erg.G⁻¹) e H é o campo magnético aplicado. Quando se emprega o espectrômetro de banda X, o campo aplicado é de cerca de 3 kG e a frequência de microondas é de cerca de 9 GHz. Geralmente, o registro do espectro é feito como a primeira derivada do espectro de absorção.

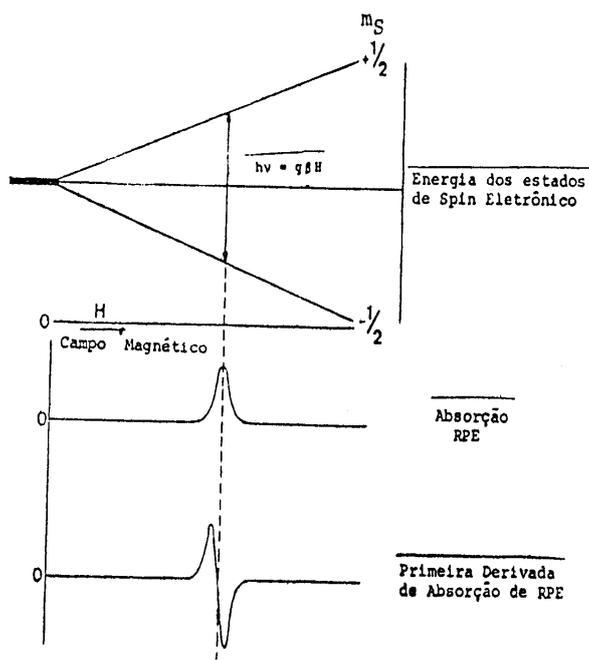


Figura 07. Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico em presença de um campo magnético. Os espectros de RPE registram, em geral, a derivada primeira da absorção (Schreier, 1979).

3.2.2.1. ESPECTROS DE RPE DE NITRÓXIDOS (SCHREIER, 1979)

A energética de transições envolvendo o momento magnético de spin pode ser representada através da hamiltoniana de spin, a qual é expressa pela equação (2),

$$\mathcal{H} = \beta_e \cdot \bar{H} \cdot \bar{g} \cdot \hat{S} + \hat{S} \cdot \bar{T} \cdot \hat{I} - \beta_N \cdot \bar{H} \cdot \bar{g}_N \cdot \hat{I} + \mathcal{H}_{troca} + \mathcal{H}_{dipolo} \quad (2)$$

onde o primeiro termo representa a interação eletrônica de tipo Zeeman, o segundo, a interação hiperfina (spin eletrônico-spin nuclear), o terceiro, a interação entre o spin nuclear e o campo magnético (que é desprezível nas condições normais do experimento de RPE) e \mathcal{H}_{troca} e \mathcal{H}_{dipolo} representam as energias envolvidas em interações entre elétrons livres, que ocorrem em bi- ou poli-radicais ou em concentrações elevadas de mono-radicais e também entre radicais e íons metálicos paramagnéticos. \mathcal{H}_{troca} depende da interpenetração dos orbitais das espécies

paramagnéticas, e $\mathcal{H}_{\text{dipolo}}$ depende da geometria do sistema, uma vez que envolve uma dependência angular (Wertz e Bolton, 1972). Na equação (2), H é o vetor do campo magnético, β_e e β_N são os magnetons de Bohr eletrônico e nuclear, respectivamente, g_N é o fator de desdobramento nuclear Zeeman, g é o tensor g do elétron, S é o operador de momento angular do spin do elétron, \hat{I} é o operador de momento angular de spin nuclear e T (ou A) é o tensor de desdobramento hiperfino.

Em radicais nitróxido, a maior parte da densidade eletrônica está localizada no átomo de nitrogênio. O isótopo mais abundante do nitrogênio, ^{14}N , possui spin nuclear I igual a 1, apresentando, na presença de um campo magnético, três valores para o momento magnético de spin nuclear ($M_I = -1, 0, +1$). A interação entre o spin nuclear e o spin eletrônico dá origem ao desdobramento hiperfino (segundo termo da equação 2), causando o desdobramento de cada nível energético de spin eletrônico em três (figura 08). Portanto, na ausência de interações spin eletrônico-spin eletrônico ($\mathcal{H}_{\text{troca}}$ e $\mathcal{H}_{\text{dipolo}} = 0$), podem-se observar três transições, uma vez que somente transições com $\Delta M_I = 0$ são permitidas. A separação entre as linhas é o desdobramento hiperfino (a_N).

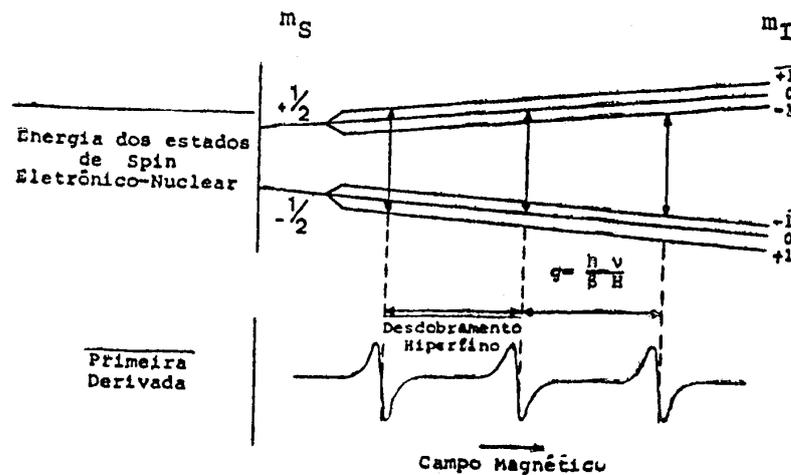


Figura 08. Desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico para um átomo com spin nuclear ($I=1$). A separação entre as linhas espectrais mede o desdobramento hiperfino (Schreier, 1979).

3.2.2.2. DEPENDÊNCIA DOS ESPECTROS DE RPE DA MOBILIDADE (SCHREIER, 1979)

Espectros de RPE de radicais nitróxido dependem da orientação dos eixos principais (x, y e z) em relação ao campo magnético aplicado. O sistema de coordenadas convencionalmente atribuído ao radical nitróxido está representado na figura 09, onde o eixo x coincide com a direção da ligação N–O e o eixo z com a orbital $2p\pi$ do nitrogênio onde há maior probabilidade da presença do elétron desemparelhado.

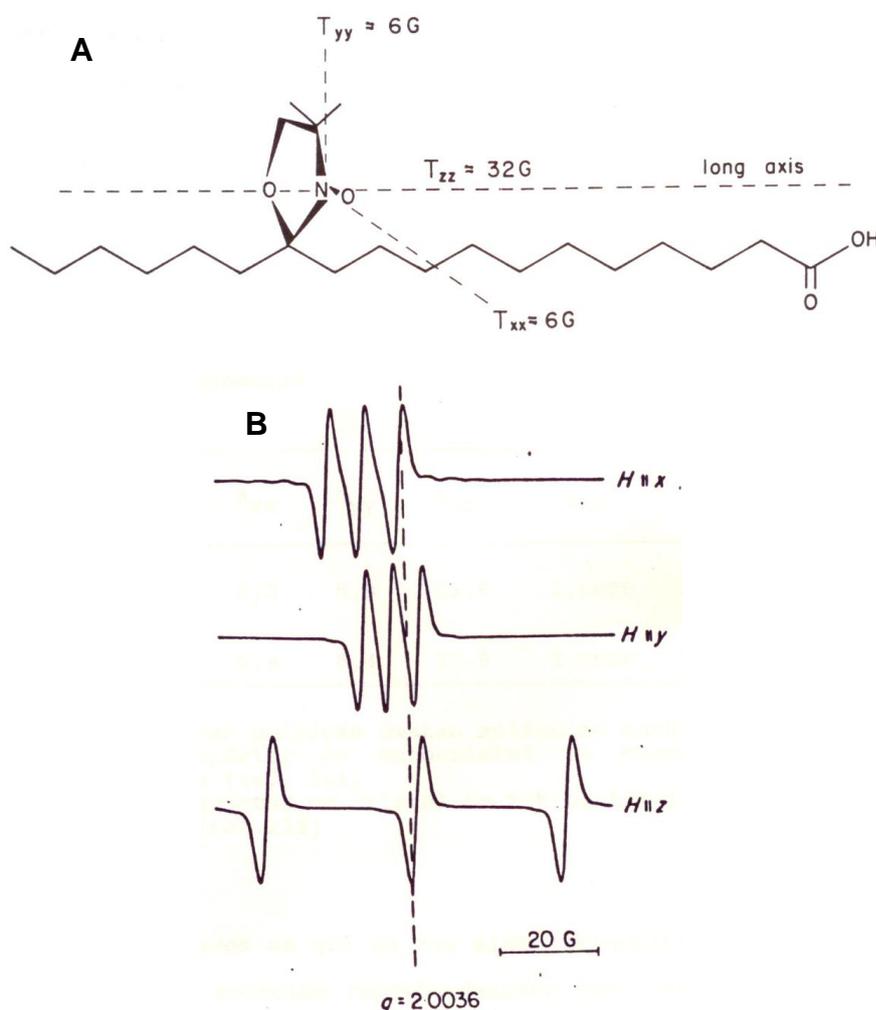
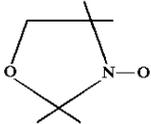


Figura 09. Sistema de coordenadas convencionalmente atribuídas ao radical nitróxido (A) e espectros do radical di-t-butil nitróxido incluído em um monocristal diamagnético de tetrametil-1,3-ciclobutadiona (B). Os espectros foram obtidos para a direção do campo magnético paralela aos eixos x (a), y (b), e z (c) do nitróxido (Griffith e Waggoner, 1969)

Moléculas esféricas em fluidos isotrópicos em geral possuem movimento isotrópico caracterizado por um tempo de correlação rotacional, τ . Se o movimento é

rápido na escala de tempo do RPE ($\tau < 10^{-9}$ s), o espectro de um marcador de spin apresentará valores de g e de desdobramento hiperfino (a_N) que são as médias dos valores dos componentes principais (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} e A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} , respectivamente). No caso de nitróxidos, o valor de desdobramento hiperfino é máximo na direção do eixo z pois é onde se encontra a maior parte da densidade eletrônica do elétron desemparelhado, e mínimo nas direções x e y . Por outro lado, o valor de g é máximo na direção x e mínimo nas direções y e z . Os valores desses tensores, determinados para dois marcadores de spin estão na tabela IV.

Tabela IV. Principais valores dos tensores de desdobramento hiperfino e g de nitróxidos orientados em cristais diamagnéticos.

Nitróxido	Cristal diamagnético	A_{xx} (G)	A_{yy} (G)	A_{zz} (G)	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}
CSL ^a	Cloreto de colestera (Gaffney e McConnell, 1974)	6,3	5,9	31,9	2,0090	2,0060	2,0024
	Tetrametil-1,3-ciclobutanodiona (Griffith <i>et al.</i> , 1965)	5,9	5,4	32,9	2,0088	2,0058	2,0022

^aCSL: 3-doxil-5 α -colestano.

A velocidade do movimento determina a largura das linhas espectrais. Estas são estreitas para movimentos rápidos e vão se alargando à medida que o movimento se torna mais lento (figura 10). Quando o alargamento das linhas espectrais é devido à diminuição da velocidade de tombamento da molécula, este ocorre de forma diferencial, na seguinte ordem: linha central < linha de campo baixo < linha de campo alto, para espectros obtidos em banda X (figura 10). Quando a frequência do movimento se torna comparável à diferença entre os valores principais de T ou g (medidos em unidades de frequência), obtém-se linhas de formas mais

complexas. Quando o movimento molecular é lento na escala de tempo do aparelho ($\tau > 3 \times 10^{-8}$ s), cada molécula contribui com um espectro individual, obtendo-se espectros chamados de pó, que representam a soma de todas as orientações em relação ao campo magnético.

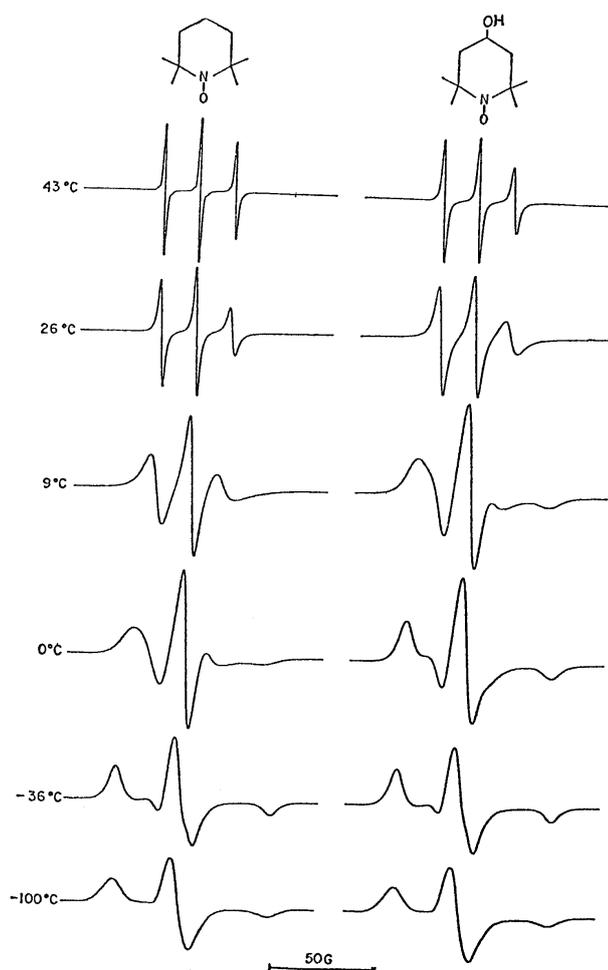


Figura 10. Espectros dos marcadores de spin TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-N-oxil-piperidina, à direita) e TEMPOL (2,2,6,6-tetrametil-4-hidroxi-N-oxil-piperidina, à esquerda) em glicerol a diferentes temperaturas. Os espectros a -36°C e -100°C correspondem a espectros de pó. (Jost et al., 1971)

A partir das medidas das alturas e das larguras das linhas espectrais, pode-se obter o tempo de correlação rotacional (τ). A teoria para o cálculo de τ foi desenvolvida por Kivelson (1960) e Fred & Fraenkel (1963) e gera dois valores de τ

(τ_B e τ_C), sendo obtidos de duas expressões distintas aplicáveis a movimentos rápidos e isotrópicos ($5 \times 10^{-11} < \tau < 3 \times 10^{-9}$ s) (Kivelson, 1960), equações (3) e (4),

$$\tau_B = -1,27 \times 10^{-9} \frac{W_0}{2} \left[\left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} \right) - \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} \right) \right] \quad (3)$$

$$\tau_C = 1,19 \times 10^{-9} \frac{W_0}{2} \left[\left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} \right) + \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} \right) - 2 \right] \quad (4)$$

onde W_0 é a largura pico a pico da linha de campo central e h_n as alturas dos picos (figura 11).



Figura 11. Espectro da TOAC⁰-Hst-5 em tampão PBC 5,0 mM, pH 5,0, mostrando as alturas dos picos de campo baixo (h_{+1}), central (h_0) e alto (h_{-1}).

O parâmetro h_0/h_{-1} , calculado a partir das alturas das linhas de campo central, h_0 , e de campo alto, h_{-1} , (figura 11), é um parâmetro empírico utilizado para analisar os espectros (Schreier *et al.*, 1984). Em espectros correspondentes a movimento isotrópico e rápido na escala de tempo do aparelho, os valores de h_0/h_{-1} ou h_0/h_{+1} são proporcionais ao tempo de correlação rotacional; quanto mais lento o tombamento da molécula, mais altos esses valores, devido ao alargamento diferencial das linhas espectrais, como descrito acima.

Valores de a_N , também utilizados neste trabalho, são sensíveis à polaridade do meio, aumentando com o aumento da polaridade (Schreier *et al.*, 2004).

3.2.2.3. MOVIMENTO ANISOTRÓPICO EM BICAMADAS LIPÍDICAS (SCHREIER *ET AL.*, 1978A, SCHREIER, 1979)

Uma molécula de marcador de spin intercalado em membranas, usualmente de natureza lipídica, tende a orientar-se preferencialmente com o eixo longo molecular paralelo à normal à bicamada lipídica (Griffith e Jost, 1976). Dependendo da estrutura da molécula, esse eixo pode ser aproximadamente paralelo aos eixos x, y, ou z do nitróxido. A forma das linhas espectrais e sua posição no campo podem ser calculadas assumindo-se um modelo que descreva o grau de orientação e movimento da molécula no meio onde se encontra (figura 12).

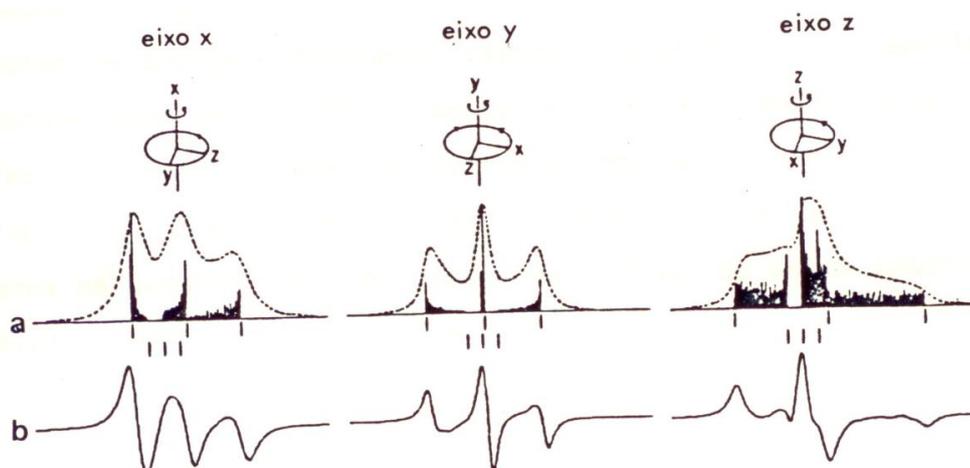


Figura 12. Forma teórica das linhas espectrais de 2-doxil propano de acordo com a rotação rápida em torno dos eixos longos moleculares. Em (A) espectros de baguetas e de absorção e (B), espectros de primeira derivada correspondentes. (Griffith e Jost, 1976)

O parâmetro de ordem (S) é uma medida da orientação molecular em relação a um eixo de referência. Em estudos com bicamadas, o eixo de referência é tomado como a normal à bicamada (Gaffney e McConnell, 1974; Schreier *et al.*, 1978a).

Para moléculas que descrevem movimentos perfeitamente isotrópicos, o parâmetro de ordem será igual a zero, e, de uma forma análoga, para uma molécula

perfeitamente orientada, $S = 1$. Em casos intermediários, S é correlacionado à amplitude angular do movimento anisotrópico da molécula na bicamada (figura 13).

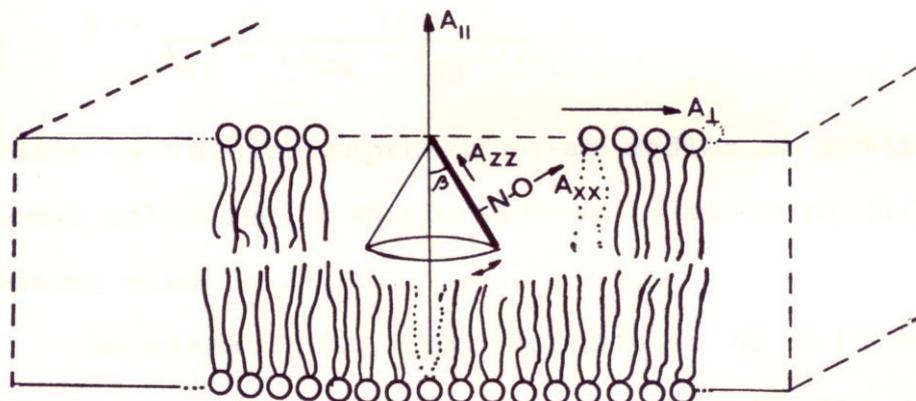


Figura 13. Movimento anisotrópico de um marcador de spin intercalado na região lipídica da membrana. A direção $A_{||}$ é paralela à normal à superfície da bicamada lipídica.

Para o cálculo de S a partir do espectro de um marcador de spin intercalado em membranas, é necessária a obtenção de espectros com o campo magnético orientado paralelamente (0°) e perpendicularmente (90°) à normal à bicamada lipídica. Dessa forma, são obtidos os desdobramentos hiperfinos paralelo e perpendicular ($A_{||}$ e A_{\perp} , respectivamente), que são empregados para calcular o parâmetro de ordem (Seelig, 1970; Hubbell e McConnell, 1971).

No caso de um marcador de spin com o eixo longo molecular orientado paralelamente à normal à bicamada, onde o eixo longo molecular coincide aproximadamente com a direção do componente principal do tensor hiperfino A_{zz} , e o movimento ao redor desse eixo é rápido na escala de tempo do experimento, o parâmetro de ordem é dado por

$$S = [(A_{||} - A_{\perp}) / A_{zz} - (A_{xx} + A_{yy}) / 2] \quad (5)$$

onde A_{xx} , A_{yy} , e A_{zz} representam os valores principais do tensor hiperfino e $A_{||}$ e A_{\perp} são, respectivamente, os valores de desdobramento hiperfino medidos no espectro para os marcadores com o eixo longo molecular aproximadamente paralelo e perpendicular ao campo magnético. Se o movimento ao redor do eixo longo

molecular for rápido na escala de tempo do aparelho, existe simetria cilíndrica ao redor desse eixo e o valor do desdobramento hiperfino no plano da membrana corresponde à média dos valores de desdobramento hiperfino dos componentes principais paralelos a esse plano, no caso $(A_{xx} + A_{yy}) / 2$.

O espectro de marcadores de spin em dispersões lipídicas é uma somatória dos espectros de todas as orientações possíveis do eixo longo molecular em relação ao campo magnético aplicado. Apesar da existência de uma distribuição isotrópica de lipídios, o espectro resultante é dependente da ordem local na bicamada e reflete a orientação de cada molécula. Esse espectro resultante nem sempre permite o cálculo de S. (Schreier *et al.*, 1978a).

Hubbell e McConnell (1971) mostraram que os espectros de alguns marcadores de spin apresentam pontos dos quais é possível extrair $A_{//}$ (extremos externos) e A_{\perp} (extremos internos, figura 14), permitindo o cálculo de S a partir da equação (5).

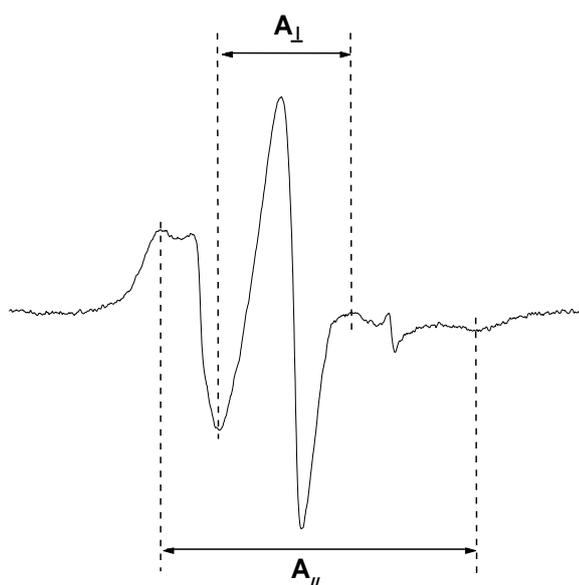


Figura 14. Espectro de RPE de TOAC⁰-Hst-5 45 μ M em tampão PBC 5 mM, pH 3,5, na presença de 9 mM de MLV (PE:POPG:CL, 80:15:5), mostrando os extremos externos ($A_{//}$) e internos (A_{\perp}), utilizados no cálculo de S.

3.2.2.4. INTERAÇÃO SPIN-SPIN ENTRE NITRÓXIDOS E ÍONS METÁLICOS PARAMAGNÉTICOS

Como mencionado acima, interações spin-spin podem afetar os espectros de RPE de espécies paramagnéticas. Essas interações podem ser de troca ou dipolares.

No primeiro caso não existe uma dependência angular, sendo a interação determinada pela interpenetração das orbitais contendo os elétrons desemparelhados dos dois sistemas envolvidos, que podem ser a mesma espécie (nitroxido-nitroxido) ou duas espécies diferentes (nitroxido-íon metálico, por exemplo). Essa interação aumenta com o aumento da concentração (aumento na frequência de colisões e conseqüente aumento da frequência de troca) e com o aumento da temperatura (Scandella *et al.*, 1972).

A interação dipolar apresenta uma dependência angular com o campo magnético. Essa interação foi observada em um estudo da enzima creatina quinase de músculo de coelho, onde grupamentos sulfidrilos foram marcados covalentemente com um grupamento nitroxido, tendo ocorrido a interação spin-spin quando foi adicionado ATP contendo o íon paramagnético Mn^{2+} no lugar de Mg^{2+} (Taylor *et al.*, 1969). Observou-se perda da amplitude do espectro, mas o espectro remanescente mantinha a mesma forma das linhas espectrais. Esse resultado foi analisado teoricamente por Leigh (1970), que mostrou que o fenômeno é devido à interação dipolar entre o íon e o grupamento nitroxido e ocorre quando ambos os centros estão relativamente fixos. Nesse caso, a largura das linhas espectrais é dada por:

$$\delta H_{obs} = C(1 - 3\cos^2 \theta)^2 + \delta H_0 \quad (6),$$

onde δH_{obs} e δH_0 são, respectivamente, as larguras da linha na presença e na ausência do íon, θ é o ângulo formado pelo vetor que une as duas espécies e o

campo magnético, e C é o coeficiente de interação dipolar e que se relaciona com a distância r entre as duas espécies de acordo com a equação 7:

$$C = g\beta\mu^2T_1 / r^6\hbar \quad (7)$$

onde g e β são, respectivamente, o fator g e o magneton de Bohr do elétron desemparelhado do nitróxido, μ é o momento magnético efetivo do dipolo, T_1 é o tempo de relaxação spin-rede do metal e \hbar é a constante de Planck.

De acordo com a teoria de Leigh, no caso de valores altos de C , o primeiro termo da equação 6 prevalece e ocorre o alargamento do espectro, de forma que ele deixa de ser detectado. O espectro remanescente é aquele em que o primeiro termo é igual a zero (o que ocorre quando $\theta = 54,73^\circ$ (portanto, $\cos^2 \theta = 1/3$), valor chamado de ângulo mágico) ou muito pequeno (valores de θ próximos do ângulo mágico). Por esse motivo, o espectro remanescente mantém a forma das linhas do espectro obtido na ausência do íon paramagnético.

A equação 7 mostra que, quanto menor a distância entre as duas espécies, maior o valor de C . Leigh derivou uma curva que descreve a variação da amplitude em função de $C / \delta H_0$ (figura 15).

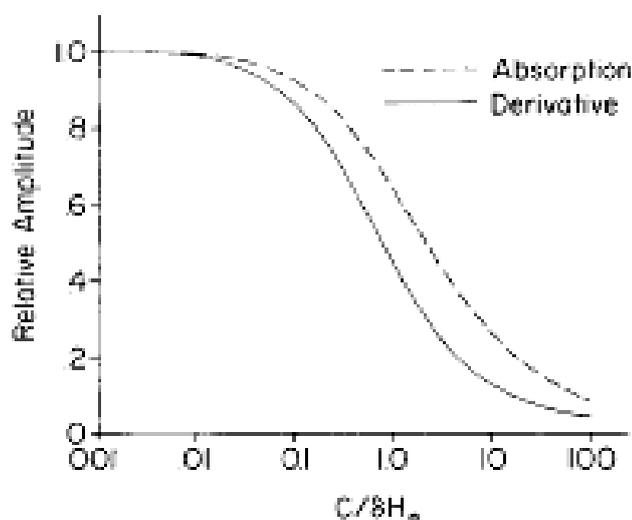


Figura 15. Derivação da curva de amplitude em função da largura de linha na ausência de íon (Leigh, 1970).

3.2.2.5. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE RPE

Os espectros de RPE foram adquiridos em espectrômetro Bruker EMX-200, interfaciado com um microcomputador, a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. As amostras foram colocadas em celas chatas de quartzo, para soluções aquosas (Wilmad, New Jersey, EUA). A concentração dos peptídeos nas amostras foi da ordem de 5×10^{-5} M. Foram empregadas freqüências da ordem de 9,9 GHz. Para os espectros de TOAC⁰-Hst-5, o campo varrido foi de 100 G, a amplitude de modulação foi de 1,0 G (inferior à largura das linhas espectrais), foram empregadas constantes de tempo da ordem de 300 ms, tais que a largura das linhas espectrais fosse percorrida em tempos equivalentes a, no mínimo, 10 constantes de tempo, e, em cada caso, foi efetuado o número de varreduras necessárias para se obter espectros com relação sinal/ruído suficientemente alta para uma análise adequada. Nos estudos com o metal paramagnético Mn^{2+} , o campo varrido foi de 1000 G, a amplitude de modulação utilizada foi de 10,0 G, as constantes de tempo foram da ordem de 300 ms, e o número de varreduras foi o necessário para obter espectros com alta relação sinal/ruído. As integrais dos espectros, as alturas e as larguras das linhas foram obtidas utilizando-se o programa WINEPR, da Bruker.

3.2.3. DICROÍSMO CIRCULAR (CD) (WOODY, 1996)

A técnica de CD detecta a atividade óptica de moléculas quirais originada pela interação de centros assimétricos com a luz circularmente polarizada (figura 16). Este fenômeno é representado pela diferença de absorção entre a luz polarizada à direita e à esquerda, resultando em luz elipticamente polarizada. 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.

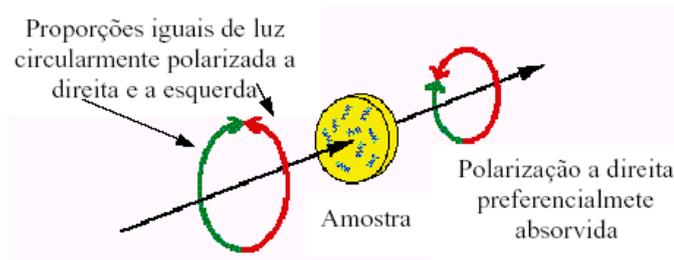


Figura 16. Representação esquemática do fenômeno de dicroísmo circular.

A informação obtida a partir dos espectros de CD é a elipticidade:

$$\theta = 2,303 \cdot (A_E - A_D) \cdot \frac{180}{4\pi} \quad (8)$$

onde A_E e A_D são, respectivamente, absorvância da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita.

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 (figura 17). Os ângulos específicos ϕ e Ψ são os responsáveis pelo espectro de CD característico das estruturas secundárias, α -hélice, folha β paralela e anti-paralela, 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.

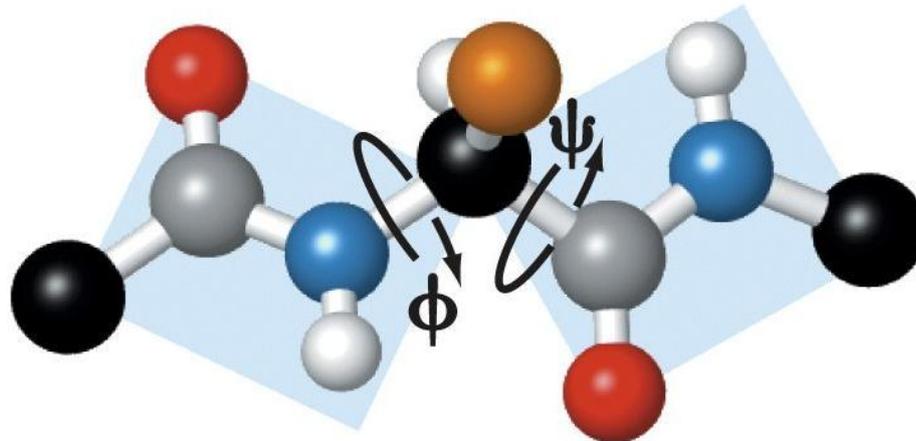


Figura 17. Representação esquemática de ligação peptídica, evidenciando os ângulos ϕ e ψ . Em vermelho, estão representados os átomos de oxigênio; em azul, átomos de nitrogênio; em cinza claro, átomos de hidrogênio; em preto, os carbonos α do aminoácido; em cinza escuro, os átomos de carbono do C-terminal do aminoácido, e em laranja, está representada a cadeia lateral do aminoácido.

Quando a proteína está enovelada, o arranjo tridimensional dos cromóforos afeta a estrutura eletrônica e, em consequência, o espectro da proteína ou peptídeo. Para 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 negativa $n \rightarrow \pi^*$ centrada em 215 nm e uma banda positiva $\pi \rightarrow \pi^*$ 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 (banda positiva), e $\pi \rightarrow \pi^*$ (\parallel) centrada em 208 nm (banda negativa). A transição $n \rightarrow \pi^*$ é deslocada para menor energia, centrada em 222 nm (banda negativa). A figura 18 apresenta espectros característicos de CD das estruturas secundárias acima mencionadas.

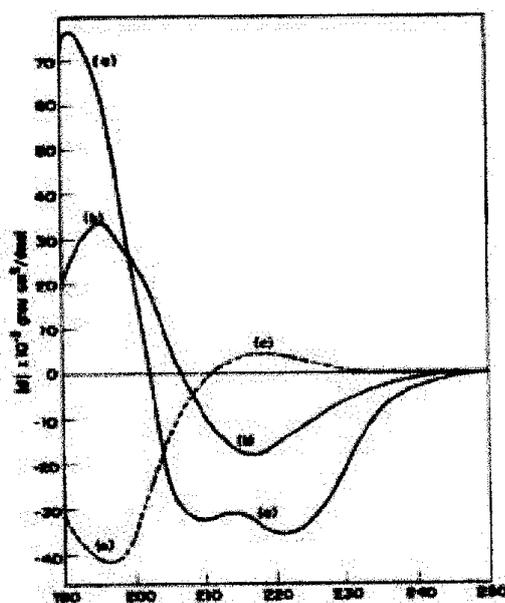


Figura 18. Espectros de CD da poli(Lys) em α -hélice (a), folha β anti-paralela (b) e ao acaso (c) (Greenfield e Fasman, 1969).

3.2.3.1. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE CD

Os espectros foram adquiridos a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, nos espectrômetros Jobin-Yvon CD-6 ou Jasco J-720, em celas de 0,2 e 0,5 mm de caminho óptico para os experimentos em solução ou na presença de micelas, e celas de 1,0 mm de caminho óptico, para os experimentos com SUVs, em concentrações especificadas no item 4. Foram realizados 8 espectros acumulativos de cada amostra, e dos espectros resultantes era subtraído o espectro do tampão. Esses espectros foram submetidos ao processo de filtragem pelo programa J-Y, da Jobin-Yvon ou pelo programa Spectra Analysis, da Jasco, de forma a eliminar a interferência do ruído gerado durante a aquisição. O comprimento de onda variou de 190 a 260 nm, com tempo de integração de 1s e fenda de 2 nm. A calibração dos aparelhos foi efetuada com ácido d-10-canforsulfônico (CSA) e isoandrosterona (Chen e Yang, 1977).

A porcentagem de α -hélice foi calculada através de três métodos diferentes:

1. Equação de Chen *et al.* (1974):

$$[\theta]_{\lambda} = (f_H - ik/N) [\theta]_{H^{\infty}} \quad (9)$$

onde $[\theta]_{\lambda}$ é a elipticidade molar residual no comprimento de onda λ , $[\theta]_{H^{\infty}}$ é o máximo de elipticidade molar residual para uma hélice de tamanho infinito, f_H é a fração de hélice na molécula, i corresponde ao número de segmentos helicoidais, N é o número de resíduos de aminoácidos do peptídeo e k é uma constante que depende de λ , e equivale a 2,57 em 222 nm.

2. Equação de Rohl et al. (1998):

$$[\theta]_{222} = [f_H \theta_H (f_H - x/N_r)] + [(1 - f_H) \theta_C] \quad (10)$$

onde $\theta_C = 640 - 45T$, $\theta_H = 42500 + 125T$; sendo que T é a temperatura em °C; θ_C e θ_H correspondem, respectivamente, ao valor de elipticidade molar residual para um peptídeo de tamanho infinito ao acaso e completamente helicoidal; x é o parâmetro de correção para o tamanho da cadeia, que equivale a 3 neste caso e N é o número de resíduos do peptídeo.

3. Utilizando o algoritmo k2d, disponível em <http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/> (Andrade *et al.*, 1993 e Merelo *et al.*, 1994).

3.2.4. FLUORESCÊNCIA (LAKOWICZ, 1999)

O fenômeno da fluorescência é observado quando um elétron retorna do estado singlete excitado (S_1), de maior energia, para o estado singlete fundamental, de menor energia (S_0), resultando na emissão de um fóton.

Substâncias que apresentam fluorescência significativa geralmente possuem elétrons deslocalizados em ligações duplas conjugadas. Ao se incidir um feixe de luz, o fluoróforo absorve o quantum de energia adequado no nível de energia eletrônica S_0 , resultando na promoção instantânea (10^{-15} s) para níveis eletrônicos de maior energia S_1 ou S_2 . Com raras exceções, moléculas em fases condensadas,

como em solução aquosa, rapidamente relaxam para o nível de energia vibracional mais baixo em S_1 . Este processo é chamado de conversão interna e ocorre em torno de 10^{-12} s. A volta ao estado fundamental ocorre a partir daí para vários níveis vibracionais de S_0 , em um tempo da ordem de 10^{-9} s. Outros processos podem ocorrer, como decaimento não-radioativo, onde a molécula relaxa para o estado fundamental sem emitir fótons. Durante essas transições não ocorre mudança do estado de spin do elétron. Contudo, moléculas no estado S_1 podem sofrer conversão para o primeiro estado tripleto (T_1), chamado de cruzamento entre sistemas. Por envolver mudança do estado de spin do elétron, a transição de T_1 para o nível fundamental S_0 é proibida, e como resultado a constante de velocidade para tal emissão tende a ser várias ordens de grandeza menor do que para fluorescência. A emissão a partir de T_1 é chamada de fosforescência e seus tempos de vida são da ordem de 10^{-6} s a mais de 1 s. Esses processos estão representados no diagrama de Jablonski (figura 19).

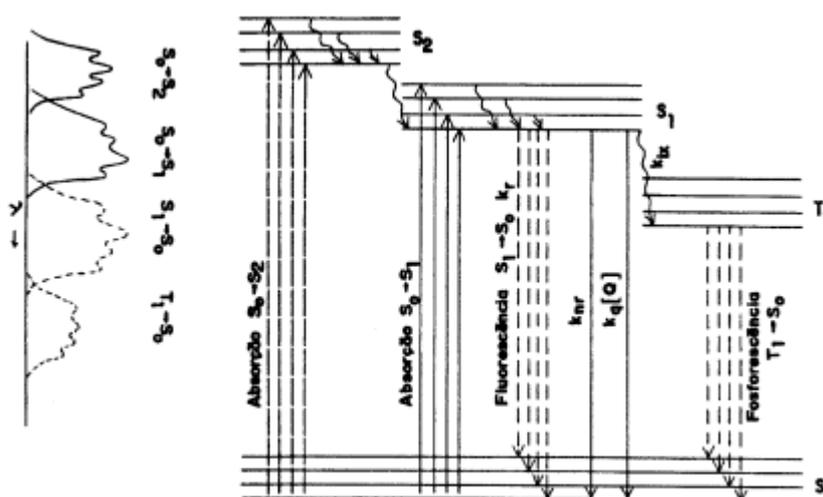


Figura 19. Diagrama de Jablonski para a absorção de fótons do estado eletrônico fundamental (S_0) para os estados singleto excitados (S_1 e S_2) e para a emissão de fótons dos estados excitados S_1 e T_1 . T_1 é o primeiro estado tripleto excitado. Espectros para as várias transições são apresentados a esquerda (Lakowicz, 1999).

A fluorescência de proteínas e peptídeos se origina dos resíduos aromáticos de Trp e Tyr. A Phe possui rendimento quântico muito baixo e por isso a emissão deste resíduo raramente é estudada. O rendimento quântico de um fluoróforo é definido pela razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos, sendo que a intensidade de fluorescência de um determinado fluoróforo é diretamente proporcional ao seu rendimento quântico. Geralmente, os experimentos de fluorescência de proteínas 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. Nessa região pode-se excitar também o tirosinato, que apresenta emissão em torno de 345 nm.

O pK_a do grupo hidroxila da Tyr é cerca de 10,5; contudo, este valor pode decrescer a 4,0 ou menos, ao excitar-se, e mesmo a ionização do estado fundamental pode ocorrer até em pH neutro. A emissão de tirosinato geralmente é fraca devido ao seu baixo rendimento quântico. Contudo, assim como no caso do Trp, a emissão do tirosinato pode servir como uma sonda para estudar o ambiente em torno da proteína.

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 de emissão. Assim, propriedades como comprimento de onda do máximo de emissão ($\lambda_{m\acute{a}x}$), rendimento quântico (ϕ_F), tempo de vida do estado excitado (τ_F), e propriedades de polarização podem ser utilizadas para caracterizar propriedades estruturais das proteínas. No caso do Trp, o valor de $\lambda_{m\acute{a}x}$ diminui e a intensidade de fluorescência aumenta com a diminuição da polaridade do ambiente. No caso da Tyr, $\lambda_{m\acute{a}x}$ é pouco sensível à polaridade,

mas a intensidade de fluorescência também aumenta com a diminuição da polaridade do ambiente.

3.2.4.1. SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA (LAKOWICZ, 1999)

A supressão da fluorescência refere-se a qualquer processo que resulte na diminuição da intensidade de fluorescência de uma dada substância, os quais incluem: reações no estado excitado, transferência de energia, formação de complexos, ou supressão estática, e supressão colisional, também chamada de supressão dinâmica. A supressão colisional da fluorescência é descrita pela equação de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (11)$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de supressor, k_q é a constante de supressão bimolecular e τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor, Q . $K_{SV} = k_q\tau_0$ é a constante de Stern-Volmer. O plote dos valores de F_0/F resulta numa reta, e o coeficiente angular dessa reta é igual à constante de Stern-Volmer.

3.2.4.2. SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA POR NITRÓXIDOS

O processo de supressão de fluorescência pode ocorrer em decorrência de vários processos, como a transferência de energia, rearranjos moleculares ou colisão entre moléculas (Lakowicz, 1999).

Marcadores de spin, por conterem o grupamento paramagnético nitróxido, também são eficientes supressores de fluorescência. Essa propriedade tem sido muito empregada para verificar a inserção de proteínas (Alvarez *et al.*, 2003) e peptídeos (Salinas *et al.*, 2002) em membranas lipídicas. Alterações conformacionais

de regiões contendo resíduos aromáticos podem ser detectadas pela variação do efeito do marcador sobre a fluorescência desses aminoácidos.

3.2.4.3. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA

Os estudos de fluorescência foram realizados em espectrofluorímetro Hitachi F-4500, interfaciado com microcomputador. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), e, para monitorar a fluorescência da Tyr, o comprimento de onda de excitação foi ajustado para 275 nm, e a emissão foi monitorada entre 285 nm e 400 nm. Para monitorar a emissão de fluorescência do tirosinato, o comprimento de onda de excitação foi ajustado para 292 nm, e a emissão de fluorescência foi monitorada entre 305 e 400 nm. A voltagem da fotomultiplicadora foi mantida em 700 V, e as fendas de excitação e emissão foram de 5 nm. Os espectros dos brancos foram subtraídos dos espectros das amostras, e os efeitos de diluição foram corrigidos. Os espectros foram analisados, e os dados convertidos em unidades de área pelo programa F-4500 da Hitachi. As celas utilizadas têm caminho óptico de 1 cm tanto para excitação como para emissão.

3.2.5. BICAMADAS LIPÍDICAS PLANAS (BLM)

A técnica de medida de condutância em BLM foi desenvolvida há mais de três décadas (Mueller *et al.*, 1963). As BLMs permitem a incorporação e investigação funcional de vários compostos formadores de canais iônicos e transportadores de íons (Tien *et al.*, 1999).

Com o emprego de BLM é possível estudar propriedades elétricas e fenômenos de transporte através de uma membrana separando dois compartimentos (Mueller *et al.*, 1963; Mirzabekov *et al.*, 1999).

Medidas de condutância em BLM são muito sensíveis, permitindo observar a corrente iônica fluindo através de canais unitários (*single channel*). Abertura e fechamento de canais unitários podem ser detectados, e modificações das propriedades do canal por voltagem, pH, composição iônica, e compostos químicos podem ser quantificadas. Os ensaios também apresentam especificidade, pois propriedades do canal, tais como condução iônica, tempo de residência, dependência da voltagem, e seletividade iônica podem servir para identificar um dado canal (Mirzabekov *et al.*, 1999). A técnica permite ainda obter informações sobre a interação de compostos com BLM planas através da mudança de outros parâmetros elétricos tais como capacitância (Vargas *et al.*, 2000) e potencial elétrico da membrana (Pohl *et al.*, 1998).

3.2.5.1. MEDIDAS ELÉTRICAS EM BLM

BLM foram preparadas a partir de ASO ou DPhPC. Os lipídios foram dissolvidos em n-decano resultando em uma solução 2.5%. BLM foram formadas através de um orifício de 0,2-1,0 mm num copo cilíndrico de polipropileno inserido numa câmara de acrílico. O copo separava dois compartimentos com soluções denominadas *cis* e *trans* (Mueller *et al.*, 1963), preenchidos com PBC 5 mM, KCl 100 mM, no pH desejado. Os peptídeos, dissolvidos em tampão PBC 5,0 mM no pH desejado, foram adicionados ao compartimento *cis*. Esse compartimento era mantido aterrado (0 mV), e o compartimento *trans* era submetido a uma série de valores de tensão. O sinal do potencial de membrana diz respeito ao compartimento *trans*.

3.2.6. PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS MODELO

A concentração das soluções estoque dos fosfolipídios foi determinada através da dosagem de fosfato inorgânico (Rouser *et al.*, 1970), após hidrólise dos fosfolipídios com ácido perclórico 70% por uma hora a 180°C. Filmes lipídicos na composição desejada foram obtidos evaporando-se volumes adequados de soluções estoque em clorofórmio e mantidos sob vácuo por pelo menos 2 h. Os filmes foram ressuspensos no tampão desejado, através de agitação vigorosa por 10 minutos. Vesículas unilamelares pequenas (*small unilamellar vesicles*, SUV) foram obtidas sonicando-se a ressuspensão lipídica em 20 ciclos de 1 minuto de sonicação por 1 minuto de descanso, sob fluxo de N₂ e em banho de água e gelo. Obtidas as vesículas, estas foram mantidas em gelo e utilizadas no mesmo dia. Vesículas multilamelares (MLV) utilizadas nos estudos de RPE foram obtidas ressuspendendo-se o filme lipídico com tampão PBC 5 mM, pH 5,0, com o peptídeo TOAC⁰-Hst-5 45 μM.

As soluções estoque de LPC e LPG foram preparadas dissolvendo-se uma massa conhecida de detergente em volume adequado de tampão PBC 5 mM, no pH desejado.

3.2.7. PERMEABILIZAÇÃO DE VESÍCULAS

Os estudos de permeabilização de vesículas foram realizados de acordo com Alvarez *et al.* (2003). Vesículas unilamelares grandes (*large unilamellar vesicles*, LUV) de POPG carregadas com o fluoróforo aquossolúvel CF foram obtidas evaporando-se volumes adequados de solução estoque do fosfolipídio em clorofórmio e mantendo-se o filme sob vácuo por pelo menos duas horas. O filme foi ressuspenso com solução 80 mM de CF, e extrudado por 33 vezes utilizando-se um

aparelho extrusor Lipofast, da Avestin, com membrana de policarbonato de poro de 100 nm de diâmetro. A CF livre na solução foi retirada passando-se a amostra por uma coluna de Sephadex G-50 (Aldrich Chemical Company Inc.) pré-equilibrada com tampão PBC 5 mM, em 145 mM NaCl, pH 7,4. O experimento baseia-se no fato de que a fluorescência da CF retida no compartimento aquoso interior das vesículas é auto-suprimida devido à alta concentração do fluoróforo. Ao ocorrer permeabilização da vesícula, a CF é liberada para o meio externo, com conseqüente diluição e aparecimento da fluorescência.

A porcentagem de permeabilização foi obtida através de medidas de fluorescência, excitando-se em 490 nm e lendo a emissão a 520 nm. Experimentos de vazamento foram realizados para diferentes concentrações de peptídeo. O máximo de vazamento (F_{max}) foi obtido lisando-se as LUV com 0,1% de Triton X-100. A porcentagem de CF liberada ($R_{\%}$), foi obtida através da equação:

$$R_{\%} = [(F_{fin} - F_{in}) / (F_{max} - F_{in})] \times 100 \quad (12)$$

onde F_{in} e F_{fin} são os valores de fluorescência inicial (antes da adição do peptídeo) e final (após a adição do peptídeo), respectivamente.

3.2.8. ENSAIO LÍQUIDO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO ANTIMICROBIANO.

A concentração inibitória mínima (MIC), ou seja, a concentração de peptídeo que mata ou inibe o crescimento de 100% das células foi realizada através de ensaio líquido de inibição de crescimento como descrito por Ehret-Sabatier *et al.* (1996). Diluições seriais do peptídeo são adicionados a 100 μ L de suspensão de *C. albicans* cepa MDM8 (10^7 UFC/mL) diluída 400 vezes em meio PDB (*potato-dextrose broth*) 12%, NaCl 0,5%, peptona 1% em uma placa de 96 poços. São feitos também poços controle negativo, onde encontra-se apenas o meio PDB, e controle positivo,

consistindo apenas de suspensão de fungos. A placa é incubada durante 12 h em estufa a 30°C, sob agitação constante e o crescimento fúngico é avaliado através de um leitor de ELISA (Labsystem iEMS Analyser), com comprimento de onda ajustado em 595 nm.

3.2.9. ENSAIO HEMOLÍTICO

O ensaio hemolítico foi realizado como descrito em Fázio et al., 1996. Foram coletadas aproximadamente 8 mL de sangue de doadores saudáveis em tubos heparinizados a vácuo. Logo, os tubos foram centrifugados em 4°C a 300x g por 5 minutos para separar os eritrócitos do plasma, o sobrenadante (plasma) foi retirado e descartado e o precipitado (eritrócitos) foram lavados 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS, 10 mM Na₂PO₄, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4; 313 mOsm/kg de água). O concentrado de eritrócitos foi suspenso em PBS e depois diluído até uma concentração de 0,44% em PBS. Posteriormente, 20 µL de peptídeo (diluídos em PBS serialmente, 0,19 - 50 µM) foram incubadas com 180 µL da suspensão 0,44% de eritrócitos em PBS a 37°C. Após 1 hora, as células foram centrifugadas por 5 min a 4°C, 300x g, e 50 µL do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e a leitura foi realizada em 405 nm. Como controle negativo foi usado tampão PBS e como controle positivo foi usado 0,1% SDS em PBS.

As porcentagens de hemólises foram calculadas usando a equação:

$$\% \text{ hemólise} = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{peptídeo}} - \text{Abs}_{\text{controle negativo}}}{\text{Abs}_{\text{controle positivo}} - \text{Abs}_{\text{controle negativo}}} \right] \quad (13)$$

onde $\text{Abs}_{\text{peptídeo}}$ é a absorção da amostra em diferentes concentrações de peptídeo, $\text{Abs}_{\text{controle negativo}}$ é a absorção do controle negativo, e $\text{Abs}_{\text{controle positivo}}$ é a absorção do controle positivo.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDOS CONFORMACIONAIS

Estudos conformacionais de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 empregando as técnicas de CD, fluorescência e RPE (esta última apenas para TOAC⁰-Hst-5) foram realizados em solução e em presença de membranas modelo.

Nos estudos em solução foram investigados os efeitos do pH, da adição do solvente indutor de estrutura secundária, TFE e da interação com íons metálicos (Zn²⁺, Cu²⁺ e Mn²⁺).

As membranas modelo empregadas consistiram de micelas e bicamadas lipídicas. Micelas foram preparadas com lisofosfolipídios com as seguintes composições: LPC (zwitteriônica), LPC:LPG (2:1, mol:mol, carga superficial negativa) e LPG (carga superficial negativa). Por razões que serão discutidas adiante, estudos com vesículas (bicamadas) foram apenas realizados com TOAC⁰-Hst-5, empregando RPE. As vesículas foram preparadas de forma a conter as principais cabeças polares de fosfolipídios e os esteróis encontrados em membranas de *Escherichia coli* (ePE:POPG:CL, 80:15:5) (van Voorst e de Kruijff, 2000), *Candida albicans* (POPC:ePE:bPS:PA: ERGO, 35:15:24:11:15) (Mishra *et al.*, 1992) e na face externa da membrana de eritrócitos (POPC:SM:ePE:COL, 26:22:7:45) (Owen *et al.*, 1982). As proporções estão dadas em moles %.

4.1.1. ESTUDOS EM SOLUÇÃO

4.1.1.1. EFEITO DO PH

A figura 20 mostra espectros de fluorescência de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 em diferentes pHs, obtidos excitando-se a forma fenólica ($\lambda_{exc}=275$ nm) e a forma fenolato ($\lambda_{exc}=292$ nm). Como esperado, vê-se que à medida que aumenta o pH do

meio, diminui a concentração da primeira e aumenta a concentração da segunda. A figura mostra ainda que a intensidade da fluorescência é maior para Hst-5 do que para TOAC⁰-Hst-5. Esse resultado deve-se à supressão parcial da fluorescência pelo grupamento paramagnético nitróxido presente na molécula.

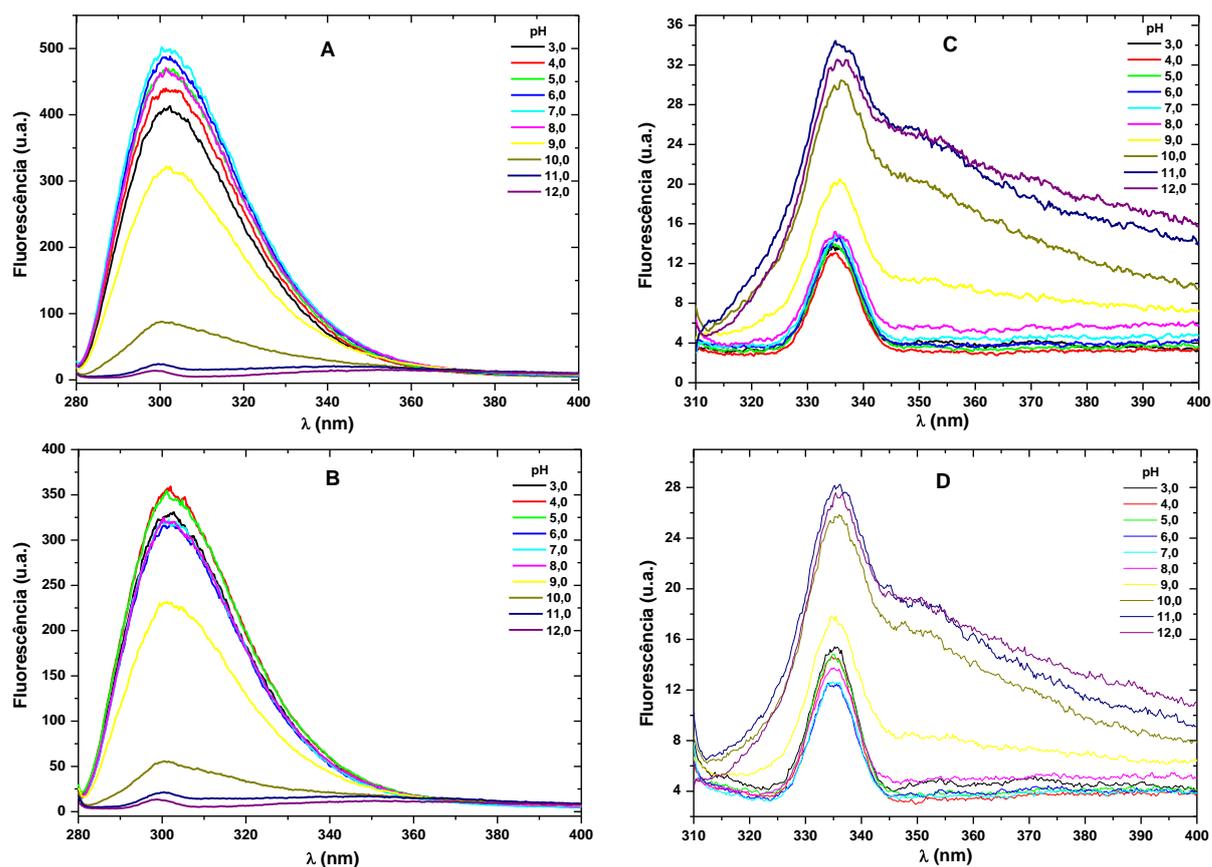


Figura 20. Espectros de fluorescência de Hst-5 23,2 μM (A,C) e TOAC⁰-Hst-5 23,0 μM (B,D) em função do pH, em tampão PBC 5,0 mM. λ_{exc}=275 nm (A,B) e λ_{exc}=292 nm (C,D).

Os resultados experimentais foram analisados comparando-se as variações observadas com a variação de carga formal dos peptídeos, calculada de acordo com os pKs dos aminoácidos, encontrados na literatura (Voet e Voet, 1995). Essa análise é mostrada nas figuras 21 e 22 para os resultados de fluorescência.

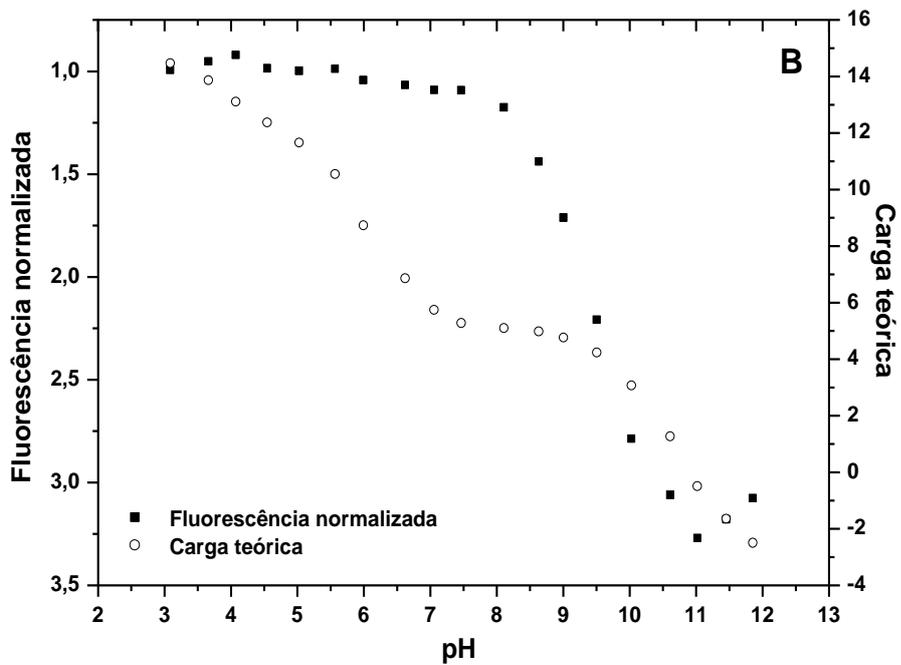
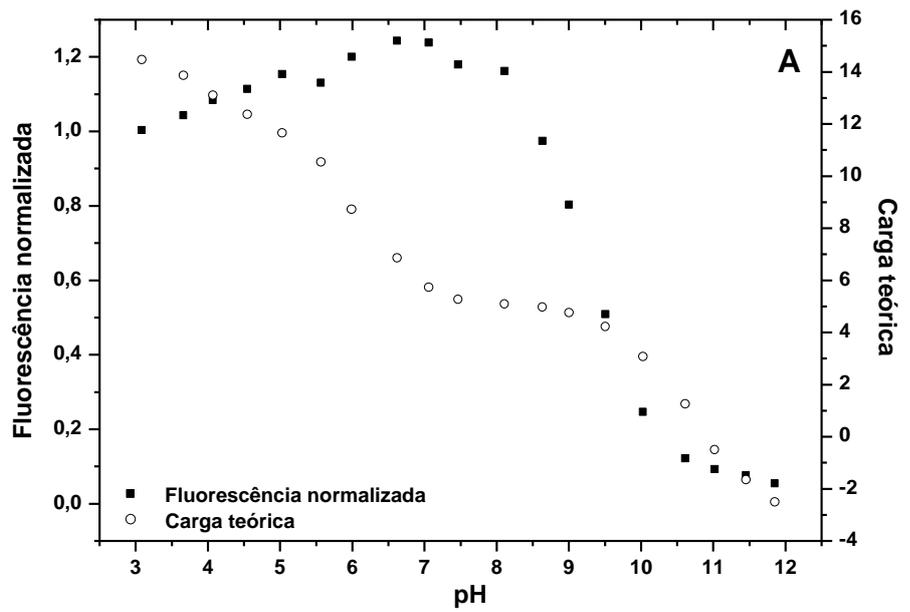


Figura 21. Fluorescência normalizada de Hst-5 em função do pH, tampão PBC 5,0 mM. $\lambda_{exc} = 275$ nm (A) e $\lambda_{exc} = 292$ nm (B).

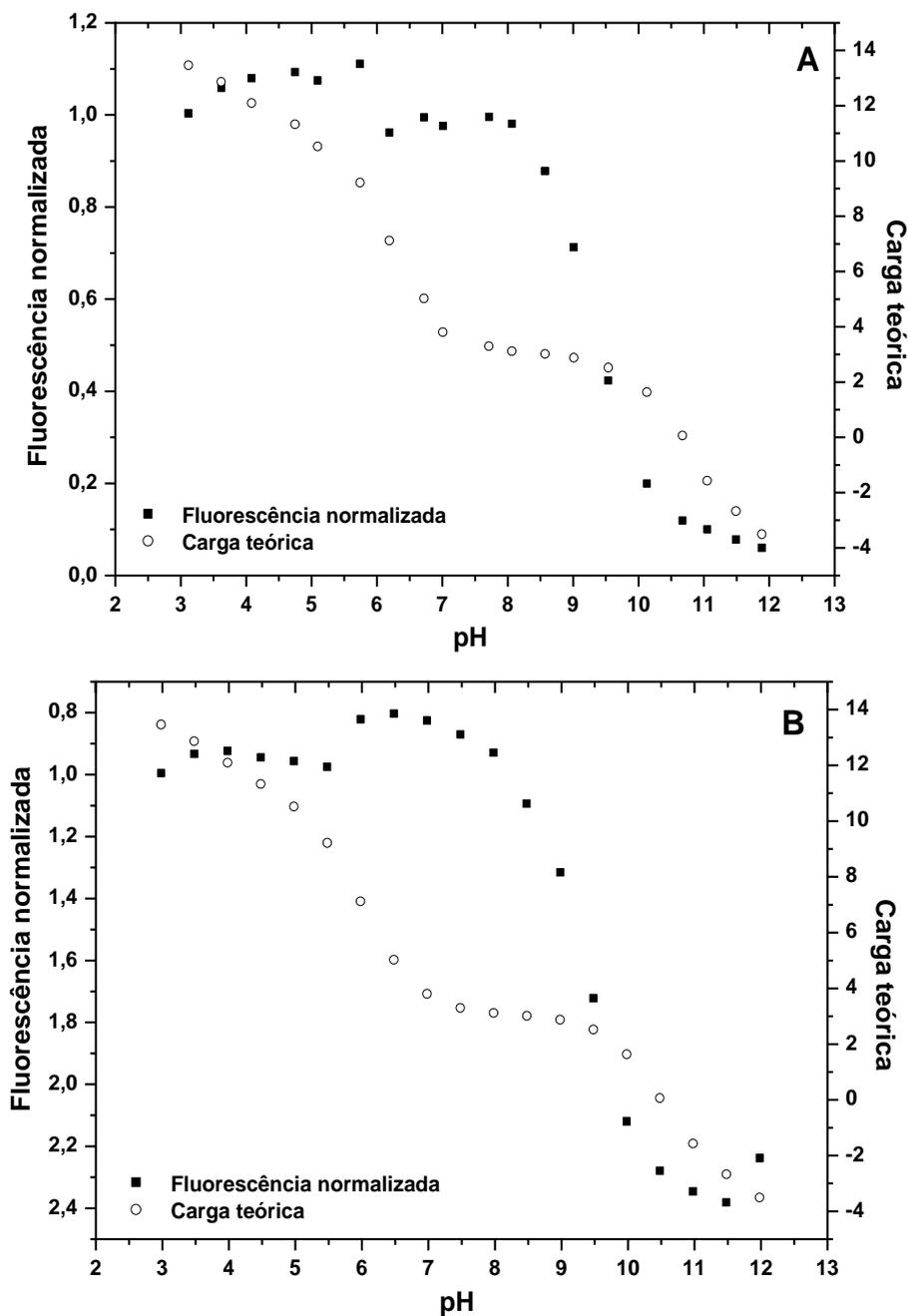


Figura 22. Fluorescência normalizada de TOAC⁰-Hst-5 em função do pH, em tampão PBC 5,0 mM. $\lambda_{exc}=275$ nm (A) e $\lambda_{exc}=292$ nm (B).

Ao realizar estudos espectroscópicos, é importante considerar a propriedade que está sendo monitorada. No caso dos estudos de fluorescência, observa-se a fluorescência dos resíduos de Tyr; por esse motivo, a titulação desses resíduos causa as maiores alterações espectrais. As alterações espectrais observadas podem refletir mudanças no microambiente, decorrentes da proximidade de outros resíduos

carregados no peptídeo, o que pode levar a alterações de pK. Deve-se considerar ainda que modificações de carga produzidas pela variação do pH podem resultar em flutuações conformacionais que também poderão se refletir em alterações espectrais.

A partir dos resultados experimentais, foram estimados os valores de pK dos resíduos de Tyr, sendo encontrados os valores de 9,4 para Hst-5 e 9,5 para TOAC⁰-Hst-5, ou seja, cerca de uma unidade abaixo do pK teórico de Tyr. Na figura 22 nota-se uma pequena inflexão da curva de titulação de TOAC⁰-Hst-5 que poderia refletir um pK=6,1, que poderia ser devido à desprotonação dos resíduos de His. Essa inflexão não aparece na titulação do peptídeo não marcado.

No caso de TOAC⁰-Hst-5, o efeito do pH foi também estudado empregando-se a técnica de RPE. A figura 23 mostra os espectros obtidos em função do pH, os quais apresentam linhas estreitas, indicando que a molécula tomba rapidamente na escala de tempo do aparelho. Quando comparado ao espectro de TOAC livre (figura 23F), nota-se que nesse último caso as linhas são mais estreitas, indicando que essa molécula tomba mais rapidamente, como esperado para uma molécula de peso molecular menor.

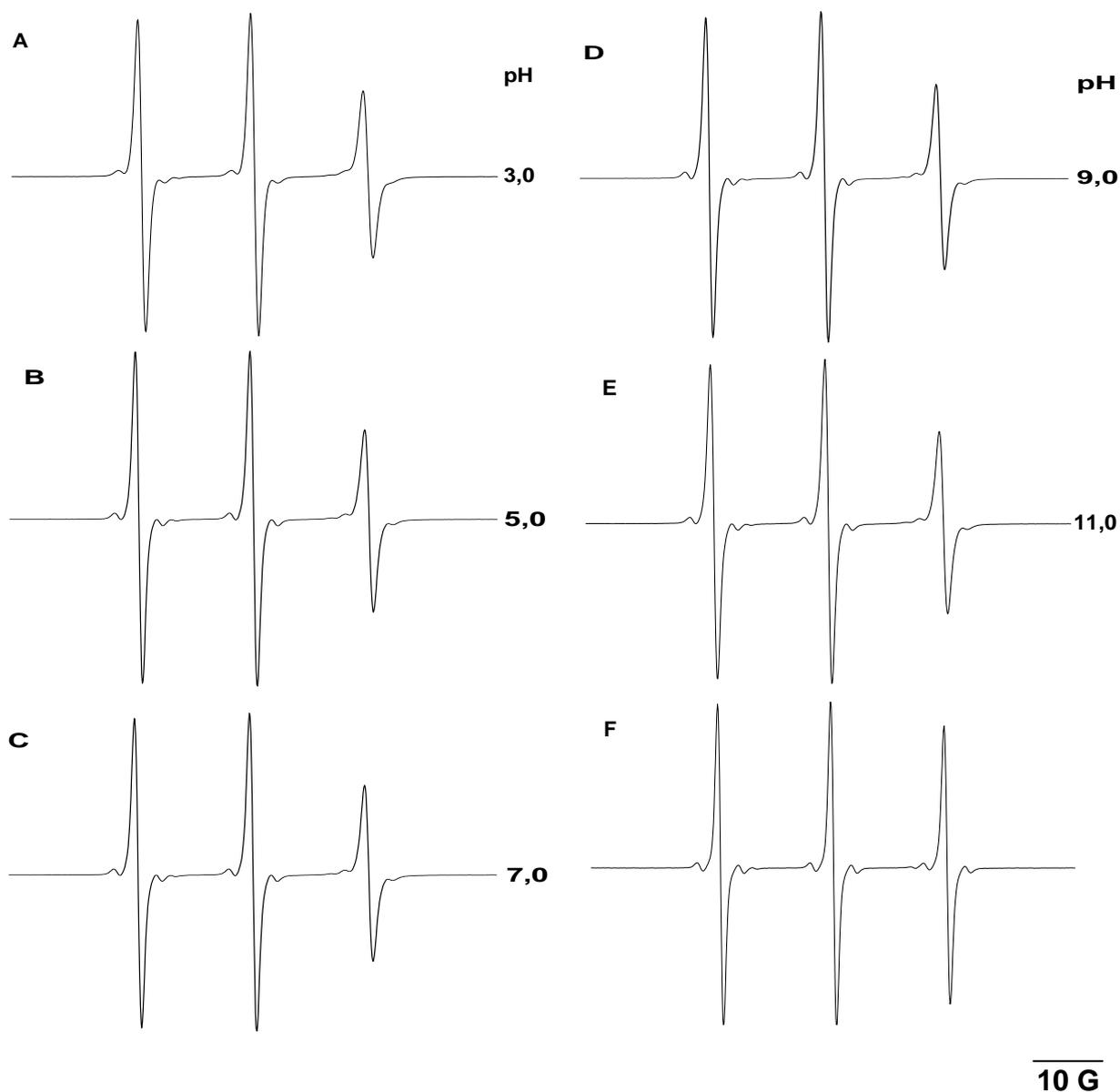


Figura 23. Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 79,0 μ M em função do pH (A-E), tampão PBC 5,0 mM e de TOAC 100 μ M (F) em tampão PBC 5,0 mM, pH 7,0.

Nos casos apresentados acima, o tempo de correlação rotacional (τ) não deve ser calculado, pois sabe-se que ocorre a coexistência de duas populações, uma correspondente à forma protonada de TOAC e outra correspondente à forma desprotonada. Essas duas populações encontram-se em troca lenta na escala de tempo do RPE, dando origem a espectros superpostos, com g e a_N diferentes (Nakaie *et al.*, 1981). No caso de TOAC⁰-Hst-5 outros equilíbrios de ionização estão presentes e é possível que as diferentes estruturas também dêem origem a diferentes

espectros. Por esse motivo, para analisar os efeito do pH, foi utilizado o parâmetro empírico h_0/h_{-1} , que é proporcional a τ . A figura 24 mostra a variação desse parâmetro em função do pH, e, a partir das inflexões da curva experimental, foram estimados os pKs do N-terminal de TOAC, 4,9, e, possivelmente, dos resíduos de His, 6,8, e Tyr, 9,2, mostrando a sensibilidade da sonda paramagnética. Não se pode descartar também que a inflexão observada na região de pH 4-5 reflita também a ionização dos grupamentos carboxílicos dos resíduos D¹ e E¹⁶, em particular, D¹ pela sua proximidade ao TOAC.

Vale notar que o pK dos resíduos de Tyr estimado a partir dos estudos de RPE difere em 0,3 unidades do pK dos valores estimados a partir dos estudos de fluorescência. Essa diferença é maior para os resíduos de His, chegando a 0,7 unidades.

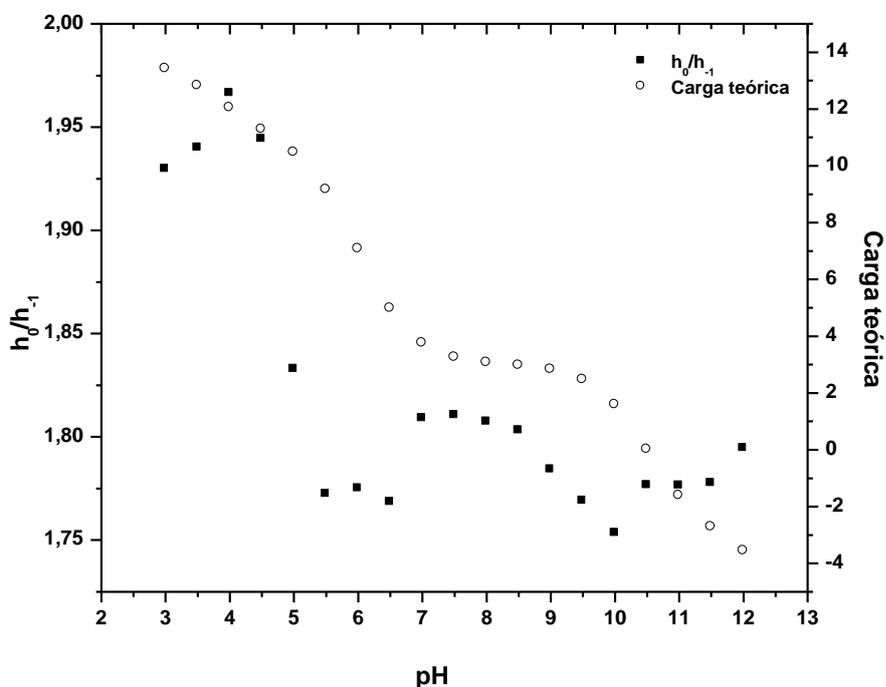


Figura 24. Relação h_0/h_{-1} calculada a partir dos espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 em função do pH, tampão PBC 5,0 mM.

Foram também realizadas medidas de desdobramento hiperfino (a_N , figura 25) em função do pH. Conforme observado para o TOAC (Nakie *et al.*, 1981) e para outros peptídeos (Nakaie *et al.*, 1981; Nakaie *et al.*, 1983, Pertinhez *et al.*, 1997, Schreier *et al.*, 2004, Moraes *et al.*, 2007), o valor de a_N varia com o pH. Isto se deve ao fato de que as formas protonada e desprotonada do amino grupo (e também da carboxila, no caso do TOAC, Nakaie *et al.*, 1981) dão origem a espectros com valores diferentes de a_N devido ao efeito de carga sobre a distribuição eletrônica do elétron desemparelhado. Conforme a figura 25, os valores de a_N para as formas protonada e desprotonada correspondem a 16,325 e 16,57, respectivamente. À medida que varia o pH, as duas formas coexistem de acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch. Foi também demonstrado que o equilíbrio de troca entre as duas formas é lento na escala de tempo do experimento (Nakaie *et al.*, 1981, Nakaie *et al.*, 1983). Assim, em pHs intermediários os espectros das formas protonada e desprotonada se superpõem na proporção dada pela equação de Henderson-Hasselbalch, permitindo a determinação do pK dos grupos ionizáveis, especialmente o do TOAC.

A partir da figura 25 o valor do pK do N-terminal de TOAC foi estimado em 4,3, e o dos resíduos de His, em 6,8.

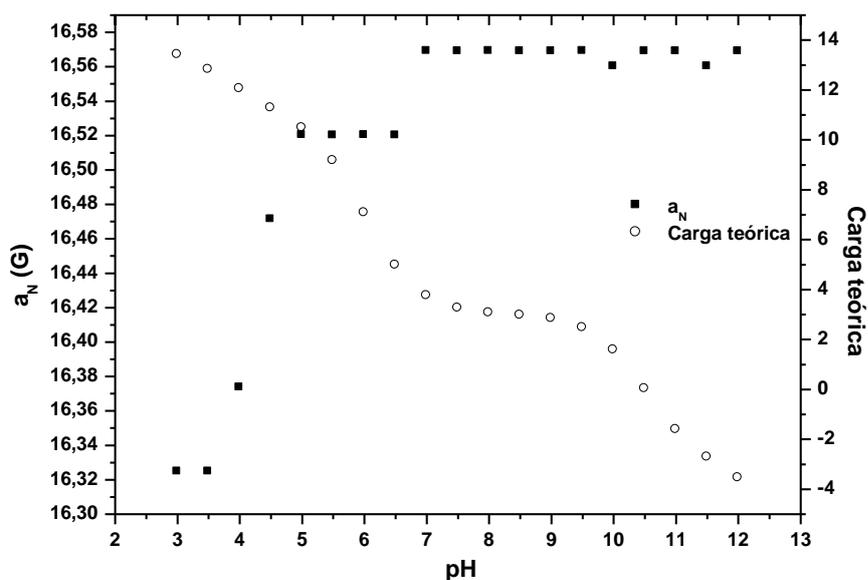


Figura 25. Desdobramento hiperfino (a_N) dos espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 em função do pH, tampão PBC 5,0 mM.

A tabela V sumariza os valores de pK obtidos a partir dos estudos de fluorescência e de RPE. A diferença entre os valores teóricos e experimental mostra a influência do microambiente sobre a dissociação dos resíduos ionizáveis.

Tabela V. pKs teórico e experimental dos resíduos de TOAC, His e Tyr de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 (n.d. = não detectado).

Resíduo	pK teórico	Hst-5		TOAC ⁰ -Hst-5	
		Fluorescência	Fluorescência	RPE	a_N
TOAC	4,5	-	n.d.	h_0/h_{-1}	4,3
His	6,04	n.d.	6,1	6,8	6,8
Tyr	10,46	9,4	9,5	9,2	n.d.

Embora um peptídeo em solução dificilmente adote conformações estruturadas, foram realizados estudos de CD para verificar se ocorreriam mudanças conformacionais em função da variação do pH. A figura 26 mostra os espectros de CD de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5. Como esperado, ambos os peptídeos apresentam estrutura ao acaso em solução. Os espectros de estruturas ao acaso são caracterizados por uma banda negativa na região de 195 nm e uma banda, que pode ser positiva ou negativa, na região de 225 nm. As variações nos espectros em

função do pH mostram que ocorrem flutuações na conformação dos peptídeos, sem formação de estruturas secundárias estáveis, sendo mantida a estrutura ao acaso.

A qualidade dos espectros, apesar das tentativas de otimizar a aquisição, foi sempre razoável. Isso se deve à grande flexibilidade do peptídeo, o que gera um equilíbrio entre várias conformações; essa ausência de uma conformação estável prejudica de forma significativa a obtenção de espectros com boa relação sinal/ruído.

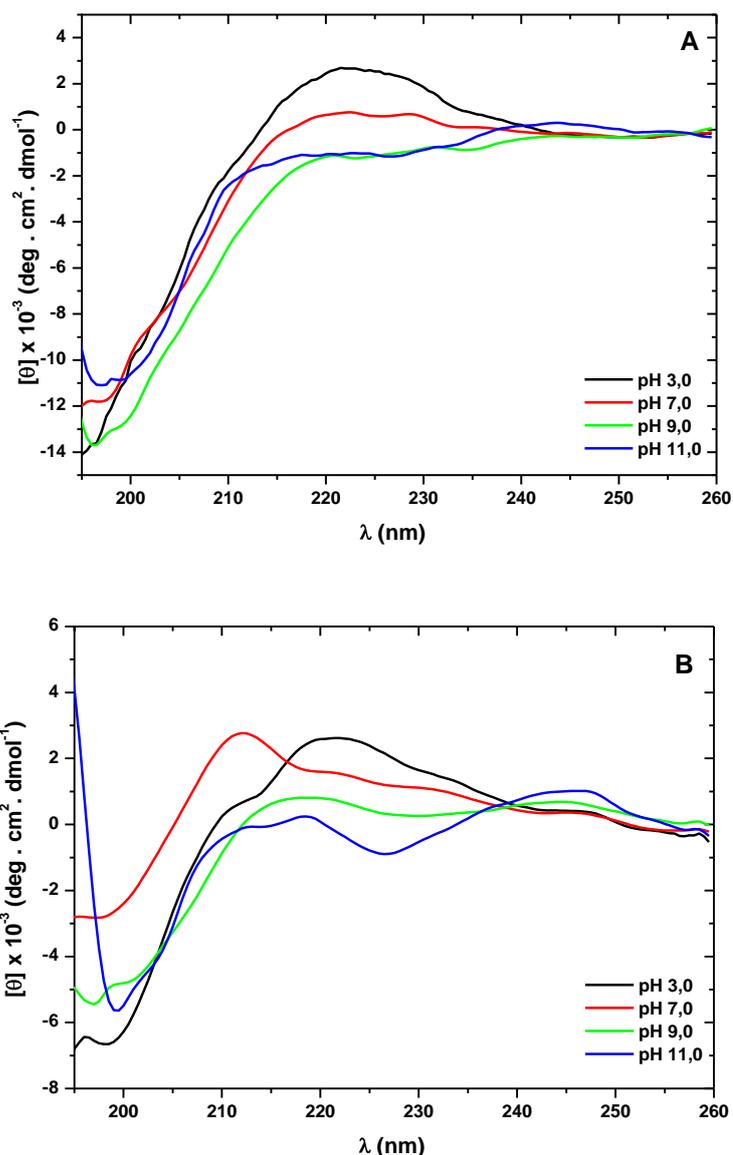


Figura 26. Espectros de CD de Hst-5 75,0 μM (A) e TOAC⁰-Hst-5 79,0 μM (B) em função do pH, em tampão PBC 5,0 mM.

Observa-se na figura 26 que há uma queda na intensidade da banda positiva em 224 nm com o aumento do pH. A variação de $[\theta]_{224}$ em função do pH para Hst-5

está mostrada na figura 27. Resíduos aromáticos, no caso, os resíduos de tirosina, podem contribuir para o espectro nesta região (Woody e Dunker, 1996; Salinas et al., 2002) e a falta de estrutura secundária do peptídeo pode fazer com que a contribuição desses resíduos nessa região do espectro seja mais destacada e reflita possíveis flutuações conformacionais do peptídeo. Apesar da qualidade pouco satisfatória dos espectros, pode-se notar que a variação de $[\theta]_{224}$ com o pH acompanha razoavelmente a variação da carga formal do peptídeo, sugerindo que as alterações espectrais refletem flutuações conformacionais induzidas pela alteração de carga do peptídeo.

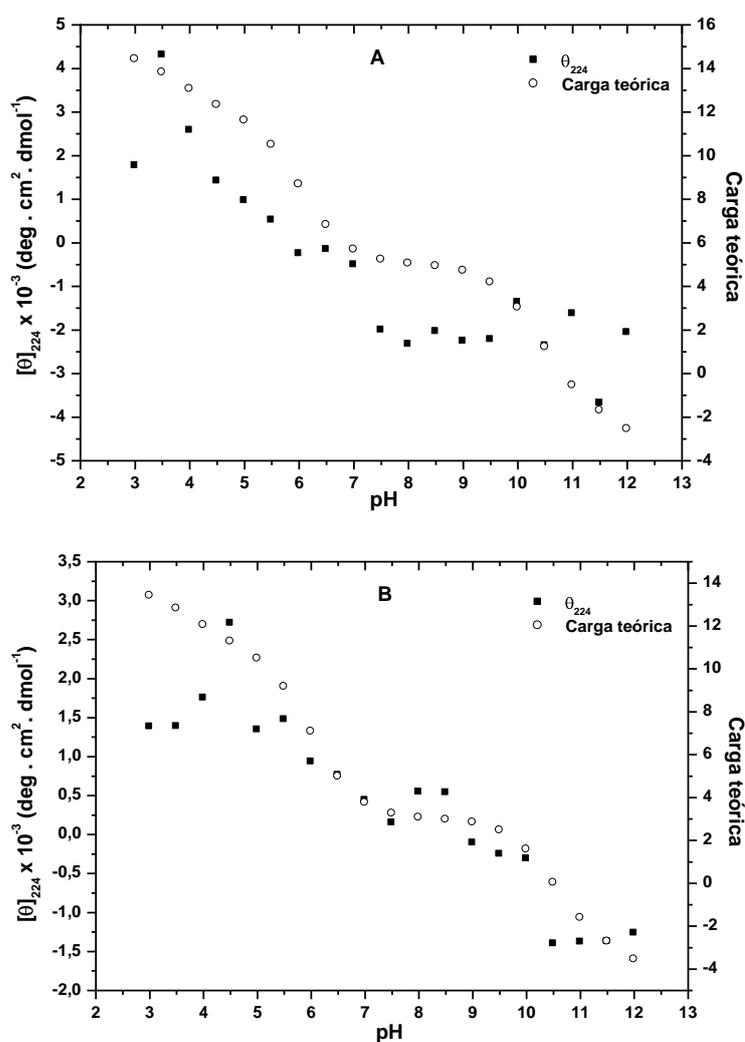


Figura 27. Valores de $[\theta]_{224}$ nos espectros de CD da Hst-5 (A) e TOAC⁰-Hst-5 (B) em função do pH, em tampão PBC 5,0 mM.

4.1.1.2. EFEITO DE TFE

O TFE é um solvente muito usado como indutor de estrutura secundária em peptídeos, pela formação de pontes de hidrogênio intra-moleculares (Marlborough e Ryan, 1977).

A diminuição da polaridade do meio leva a um aumento da intensidade de fluorescência de Tyr (Lakowicz, 1999). A figura 28 mostra o efeito da concentração de TFE sobre os espectros de fluorescência de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5. Verifica-se que para Hst-5 ocorre estabilização da intensidade de emissão de fluorescência após 40% de TFE, enquanto que, para TOAC⁰-Hst-5, ocorre inicialmente um aumento de intensidade de fluorescência e, em seguida, uma queda nessa intensidade. Esse fenômeno pode ser melhor observado na figura 29, onde está graficada a variação de intensidade de fluorescência em função da concentração de TFE.

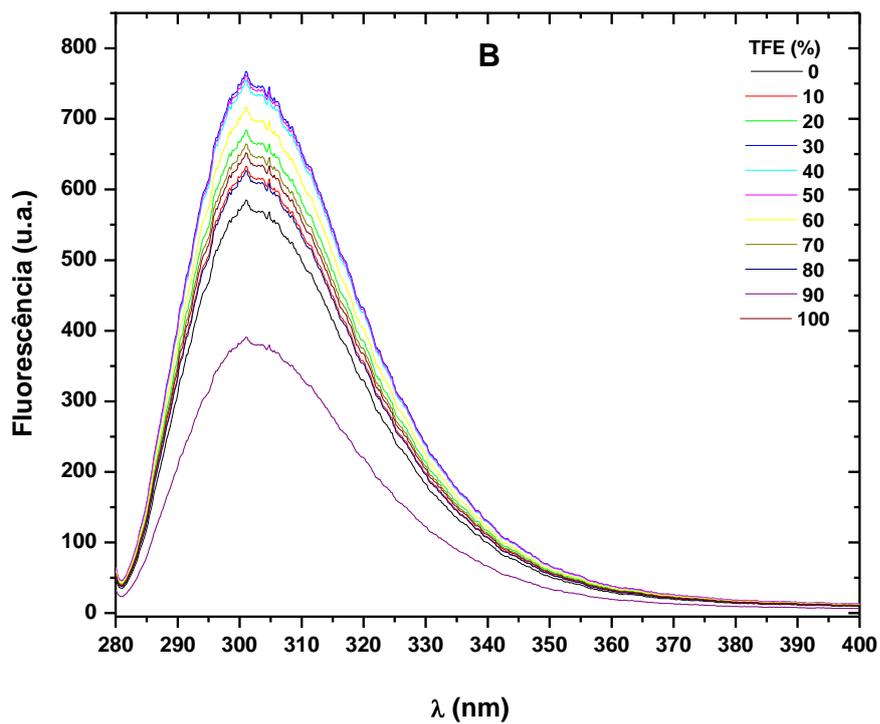
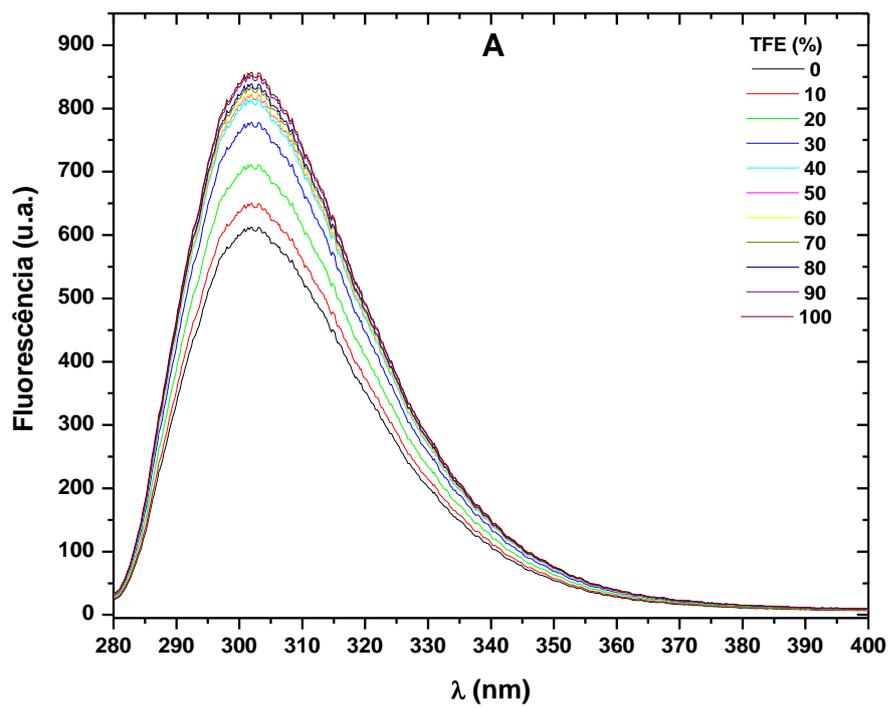


Figura 28. Espectros de fluorescência de Hst-5 30,0 μM (A) e TOAC⁰-Hst-5 37,0 μM (B), em função da concentração de TFE, $\lambda_{exc}=275$ nm.

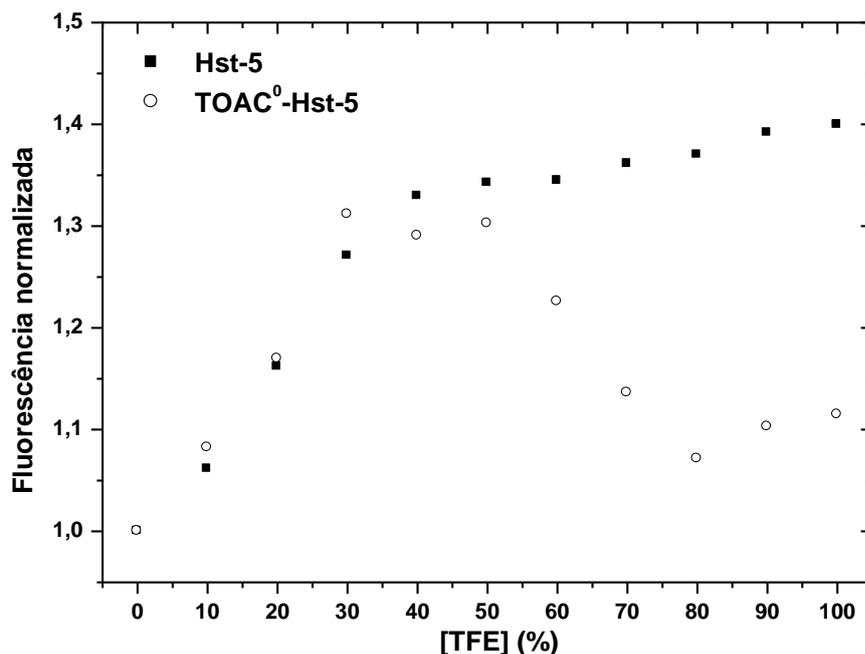


Figura 29. Fluorescência normalizada de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 em função da concentração de TFE.

A queda observada na intensidade de emissão de fluorescência do peptídeo marcado pode ser explicada pela aquisição de estrutura secundária do peptídeo, levando a uma aproximação do grupamento nitróxido do TOAC dos resíduos de Tyr, aumentando a eficiência da supressão de fluorescência.

Para TOAC⁰-Hst-5 foram realizados estudos de RPE. A figura 30 mostra os espectros em concentrações crescentes de TFE. Observa-se um alargamento das linhas espectrais, que refletem uma diminuição na velocidade de tombamento da molécula, que pode ser causada por mudanças conformacionais do peptídeo e/ou pelo aumento da viscosidade do meio.

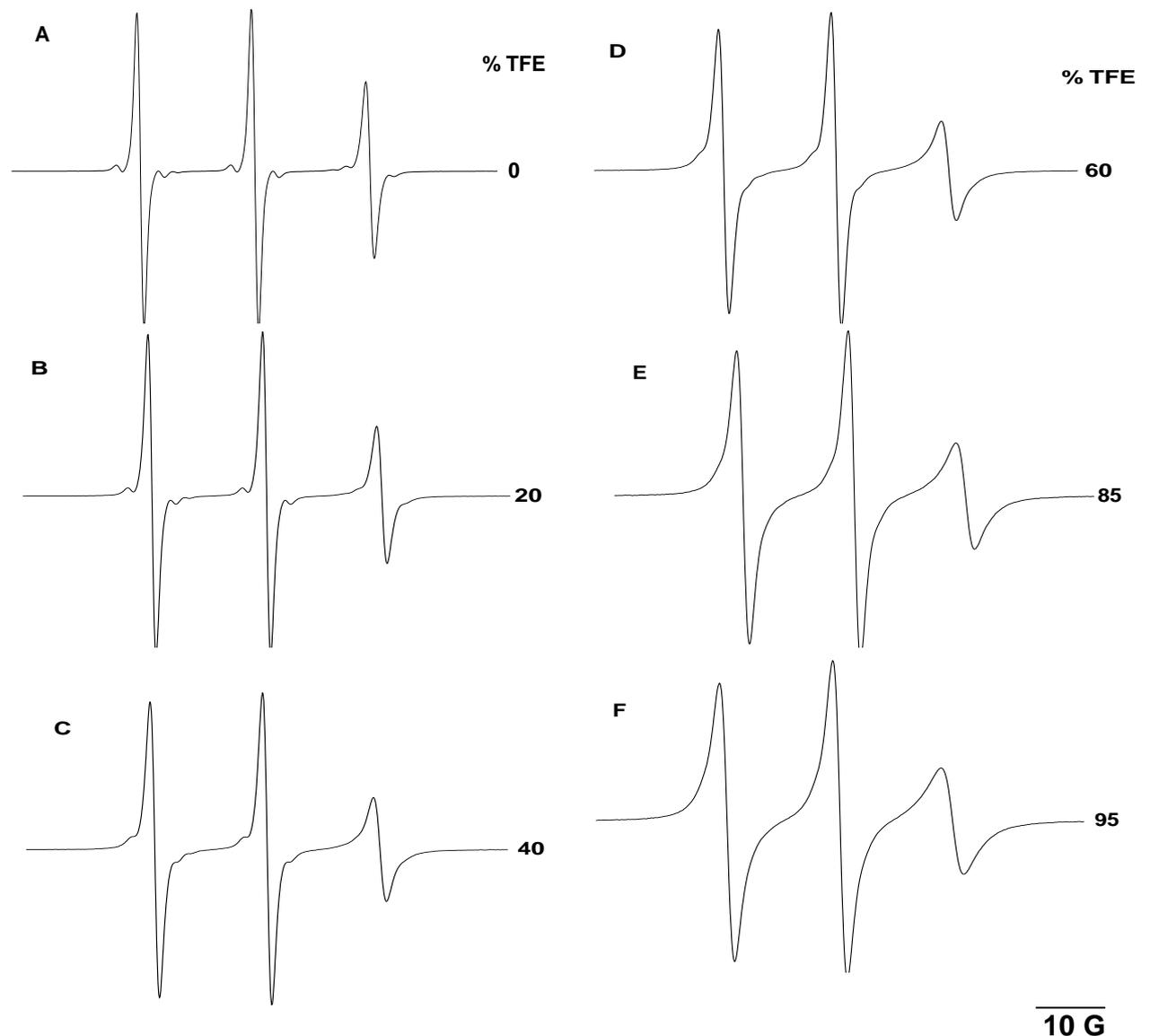


Figura 30. Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 90,0 μM em concentrações crescentes de TFE.

O TFE causa um aumento da viscosidade do meio, influenciando o valor de τ , de acordo com a equação de Stokes-Einstein (Pertinhez *et al.*, 1997):

$$\tau = \frac{4 \cdot \pi r^3}{3} \cdot \frac{\eta}{k \cdot T} \quad (14)$$

onde τ é o tempo de correlação rotacional, $\frac{4}{3} \pi r^3$ é o volume da molécula, η é a viscosidade do solvente, k é a constante de Boltzmann e T , a temperatura em Kelvin. Assim, quanto maior a viscosidade, maior o valor de τ , e para descontar esse efeito, os valores calculados através dos espectros foram divididos pelos valores obtidos

para o TOAC nas mesmas concentrações de TFE (Schreier *et al.*, 2004). A figura 31 mostra que, mesmo após a correção pelo aumento da viscosidade, a relação $\tau_{\text{peptídeo}}/\tau_{\text{TOAC}}$ aumenta com o aumento de TFE, permanecendo relativamente estável a partir de 40% de TFE, até cerca de 70% do solvente e tendendo a aumentar para as porcentagens mais altas (85 e 95%). Esses resultados sugerem que os espectros monitoram, além da mudança de viscosidade do meio, a ocorrência de alterações conformacionais no peptídeo e estão de acordo com as mudanças efetivamente observadas através dos espectros de CD (ver abaixo).

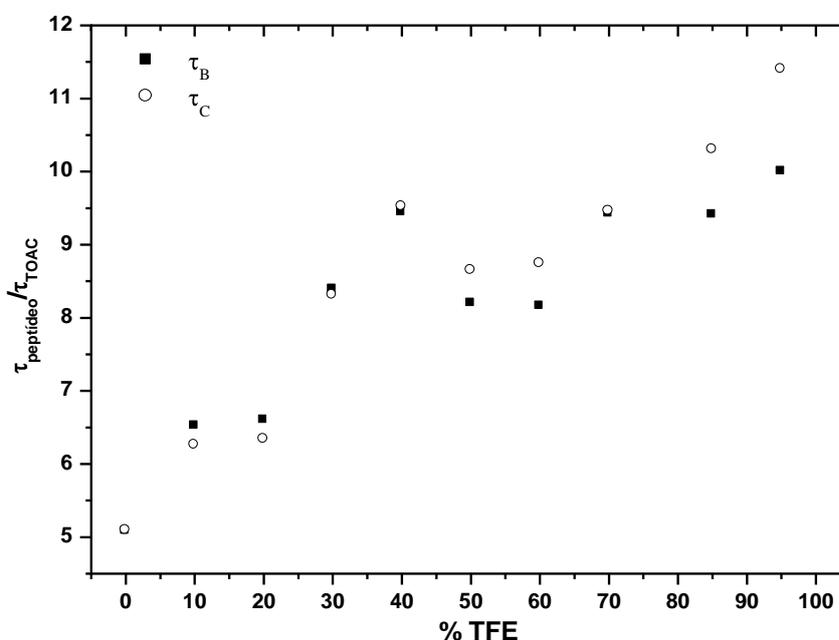


Figura 31. Relação entre os valores de tempo de correlação rotacional para TOAC⁰-Hst-5 e para TOAC livre em concentrações crescentes de TFE.

Na figura 32 estão apresentados os valores do desdobramento hiperfino (a_N), em função da concentração de TFE. Conforme mencionado em Materiais e Métodos, esse parâmetro é sensível à polaridade do meio, diminuindo com a diminuição da polaridade (Schreier *et al.*, 1994). A figura mostra uma diminuição nos valores de a_N para o peptídeo e para o TOAC livre. Observa-se que, enquanto a_N decresce de forma contínua para este último, ocorre uma transição abrupta para o peptídeo em

30% TFE. Esses resultados sugerem que as alterações espectrais neste último caso refletem, além da diminuição da polaridade do meio, as alterações conformacionais sofridas pelo peptídeo na presença de TFE.

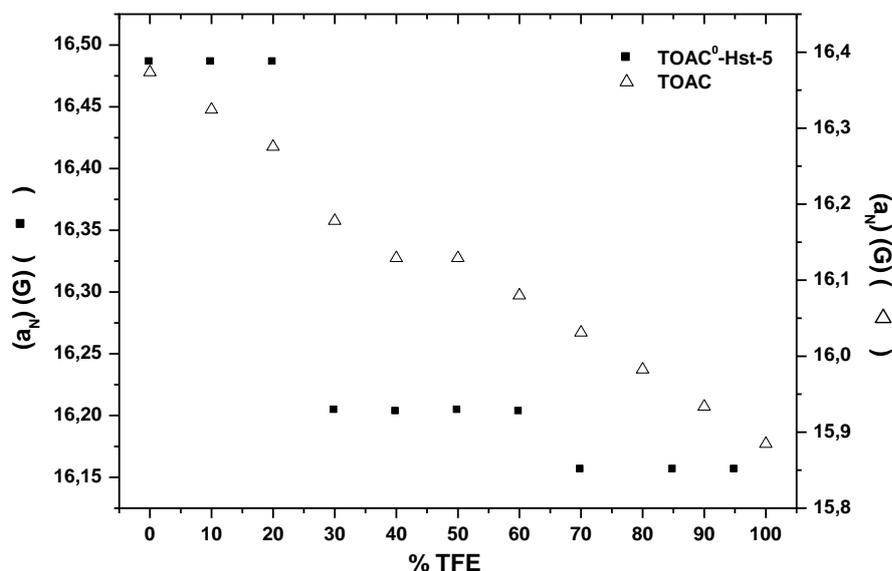


Figura 32. Desdobramento hiperfino (a_N) para os espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 e TOAC livre em função da concentração de TFE.

A fim de determinar a estrutura secundária adotada pelos peptídeos na presença de TFE, foram realizados estudos de dicroísmo circular. Na figura 33, observa-se que na presença de TFE, os peptídeos adquirem conformação α -helicoidal, caracterizada pelas bandas com máximo na região de 195 nm, e mínimos em 208 e 222 nm. Esses resultados corroboram os dados obtidos para Hst-5 (Brewer *et al.*, 1998; Raj *et al.*, 1998; Iovino *et al.*, 2001).

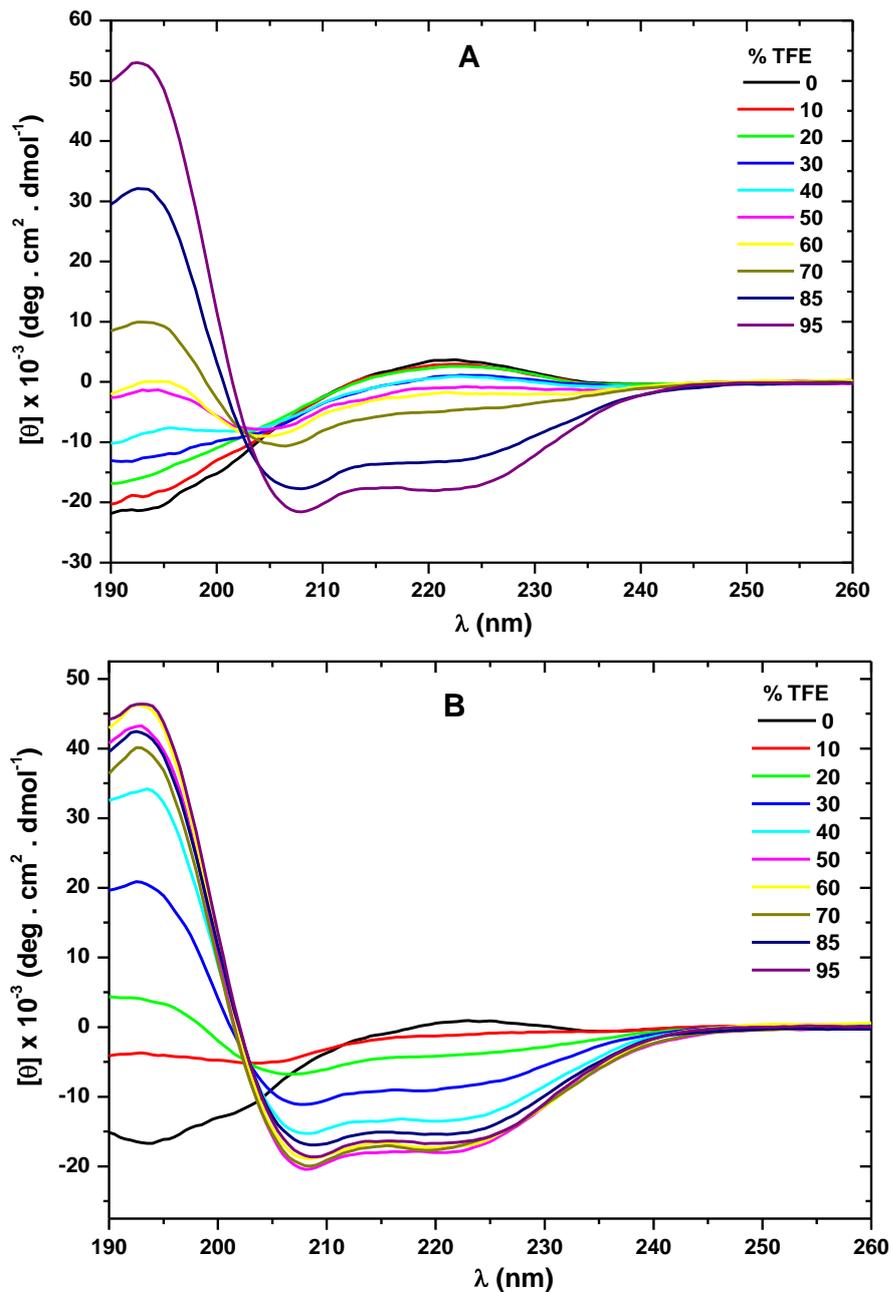


Figura 33. Espectros de CD de Hst-5 65,0 μM (A) e TOAC⁰-Hst-5 60,0 μM (B), em função da concentração de TFE.

Um aumento de intensidade do espectro de CD em 222 nm reflete o aumento de conteúdo α -helicoidal, conforme mostrado na figura 34. Observa-se que TOAC⁰-Hst-5 alcança seu máximo de estruturação em 50% de TFE, enquanto o peptídeo não marcado apresenta a mesma intensidade apenas em 95% de TFE.

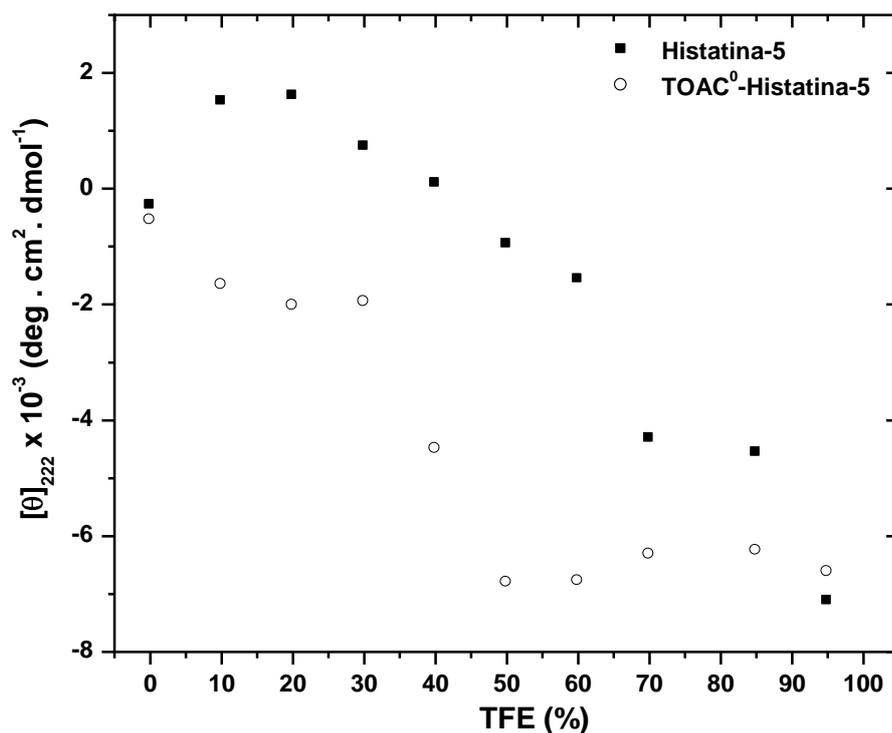


Figura 34. Valores de $[\theta]_{222}$ para Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5, em função da concentração de TFE.

Na tabela VI, são apresentadas as porcentagens de α -hélice para ambos os peptídeos, em 95% de TFE, estimadas através do método de Chen *et al.* (1974), através da equação de Rohl e Baldwin (1998) e também utilizando o algoritmo k2d (Andrade *et al.*, 1993; Merelo *et al.*, 1994). A diferença entre os valores deve-se às diferentes equações utilizadas, que, além disso, foram derivadas para calcular a porcentagem de estrutura secundária em proteínas, e não em peptídeos. Nesse caso, devido à baixa intensidade dos espectros, as contribuições de aminoácidos aromáticos e pontes dissulfeto podem aparecer de forma mais significativa.

Tabela VI. Porcentagem de α -hélice dos peptídeos Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 em 95% TFE, calculada a partir de espectros de CD. Entre parênteses, o número de resíduos presentes no segmento α -helicoidal.

Peptídeo	Chen <i>et al.</i> (1974)	Rohl e Baldwin (1995)	k2d
Hst-5	56% (13,4)	68% (16,3)	64% (15,4)
TOAC ⁰ - Hst-5	53% (13,3)	65% (16,3)	61% (15,3)

4.1.1.3. INTERAÇÃO COM ÍONS METÁLICOS

Estudos de titulação calorimétrica isotérmica (ITC) mostraram a ligação de Hst-5 aos íons metálicos Zn^{2+} e Cu^{2+} (Gusman *et al.*, 2001c) e espectros de RMN unidimensional forneceram informações sobre os sítios de ligação desses íons: D^1SH^3 para Cu^{2+} e $H^{15}EKHH^{19}$ para Zn^{2+} (Grogan *et al.*, 2001). Estudos de CD indicaram que os efeitos conformacionais dessas interações em meio aquoso são muito pequenos (Brewer e Lajoie, 2000). Em presença de membranas PC:PA de ovo 8:2 (em moles), Melino *et al.* (1999) observaram que a adição de Zn^{2+} favorece a aquisição de estrutura α -helicoidal pelo peptídeo. Em estudos do peptídeo ATCUN-C16, onde foram deletados os resíduos 5 a 8 da Hst-5, Melino *et al.* (2006) observaram pequena indução de estrutura α -helicoidal por concentrações equimolares de íons de Ni^{2+} e de $Ni^{2+} + Zn^{2+}$ em meio aquoso, pH 5,9. Em presença de 50% de TFE, os autores observaram que o peptídeo tende a formar uma hélice 3_{10} em ausência de íons e que essa estrutura se converte em α -hélice na presença de Ni^{2+} . Além disso, não existem estudos sobre uma eventual interação do peptídeo com Mn^{2+} . Assim, foi estudada a interação entre Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 e Cu^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} através de fluorescência, CD e RPE.

Na figura 35 observa-se que os espectros de fluorescência de ambos os peptídeos sofrem muito pequenas variações na presença de concentrações equimolares de Cu^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} .

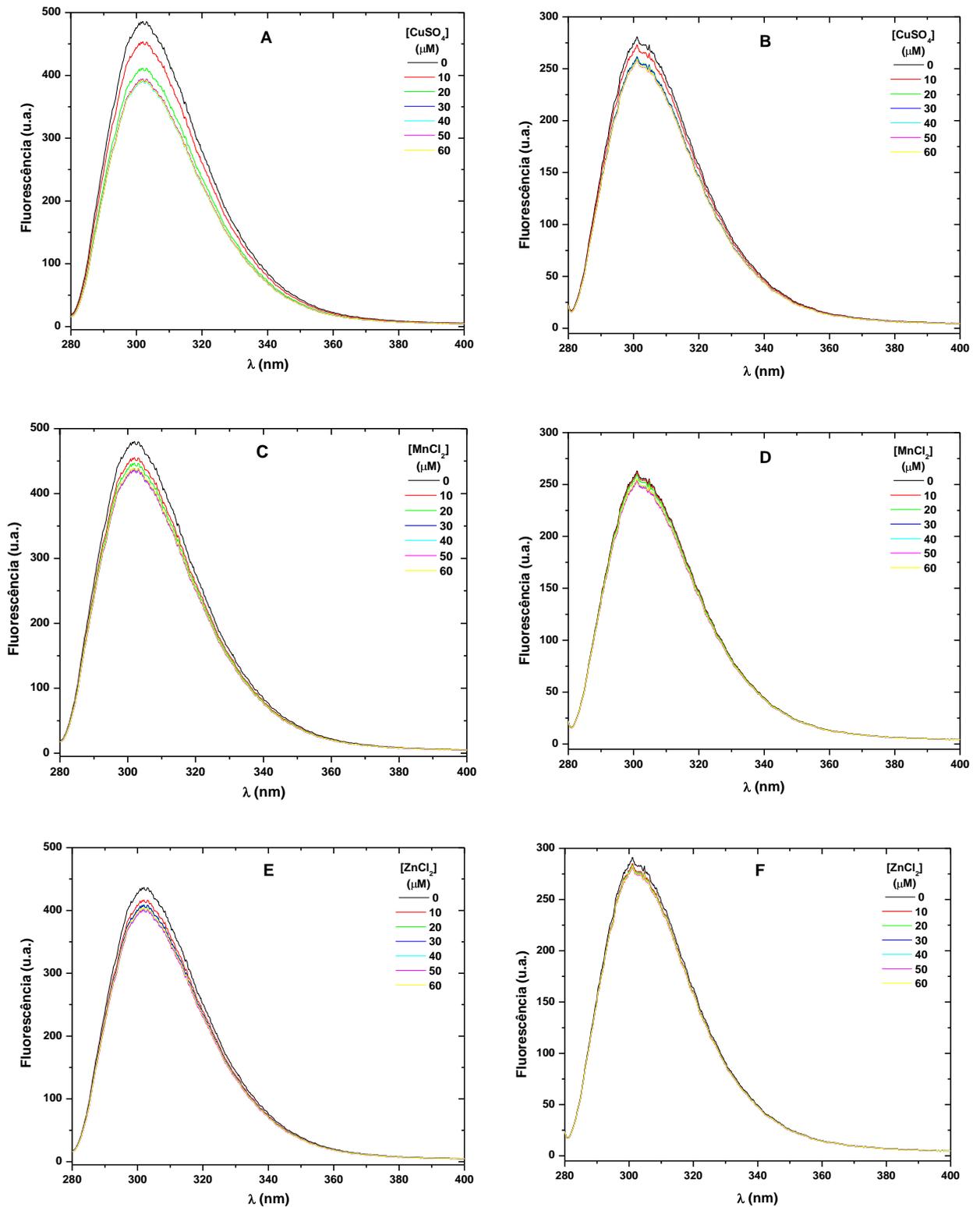


Figura 35. Espectros de fluorescência de Hst-5 (A, C, E) e TOAC⁰-Hst-5 (B, D, F) na presença de Cu²⁺ (A, B), Mn²⁺ (C, D) ou Zn²⁺ (E, F), em água deionizada, pH 5,0, $\lambda_{exc}=275$ nm. Concentrações: Hst-5 e Cu²⁺, 23,8 μ M; TOAC⁰-Hst-5 e Cu²⁺, 17,0 μ M; Hst-5 e Mn²⁺, 23,0 μ M; TOAC⁰-Hst-5 e Mn²⁺, 17,3 μ M; Hst-5 e Zn²⁺, 20,7 μ M; TOAC⁰-Hst-5 e Zn²⁺, 17,7 μ M.

Na figura 36 são mostradas as variações de fluorescência em função da concentração dos íons. Verifica-se um comportamento aparentemente hiperbólico da intensidade de fluorescência, o que sugeriria uma estequiometria de 1:1 para a interação entre os peptídeos e os íons metálicos. A estequiometria de ligação entre íons metálicos e Hst-5 permanece motivo de debate na literatura (Brewer e Lajoie, 2000; Gusman *et al.*, 2001c).

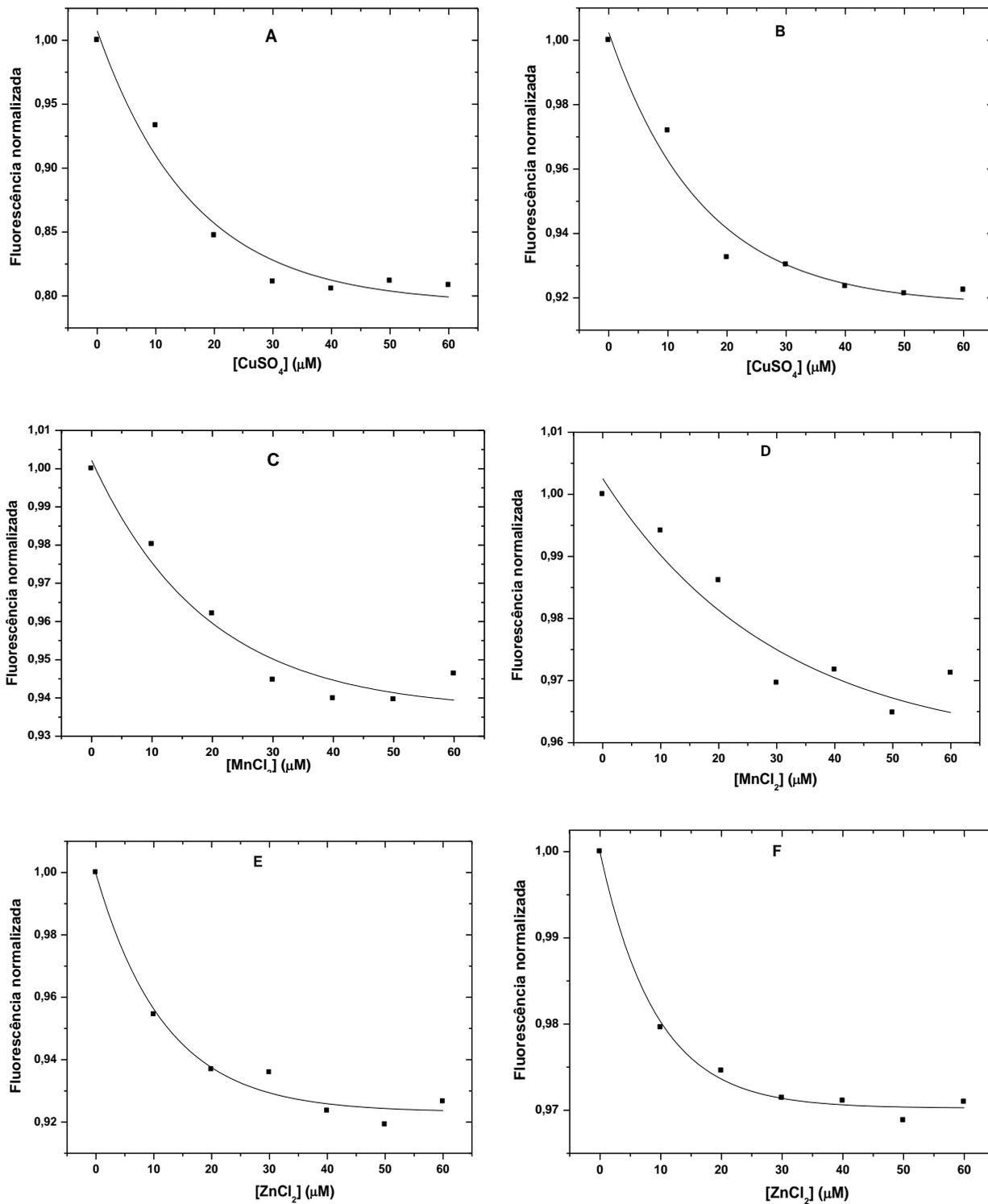


Figura 36. Fluorescência normalizada de Hst-5 (A, C, E) e TOAC⁰-Hst-5 (B, D, F) em função da concentração de Cu^{2+} (A, B), Mn^{2+} (C, D) ou Zn^{2+} (E, F), em água deionizada, pH 5,0, $\lambda_{\text{exc}}=275$ nm.

Devido à baixa variação na intensidade de fluorescência, foram realizados experimentos para verificar se os metais Cu^{2+} e Mn^{2+} , por serem paramagnéticos, agiriam como supressores de fluorescência de Tyr. Foi utilizada a N-acetil-

tirosinamida (NAYA). Na figura 37, porém, observa-se que, nas concentrações utilizadas nos experimentos acima, os íons metálicos não interferem nos resultados.

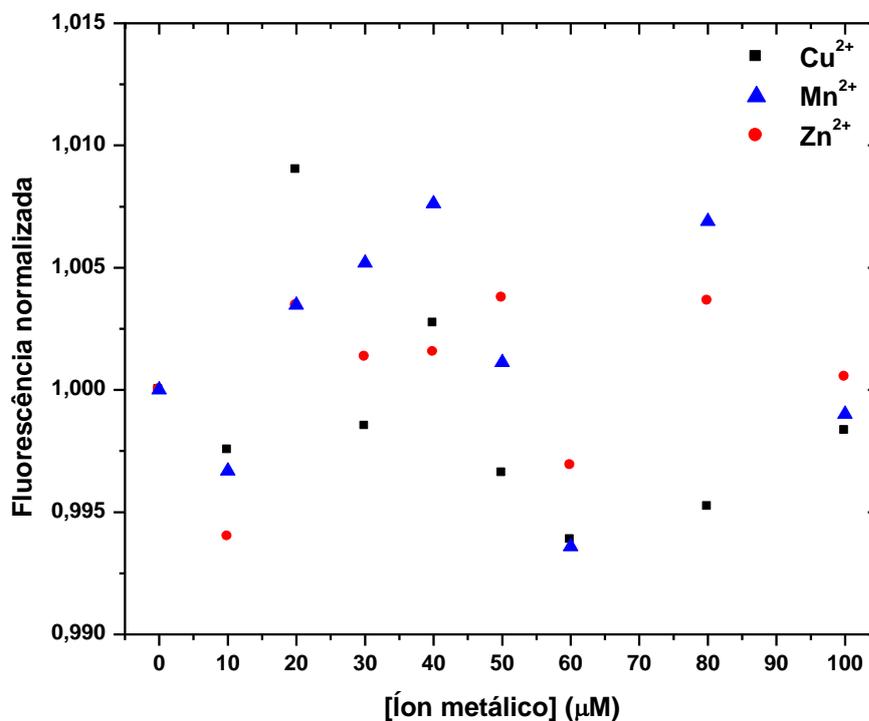


Figura 37. Fluorescência normalizada de NAYA 20 μM em função da concentração dos íons metálicos, em água deionizada, pH 5,0, $\lambda_{exc}=275$ nm.

Estudos de RPE também foram utilizados para obter informações a respeito da interação entre o peptídeo TOAC⁰-Hst-5 e os três íons metálicos estudados. No caso do Mn²⁺, foi também possível estudar a interação através dos espectros de RPE do íon, que podem ser obtidos à temperatura ambiente.

A figura 38 mostra os espectros de TOAC⁰-Hst-5 na presença de concentrações crescentes de Cu²⁺. A adição do íon causou uma grande perda da intensidade do sinal, bem como um alargamento das linhas espectrais de TOAC⁰-Hst-5 no espectro remanescente.

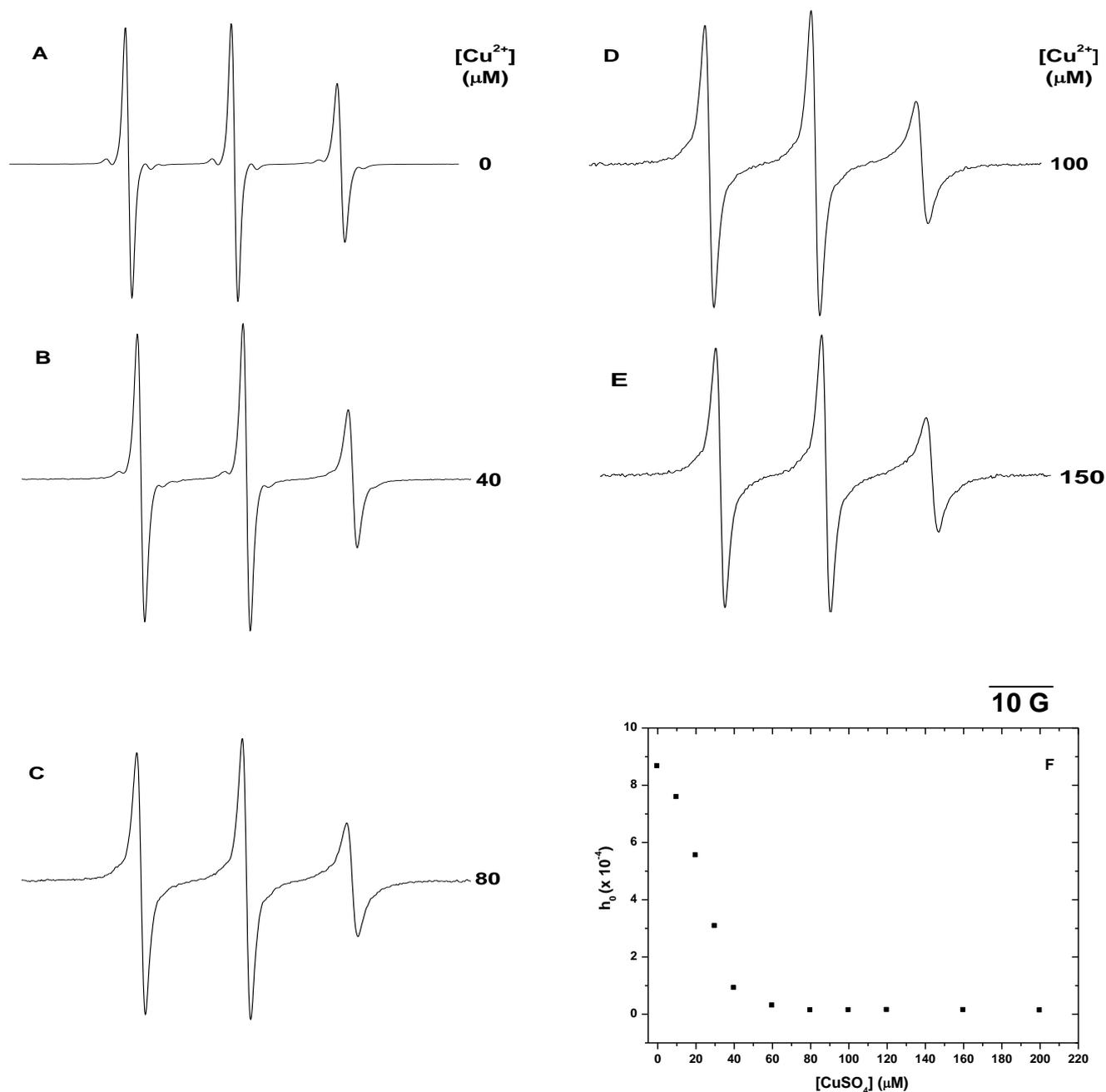


Figura 38. (A-E): Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 68,0 μM em função da concentração de CuSO₄, em água deionizada, pH 5,0. (F): Amplitude do pico de campo central em função da concentração de Cu²⁺.

A grande perda de intensidade (figura 38F) sugere a ocorrência de interação dipolar entre o íon de Cu²⁺ e o TOAC. Estudos da interação entre íons paramagnéticos e nitróxidos em condições em que as duas espécies encontram-se em posições fixas, como, por exemplo, em enzimas, mostraram que ocorre perda de amplitude do sinal de RPE do nitróxido em consequência de interação spin-spin

(Taylor et al., 1969; Cohn et al., 1971). O fenômeno foi analisado por Leigh (1970), que mostrou que a perda de amplitude ocorre devido à interação dipolar de acordo com a equação (6) (Seção 3.2.2.4).

A figura 38E mostra que a perda de amplitude do sinal é de 98,6%. De acordo com a figura 15 (tirada de Leigh, 1970) esse valor corresponde a um valor de $C/\delta H_0$ de cerca de 100, sendo C a constante que modula a interação dipolar da equação (6) e δH_0 a largura pico-a-pico da linha de campo central na ausência da interação. Usando-se o valor de $\delta H_0 = 1,43$ G medido no espectro obtido em presença de $100 \mu\text{M}$ de Cu^{2+} (ver comentários abaixo sobre o alargamento das linhas espectrais devido à diminuição da mobilidade do TOAC) foi calculado o valor de C. Empregando ainda $\mu = 1,02 \times 10^{-20}$ erg G^{-1} (calculado a partir dos parâmetros obtidos em Livshits *et al.*, 2001) e $T_1 = 10^{-9}$ s (tirado de Livshits *et al.*, 2001), foi calculada a distância de $4,8 \text{ \AA}$ entre o íon e o nitróxido. Nota-se que os dois grupamentos estão muito próximos, corroborando o sítio de ligação do cobre proposto na literatura, D^1SH^3 . Esse resultado e o fato de os espectros remanescentes do peptídeo apresentarem alargamento diferencial das linhas (figura 38) sugerem que esse alargamento seja devido à diminuição de mobilidade do TOAC decorrente da ligação do íon aos resíduos imediatamente contíguos ao TOAC.

A partir dos espectros da figura 38, foram calculados valores de τ_B e τ_C (figura 39). O aumento de τ reflete o alargamento diferencial das linhas espectrais. Nota-se uma saturação no comportamento da curva a partir de $\sim 60,0 \mu\text{M}$ de CuSO_4 , concentração equivalente àquela do peptídeo, corroborando a proposta de que a estequiometria de complexação é 1:1.

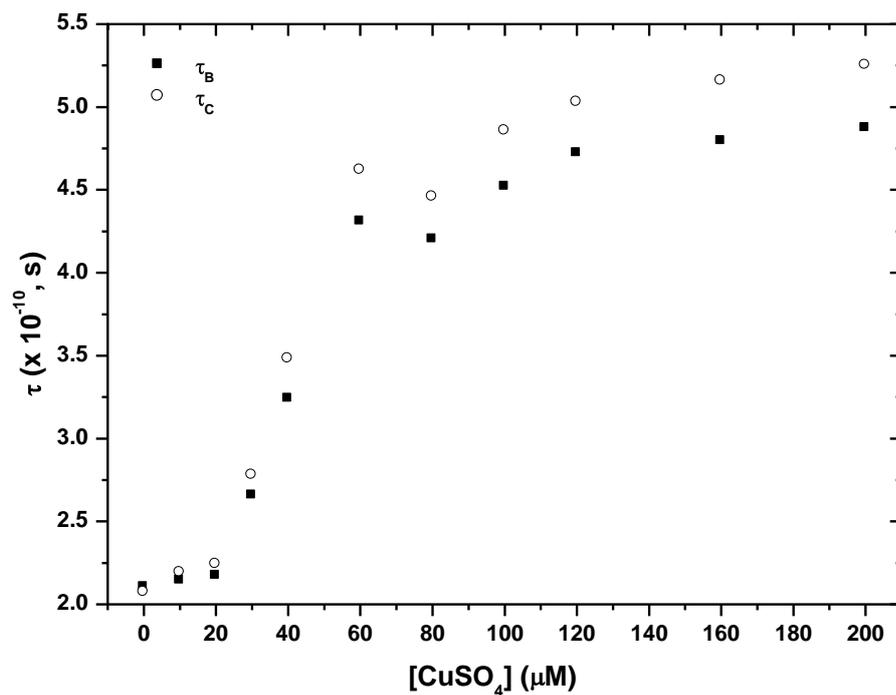


Figura 39. Valores de τ_B e τ_C calculados a partir dos espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 em função da concentração de CuSO₄, em água deionizada, pH 5,0.

Os espectros da figura 38 foram também analisados em termos do parâmetro h_0/h_{-1} , a relação entre as alturas das linhas dos campos central e alto (figura 40). Como era de se esperar, esse parâmetro confirma o comportamento evidenciado na análise do tempo de correlação rotacional e mostra claramente o alargamento diferencial das linhas espectrais.

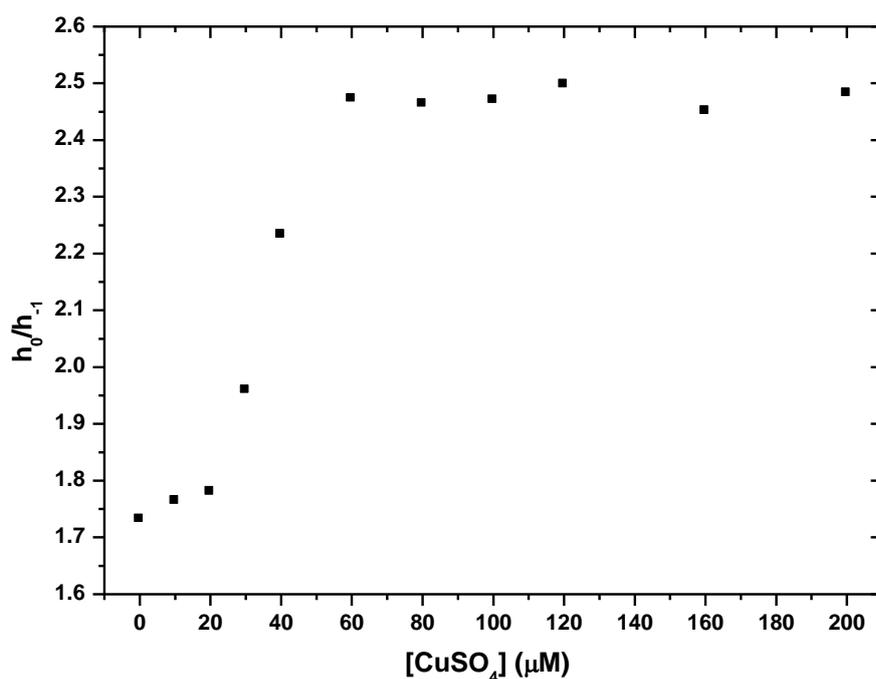


Figura 40. Relação entre as alturas das linhas de campo central e alto (h_0/h_{-1}) obtidas a partir dos espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 em função da concentração de cobre, em água deionizada, pH 5,0.

A interação entre Zn²⁺ e TOAC⁰-Hst-5 foi estudada seguindo a mesma abordagem utilizada com o Cu²⁺. A figura 41 mostra espectros de TOAC⁰-Hst-5 na presença de Zn²⁺, que são característicos de moléculas em movimento rápido na escala de tempo do aparelho, evidenciado pelas três linhas estreitas.

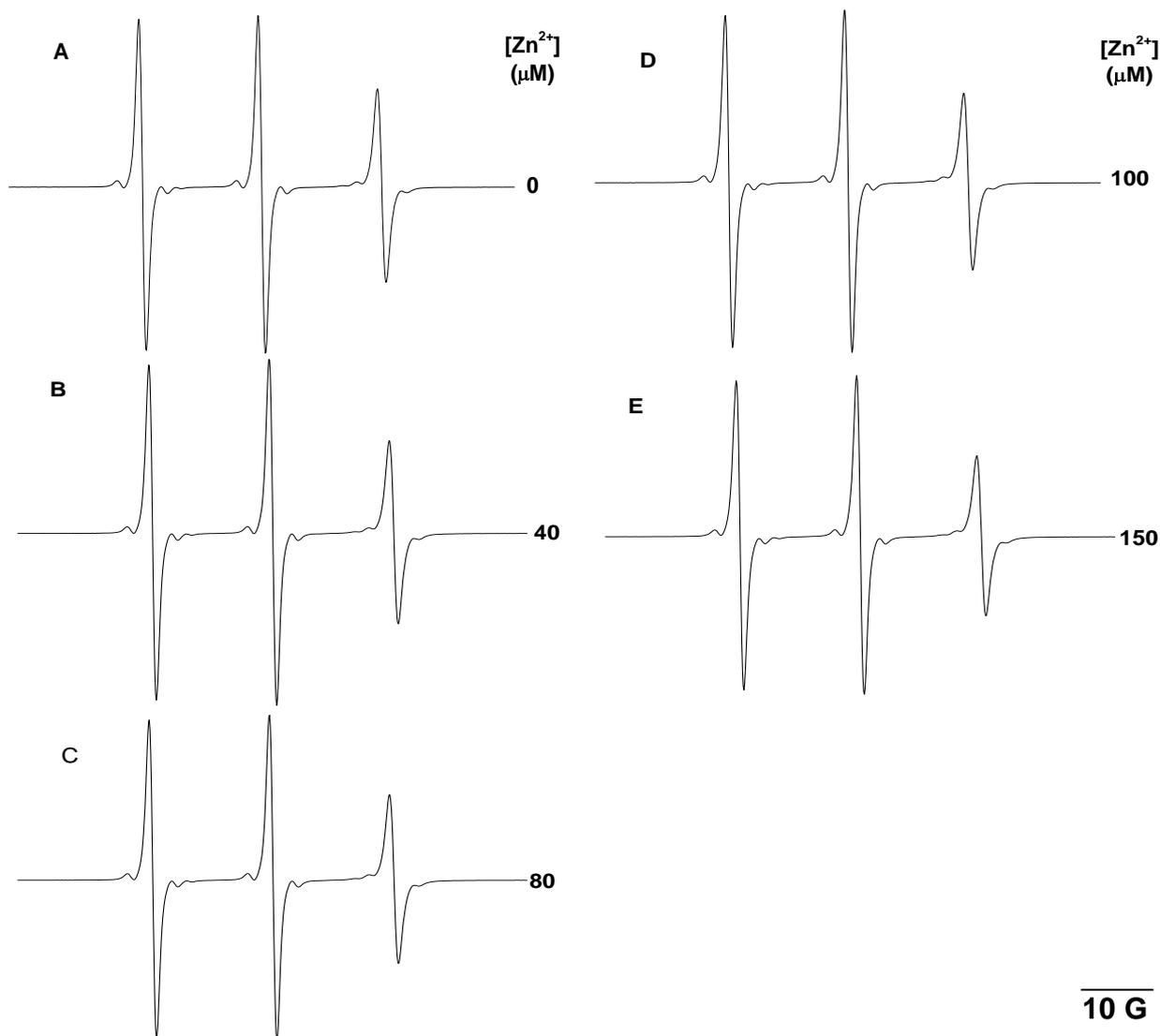


Figura 41. Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 68,0 μM em função da concentração de $ZnCl_2$, em água deionizada, pH 5,0.

A partir dos espectros foi calculado o tempo de correlação rotacional, τ (figura 42). Verifica-se um aumento desse parâmetro com o aumento da concentração de Zn^{2+} , indicando uma diminuição da velocidade de tombamento da molécula. Os valores de τ foram menores para 100 μM Zn^{2+} . Não temos, no momento, uma explicação para esse resultado. A variação da relação h_0/h_{-1} (figura 43) mostra que esse parâmetro aumentou com a concentração do íon, tendendo a estabilizar na proporção 1:1 íon:peptídeo. A seqüência proposta na literatura para a ligação do

Zn^{2+} é $H^{15}EKHH^{19}$ (Gusman *et al.*, 2001c; Grogan *et al.*, 2001). É possível que o menor aumento de τ e de h_0/h_{-1} quando comparado com o causado por Cu^{2+} (figuras 39 e 40), reflita a maior distância entre o sítio de ligação do Zn^{2+} ao TOAC, fazendo com que a região N-terminal sinta menos a imobilização causada pela complexação Zn^{2+} :peptídeo.

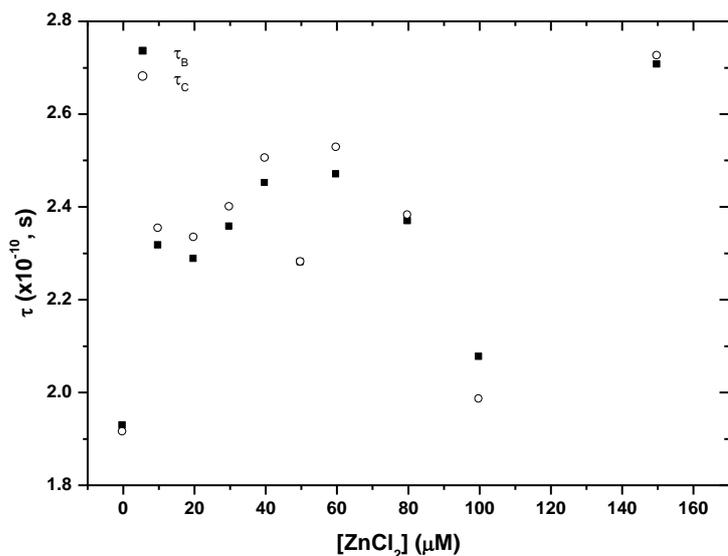


Figura 42. Valores de τ_B e τ_C calculados a partir dos espectros de $TOAC^0$ -Hst-5 em função da concentração de $ZnCl_2$, em água deionizada, pH 5,0.

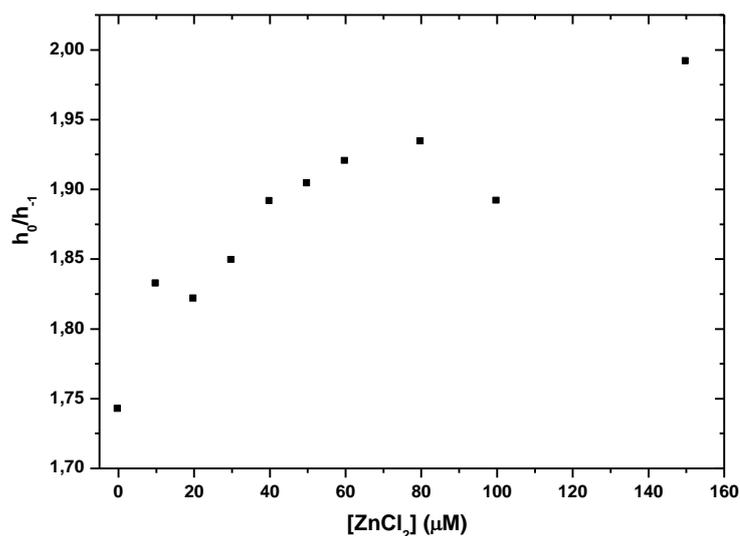


Figura 43. Relação entre as alturas das linhas de campo central e alto (h_0/h_{-1}) obtidas a partir dos espectros de RPE de $TOAC^0$ -Hst-5 em função da concentração de Zn^{2+} , em água deionizada, pH 5,0.

A interação com Mn^{2+} foi também estudada por RPE. Como mencionado acima, foi possível monitorar tanto o peptídeo marcado com TOAC quanto o íon metálico, já que este apresenta espectros de RPE à temperatura ambiente.

A figura 44 mostra espectros de TOAC⁰-Hst-5 na presença de Mn^{2+} . Esses espectros são característicos de moléculas em movimento rápido na escala de tempo do aparelho, como denotado pelas três linhas estreitas. Sendo o Mn^{2+} um íon paramagnético, poder-se-ia esperar a ocorrência de interação spin-spin entre esse íon e o grupamento nitróxido. De fato, interações dipolares entre as duas espécies tem sido descritas, tanto em enzimas (Eaton e Eaton, 1978) como em bicamadas lipídicas (Livshits *et al.*, 2001). A análise dos valores de amplitude dos espectros da figura 44 (A-E) está mostrada na figura 44F. Observa-se que, contrariamente ao que ocorreu no caso do Cu^{2+} , a diminuição da amplitude do sinal foi pequena, chegando a um mínimo de cerca de 75% da amplitude inicial. Foi também observado que não ocorreu mudança na largura das linhas espectrais. O cálculo da distância r entre os dois centros paramagnéticos foi efetuado como descrito para o Cu^{2+} .

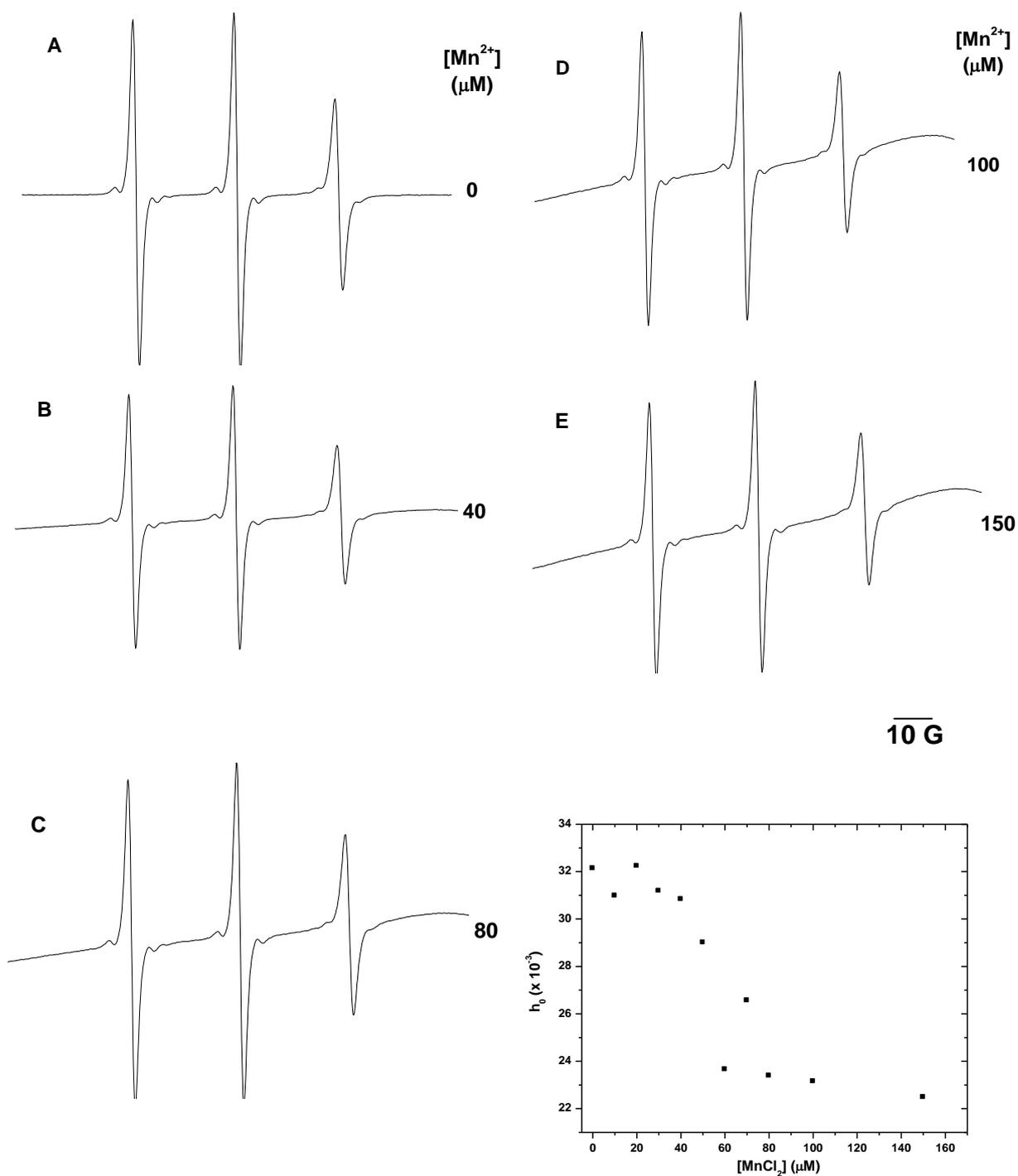


Figura 44. (A-E): Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 66,0 μM em função da concentração de $MnCl_2$, em água deionizada, pH 5,0. (F): Amplitude do pico de campo central em função da concentração de Mn^{2+} .

Para uma redução de 25% do sinal, de acordo com a figura 15, o valor de $C/\delta H_0$ corresponde a cerca de 0,2. Sendo δH_0 a largura pico-a-pico da linha de campo central na ausência da interação = 1,07 G, tem-se que $C = 0,2$. No caso do

Mn^{2+} , $\mu = 4,64 \times 10^{-20}$ erg G^{-1} (calculado a partir dos parâmetros obtidos em Livshits *et al.*, 2001) e usando $T_1 = 10^{-9}$ s (tirado de Livshits *et al.*, 2001), calcula-se que $r = 24$ Å. Esse valor corresponde a uma distância muito maior do que aquela calculada para o Cu^{2+} , sugerindo um sítio distinto de ligação para o Mn^{2+} (resultados de RPE obtidos para espectros de Mn^{2+} sugerem a possibilidade da existência de mais de um sítio, ver abaixo). Nesse caso, como os espectros de CD mostram que os peptídeos mantêm uma conformação ao acaso ao interagir com os íons, provavelmente a distância entre o N-terminal e o(s) sítio(s) de ligação do Mn^{2+} flutua e o valor obtido seria um valor médio. Um sítio possível de ligação para o Mn^{2+} seria o sítio do Zn^{2+} . Sabe-se que esses íons muitas vezes coordenam-se aos mesmos sítios (Deligiannakis *et al.*, 2000).

Os espectros de RPE do grupamento nitróxido deveriam ser menos sensíveis à ligação do Mn^{2+} a um sítio mais distante do N-terminal. De forma análoga ao observado para o Zn^{2+} , os valores de tempo de correlação rotacional deveriam ser pouco afetados pela ligação. As figura 45 e 46 apresentam, respectivamente os valores de τ_B e τ_C , calculados a partir dos espectros obtidos e os valores da relação h_0/h_{-1} em função da concentração de Mn^{2+} . Nota-se que a variação de ambos os parâmetros praticamente inexistente.

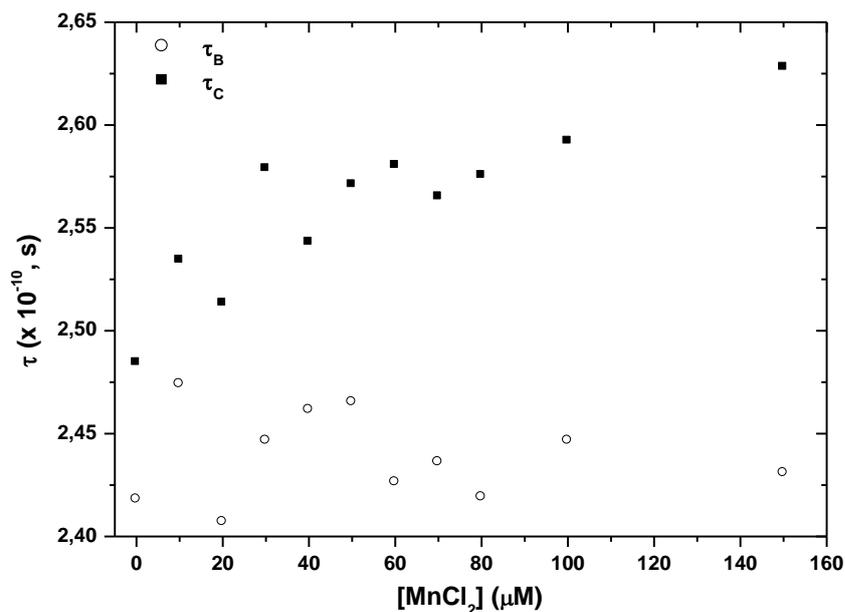


Figura 45. Valores de τ_B e τ_C calculados a partir dos espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 em função da concentração de MnCl₂, em água deionizada, pH 5,0.

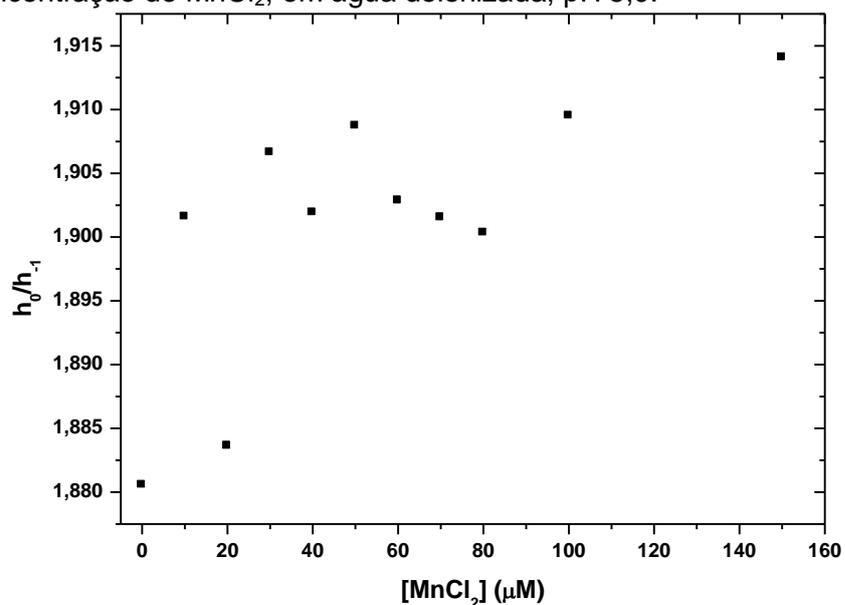


Figura 46. Relação entre as alturas das linhas de campo central e alto (h_0/h_{-1}) calculados a partir dos espectros de TOAC⁰-Hst-5 em função da concentração de MnCl₂ em água deionizada, pH 5,0.

No entanto, estudos dos espectros do íon sugeriram que ocorre interação entre os peptídeos e o Mn²⁺. Os espectros do Mn²⁺ à temperatura ambiente, na ausência e na presença de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 são mostrados nas figuras 47, 48 e 49, respectivamente. O manganês tem 6 linhas espectrais, devido à interação entre o spin nuclear e o spin eletrônico. Sendo o spin nuclear, I, do Mn²⁺ 5/2, tem-se que o número de linhas espectrais = 2I + 1 = (2 · 5/2) + 1 = 6.

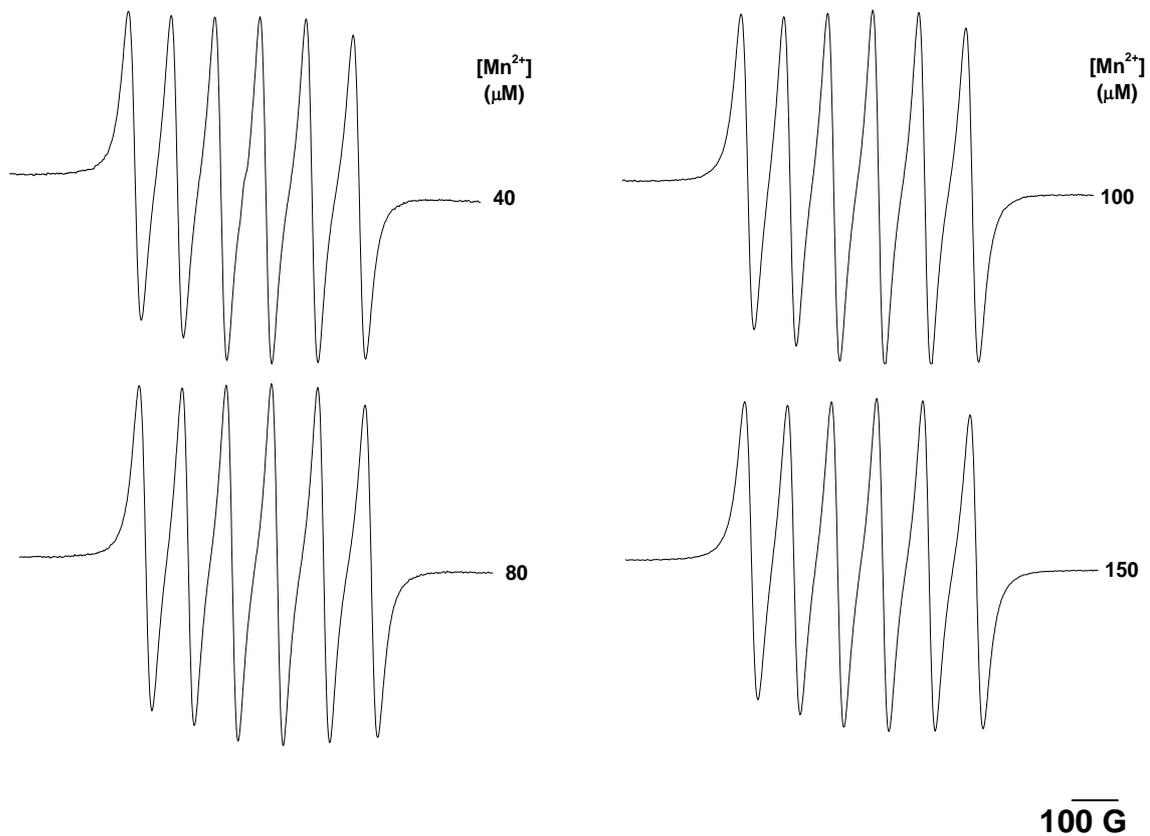


Figura 47. Espectros de RPE de Mn^{2+} na ausência de peptídeo, em água deionizada, pH 5,0.

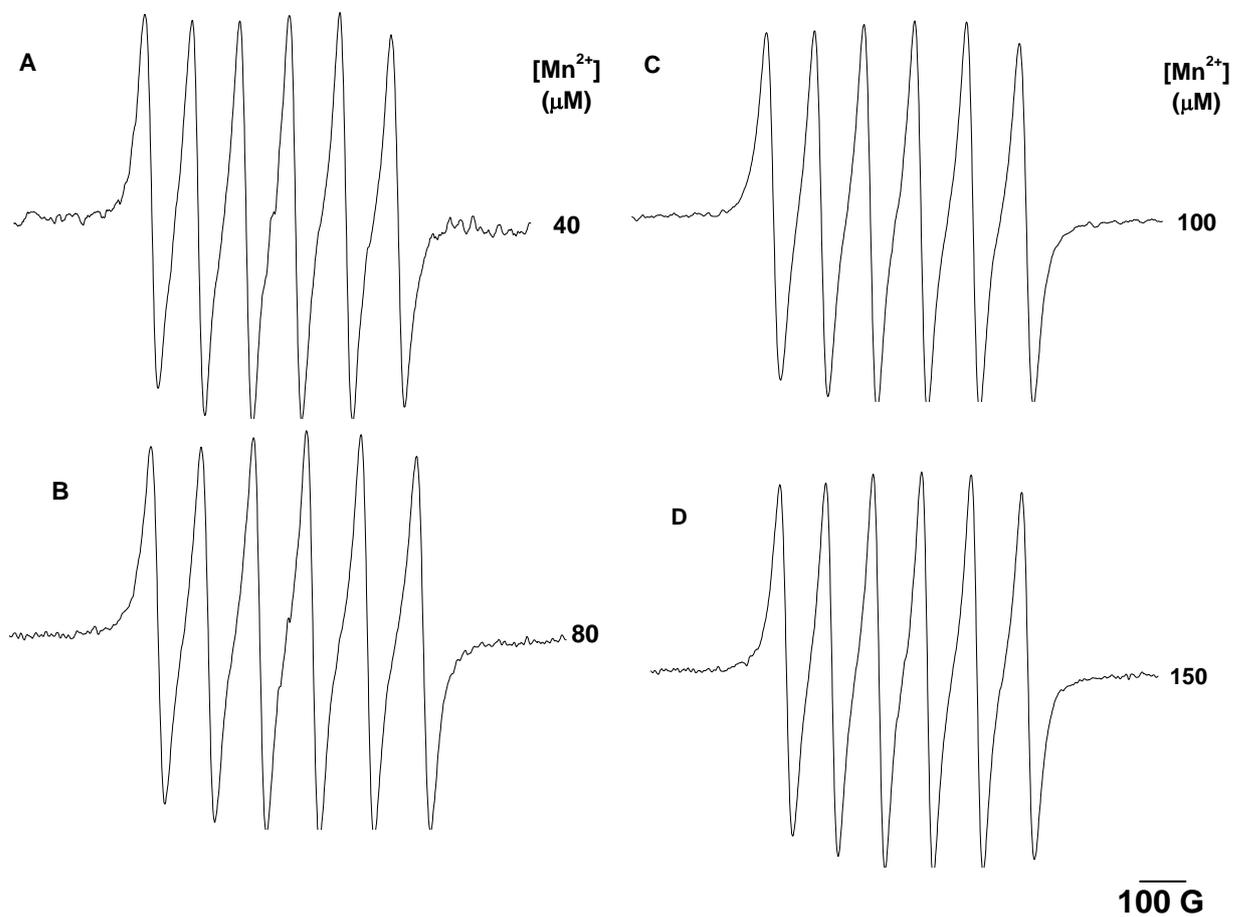


Figura 48. Espectros de RPE de Mn^{2+} na presença de Hst-5 60,0 μM , em água deionizada, pH 5,0.

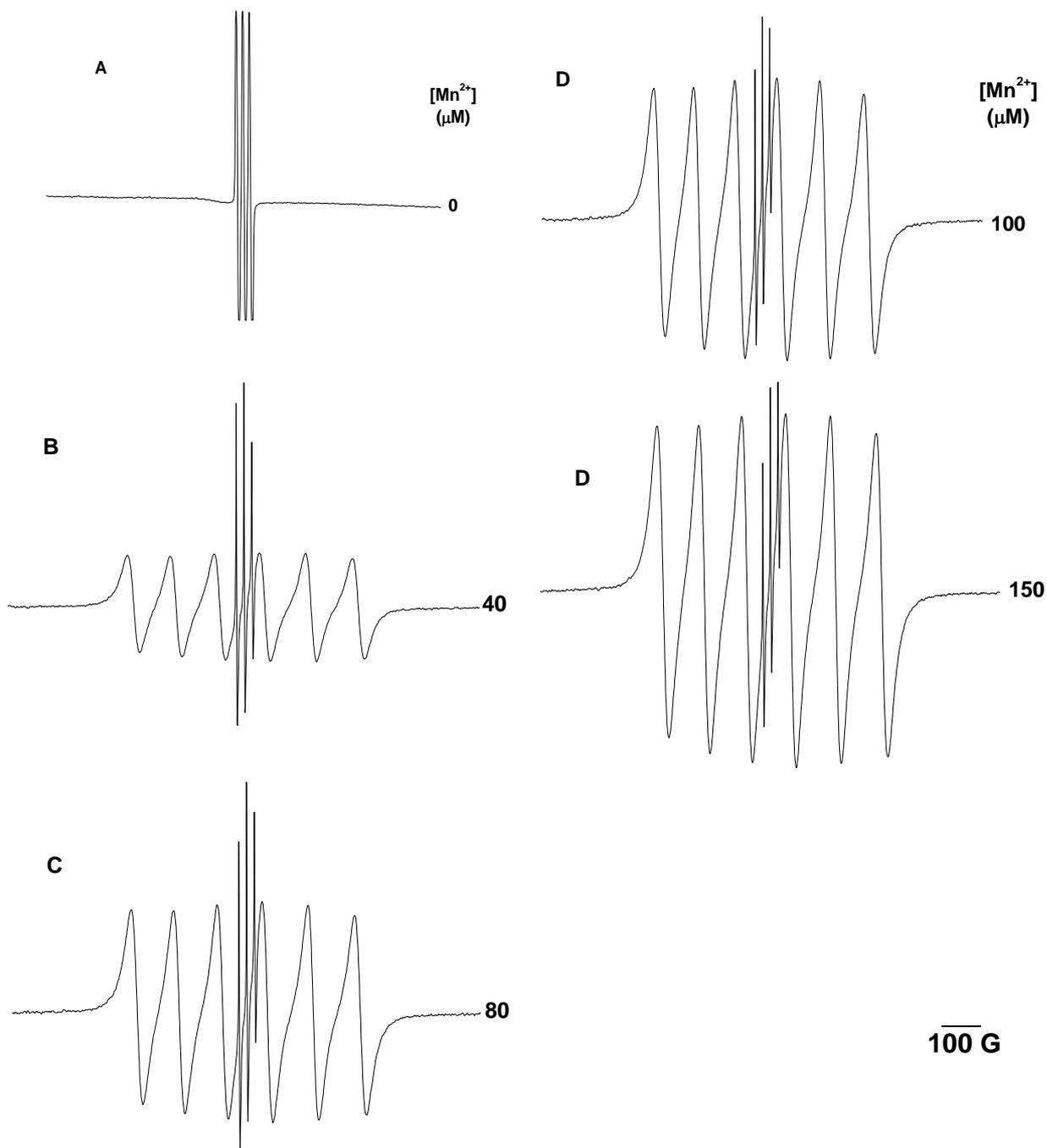


Figura 49. Espectros de RPE de Mn^{2+} na presença de $TOAC^0$ -Hst-5 $66,0 \mu M$, em água deionizada, pH 5,0.

A figura 50A mostra as alturas da linha de campo alto dos espectros de Mn^{2+} , na ausência e na presença dos peptídeos. Na presença dos peptídeos, a intensidade do espectro cai consideravelmente, sugerindo que, não se observa o espectro do íon ligado. Tentativas de avaliar a quantidade de Mn^{2+} ligado através da subtração das intensidades medidas nos espectros em presença dos peptídeos

daquelas medidas em ausência dos mesmos mostraram um aumento contínuo de Mn^{2+} ligado (figura 50B). Este resultado contrasta com os obtidos para Cu^{2+} e Zn^{2+} , onde foi obtida uma saturação sugestiva de estequiometria 1:1. Vale notar também, que as variações de fluorescência (figura 36C e 36D), embora pequenas, também sugerem uma estequiometria de 1:1 para a interação entre os peptídeos e o Mn^{2+} . Não temos no momento, uma explicação para os resultados obtidos com os espectros de RPE de Mn^{2+} .

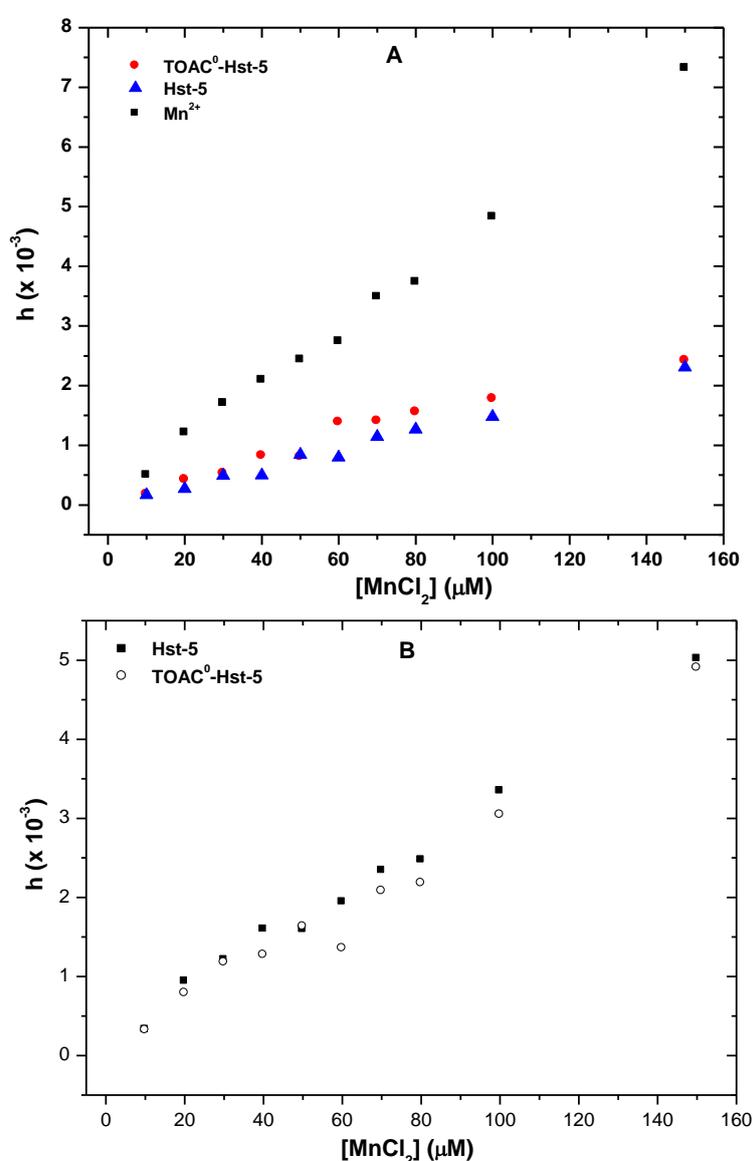


Figura 50. (A) Alturas da linha de campo alto dos espectros de Mn^{2+} na ausência e na presença de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 em função da concentração de Mn^{2+} . (B) Valores obtidos da subtração dos valores de intensidade dos espectros em presença dos peptídeos daqueles obtidos na ausência dos mesmos em função da concentração de Mn^{2+} .

Utilizando os resultados obtidos através de fluorescência (figura 36), e de RPE para o Cu^{2+} , (figura 40) e para o Zn^{2+} (figura 43) foram calculadas as constantes de ligação dos íons metálicos aos peptídeos, assumindo uma estequiometria de 1:1 (tabela VII). Gusman e colaboradores (2001c), utilizando titulação calorimétrica isotérmica (ITC), obtiveram curvas em pH 7,4 que foram analisadas de acordo com dois modelos – de um único sítio e de sítios múltiplos. Na tabela VII são apresentadas as constantes das curvas que indicavam estequiometria 1:1 (Gusman *et al.*, 2001c).

Tabela VII. Constantes de ligação (M^{-1}) dos íons Cu^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} a Hst-5 e TOAC^0 -Hst-5 obtidas através dos espectros de fluorescência (Hst-5) e RPE (TOAC^0 -Hst-5) em água deionizada, pH 5,0. As constantes obtidas através de ITC foram obtidas por Gusman e colaboradores (2001c) em pH 7,4.

Íon metálico	Hst-5		TOAC^0 -Hst-5	
	Fluorescência	ITC	Fluorescência	RPE
Cu^{2+}	$5,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^7$	$6,4 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$
Mn^{2+}	$5,3 \times 10^4$	-	$3,4 \times 10^4$	-
Zn^{2+}	$8,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$8,1 \times 10^4$	$3,8 \times 10^4$

Foram também obtidos espectros de CD de amostras contendo os íons e os peptídeos na proporção molar 1:1 a fim de verificar eventuais mudanças conformacionais induzidas pela complexação. A figura 51 mostra que na presença de íons metálicos não foi observada aquisição de estrutura secundária em nenhum caso, sendo os espectros característicos de estruturas ao acaso.

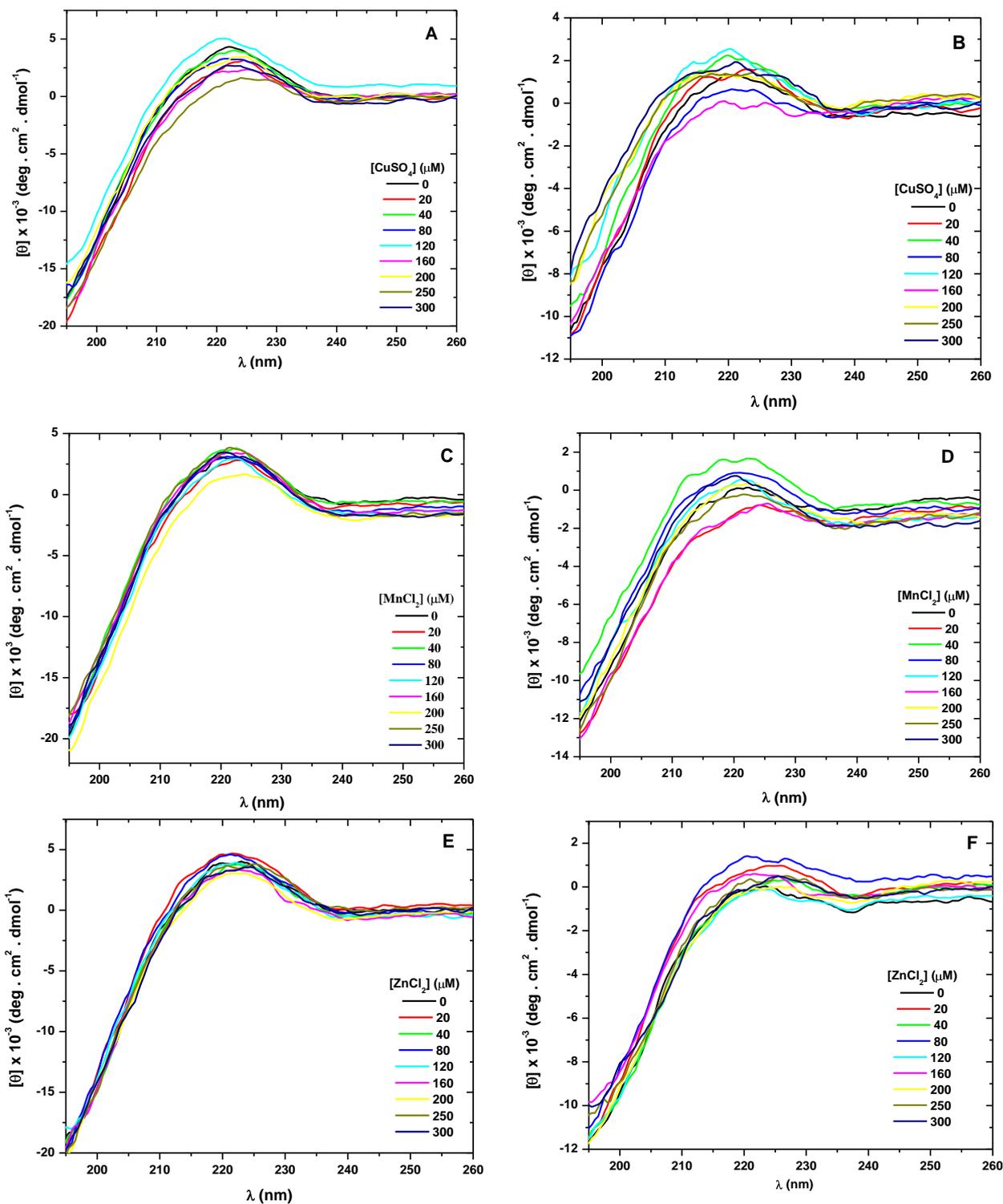


Figura 51. Espectros de CD de Hst-5 (A, C, E) e TOAC⁰-Hst-5 (B, D, F), na presença de Cu²⁺ (A, B), Mn²⁺ (C, D) e Zn²⁺ (E, F), em água deionizada, pH 5,0. Concentrações: Hst-5 e Cu²⁺, 70,0 μM; TOAC⁰-Hst-5 e Cu²⁺, 72,0 μM; Hst-5 e Mn²⁺, 70,0 μM; TOAC⁰-Hst-5 e Mn²⁺, 65,0 μM; Hst-5 e Zn²⁺, 75,0 μM; TOAC⁰-Hst-5 e Zn²⁺, 79,0 μM.

4.1.2. ESTUDOS COM MEMBRANAS MODELO

4.1.2.1 MICELAS

Os estudos na presença de micelas foram realizados em pH 3,5, onde Hst-5 tem carga teórica +13,8 e TOAC⁰-Hst-5, +13,2. As micelas foram preparadas utilizando os lisofosfolípidios LPC (zwitteriônico), LPC:LPG (2:1, mol:mol, carga superficial negativa) e LPG (carga superficial negativa), de forma a verificar a influência de interações eletrostáticas para a ligação dos peptídeos a sistemas biomiméticos.

A figura 52 mostra espectros de fluorescência da forma fenólica ($\lambda_{exc}=275$ nm) de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 na presença de concentrações crescentes de micelas com as composições acima indicadas. À medida que aumenta a concentração de micelas, ocorre aumento da intensidade de fluorescência, mostrando que os resíduos de Tyr encontram-se em ambiente mais apolar em decorrência da ligação do peptídeo às micelas.

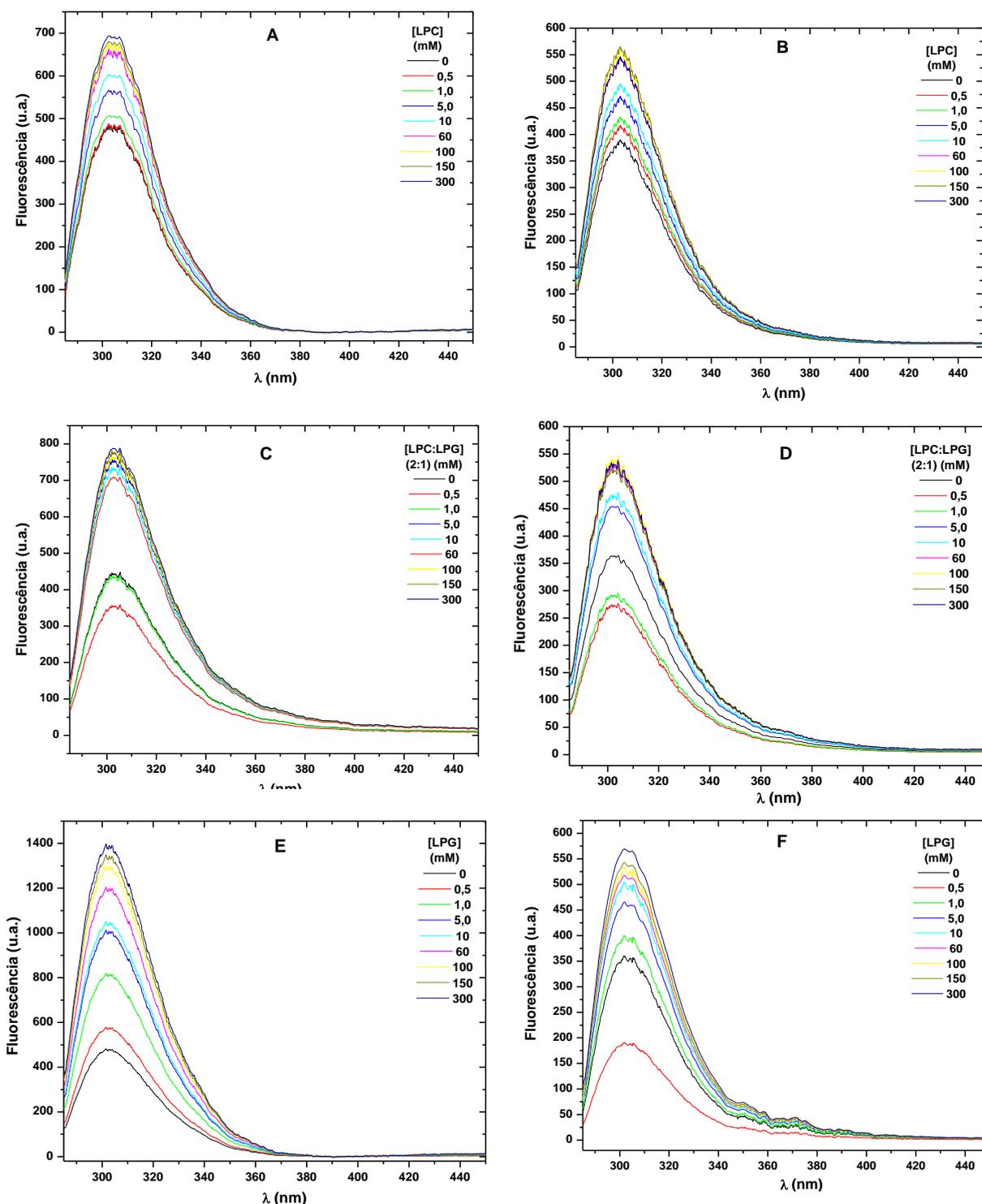


Figura 52. Espectros de fluorescência de Hst-5 23,0 μM (A, C, E) e TOAC⁰-Hst-5 27,0 μM (B, D, F) em função da concentração de micelas de LPC (A, B), LPC:LPG (2:1) (C, D) e LPG (E, F), em tampão PBC 5,0 mM, $\lambda_{\text{exc}}=275$ nm.

As variações de intensidade de fluorescência diferem para cada tipo de micela, refletindo diferentes graus de interação (figura 52). Na figura 53 são apresentadas as variações obtidas. Para Hst-5, foi observado que a intensidade de

emissão de fluorescência aumenta em 1,35 vezes para as micelas de LPC, 1,65 vezes para as micelas de LPC:LPG (2:1) e 2,7 vezes para as micelas de LPG, indicando que a interação ocorre na ordem $LPG > LPC:LPG (2:1) > LPC$. Para TOAC⁰-Hst-5, a variação foi de cerca de 1,4 vezes, para todas as composições lipídicas. Provavelmente, esse fenômeno ocorre devido a mudanças conformacionais do peptídeo quando da interação com as micelas, que aproxima o grupamento nitróxido dos resíduos de Tyr, acarretando em supressão de fluorescência e levando, portanto, a um menor aumento do que o observado para o peptídeo nativo.

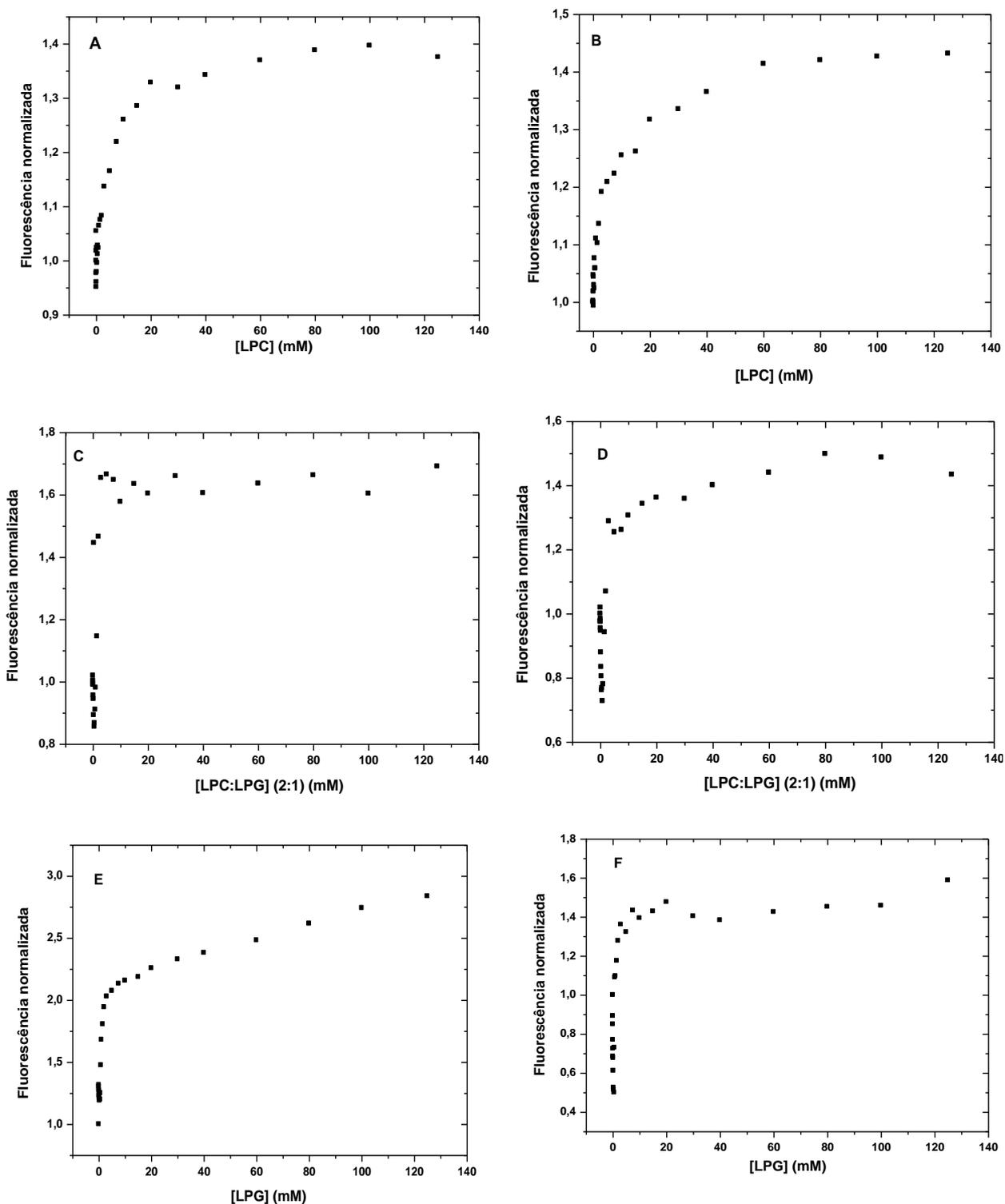


Figura 53. Fluorescência normalizada de Hst-5 (A, C, E) e TOAC⁰-Hst-5 (B, D, F) em função da concentração de micelas de LPC (A, B), LPC:LPG (2:1) (C, D) e LPG (E, F), em tampão PBC 5,0 mM, $\lambda_{exc}=275$ nm

Ainda na figura 53, nota-se que, em baixas concentrações de lisofosfolípidios, ocorre diminuição da intensidade de fluorescência. A região correspondente a baixas

concentrações de micelas foi expandida e o resultado pode ser visto na figura 54. O fenômeno observado pode ser atribuído ao fato de monômeros de detergente ligarem-se ao peptídeo, formando agregados. Em micelas de LPC, esse fenômeno é menos acentuado, pois nesse caso as micelas são zwitteriônicas. Pode-se observar também que, quando é atingida a concentração de 0,5 mM de detergente, a intensidade de fluorescência começa a aumentar, como esperado. Em micelas de LPC:LPG (2:1), essa concentração corresponde a aproximadamente 0,17 mM de cargas negativas, e em micelas por LPG, são 0,5 mM de cargas negativas. Levando-se em conta a concentração dos peptídeos no experimento e a carga teórica em pH 3,5 - 20 μ M e + 13,8 para Hst-5 e 27 μ M e +13,2 para TOAC⁰-Hst-5 - temos que Hst-5 apresenta 0,28 mM de cargas positivas e TOAC⁰-Hst-5, 0,36 mM, mostrando que quando as cargas do peptídeo e do lipídio são aproximadamente iguais, ocorre a formação de agregados. Quando a concentração de cargas negativas das micelas supera em muito a carga positiva dos peptídeos, o efeito hidrofóbico faz com que ocorra a formação de micelas, com a subsequente ligação dos peptídeos às mesmas.

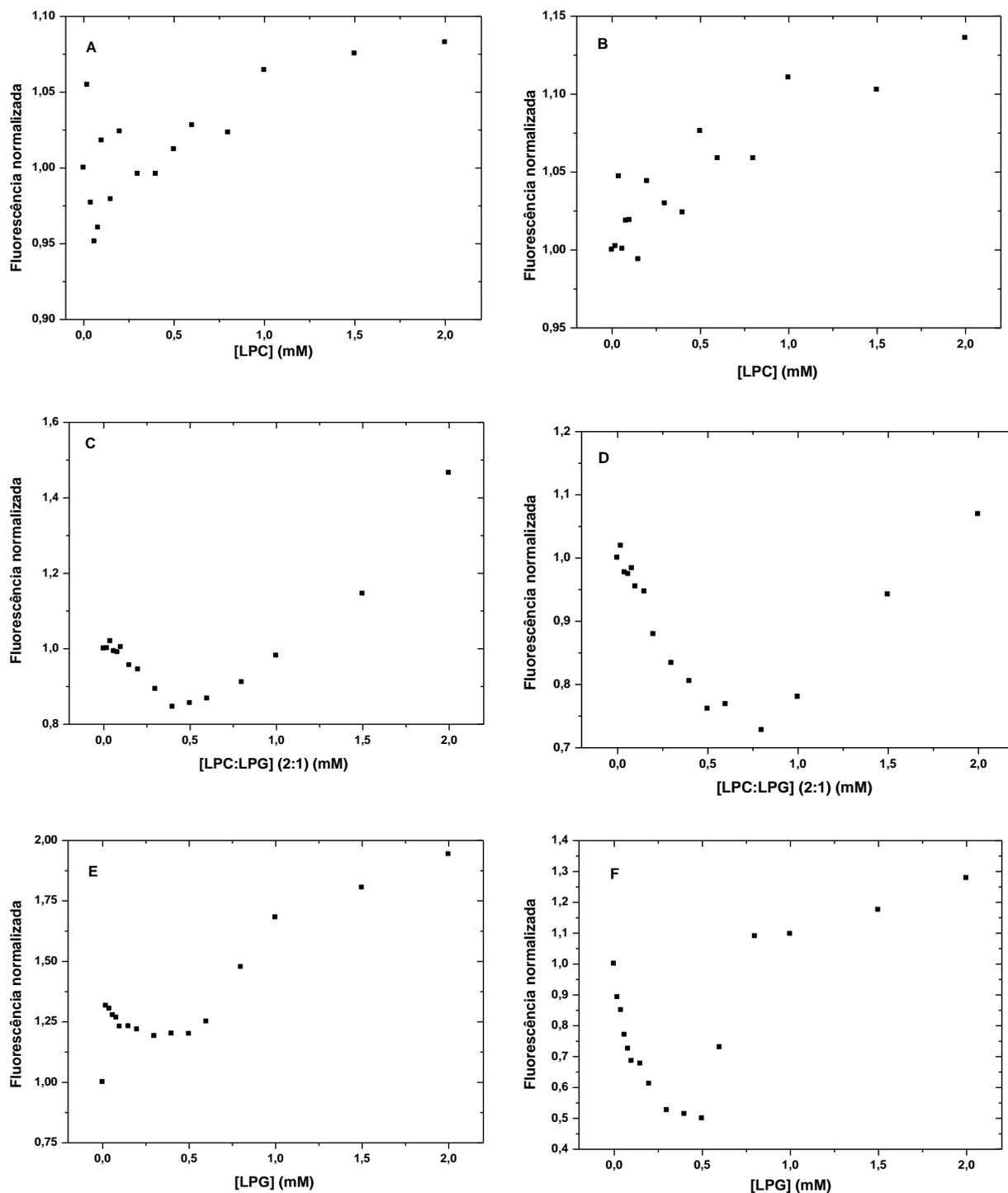
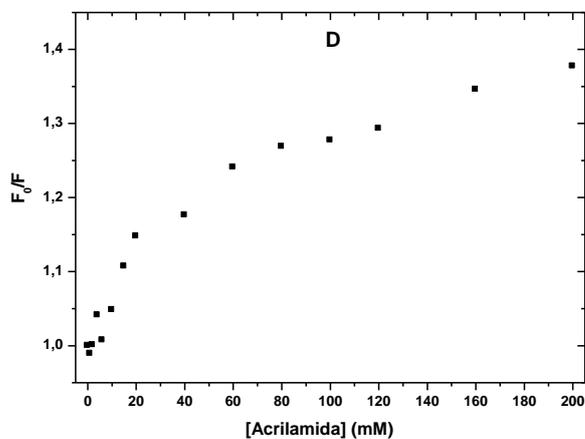
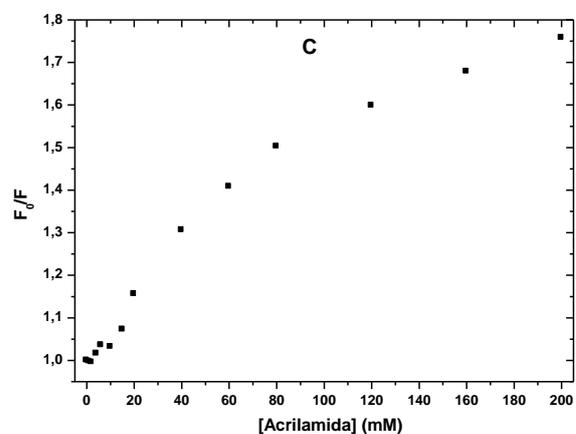
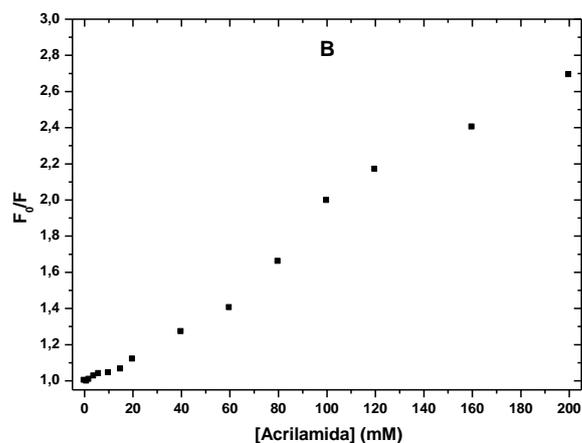
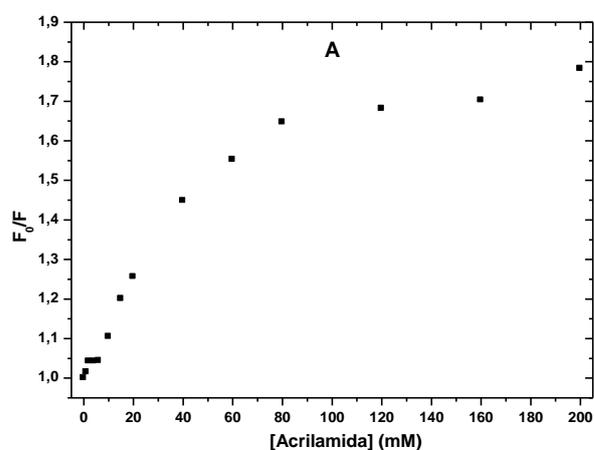


Figura 54. Expansão dos resultados da Figura 52 para a região de concentração 0 – 2 mM de micelas.

Para verificar o grau de inserção dos resíduos de Tyr, foram realizados estudos de supressão de fluorescência com acrilamida. Observa-se, na figura 55, que, em micelas de LPC e LPC:LPG (2:1) ocorre desvio negativo na reta de Stern-

Volmer, sugerindo a presença de duas populações de fluoróforos, que podem ser constituídas de (i) duas populações de peptídeos, ou (ii) um dos resíduos de Tyr estar mais exposto ao supressor e o outro resíduo mais inserido na micela. Esse fato não é notado em micelas constituídas apenas de LPG, mostrando que todo o peptídeo está ligado à micelas, ou que ambos os resíduos de Tyr estão igualmente acessíveis ao supressor.



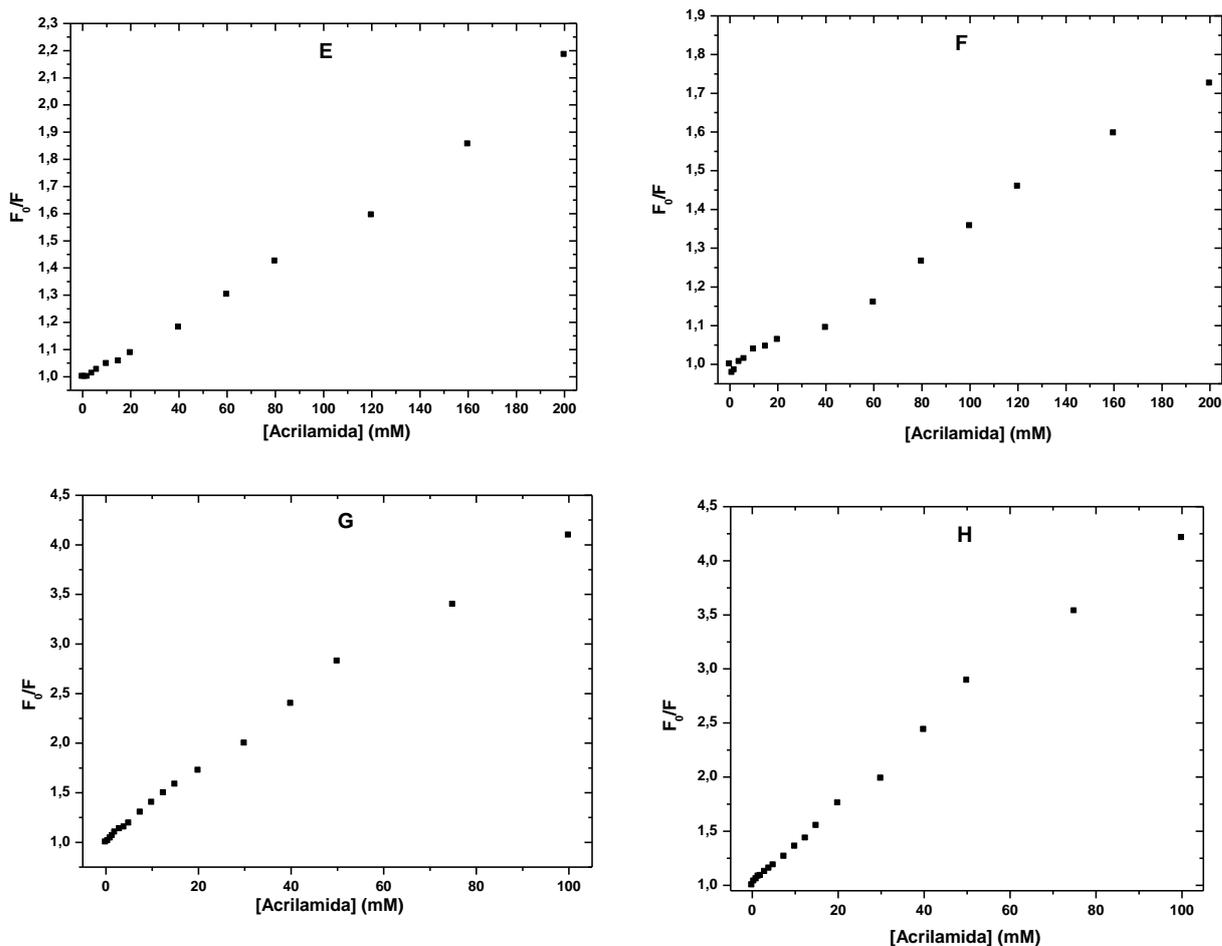


Figura 55. Relação F_0/F em função da concentração de acrilamida para Hst-5 (A, C, E) e TOAC⁰-Hst-5 (B, D, F) na presença de 300 mM de micelas compostas de LPC (A, B), LPC:LPG (2:1) (C, D) e LPG (E, F) e em tampão PBC 5,0 mM, pH 3,5 (G, H).

A partir da figura 55, foram calculadas as constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) para cada uma das situações (tabela VIII). Nos casos em que as curvas sugeriam duas populações de fluoróforos, foram calculadas as constantes de Stern-Volmer para as duas populações. As retas traçadas sempre passaram pelo ponto $x = 0$, $y = 1$. Em todos os casos, as constantes na presença de 300 mM de micelas de quaisquer composições lipídicas são menores do que em solução, mostrando que os resíduos de Tyr estão menos acessíveis à acrilamida. Em todos os casos, as constantes de Stern-Volmer apontam para uma maior interação dos peptídeos com micelas de LPG, seguida por micelas de LPC:LPG (2:1) e, por fim, micelas de LPC.

Tabela VIII. Constantes de Stern-Volmer (K_{SV} , M^{-1}) calculadas para Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5, em tampão PBC 5,0 mM, pH 3,5 e na presença de 300 mM de micelas de diferentes composições lipídicas e em tampão PBC 5 mM, pH 3,5.

Micelas	Hst-5	TOAC⁰-Hst-5
LPC	0,00852	0,00891
	0,00399	0,00683
LPC:LPG (2:1)	0,00675	0,00766
	0,00396	0,00417
LPG	0,00566	0,00374
Solução	0,03162	0,03309

Para TOAC⁰-Hst-5 foram também realizados estudos através de RPE. Os espectros do peptídeo na presença de micelas de LPC, LPC:LPG (2:1) e LPG são mostrados nas figuras 56, 57 e 58, respectivamente.

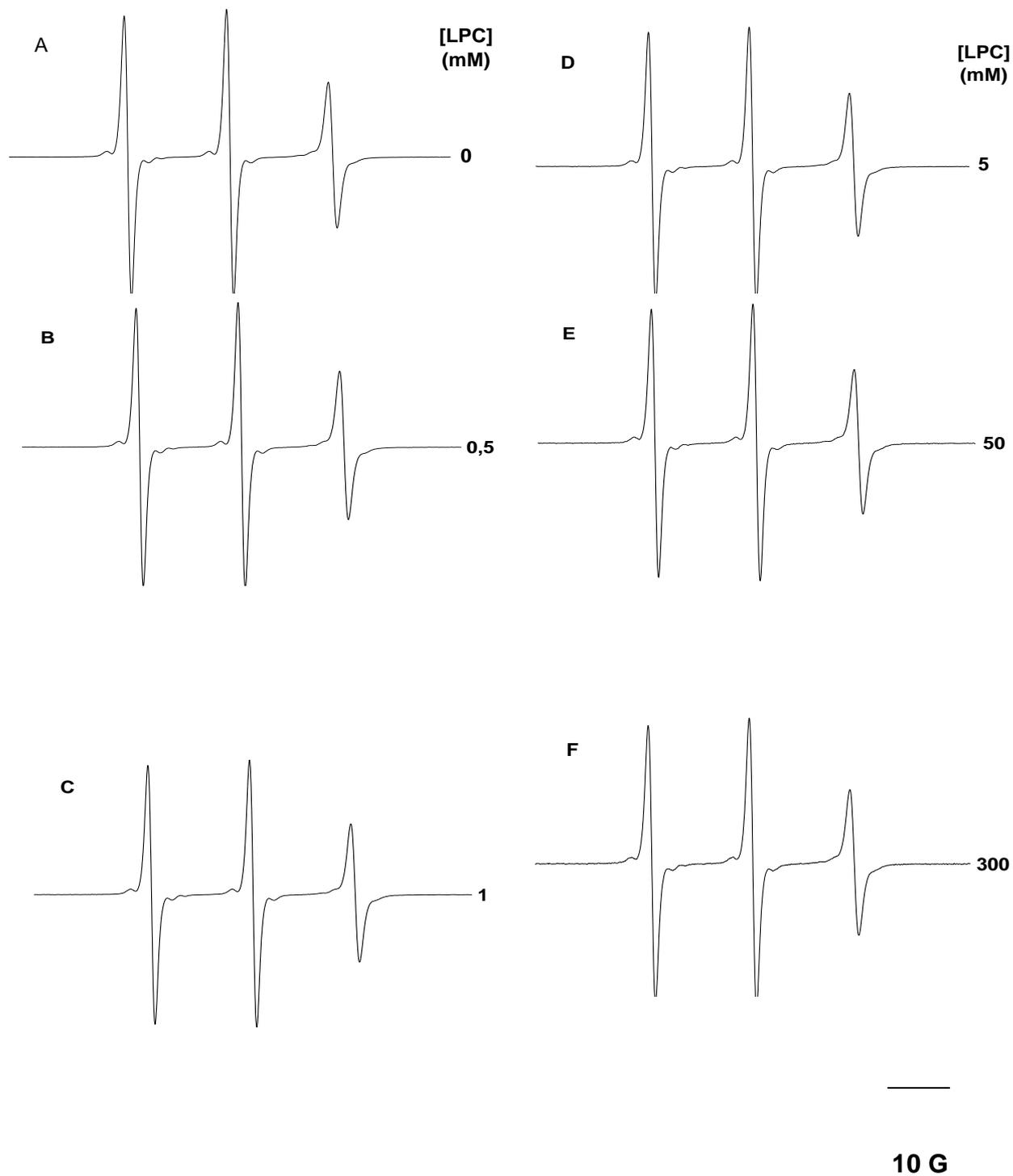


Figura 56. Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 50,0 μ M na presença de micelas de LPC, em tampão PBC 5,0 mM, pH 3,5.

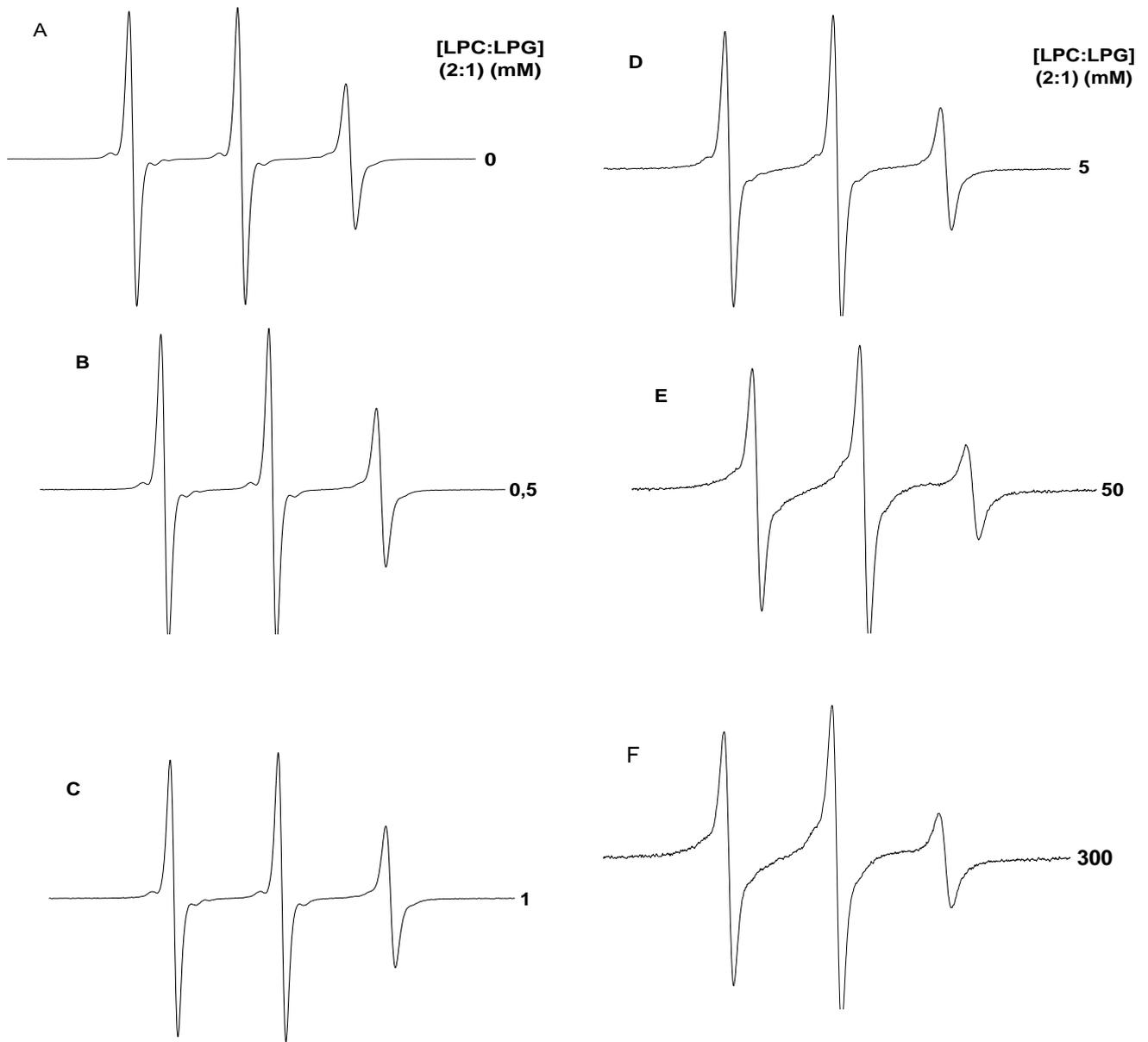


Figura 57. Espectros de RPE da TOAC⁰-Hst-5 50,0 μ M na presença de micelas de LPC:LPG (2:1), em tampão PBC 5,0 mM, pH 3,5.

10 G

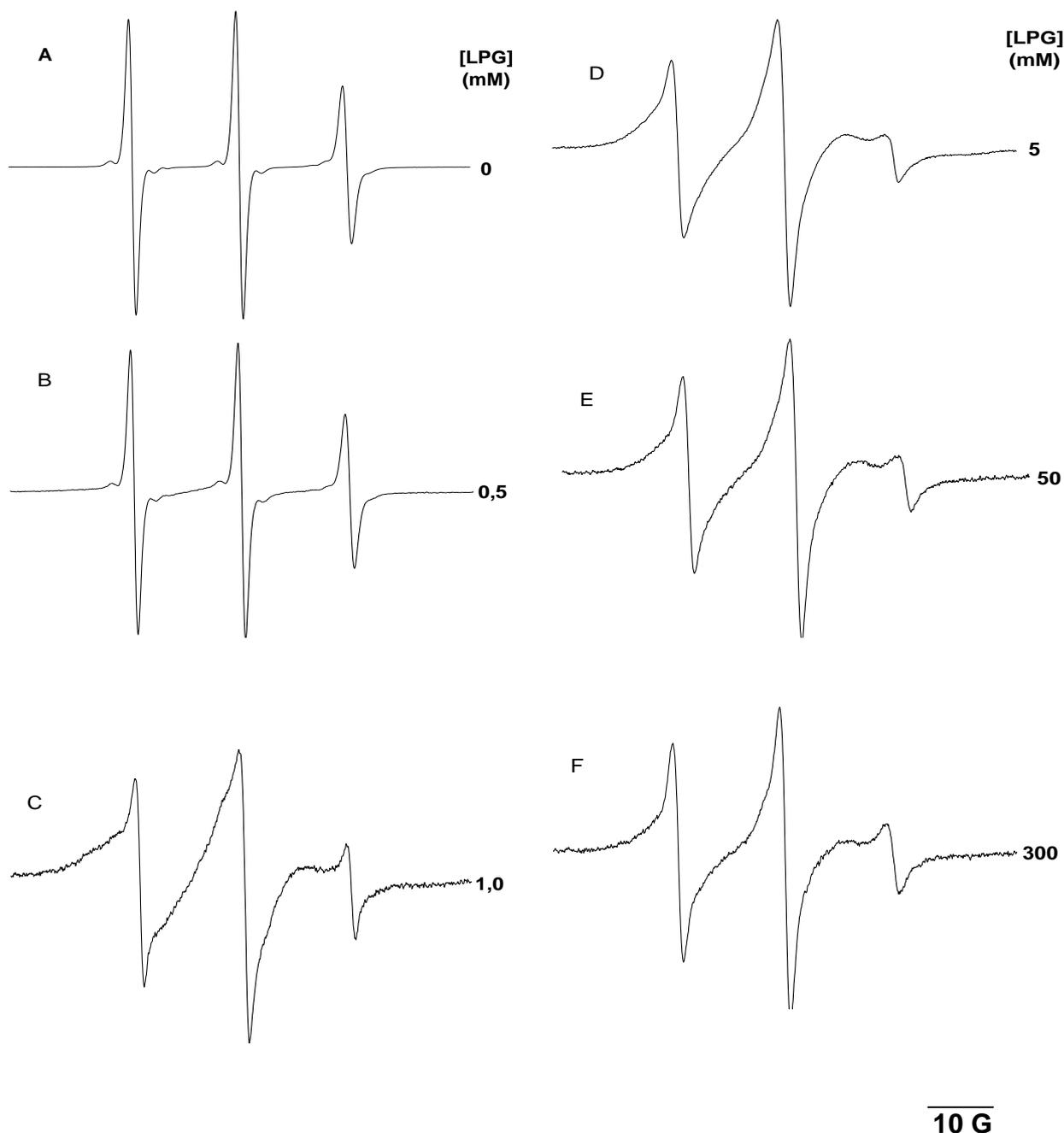


Figura 58. Espectros de RPE da TOAC⁰-Hst-5 50,0 μ M na presença de micelas de LPG, em tampão PBC 5,0 mM, pH 3,5.

Os espectros obtidos evidenciam duas componentes espectrais, uma, de linhas estreitas, devida ao peptídeo em meio aquoso, e outra, de linhas alargadas, devida ao peptídeo ligado às micelas. Pode-se notar ainda que, como apontado pelos resultados de fluorescência, a interação é maior com micelas de LPG, seguida pelas micelas de LPC:LPG (2:1), e, posteriormente, por micelas de LPC.

Dos espectros obtidos na presença de 300 mM de micelas de LPC:LPG (2:1) e LPG foram subtraídos 5% e 3%, respectivamente, dos espectros do peptídeo não ligado, resultando nos espectros da figura 59. Esse procedimento foi de difícil execução para as micelas de LPC, provavelmente porque a quantidade de peptídeo ligado era muito pequena. Apesar de restar uma pequena contribuição do marcador livre, vê-se que os espectros da figura 59 são semelhantes aos obtidos para outros peptídeos marcados ligados a micelas (Pertinhez *et al.*, 1995, 1997), bem como aos de sondas lipídicas nesses agregados, refletindo o movimento do marcador na micela e da micela como um todo (Schreier *et al.*, 1978b; Liang *et al.*, 1993).

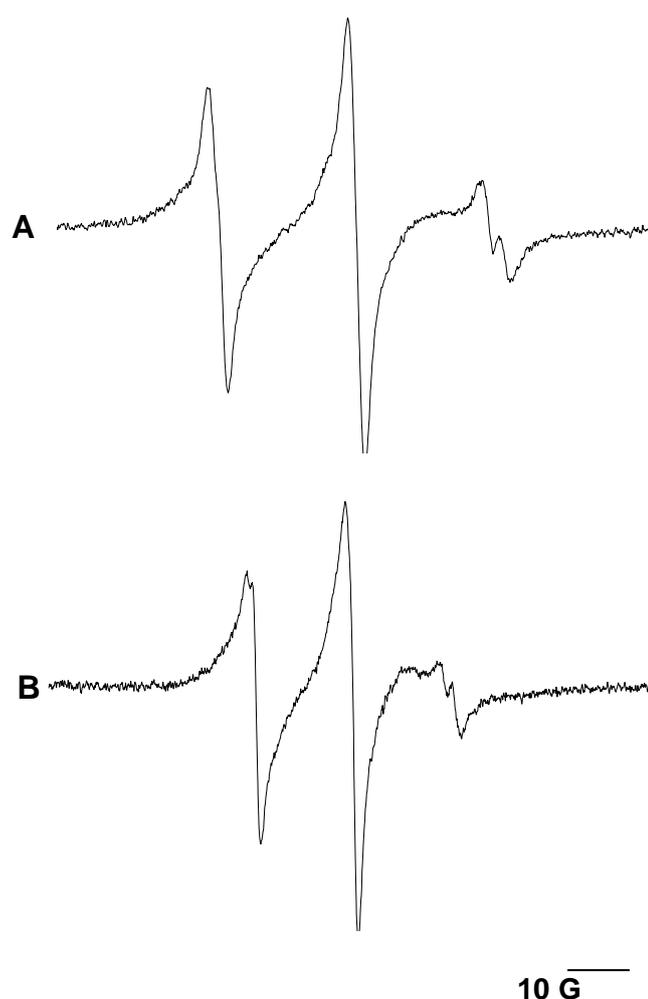


Figura 59. Espectros resultantes da subtração do espectro de TOAC⁰-Hst-5 livre em solução dos espectros obtidos em presença de 300 mM de (A) LPC:LPG (2:1) e (B) LPG em tampão PBC 5 mM, pH 3,5.

Um aspecto interessante ocorre na presença de micelas de LPG, onde, na presença de 800 μM de detergente, ocorre formação de um agregado entre o peptídeo e monômeros de lisofosfolípido, resultando em uma estrutura onde o peptídeo tem menor mobilidade do que na micela (figura 58C). Comparando-se a subtração na figura 59B com a da figura 60B, podem-se notar as diferenças entre os dois espectros. Essa situação ocorre apenas na presença de LPG, nas condições mencionadas, uma vez que em pH 3,5, 50 μM de TOAC⁰-Hst-5 possui 660 μM de cargas positivas, tendo-se, portanto, uma relação próxima a 1:1 entre as cargas do peptídeo e do lipídio. Com a adição de mais lisofosfolípido, ocorre a formação de micelas, com o peptídeo ligando-se essas estruturas. Esses resultados são análogos aos observados nos estudos de fluorescência. Subtraindo 3% do espectro do peptídeo livre em solução do espectro na presença de 800 μM de LPG, obtém-se o espectro do peptídeo no agregado (figura 60).

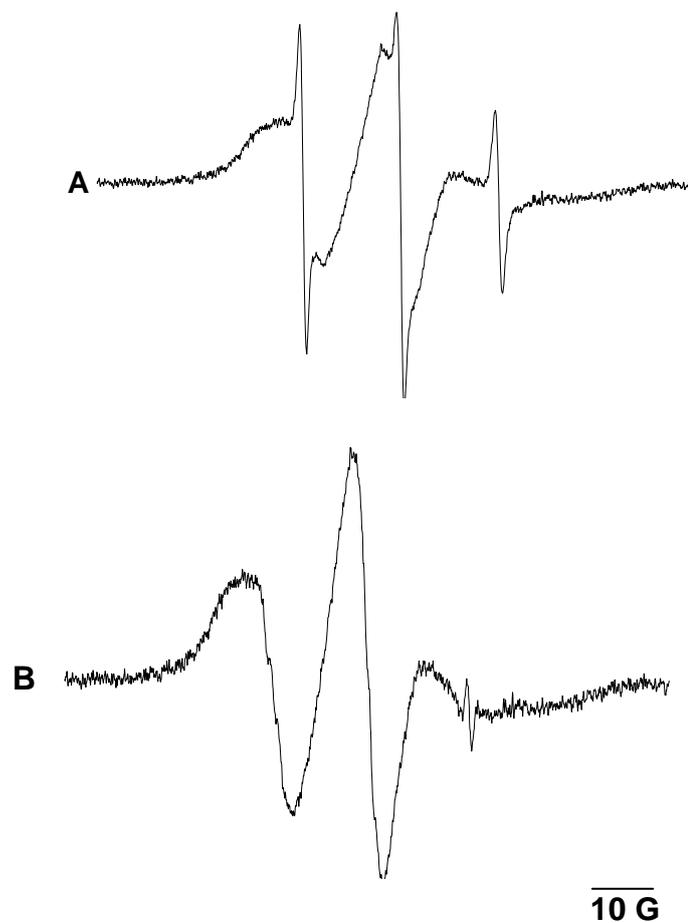
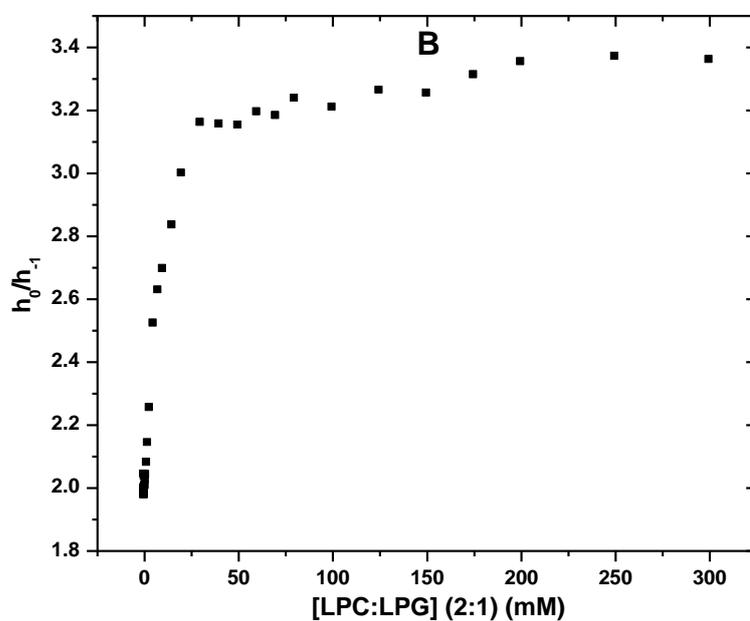
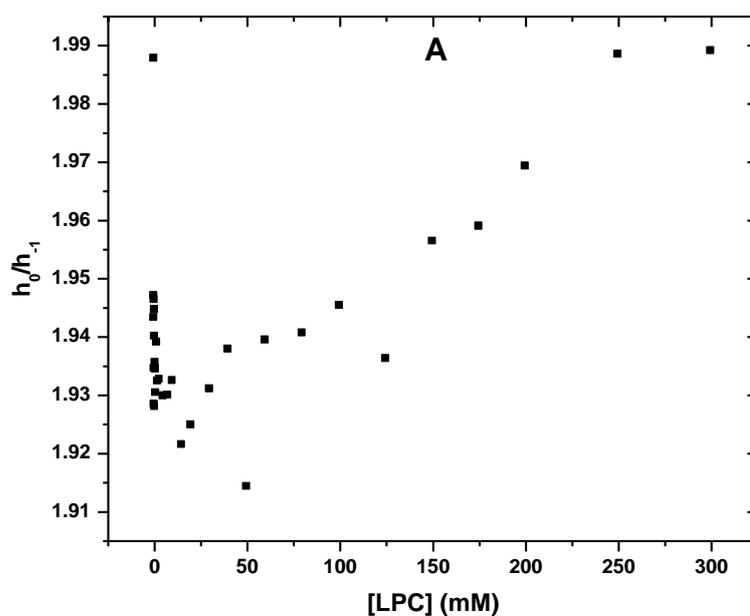


Figura 60. Espectro de TOAC⁰-Hst-5 na presença de 0,8 mM de LPG (A) e espectro obtido pela subtração do espectro de TOAC⁰-Hst-5 livre (3%), em tampão PBC 5mM, pH 3,5.

A partir dos espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 (figuras 56 a 58), foram calculados os parâmetros h_0/h_{-1} (figura 61), onde o valor de h_{-1} foi medido para a linha estreita de campo alto, portanto, a que representa prioritariamente a população de peptídeo livre em solução. Pode-se observar que, à medida que a concentração de micelas aumenta, aumenta a relação h_0/h_{-1} . Neste caso, o aumento da relação representa a diminuição da população em solução, isto porque, enquanto o valor de h_{-1} corresponde essencialmente ao marcador em solução, o valor de h_0 engloba a concentração das duas populações de peptídeo, a livre e a ligada. A figura mostra que o peptídeo liga-se em maior proporção às micelas de LPG, e, em seguida, a micelas de LPC:LPG (2:1). Apesar do aumento pequeno no caso de LPC, nota-se que ocorre alguma ligação a essas micelas. Na presença de micelas de LPG (figura

60B), é possível visualizar também a formação do agregado acima citado, pelo aumento de 6,3 vezes na relação h_0/h_{-1} , seguida então pela formação de micelas e subsequente diminuição dessa relação, estabilizando-se em 4,5 vezes da relação inicial.



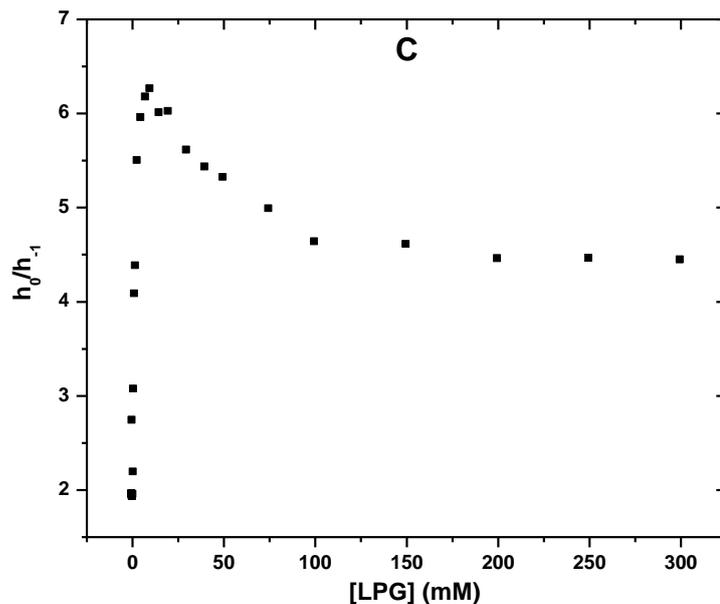


Figura 61. Relação entre as alturas dos picos de campo central e do pico estreito de campo alto (h_0/h_{-1}) obtidas a partir dos espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5, em função da concentração das micelas indicadas. Em (A) LPC, em (B) LPC:LPG (2:1) e em (C) LPG.

Para analisar de forma mais detalhada a contribuição de interações eletrostáticas para a ligação de TOAC⁰-Hst-5 às micelas, foi estudado o efeito do pH na presença de 300 mM de micelas de LPC (figura 62), LPC:LPG (2:1) (figura 63) e LPG (figura 64). Observa-se que, à medida que aumenta o pH, diminui a interação com as micelas, em decorrência da diminuição da carga líquida do peptídeo.

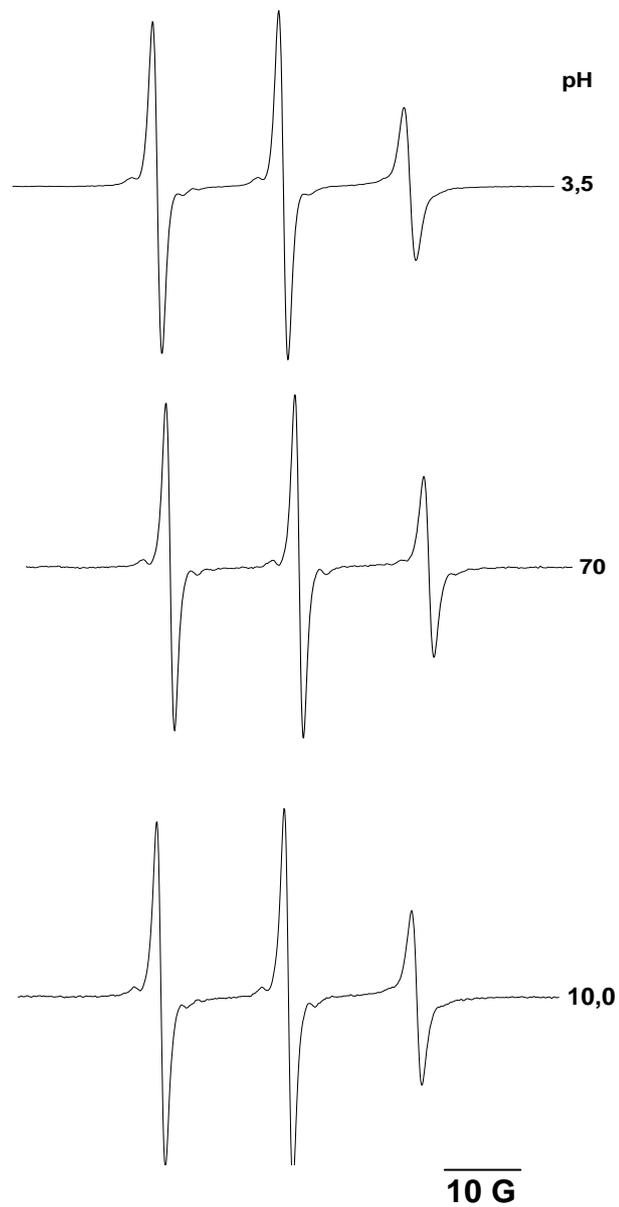


Figura 62. Espectros de RPE da TOAC⁰-Hst-5 45,0 μ M na presença de micelas de LPC, em função do pH, tampão PBC 5,0 mM.

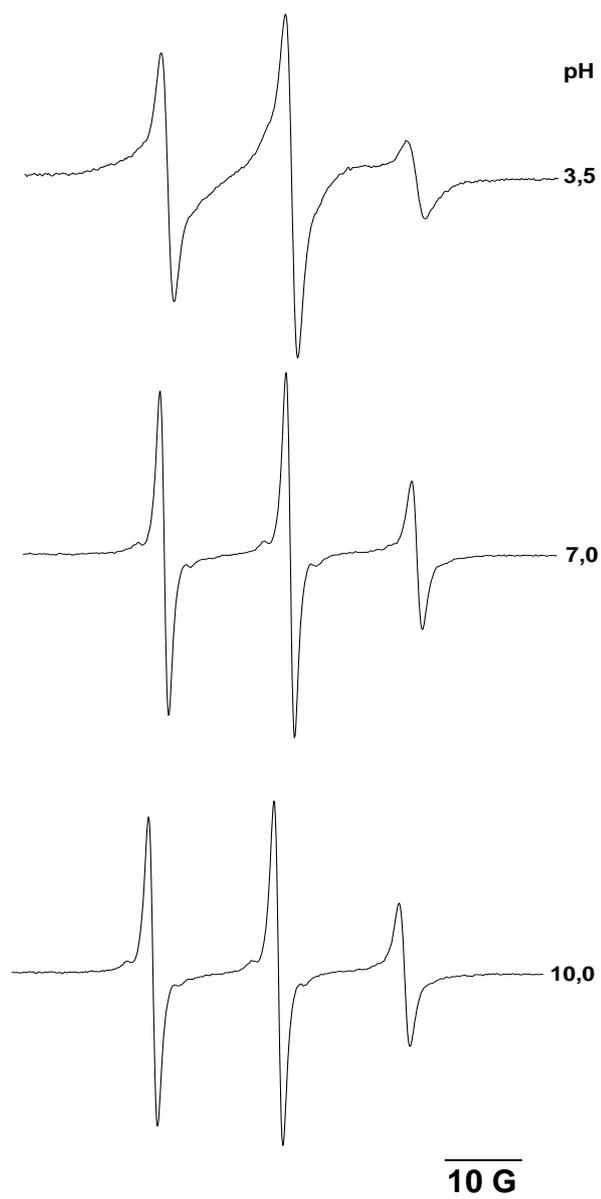


Figura 63. Espectros de RPE da TOAC⁰-Hst-5 45,0 μ M na presença de micelas de LPC:LPG (2:1), em função do pH, tampão PBC 5,0 mM.

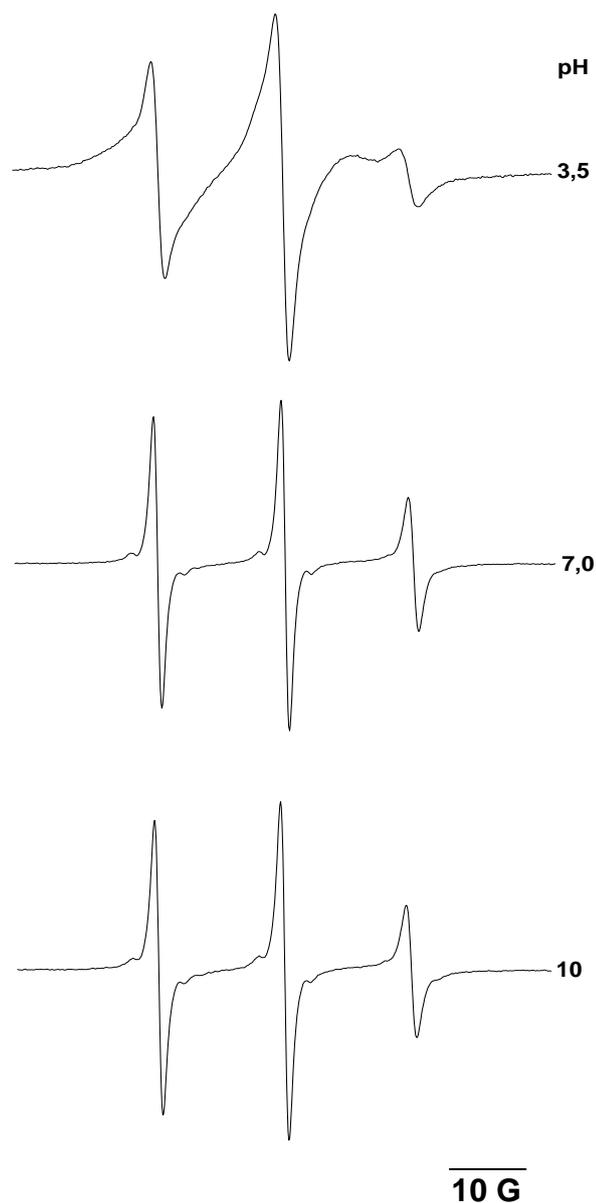


Figura 64. Espectros de RPE da TOAC⁰-Hst-5 45,0 μ M na presença de micelas de LPG, em função do pH, tampão PBC 5,0 mM.

A partir dos resultados experimentais, foi calculada a relação h_0/h_{-1} . A figura 65 mostra claramente a modulação da ligação às micelas pela carga do peptídeo, evidenciando a importância de interações eletrostáticas: em pHs baixos, onde a carga positiva do peptídeo é alta, a relação é alta, indicando maior ligação. Os baixos valores de h_0/h_{-1} na presença de LPC mostram a pouca extensão da ligação a micelas zwitteriônicas.

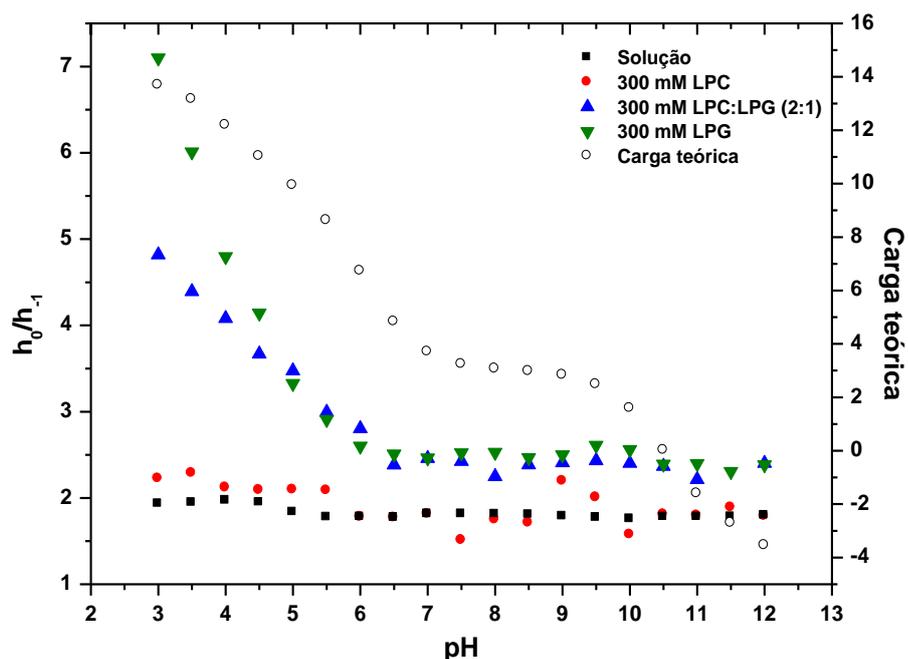


Figura 65. Relação entre as alturas da linha de campo central e da linha estreita de campo (h_0/h_{-1}) obtida a partir dos espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5, em função do pH, na ausência e na presença de 300 mM de micelas de diferentes composições lipídicas, em tampão PBC 5 mM.

Utilizando os resultados de fluorescência representados na figura 53, foram calculadas as constantes de ligação de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 às micelas de diferentes composições lipídicas. Para TOAC⁰-Hst-5, foi calculado o coeficiente de partição, P, (Bianconi e Schreier, 1991) através dos resultados de RPE, utilizando a altura da linha estreita de campo alto, assumindo que essa altura representa exclusivamente o peptídeo em solução, na presença de 100 mM de micelas. P é proporcional à constante de ligação, K_b , através da relação

$$K_b = P \cdot V \quad (15)$$

onde V é o volume molar parcial do lisofosfolípido. As constantes de ligação estão sumarizadas na tabela IX. A maior discrepância no caso de LPC deve-se à imprecisão dos resultados resultante da pouca ligação do peptídeo a essas micelas.

Tabela IX. Constantes de ligação (M^{-1}) de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 à micelas de diferentes composições lipídicas, em tampão PBC 5 mM, pH 3,5.

Micela	Hst-5		TOAC ⁰ -Hst-5
	Fluorescência	Fluorescência	RPE
LPC	$2,25 \times 10^2$	$2,25 \times 10^2$	$3,87 \times 10^1$
LPC:LPG (2:1)	$6,21 \times 10^2$	$5,15 \times 10^2$	$3,41 \times 10^2$
LPG	$7,81 \times 10^2$	$14,90 \times 10^2$	$16,32 \times 10^2$

A aquisição de estrutura secundária na presença de foi avaliada através de estudos de dicroísmo circular. Os espectros apresentam mínimo em torno de 210 nm (figuras 66), indicando que os peptídeos adotam uma estrutura em dobra β tipo I (Perczel e Hollósi, 1996). Situ e colaboradores (2000) já haviam demonstrado que, na presença de micelas de LPG, estruturava-se como uma dobra β . Apesar da pouca extensão da ligação às micelas de LPC evidenciada nos estudos de fluorescência e RPE, os espectros de CD sugerem que a interface micela-tampão oferece condições para que o peptídeo se estruture.

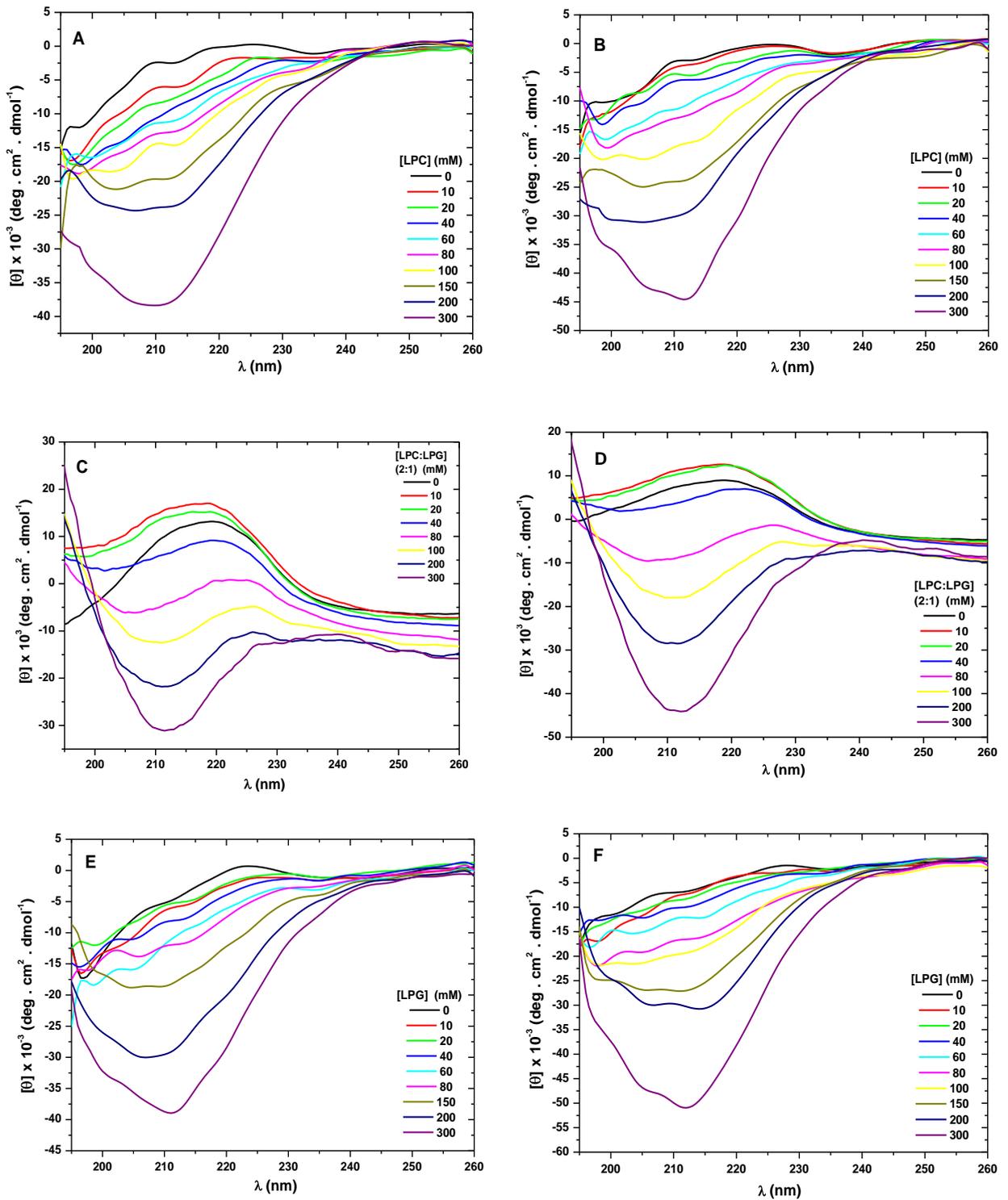


Figura 66. Espectros de CD de Hst-5 50,0 μM (A, C, E) e TOAC^0 -Hst-5 50,0 mM (B, D, F) em função de concentrações crescentes de LPC (A, B), LPC:LPG (2:1) (C, D) e LPG (E, F), em tampão PBC 5,0 mM, pH 3,5.

Utilizando-se do método descrito por Kaur e Raghava (2003), verificou-se que a região com maior propensão a formar a dobra β é a seqüência $\text{H}^7\text{HGY}^{10}$. A

formação dessa dobra corrobora a observação de supressão de fluorescência em presença de micelas (figuras 53B, 53D, 53E), uma vez que essa conformação levaria a uma maior proximidade entre o grupamento nitróxido e a Tyr²⁴.

4.1.2.2 VESÍCULAS UNILAMELARES PEQUENAS (SUV)

Foi estudada a interação entre Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 e membranas modelo, SUV contendo as principais cabeças polares dos lipídios encontrados em membranas de *Escherichia coli* (PE:POPG:CL, 80:15:5) As proporções estão dadas em moles %.

No entanto, os estudos de fluorescência e CD mostraram-se inviáveis, pois os peptídeos induziram agregação das SUV, levando ao espalhamento de luz pelas amostras. Na figura 67 observa-se que, à medida que os peptídeos são titulados com SUV, a intensidade de fluorescência cai, contrariamente ao aumento esperado em decorrência da ligação dos peptídeos às SUV, mostrando que predomina o espalhamento de luz decorrente da agregação. Esse fenômeno predomina mesmo nos pHs 7,0 e 10,0.

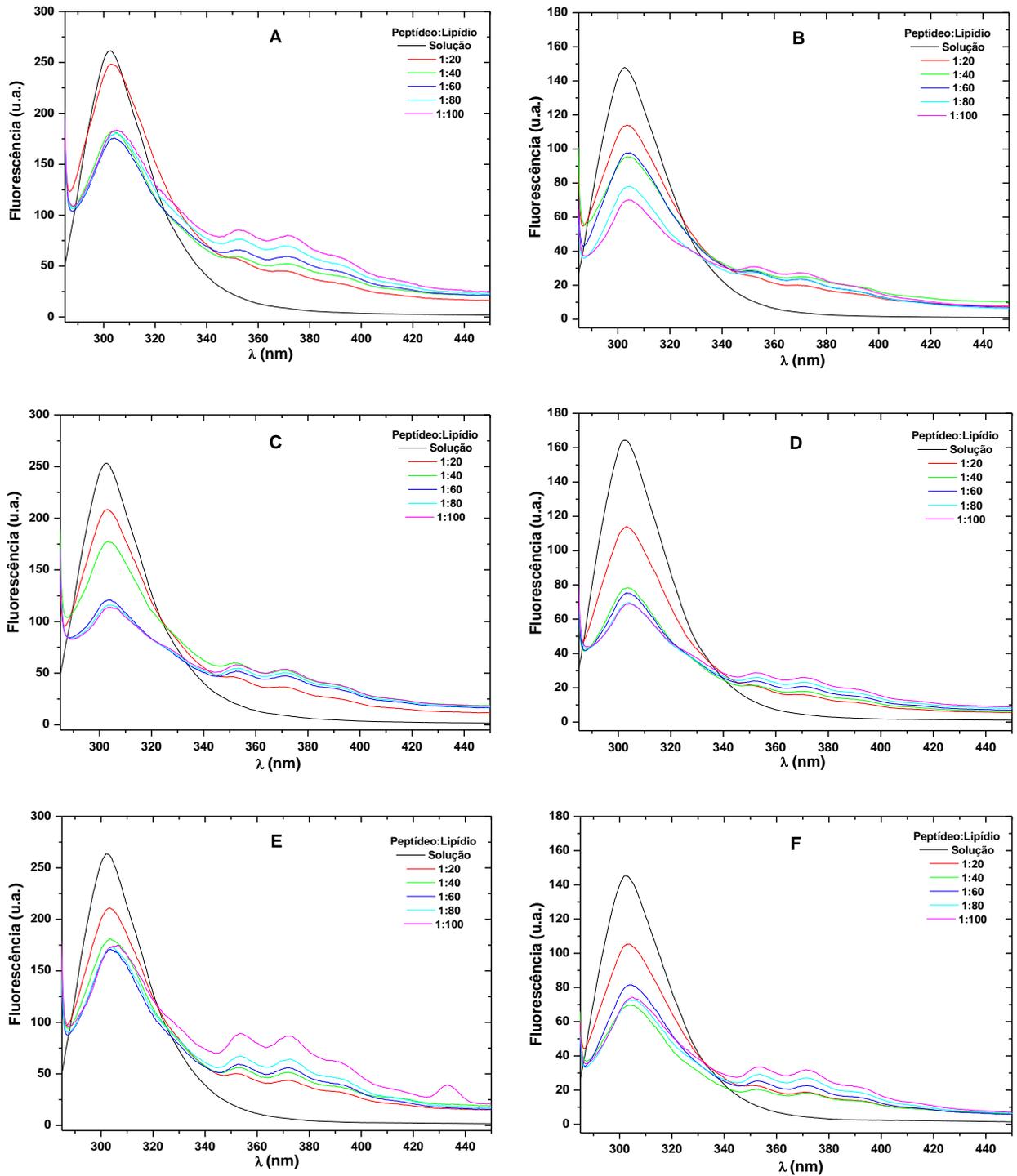


Figura 67. Espectros de fluorescência de Hst-5 11,0 μ M (A, C, E) e TOAC⁰-Hst-5 10,0 μ M (B, D, F) em função da concentração de SUV (ePE:POPG:CL, 80:15:5), em pH 4,0 (A, B), 7,0 (C, D) e 10,0 (E, F), em tampão PBC 5,0 mM, $\lambda_{exc}=275$ nm

A figura 68 mostra que a diminuição da fluorescência tende a estabilizar-se, em relações lipídio:peptídeo de cerca de 50:1, e nota-se mesmo uma sugestão de

aumento da fluorescência para relações mais altas no caso de Hst-5. Porém não foi possível analisar a ligação dos peptídeos às SUV em maior detalhe.

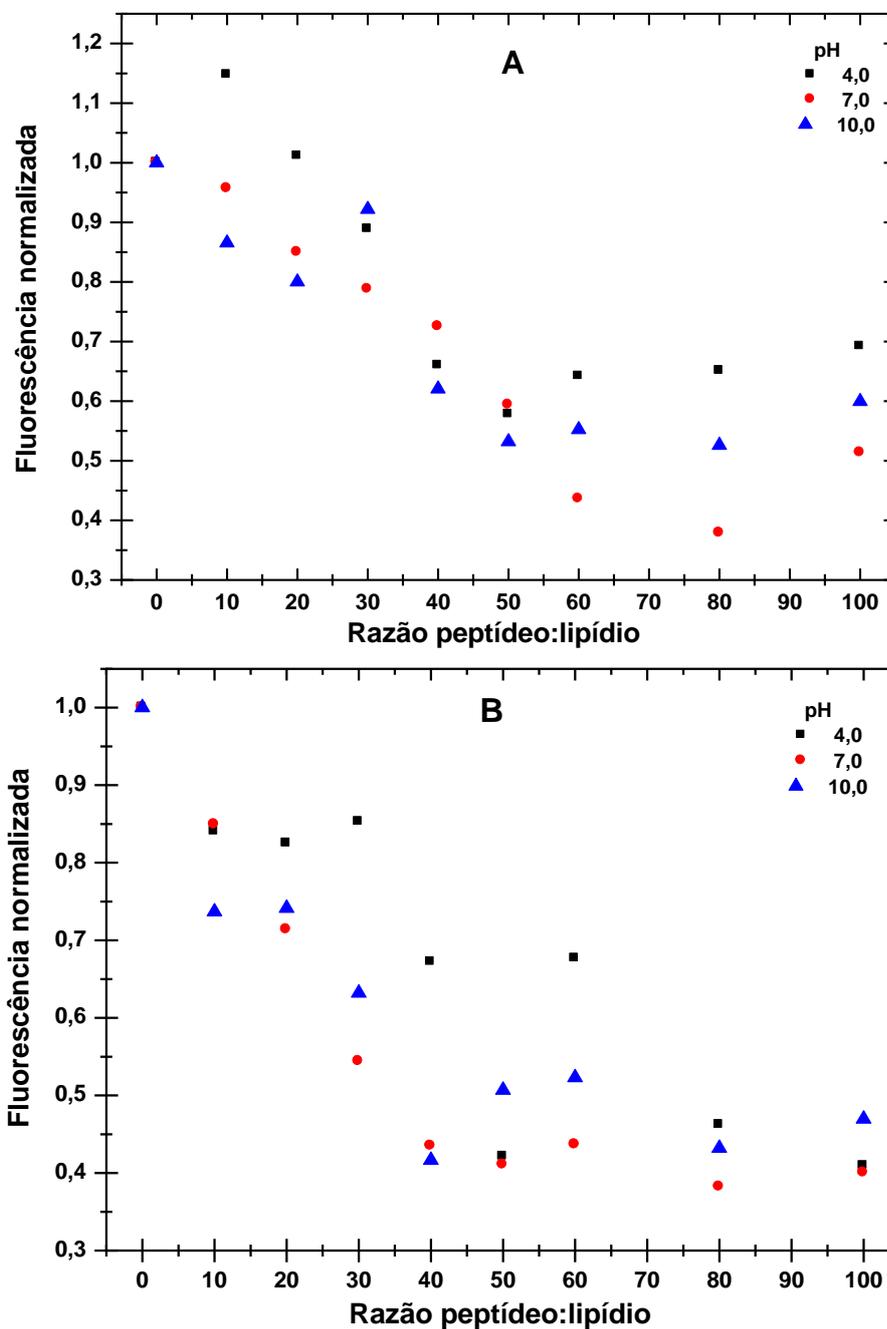


Figura 68. Fluorescência normalizada de Hst-5 (A) e TOAC⁰-Hst-5 (B) em função da concentração de SUV (ePE:POPG:CL, 80:15:5), em tampão PBC 5,0 mM, $\lambda_{exc} = 275$ nm.

Estudos de supressão de fluorescência por acrilamida (figura 69) mostraram que os resíduos de Tyr estão menos acessíveis ao supressor, confirmando a ligação

dos peptídeos às SUV. No entanto, o espalhamento de luz causado pela agregação das SUV novamente prejudicou a análise dos resultados.

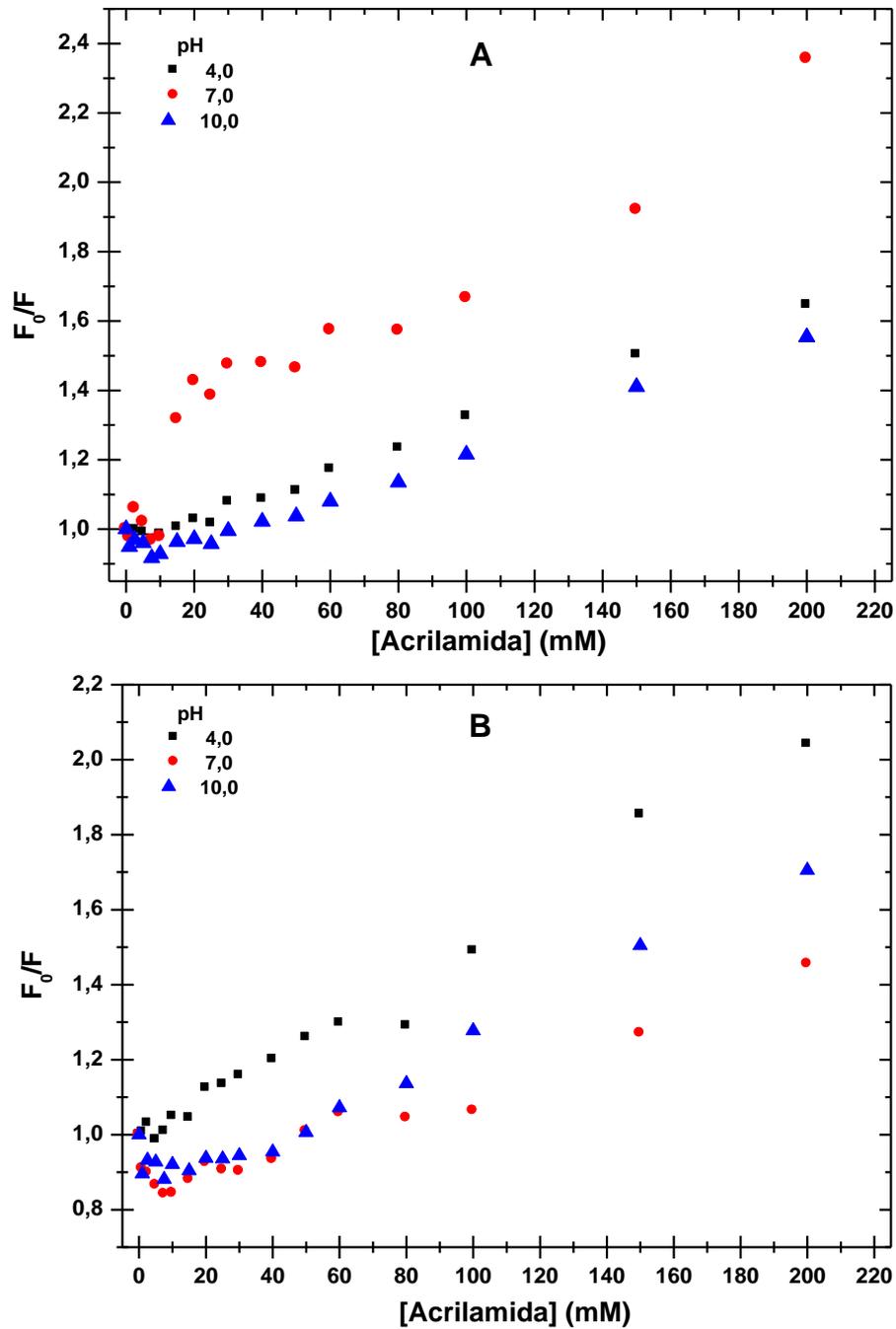


Figura 69. Relação F_0/F para Hst-5 TOAC⁰-Hst-5 em função da concentração de acrilamida na presença, respectivamente, de 1,1 mM e 1,0 mM de SUV (ePE:POPG:CL, 80:15:5), em tampão PBC 5,0 mM, pHs 4,0, 7,0 e 10,0. $\lambda_{exc} = 275$ nm.

Foram calculadas as constantes de Stern-Volmer para os resultados da figura 69. A tabela X mostra que em presença das SUV os resíduos de Tyr estão menos acessíveis à acrilamida, pois K_{SV} é menor do que em solução.

Tabela X. Constantes de Stern-Volmer (K_{SV} , M^{-1}) calculadas para Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 em função da concentração de acrilamida na presença, respectivamente, de 1,1 mM e 1,0 mM de SUV (ePE:POPG:CL, 80:15:5), em tampão PBC 5,0 mM, $\lambda_{exc} = 275$ nm.

pH	Hst-5	TOAC⁰-Hst-5
4,0	0,0035	0,0042
7,0	0,0034	0,0029
10,0	0,0032	0,0047
Solução, pH 3,5	0,03162	0,03309

Foram realizados também estudos de CD, para investigar se a interação com as SUV induz aquisição de estrutura secundária. Novamente, os espectros foram bastante prejudicados pela ocorrência de agregação (figura 70).

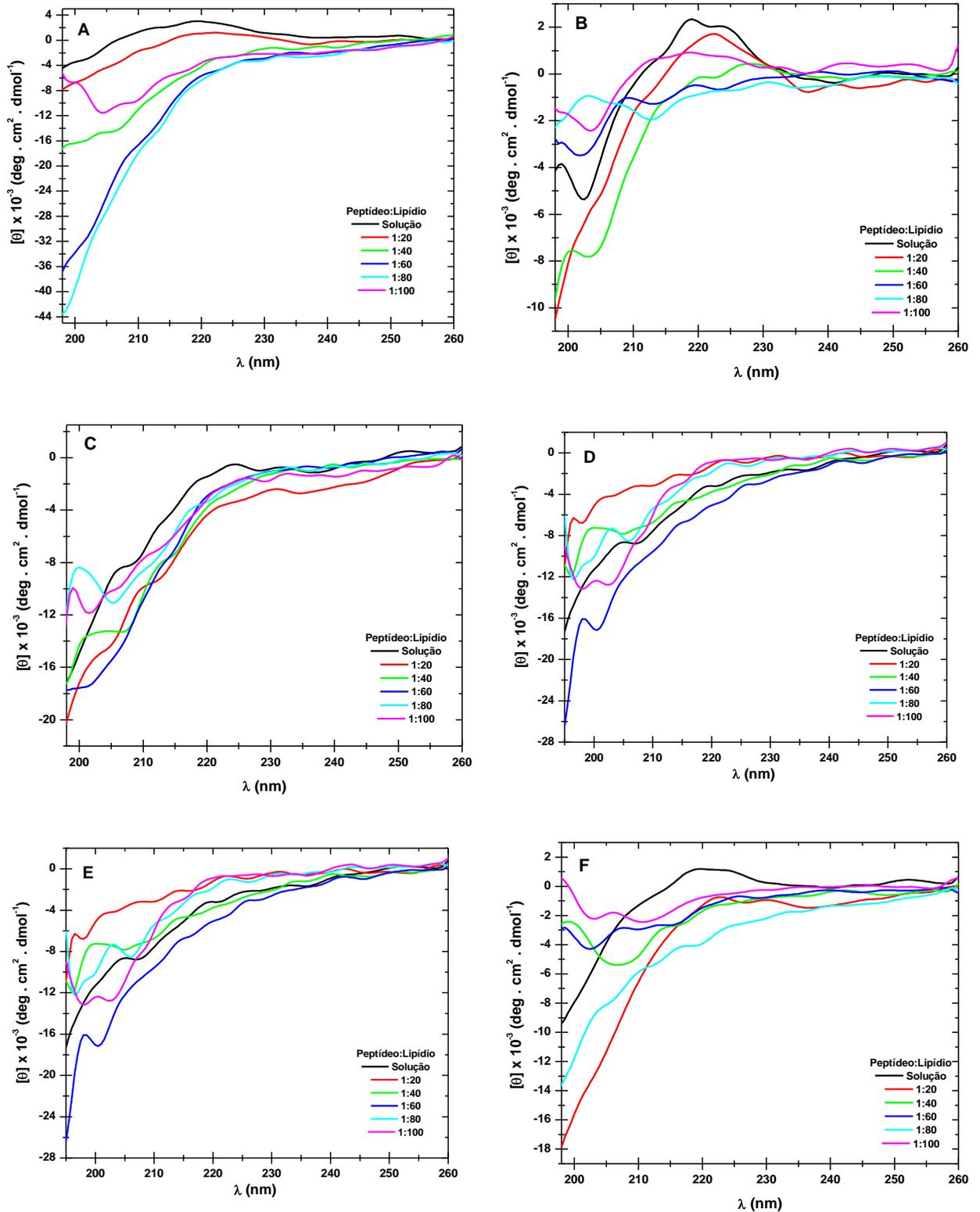


Figura 70. Espectros de CD de Hst-5 11 μM (A, C, E) e TOAC⁰-Hst-5 10 μM (B, D, F), na presença, respectivamente, de 1,1 mM e 1,0 mM de SUV (ePE:POPG:CL, 80:15:5), em pHs 4,0 (A, B), 7,0 (C, D) e 10,0 (E, F), em tampão PBC 5,0 mM.

A agregação de vesículas, induzida pelos peptídeos, ocorre provavelmente porque o peptídeo, com carga positiva, liga-se a várias vesículas de carga negativa,

neutralizando as cargas (tabela XI e XII). Esse fenômeno é bastante visível na figura 70, especialmente nas proporções peptídeo:lipídio 1:40 e 1:60, concentrações em que as cargas estão neutralizadas. A partir do momento em que se aumenta a concentração de SUV, aumentam também as cargas negativas e, conseqüentemente, ocorre repulsão, levando a uma pequena diminuição na turbidez da amostra.

Tabela XI. Carga de Hst-5, SUV (ePE:POPG:CL, 80:15:5) e carga líquida do sistema peptídeo-lipídio em função do pH. As cargas de POPG e CL foram consideradas -1 e -2 em todos os pHs. A carga de PE foi considerada 0 em pHs 4,0 e 7,0, e -1 em pH 10,0.

	pH 4,0			pH 7,0			pH 10,0		
	Peptídeo	SUV	Total	Peptídeo	SUV	Total	Peptídeo	SUV	Total
Solução	+ 13,4	-	+ 13,4	+ 5,7	-	+ 5,7	+ 2,7	-	+ 2,7
1:10	+ 13,4	- 2,5	+ 10,9	+ 5,7	- 2,5	+ 3,2	+ 2,7	- 10,5	- 7,8
1:20	+ 13,4	-5,0	+ 8,4	+ 5,7	-5,0	+ 0,7	+ 2,7	- 21,0	- 18,3
1:30	+ 13,4	-7,5	+ 5,9	+ 5,7	-7,5	- 1,8	+ 2,7	- 31,5	- 28,8
1:40	+ 13,4	-10,0	+ 3,4	+ 5,7	-10,0	- 4,3	+ 2,7	- 42,0	- 39,3
1:50	+ 13,4	-12,5	+ 0,9	+ 5,7	-12,5	- 6,8	+ 2,7	- 52,5	- 49,8
1:60	+ 13,4	-15,0	- 1,6	+ 5,7	-15,0	- 9,3	+ 2,7	- 63,0	- 60,3
1:80	+ 13,4	-20,0	- 6,6	+ 5,7	-20,0	- 14,3	+ 2,7	- 84,0	- 81,3
1:100	+ 13,4	-25,0	- 11,6	+ 5,7	-25,0	- 19,3	+ 2,7	- 105,0	- 102,3

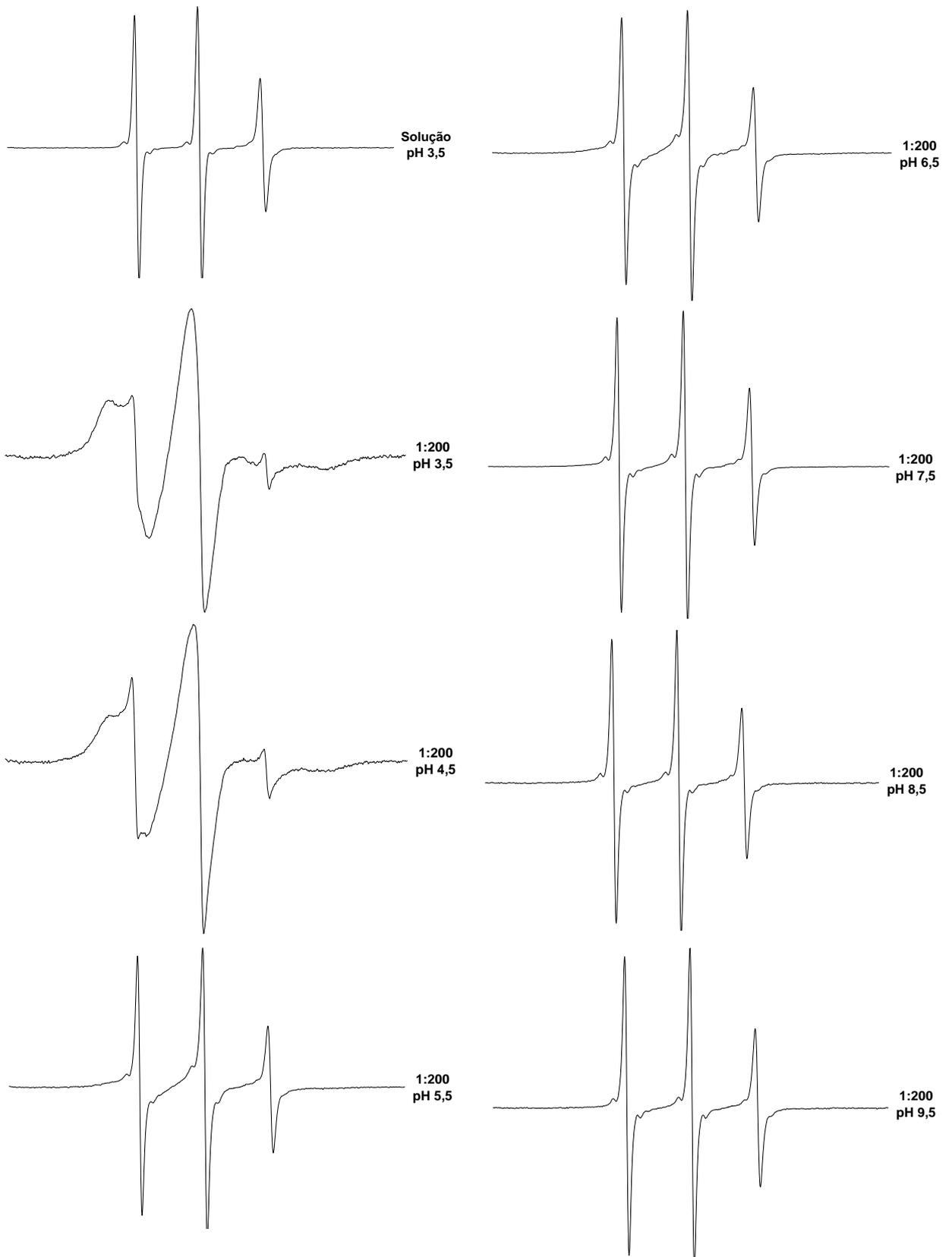
Tabela XII. Carga de TOAC⁰-Hst-5, SUV (ePE:POPG:CL, 80:15:5) e carga líquida do sistema peptídeo-lipídio em função do pH. As cargas de POPG e CL foram consideradas -1 e -2 em todos os pHs. A carga de PE foi considerada 0 em pHs 4,0 e 7,0, e -1 em pH 10,0.

	pH 4,0			pH 7,0			pH 10,0		
	Peptídeo	SUV	Total	Peptídeo	SUV	Total	Peptídeo	SUV	Total
Solução	+ 12,2	-	+ 12,2	+ 3,7	-	+ 3,7	+ 1,6	-	+ 1,6
1:10	+ 12,2	- 2,5	+ 9,7	+ 3,7	- 2,5	+ 1,2	+ 1,6	- 10,5	- 8,9
1:20	+ 12,2	-5,0	+ 7,2	+ 3,7	-5,0	- 1,3	+ 1,6	- 21,0	- 19,4
1:30	+ 12,2	-7,5	+ 4,7	+ 3,7	-7,5	- 3,8	+ 1,6	- 31,5	- 29,9
1:40	+ 12,2	-10,0	+ 2,2	+ 3,7	-10,0	- 6,3	+ 1,6	- 42,0	- 40,4
1:50	+ 12,2	-12,5	- 0,3	+ 3,7	-12,5	- 8,8	+ 1,6	- 52,5	- 50,9
1:60	+ 12,2	-15,0	- 2,8	+ 3,7	-15,0	- 11,3	+ 1,6	- 63,0	- 61,4
1:80	+ 12,2	-20,0	- 7,8	+ 3,7	-20,0	- 16,3	+ 1,6	- 84,0	- 82,4
1:100	+ 12,2	-25,0	- 12,8	+ 3,7	-25,0	- 21,3	+ 1,6	- 105,0	- 103,4

A interação de TOAC⁰-Hst-5 com bicamadas lipídicas foi também examinada por RPE. Como essa técnica não requer transparência da amostra, o estudo foi realizado com vesículas multilamelares (MLV), como descrito em Materiais e Métodos. Foram estudadas membranas cuja composição lipídica mimetizava a de

membranas de *E. coli* (ePE:POPG:CL, 80:15:5), *C. albicans* (POPC:ePE:bPS:PA:ERGO, 35:15:24:11:15) e eritrócitos (POPC:SM:ePE:COL, 26:22:7:45).

Na figura 71, observam-se espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 em solução e na presença de MLV cuja composição fosfolipídica mimetiza a da membrana de *E. coli*, apresentando carga líquida negativa. Em pHs 3,5 e 4,5, verifica-se a presença de uma população de peptídeo imobilizada, a qual dá origem a um espectro que apresenta extremos internos e externos. Esse espectro indica que o grupamento nítróxido está orientado com o eixo z paralelo à normal à bicamada e permite calcular um parâmetro de ordem (conforme Seção 3.2.2.3). À medida que o pH aumenta, o peptídeo perde cargas positivas, o que leva ao seu desligamento da membrana, como denotado pelo aumento do espectro de linhas estreitas observado em pHs mais altos.



10 G

Figura 71. Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 45,0 μ M em solução e na presença de 9 mM de MLV (ePE:POPG:CL, 80:15:5), em função do pH, em tampão PBC 5,0 mM.

Foi realizada a subtração de 5% do espectro do peptídeo livre em solução do espectro do peptídeo na presença de MLV em pH 3,5 (figura 72). O espectro resultante indica que a molécula possui movimento anisotrópico e que o grupamento nítróxido está orientado com o eixo z paralelo à normal à bicamada. O parâmetro de ordem calculado para esse espectro (conforme Seção 3.2.2.3) é de 0,605.

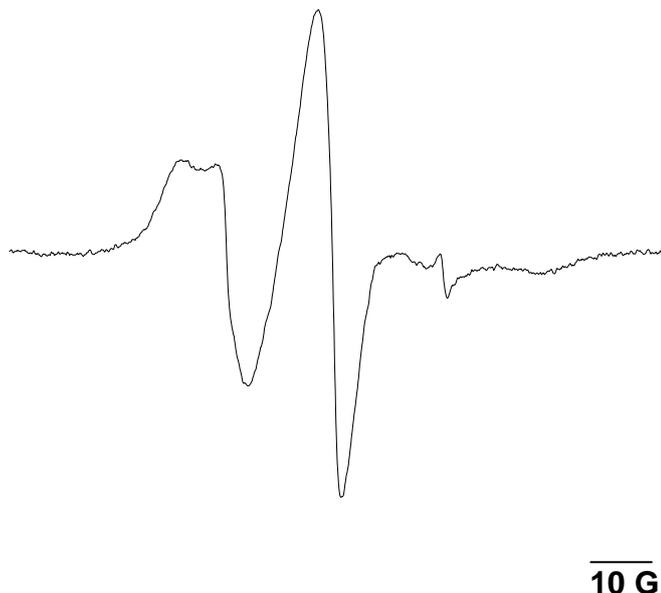


Figura 72. Espectro obtido pela subtração de 5% do espectro do peptídeo TOAC⁰-Hst-5 livre do espectro obtido na presença de 9 mM de MLV (ePE:POPG:CL, 80:15:5), em tampão PBC 5 mM, pH 3,5.

Assim como observado em MLV que mimetizam membranas de *E.coli*, MLV mimetizando a membrana biológica de *C. albicans* também contem fosfolipídios com cabeça polar de carga negativa. Em pHs 3,5 e 4,5, os espectros de TOAC⁰-Hst-5 em presença de MLV compostas por POPC:ePE:bPS:PA:ERGO 35:15:24:11:15 são qualitativamente semelhantes aos obtidos para as membramas mimetizadoras de *E. coli* (figura 73). Nota-se nesses espectros que, na região de campo baixo, aparece uma pequena porcentagem de uma componente fortemente imobilizada. À medida que o pH aumenta, o peptídeo perde cargas positivas, o que leva ao seu desligamento da membrana, como denotado pelo aumento do espectro de linhas estreitas observado em pHs mais altos.

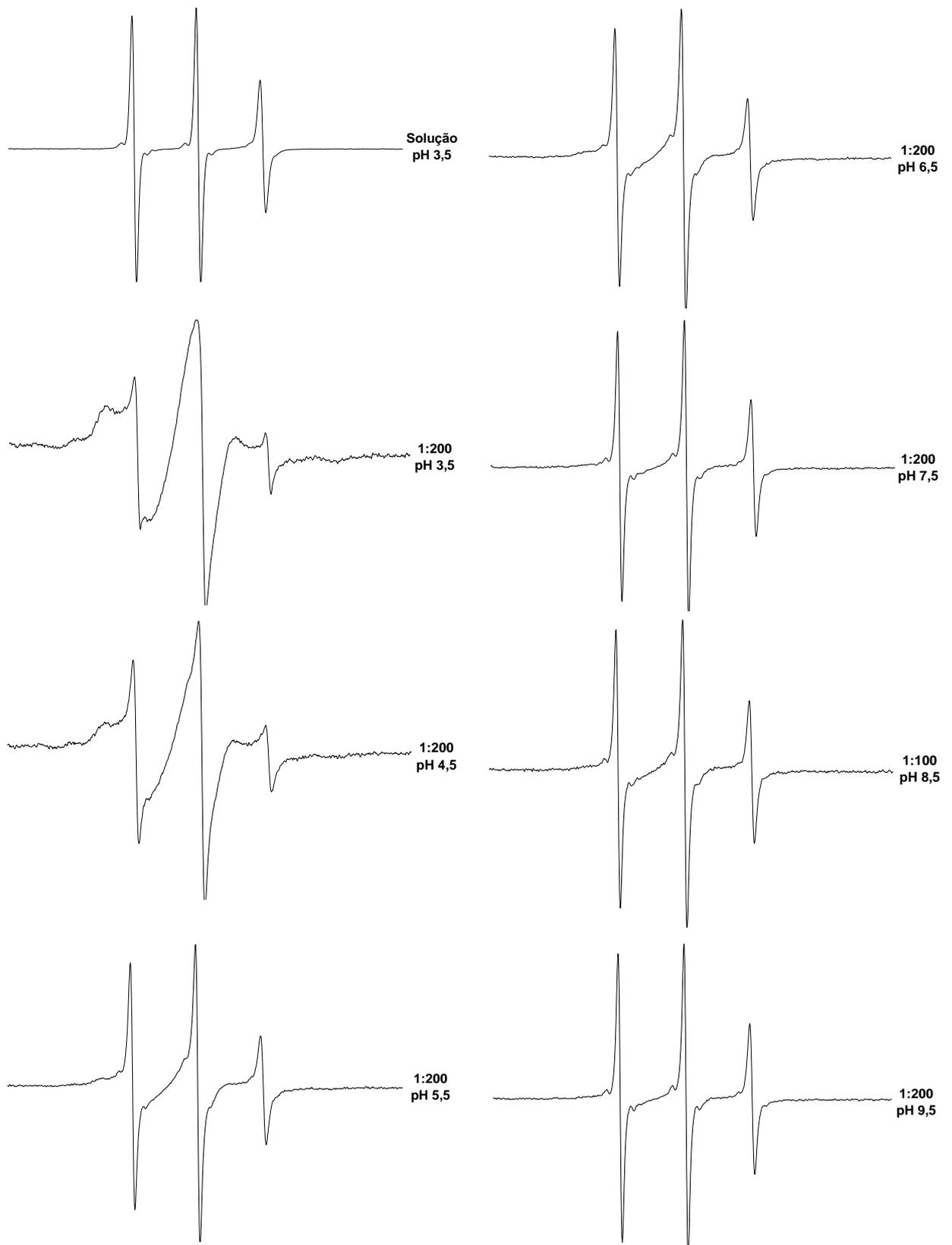


Figura 73. Espectros de RPE da TOAC⁰-Hst-5 45,0 μ M em solução e na presença de 9 mM de MLV (POPC:ePE:bPS:PA: ERGO, 35:15:24:11:15), em função do pH, em tampão PBC 5,0 mM.

Foi realizada a subtração de 3% do espectro do peptídeo livre em solução do espectro do peptídeo na presença de MLV em pH 3,5 (figura 74). Na figura a seta indica pela a população fortemente imobilizada. O parâmetro de ordem calculado para esse espectro, é de 0,704, maior do que o parâmetro de ordem encontrado para as MLV que mimetizam *E. coli*, mostrando maior ordem no sistema que mimetiza *C. albicans*. Esse resultado poderia ser devido à presença do ergosterol nessas membranas. É amplamente conhecido o fato de que colesterol, e também ergosterol, aumentam a ordem e diminuem a mobilidade em membranas no estado líquido-cristalino (Butler e Smith, 1978; Aracava *et al.*, 1981).

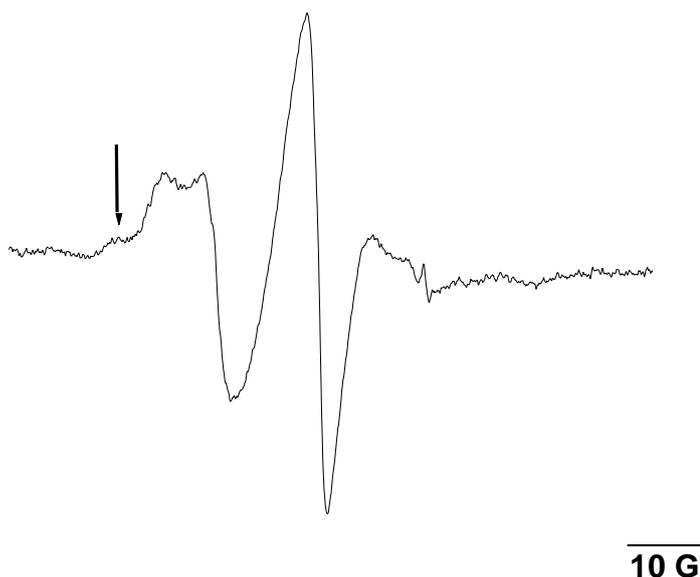


Figura 74. Espectro obtido pela subtração do espectro do peptídeo TOAC⁰-Hst-5 livre do espectro obtido na presença de 9 mM de MLV (POPC:ePE:bPS:PA: ERGO, 35:15:24:11:15), em tampão PBC 5 mM, pH 3,5. A seta indica uma população de peptídeo fortemente imobilizada.

Finalmente, foram realizados estudos com MLV que mimetizam a monocamada externa da membrana de eritrócitos (POPC:SM:PE:COL, 26:22:7:45), cuja carga líquida é zero. Como observado nos estudos com micelas de LPC, o peptídeo interage pouco com esse tipo de cabeças polares, como pode ser visto pelos espectros de linhas estreitas da figura 75. De forma análoga ao ocorrido com as micelas acima mencionadas, não foi possível subtrair o espectro do peptídeo não ligado, pela pouca quantidade de peptídeo ligada à membrana.

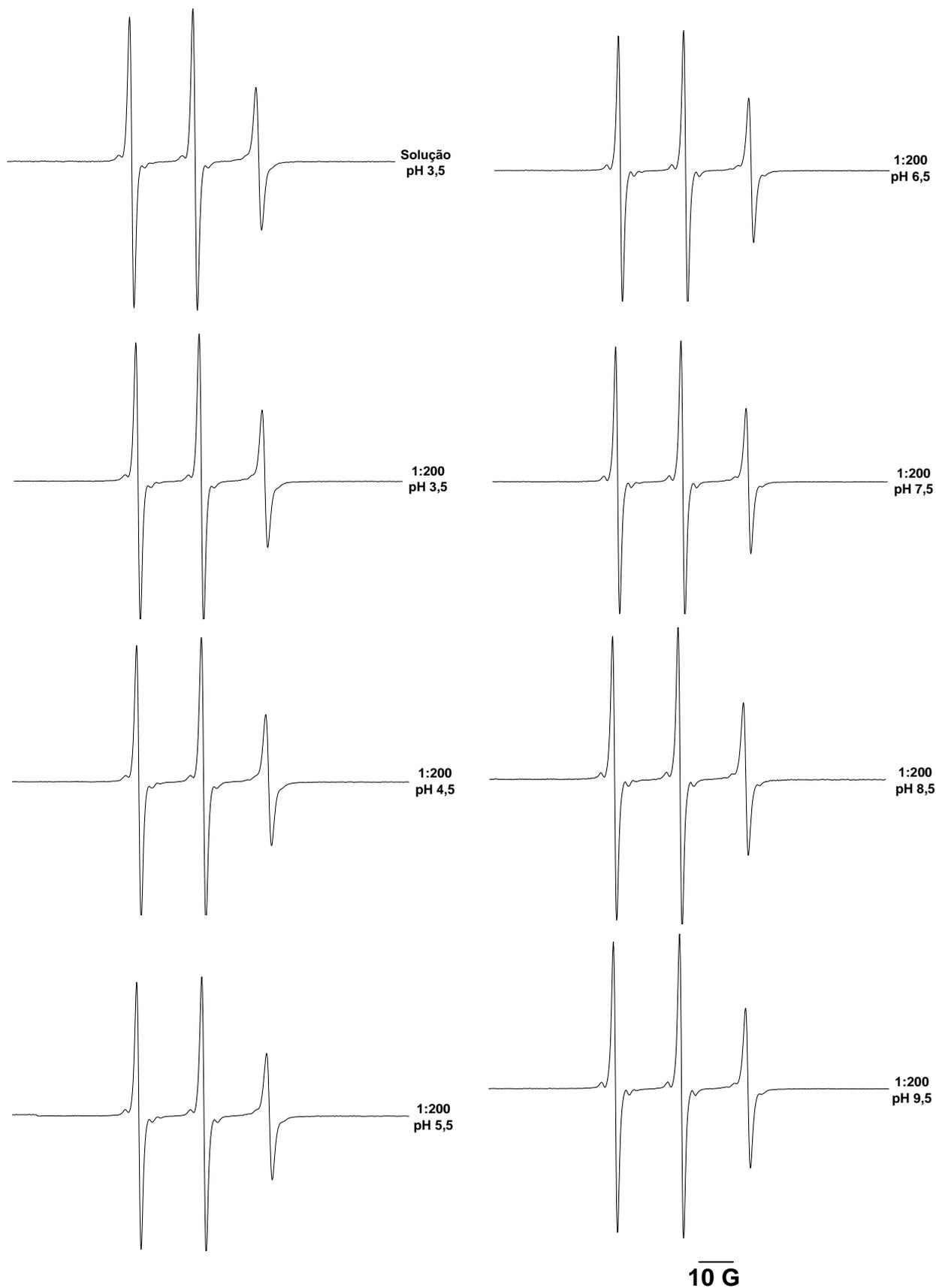


Figura 75. Espectros de RPE da TOAC⁰-Hst-5 45,0 μ M em solução e na presença de 9 mM de MLV (POPC:SM:ePE:COL, 26:22:7:45), em função do pH, em tampão PBC 5,0 mM.

A partir da altura do pico estreito de campo alto (figuras 72 e 74), foi calculado o coeficiente de partição (P) do peptídeo TOAC⁰-Hst-5 em diferentes pHs em membranas que mimetizam membranas biológicas de *E. coli* e *C. albicans* (figura 76).

Como observado nos espectros, à medida que o pH aumenta, o peptídeo se desliga da membrana, e o reflexo desse fenômeno é a diminuição do coeficiente de partição. O coeficiente de partição não foi calculado para membranas que mimetizam eritrócitos devido à baixa ligação do peptídeo a esse tipo de MLV.

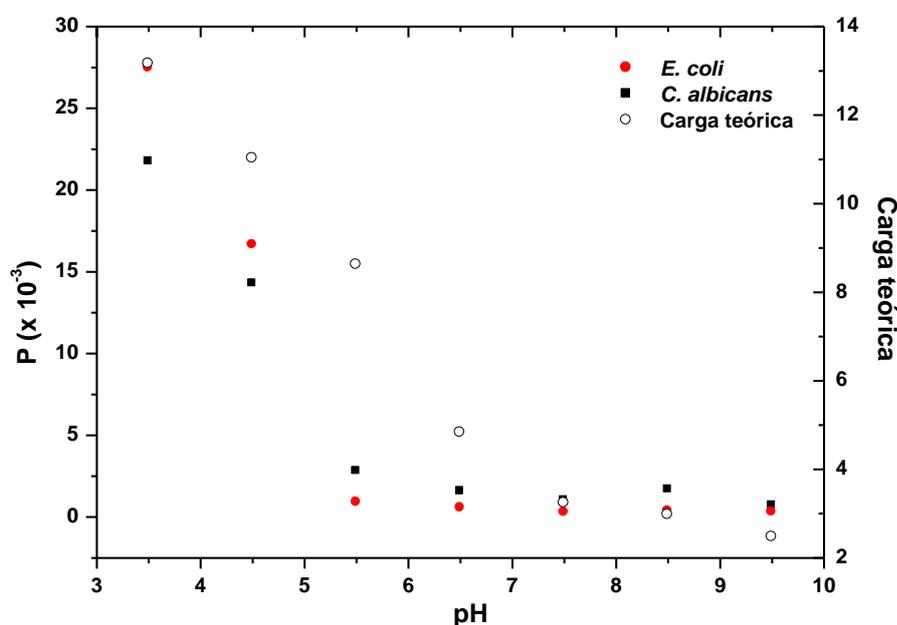


Figura 76. Coeficiente de partição calculado a partir dos espectros de RPE para membranas que mimetizam *E. coli* (ePE:POPG:CL, 80:15:5) e *C. albicans* (POPC:ePE:bPS:PA:ERGO, 35:15:24:11:15) em função do pH.

4.2. ESTUDOS FUNCIONAIS

Estudos funcionais em sistemas modelo foram efetuados realizando-se medidas elétricas em bicamadas lipídicas planas, utilizando membranas de asolecitina de soja (aniônicas) e DPhPC (zwitteriônicas) e ainda experimentos de

permeabilização de vesículas, utilizando LUV constituídas de POPG carregadas com carboxifluoresceína.

Foram realizados ainda estudos para determinação da atividade fungicida de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 contra *C. albicans*, na ausência e na presença de íons metálicos, bem como ensaios hemolíticos com ambos os peptídeos.

4.2.1. BICAMADAS LIPÍDICAS PLANAS

Experimentos para verificar a atividade canal da Hst-5 em membranas lipídicas planas de asolectina e de DPhPC em pHs 7,2 e pH 4,5 mostraram incapacidade do peptídeo de formar canais iônicos em bicamadas lipídicas planas. Nenhuma flutuação de corrente em relação à linha de base foi observada, independentemente da quantidade de peptídeo adicionada. Esse resultado sugere que a ação antimicrobiana do peptídeo não está relacionada com sua habilidade de formar canais iônicos.

No caso de TOAC⁰-Hst-5 os resultados mostraram que em pH 7,2 o peptídeo não forma canais iônicos em membranas de azolecitina. No entanto, em pH 4,5 TOAC⁰-Hst-5 apresentou atividade canal tanto em membranas com carga líquida negativa (figura 77) quanto em membranas zwitteriônicas (figura 78).

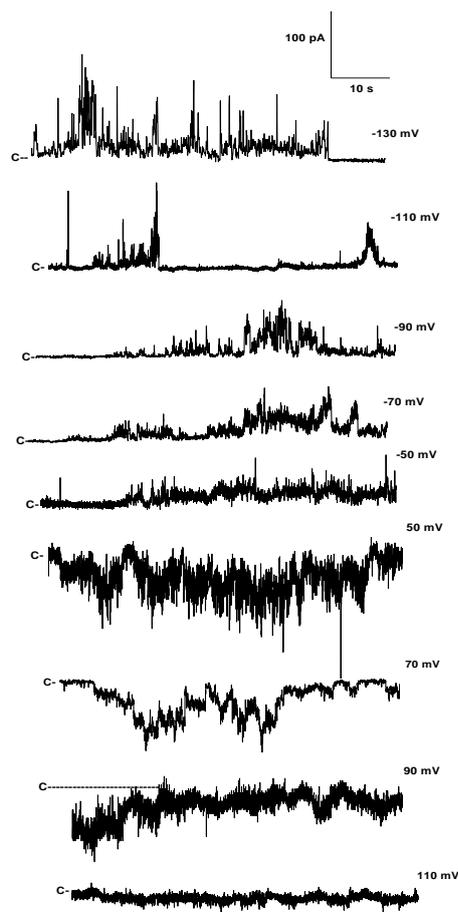


Figura 77. Atividade canal da TOAC⁰-Hst-5 em BLMs de ASO. Traços de canais unitários sob condições simétricas: PBC 5 mM, KCl 100 mM, pH 4,5, em diferentes voltagens. Níveis de abertura para cima ocorrem em potenciais aplicados negativos e níveis de abertura para baixo ocorrem em potenciais aplicados positivos. Níveis fechados (corrente zero) são indicados pelas linhas tracejadas.

A figura 77 mostra traços de atividade canal para o TOAC⁰-Hst-5 onde a atividade se manifesta com eventos de abertura pouco regulares, bem como com várias manifestações de abertura irregulares. Além disso, foram também observados eventos de atividade canal exibindo tempos de abertura mais curtos e de formato pontiagudo (*spike*). Há três conjuntos de valores de condutância: $G_1 = (75 \pm 25) \text{ pS}$, $n = 6$; $G_2 = (167 \pm 39) \text{ pS}$, $n = 10$; $G_3 = (468 \pm 83) \text{ pS}$, $n = 5$.

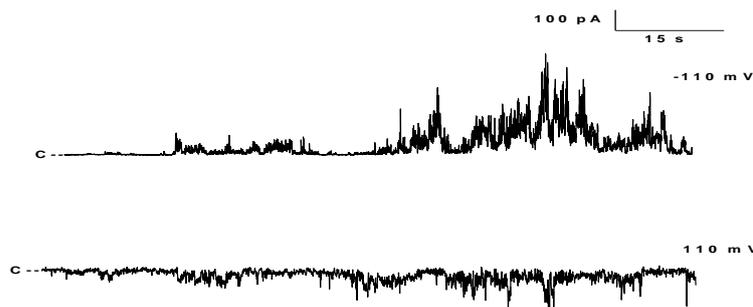


Figura 78. Atividade canal da TOAC⁰-Hst-5 em BLMs de DPhPC. Traços de canais unitários sob condições simétricas: PBC 5 mM, KCl 100 mM, pH 4,5, em diferentes voltagens. Níveis de abertura para cima ocorrem em potenciais aplicados negativos e níveis de abertura para baixo ocorrem em potenciais aplicados positivos. Níveis fechados (corrente zero) são indicados pelas linhas tracejadas.

A figura 78 mostra que a TOAC⁰-Hst-5 também pode formar canais iônicos em BLMs de DPhPC, mas a manifestação de atividade canal é mais difícil com esse tipo de membrana, revelando a preferência da TOAC⁰-Hst-5 por membranas com carga líquida negativa. Observam-se eventos de abertura de baixa regularidade, assim como eventos de abertura irregulares, inclusive aberturas bem curtas do tipo *spike*. Os valores de condutância determinados foram: $G_1 = (424 \pm 55) \text{ pS}$, $n=5$; $G_2 = (802 \pm 123) \text{ pS}$, $n= 8$; $G_3 = (2150 \pm 618) \text{ pS}$, $n=7$.

4.2.2. PERMEABILIZAÇÃO DE VESÍCULAS

Levando-se em conta os resultados obtidos através dos experimentos de BLM, foram realizados estudos de permeabilização (figura 79) de vesículas com LUV de POPG, com carga líquida negativa, em tampão PBC 5 mM, NaCl 145 mM, pH 7,4. Não foram realizados experimentos em pH ácido porque a 5,6-carboxifluoresceína não fluoresce em pHs ácidos.

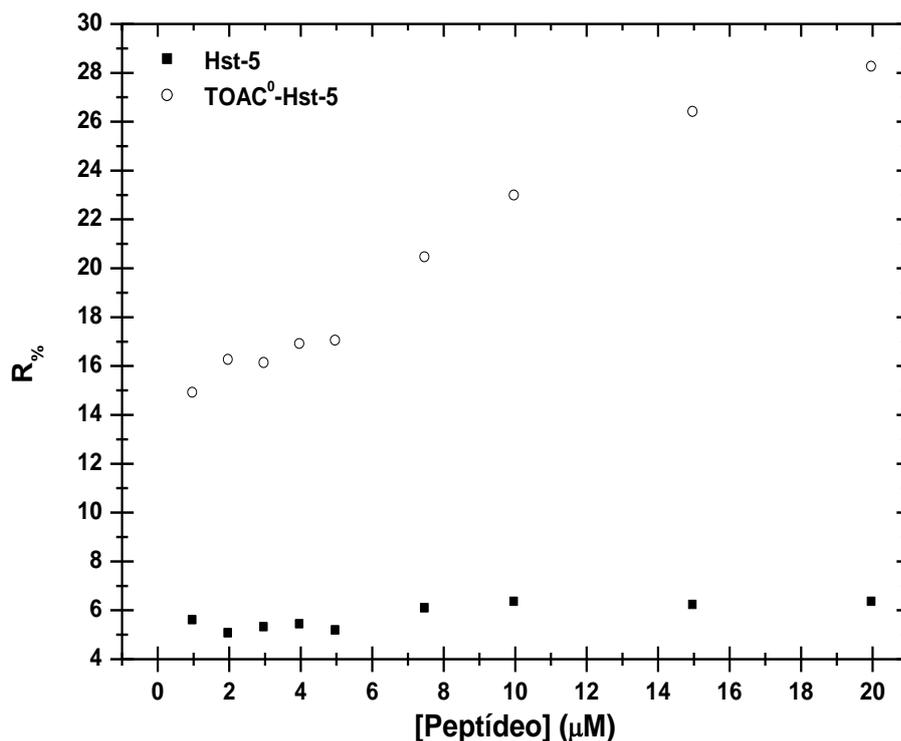


Figura 79. Permeabilização de LUV de POPG em função da concentração de peptídeo. Tampão PBC 5 mM, NaCl 145 mM, pH 7,4.

Pode-se observar que, enquanto a Hst-5 praticamente não tem efeito permeabilizante, TOAC⁰-Hst-5 age sobre a membrana, provocando vazamento do fluoróforo, que aumenta com a concentração do peptídeo. A diferença de comportamento entre ambos os peptídeos poderia residir na diferença de cargas no N-terminal, pois o TOAC tem pK = 4,5 nessa região, portanto, não apresentaria carga em pH 7,4, favorecendo a ligação do peptídeo por um efeito hidrofóbico, enquanto que no peptídeo não marcado o N-terminal estaria protonado. Deve-se considerar, contudo, que o pK de grupos carregados positivamente (como é o caso do amino grupo) tende a aumentar na presença de interfaces carregadas negativamente (Lee e Schreier, 1993). No caso dos peptídeos, a presença dos outros resíduos carregados também pode influir no valor do pK (Salinas et al., 2002). Esses efeitos não foram examinados.

4.2.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para estudar a atividade fungicida dos peptídeos, foram realizados ensaios líquidos de inibição de crescimento de *C. albicans* (tabela XIII), a fim de determinar a concentração inibitória mínima (MIC). Os estudos foram realizados na ausência e na presença de CaCl_2 , CuSO_4 , MnCl_2 e ZnCl_2 na proporção 1:1.

Tabela XIII – MIC (μM) dos peptídeos na ausência e na presença de íons metálicos. As MIC são expressas na forma $[a]-[b]$, onde $[a]$ é a menor concentração de peptídeo que causou 100% de inibição, e $[b]$, a maior concentração de peptídeo onde o fungo continuou a crescer.

Peptídeo	Ausência de				
	íons metálicos	CaCl_2	CuSO_4	MnCl_2	ZnCl_2
Hst-5	12,5 – 6,3	12,5 – 6,3	12,5 – 6,3	6,3 – 3,1	6,3 – 3,1
TOAC ⁰ -Hst-5	6,3 – 3,1	6,3 – 3,1	6,3 – 3,1	6,3 – 3,1	6,3 – 3,1

Observa-se que o peptídeo marcado não é sensível à adição de metais no meio de cultura, enquanto que Hst-5 é sensível à presença dos íons Mn^{2+} e Zn^{2+} , mas não Ca^{2+} e Cu^{2+} . Isso pode ser sugestivo de mecanismos de ação diferentes para Hst-5 e seu análogo marcado. Essa possibilidade está de acordo com os estudos funcionais com membranas modelo, que apontam para atividades diferentes dos peptídeos

4.2.4. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Na figura 80, observa-se a atividade hemolítica dos peptídeos. Nota-se que Hst-5 50 μM lisa menos de 7% dos eritrócitos humanos, enquanto que TOAC⁰-Hst-5 50 μM lisa pouco mais de 10% das mesmas células. Esse fato deve-se, provavelmente, à natureza zwitteriônica da superfície externa da bicamada lipídica, o que diminui a ligação dos peptídeos à membrana, como observado nos estudos com micelas de diferentes composições lipídicas.

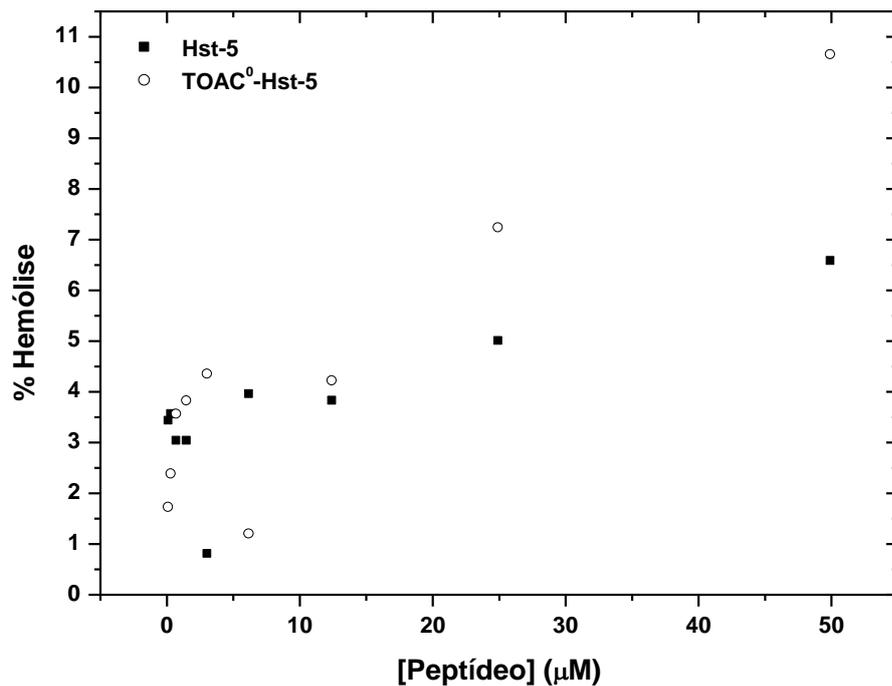


Figura 80. Atividade hemolítica em função da concentração de peptídeo, em tampão PBS 10 mM, NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4.

5. DISCUSSÃO

Nosso laboratório vem, de longa data, contribuindo com estudos estruturais de peptídeos biologicamente ativos, com destaque para a introdução do aminoácido paramagnético TOAC através de ligação peptídica, representando uma nova abordagem nessa área (Marchetto *et al.*, 1993; Moraes *et al.*, 1997; Nakaie *et al.*, 1981, 1983; Oliveira *et al.*, 2002; Pertinhez *et al.*, 1995, 1997; Schreier *et al.*, 2004). O laboratório tem contribuído ainda para a compreensão sobre a interação entre peptídeos biologicamente ativos e sistemas biomiméticos, tais como micelas e bicamadas lipídicas (Pertinhez *et al.*, 1995, 1997; Salinas *et al.*, 2002; Vieira *et al.*, 2002). Ambas as áreas estudadas envolveram a utilização de técnicas espectroscópicas como fluorescência, CD e RPE.

Este trabalho enfoca o peptídeo antimicrobiano Histatina-5 e seu análogo marcado com TOAC na posição N-terminal, TOAC⁰-Histatina-5. PAM são capazes

de inserir-se na membrana citoplasmática da célula-alvo, onde podem formar poros e causar a morte celular, ou ainda, translocar-se para o meio intracelular e atingir organelas e/ou processos intracelulares, levando igualmente à morte da célula-alvo. Assim, sendo a membrana uma barreira para a ação dos PAM, é de primordial importância entender os mecanismos pelos quais ocorre a interação entre o peptídeo e a membrana, bem como estudar as possíveis variações conformacionais envolvidas nas várias etapas da ação fisiológica dessas moléculas.

Hst-5, encontrada na saliva humana, possui notável ação fungicida e inibe a adesão de bactérias ao esmalte dos dentes ou às mucosas orais. Seu mecanismo de ação, entretanto, é ainda desconhecido, e permanece motivo de debate na literatura. Hst-5 apresenta ainda com motivos de ligação a íons metálicos existentes na saliva. No presente trabalho, foram empregadas as técnicas de fluorescência, CD e RPE a fim de realizar estudos conformacionais de Hst-5 e de TOAC⁰-Hst-5 em solução com o objetivo de examinar o efeito da variação de pH, a influência do solvente indutor de estrutura secundária TFE e a interação com os íons metálicos Cu²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺, presentes na saliva humana, sendo que o estudo da interação com Mn²⁺ é inédito na literatura. Foram também realizados estudos na presença de sistemas biomiméticos, com micelas zwitteriônicas e de carga líquida negativa, além da interação com vesículas que mimetizam a composição lipídica de membranas de *E. coli*, *C. albicans* e eritrócitos humanos. A relação estrutura-função, fundamental no entendimento do mecanismo de ação de PAM, foi também investigada, examinando-se a atividade dos peptídeos frente a membranas lipídicas planas (BLM) e na permeabilização de vesículas lipídicas. Por fim, foram ainda estudadas as atividades fungicida e hemolítica de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5.

5.1. EFEITO DO PH

Os estudos de fluorescência mostraram a capacidade de TOAC suprimir a fluorescência, como já descrito na literatura (Toniolo *et al.*, 1998), uma vez que as intensidades de fluorescência de TOAC⁰-Hst-5 são menores que as de Hst-5 (figura 20).

A tabela XIV mostra os pKs calculados a partir dos resultados de RPE e fluorescência para Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5, e são comparados aos pKs teóricos e obtidos através de RMN de próton (¹H-RMN) para Hst-5. A variação nos valores de pK obtidos por fluorescência e ¹H-RMN para Hst-5 pode ser explicada pela utilização de técnicas diferentes, fato também observado no peptídeo TOAC⁰-Hst-5, quando comparam-se os valores de pK de His e Tyr obtidos por fluorescência e RPE. Em qualquer caso, no entanto, observa-se deslocamento nos valores de pK dos resíduos quando comparados aos pKs teóricos dos aminoácidos, mostrando a influência do microambiente sobre a ionização das cadeias laterais dos resíduos ionizáveis. Quando comparados, Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 mostram que os pKs de resíduos de Tyr são muito próximos, mostrando que a inserção de TOAC no N-terminal não afetou o grau de ionização dos resíduos de Tyr, fato que pode ser atribuído à distância entre os resíduos.

Tabela XIV. pKs teórico e experimental dos resíduos de TOAC, His e Tyr de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5. Os valores obtidos utilizando ¹H-RMN foram retirados de Grogan *et al.*, 2001 (n.d. = não detectado).

Resíduo	pK teórico	Hst-5		TOAC ⁰ -Hst-5		
		Fluorescência	¹ H-RMN*	Fluorescência	RPE h0/h-1	aN
TOAC	4,5	-	-	n.d.	4,9	4,3
Asp	3,9	n.d.	2,8	n.d.	n.d.	n.d.
Glu	4,07	n.d.	3,2	n.d.	n.d.	n.d.
His	6,04	n.d.	5,9 – 6,3	6,1	6,8	6,8
Tyr	10,46	9,4	9,8 – 10,3	9,5	9,2	n.d.

*Valores obtidos por Grogan *et al.* (2001). Foram determinados pKs individuais para os resíduos His⁷, His¹⁵, Tyr¹⁰ e Tyr²⁴. Na tabela estão apresentados os menores e maiores valores obtidos para esses resíduos.

Espectros de CD de Hst-5 estão de acordo com os apresentados na literatura utilizando a mesma técnica, que apontam para a falta de estruturação do peptídeo em solução aquosa, em pHs que variaram entre 7,2 e 7,4 (Raj *et al.*, 1990; Brewer *et al.*, 1998; Melino *et al.*, 1999; Helmerhorst *et al.*, 2001). Estudos de RMN bi-dimensional (2D-RMN) em pH 3,8 (Raj *et al.*, 1998) e em pH 7,5 (Brewer *et al.*, 1998) também mostram que não ocorre estruturação do peptídeo em solução aquosa.

A análise dos espectros de CD obtidos neste trabalho em diversos pHs indica que, apesar de não ocorrer estruturação, ocorrem pequenas flutuações na conformação, resultantes da alteração de carga do peptídeo. TOAC⁰-Hst-5 apresenta comportamento semelhante, mostrando que a introdução do aminoácido paramagnético na posição N-terminal não altera a conformação do peptídeo. Schreier *et al.* (2004) já haviam demonstrado que a introdução de TOAC na região N-terminal pouco afeta a conformação dos hormônios peptídicos bradicinina e angiotensina II em solução aquosa. Moraes *et al.* (2007) sintetizaram peptídeos análogos do PAM gomesina contendo TOAC no N-terminal e verificaram que a introdução do aminoácido paramagnético não alterou a conformação do peptídeo marcado em solução aquosa.

5.2. EFEITO DE TFE

Como mencionado anteriormente, o solvente TFE é largamente utilizado como indutor de estrutura secundária (Marlborough e Ryan, 1977). Na literatura, existem diversos trabalhos que utilizam a técnica de CD e relatam a aquisição de estrutura α -helicoidal por Hst-5 na presença de TFE (Raj *et al.*, 1990; Brewer *et al.*, 1998; Melino *et al.*, 1999; Situ *et al.*, 2000; Helmerhorst *et al.*, 2001) e metanol (Raj

et al., 1990). Estudos utilizando 2D-RMN na presença de TFE confirmam estes resultados (Brewer *et al.*, 1998; Raj *et al.*, 1998).

Nossos dados mostram que tanto o peptídeo nativo quanto o marcado com TOAC estruturam-se em uma conformação α -helicoidal, sendo que o peptídeo TOAC⁰-Hst-5 adota essa estrutura em 30% de TFE, como indicam os espectros de CD (figura 33), fluorescência (figura 29) e RPE (figura 30). Hst-5 adota estrutura β -helicoidal em 70% de TFE, como mostram os espectros de CD (figura xx), e estão de acordo com os resultados obtidos por Melino *et al.* (1999), embora resultados de Brewer *et al.* (1998) mostrem que Hst-5 estrutura-se em α -hélice em 30% de TFE, e Helmerhorst *et al.* (2001) obtém resultados semelhantes em 50% do mesmo solvente.

A porcentagem de conteúdo α -helicoidal apresenta grande variação na literatura. A tabela XV mostra uma comparação entre os percentuais obtidos neste trabalho e os dados obtidos na literatura utilizando o método de Chen *et al.* (1974).

Tabela XV. Porcentagens de α -hélice dos peptídeos Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5, calculadas a partir de espectros de CD em 100% de TFE (Melino *et al.*, 1999; Helmerhorst *et al.*, 2001). Em parênteses é dado o número de resíduos presentes no segmento α -helicoidal (foi assumida a formação de um segmento em α -hélice).

Peptídeo	Dados obtidos	Melino <i>et al.</i> (1999)	Helmerhorst <i>et al.</i> (2001)
Hst-5	56% (13,4)	27% (6,5)	36% (8,6)
TOAC ⁰ -Hst-5	53% (13,3)	-	-

Apesar da variação na porcentagem do peptídeo em α -hélice, nossos resultados e os dados da literatura mostram que o peptídeo não se encontra totalmente enovelado (Raj *et al.*, 1990; Brewer *et al.*, 1998; Melino *et al.*, 1999; Situ *et al.*, 2000; Helmerhorst *et al.*, 2001). Neste sentido, apenas o trabalho de Raj *et al.* (1998) concluiu, a partir de estudos de 2D-RMN que em dimetil sulfóxido (DMSO), Hst-5 encontra-se 100% estruturada em α -hélice (figura 81), resultado que não está

de acordo com os dados de Brewer *et al.* (1998), que, utilizando a mesma técnica e solvente apontam que a perda de efeitos nucleares de Overhauser (*nuclear Overhauser effect*, NOE) de médio e longo alcance mostra a instabilidade da α -hélice formada por Hst-5.

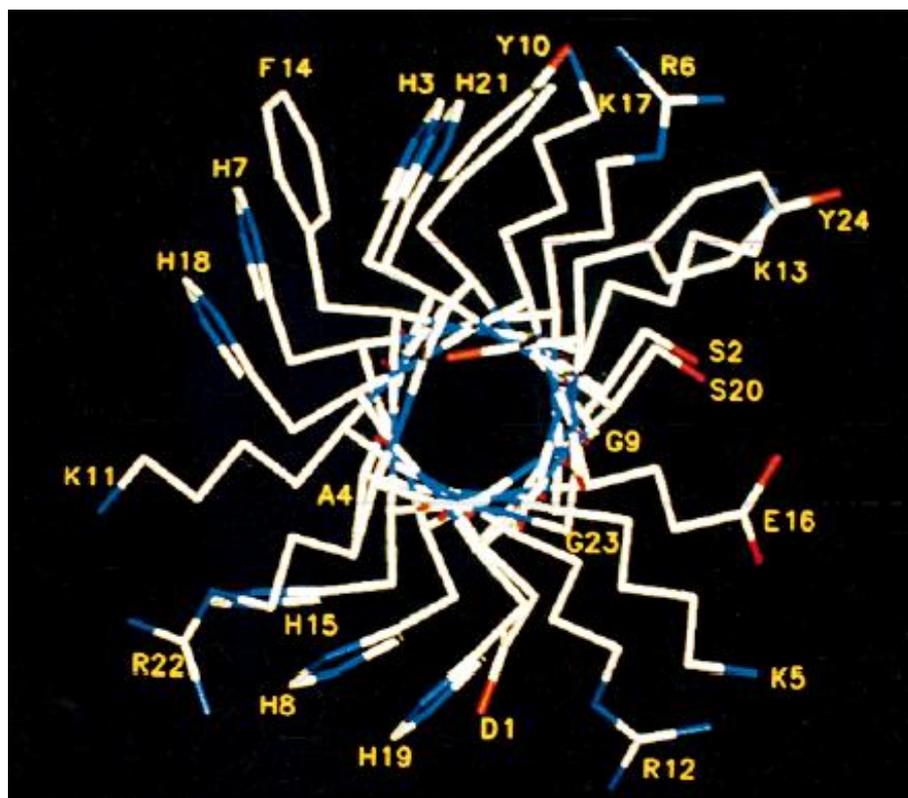


Figura 81. Estrutura média da α -hélice de Hst-5 em DMSO, obtida através de 2D-RMN (Raj *et al.*, 1998)

A figura 81 mostra que, assumindo uma conformação 100% helicoidal, Hst-5 não forma uma hélice anfipática, apresentando uma distribuição uniforme de cargas positivas ao longo da hélice. Através de modelagem molecular e análise de espectros de CD, Ramalingam *et al.* (1996) propuseram que interações entre as cadeias laterais de Phe¹⁴ e His¹⁸ e Arg¹² e Glu¹⁶ contribuem para a estabilização da α -hélice. A formação da ponte salina entre Arg¹² e Glu¹⁶ e a consequente estabilização da estrutura α -helicoidal reforçam a hipótese de Melino *et al.* (1999), que, estudando a conformação de Hst-5 na presença de vesículas compostas de PC:PA de ovo (8:2)

na ausência e na presença de Zn^{2+} , verificaram maior propensão à formação de α -hélice quando o íon metálico é adicionado à amostra. Considerando que a interação entre Zn^{2+} e Hst-5 ocorre no sítio H¹⁵EKHH¹⁹ (Grogan *et al.*, 2001), conclui-se que a estabilização de cargas nesse sítio é importante para a aquisição de estrutura secundária.

Utilizando técnicas de dinâmica molecular, Lovino *et al.* (2001) estudaram, através de simulações de dinâmica molecular, a formação de pontes de hidrogênio entre a cadeia polipeptídica de Hst-5 e moléculas de água e TFE, chegando à conclusão que as moléculas de água interagem com Hst-5 através de pontes de hidrogênio por mais tempo do que as moléculas de TFE, restringindo a formação de pontes de hidrogênio intra-moleculares e conseqüentemente, a aquisição de estrutura em água. O trabalho mostra também que as moléculas de TFE que estão em contato direto com Hst-5 apresentam troca lenta com as moléculas de TFE da solução como um todo, o que acarreta em menor perturbação na formação das pontes de hidrogênio intra-moleculares e subsequente aquisição de estrutura secundária.

O aumento na intensidade de emissão de fluorescência para ambos os peptídeos reflete a menor polaridade do meio (Lakowicz, 1999). No entanto, a queda na intensidade de fluorescência de TOAC⁰-Hst-5 ocorrida após 50% de TFE mostra que TOAC aproxima-se dos resíduos de Tyr devido à aquisição de estrutura, aumentando a eficiência da supressão de fluorescência (Toniolo *et al.*, 1998; Schreier *et al.*, 2004; Marín, 2007). Os espectros de RPE foram sensíveis às mudanças acarretadas pela aquisição de estrutura secundária, como já demonstrado por Schreier *et al.*, 2004. Essa sensibilidade foi revelada tanto através do cálculo do tempo de correlação rotacional, que aumentou na presença do solvente, como nas

medidas de desdobramento hiperfino, que mostraram o comportamento diferente do peptídeo quando comparado ao TOAC livre. Da mesma forma, através de comparação com resultados obtidos para TOAC livre foi possível verificar que o aumento do tempo de correlação rotacional não foi devido apenas ao aumento da viscosidade do meio, mas também, às alterações conformacionais sofridas pelo peptídeo.

5.3. INTERAÇÃO COM ÍONS METÁLICOS

A saliva humana é um fluido complexo que, dentre outras funções, tem o papel de proteger a cavidade oral de bactérias e fungos. Para tanto, são sintetizados nas glândulas salivares diversos PAM, como as Hst, as proteínas ricas em Pro, as defensinas e as estaterinas (Oppenheim *et al.*, 1988; Abiko *et al.*, 2003; Vitorino *et al.*, 2005). Além disso, são encontrados na saliva diversos íons metálicos, como o Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} , sendo que o primeiro é encontrado na ordem de milimolar, e os demais, na ordem de micromolar (Gusman *et al.*, 2001c). Hst-5 possui diversos sítios de coordenação para diferentes metais, como Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} e Ni^{2+} (Brewer e Lajoie, 2000; Grogan *et al.*, 2001; Gusman *et al.*, 2001c). Em especial, destacam-se os motivos ATCUN (*amino-terminal copper and nickel binding site*, sítio de ligação de cobre e níquel no N-terminal) D^1SH^3 e o sítio de ligação Zn^{2+} , $\text{H}^{15}\text{EKHH}^{19}$, como mostraram os estudos de ^1H -RMN (Grogan *et al.*, 2001). Brewer e Lajoie (2000) mostraram, através de espectroscopia de massa que pHs mais altos favorecem a ligação dos íons metálicos, indicando que a perda de cargas positivas do peptídeo, devido à desprotonação dos resíduos de His, aumenta a afinidade pelos íons metálicos.

A estequiometria da ligação entre os íons metálicos e Hst-5 não é bem definida. Para analisar resultados de ITC, Gusman *et al.* (2001c) utilizaram dois modelos para ajustar as curvas de titulação de Zn^{2+} e Cu^{2+} , assumindo uma estequiometria de 1:1 ou a ocorrência de interações entre os íons metálicos e múltiplos sítios. Brewer e Lajoie (2000), utilizando espectrometria de massa, mostraram que existem vários sítios de ligação a Cu^{2+} e apenas um sítio de ligação a Zn^{2+} . Nossos resultados de fluorescência e RPE sugerem que a estequiometria da interação entre esses íons e Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 é de 1:1. Os valores das constantes de ligação de Zn^{2+} aos peptídeos Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 mostradas na tabela xx são da mesma ordem daqueles obtidos por Gusman *et al.* (2001c), enquanto que as constantes obtidas para a ligação do Cu^{2+} são menores quando comparadas aos resultados apresentados nesse trabalho. Esse fato deve-se possivelmente, ao fato de que nossos estudos foram realizados em pH mais ácido (5,0) do que aquele utilizado por Gusman *et al.* (2001c). É relatado na literatura que a ligação do Cu^{2+} à Hst-5 diminui com o abaixamento do pH (Brewer e Lajoie, 2000).

Os dados obtidos neste trabalho mostraram ainda que os espectros de RPE foram sensíveis à interação íon metálico-TOAC⁰-Hst-5, permitindo o cálculo de constantes de ligação através da relação h_0/h_{-1} para os espectros do peptídeo em presença de Zn^{2+} e Cu^{2+} . O pronunciado decaimento da amplitude do sinal de RPE da TOAC⁰-Hst-5 e sua análise através da teoria de Leigh (1970) para a interação dipolar íon paramagnético-nitróxido corroboraram a conclusão da ligação do Cu^{2+} ao peptídeo e permitiram o cálculo da distância entre ambos, cerca de 4,8 Å. Esse valor está de acordo com a hipótese de que o Cu^{2+} liga-se ao motivo D¹SH³. A influência da interação entre Zn^{2+} e TOAC⁰-Hst-5 foi observada de maneira menos intensa nos espectros de RPE muito provavelmente devido à maior distância do sítio de ligação

do metal ao peptídeo em relação ao resíduo de TOAC ($H^{15}EKHH^{19}$, Grogan *et al.*, 2001). Interações entre nitróxidos e metais paramagnéticos têm sido estudadas em proteínas (Eaton e Eaton, 1978) e em membranas (Keith e Snipes, 1974; Polnaszek *et al.*, 1978; Livshits *et al.*, 2001), mas esse efeito ainda não havia sido estudado em peptídeos marcados com TOAC.

Quanto aos resultados com Mn^{2+} , como mencionado, não existem estudos com esse íon na literatura. Resultados de fluorescência sugeriram uma estequiometria de 1:1 para sua complexação com Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 e a análise dos dados forneceu valores de constantes de ligação semelhantes às dos outros íons (tabela VII). Os estudos de RPE mostraram que a adição de Mn^{2+} promoveu uma diminuição na amplitude do espectro de TOAC na TOAC⁰-Hst-5, porém essa diminuição foi muito menor do que a observada para Cu^{2+} . Também, diferentemente do Cu^{2+} , o Mn^{2+} não induziu uma redução na mobilidade da região N-terminal do peptídeo. Esses dados indicam que o Mn^{2+} não se ligou ao sítio ATCUN e sugerem que o íon poderia ligar-se ao sítio de ligação de Zn^{2+} na região C-terminal do peptídeo (Deligiannakis *et al.*, 2000). Porém, os resultados obtidos no estudo dos espectros de Mn^{2+} quando adicionado a Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5, além de evidenciar a ligação do íon aos peptídeos através da perda significativa de sinal do Mn^{2+} , pareceram mostrar um aumento crescente da ligação com o aumento da concentração do íon, o que contrasta com os resultados de fluorescência para o próprio Mn^{2+} e com os resultados de fluorescência e RPE para os outros íons, quando foi observada saturação em estequiometria 1:1.

Melino *et al.* (1999) observaram que, na presença de Zn^{2+} , Hst-5 tem a capacidade de fundir vesículas com carga líquida negativa, e que a conformação do

peptídeo, na presença de Zn^{2+} e PC:PA de ovo (8:2) em pH 7,3, assume uma estrutura α -helicoidal.

Em trabalho mais recente, Melino *et al.* (2006) sintetizaram um análogo de Hst-5 de vinte resíduos contendo o motivo ATCUN e o fragmento C-terminal de Hst-5 (DSHAGYKRKFHEKHHSHRGY, ATCUN-C16) e mostraram sua capacidade de ligar-se a DNA e exercer atividade nucleásica na presença de íons Cu^{2+} e ascorbato. Também neste caso foi estabelecida a ligação do íon apenas à região N-terminal. A atividade nucleásica foi atribuída ao fato de o complexo Cu^{2+} -ATCUN ser um forte agente oxidante através da produção de espécies reativas de oxigênio. Foi ainda observada a ação sinérgica do Zn^{2+} nessa atividade e ainda que o peptídeo N-terminal da Hst-5 (10 primeiros resíduos, contendo apenas o sítio ATCUN) apresentava menor atividade. A atividade nucleásica foi também observada para a Hst-5. Espectros de RPE do Cu^{2+} mostraram que o complexo possui geometria quadrada planar, característica da ligação desse íon ao motivo ATCUN (figura 82).

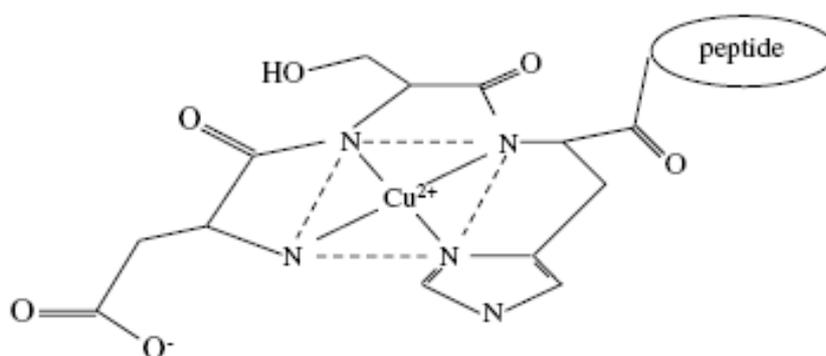


Figura 82. Modelo de coordenação de Cu^{2+} ao sítio ATCUN, evidenciando a geometria quadrada planar (Cabras *et al.*, 2007).

Estudos conformacionais de ATCUN-C16 foram realizados por meio de RMN e CD. Espectros de CD em meio aquoso mostraram que a adição de Ni^{2+} (que se liga ao mesmo sítio que o Cu^{2+}) induz a aquisição de pequena proporção de estrutura α -helicoidal e que a posterior adição de Zn^{2+} modifica pouco esse

resultado. Na presença de 100% TFE o peptídeo adquire estrutura em α -hélice. Espectros de RMN indicaram que a hélice se estende de Y⁶ a S¹⁶. Em 50% TFE, o peptídeo adquire conformação em hélice 3_{10} ; o equilíbrio é deslocado para a conformação em α -hélice pela adição de Ni²⁺. Quanto ao íon Zn²⁺, estudos anteriores dos mesmos autores (Melino *et al.*, 1999) indicaram que ocorre estabilização da estrutura secundária da região C-terminal da Hst-5, que contém o motivo H¹⁵EKHH¹⁹ ligante do íon, na presença deste. Melino *et al.* (2006) comentam que os dados sugerem que a hélice formada pela região C-terminal é menos estável do que as usualmente encontradas e que ATCUN-C16 conserva uma flexibilidade residual que parece ser uma característica estrutural peculiar de Hst-5 e sugerem que a estabilização da conformação em α -hélice pode não ser relevante para as propriedades anti-fúngicas do peptídeo. Propostas semelhantes também foram feitas por Brewer *et al.* (2002) em estudos que mostraram que um peptídeo cíclico derivado de Hst-5 era mais potente que o peptídeo nativo.

Nossos estudos em solução sugeriram que, apesar de pequenas flutuações na conformação, Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 não adquiriram estrutura secundária na presença dos íons metálicos em solução aquosa. Estudos adicionais deverão ser realizados para examinar o efeito dos íons em presença de TFE e de membranas modelo.

Em estudos biológicos tem sido observado que a interação entre íons metálicos e Hst-5 leva a efeitos distintos sobre a atividade do peptídeo. Quando foi estudada a atividade bactericida contra *E. faecalis*, a adição de Zn²⁺ e Ca²⁺ levou a um aumento da atividade lítica do peptídeo, enquanto que Mg²⁺ não teve efeito (Rydengård *et al.*, 2006). Em outro trabalho, Dong *et al.* (2003) mostraram que Mg²⁺ diminui a atividade fungicida contra *C. albicans* em até 40%, enquanto Ca²⁺

praticamente abole a ação contra o fungo, diminuindo em até 90% a atividade de Hst-5. Nossos resultados (tabela XIII) mostraram que TOAC⁰-Hst-5 é duas vezes mais ativa contra *C. albicans* do que o peptídeo nativo, e não é sensível à adição de íons metálicos, enquanto que a atividade de Hst-5 aumenta duas vezes na presença de Mn²⁺ e Zn²⁺, e não mostra sensibilidade à adição de Ca²⁺, resultado que difere do observado na literatura (Dong *et al*, 2003). A diferença de comportamento entre o peptídeo nativo e o marcado com TOAC sugere que os peptídeos podem agir através de mecanismos de ação diferentes.

5. 4. ESTUDOS COM MEMBRANAS MODELO – ASPECTOS CONFORMACIONAIS

A interação de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 com membranas modelo foi examinada empregando-se micelas e bicamadas com carga superficial líquida zero ou negativa. O estudo com micelas foi realizado empregando-se as técnicas de fluorescência, CD, e RPE, porém, devido ao fato de que os peptídeos induziram agregação de vesículas lipídicas, o intenso espalhamento de luz promovido por esse fenômeno dificultou o emprego das técnicas ópticas, sendo mais confiáveis os estudos realizados com TOAC⁰-Hst-5 através de RPE.

O aumento da intensidade de fluorescência e o aparecimento de um espectro correspondente a uma população mais imobilizada nos espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 mostraram que os peptídeos ligam-se tanto a micelas zwitteriônicas (LPC) como a micelas carregadas negativamente (LPC:LPG 2:1 e LPG pura), porém a ligação a essas últimas é bem mais pronunciada. Espectros de CD evidenciaram que, ao se ligar às micelas, os peptídeos tendem a adquirir uma conformação em dobra β tipo I. Fazendo uso do método de Kaur e Raghava (2003), estimou-se que a sequência com propensão à formação de dobra corresponde aos resíduos H⁷HGY¹⁰.

Esses resultados estão de acordo com os de Situ e colaboradores (2000) que também encontraram que Hst-5 adquire conformação em dobra β na presença de micelas de LPG. O menor aumento de fluorescência observada para TOAC⁰-Hst-5 do que para o peptídeo nativo em presença de micelas sugere a ocorrência de supressão de fluorescência em consequência da conformação adotada pelo peptídeo, a qual levaria a uma maior proximidade entre o grupamento nitroxídeo e a Tyr²⁴.

A menor ligação a micelas zwitteriônicas está de acordo com estudos anteriores para outros peptídeos (Vieira et al., 2002, Moraes et al., 2007, Marín, 2007). Estudos de supressão de fluorescência mostraram que os resíduos de Tyr estão menos acessíveis ao supressor aquossolúvel acrilamida. Foi também observada a existência de duas populações de Tyr, uma mais acessível ao supressor, em LPC e LPC:LPG, mas não em LPG. Essas populações poderiam corresponder ou às duas tirosinas presentes nos peptídeos, ou a duas populações de peptídeos em diferentes ambientes. Constantes de ligação dos peptídeos às micelas calculadas a partir dos resultados de fluorescência (assumindo estequiometria 1:1) e RPE foram bastante concordantes, exceto no caso de LPC, provavelmente devido à pouca ligação dos peptídeos.

Os espectros de RPE permitiram também examinar os agregados formados por TOAC⁰-Hst-5 e baixas concentrações de LPG, quando a soma de cargas positivas contribuídas pelo peptídeo é aproximadamente igual à soma das cargas negativas contribuídas pelo lipídio. É interessante notar que o peptídeo nesse agregado apresenta-se mais imobilizado do que quando ligado a micelas, quando os espectros de RPE se assemelham mais aos de sondas lipídicas intercaladas nesses sistemas (Schreier et al, 1978, Moraes et al., 2007).

Vale notar também que a ligação é extremamente dependente do pH, diminuindo consideravelmente com o aumento deste e chegando a valores mínimos ao redor de pH 6.5, região do pK da histidina. Esses resultados evidenciam o papel preponderante de interações eletrostáticas para a ligação dos peptídeos. Em outros estudos tem sido observado que mesmo com a diminuição da carga ainda ocorre uma ligação residual a micelas (Marin, 2007). Esse fenômeno tem sido discutido em termos de contribuições hidrofóbicas para a ligação. No entanto, no caso da Hst-5 e seu análogo marcado, a alta hidrofiliabilidade da seqüência previne uma contribuição significativa de interações hidrofóbicas para a ligação.

A interação dos peptídeos com bicamadas foi estudada empregando-se vesículas com composições lipídicas mimetizadoras das membranas de *E. coli* (PE:POPG:CL, 80:15:5) e *C. albicans* (POPC:ePE:bPS:PA: ERGO, 35:15:24:11:15), ambas com carga superficial negativa e de eritrócitos (POPC:SM:PE:COL, 26:22:7:45, carga líquida zero). Conforme mencionado acima, a agregação induzida pela interação eletrostática entre os peptídeos e mais de uma vesícula no caso de membranas carregadas negativamente promoveu intenso espalhamento de luz, levando a menores valores de fluorescência observada. Mesmo em condições de excesso de carga negativa, em concentrações mais altas de membranas (conforme tabela XI) o espalhamento de luz continuou a dificultar a realização de medidas de fluorescência e também a obtenção de espectros de CD de boa qualidade.

Mesmo nas condições difíceis encontradas, foram realizados estudos de supressão de fluorescência por acrilamida, que mostraram menor acessibilidade ao fluoróforo na presença de membranas de *E. coli*, evidenciando a ligação dos peptídeos.

Porém, estudos de RPE, técnica que não requer a transparência da amostra, forneceram informações relevantes sobre a interação peptídeo-membrana. Os espectros de TOAC⁰-Hst-5 mostraram, na presença das membranas carregadas negativamente, duas populações, uma mais imobilizada, devida ao peptídeo ligado e outra com três linhas estreitas, correspondente ao peptídeo livre em solução. Subtrações espectrais forneceram os espectros do peptídeo ligado e mostraram que o eixo z do nitróxido encontra-se aproximadamente paralelo à normal à bicamada. O cálculo do parâmetro de ordem para esses espectros resultou em um valor maior para membranas de *Candida*, mostrando que a amplitude de movimento da molécula é menor nessas membranas, possivelmente devido à presença de ergosterol, que, como o colesterol (Lapper *et al.*, 1972, Schreier-Muccillo *et al.*, 1973, Mailer *et al.*, 1974) sabidamente diminui a amplitude e a velocidade de movimento em membranas (Butler *et al.*, 1978, Aracava *et al.*, 1981).

As subtrações espectrais também permitiram calcular o coeficiente de partição do peptídeo nas membranas mimetizadoras de *E. coli* e de *C. albicans*. Assim como em micelas, foi observada grande diminuição na partição com o aumento do pH. Também, como observado em micelas, a partição em membranas mimetizadoras de eritrócitos foi muito pequena.

Existem poucos estudos conformacionais de interação de Hst-5 com membranas lipícas na literatura. Em presença de vesículas de PC:PA de ovo foi observado que Hst-5 não adquire estrutura secundária, assumindo conformação em α -hélice após a adição de íons Zn²⁺ (Melino *et al.*, 1999). Em estudos com o fragmento contendo os 16 resíduos da região C-terminal da Hst-5, observou-se que esse peptídeo adquire conformação α -helicoidal em presença de vesículas de DMPC em pH 7,4.

5. 5. ESTUDOS COM MEMBRANAS MODELO – ASPECTOS FUNCIONAIS

Medidas de condutividade elétrica em BLM de azolecitina (carga líquida negativa) e de difitanoil fosfatidilcolina (zwitteriônica) e ainda de permeabilização de vesículas de POPG (carga líquida negativa) monitorada através do vazamento do marcador fluorescente aquossolúvel carboxifluoresceína mostraram efeitos diferentes para Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5. Assim, enquanto o comportamento conformacional dos dois peptídeos foi bastante semelhante, apenas o análogo marcado foi capaz de induzir condutividade iônica a pH 4,5, com maior efeito no caso de azolecitina, e de permeabilizar as vesículas de POPG a pH 7,4. Esse resultado foi bastante surpreendente, uma vez que os dois peptídeos diferem apenas pela presença de TOAC no N-terminal do análogo marcado.

Os resultados para Hst-5 estão de acordo com o estudo de den Hertog *et al.*, (2004) que mostrou que o peptídeo não causou vazamento do fluoróforo aquossolúvel calceína em lipossomos unilamelares de PC de ovo:PS de cérebro bovino 9:1 em pH 7,2.

5. 6. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E HEMOLÍTICA

Os resultados obtidos para a atividade hemolítica da Hst-5 estão de acordo com outros obtidos na literatura. Também o análogo marcado não apresentou atividade hemolítica.

Quanto à atividade anti-fúngica, Hst-5 forneceu resultados semelhantes àqueles obtidos em outros estudos e evidenciando o papel de íons metálicos na ação anti-fúngica. Por outro lado, TOAC⁰-Hst-5 também apresentou ação anti-fúngica, em concentrações semelhantes àquelas empregadas para o peptídeo nativo, porém não se observou o efeito de íons metálicos na atividade. Esse

resultado remete às diferenças observadas em membranas modelo e sugere a possibilidade de diferentes mecanismos para os dois peptídeos frente a membranas de *C. albicans*.

5.7. IMPLICAÇÕES DOS RESULTADOS PARA O MECANISMO DE AÇÃO DA HST-5

O mecanismo de ação de Hst-5 ainda não foi totalmente esclarecido. Devido à alta hidrofobicidade e carga de Hst-5, tem sido proposto que esse peptídeo, diferentemente da maioria dos PAM, não atua através de mecanismo de formação de poros (Helmerhorst *et al.*, 2001b ; Ruissen *et al.*, 2002; den Hertog *et al.*, 2005).

Assim sendo, outros mecanismos tem sido propostos. Entre esses, a mitocôndria tem sido enfocada como candidato a alvo intra-celular (Helmerhorst *et al.*, 1999a). Foi proposto que, uma vez atuando na mitocôndria, Hst-5 participaria da geração de radicais livres, por interferir na cadeia respiratória, desencadeando a apoptose (Helmerhorst *et al.*, 2001a). No entanto, resultados de Veerman *et al.* (2004) e Wunder *et al.* (2004) estão em desacordo com esse modelo. Outro modelo proposto é de indução do efluxo de íons e moléculas pequenas como ATP através de canais transportadores (Koshlukova *et al.*, 1999; Baev *et al.*, 2003; Baev *et al.*, 2004). No caso de fungos, estudos mostraram a ligação de Hst-5 a uma proteína de choque térmico específica desses organismos, presente na membrana plasmática de *C. albicans*, sendo então enviada ao meio intra-celular (Edgerton *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2003, 2006). No entanto, existem resultados que mostraram atividade bactericida de Hst-5 (MacKay *et al.*, 1984) e sua ação como um peptídeo que penetra células em *Leishmania donovani* (Luque-Ortega *et al.*, 2008). A ausência da proteína de choque térmico de *C. albicans* na superfície celular de bactérias, e sua atividade de penetrar células de *L. donovani* mostram que os aspectos que

envolvem a interação de Hst-5 com membranas biológicas ainda precisam ser melhor entendidos.

A internalização de Hst-5 é também motivo de debate na literatura e, embora tenha sido proposto que esse fenômeno poderia ocorrer a favor de um potencial transmembranar (Helmerhorst *et al.*, 1999a), também esse aspecto necessita de mais estudos.

Alguns estudos realizados com análogos e fragmentos de Hst-5 tem evidenciado a interação dessas moléculas com membranas. Foi verificado que o fragmento contendo os últimos 16 resíduos do C-terminal de Hst-5 retém a atividade fungicida do peptídeo nativo (Raj *et al.*, 1990). Diversos estudos têm sido feitos com análogos desse peptídeo, mutando resíduos polares por Leu. Uma vez que esses peptídeos adotam conformação α -helicoidal na presença de TFE (Tsai *et al.*, 1996; Helmerhorst *et al.*, 2001b), a estrutura formada apresenta caráter anfipático. Essa anfipaticidade modifica o mecanismo de ação desses peptídeos, que passam a formar poros e apresentar translocação em vesículas lipídicas (den Hertog *et al.*, 2005). Estudos com *C. albicans* mostraram que a atividade dos peptídeos mutados aumenta em até cinco vezes (Helmerhorst *et al.*, 2001b) e que eles passam a ser hemolíticos, ao contrário de Hst-5 (Helmerhorst *et al.*, 1997). No entanto, mesmo com o aumento do momento hidrofóbico desses peptídeos, eles não apresentam atividade hemolítica ou fungicida em meios com alta força iônica (Helmerhorst *et al.*, 1997) e não foram localizados em associação com membranas, o que seria indicativo da formação de poros (Ruissen *et al.*, 2002).

Apesar de vários estudos sugerirem que o mecanismo de ação da Hst-5 não envolve efeito sobre a membrana plasmática, claramente, para exercer efeitos a nível intra-celular, o peptídeo deve atravessar a barreira representada pela membrana,

tornando desejável a compreensão, a nível molecular das interações e aspectos conformacionais envolvidos nessa etapa. Os resultados obtidos neste trabalho oferecem subsídios para essa compreensão. Vale notar ainda que vários estudos tem focado também o papel de íons metálicos na atividade do peptídeo e que tem sido observado que a interação com essas espécies afeta as propriedades conformacionais da Hst-5 em solventes orgânicos e na presença de membranas. Estudos futuros terão como objetivo examinar, através das técnicas espectroscópicas empregadas neste trabalho, o efeito dos íons aqui estudados sobre as propriedades conformacionais de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 naquelas condições.

6. CONCLUSÕES

As técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular (CD), fluorescência e ressonância paramagnética eletrônica (RPE) foram empregadas para estudar as propriedades conformacionais de Hst-5 e seu análogo contendo o aminoácido paramagnético TOAC N-terminal (TOAC⁰-Hst-5) em solução aquosa, em função do pH, de TFE, e de íons metálicos, e em presença de membranas modelo de composição.

Foi também examinada a atividade dos dois peptídeos em membranas lipídicas planas, na permeabilização de membranas modelo e frente ao fungo *Candida albicans* e eritrócitos humanos, com o objetivo de estabelecer correlações entre a atividade e a estrutura dos peptídeos.

Os resultados levaram às seguintes conclusões:

1. Nos estudos do efeito do pH, espectros de fluorescência mostraram a capacidade de TOAC de suprimir a fluorescência e que o pK dos resíduos de Tyr foi deslocados para valores menores. Espectros de CD mostraram pequenas flutuações conformacionais, mas foram mantidas estruturas ao acaso. Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 mostraram a coexistência de duas populações, protonada e desprotonada, em troca lenta. A partir de medidas de desdobramento hiperfino (a_N), foram calculados os pKs de TOAC e outros grupos ionizáveis; a relação de altura dos picos de campo central e alto também foi sensível à titulação do peptídeo.

2. Em TFE espectros de CD indicaram que os peptídeos adotaram conformação α -helicoidal. Espectros de fluorescência de Hst-5 mostraram aumento da fluorescência, e os de TOAC⁰-Hst-5 mostraram supressão, indicando aproximação de TOAC dos resíduos de Tyr. Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 também refletiram as mudanças conformacionais.

3. Estudos de fluorescência mostraram a interação de Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 com Cu²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺, permitindo o cálculo de constantes de ligação. Espectros de CD refletiram pequenas variações conformacionais, sem aquisição de estrutura secundária. Espectros de RPE de TOAC⁰-Hst-5 na presença dos íons paramagnéticos Cu²⁺ e Mn²⁺ indicaram interações spin-spin, permitindo o cálculo das distâncias metal-nitróxido. Curvas de tempo de correlação rotacional em função da concentração dos íons permitiram calcular constantes de ligação da mesma ordem de grandeza daquelas obtidas por fluorescência.

4. Hst-5 e TOAC⁰-Hst-5 ligaram-se em maior extensão a micelas negativas do que a zwitteriônicas num processo pH-dependente. Estudos de supressão de fluorescência por acrilamida confirmaram esses resultados, indicando a modulação

da ligação por interações eletrostáticas. Espectros de CD mostraram que os peptídeos adotam conformação em dobra β tipo I.

5. Estudos de RPE da interação de TOAC⁰-Hst-5 com vesículas de composição lipídica mimetizando membranas de *E. coli* e *C. albicans* (carga líquida negativa) e eritrócitos (carga líquida zero) confirmaram essa modulação. Na presença das membranas negativamente carregadas os espectros apresentaram extremos externos e internos, indicando que o eixo z do nitróxido orienta-se paralelamente à normal à bicamada.

6. Estudos funcionais utilizando bicamadas lipídicas planas mostraram que TOAC⁰-Hst-5, mas não Hst-5, forma poros nas membranas. Também, TOAC⁰-Hst-5, mas não Hst-5, permeabiliza vesículas carregadas negativamente.

7. A atividade fungicida de TOAC⁰-Hst-5 foi maior do que a de Hst-5 na ausência de íons, porém foi a mesma na presença de Mn²⁺ e Zn²⁺. Finalmente, TOAC⁰-Hst-5 mostrou maior atividade hemolítica que Hst-5.

8. Os resultados obtidos para a atividade dos peptídeos sugerem uma possível diferença nos mecanismos de ação de Hst-5 e seu análogo marcado, apesar da semelhança no comportamento conformacional dos peptídeos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abiko, Y.; Nishimura, M.; Kaku, T. (2003) Defensins in saliva and the salivary glands. *Med. Electron.Microsc.* **36**: 247-252.

Alvarez, C.; Casallanovo, F.; Shida, C.S.; Nogueira, L.V.; Martinez, D.; Tejuca, M.; Pazos, I.F.; Lanio, M.E.; Menestrina, G.; Lissi, E.; Schreier, S. (2003) Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces: modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction. *Chem. Phys. Lipids* **122**: 97-105.

- Andersen, J.H.; Jenssen, H.; Sandvik, K.; Gutteberg, T.J. (2004) Anti-HSV activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface. *J. Med. Virol.* **74**: 262-271.
- Anderson, D.J.; Hanson, P.; McNulty, J.; Millhauser, G.; Monaco, V.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C. (1999) Solution structures of TOAC-labeled trichogin GA IV peptides from allowed ($g \approx 2$) and half-field electron spin resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 6919-6927.
- Andrade, M.A.; Chacon, P.; Merelo, J.J.; Moran, F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.* **6**: 383-390.
- Aracava, Y.; Smith, I.C.; Schreier, S. (1981) Effect of amphotericin B on membranes: a spin probe study. *Biochemistry* **20**: 5702-5707.
- Avrahami, D.; Shai, Y. (2003) Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D,L-amino acid-containing antimicrobial peptides: a plausible mode of action. *Biochemistry* **42**: 14946-56.
- Baev, D.; Rivetta, A.; Li, X.S.; Vylkova, S.; Bashi, E.; Slayman, C.L.; Edgerton, M. (2003) Killing of *C. albicans* by human salivary histatin 5 is modulated, but not determined, by the K^+ channel TOK1. *Infect. Immun.* **71**: 3251-3260.
- Barbosa, S.R.; Cilli, E.M.; Lamy-Freund, M.T.; Castrucci, A.M.; Nakaie, C.R. (1999) First synthesis of a fully active spin-labeled peptide hormone. *FEBS Lett.* **446**: 45-48.
- Barbosa, S.R.; Casallanovo, F.; Cilli, E.M.; Paiva, A.C.M.; Schreier, S.; Nakaie, C.R. **In:** Martinez, J.; Fehrentz, J.A., Eds. *Peptides 2000*; EDK: Paris, France, 2001: 451.
- Barr, D.; Jiang, J.J.; Weber, R.T. (1996) How to quantitate nitroxide spin adduct using TEMPOL. *Bruker Manual – Experimental Techniques note 3.*
- Bartucci, R.; Guzzi, R.; De Zotti, M.; Toniolo, C.; Sportelli, L.; Marsh, D. (2008) Backbone dynamics of alamethicin bound to lipid membranes: spin-echo electron paramagnetic resonance of TOAC-spin labels. *Biophys. J.* **94**: 2698-2705.

- Beven, L.; Helluin, O.; Molle, G.; Duclouhier, H.; Wroblewski, H. (1999) Correlation between anti-bacterial activity and pore sizes of two classes of voltage-dependent channel-forming peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1421**: 53-63.
- Bettio, A.; Gutewort, V.; Poppl, A.; Dinger, M.C.; Zschornig, O.; Arnold, K.; Toniolo, C.; Beck-Sickinger, A.G. (2002) Electron paramagnetic resonance backbone dynamics studies on spin-labelled neuropeptide Y analogues. *J. Peptide Sci.* **8**: 671-682.
- Breukink, E.; de Kruijff, B. (1999) The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochim. Biophys. Acta* **1462**: 223-234.
- Brewer, D.; Hunter, H.; Lajoie, G. (1998) NMR studies of the antimicrobial salivary peptides histatin 3 and histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions. *Biochem. Cell Biol.* **76**: 247-256.
- Brewer, D.; Lajoie, G. (2000) Evaluation of the metal binding properties on the histidine-rich antimicrobial peptides histatins 3 and 5 by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **14**: 1736-1745.
- Butler, K.W.; Smith, I.C. (1978) Sterol ordering effects and permeability regulation in phosphatidylcholine bilayers. A comparison of ESR spin-probe data from oriented multilamellae and dispersions. *Can. J. Biochem.* **56**: 117-122.
- Cabras, T.; Patamia, M.; Melino, S.; Inzitari, R.; Messina, I.; Castagnola, M.; Petruzzelli, R. (2007) Pro-oxidant activity of histatin 5 related Cu(II)-model peptide probed by mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**: 277-284.
- Campbell, I.D.; Dwek, R.A. (1984) *Biological Spectroscopy*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., London, p. 179-216.
- Carrington, A.; McLachlan A.D. (1967) *Introduction to Magnetic Resonance*, Harper and Row, N. York.
- Chen, Y.H.; Yang, J.T.; Chau, K.H. (1974) Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **13**: 3350-3359.
- Chen, G.C.; Yang, J.T. (1977) Two-point calibration of circular dichrometer with *d*-10-camphorsulfonic acid. *Anal. Letters* **10**: 1195-1207.

- Cilli, E.M.; Marchetto, R.; Schreier, S.; Nakaie, C.R. (1997) Use of spin label EPR spectra to monitor peptide chain aggregation inside resin beads. *Tetrahedron Lett.* **38**: 517-520.
- Cilli, E.M.; Marchetto, R.; Schreier, S.; Nakaie, C.R. (1999) Correlation between the mobility of spin-labeled peptide chains and resin solvation: an approach to optimize the synthesis of aggregating sequences. *J. Org. Chem.* **64**: 9118-9123.
- Cohn, M.; Diefenbach, H.; Taylor, J.S. (1971) Magnetic resonance studies of the interaction of spin-labeled creatine kinase with paramagnetic manganese-substrate complexes. *J. Biol. Chem.* **246**: 6037-6042.
- Crisma, M.; Monaco, V.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; George, C.; Flippen-Anderson, J.L. (1997) Crystallographic structure of a helical lipopeptaibol antibiotic analogue. *Lett. Peptide Sci.* **4**: 213-218.
- Dathe, M.; Nikolenko, H.; Meyer, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. (2001) Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* **501**: 146-150.
- Deligiannakis, Y.; Louloudi, M.; Hadjiliadis, N. (2000) Electron spin echo envelope modulation (ESEEM) spectroscopy as a tool to investigate the coordination environment of metal centers. *Coord. Chem. Rev.* **204**: 1-112.
- de Deus Teixeira, L.G.; Bersanetti, P.A.; Schreier, S.; Carmona, A.K.; Nakaie, C.R. (2007) Analogues containing the paramagnetic amino acid TOAC as substrates for angiotensin I-converting enzyme. *FEBS Lett.* **581**: 2411-2415.
- Dong, J.; Vylkova, S.; Li, X.S.; Edgerton, M. (2003) Calcium blocks fungicidal activity of human salivary histatin 5 through disruption of binding with *Candida albicans*. *J. Dent. Res.* **82**: 748-752.
- Du Pasquier, L. (2001) The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **129B**: 1-15.
- Edgerton, M.; Koshlukova, S.E.; Lo, T.E.; Chrzan, B.G.; Straubinger, R.M.; Raj, P.A. (1998) Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **273**: 20438-20447.
- Ehrenstein, G.; Lecar, H. (1977) Electrically-gated ionic channels in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* **10**: 1-34.

- Ehret-Sabatier, L.; Loew, D.; Goyffon, M.; Fehlbaum, P.; Hoffmann, J.A.; van Dorsselaer, A.; Bulet, P. (1996) Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. *J. Biol. Chem.* **271**: 29537-29544.
- Epand, R.; Vogel, H.J. (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanism of action. *Biochem. Biophys. Acta.* **1462**: 11-28.
- Epand, R.; Epand, R.M.; Monaco, V.; Stoia, S.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C. (1999) The antimicrobial peptide trichogin and its interaction with phospholipid membranes. *Eur. J. Biochem.* **266**: 1021-1028.
- Esposito, C.; Tedeschi, A.; Scrima, M.; D'errico, G.; Ottaviani, M.F.; Rovero, P.; D'ursi, A.M. (2006) Exploring interaction of beta-amyloid segment (25-35) with membrane models through paramagnetic probes. *J. Pept. Sci.* **12**: 766-774.
- Fázio, M.A.; Oliveira Jr, V.X.; Bulet, P.; Miranda, M.T.; Daffre, S.; Miranda, A. (2006) Structure-activity relationship studies of gomesin: importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability. *Biopolymers* **84**: 205-218.
- Freed, J.H.; Fraenkel, G.K. (1963) Theory of linewidths in electron spin resonance spectra. *J. Chem. Phys.* **39**: 326-348.
- Gaffney, B.J.; McConnell, H.M. (1974) Paramagnetic resonance spectra of spin labels in phospholipid membranes. *J. Magn. Res.* **16**: 1-28.
- Gill, S.C.; von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**: 319-326.
- Greenfield, N.; Fasman, G.D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**: 4108-4116.
- Griffith, O.H.; Waggoner, A.S. (1969) Nitroxide free radicals: spin labels for probing biomolecular structure. *Acc. Chem. Res.* **2**: 17-24.
- Griffith, O.H.; Jost, P.C. (1976) *Lipid spin labels in biological membranes.* in: Spin Labeling – Theory and Applications, Berliner, L.W, ed., Academic Press, 453-523.
- Griffith, O.H.; Cornell, D.W.; McConnell, H.M. (1965) Nitrogen hyperfine tensor and g tensor of nitroxide radicals. *J. Chem. Phys.* **43**: 2909-2910.

- Groenink, J.; Ruissen, A.L.A.; Lowies, D.; Van't Hof, W.; Veerman, E.C.I.; Nieuw Amerongen, A.V. (2003) Degradation of antimicrobial histatin-variant peptides in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* **82**: 753-757.
- Grogan, J.; McKnight, C.J.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. (2001) Zinc and copper bind to unique sites of histatin 5. *FEBS Lett.* **491**: 76-80.
- Gusman, H.; Travis, J.; Helmerhorst, E.J.; Potempa, J.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. (2001a) Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infect. Immun.* **69**: 1402-1408.
- Gusman, H.; Grogan, J.; Kagan, H.M.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. (2001b) Salivary histatin 5 is a potent competitive inhibitor of the cysteine proteinase clostripain. *FEBS Lett.* **489**: 97-100.
- Gusman, H.; Lendenmann, U.; Grogan, J.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. (2001c) Is salivary histatin 5 a metallopeptide? *Biochim. Biophys. Acta* **1545**: 86-95.
- Gyurko, C.; Lendenmann, U.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. (2000) *C. albicans* mutants deficient in respiration are resistant to the small cationic salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 348-354.
- Gyurko, C.; Lendenmann, U.; Helmerhorst, E.J.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. (2001) Killing of *Candida albicans* by histatin 5: cellular uptake and energy requirement. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**: 297-309.
- Hancock, R.E.W.; Chapple, D.S. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 1317-1323.
- Hanson, P.; Martinez, G.; Millhauser, G.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Vita, C. (1996) Distinguishing helix conformations in alanine-rich peptides using the unnatural amino acid TOAC and electron spin resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 271-272.
- Hardt, M.; Thomas, L.R.; Dixon, S.E.; Newport, G.; Agabian, N.; Prakobphol, A.; Hall, S.C.; Witkowska, H.E.; Fisher, S.J. (2005) Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry. *Biochemistry* **44**: 2885-2899.

- Hartsel, S.; Bolard, J. (1996) Amphotericin B: new life for an old drug. *Trends Pharmacol Sci.* **17**: 445-449.
- Hecht, G. (1999) Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am. J. Physiol.* **277**: C351-C358.
- Helmerhorst, E.J.; Van 't Hof, W.; Veerman, E.C.I.; Simoons-Smit, Ina; Nieuw Amerongen, A.V. (1997) Synthetic histatin analogs with broad-spectrum antimicrobial activity. *Biochem. J.* **326**: 39-45.
- Helmerhorst, E.J.; Breeuwer, P.; van't Hof, W.; Walgreen-Weterings, E.; Oomen, L.C.J.M.; Veerman, E.C.I.; Amerongen, A.V.N.; Abee, T. (1999a) The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J. Biol. Chem.* **274**: 7286-7291.
- Helmerhorst, E.J.; Reijnders, I.M.; van't Hof, W.; Veerman, E.C.I.; Nieuw Amerongen, A.V. (1999b) A critical comparison of the hemolytic and fungicidal activities of cationic antimicrobial peptides. *FEBS Lett.* **449**: 105-110.
- Helmerhorst, E.J.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. (2001a) The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14637-14642.
- Helmerhorst, E.J.; van't Hof, W.; Breeuwer, P.; Veerman, E.C.I.; Abee, T.; Troxler, R.F.; Amerongen, A.V.N.; Oppenheim, F.G. (2001b) Characterization of histatin 5 with respect to amphipathicity, hydrophobicity, and effects on cell and mitochondrial membrane integrity excludes a candidacidal mechanism of pore formation. *J. Biol. Chem.* **276**: 5643-5649.
- Helmerhorst, E.J.; Murphy, M.P.; Troxler, R.F.; Oppenheim, F.G. (2002) Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1556**: 73-80.
- den Hertog, A.L.; Sang, H.W.W.F.; Kraayenhof, R.; Bolscher, J.G.M.; van't Hof, W.; Veerman, E.C.I.; Amerongen, A.V.N. (2004) Interactions of histatin 5 and histatin 5-derived peptides with liposome membranes: surface effects, translocation and permeabilization. *Biochem. J.* **379**: 665-672.
- den Hertog, A.L.; van Marle, J.; van Veen, H.A.; Van't Hof, W.; Bolscher, J.G.; Veerman, E.C.; Nieuw Amerongen, A.V. (2005) Candidacidal effects of two

antimicrobial peptides: histatin 5 causes small membrane defects, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane. *Biochem. J.* **388**: 689-695.

Hicks, J.; Garcia-Godoy, F.; Flaitz, C. (2003) Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J. Clin. Pediatr. Dent.* **28**: 47-52.

Huang, X.; Xie, W.; Gong, Z. (2000) Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba*. *FEBS Lett.* **478**: 123-126.

Hubbell, W.L.; McConnell, H.M. (1971) Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **93**: 314-326.

Inbaraj, J.J.; Cardon, T.B.; Laryukhin, M.; Grosser, S.M.; Lorigan, G.A. (2006) Determining the topology of integral membrane peptides using EPR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 9549-9554.

Iovino, M.; Falconi, M.; Marcellini, A.; Desideri, A. (2001) Molecular dynamics simulation of the antimicrobial salivary peptide histatin-5 in water and in trifluoroethanol: a microscopic description of the water destructuring effect. *J. Peptide Res.* **58**: 45-55.

Jang, W.S.; Lee, S.C.; Lee, Y.S.; Shin, Y.P.; Shin, K.H.; Sung, B.H.; Kim, B.S.; Lee, S.H.; Lee, I.H. (2007) Antimicrobial effect of halocidin-derived peptide in a mouse model of *Listeria* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 4148-4156.

Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R.E.W. (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 491-511.

Jost, P.C.; Waggoner, A.S.; Griffith, O.H. (1971) in *Structure and function of biological membranes*, L.I. Rothfield, ed. Academic Press, Orlando, p. 83-144.

Karim, C.B.; Zhang, Z.; Howard, E.C.; Torgersen, K.D.; Thomas, D.D. (2006) Phosphorylation-dependent conformational switch in spin-labeled phospholamban bound to SERCA. *J. Mol. Biol.* **358**: 1032-1040.

Karp, E.S.; Inbaraj, J.J.; Laryukhin, M.; Lorigan, G.A. (2006) EPR studies of an integral membrane peptide inserted into aligned phospholipid bilayer nanotube arrays. *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 12070-12071.

- Kaur, H.; Raghava, G.P. (2003) Prediction of beta-turns in proteins from multiple alignment using neural network. *Protein Sci.* **12**: 627-634.
- Keith, A.D.; Snipes, W. (1974) Viscosity of cellular protoplasm. *Science* **183**: 666-668.
- Kivelson, D. (1960) Theory of ESR linewidths of free radicals. *J. Chem. Phys.* **33**: 1094.
- Koshlukova, S.E.; Lloyd, T.L.; Araujo, M.W.B.; Edgerton, M. (1999) Salivary histatin 5 induces non-lytic release of ATP from *Candida albicans* leading to cell death. *J. Biol. Chem.* **274**: 18872-18879.
- Koshlukova, S.E.; Araujo, M.W.; Baev, D.; Edgerton, M. (2000) Released ATP is an extracellular cytotoxic mediator in salivary histatin 5-induced killing of *C. albicans*. *Infect. Immun.* **68**: 6848-6856.
- Lakowicz, J.R. (1999) *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2nd edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Lapper, R.D.; Paterson, S.J.; Smith, I.C. (1972) A spin label study of the influence of cholesterol on egg lecithin multibilayers. *Can. J. Biochem.* **50**: 869-881.
- Lee, A.G.; Schreier, S. (1993) *Binding of charged molecules to lipid bilayers.* in: Liposome Technology, v. II Entrapment of Drugs and other Materials (Gregoriadis, G., Ed.) CRC Press, Boca Raton, pp. 1-25.
- Leigh Jr., J.S. (1970) ESR rigid-lattice line shape in a system of two interacting spins. *J. Chem. Phys.* **52**: 2608-2612.
- Lenander-Lumikari, M.; Loimaranta, V. (2000) Saliva and dental caries. *Adv. Dent. Res.* **14**: 40-47.
- Liang, Z.; Westlund, P.O.; Wikander, G. (1993) A quantitative electron-spin resonance line shape study of the local motion in the micellar and liquid crystalline lamellar phases of the oleoyllysolecithin water system. *J. Chem. Phys.* **99**: 7098-7107.
- Li, X.S.; Reddy, M.S.; Baev, D.; Edgerton, M. (2003) *Candida albicans* Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. *J. Biol. Chem.* **278**: 28553-28561.

- Li, X.S.; Sun, J.N.; Okamoto-Shibayama, K.; Edgerton, M. (2006) Candida albicans cell wall ssa proteins bind and facilitate import of salivary histatin 5 required for toxicity. *J. Biol. Chem.* **281**: 22453-22463.
- Livshits, V.A.; Dzikovski, B.G.; Marsh, D. (2001) Mechanism of relaxation enhancement of spin labels in membranes by paramagnetic ion salts: dependence on 3d and 4f ions and on the anions. *J. Magn. Res.* **148**: 221-237.
- Ludtke, S.J.; He, K.; Heller, W.T.; Harroun, H.A.; Yang, L.; Huang, H.W. (1996) Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* **35**: 13723-13728.
- Luque-Ortega, J.R.; van't Hof, W.; Veerman, E.C.; Saugar, J.M.; Rivas, L. (2008) Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in Leishmania. *FASEB J.* **22**: 1817-1828.
- MacKay, B.J.; Denepitiya, L.; Iacono, V.J.; Krost, S.B.; Pollock, J.J. (1984) Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on Streptococcus mutans. *Infect. Immun.* **44**: 695-701.
- Mailer, C.; Taylor, C.P.; Schreier-Muccillo, S.; Smith, I.C. (1974) The influence of cholesterol on molecular motion in egg lecithin bilayers—a variable-frequency electron spin resonance study of a cholestane spin probe. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**: 671-678.
- Marcello, A.; Palù, G. (1995) Disruption of herpes simplex virus ribonucleotide reductase quaternary structure by peptide inhibitors as a novel approach to antiviral therapy. *J. Chemother.* **7**: 403-405.
- Marchetto, R.; Schreier, S.; Nakaie, C.R. (1993) A novel spin labeled amino acid derivative for use in peptide synthesis: (9-fluorenylmethoxy-carbonyl)-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl-4-amino-4-carboxylic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 11042-11043.
- Marín, N.S. *Propriedades conformacionais de hormônios peptídicos ligantes de receptores acoplados a proteínas G em solução e em presença de membranas modelo.* São Paulo: Instituto de Química; Universidade de São Paulo, 2007, 195 p. Tese de Doutorado em Ciências.

- Marlborough, D.I.; Ryan, J.W. (1977) Circular dichroism spectra of bradykinin analogs containing beta-homoamino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**: 757-65.
- Marr, A.K.; Gooderham, W.J.; Hancock, R.E.W. (2006) Antibacterial peptides for therapeutic use: Obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**: 468-472.
- Marsh, D.; Jost, M.; Peggion, C. Toniolo, C. (2007a) TOAC spin labels in the backbone of alamethicin: EPR studies in lipid membranes. *Biophys. J.* **92**: 473-481.
- Marsh, D.; Jost, M.; Peggion, C. Toniolo, C. (2007b) Lipid chain-length dependence for incorporation of alamethicin in membranes: electron paramagnetic resonance studies on TOAC-spin labeled analogs. *Biophys. J.* **92**: 4002-4011.
- Matsuzaki, K. (1998) Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**: 391-400.
- Merrifield, R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 2149-2154.
- McCabe, D.; Cukierman, T.; Gabay, J.E. (2002) Basic residues in azurocidin/HBP contribute to both heparin binding and antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* **277**: 27477-27488.
- Melino, S.; Rufini, S.; Sette, M.; Morero, R.; Grottesi, A.; Paci, M.; Petruzzelli, R. (1999) Zn²⁺ ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. *Biochemistry* **38**: 9626-9633.
- Melino, S.; Gallo, M.; Trotta, E.; Mondello, F.; Paci, M.; Petruzzelli, R. (2006) Metal-binding and nuclease activity of an antimicrobial peptide analogue of the salivary histatin 5. *Biochemistry* **45**: 15373-15383.
- Merelo, J.J.; Andrade, M.A.; Prieto, A.; Morán F. (1994) Proteinotopic Feature Maps. *Neurocomputing.* **6**: 443-454.
- Messana, I.; Cabras, T.; Pisano, E.; Sanna, M.T.; Olinas, A.; Manconi, B.; Pellegrini, M.; Paludetti, G.; Scarano, E.; Fiorita, A.; Agostino, S.; Contucci, A.M.; Calò, L.; Picciotti, P.M.; Manni, A.; Bennick, A.; Vitali, A.; Fanali, C.; Inzitari, R.;

- Castagnola, M. (2008) Trafficking and postsecretory events responsible for the formation of secreted human salivary peptides: a proteomics approach. *Mol. Cell. Proteomics* **7**: 911-926.
- Mirzabekov, T.A.; Silberstein, A.Y.; Kagan, B.L. (1999) Use of planar lipid bilayer membranes for rapid screening of membrane active compounds. *Methods in Enzymology* **294**: 661-674.
- Mishra, P.; Bolard, J.; Prasad, R. (1992) Emerging role of lipids of *Candida albicans*, a pathogenic dimorphic yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **1127**: 1-14.
- Monaco, V.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Hanson, P.; Millhauser, G.L. (1999) Orientation and immersion depth of a helical lipopeptaibol in membranes using TOAC as an ESR probe. *Biopolymers* **50**: 239-253.
- Mookherjee, N.; Hancock, R.E.W. (2007) Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 922-933.
- Moraes, L.G.; Fázio, M.A.; Vieira, R.F.; Nakaie, C.R.; Miranda, M.T.; Schreier, S.; Daffre, S.; Miranda, A. (2007) Conformational and functional studies of gomesin analogues by CD, EPR and fluorescence spectroscopies. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**: 52-58.
- Mueller, P.; Rudin, D.O.; Tien, H.T.; Wescott, W.C. (1963) Methods for formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **67**: 534-535.
- Murakami, Y.; Nagata, H.; Amano, A.; Takagaki, M.; Shizukuishi, S.; Tsunemitsu, A.; Aimoto, S. (1991) Inhibitory effects of human salivary histatins and lysozyme on coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mitis*. *Infect. Immun.* **59**: 3284-3286.
- Murakami, T.; Nakajima, T.; Koyanagi, Y.; Tachibana, K.; Fujii, N.; Tamamura, H.; Yoshida, N.; Waki, M.; Matsumoto, A.; Yoshie, O.; Kishimoto, T.; Yamamoto, N.; Nagasawa, T. (1997) A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **186**: 1389-1393.

- Murakami, Y.; Xu, T.; Helmerhorst, E.J.; Ori, G.; Troxler, R.F.; Lally, E.T.; Oppenheim, F.G. (2002) Inhibitory effect of synthetic histatin 5 on leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol.* **17**: 143-149.
- Nakaie, C.R.; Goissis, G.; Schreier, S.; Paiva, A.C.M. (1981) pH dependence of EPR spectra of nitroxides containing ionizable groups. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **14**: 173-180.
- Nakaie, C.R.; Goissis, G.; Schreier, S.; Paiva, A.C.M. (1983) Synthesis and properties of spin-labeled angiotensin derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* **742**: 63-71.
- Nakaie, C.R.; Barbosa, S.R.; Vieira R.F.F.; Fernandez, R.M.; Cilli, E.M.; Castrucci, A.M.L.; Visconti, M.A.; Ito, A.S., Lamy-Freund, M.T. (2001) Comparative EPR and fluorescence conformational studies of fully active spin-labeled melanotropic peptides. *FEBS Lett.* **497**: 103-107.
- Nakaie, C.R.; Silva, E.G.; Cilli, E.M.; Marchetto, R.; Schreier, S.; Paiva, T.B.; Paiva, A.C.M. (2002) Synthesis and pharmacological properties of TOAC-labeled angiotensin and bradykinin analogs. *Peptides* **23**: 65-70.
- Nesmelov, Y.E.; Karim, C.B.; Song, L.; Fajer, P.G.; Thomas, D.D. (2007) Rotational dynamics of phospholamban determined by multifrequency EPR. *Biophys. J.* **93**: 2805-2812.
- Oliveira, E.; Cilli, E.M.; Miranda, A.; Jubilut, G.N.; Albericio, F.; Andreu, D.; Paiva, A.C.M.; Schreier, S.; Tominaga, M.; Nakaie, C.R. (2002) Monitoring the chemical assembly of a transmembrane bradykinin receptor fragment: correlation between resin solvation, peptide chain mobility, and rate of coupling. *Eur. J. Org. Chem.* **21**: 3686-3694.
- Oppenheim, F.G.; Yang, Y.C.; Diamond, R.D.; Hyslop, D.; Offner, G.D.; Troxler, R.F. (1986) The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion. *J. Biol. Chem.* **261**: 1177-1182.
- Oppenheim, F.G.; Xu, T.; McMillian, F.F.; Levitz, S.M.; Diamond, R.D.; Offner, G.D.; Troxler, R.F. (1988) Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. *J. Biol. Chem.* **263**: 7472-7477.

- Owen, J.S.; Bruckdorfer, R.; Day, R.C.; McIntyre, N. (1982) Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J. Lipid Res.* **23**: 124-132.
- Papo, N.; Shai, Y. (2005) Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**: 784-790.
- Park, C.B.; Kim, H.S.; Kim, S.C. (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**: 253-257.
- Payne, J.B.; Iacono, V.J.; Crawford, I.T.; Lepre, B.M.; Bernzweig, E.; Grossbard, B.L. (1991) Selective effects of histidine-rich polypeptides on the aggregation and viability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Oral Microbiol. Immunol.* **6**: 169-176.
- Perczel, A.; Hollósi, M. (1996) Turns in: Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. (G.D. Fasman, Ed.), Plenum Press, New York, p. 285-380.
- Pertinhez, T.A.; Nakaie, C.R.; Carvalho, R.S.; Paiva, A.C.M.; Tabak, M.; Toma, F.; Schreier, S. (1995) Conformational changes upon binding of a receptor loop to lipid structures: possible role in signal transduction. *FEBS Lett.* **375**: 239-242.
- Pertinhez, T.A.; Nakaie, C.R.; Paiva, A.C.M.; Schreier, S. (1997) Spin-labeled extracellular loop from a seven-transmembrane helix receptor: studies in solution and interaction with model membranes. *Biopolymers* **42**: 821-829.
- Petruzzelli, R.; Clementi, M.E.; Marini, S.; Coletta, M.; Di Stasio, E.; Giardina, B.; Misiti F. (2003) Respiratory inhibition of isolated mammalian mitochondria by salivary antifungal peptide histatin-5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**: 1034-1040.
- Pohl, E.E.; Krylov, A.V.; Block, M.; Pohl, P. (1998) Changes of the membrane potential profile induced by verapamil and propranolol. *Biochim. Biophys. Acta* **1373**: 170-178.

- Pollock, J.J.; Denepitiya, L.; MacKay, B.J.; Iacono, V.J. (1984) Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **44**: 702-707.
- Raj, P.A.; Edgerton, M.; Levine, M.J. (1990) Salivary histatin 5: dependence of sequence, chain length, and helical conformation for candidacidal activity. *J. Biol.Chem.* **265**: 3898-3905.
- Raj, P.A.; Marcus, E.; Sukumaran, D.K. (1998) Structure of human salivary histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions. *Biopolymers* **45**: 51-67.
- Ramalingam, K.; Gururaja, T.L.; Ramasubbu, N.; Levine, M.J. (1996) Stabilization of helix by side-chain interactions in histatin-derived peptides: role in candidacidal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **225**: 47-53.
- Rassat, A.; Rey, P. (1967) Nitroxides. XXIII. Preparation of amino acid free radicals and their complex salts. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **3**: 815-817.
- Reddy, K.V.R.; Yedery, R.D.; Aranha, C. (2004) Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int. J. Antimicrob. Agents* **24**: 536-547.
- Robinson Jr., W.E.; McDougall, B.; Tran, D.; Selsted, M.E. (1998) Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **63**: 94-100.
- Rohl, C.A.; Baldwin, R.L. (1998) Deciphering the rules of helix stability in peptides. *Methods Enzymol.* **295**: 1-26.
- Rouser, G.; Fleisher, S.; Yamamoto, A. (1970) Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorous analysis of spots. *Lipids* **5**: 494-496.
- Rozek, A.; Friedrich, C.L.; Hancock, R.E. (2000) Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* **39**: 15765-15774.
- Ruissen, A.L.A.; Groenink, J.; Helmerhorst, E.J.; Walgreen-Weterings, E.; van't Hof, W.; Veerman, E.C.I.; Amerongen, A.V.N. (2001) Effects of histatin 5 and derived peptides on *Candida albicans*. *Biochem. J.* **356**: 361-368.

- Ruissen, A.L.A.; Groenink, J.; van't Hof, W.; Walgreen-Weterings, E.; van Marle, J.; van Veen, H.A.; Voorhout, W.F.; Veerman, E.C.I.; Nieuw Amerongen, A.V. (2002) Histatin 5 and derivatives. Their localization and effects on the ultra-structural level. *Peptides* **23**: 1391-1399.
- Rydengård, V.; Andersson Nordahl, E.; Schmidtchen, A. (2006) Zinc potentiates the antibacterial effects of histidine-rich peptides against *Enterococcus faecalis*. *FEBS J.* **273**: 2399-2406.
- Salinas, R.K.; Shida, C.S.; Pertinhez, T.A.; Spisni, A.; Nakaie, C.R.; Paiva, A.C.; Schreier, S. (2002) Trifluoroethanol and binding to model membranes stabilize a predicted turn in a peptide corresponding to the first extracellular loop of the angiotensin II AT(1A) receptor. *Biopolymers* **65**: 21-31.
- Samsom, M.S. (1991) The biophysics of peptide models of ion channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **55**: 139-235.
- Sanglard, D.; Odds, F.C. (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet* **2**: 73-85.
- Santos, E.L.; de Picoli Souza, K.; Sabatini, R.A.; Martin, R.P.; Fernandes, L.; Nardi, D.T.; Malavolta, L.; Shimuta, S.I.; Nakaie, C.R.; Pesquero, J.B. (2008) Functional assessment of angiotensin II and bradykinin analogues containing the paramagnetic amino acid TOAC. *Int. Immunopharmacol.* **8**: 293-299.
- Scandella, C.J.; Devaux, P.; McConnell, H.M. (1972) Rapid lateral diffusion of phospholipids in rabbit sarcoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **69**: 2056-2060.
- Schreier, S.; Polnaszek, C.F.; Smith, I.C.P. (1978a) Spin labels in membranes. Problems in practice. *Biochim. Biophys. Acta* **515**: 395-436.
- Schreier, S.; Ernandes, J.R.; Cuccovia, I.; Chaimovich, H. (1978b) Spin label studies of structural and dynamical properties of detergent aggregates. *J. Magn. Res.* **30**: 283-298.
- Schreier, S. *Estudos estruturais e dinâmicos de membranas pelo método do marcador de spin.* São Paulo: Instituto de Química; Universidade de São Paulo, 1979, 271 p. Tese de Livre Docência em Ciências.

- Schreier, S.; Frezzatti Jr., W.A.; Araujo, P.S.; Chaimovich, H.; Cuccovia, I.M. (1984) Effect of lipid membranes on the apparent pK of the local anesthetic tetracaine. Spin label and titration studies. *Biochim. Biophys. Acta.* **769**: 231-237.
- Schreier, S.; Barbosa, S.R.; Casallanovo, F.; Vieira, R.F.F.; Cilli, E.M.; Paiva, A.C.M.; Nakaie, C.R. (2004) Conformational basis for the biological activity of TOAC-labeled angiotensin II and bradykinin: electron paramagnetic resonance, circular dichroism and fluorescence studies. *Biopolymers* **74**: 389-402.
- Schreier-Muccillo, S.; Mards, D.; Dugas, H.; Schneider, H.; Smith, Ian C. P. (1973) Spin-probe study of the influence of cholesterol on motion and orientation of phospholipids in oriented multibilayers and vesicles. *Chem. Phys. Lipids* **10**: 11-27.
- Seelig, J. (1970) Spin label studies of oriented smectic liquid crystals (a model system for bilayer membranes). *J. Am. Chem. Soc.* **92**: 3881-3887.
- Seelig, J. (2004) Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1666**: 40-50.
- Shai, Y.; Oren, Z. (2001) From "carpet" mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides* **22**: 1629-1641.
- Situ, H.; Bobek, L. A. (2000) In vitro assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin-5, and salivary mucin (MUC7) domain 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1485-1493.
- Situ, H.; Balasubramaniam, S.V.; Bobek, L.A. (2000) Role of α -helical conformation of histatin-5 in candidacidal activity examined by proline variants. *Biochim. Biophys. Acta* **1475**: 377-382.
- Sitaram, N.; Nagaraj, R. (1999) Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**: 29-54.
- Smythe, M.L.; Nakaie, C.R.; Marshall, G.R. (1995) α -helical versus 3_{10} -helical conformation of alanine-based peptides in aqueous solution: an electron spin resonance investigation. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 10555-10562.
- Stewart, J.M.; Young, J.D. (1984) *Solid phase peptide synthesis.* Pierce Chemical Co., Rockford.

- Taylor, J.S.; Leigh Jr., J.S.; Cohn, M. (1969) Magnetic resonance studies of spin-labeled creatine kinase system and interaction of two paramagnetic probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **64**: 219-226.
- Thomas, L.; Scheidt, H.A.; Bettio, A.; Huster, D.; Beck-Sickinger, A.G.; Arnold, K.; Zschörnig, O. (2005) Membrane interaction of neuropeptide Y detected by EPR and NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1714**: 103-113.
- Thomas, A.; Brasseur, R. (2006) Tilted peptides: the history. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**: 523-527.
- Tien, H.T.; Ottova, A.L. (1999) From self-assembled bilayer lipid membranes (BLMs) to supported BLMs on metal and gel substrates to practical applications. *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Asp.* **149**: 217-233.
- Toniolo, C.; Valente, E.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Pilloni, G.; Corvaja, C.; Toffoletti, A.; Martinez, G.V.; Hanson, M.P.; Millhauser, G.L.; George, C.; Flippen-Andersen, J.L. (1995) Synthesis and conformational studies of peptides containing TOAC, a spin-labeled C^{α,α}-disubstituted glycine. *J. Peptide Sci.* **1**: 45-57.
- Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F. (1998) TOAC, a nitroxide spin-labeled, achiral C^α-tetrasubstituted α-amino acid, is an excellent tool in material science and biochemistry. *Biopolymers* **47**: 153-158.
- Vargas, J.; Alarcón, J.M.; Rojas E. (2000) Displacement currents associated with the insertion of Alzheimer disease amyloid β-peptide into planar bilayer membranes. *Biophys. J.* **79**: 934-944.
- Veerman, E.C.I.; Nazmi, K.; van't Hof, W.; Bolscher, J.G.M.; den Hertog, A.L.; Amerongen, A.V.N. (2004) Reactive oxygen species play no role in the candidacidal activity of the salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Biochem. J.* **381**: 447-452.
- Veerman, E.C.; Valentijn-Benz, M.; Nazmi, K.; Ruissen, A.L.; Walgreen-Weterings, E.; van Marle, J.; Doust, A.B.; van't Hof, W.; Bolscher, J.G.; Amerongen, A.V. (2007) Energy depletion protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides by rigidifying its cell membrane. *J. Biol. Chem.* **282**: 18831-18841.

- Vieira R.F.F.; Casallanovo, F.; Cilli, E.M., Paiva, A.C.M.; Schreier, S.; Nakaie, C.R. (2002) Conformational studies of TOAC-labeled bradykinin analogues in model membranes. *Lett. Pep. Sci.* **9**: 83-89.
- Vieira, R.F.F. *Síntese, estudos biológicos e conformacionais, em solução e em sistemas membrana-miméticos, de peptídeos contendo aminoácido paramagnético.* São Paulo: Departamento de Biofísica; Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, 2004, 144 p. Tese de Doutorado em Ciências.
- Vitorino, R.; Lobo, M.J.C.; Duarte, J.R.; Ferrer-Correia, A.J.; Domingues, P.M.; Amado, F.M.L. (2005) The role of salivary peptides in dental caries. *Biomed. Chromatogr.* **19**: 214-222.
- Voet, D; Voet, JG. (2005) *Biochemistry* John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- van Voorst, F.; de Kruijff, B. (2000) Role of lipids in the translocation of proteins across membranes. *Biochem. J.* **347**: 601-612
- Vylkova, S.; Li, X.S.; Berner, J.C.; Edgerton, M. (2006) Distinct antifungal mechanisms: beta-defensins require *Candida albicans* Ssa1 protein, while Trk1p mediates activity of cysteine-free cationic peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**: 324-331.
- Vylkova, S.; Jang, W.S.; Li, W.; Nayyar, N.; Edgerton, M. (2007) Histatin 5 initiates osmotic stress response in *Candida albicans* via activation of the Hog1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Eukaryot. Cell.* **6**: 1876-1888.
- Wang, W.; Owen, S.M.; Rudolph, D.L.; Cole, A.M.; Hong, T.; Waring, A.J.; Lal, R.B.; Lehrer, R.I. (2004) Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1. *J. Immunol.* **173**: 515-520.
- Wang, Z.; Wang, G. (2004) APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res.* **32**: D590-D592.
- Wertz, J.; Bolton, J.R. (1972) *Electron Spin Resonance. Elementary Theory and Practical Applications*, McGraw-Hill Book Company, N. York.
- Woody, R.W. (1996) *Theory of circular dichroism of proteins in:* Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. (G.D. Fasman, Ed.), Plenum Press, New York, p. 25-67.

- Woody, R.W.; Dunker, A.K. (1996) *Aromatic and cystine side-chain circular dichroism in proteins* in: Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. (G.D. Fasman, Ed.), Plenum Press, New York, p. 109-157.
- Wunder, D.; Dong, J.; Baev, D.; Edgerton, M. (2004) Human salivary histatin 5 fungicidal action does not induce programmed cell death pathways in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **48**: 110-115.
- Xiong, Y.Q.; Bayer, A.S.; Yeaman, M.R. (2002) Inhibition of intracellular macromolecular synthesis in *Staphylococcus aureus* by thrombin-induced platelet microbicidal proteins. *J. Infect. Dis.* **186**: 668–677.
- Xu, T.; Levitz, S.M.; Diamond, R.D.; Oppenheim, F.G. (1991) Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infect. Immun.* **59**: 2549-2554.
- Yacoby, I.; Benhar, I. (2007) Targeted anti bacterial therapy. *Infect. Disord. Drug Targets* **7**: 221-229.
- Yang, L.; Weiss, T.M.; Lehrer, R.I.; Huang, H.W. (2000) Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys. J.* **79**: 2002-2009.
- Yang, L.; Harroun, T.A.; Weiss, T.M.; Ding, L.; Huang, H.W. (2001) Barrel-stave model or toroidal model? A case study in melittin pores. *Biophys. J.* **81**: 1475-1485.
- Yeaman, M.R.; Yount, N.Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* **55**: 27-55.
- Zairi, A.; Serres, C.; Tangy, F.; Jouannet, P.; Hani, K. (2008) In vitro spermicidal activity of peptides from amphibian skin: Dermaseptin S4 and derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **16**: 266-275.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389-395.
- Zhang, Z.; Remmer, H.A.; Thomas, D.D. Karim, C.B. (2007) Backbone dynamics determined by EPR to optimize solid-phase peptide synthesis of TOAC-labeled phospholamban. *Biopolymers* **88**: 29-35.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)