

Estudo da relação estrutura-atividade do Hb33-61a, um peptídeo sintético antimicrobiano derivado da cadeia α da hemoglobina bovina

Elaine Nogueira¹ (PG)*, Alessandra Machado¹ (PQ), Sirlei Daffre (PQ)², Antônio Miranda³, Maria Terêsa M. Miranda¹ (PQ) elaineno@iq.usp.br, mtmirand@iq.usp.br

¹ Departamento de Bioquímica, IQ-USP, C.P. 26077, 05508-900, São Paulo, Brasil ² Departamento de Parasitologia, ICB-USP, 05508-900, São Paulo, Brasil ³ Departamento de Biofísica, UNIFESP, 04044-020, São Paulo, Brasil.

Palavras Chave: hemoglobina, peptídeos antimicrobianos, relação estrutura-atividade, *Candida albicans*.

Introdução

Fragmentos da hemoglobina (Hb) com funções biológicas diversas têm sido descritos desde a década de 70. Entretanto, somente em 1999, é que foi descrito um fragmento de Hb com atividade antimicrobiana gerado *in vivo*.¹ Este peptídeo corresponde à porção 33-61 da cadeia α da hemoglobina bovina (*Hb33-61*) e foi isolado do conteúdo intestinal do carrapato *Boophilus microplus*. O seu análogo sintético amidado (*Hb33-61a*) foi ativo contra bactérias Gram-positivas e fungos.¹ Embora não apresentasse estrutura definida em água, em micelas de SDS ele apresentou estrutura secundária definida por uma dobra β na porção N-terminal (Lys⁴⁰-Phe⁴³) e por uma dobra β (Ser⁴⁹-Ser⁵²) seguida de uma α -hélice no C-terminal (Ala⁵³-Ala⁶⁰), sendo as duas partes conectadas por uma alça flexível espacialmente organizada (Pro⁴⁴-Leu⁴⁸).² Diante deste conhecimento, análogos amidados, com carboxila α livre e/ou acetilados correspondentes às porções 48-61, 33-52 e 40-61 foram sintetizados e testados frente a *Candida albicans*. Os resultados obtidos demonstraram que a amidação levou a um aumento das atividades dos análogos, enquanto a acetilação levou à sua redução. Assim como o *Hb33-61a*, o *Hb40-61a* apresentou MIC* de 3,12-6,25 μ M, é fungicida a 6,25 μ M, capaz de permeabilizar a membrana de *C. albicans* a 62,5 μ M e apresenta baixa atividade hemolítica (16 \pm 3 % a 50 μ M).³ Assim, o presente trabalho objetivou continuar o estudo da relação estrutura-atividade do *Hb33-61a* através da síntese de novos análogos e análise conformacional destes por dicróismo circular (CD).

Resultados e Discussão

Os peptídeos foram sintetizados pelo método da síntese em fase sólida. Eles foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e caracterizados por hidrólise total seguida de análise de aminoácidos do hidrolisado e por RP-HPLC acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI-MS). Os testes de microdiluição em caldo foram usados para obter as atividades frente a *C. albicans* descritas na **Tabela 1**. Como se observa, a

deleção da porção Gly⁵⁹-Lys⁶¹ ou Gly⁵⁶-Lys⁶¹ do *Hb40-61a* levou à

Tabela 1: Atividade antifúngica dos análogos do *Hb33-61a*

| Peptídeo | MIC* (mM) | Peptídeo | MIC* (mM) |
|------------------------------|------------|----------|-------------|
| Hb40-61a | 3,12-6,25 | Hb40-56a | 100,0-200,0 |
| Hb40-58a | 6,25-12,50 | Hb35-56a | >200,0 |
| [Ala ⁵⁷]Hb40-58a | 6,25-12,50 | Hb40-63 | 3,12-6,25 |

*MIC: [a]-[b], onde [a] é a maior concentração testada no qual o microorganismo cresce e [b] é a menor concentração que causa total inibição do seu crescimento.

redução de sua atividade; a adição dos aminoácidos Val⁶² e Ala⁶³ a ele não teve efeito sobre ela. Por outro lado, a adição da porção Ser³⁵-Thr³⁹ ao *Hb40-56a* causou a redução da sua atividade. Finalmente, a troca da Gly⁵⁷ pela Ala⁵⁷ não teve impacto sobre a atividade do *Hb40-58a*.

Testes adicionais realizados em concentrações variadas de NaCl evidenciaram a sensibilidade dos análogos estudados à força iônica do meio (MICs >200 μ M em NaCl 137mM).

Os espectros de CD coletados em 200mM de SDS não foram suficientes para fornecer informações estruturais que poderiam explicar a diferença de atividade destes novos análogos. Aparentemente, a substituição da Gly⁵⁷ pela Ala⁵⁷ modificou a estrutura secundária do *Hb40-58a*.

Conclusões

O *Hb40-61a* é a porção mínima ativa do *Hb33-61a*. Este dado tem grande relevância se considerados o alto custo dos peptídeos e a demanda atual por novos compostos ativos frente a *C. albicans*, levedura de grande importância clínica. O fato de este peptídeo ser sensível a concentrações salinas próximas da fisiológica não significa que ele não possa vir a ser empregado na terapêutica.

Agradecimentos

Fapesp/CNPq: financiamento/bolsa; C.W. Liria: análise de aminoácidos.

¹ Fogaça, A. C.; da Silva, P. L. Jr.; Miranda, M. T. M.; Bianchi, A. G.; Miranda, A.; Ribolla, P. E. M. e Daffre, S. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 25330-25334.

² Sforça, M. L.; Machado, A.; Figueredo, R. C. R.; Oyama, S. Jr.; Silva, F. D.; Miranda, A.; Daffre, S.; Miranda, M. T. M.; Spisni, A. e Pertinhez, T. A. *Biochemistry* **2005**, *44*, 6440-6451.

³ Machado, A.; Sforça, M. L.; Miranda, A.; Daffre, S.; Pertinhez, T. A., Spisni, A. e Miranda, M. T. M..Biopolymers – Peptide Science, no prelo.