

INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COM GLICOSAMINOGLICANOS DA MATRIZ EXTRACELULAR

Letícia Paulino Sperandio^{1*}; Wagner Alves de Souza Júdice²; Antonio Carlos Ribeiro-Filho³; Antonio de Miranda⁴; Marcus Vinícius Buri⁵; Edgar Julian Paredes-Gamero⁶.

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail:leticiasperandio7@gmail.com¹

Professor e Pesquisador da Universidade de Mogi das Cruzes;

wagnerjudice@gmail.com²

Estudante do Curso de Doutorado em Biotecnologia; antonio_biomed@hotmail.com³

Professor e Pesquisador da Universidade Federal de São Paulo;

miranda.unifesp@gmail.com⁴

Estudante do Curso de Doutorado em Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo; marcus.buri@gmail.com⁵

Professor e Pesquisador da Universidade de Mogi das Cruzes; edgarparedes@umc.br⁶

Área do Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-chave: Peptídeos Antimicrobianos; Antitumoral; Glicosaminoglicanos

INTRODUÇÃO

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) geralmente são moléculas pequenas de até 45 resíduos de aminoácidos, sendo normalmente anfipáticas, ou seja, apresentam uma extremidade hidrofílica e hidrofóbica com aminoácidos carregados positivamente. Estes PAMs desempenham um papel importante na defesa contra agentes patogênicos como bactérias gram-negativa e positiva, fungos e leveduras, vírus e mais recentemente, células tumorais e têm demonstrado ter potente ação antitumoral (Paredes et al., 2012a; Paredes et al., 2012b). Uma das características semelhantes dos PAMs está na estrutura, estes podem ser lineares, apresentando estrutura desordenada em meio aquoso, tendem a formar uma conformação em α -hélice anfipática (Radermacher et al., 1993), ou podem ser cíclicos apresentando pontes de dissulfeto que levam a formação de folhas β ou grampo β . Nesta classe de peptídeos encontra-se os peptídeos gomesina, protegrina, taquiplesina e polifemusina (Barbosa et al., 2007; Nakamura et al., 1988; Mangoni et al., 1996). Estes peptídeos têm mostrado ter capacidade citotóxica contra tumores por diversos mecanismos celulares. Um aspecto interessante da ação destes PAMs contra células tumorais é a capacidade de entrarem na célula por mecanismos não conhecidos, apesar do seu tamanho e carga positiva (Paredes et al., 2012a). A matriz extracelular é um espaço preenchido por componentes viscosos e fibrosos, os principais compostos da matriz são colágeno, fibras elásticas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, que se organizam formando uma rede. Os glicosaminoglicanos são polímeros lineares (não ramificados) de dissacarídeos constituindo uma família complexa como: condroitim 4 e 6 sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparan sulfato (HS), heparina (HEP), queratam sulfato (QS) e ácido hialurônico (AH). Estes compostos diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não aminado, quanto ao grau e posição de sulfatação, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter e intradissacarídica (Feldner et al., 2008).

OBJETIVO

Determinar a afinidade dos glicosaminoglicanos com os peptídeos antimicrobianos (gomesina, taquiplesina, protegrina e polifemusina).

METODOLOGIA

Os peptídeos antimicrobianos que foi utilizado neste estudo foram sintetizados pela estratégia T-Boc pelo Prof. Dr. Antonio de Miranda, do Depto de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo. A ligação de glicosaminoglicanos aos PAM contendo o aminoácido triptofano em sua estrutura foi monitorada pela espectrofluorescência intrínseca deste aminoácido. Logo foram testados os glicosaminoglicanos heparan sulfato, condroitin sulfato 4S, condroitin sulfato 6S e heparina sulfatada (pela semelhança estrutural e de carga do heparan sulfato). Também foi utilizado o dextran como molécula carregada negativamente, mas com estrutura diferente aos glicosaminoglicanos. A variação de intensidade de fluorescência intrínseca foi quantificada como medida da ligação dos GAGs aos peptídeos antimicrobianos e esta variação foi utilizada para determinar a afinidade (K_d = constante de dissociação) da gomesina pelos GAGs utilizados. As medidas de fluorescência intrínseca foram realizadas a 37°C, em tampão Tris-HCl (50 mM) contendo 100 mM de NaCl a pH 7.4. A fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro Hitachi-F2500 com excitação a 280 nm (10 nm slit) e a emissão capturada na faixa de 300-400 nm (20 nm slit). A variação da fluorescência intrínseca relativa será apresentada como $\Delta F/F_0 = (F_0 - F_{obs})/F_0$, onde F_0 é a fluorescência inicial dos peptídeos antimicrobianos e F_{obs} é a fluorescência observada após a adição de GAG.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fluorescência intrínseca do triptofano foi monitorada e observada pela formação do complexo peptídeo e GAGs usando o Espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-55 fazendo a varredura do comprimento de onda $\lambda_{EX} = 280$ nm e $\lambda_{EM} = 300-500$ nm. O espectro mostra a fluorescência de Trp-gomesina (100 μ M) na presença de diferentes concentrações de glicosaminoglicanos. O K_d (constante de dissociação) foi determinada por regressão não linear $\Delta F/F_0 = (F_0 - F_{obs})/F_0$ gerando uma curva de hipérbole por meio do programa Grafit, utilizando a fluorescência do pico de emissão de Trp-gomesina.

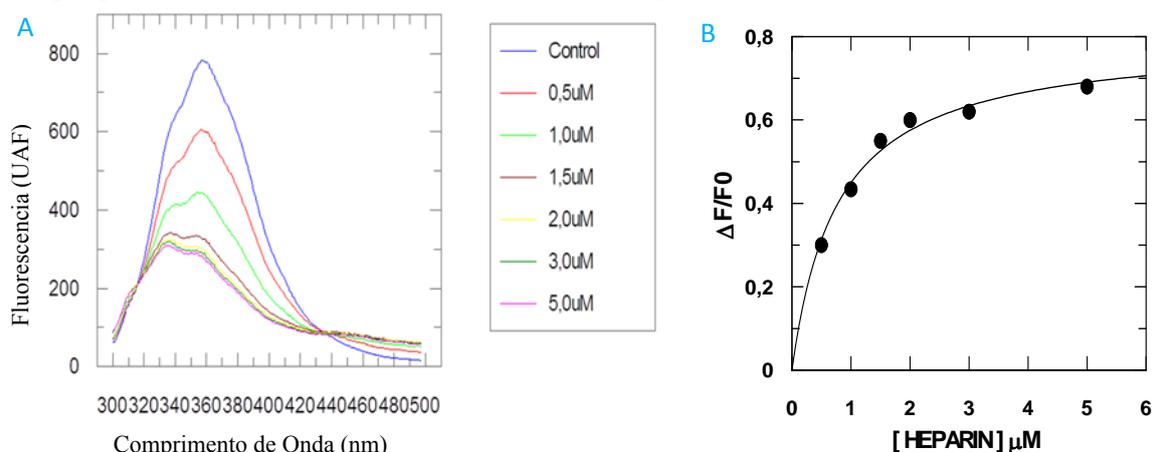


Figura 1: (A) fluorescência Intrínseca do triptofano Spectro de TRP-gomesina com a heparina GAGs de ligação. (B) Curva de hipérbole determinado por constante de dissociação (kd).

Observa-se no decorrer da varredura a presença de dois pontos isobécticos que indica um ponto de intersecção de um grupo de espectros de duas substâncias puras que se sobrepõem. Nestes pontos tem-se a mesma absorvidade de fluorescência para todos os espectros em diferentes concentrações de GAGs a 37°C. No decorrer do teste há o decaimento do espectro em cada concentração que mostra quanto mais baixa a ligação com o solvente maior a absorvidade. O teste com os outros peptídeos foram realizados da mesma forma, os resultados do Kd de todos os peptídeos com os GAG estão resumidos na tabela a seguir.

Glicosaminoglicanos	Gomesina	Taquipliesina	Polifemusina	Protegrina	Kd (µM)				
Heparina	0,78 ± 0.10	0,71 ± 0.06	1,03 ± 0.06	0,68 ± 0.05					
Chondroitina sulfato	0,95 ± 0.08	1,62 ± 0.11	0,39 ± 0.06	0,86 ± 0.11					
Dermatan sulfato	3,43 ± 0.17	2,87 ± 0.16	11,92 ± 1.39	2,44 ± 0.24					
Heparan sulfato	1,01 ± 0.05	0,72 ± 0.04	1,93 ± 0.09	0,20 ± 0,009					
Dextran sulfato	4,50 ± 1.05	1,92 ± 0.26	3,93 ± 0.14	1,28 ± 0,38					

Tabela 1: constante de dissociação (Kd) de ligação de peptídeos antimicrobianos -Trp com glicosaminoglicanos.

Os PAMs utilizados são moléculas catiônicas carregadas positivamente enquanto os glicosaminoglicanos apresentam diferentes graus de sulfatação, exceto o ácido hialurônico, dando-lhes característica aniônica (Feldner et al., 2008). Uma possibilidade de interação seria por uma ligação por cargas opostas que tendem a se interagir. Contudo, como observado na tabela 1 o dextran sulfato, um composto sintético com maior carga negativa, não foi quem apresentou maior afinidade pelos PAMs. Dentre os GAGs testados a heparina e o heparan sulfato, que possuem estruturas parecidas mostraram maior afinidade pelos PAMs sugerindo que a estrutura dos PAMs poderia estar relacionada com a afinidade observada. Por outro lado o Dermatan sulfato foi o composto que apresentou menor afinidade apesar de também possuir cargas aniônicas na sua estrutura.

CONCLUSÃO

Estes resultados determinaram a afinidade dos PAMs com os GAG, ademais estes dados também sugerem que a afinidade dos PAMs pode ser dependente da estrutura, uma vez que a carga negativa não representou uma relevância direta com a afinidade.

AGRADECIMENTOS: FAPESP, CNPq, CAPES, FAEP.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, F. M.; DAFFRE, S.; MALDONADO, R. A.; MIRANDA, A.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L. Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anticryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole. **FEMS Microbiol**, Inglaterra, p.279–286, 2007.

FELDNER, P. C. Jr.; KOBAYASHI, E. Y.; SARTORI, M. G.; Nader, H.; Baracat, E. C.; Castello-Girão, M. J. B. Avaliação dos glicosaminoglicanos do tecido periuretral de pacientes com e sem prolapso genital. **Rev Assoc Med Bras**, Brasil, v.54, n.2, p.173-177, 2008.

MANGONI, M. E.; AUMELAS, A.; CHARNET, P.; ROUMESTAND, C.; CHICHE, L.; DESPAUX, E.; GRASSY, G.; CALAS, B.; CHAVANIEU, A. Change in membrane permeability induced by protegrin 1: implication of disulphide bridges for pore formation. **FEBS Letters**, Inglaterra, v.25;383, n.1-2, p.93-98, 1996.

NAKAMURA, T.; FURUNAKA, H.; MIYATA, T.; TOKUNAGA, F.; MUTA, T.; IWANAGA, S.; NIWA, M.; TAKAO, T.; SHIMONISHI, Y. Tachypleisin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. **Journal of Biological Chemistry**, Los Angeles, v263, n32, p.16709-16713, 1988.

PAREDES-GAMERO, E. J.; MARTINS M. N. C.; CAPPABIANCO, F. A. M.; IDE, J. S.; MIRANDA, A. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption. **Biochimica et Biophysica Acta**, Holanda, p. 1062-1072, 24 de fevereiro de 2012a.

PAREDES-GAMERO, E. J.; CASAES-RODRIGUES, R. L.; MOURA, G. E. D. D.; DOMINGUES, T. M.; BURI, M. V.; FERREIRA, V. H. C.; TRINDADE, E. S.; MORENO-ORTEGA, A. J.; CANO-ABAD, M. F.; NADER, H. B.; FERREIRA, A. T.; MIRANDA, A.; JUSTOS, G. Z.; and TERSARIOL, I. L. S. Cell- Permeable gomesin peptide promotes cell death by intracelular ca^{2+} overload. **Mol. Pharmaceutics**, n.9, p.2686 – 2697. 2012b.

RADERMACHER, S.W.; SCHOOP, V.M. and SCHLUESENER, H.J. Bactenecin, a leukocytic antimicrobial peptide, is cytotoxic to neuronal and glial cells. **Journal of Neuroscience Research**, Stanford, v.15;36, n.6, p.657-662, 1993.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed.(the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.