

INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS COM GLICOSAMINOGLICANOS DA MATRIZ EXTRACELULAR

Letícia Paulino Sperandio¹; 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 da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail:wagnerjudice@gmail.com²

Doutorando em Biotecnologia; e-mail:antonio_biomed@hotmail.com³

Professor da Universidade Federal de São Paulo; miranda.unifesp@gmail.com⁴

Doutorando em Biologia Molecular; marcus.buri@gmail.com⁵

Professor 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. 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, demonstrando ter potente ação antitumoral (Paredes-Gamero et al., 2012a; Paredes-Gamero 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). Um aspecto interessante da ação destes PAMs contra células tumorais é a capacidade de entrarem na célula por mecanismos desconhecidos, apesar do seu tamanho e carga positiva (Paredes-Gamero et al., 2012a).

OBJETIVO

Determinar a afinidade dos glicosaminoglicanos com os peptídeos antimicrobianos e sua participação na citotoxicidade/entrada dos PAMs (gomesina, taquiplesina, protegrina e polifemusina) nas células de adenocarcinoma HeLa.

METODOLOGIA

Os PAMs utilizados foram sintetizados pela estratégia T-Boc pelo Prof. Dr. Antonio de Miranda, do Depto de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo. Como modelo tumoral foi usada a linhagem de adenocarcinoma HeLa. A viabilidade celular foi realizada pelo método de MTT. A quantificação da entrada dos PAMs foi realizada por microscopia confocal (SP8, Leica) e citometria de fluxo (Accuri C6, BD).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram determinados os Kd dos PAMs (gomesina, protegrina, polifemusina e taquiplesina) por diferentes GAGs (heparina, heparan sulfato, condroitin-6-sulfato, e ácido hialurônico). A regressão não linear permitiu determinar o valor da constante de dissociação Kd apresentado na Tabela 1. Pode observar-se, que os PAMs apresentam

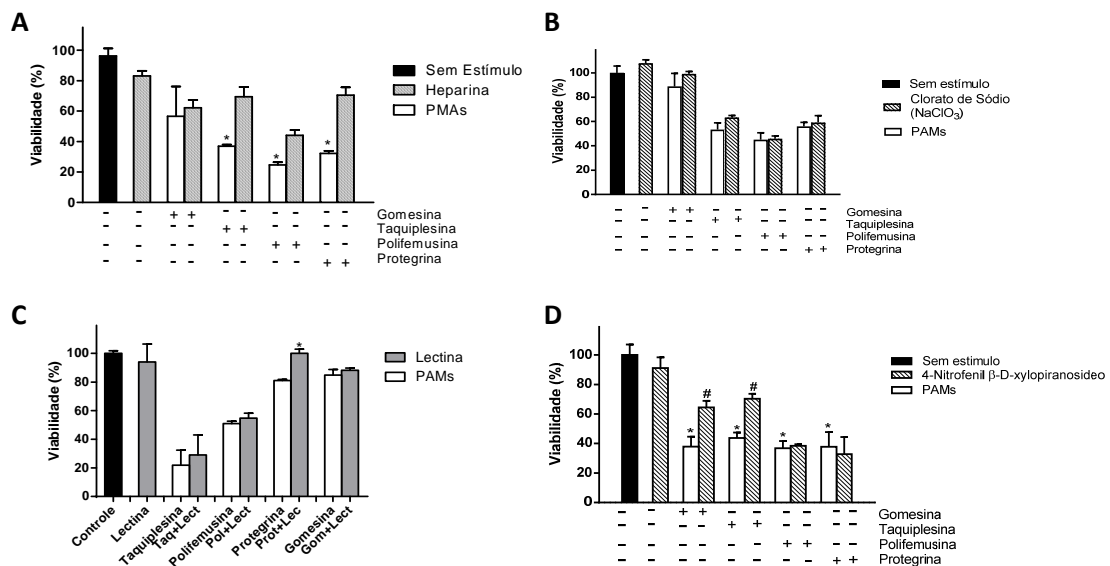
afinidade na ordem de μM pelos PAMs testados. A desulfatação da heparina promoveu pequenas diferenças de afinidade.

Tabela 1: Constante de dissociação (Kd) de ligação de PAMs com GAGs.

GAGs	Kd (μM)			
	Gomesina	Taquiplesina	Polifemusina	Protegrina
Heparina	0,78 \pm 0.10	0,71 \pm 0.06	1,03 \pm 0.06	0,68 \pm 0.05
Condroitina sulfato	0,95 \pm 0.08	1,62 \pm 0.11	0,39 \pm 0.06	0,86 \pm 0.11
Dermatan sulfato	3,43 \pm 0.17	2,87 \pm 0.16	11,92 \pm 1.39	2,44 \pm 0.24
Heparan sulfato Pulmão	1,01 \pm 0.05	0,72 \pm 0.04	1,93 \pm 0.09	0,20 \pm 0,009
Dextran sulfato	4,50 \pm 0.45	1,92 \pm 0.26	3,93 \pm 0.14	1,28 \pm 0,38
Ácido hialurônico	1,48 \pm 0,21	0,09 \pm 0,01	0,55 \pm 0,06	1,86 \pm 0,17
GAGs modificados				
Heparina 2-O,N-Dessulfatada	4,63 \pm 0,42	6,8 \pm 0,75	3,43 \pm 0,09	1,81 \pm 0,17
Heparina desulfatada (80%)	1,96 \pm 0,38	0,82 \pm 0,12	1,78 \pm 0,05	0,41 \pm 0,05

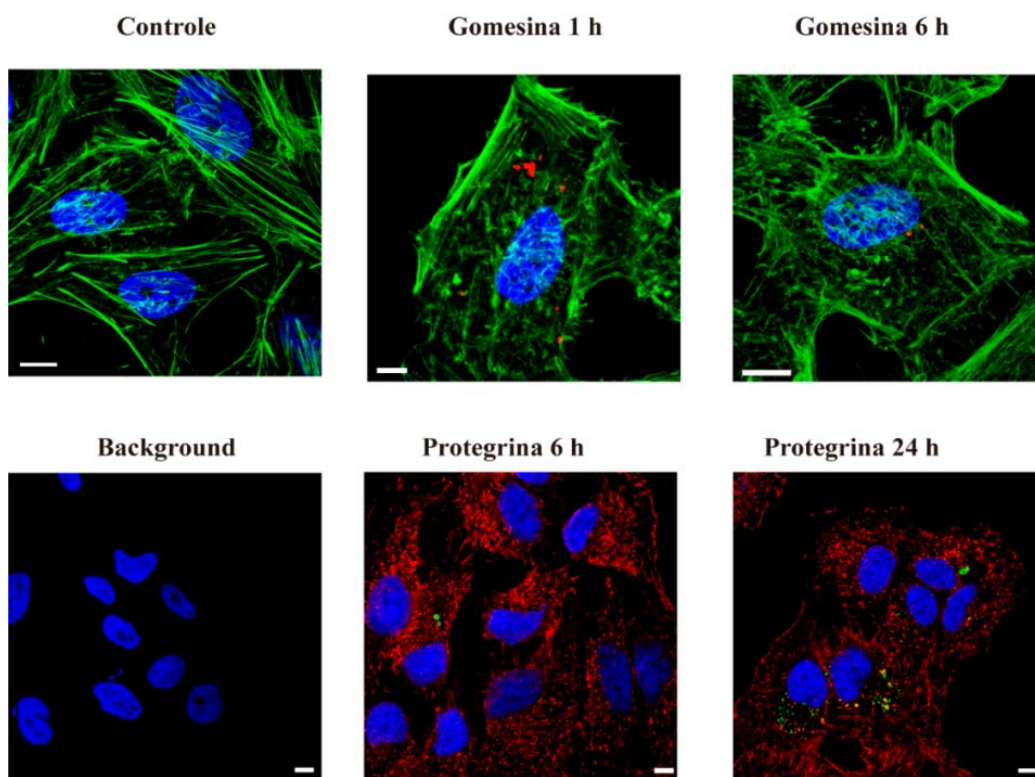
Após avaliar a afinidade testamos se modelos de competição e modulação de GAGs em modelo tumoral de adenocarcinoma (células HeLa). A presença externa da Heparina foi capaz de competir e reduzir a morte celular pelos PAMs, exceto o efeito da gomesina. O clorato de sódio (NaClO_3), reduz a sulfatação dos GAGs presentes na superfície celular (Fig. 1B). A redução de sulfatação dos GAGs não diminuiu o efeito citotóxico dos PAMs nas células HeLa. Sugerindo que a sulfatação não seria importante para o efeito citotóxico dos PAMs. Também foi usado a lectina. A presença de lectina (5 mM) proteína que liga em carboidratos de superfície, somente afetou parcialmente a morte por protegrina (Fig. 1C). Também foi usado o xylopiranosídeo que é um competidor das cadeias de GAGs impedindo a formação dos GAGs no esqueleto proteico do proteoglicanos (Fritz et al., 1994; Garud ET AL., 2008). A redução das cadeias de GAGs pelo xylopiranosídeo diminuiu o efeito citotóxico de alguns PAMs (gomesina e taquiplesina) nas células HeLa (Fig. 1D).

Figura 1. Avaliação da citotoxicidade dos PAMs em células HeLa na presença de moduladores de GAGs. As células foram incubadas antes do estimuladas com os PAMs por 24 h. (A) Foi adicionado heparina (10 μM). (B) As células foram incubadas com 20 μM de clorato de sódio por 48 h. (C) As células foram incubadas com a lectina (5 mM) por 24h. (D). O xylopiranosídeo foi colocado 72 h antes. Os dados são a média \pm SEM de 3 experimentos independentes.



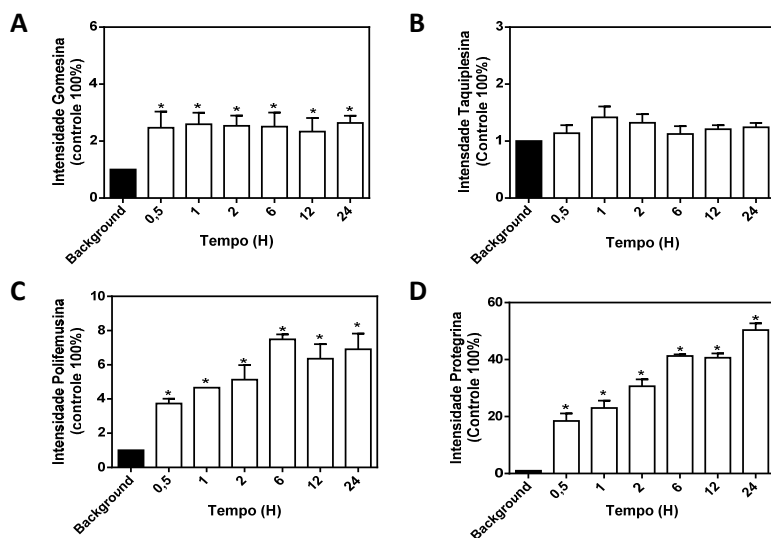
Para verificar a localização interna dos PAMs, experimentos preliminares por microscopia confocal foram realizados. Foi possível observar a presença interna da gomesina e protegrina no interior das células (Fig. 2). Aparentemente há formação de vesículas citoplasmática, possivelmente em endossomos ou lisossomos. Uma evidente desestruturação do citoesqueleto pode ser observada após o tratamento com os PAMs. Um efeito semelhante foi visto anteriormente em células de melanoma murina (BURI et al., 2013) e em células HeLa (PAREDES-GAMERO et al., 2012a). As células também foram estimuladas com Protegrina-FITC (Verde) a membrana marcada com WGA- Alexa Fluor 594, uma lectina que se liga a açúcares de membrana evidenciando-a. No tempo de 24 h, um acúmulo da protegrina pode ser observado na região perinuclear.

Figura 2: Imagem da localização interna da gomesina-rhodamina e protegrina-FITC. As células foram tratadas com 2 μ M em linhagem tumoral HeLa por microscopia confocal em diferentes tempos. O citoesqueleto foi marcado com faloidina-Alexa Fluor 488 (Verde) ou faloidina Alexa Fluo 594. (Vermelho). As imagens foram adquiridas no microscópio confocal SP8 (Leica). Barra = 10 μ M.



Para determinar o tempo de internalização dos PAMs quantificou-se por citometria de fluxo a presença de PAMs nas células HeLa. As células foram incubadas em diferentes tempos utilizando uma baixa concentração dos peptídeos (2 μ M) que não induz a permeabilização da membrana (Fig. 3). A gomesina e taquiplesina foram conjugadas com botina e reveladas com estreptavidina Alexa Fluor 488, e a polifemusina e protegrina eram conjugadas com FITC. A gomesina teve uma internalização rápida e constante. A taquiplesina, a entrada foi baixa em relação a os outros PAMs. A polifemusina e protegrina tiveram uma incorporação cumulativa em relação ao tempo. Em células de melanoma murinho a quantificação temporal seguiu um comportamento semelhante (BURI et al., 2013).

Figura 3: Quantificação da internalização dos PAMs. (A) gomesina, (B) taquipesina, (C) polifemusina e (D) protegrina em diferentes tempos usando uma concentração de 2 μ M. A entrada dos PAMs foi quantificada por citometria de fluxo. Os dados são a média \pm SEM de 3 experimentos realizados em duplicata.



CONCLUSÕES

Estes resultados mostram que os PAMs têm afinidade pelos GAGs. Ademais, a modulação dos GAGs afetam diferentemente o efeito citotóxico dos PAMs utilizados neste trabalho. Também foi observada e quantificada a entrada de PAMs nas células HeLa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, Fabiane, M; DAFFRE, Sirlei; MALDONADO, Rosa, A; MIRANDA, Antonio; NIMRICHTER, Leonardo; RODRIGUES, Marcio L. Gomesin, a peptide produced by the spider *Acanthoscurria gomesiana*, is a potent anti cryptococcal agent that acts in synergism with fluconazole. **FEMS Microbiol**, Inglaterra, v. 274, n. 2, p.279–286, 2007.

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 (*Tachypleustri dentatus*). 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 intracellular 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 Stanford**, v.15, 36, n.6, p.657-662, 1993.