

Efeito do colesterol na interação do peptídeo antimicrobiano DD K com lipossomas

Rodrigo Moreira Verly¹(PG)*, Angelo Márcio L. Denadai³(PQ), Marcelo P. Bemquerer²(PQ), Dorila Pilo-Veloso¹(PQ). rodrigoverly@oi.com.br

1- Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, P.O. Box 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brasil.

2- Embrapa-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Pq. Estação Biológica, Final W5 Norte, P.O. Box 70770-900, Brasília-DF, Brasil.

3- Centro Federal de Educação Tecnológica - CEFET-MG, Campus VII (Unidade Timóteo).

Peptídeo, dermadistinctina, antimicrobiano, ITC, DLS.

Introdução

Peptídeos antimicrobianos são alvos de intensas investigações por serem responsáveis pela atividade imune inata de diferentes organismos. Estas moléculas podem ser amplamente encontradas em secreções de pele de anfíbios. O peptídeo DD K, cuja seqüência é apresentada abaixo, é uma dermaseptina produzida da glândula do anuro da espécie *Phyllomedusa distincta* e que apresenta atividade antibiótica¹. O estudo da interação peptídeo-fosfolípido fornece informações preciosas sobre os mecanismos de ação do peptídeo. O emprego em conjunto das técnicas calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e espalhamento de luz dinâmico (DLS), no estudo do sistema peptídeo-membrana, pode prover, além de informações de mecanismos de ação, as possíveis orientações do peptídeo na membrana².

Seqüência DD K

GLWSK IKAAG KEAAK AAAGA AGKAA LNAVS EAV

Resultados e Discussão

A síntese do peptídeo DD K foi realizada pela estratégia Fmoc em fase sólida, utilizando-se reacoplamentos para os resíduos Ile-28, Trp-31, Leu-32, Gly-33. As vesículas foram preparadas em solução tampão 10 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl, pH 8.0, com fosfatidilcolina (PC) e calibradas para 100 nm, sendo nomeadas PC-LUVs e aquelas que contêm colesterol como LUVs-Chol.

O peptídeo foi purificado por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e caracterizado por espectrometria de massa (ESI-MS). O efeito do colesterol na interação do DD K com vesículas unilamelares (LUVs) foi investigado por ITC e DLS. Para PC-LUVs (Fig. 1a), os dados mostram que o coeficiente estequiométrico (n) é aproximadamente 10, ou seja, uma razão molar de dez para um de lipídio e peptídeo respectivamente. Esta interação provavelmente acontece através de incorporação parcial do peptídeo na bicamada de LUVs, como tem sido mostrado pelo aumento do tamanho de vesícula

observado por DLS (Fig. 1c). Os dados de ITC também mostraram que para esta interação os fatores entálpico e entrópico favorecem a ligação do peptídeo com as bicamadas de PC-LUVs (Tabela 1).

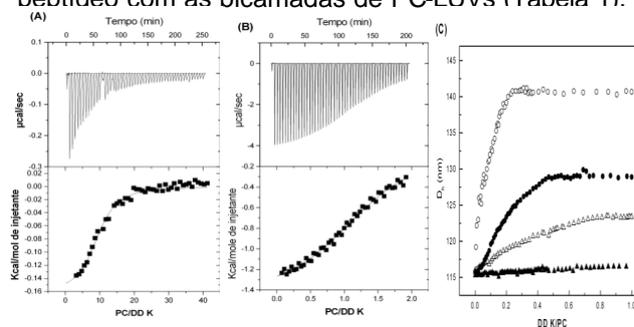


Figura 1. a) ITC de DD K/PC-LUVs. b) ITC DD K/LUVs-Chol. c) raio hidrodinâmico de LUVs x DD K/PC. (?) PC-LUVs, (?) LUVs-Chol (12 mol %), (?) LUVs-Chol (27 mol %), (?) LUVs-Chol (43 mol %).

Os resultados da interação peptídeo e LUVs-Chol (Fig. 1b) mostram menor interação do peptídeo com a bicamada, com a constante de ligação (K) sendo da ordem de cinco vezes menor, além do menor aumento no tamanho das LUVs com a adição gradativa de colesterol (Fig. 1c).

Tabela 1. Parâmetros termodinâmicos da interação DD K com PC-LUVs e LUVs-Chol

LUVs	n	K _{app} (L mol ⁻¹)	ΔG (cal.mol ⁻¹)	ΔH (cal.mol ⁻¹)	TΔS (cal.mol ⁻¹)
PC-LUVs	9.7 ± 0.3	10,000	-5470	-162.8 ± 7.7	5307
LUVs-Chol	1.36 ± 0.01	2,160	-4546	-1,478.0 ± 28	3068

Conclusões

Todos os dados obtidos indicam que a interação DD K/LUVs é afetada na presença de colesterol, explicando sua baixa atividade hemolítica.

Agradecimentos

CAPES, CNPQ, FAPEMIG.

¹ Batista C. V. F., et. al.; *FEBS Lett.*, **2001**, 494, 85-89; 3

² Seelig J. Thermodynamics of lipid-peptide interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**; 1666:40-50.