

Estudo estrutural por RMN de ^1H de peptídeos bioativos isolados da secreção cutânea de *Hypsiobas albopunctatus* e *Leptodactylus labyrinthicus*

Eliane Santana FERNANDES^{*1}, Luciano Morais LIÃO¹, Aline Lima de OLIVEIRA¹, Mariana de Sousa CASTRO².

¹*Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.*

²*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.*

*eliane_ufg@yahoo.com.br

Palavras chave: peptídeo; estrutura 3D; SDS micelas

Introdução

A pele dos anfíbios tem sido a fonte de uma grande variedade de substâncias biologicamente ativas. Atualmente, o surgimento de fungos, bactérias e vírus resistentes a múltiplas drogas tem estimulado o interesse no desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos com grande potencial terapêutico. Existem algumas propriedades que devem ser observadas em drogas antimicrobianas, como apresentar toxicidade seletiva, ação rápida, mecanismos de ação específicos e ter um amplo espectro de ação, ou seja, apresentar atividade sobre várias espécies. Isso é exatamente o que acontece com peptídeos antimicrobianos isolados da secreção cutânea de anuros. Na verdade, eles são bastante diferentes dos antibióticos utilizados na terapia atualmente, tanto em sua estrutura quanto em seu mecanismo de ação^{1,2}.

A principal força motriz para a ação de peptídeos antimicrobianos é sua habilidade em lisar as membranas celulares, matando rapidamente um amplo espectro de microorganismos^{1,2}. A estrutura do peptídeo tem uma grande importância em sua interação com a estrutura anfílica das membranas biológicas. Nesse sentido, a determinação da estrutura 3D identifica a localização de cada resíduo e destaca aqueles que são importantes para a atividade ou que poderiam ser modificados para aumentar a atividade antimicrobiana^{1,3}. Pois um elevado grau de helipticidade e/ou anfipaticidade (momento hidrofóbico) está correlacionado ao aumento da toxicidade contra células compostas por fosfolípidios neutros⁴.

O presente estudo tem como objetivo determinar a conformação estrutural através da técnica de RMN de ^1H dos peptídeos Ocellatina-P1G16 e Hylina, extraídos da secreção glandular dos anuros *Leptodactylus labyrinthicus* e *Hypsiobas*

albopunctatus, respectivamente. O primeiro apresentou atividade contra bactérias patogênicas e o segundo atividade antimicrobiana e antibactericida e suas estrutura primária estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Estrutura primária dos peptídeos de estudo.

Ocelatina-P1G16	¹ GLD ¹ TLKGA ¹ AKNVVGLASKVMEKL ²⁵
Hylina	¹ IFGAILPLALGALKNLIK ¹⁸

Materiais e métodos

As secreções cutâneas dos anuros de estudo foram obtidas por estimulação elétrica. Após liofilização, as amostras foram fracionadas por RP-HPLC em uma coluna C8. Todas as frações eluídas foram testadas contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os peptídeos bioativos foram purificados por C18-RP-HPLC e seqüenciados por degradação de Edman. A análise por esterificação de Fischer demonstrou amidação na região C-terminal. A isoforma Ocelatina-P1G16 difere do peptídeo Ocelatina-P1 em apenas um resíduo (uma glicina em vez de serina na posição 16). Amostras puras dos peptídeos Ocelatina-P1G16 e Hylina foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Mariana S. Castro da Universidade de Brasília.

Para a análise de RMN de ¹H, as amostras foram preparadas pela dissolução do peptídeo sintético a uma concentração final de 1 mM em 500µL de solução 100 mM de SDS e 10% de D₂O. Os espectros do peptídeo Ocelatina-P1G16 foram obtidos a 36⁰C em 90% H₂O, pH 4,3. Já os espectros do peptídeo Hylina foram obtidos a 25⁰C, pH 7,0 em tampão PBS.

Espectros de RMN bidimensionais homonucleares de TOCSY, NOESY e COSY foram realizados em um equipamento de ressonância nuclear magnética BRUKER AVANCE III 500 (11,75T). A atribuição completa das cadeias principal e laterais foi realizada utilizando os procedimentos padrão de atribuição seqüencial. Restrições de distância foram obtidas a partir do espectro 2D NOESY ¹H coletados com 60 ms de tempo de mistura. Todos os dados de RMN foram processados utilizando o software nmrPIPE/nmrVIEW. O cálculo das estruturas foi realizado utilizando o software XPLOR-NIH.

Resultados e discussão

Um conjunto de 226 restrições de distância foi utilizado para determinar a estrutura Ocelatina-P1G16, resultando em uma média final de 9,04 restrições por resíduo. As 20 estruturas de menor energia (de um total de 100 estruturas calculadas) foram escolhidas para representar a família de estruturas do peptídeo Ocelatina-P1G16 (Figura 1A) e a estrutura de menor energia está apresentada na figura 1B.

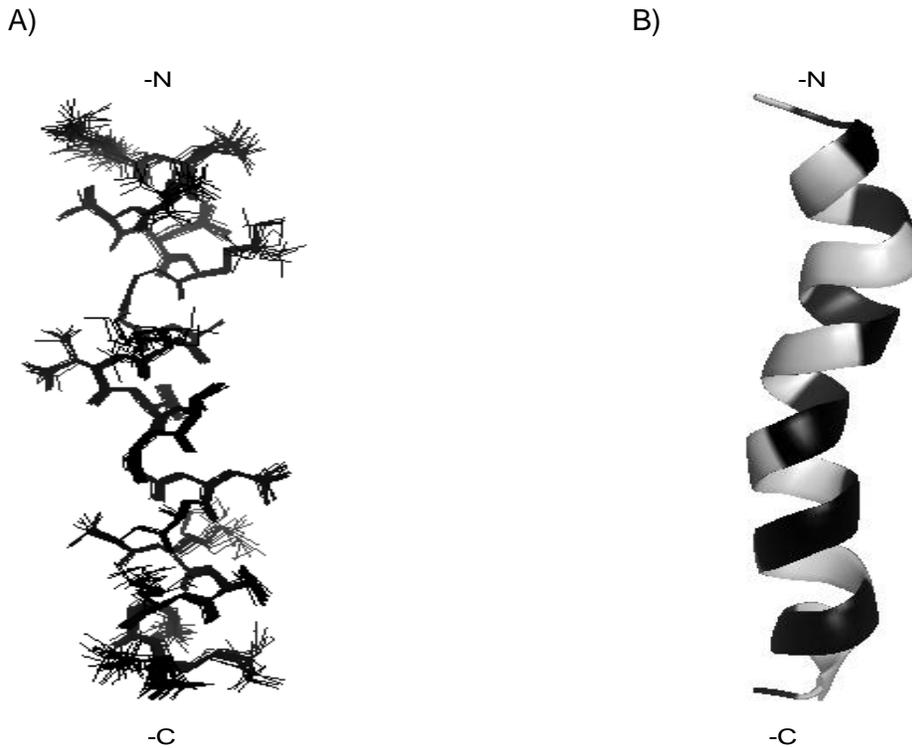


Figura 1. Ocelatina-P1G16 A) Sobreposição das vinte estruturas de menor energia, B) estrutura de menor energia.

Como esperado, a estrutura do peptídeo Ocelatina-P1G16 na presença de micelas de SDS (Figura 1B) é predominantemente helicoidal, apresentando uma hélice regular abrangendo a região entre os resíduos Leu³-Lys²⁴. A estrutura referente ao peptídeo Hylina na presença de micelas de SDS é predominantemente helicoidal entre os resíduos Ile⁵-Ile¹⁷. As estruturas de ambos os peptídeos são bem definidas como evidenciado pela superposição dos 20 modelos de menor energia (Figuras 1A e 2A).

Foi utilizado para os cálculos das estruturas do Hylina, um conjunto de 131 restrições de distância, resultando em uma média final de 7,28 restrições por resíduo. A família de 20 estruturas e a estrutura de menor energia do peptídeo Hylina estão apresentadas nas figuras 2A e 2B, respectivamente.

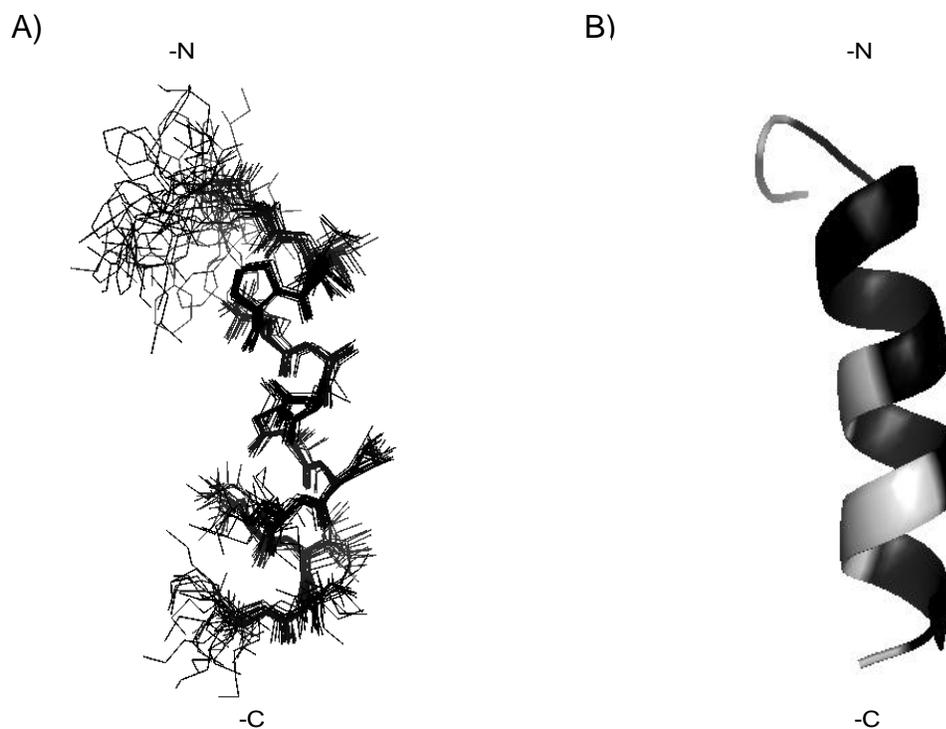


Figura 2. Hylina A) Sobreposição das vinte estruturas de menor energia B) estrutura de menor energia.

Para ambos os peptídeos, os valores de desvio médio quadrático (RMSD) evidenciam que as estruturas exibem uma boa geometria. Além disso, a boa qualidade dos modelos de RMN é observada devido a maioria dos diagramas de Ramachandran estarem na região mais favorecida como mostra tabela II.

Tabela II. Estatística das 20 estruturas dos peptídeos Ocelatina-P1G16 e Hylina.

	Ocelatina-P1G16	Hylina
Restrições utilizadas	226	131
Restrições de distância	186	109
Intra-resíduos	53	35
Ponte de hidrogênio	40	22
Media de restrições por resíduo	9,04	7,28
Restrições de ângulo	0	0
RMSD (Å)	0,24 ± 0,13	0,38 ± 0,23
Ramachandran:		
Região mais favorecida	76.5%	88.8%
Região permitida	18.8%	8.9%

Região generosamente permitida	3.75%	2.3%
--------------------------------	-------	------

As Figuras 1B e 2B destacam os resíduos hidrofóbicos em preto e os resíduos hidrofílicos em cinza, mostrando que este peptídeo Ocelatina-P1G16 tem natureza anfipática. A estrutura helicoidal deste peptídeo inclui quatro resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Lys⁷, Lys¹¹, Lys²⁰, Lys²⁴) e dois resíduos de aminoácidos com cargas negativas (Asp⁴, Glu²³), que podem ser a chave para uma interação seletiva com as membranas biológicas. Já o peptídeo Hylina possui cinco resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Lys⁶, Lys⁸, Lys¹⁰, Lys¹³, Lys¹⁶), e nenhum aminoácido carregado negativamente.

Como perspectiva para analisar os detalhes moleculares de como estes peptídeos interagem com as micelas de SDS, experimentos de troca H/D serão realizados. A determinação das características estruturais desses peptídeos será muito importante para desvendar o mecanismo molecular associado à sua função biológica abrindo novas perspectivas para a atividade biológica de peptídeos.

Conclusões

Os estudos estruturais realizados através da técnica de RMN mostraram que o peptídeo Ocelatina-P1G16 é uma α -hélice anfipática entre os resíduos Leu³-Lys²⁴ e que o peptídeo Hylina apresenta uma α -hélice bem definida na região dos resíduos Ile⁵-Ile¹⁷. Ambos os peptídeos apresentam uma face hidrofóbica e outra hidrofílica. Essa característica estrutural, unida à presença de resíduos positivamente carregados, tornam esses peptídeos candidatos promissores para o desenvolvimento de um novo composto antimicrobiano.

Referências bibliográfica

1. Castro M. S. *et al.*, Peptides, v.30,291, 2009
2. MURRAY, P.R. *et al.*, Microbiologia Médica. 4 ed, 604p, 2002.
3. Libério M. S. *et al.*, *Amino Acids*, v. 40, 51, 2011
4. Yeaman M. R. and Yount N. Y. *Pharmacol*, v.55, 27, 2003