

Resumo

Ureasas são metaloenzimas dependentes de níquel que catalisam a hidrólise de uréia em amônia e dióxido de carbono. São isoladas de plantas, fungos e bactérias e até agora não foram caracterizadas em animais. A urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) apresenta propriedades biológicas não-relacionadas com sua atividade ureásica, como ativação plaquetária e atividade entomotóxica. O efeito inseticida é devido à liberação, por enzimas do tipo catepsinas do inseto, de um peptídeo tóxico interno da urease. Tanto a JBU quanto o peptídeo derivado são entomotóxicos se administrados por via oral. O mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. Para avaliar a interação das toxinas com membranas lipídicas foi utilizada a técnica de "Planar Lipid Bilayer". Nessa abordagem, a corrente iônica gerada pela inserção da molécula na membrana é quantificada. Foi verificado que tanto a JBU quanto o peptídeo são capazes de formar canais iônicos em membranas artificiais contendo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e colesterol. No entanto, a presença de um fosfolípido de carga negativa parece facilitar essa inserção.

Objetivos

Técnica de "Planar Lipid Bilayer" (PLB): analisar a capacidade de inserção da JBU e do peptídeo derivado em bicamadas lipídicas e a atividade de canal nessas membranas.

Metodologia

Técnica de PLB: consiste em formar uma membrana lipídica artificial através de uma abertura que liga dois compartimentos (*Cis* e *Trans*). Após, a toxina em estudo é adicionada no lado *cis* e sua inserção na bicamada pode ser monitorada através da corrente iônica que passa pelo canal, sob diferentes voltagens.

- Misturas lipídicas: 7:2:1 de fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e colesterol (PE:PC:Ch); e 4:1 de fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerol (PE:POPG).
- Concentração lipídica final=25 mg/mL, dissolvidos em decano.
- Concentração proteica: 5 µg/mL.
- Solução dos compartimentos: 500 mM KCl, HEPES 10 mM e CaCl₂ 1 mM pH 7,5.

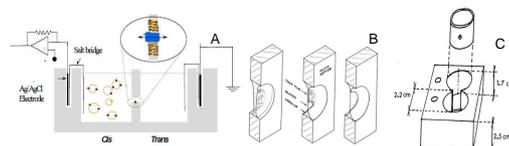


Fig. 1: Modificado de "Electrophysiological methods for the study of ion channels", Ghazi (2003) em (A). Modificado de "Ion Channel Reconstitution", Christopher Miller em (B) e (C).

Resultados

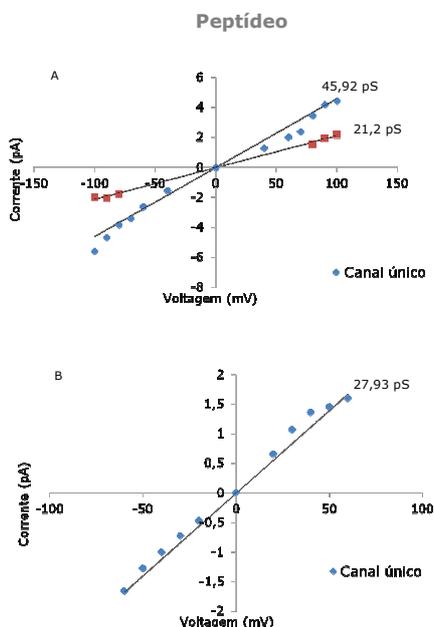


Fig. 2: Curva I/V da atividade de canal do peptídeo sob diferentes voltagens em condições simétricas de 500 mM KCl em pH 7,5 e mistura lipídica de PE:POPG (4:1) em (A), e PE:PC:Ch (7:2:1) em (B).



Fig. 3: Traços de corrente mostrando a atividade de canal de 5µg/mL do peptídeo sob -100mV em condições simétricas de 500 mM KCl em pH 7,5, em membrana negativa.

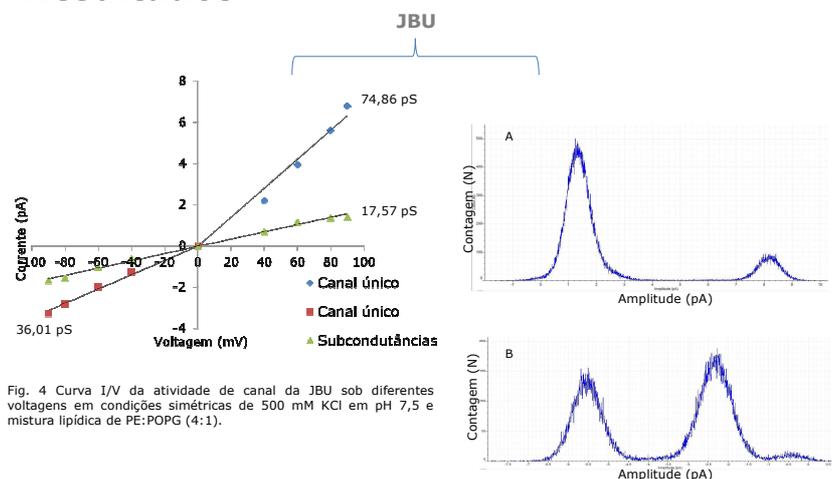


Fig. 4: Curva I/V da atividade de canal da JBU sob diferentes voltagens em condições simétricas de 500 mM KCl em pH 7,5 e mistura lipídica de PE:POPG (4:1).

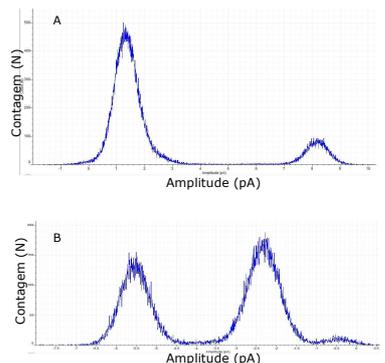


Fig. 5: Histograma demonstrando a frequência de aberturas em determinada voltagem: +90mV em (A) e -90mV em (B).

Conclusão

- JBU e peptídeo, em concentrações de 10nM e 0,45µM, respectivamente, são capazes de se inserir em membranas lipídicas em experimentos *in vitro*;
- Há diferenças nas condutâncias dos canais formados, indicando comportamentos distintos entre a JBU e o peptídeo;
- Observou-se presença de subcondutâncias sobretudo em membranas aniônicas;
- A composição lipídica de carga negativa aparentemente facilitou a inserção do peptídeo na membrana, o que aponta uma maior interação da toxina com moléculas negativas.