



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

LABORATÓRIO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA



**SÍNTESE, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA  
ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE PEPTÍDEOS OPIÓIDES**

*Mariana Magalhães Nóbrega*

Orientador : Dr. Carlos Bloch Júnior

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em ciências biológicas, área de concentração: Biologia Molecular.

Brasília - DF, 04 de Fevereiro de 2013.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meu avós,  
Edmilson e Nilda, Eudes e Anete, por todo amor ,  
entusiasmo e inspiração para a vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a toda minha família principalmente meus pais Cláudia e Eugênio, Gláucia e Pita e meu irmão Rodrigo, por cuidarem de mim com muito amor, carinho e atenção.

Em especial ao Fernando Fonseca, por ser meu amigo, companheiro, namorado, pela paciência, carinho, atenção e incentivo durante todo tempo que estamos juntos.

Ao meu orientador prof. Dr. Carlos Bloch Jr. pela orientação, paciência, conversas, discussões, ajuda e por mostrar os valores da pesquisa científica.

Ao Professor Dr. Luciano Paulino, pela atenção, ajuda, pela realização do treinamento didático, conversas e discussões sobre o projeto.

Ao Prof. Dr. Marcelo Porto Bemquerer pelos ensinamentos sobre a síntese dos peptídeos e pelas discussões sobre o projeto, obrigada.

Aos meus amigos Felipe Vinecky e Eder Barbosa pela paciência, discussões, churrascos, festas e ajuda durante toda a realização do projeto de mestrado, sem eles o projeto não seria a mesma coisa.

À Karlinha, do laboratório de toxilogia da UnB, que me ajudou muito durante a realização do trabalho, principalmente nos testes biológicos, muito obrigada, pelas discussões, conversas, sugestões e apoio durante todo o trabalho.

À Maura, pela paciência, atenção, ajuda, cuidados, discussões sobre o trabalho principalmente na purificação dos peptídeos e também por ter participado da minha qualificação.

Ao Sifu, pelas discussões e ajuda principalmente na realização dos experimentos com ESI.

Ao pessoal do Laboratório de Espectrometria de Massa: Lipe, Eder, Sifu, Marcelo Ramada, Nathy, Diego, Luísa, Sophia, Kelliane, Grazy Cinthia, Eduardo, Zé e Jorge por toda a ajuda.

À prof. Dra. Márcia Renata Mortari pela colaboração durante a realização do trabalho, principalmente em relação aos testes biológicos, muito obrigada.

Ao pessoal do laboratório de Toxinologia, da Universidade de Brasília (UnB) por terem viabilizado os testes com animais.

À prof. Dra. Elisabeth Schwartz, pelas sugestões durante a qualificação, obrigada.

Ao pesquisador Dr. Guilherme Dotto Brand, pelas discussões, sugestões e por ter aceitado participar da banca examinadora da qualificação e mestrado.

Ao prof. Dr. Fernando Araripe, por suas sugestões, discussões e por ter participado da banca examinadora na defesa do mestrado.

Ao prof. Dr. Luiz Antônio Barreto de Castro, pelas discussões, sugestões e participação como examinador na defesa do mestrado.

À Ana, da secretaria do dept. de pós graduação em biologia molecular por toda sua competência, obrigada.

As minhas amigas, Maria Cláudia, Iana Abreu, Ingrid e as Marianas Simonetti e Lima, muito obrigada por estarem presentes na minha vida.

Aos pestinhas da minha vida, meu irmão Rodrigo e meus eternos priminhos Vanessa, Zé Carlos, Pedro Vidal, Isabella e Bia.

Ao departamento de pós graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília (UnB) e à Embrapa recursos genéticos e biotecnologia pelo espaço físico, equipamentos e tudo o que foi necessário para possibilitar o desenvolvimento do trabalho. À CAPES pela bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES E ACRÔNIMOS .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Nociceção .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2. Receptores opióides .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3. Proteína G .....</b>	<b>17</b>
<b>1.4. Enzima conversora da angiotensina.....</b>	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Objetivo geral .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>22</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>23</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Síntese de peptídeos .....</b>	<b>25</b>
<b>4.2. Clivagem dos peptídeos .....</b>	<b>26</b>
<b>4.3. Purificação dos peptídeos .....</b>	<b>27</b>
<b>4.4. Verificação da pureza e identidade dos peptídeos .....</b>	<b>28</b>
<b>4.5. Ensaio Biológicos .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5.1. Animais .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5.2. Testes antinociceptivos .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5.3. Grupos avaliados .....</b>	<b>30</b>
<b>4.6. Análise estatística .....</b>	<b>31</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>5.1. Análise dos componentes obtidos (MS) .....</b>	<b>32</b>
<b>5.2. Confirmação da identidade molecular .....</b>	<b>37</b>

<b>5.3. Purificação dos peptídeos.....</b>	<b>39</b>
<b>5.4. Verificação da pureza.....</b>	<b>40</b>
<b>5.5. Análise Antinociceptiva .....</b>	<b>41</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>63</b>

## RESUMO

A prospecção de peptídeos com atividade biológica é importante do ponto de vista biotecnológico assim como ponto de partida em diversos ramos da pesquisa como no desenvolvimento de novas drogas e na produção de plantas geneticamente modificadas. Este trabalho tem como objetivo a predição e a síntese de peptídeos que tenha atividade antinociceptiva e hipotensora. A predição da estrutura primária dos peptídeos foi realizada com base em trabalhos anteriores do grupo, os quais focam na prospecção e caracterização de peptídeos bioativos, assim como no conhecimento disponível na literatura acerca das propriedades biológicas apresentadas por domínios protéicos específicos. Os peptídeos foram sintetizados por meio de síntese química em fase sólida, utilizando a estratégia Fmoc, seguida da purificação em cromatografia líquida de alta eficiência. O grau de pureza e a confirmação da estrutura primária dos peptídeos sintetizados foram determinados por espectrometria de massa, Maldi e ESI. Os peptídeos foram testados em camundongos, por via intraperitoneal com intuito de avaliar sua possível atividade antinociceptiva, realizaram-se então os testes da placa quente ou *Hot Plate* e teste de retirada da cauda ou *Tail Flick*. Os testes *in vivo* demonstraram que os peptídeos sintéticos PSLEM 11011 e 11012 apresentaram atividade antinociceptiva via receptores opióides com perfil de atividade mais tardio e duradouro em relação a morfina. Eles apresentaram atividade nos dois modelos de testes propostos, podem ter atravessado a barreira hematoencefálica e possuem ação prolongada.

Palavras - chave : Peptídeos sintéticos, opióides e testes *in vivo*.

## ABSTRACT

To prospect of peptides with biological activity is important from the point of view of biotechnology as a starting point in many fields of research as the development of new drugs and the production of genetically modified plants. This study aims to predict and synthesize peptides that have antinociceptive and hypotensive activities. The prediction of the primary structure of the peptides was based on previous work of the group, which focuses on the prospection and characterization of bioactive peptides as well as in the knowledge available in the literature about the biological properties of specific protein domains. The peptides were synthesized by solid-phase chemical synthesis using Fmoc strategy followed by purification on high performance liquid chromatography. The purity and confirmation of the primary structure of the synthesized peptides were determined by mass spectrometry, MALDI and ESI. The peptides were injected in mice intraperitoneally in order to assess its possible antinociceptive activity through Hot Plate and Tail Flick assays. The *in vivo* tests showed that synthetic peptides PSLEM 11011 and 11012 have antinociceptive activity via opioid receptors with delayed response and longer activity compared to morphine. The peptides showed activity in both test models proposed in this work, may have crossed the blood-brain barrier and presenting high bioavailability.

Keywords: Synthetic peptides, opioids and *in vivo* tests.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustração representando as vias modulatórias para a dor.....	<b>15</b>
<b>Figura 2.</b> Esquema ilustrativo mostrando a proteína G com suas subunidades.....	<b>19</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo da via de sinalização molecular, após uso contínuo dos opióides analgésicos, caracterizando o quadro de tolerância.....	<b>20</b>
<b>Figura 4 A.</b> Espectro coma série isotópica teórica para o PSLEM 11011 obtido por meio do programa <i>Compass Isotopic Pattern</i> .....	<b>32</b>
<b>Figura 4 B.</b> Espectro do PSLEM 11011 representação da série isotópica obtida por ESI.....	<b>33</b>
<b>Figura 5 A.</b> Espectro com a série isotópica teórica para o PSLEM 11012, obtido por meio do programa <i>Compass Isotopic Pattern</i> .....	<b>33</b>
<b>Figura 5 B.</b> Espectro do PSLEM 11012 representação da série isotópica obtida por ESI.....	<b>34</b>
<b>Figura 6.</b> PSLEM 11011 , bruto, mostrando o aduto de sódio $[M+ Na^+] = 1112.503$ Da.....	<b>34</b>
<b>Figura 7.</b> PSLEM 11012, bruto, mostrando o aduto de potássio $[M+ K^+] = 1185.28$ Da.....	<b>35</b>
<b>Figura 8.</b> Espectro obtido para o PSLEM 11011 purificado, após análise por ESI monocarregado $1090.534$ Da.....	<b>35</b>
<b>Figura 9.</b> Espectro obtido para o PSLEM 11012 purificado, após análise por ESI, dupla carga $574.2968$ Da.....	<b>36</b>
<b>Figura 10.</b> Espectro obtido por MS/MS para a confirmação da identidade do PSLEM 11011. ....	<b>37</b>
<b>Figura 11.</b> Espectro obtido por MS/MS para a confirmação da identidade do PSLEM 11012.....	<b>38</b>
<b>Figura 12.</b> Cromatograma obtido para o PSLEM 11011. Gradiente linear de ACN (5% - 95%) com fluxo de 2,5 ml/ min à temperatura ambiente.....	<b>39</b>
<b>Figura 13.</b> Cromatograma obtido para o PSLEM 11012. Gradiente linear de ACN (5% - 95%) com fluxo de 2,5 ml/ min à temperatura ambiente.....	<b>40</b>

<b>Figura 14 A.</b> Índice de antinocicepção referente a análise estatística para o PSLEM 11011 no <i>Tail Flick</i> .....	<b>41</b>
<b>Figura 14 B.</b> Área abaixo da curva para o PSLEM 11011 no teste do <i>Tail Flick</i> .....	<b>42</b>
<b>Figura 15 A.</b> Índice de antinocicepção referente a análise estatística para o PSLEM11012 no <i>Tail Flick</i> .....	<b>44</b>
<b>Figura 15 B.</b> Área abaixo da curva para o PSLEM 11012 no teste do <i>Tail Flick</i> .....	<b>44</b>
<b>Figura 16 A.</b> Índice de antinocicepção referente a análise estatística para o PSLEM11011 no <i>Hot Plate</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 16 B.</b> Área abaixo da curva para o PSLEM 11011 no teste do <i>Hot Plate</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 17 A.</b> Índice de antinocicepção referente a análise estatística para o PSLEM11012 no <i>Hot Plate</i> .....	<b>48</b>
<b>Figura 17 B.</b> Área abaixo da curva para o PSLEM 11012 no teste do <i>Hot Plate</i> .....	<b>48</b>

## LISTA DE ABREVIACOES E ACRNIMOS

**ACN**- Acetonitrila  
**ADP**- Adenosina di fosfato  
**AMPc**- Adenosina monofosfato cíclico  
**ATP**- Adenosina tri fosfato  
**Da**- Dalton  
**DCM**- Diclorometano  
**DIPEA**- N,N-Diisopropiletilamina  
**DMF**- N,N-Dimetilformamida  
**DOR**- *Delta opioid receptor*  
**DRT**- Núcleo reticular dorsal  
**ECA**- Enzima conversora de angiotensina  
**EDT**- 1,2-etanoditiol  
**ESI** - *Eletrospray Ionization*  
**Fmoc** - Fluorenilmetiloxicarbonil  
**GDP**- Guanosina di fosfato  
**GPCRs**- *G protein-coupled receptors*  
**GTP**- Guanosina trifosfato  
**h**- Horas  
**HPLC**- *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)  
**KOR**- *Kappa opioid receptor*  
**LC**- *Locus Coeruleus*  
**Maldi** - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*  
**µM**- Micromolar  
**mM**- Millimolar  
**min**- Minutos  
**MOR**- *Mu opioid receptor*  
**MS**- Espectrometria de Massa  
**MS/MS**- Espectro de Fragmentação  
**nm**- Nanmetros  
**r.p.m**- Rotações por minuto  
**Sida**- Síndrome da imunodeficiência adquirida  
**ORL**- *Opioid receptor-like*  
**PAG**- Região periaquedutal cinza  
**PKA**- Proteína quinase A  
**RMV**- Medula rostroventral  
**s**- Segundos  
**SNC**- Sistema nervoso central  
**TBTU**- Tetrafluoroborato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurnio  
**TFA** - cido trifluoracético  
**TIS** - Triisopropilsilano  
**TOF**- *Time-of-flight*

## 1. INTRODUÇÃO

Há cerca de 200 anos a morfina foi isolada da papoula, *Papaver somniferum*. Desde então inaugurou-se uma busca sistemática por princípios ativos que pudessem agir como medicamentos no que hoje está estabelecido como uma vasta área de pesquisa, a de produtos naturais. Em 1990, cerca de 80% dos fármacos eram, direta ou indiretamente de origem natural. Hoje, devido aos avanços da química orgânica, a maioria dos fármacos é produzida de forma sintética, a partir de seus análogos presentes na biodiversidade. (Hong, 2011; Li & Vederas, 2009).

Fora do âmbito dos Produtos Naturais, ou seja dos produtos do metabolismo secundário, o estudo de moléculas codificadas diretamente por genes registrou um avanço considerável a partir das últimas três décadas. Com isso, a prospecção de peptídeos com atividade biológica revelou-se importante tanto do ponto de vista biotecnológico quanto no ponto de partida em diversos ramos da pesquisa que incluem o desenvolvimento de novas drogas (Vlieghe *et al.*, 2010) e a produção de plantas geneticamente modificadas (Brand *et al.*, 2012; Montesinos 2007).

De um modo geral, os peptídeos bioativos têm sido apontados como candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos, devido a algumas características intrínsecas à sua atividade biológica, como alta especificidade, potência, baixa toxicidade e diversidades química e biológica (Mason, 2010). A desvantagem consiste na baixa biodisponibilidade, isto é, penetração em tecidos e dificuldade de administração por via oral e demais vias. Uma das alternativas empregadas com o intuito de minimizar tais problemas é a otimização dos peptídeos (Sato *et al.*, 2006).

Dentre as estratégias de otimização, estão: i) as modificações estruturais, como, a adição de novas moléculas, a substituição por resíduos de aminoácidos não naturais e modificações pós - traducionais; e ii) o processo de entrega da droga, como o encapsulamento de peptídeos em nanoestruturas (Antosova *et al.*, 2009; Neumann & Staubitz, 2010; Rajendran *et al.*, 2010 ).

Os peptídeos podem apresentar diversas atividades biológicas, como as antimicrobianas (Fjell *et al.*, 2011; Zasloff, 2002), opióides (Goldberg, 2011), hipotensoras (Giménez *et al.*, 2011), antitrombóticas (Menezes *et al.*, 2011) entre outras. Em 2010, cerca de 60 peptídeos sintéticos com potencial terapêuticos já estavam

disponíveis para comercialização farmacêutica e podendo ser empregados em múltiplas patologias como: alergias, asma, artrites, doenças cardiovasculares, diabetes, disfunção gastrointestinal, problemas de crescimento, inflamação, obesidade, doenças infecciosas, câncer, osteoporose, dor, vacinas dentre outras (Stevenson, 2009; Vlieghe *et al.*, 2010).

O sequenciamento do genoma humano contribuiu para a identificação dos alvos moleculares (receptores, enzimas, canais iônicos) de ação para diversos medicamentos. Os primeiros trabalhos nessa área foram os descritos por Hopkins & Groom (2002) que sugeriram 120 alvos terapêuticos distintos. Mais recentemente, Andersen e colaboradores (2011) indicaram 435 alvos, dos quais a maioria são receptores acoplados a proteína G e enzimas. Dentre os projetos mais promissores para a indústria farmacêutica destacam-se os que focam no tratamento para câncer, dor e hipertensão (Arrowsmith, 2012).

Os analgésicos opióides atuam nos receptores opióides (receptores acoplados a proteínas G), localizados principalmente no sistema nervoso central e são considerados a classe de drogas mais potente para o tratamento da dor aguda e crônica (Stein *et al.*, 2003; Stein & Lang, 2009). Eles podem ser prescritos no tratamento de patologias como o câncer, o sida, a diarreia crônica e para pacientes que fazem desintoxicação de heroína (ibegbu *et al.*, 2011).

### **1.1. Nociceção**

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor pode ser definida como uma experiência desagradável que depende basicamente de dois constituintes: o emocional e o nociceptivo. O componente emocional não foi avaliado no presente estudo, por isso não será abordado.

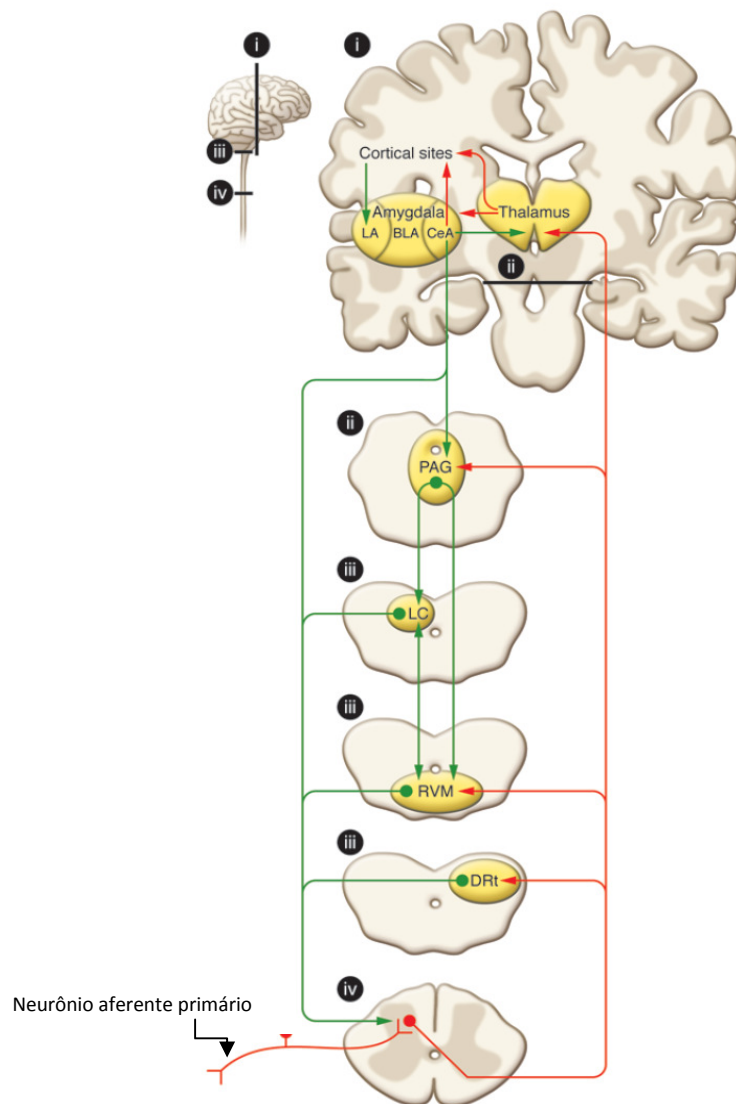
A nociceção é o processo pelo qual neurônios sensitivos primários detectam e propagam estímulos nocivos podendo ser de natureza térmica, mecânica ou química ao sistema nervoso central, (SNC) (Basbaum *et al.*, 2009; Julius & Basbaum, 2001). Essa propagação ocorre na membrana dos neurônios aferentes primários nociceptivos dos nervos periféricos, que são fibras de pequenos diâmetros (A $\delta$  e C) e transmitem a informação nociceptiva oriunda dos músculos, da pele e das vísceras até o sistema nervoso central (Rang & Dale, 2011; Stein *et al.*, 2009).

Os nociceptores (neurônios aferente primário) podem ser classificados em subfamílias de acordo com suas características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas (Gold & Gebhart, 2010). Em relação às diferenças anatômicas existem as fibras mielinizadas A $\delta$  e as não mielinizadas, fibras C. As diferenças fisiológicas referem-se a resposta aos diferentes estímulos e as bioquímicas dependem da presença ou da ausência de neuropeptídeos e de canais específicos nos nociceptores para desempenhar uma determinada função.

As fibras A $\delta$ , são responsáveis pela propagação da estimulação aguda de forma mais localizada e rápida do que as fibras não mielinizadas (fibras C). Os nociceptores A $\delta$  são subdivididos em tipo I e tipo II, os quais respondem ao estímulo mecânico, mas se diferenciam em relação ao nível de resposta quando expostos ao estímulo térmico e químico (Julius & Basbaum, 2001).

As fibras do tipo C não mielinizadas transmitem o estímulo correspondente à dor profunda, de forma difusa e de propagação mais lenta (Basbaum *et al.*, 2010; Gold & Gebhart, 2010). Dentre as fibras C existem fibras que apresentam neuropeptídeos que são os peptídeos relacionados ao gene da calcitonina (CGRP) e a substância P (SP) (Cavanaugh *et al.*, 2011). A fibra C que possui neuropeptídeos inerva regiões mais profundas da pele enquanto a outra, sem neuropeptídeos, inerva regiões mais externas como a epiderme (Todd, 2010). A maioria das fibras C são nociceptores polimodais, isto é, respondem aos estímulos térmicos, mecânicos e químicos (Hunt & Mantyh, 2001). Já as não polimodais respondem apenas ao frio e ao toque na pele (Lumpkin & Caterina, 2007).

A região do corno dorsal da medula espinhal está organizada anatomicamente e eletrofisiologicamente em lâminas distintas numeradas de I a V (Basbaum & Jessell, 2000) e recebe os estímulos provenientes das fibras aferentes primárias (Todd, 2010). Esses estímulos são processados por interneurônios excitatórios (neurotransmissores glutamatérgicos) e inibitórios (neurotransmissores GABA ou glicina) que transmitem a informação para neurônios com projeções em áreas cerebrais, o que caracteriza a via ascendente para a dor. Os axônios presentes nesses neurônios de projeção, passam através dos tratos espinotalâmicos contralaterais (DRT, RVM, LC e PAG) e fazem sinapses com neurônios localizados no tálamo onde existem outras projeções para o córtex somatosensitivo. Ver figura 1. (Basbaum *et al.*, 2010; Todd, 2010).



**Figura 1.** Ilustração representando as vias modulatórias para a dor. Em vermelho está indicando a via ascendente e em verde a via descendente. DRT( núcleo reticular dorsal) ; RMV (medula rostroventral); LC (*Locus Coeruleus*); PAG (região periaquedutal cinza); Adaptado de Ossipov *et al.*, 2010.

Outro mecanismo para a modulação da dor são as vias descendentes inibitórias para a dor, as quais controlam os impulsos no corno posterior. A via descendente parte da amígdala e do hipotálamo até chegar na região periaquedutal cinza (PAG) (Hunt & Mantyh, 2001). A região periaquedutal, passa pelo *Locus Coeruleus* (LC) e projeta-se para a medula rostroventral (RMV). A medula rostroventral projeta-se para o corno da medula espinhal ver figura 1.

A capacidade de inibir a dor nessa via é devida aos diferentes mediadores químicos produzidos pelos neurônios, que são a serotonina, as catecolaminas e os peptídeos endógenos (Perl, 2007). Dentre esses os mais importantes são principalmente

a 5-hidroxitriptamina (serotonina) e a encefalina. A 5- hidroxitriptamina que é uma monoamina, faz com que a maioria das células no SNC fiquem hiperpolarizadas e também pode agir na inibição da propagação do estímulo aferente primário para os neurônios no corno dorsal, por meio de um mecanismo pré sináptico. (Rang & Dale, 2011; Todd, 2010).

A encefalina é um peptídeo endógeno com ação agonista em receptores  $\mu$  e  $\delta$  opióides e se encontram com mais abundância nos neurônios da região periaquedutal cinza (mesencefalo) e substância gelatinosa (medula espinhal). (Rang & Dale, 2011).

## 1.2. Receptores opióides

Os receptores opióides foram identificados no tecido neural em 1973 por Pert e Snyder (Snyder & Pasternak, 2003). O primeiro receptor opióide clonado foi o delta ( $\delta$ ) (DOR) em 1992 por Kieffer e Evans. Posteriormente foi a vez do receptor mu ( $\mu$ ) opióide (MOR) e do receptor opióide kappa ( $\kappa$ ) (KOR) (Snyder & Pasternak, 2003). Os agonistas para receptores mu ( $\mu$ ) opióide bloqueiam estímulos de natureza térmica, enquanto os agonistas para receptor opióide delta ( $\delta$ ) (DOR) bloqueiam estímulos mecânicos (Basbaum *et al.*, 2010; Scherrer *et al.*, 2009). Já os agonistas para o receptor opióide kappa ( $\kappa$ ) no sistema nervoso central desempenham atividade de antagonismo de receptores mu opióides, favorecendo a nocicepção (Vanderah, 2009). Esses três receptores compartilham mais de 70% de identidade de estrutura primária, e as maiores diferenças estão nos *loops* extracelulares (Wu *et al.*, 2012).

Além desses receptores, em 1995 foi isolado o receptor opióide orfão (ORL) que apresenta a estrutura primária com maior grau de similaridade à dos receptores do tipo opióide (63% de identidade) e é o receptor para o peptídeo endógeno nociceptina. Este não é considerado um receptor opióide clássico (mu, kappa e delta) porque apresenta pouca afinidade com a maioria dos ligantes opióides, incluindo moléculas semelhantes estruturalmente à morfina (Diets *et al.*, 2011; Manglik *et al.*, 2012; Meunier *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 2012).

Os receptores opióides estão presentes nos nociceptores de fibras C (Schutting, 2012) que estão localizados principalmente no hipotálamo, na região periaquedutal cinza (PAG), na medula rostroventral (RMV) e no corno da medula espinhal, por isso



a via descendente inibitória é o local de ação para analgésicos opióides (Basbaum *et al.*, 2010; Ossipov *et al.*, 2010).

Na medula, os receptores opióides podem inibir a transmissão do estímulo nocivo nos neurônios, exercendo sua atividade no controle da antinocicepção (Ossipov *et al.*, 2010). Esses receptores opióides são acoplados a proteína G inibitória e sua atividade antinociceptiva é proveniente principalmente do bloqueio de canais de cálcio operados por voltagem (Schutting *et al.*, 2012).

Os estudos sobre peptídeos opióides endógenos possibilitou o conhecimento sobre as estruturas de aminoácidos específicos que interagem com receptores opióides. As encefalinas, morficeptinas e endomorfina - 2 são peptídeos que contém as seguintes sequências: YGGFL (Leu-encefalina) ou YGGFM (Met-encefalina), YFPF e YPPF respectivamente. Esses opióides estão presentes nos mamíferos, localizadas no SNC, assim como as endorfinas, dinofirinas, endormorfina-1 e beta casomorfina bovina (Janecka *et al.*, 2010).

### **1.3. Proteína G**

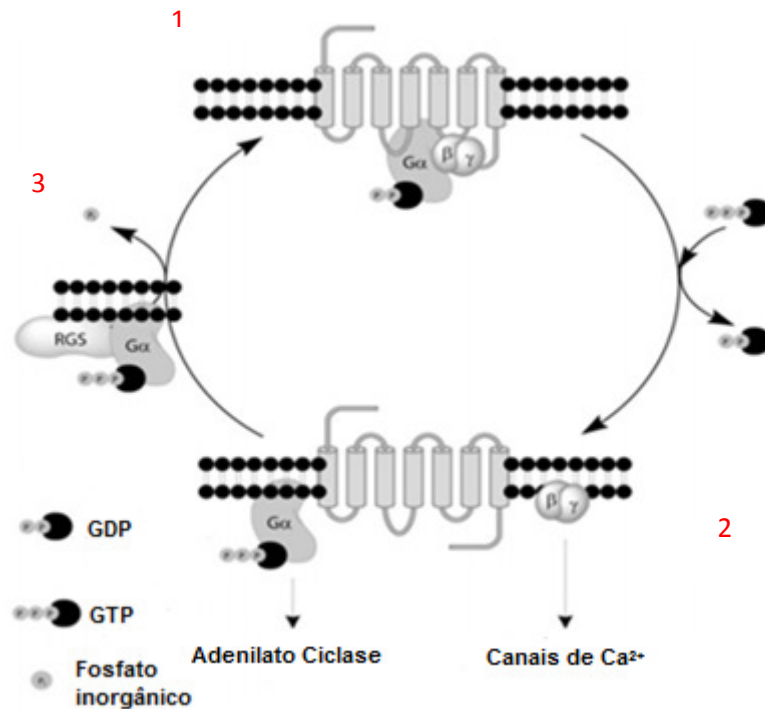
Os receptores acoplados a proteína G (GPCRs), recebem esta denominação devido à sua interação com nucleotídeos (GDP, GTP). Consiste de uma super família com mais de mais de 800 proteínas humanas distintas, como os adrenoreceptores, receptores de dopaminas, receptores opióides, receptores de 5-HT, receptores para peptídeos entre outros. Todas possuem sete alfa helices transmembrana e subunidades. A proteína G pode responder a muitos sinais extracelulares tais como a presença de íons, hormônios, neurotransmissores, lipídeos entre outros, causando respostas celulares, por isso os GPCRs são os alvos terapêuticos mais abordados no desenvolvimento de novos fármacos, fazendo parte de mais de 40% das drogas clinicamente aprovadas (Du & Xie, 2012; Fatakia *et al.*, 2011; Katritch *et al.*, 2012; Whalen *et al.*, 2011).

O receptor mu opióide que é um GPCR, se acopla ao subtipo de proteína G  $G_{\alpha i}$ , sendo o  $i$  de inibição da enzima adenilato ciclase. Esta proteína G possui 3 subunidades denominadas a subunidade alfa( $\alpha$ ) e o heterodímero beta/gama ( $\beta\gamma$ ). Na

ausência de agonista o receptor permanece com todas as subunidades juntas (Lamberts *et al.*, 2011; Traynor, 2012).

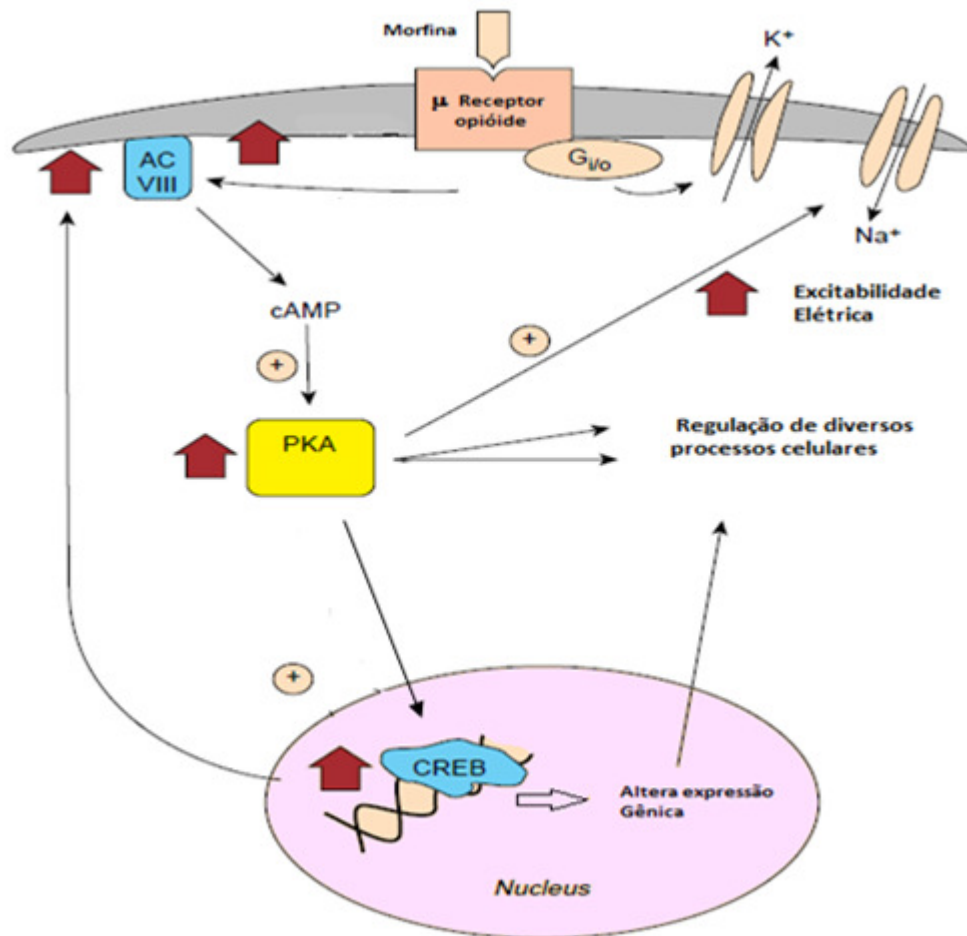
A ligação de um agonista, ao receptor mu opióide, promove uma mudança de conformação do receptor a qual leva a fosforilação do GDP (Guanosina di fosfato) formando então o GTP (Guanosina tri fosfato) com isso, as subunidades se dissociam permanecendo a subunidade  $\alpha$  e o heterodímero  $\beta\gamma$ . Cada subunidade age sobre alvos diferentes. A subunidade  $\alpha$  inibe a adenilato ciclase, enzima que cataliza a formação de adenosina monofosfato cíclico, AMPc. Essa inibição diminui os níveis de AMPc o qual participa de diversos mecanismos de regulação celular, dentre eles a diminuição dos níveis da proteína quinase A (PKA). A PKA por sua vez, diminuirá a condutância nos canais para sódio operados por voltagem, ou seja indiretamente o AMPc controla os canais para sódios voltagem dependente. O AMPc diminuído também inativa os fatores de transcrição para o gene da adenilato ciclase. (Gold & Gebhart, 2010; Law & Loh, 2004; Stein *et al.*, 2009).

A outra subunidade  $\beta\gamma$  atua diretamente sobre os canais iônicos como os canais para cálcio operados por voltagem, nos neurônios pré-sinápticos, inibindo-os e ativa canais para potássio presentes nos neurônios pós-sinápticos. Como consequência a excitabilidade da membrana neuronal é reduzida fazendo com que esta permaneça hiperpolarizada (capaz de ativar canais para potássio) com diminuição do potencial de ação, que resulta em inibição da propagação do estímulo nociceptivo. Essa sinalização é interrompida quando a subunidade  $\alpha$  que está ligada ao seu alvo, aumenta a atividade de GTPase, causando hidrólise do GTP para GDP, associando novamente as subunidades ver figura 2 (Gold & Gebhart, 2010; Law & Loh, 2004).



**Figura 2.** Esquema ilustrativo mostrando a proteína G com suas subunidades. Em 1, complexo inativo sem agonista. Em 2 complexo ativado, dissociação das subunidades e em 3 rearranjo do complexo inativo após hidrólise do GTP. Adaptado de Traynor, 2012.

O uso contínuo de opióides pode caracterizar um quadro de tolerância farmacodinâmica. Isso acontece em decorrência de alterações no mecanismo de transdução de sinal proveniente da interação fármaco receptor. Nessa situação, a subunidade alfa que deveria diminuir os níveis do AMPc, supra regula o CREB (elemento de ligação a proteínas de resposta ao AMPc) que estimula a transcrição do gene da adenilato ciclase restaurando a níveis normais de AMPc. Por esse motivo existe a necessidade de se aumentar a dose do fármaco na prática clínica, tendo em vista o quadro de tolerância que se inicia. Ver figura 3 (Morón *et al.*, 2010; de Nestler & Aghajanian, 1997; Swift & Lewis, 2009).



**Figura 3.** Esquema representativo da via de sinalização molecular, após uso contínuo de opióides analgésicos, caracterizando o quadro de tolerância. O AMPc estimula a expressão do CREB (fator de transcrição) para o gene da adenilato ciclase que neutraliza a ação do fármaco. Adaptado de Nestler & Aghajanian, 1997.

#### 1.4 Enzima conversora da angiotensina

Outro alvo de estudo com os peptídeos sintéticos é a enzima conversora de angiotensina (ECA). Essa enzima é um dos maiores alvos para terapias cardiovasculares e sua inibição permite o controle da pressão arterial (Acharya *et al.*, 2003). Ao ser inibida, a ECA não converte a angiotensina 1 em angiotensina 2 que é um peptídeo vasoconstritor que se for produzido eleva a pressão arterial (Camargo *et al.*, 2012). A hipertensão aumenta o risco de doenças cardiovasculares podendo resultar em óbito (Giménez *et al.*, 2011).

A ECA é uma zinco metalopeptidase com centro catalítico de carboxipeptidase. Dessa forma, o peptídeo inibidor da ECA age como um substrato análogo que se liga competitivamente no sítio do substrato específico da enzima. (Camargo *et al.*, 2012). O decapeptídeo, um dos peptídeos isolados do veneno da *Bothrops jararaca*, o qual

contém os resíduos IPP na região C-terminal (Cotton, 2002) e também os lacto tripeptídeos IPP e VPP encontrados no leite fermentado, possuem a atividade de inibir a ECA (Boelsma & Kloek, 2010).

Os inibidores da ECA são produzidos e comercializados há mais de 20 anos. (Acharya *et al.*, 2003). O primeiro inibidor sítio dirigido foi o captopril que foi desenvolvido a partir do estudo com peptídeos isolados do veneno da *Bothrops jararaca*. (Camargo *et al.*, 2012).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral:**

O presente estudo tem como objetivo o desenho de sequências de decapeptídeos sintéticos que possam apresentar dupla atividade: antinociceptiva e hipotensora. Os decapeptídeos devem atuar em alvos distintos, receptores opióides e a enzima conversora de angiotensina (ECA) respectivamente.

### **2.2. Objetivos específicos:**

Realizar testes biológicos *in vivo* e avaliar o perfil de atividade com a estrutura primária dos peptídeos visando estabelecer uma correlação entre a sequência de resíduos de aminoácido e o perfil de atividade apresentada.

### 3. JUSTIFICATIVA

Segundo dados apresentados pela Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), estima-se que cerca de 30% das pessoas no Brasil sofram com dor crônica (SBED, 2000). A prevalência de dor crônica nos Estados Unidos é de 78 milhões e na Europa chega a 75 milhões de pessoas, dados que refletem a preocupação mundial em terapias que auxiliem o tratamento da dor (Hanlon, *et al.*, 2011).

Atualmente, a morfina é o principal alcalóide isolado da papoula, *Papaver somniferum*, e é utilizada como droga no tratamento da dor por causa das propriedades analgésicas que apresenta (Law & Loh, 2004). Devido aos principais efeitos indesejáveis que a morfina pode provocar tais como a diminuição da motilidade gastrointestinal, a depressão respiratória e a tolerância, existe o interesse no estudo de novos compostos opióides que possam interagir com alvos específicos, produzindo poucos efeitos indesejáveis, baixo risco de tolerância e com potência elevada (Goldberg, 2010; Gorzo *et al.*, 2010).

Em 2007 o Instituto Nacional de Saúde dos EUA, NHI, junto com a agência americana reguladora de alimentos e medicamentos (FDA), relatou a necessidade de desenvolvimento de novos compostos para tratar a dor, principalmente a dor crônica (Dworkin & Turk, 2011; Woodcock, *et al.*, 2007). Nessa ocasião foram propostos novos estudos e estratégias para aprimorar o desenvolvimento de fármacos. Uma das estratégias mais impactantes consiste no desenho de fármacos que atuem em mais de um alvo molecular, já que em muitos casos o processo da dor vem associado a outras patologias. Assim, a combinação de mais de uma ação seletiva em uma única molécula poderia resultar no aprimoramento da eficácia terapêutica, da droga o que caracterizaria a terapia individualizada para o tratamento da dor (Hanlon, *et al.*, 2011; Woodcock, *et al.*, 2007).

Diversos estudos clínicos correlacionam pacientes que sofrem de dor e também apresentam quadros de hipertensão arterial (Bruehl *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2011). Mais recentemente o trabalho epidemiológico de Olsen *et al.*, analisa a prevalência da dor e hipertensão sugerindo que a dor crônica predispõe a hipertensão e que a hipertensão acontece com mais frequência em pacientes que sofrem de dor do que os que não apresentam dor (Olsen *et al.*, 2013). Tendo em vista esses

estudos, foi proposto o desenho de decapeptídeos para serem intencionalmente bifuncionais (atividades opióide e hipotensora).

Para o desenho das sequências dos peptídeos foram utilizados trabalhos anteriores do grupo ao qual pertence este projeto que focam na prospecção e predição de peptídeos oriundos da secreção cutânea de anfíbios e da peçonha de serpentes (Leite *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2010), e também no desenvolvimento de ferramentas que permitam a identificação de peptídeos bioativos encriptados em proteínas (Brand *et al.*, 2012).

Com o auxílio desses trabalhos prévios associados ao conhecimento disponível na literatura acerca de domínios protéicos específicos, alvos moleculares (por exemplo, receptores, enzimas) e o mecanismo de ação de fármacos, possibilitou-se o desenho de novos peptídeos com atividade biológica específica.

Os peptídeos foram desenhados com as seguintes sequências: (PSLEM 11011) e (PSLEM 11012). Em vermelho, região N-terminal dos peptídeos com a sequência que promove atividade opióide **xxxxx**. Em azul, região C-terminal com a sequência que complexa com a ECA **xxxxx** inibindo-a.

As sequências dos peptídeos objeto de nosso estudo, ainda não poderão ser reveladas neste documento por força de todo o ritual que nos é imposto pelos processos de patenteamento, o qual encontra-se em processo de elaboração. Vale lembrar que por tratarem-se de moléculas desenhadas exclusivamente a partir de descritores Físico-Químicos, estas não estão sujeitas à quaisquer restrições legais ou ideológicas vigentes, pelo menos até a presente data. A sigla PSLEM significa *Peptídeo Sintético Laboratório de Espectrometria de Massa* e o número indica o ano e a ordem cronológica em que o peptídeo foi sintetizado.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Síntese de peptídeos

Os peptídeos PSLEM 11011 e 11012 foram sintetizados por meio de síntese química em fase sólida, utilizando a estratégia Fmoc. A resina com o linker escolhido foi a H-2-cl-trt-resina, (*Peptides international*, Kentucky, Estados Unidos) (Goolcharran, 1998; Mergler & Durieux, 2005).

O grau de substituição da resina foi de 0,66 mmol/g, a escala de síntese utilizada foi de 0,2 mmol que é equivalente a 303mg da resina. A síntese foi realizada dentro de um dosador oral de 5ml com filtro de polipropileno.

Para a formação da ligação peptídica (ligação amida) utilizou-se um reagente químico para ativar o grupamento ácido carboxílico de um  $N_{\alpha}$ -acil-aminoácido, o qual sofre o ataque nucleofílico do grupo  $\alpha$ -amino de outro aminoácido ou fragmento peptídico  $C_{\alpha}$ -bloqueados por ligação com um suporte polimérico, resultando na formação da ligação peptídica entre eles (Machado *et al.*, 2004).

Iniciou-se a síntese com a reação de acoplamento do penúltimo aminoácido, pois o último aminoácido presente no C-terminal do peptídeo já vem acoplada na resina e desprotegida. Primeiramente utilizou-se 0,8 mmol de derivado de aminoácido (Fmoc-AA-OH) com excesso molar de 4 vezes. O reagente para a ativação do grupo carboxila, o composto carboxilatetrafluoroborato de [benzotriazol-1-iloxi(dimetilamino)metilideno]-dimetilazânio (TBTU), foi adicionado ao dosador oral na quantidade equimolar ao derivado de aminoácido a ser ativado. O *N,N*-Diisopropylethylamine, DIPEA, é uma base e foi adicionado na quantidade 255  $\mu$ L (1.5mmol) para desprotonar o grupo ácido carboxílico. A reação foi conduzida em *N,N*-dimetilformamida (DMF), 3,0 mL como solvente (Chan & White, 2000). Os acoplamentos foram conduzidos por 90 min. à temperatura ambiente sob agitação.

Em seguida, conduz-se a desproteção do grupamento Fmoc, que é quando o grupo N-terminal fica desprotegido, podendo então reagir com o próximo derivado de aminoácido. Para isso foi necessário utilizar uma solução de 4-metilpiperidina (Hachmann & Lebl, 2005) a 25% (v:v) em DMF durante duas etapas de 15 minutos, à temperatura ambiente sob agitação.

A estratégia utilizada Fmoc, (9-fluorenilmetoxicarbonila), denomina o grupo protetor temporário, da função amina com o qual estabelece ligações estáveis ao TFA e lábeis a bases orgânicas. Já o grupo protetor da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos é ácido lábil e é removido durante a desproteção final, ao término da síntese. (Llobet *et al.*, 2009).

As duas reações (desproteção do grupamento Fmoc amino-terminal e ativação do grupo carboxila do Fmoc-aminoácido para a formação da ligação peptídica) foram repetidas sucessivamente até a adição do último derivado de aminoácido e a última desproteção do grupamento Fmoc ligado ao grupo N-terminal de toda a cadeia peptídica. Entre uma reação de acoplamento e a reação de desproteção, foram feitas oito lavagens alternadas da resina com 2-propanol e DMF. Fez-se uma última lavagem com diclorometano (DCM), seguida de filtração a vácuo. (Chan & White, 2000).

Após terminar uma reação de desproteção ou acoplamento, foi conduzido o teste da Ninhidrina ou Kaiser (Chan & White, 2000) que é um teste colorimétrico que detecta em quantidades pequenas a presença de grupamentos aminas livres. A ninhidrina (2,2-dihidroindeno-1,3-diona) reage com o grupo amino do aminoácido a 110°C em meio alcalino. Se a coloração ficar azul (resultado positivo) após a desproteção, o teste indica a presença de grupos amina livres e que pode-se fazer o acoplamento. Se a coloração for amarela (resultado negativo), após o acoplamento, o teste indica que ocorreu a formação da ligação peptídica entre o grupamento N-terminal da cadeia peptídica ligada à resina e o derivado de aminoácido adicionado. Caso não ocorra a formação dessas cores, deve-se repetir a reação de desproteção ou de acoplamento.

A etapa final do processo de síntese consistiu na desproteção de todos os grupos protetores das cadeias laterais e da clivagem para a produção do peptídeo bruto que foi posteriormente clivado, purificado e caracterizado quimicamente.

#### **4.2. Clivagem dos peptídeos**

A clivagem é um procedimento necessário para promover o rompimento da ligação entre o peptídeo e a resina e para a desproteção de cadeias laterais não alquílicas e nesta etapa é fundamental impedir que ocorram reações secundárias entre carbocátions provenientes dos grupos protetores removidos e grupamentos susceptíveis presentes na cadeia peptídica (Howl, 2005). A ligação do resíduo C-terminal do peptídeo com a

resina é ácido lábil, por isso a reação foi conduzida na presença de ácido trifluoroacético, TFA e reagentes nucleófilos (Howl, 2005), nas proporções estabelecida no protocolo da Novabiochem®, de 81,5%, ácido trifluoroacético, (TFA), 5% de tioanisol, 5% de fenol, 5% de água, 2,5% de EDT e 1% de TIS para um volume final de 10 mL (Novabiochem, 2007).

Os reagentes permaneceram sob constante agitação por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente dentro de um tubo Falcon (50ml). Decorrido esse tempo, utilizou-se nitrogênio gasoso para a retirada completa do TFA e em seguida foram feitas lavagens com éter diisopropílico congelado em nitrogênio líquido para precipitar o peptídeo e retirar o excesso de produtos de reação formados entre os grupamentos protetores. O peptídeo foi extraído da resina devido às lavagens com água: acetonitrila (1:1; v:v), por meio de filtração em funil de placa porosa. Terminada a filtração, transferiu-se o líquido que contém o peptídeo para tubos de polipropileno (tubos Falcon) o líquido foi congelado com nitrogênio líquido e liofilizados durante aproximadamente 72 h. Para as lavagens foi necessário o uso do funil de placa porosa, bomba de vácuo e capela de exaustão.

### **4.3. Purificação dos peptídeos**

A purificação foi realizada por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC (*LC-10AT VP, Shimadzu, Japão*), utilizando uma coluna semi-preparativa, em fase reversa ( $C_{18}$ , 10 mm x 250 mm, *modelo 218TP510, Grace Vydac, Estados Unidos*). Para cada separação cromatográfica, foram pesados aproximadamente 2 mg de peptídeo sintético bruto que foram diluídos em 2 mL de água Milli-Q®. Em seguida a solução foi centrifugada por 15 min a 13.400 r.p.m. As fases móveis utilizadas foram as seguintes: a fase móvel A, 0,1% em volume TFA/H<sub>2</sub>O e a fase móvel B, 0,1% TFA/ACN em volume. As amostras foram injetadas com volume de 500µL por cromatografia e em seguida eluídas por incrementos da solução B de 5% a 95% durante 60 min, em gradiente linear com um fluxo de 2,5 mL/min, à temperatura ambiente. Os peptídeos foram detectados nos comprimentos de onda de 216 nm, (absorbância da ligação peptídica) e 280 nm (absorbância do anel indol do triptofano) (Brand *et al.*, 2002). As frações foram coletadas manualmente.

Foram realizadas separações cromatográficas para cada peptídeo, purificando-se o equivalente a 20 mg, quantidades essas suficientes para os testes antinociceptivos *in vivo*.

#### **4.4. Verificação da pureza e identidade dos peptídeos**

A análise da pureza dos peptídeos foi realizada por espectrometria de massa, técnica analítica que visa a obter a formação de íons na fase gasosa, para determinar sua massa molecular (Domon & Aebersold, 2006). Todos os espectrômetros devem conter uma fonte de íons, um analisador de massas e o detector. No presente estudo foram utilizados os métodos de ionização por electrospray (ESI) e a ionização/dessorção por laser, assistida por uma matriz (MALDI), um analisador por tempo de voo (TOF) e o analisador híbrido quadrupolo tempo de voo (Q-Q-TOF) cujo princípio envolve o tempo que um íon leva para percorrer a distância da fonte de íons até o detector. Como os íons possuem massas e cargas diferentes ( $m/z$ ) atingem sequencialmente o detector em ordem de valor crescente de  $m/z$ , produzindo pulsos elétricos.

Para análise por MALDI-TOF a preparação das amostras iniciou com uma alíquota do peptídeo diluída em 100  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q<sup>®</sup> e homogeneizada. As amostras foram preparadas em uma proporção de 1:3 (v:v) em uma matriz de ácido alfa-ciano-4 hidroxicinâmico (5 mg) dissolvido em 200  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q<sup>®</sup>, 250  $\mu\text{L}$  de ACN e 50  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de TFA a 3%. A placa de MALDI utilizada (*Bruker Daltonics*, Alemanha) foi do tipo maciça, previamente limpa com água e metanol e polida. Na placa foram aplicadas a solução calibrante e as amostras em triplicatas, para análise no método refletido positivo.

Após concluir a aplicação de todas as amostras na placa, esperou-se cristalizar para o procedimento de análise e obtenção dos espectros. O MALDI-TOF (*Ultraflex III*, *Bruker Daltonics*, Alemanha).

Para análise por ESI, a amostra foi preparada a partir de uma pequena quantidade do peptídeo seco que foi solubilizada em uma solução contendo acetonitrila, água Milli-Q<sup>®</sup> 1:1 (v:v) e 1% de ácido fórmico. Em seguida o equipamento foi calibrado utilizando uma solução de calibrante externo ESI-Tuning Mix (*Agilent Technologies*, Estados Unidos) e a amostra foi analisada com uma pressão no capilar de

4,5 kV e a varredura de massa foi de m/z de 50 até 3000 no equipamento ESI-Q-TOF/MS (*microtof-Q II, BrukerDaltonics, Alemanha*).

A identidade dos peptídeos também foi verificada por meio de fragmentação do íon precursor para a obtenção dos espectros de MS/MS, no mesmo instrumento. A interpretação dos espectros foi realizada de modo manual com o auxílio do programa computacional Compass Data Analysis (*Bruker Daltonics, Alemanha*).

#### **4.5. Ensaio Biológicos**

Os ensaios biológicos *in vivo* para a determinação da atividade antinociceptiva foram realizados no laboratório de Toxinologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnB. Os procedimentos foram realizados de acordo com o COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e foram submetidos ao comitê de ética da UnB juntamente com outros projetos que envolvem análises farmacológicas do Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A certificação do comitê de ética está em anexo Nº 131758/2012. Os testes para análise da atividade hipotensora estão em andamento com colaboração do Instituto do Coração, InCor-SP e por isso não serão descritos nesse trabalho.

##### **4.5.1. Animais**

Os animais utilizados foram camundongos *Mus musculus* da linhagem/raça Swiss, fêmeas, com 20-25g, adquiridos do biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. Os animais experimentais permaneceram acondicionados em gaiolas e mantidos em condições controladas de luz (ciclo de 12 horas de claro/escuro), temperatura (23°C) e umidade (55%). Antes e durante todo o período experimental, os animais receberam água e ração *ad libitum*.

##### **4.5.2. Testes antinociceptivos**

Os peptídeos foram analisados em dois modelos clássicos de testes para atividade antinociceptiva o *Hot Plate*, ou teste da placa quente, e *Tail Flick*, ou teste de retirada da cauda. Para o teste da placa quente os animais foram previamente selecionados, apenas os animais que responderam em 15s foram utilizados no teste.

Ambos os modelos promovem estímulos térmicos e mensuram a latência, que é o tempo de resposta a partir desse estímulo (Berge, 2011). A antinocicepção é expressa

a partir da comparação entre a latência média basal do animal, a qual é mensurada antes de iniciar a administração dos grupos controle e experimental. A latência teste, foi obtida após administração dos grupos controles e experimentais e a latência máxima é determinada para minimizar o risco de lesão tecidual. Quantitativamente o índice de antinocicepção (IA) é definido pela seguinte fórmula (Muñoz, *et al.*, 2012):

$$IA = \frac{(\text{Latência teste} - \text{Latência média basal})}{(\text{Latência máxima} - \text{Latência média basal})}$$

No teste da placa quente, *Hot Plate*, o animal foi introduzido em uma placa metálica aquecida em torno de 50-55 °C (AVS, Brasil), a partir daí foi observado quanto tempo o camundongo permaneceu até elicitare uma resposta cerebral que é representada pela ação de pular ou o lambar da pata traseira. Para o teste de retirada da cauda, *Tail Flick*, o camundongo foi colocado sobre um equipamento denominado analgesímetro (*Insight*, Brasil), de modo que sua cauda ficasse em contato com a resistência capaz de aumentar a temperatura até o animal retirar a cauda. Essa análise indica resposta medular. (Le bars *et al.*, 2001).

#### **4.5.3. Grupos avaliados**

Os grupos eram compostos por 6-8 animais e a via de administração foi intraperitoneal (i.p.). As doses utilizadas foram baseadas na dose e molaridade da morfina (10 mg/kg de animal; 3,48 µM), (Durántez *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2011). Como controle positivo foi utilizado além do sulfato de morfina (10mg/ml) (*Dimorf*, *Cristália*, Brasil) a Leu-encefalina que foi sintetizada com o mesmo protocolo descrito para a síntese do PSLEM 11011 e 11012 (19,3 mg/kg de animal; 3,48 µM). Como controle negativo foi utilizada solução fisiológica de cloreto de sódio, salina, (0.9%) (*Equiplex*, Brasil).

A dose do PSLEM 11011 foi de 38mg/kg (3,48 µM). A dose utilizada do PSLEM 11012 foi de 40mg/kg (3,48 µM). Foi utilizado também o antagonista de receptores opióides (mu, kappa e delta) a naloxona, cloridrato de naloxona (0,4mg/ml) (*Narcan*, *Cristália*, Brasil) (Goldeberg, 2010; Kane *et al.*, 2006) na dose de 4 mg/kg (1,13mM) quantidade suficiente para provocar o antagonismo (Hao *et al.*, 2011) que foi

administrado em doses seriadas de hora em hora com o intuito de inibir a atividade da Leu-encefalina e dos peptídeos PSLEM 11011 e PSLEM 11012. Na Leu-encefalina a administração foi realizada em todos os tempos (tempo zero, 1h, 2h, 3h), mas nos peptídeos apenas nos tempos zero, 1h, 2h para os dois modelos de testes.

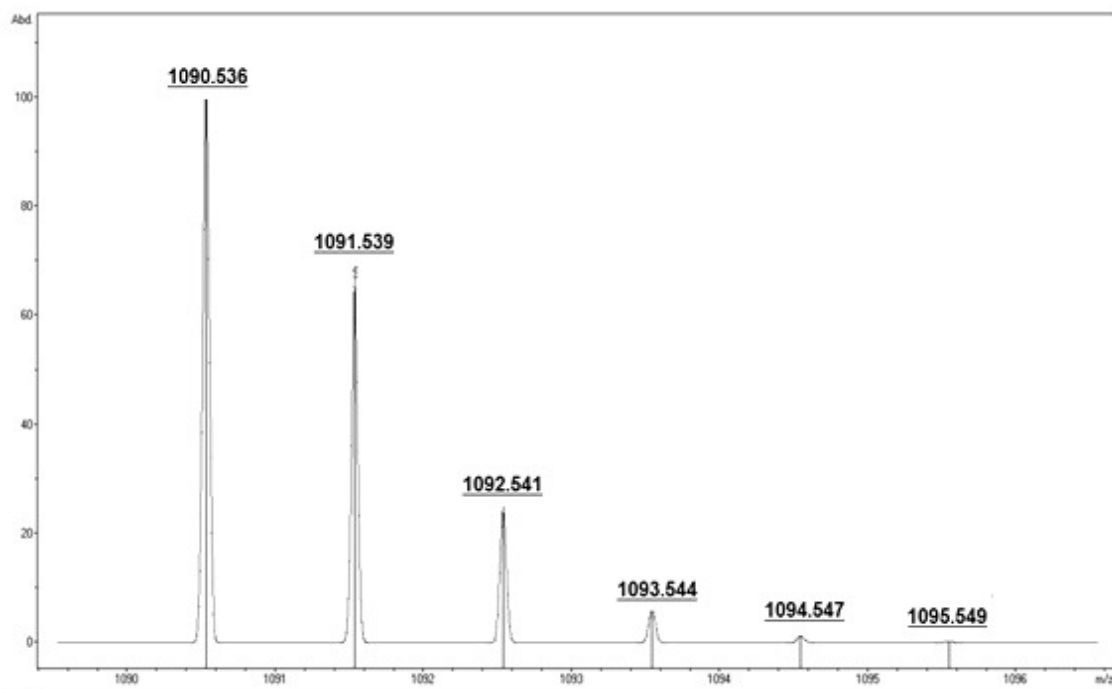
#### **4.6. Análise estatística**

Após realização dos testes *in vivo* foi realizada análise estatística com o programa *Graphpad Prism* (Graphpad software, Estados Unidos) para auxiliar na interpretação das mensurações do índice de antinociceção (IA). Para a comparação entre os grupos experimentais e controles foi utilizada a *two way* anova seguida de Bonferroni pós teste que determinou como a resposta do teste foi afetada de acordo com o tratamento e o tempo.

## 5. RESULTADOS

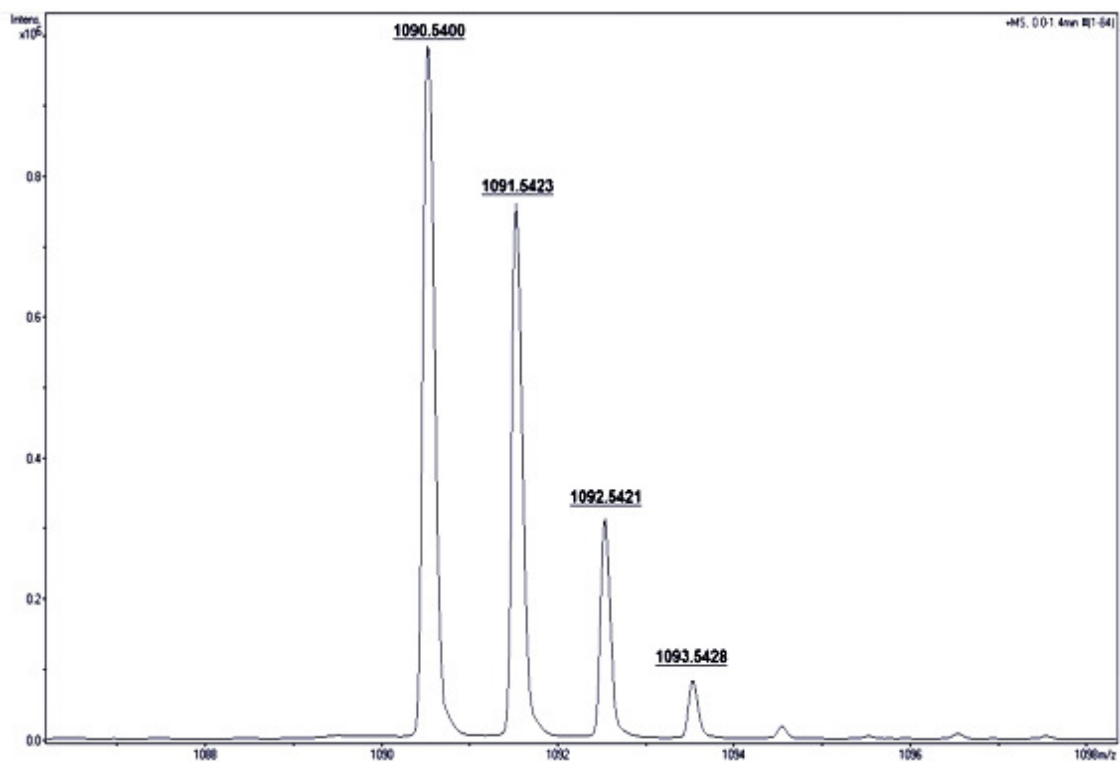
### 5.1. Análise dos componentes obtidos (MS)

Para a confirmação de que a síntese dos peptídeos foi bem sucedida, foi realizada a comparação entre a massa molecular esperada (massa teórica) e a massa molecular encontrada. A massa monoisotópica em Da esperada para os peptídeos foi obtida por meio do programa *Compass isotopic pattern*, da Bruker Daltonics. Os espectros a seguir mostram os valores encontrados para os peptídeos PSLEM 11011 e 11012 segundo o programa e também os valores observados durante a análise por espectrometria de massa. As massas moleculares teóricas e experimentais indicam acurácia como pode ser observado pelas figuras 7 A e B para o PSLEM 11011, e as figuras 8 A e B, para o PSLEM 11012.

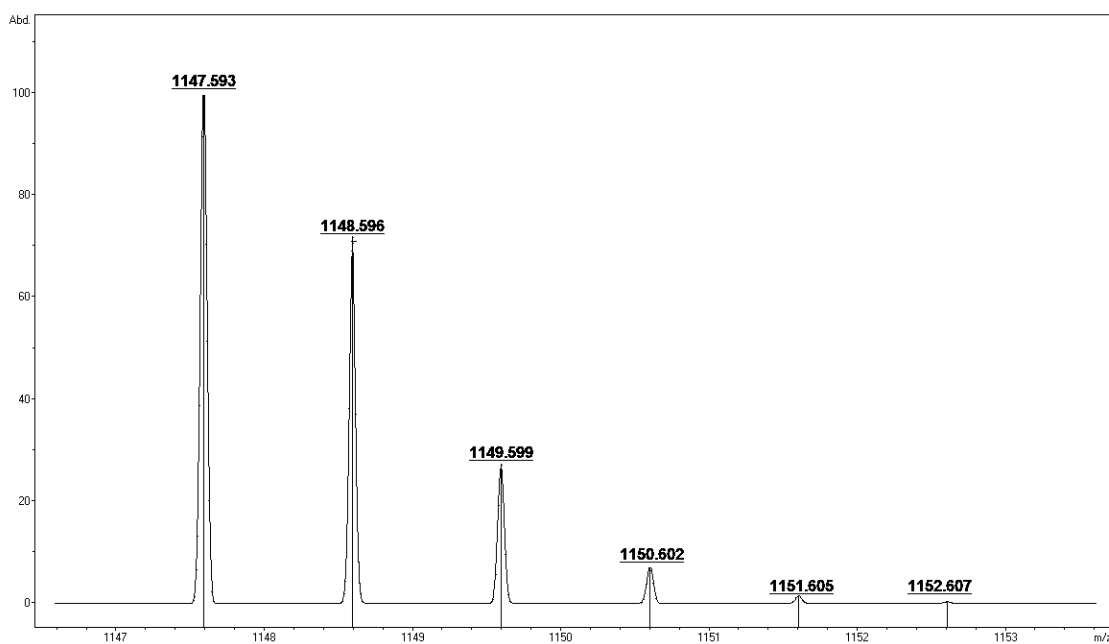


**Figura 4 A** : Espectro com a série isotópica teórica para o PSLEM 11011, obtido por meio do programa *Compass Isotopic Pattern*.

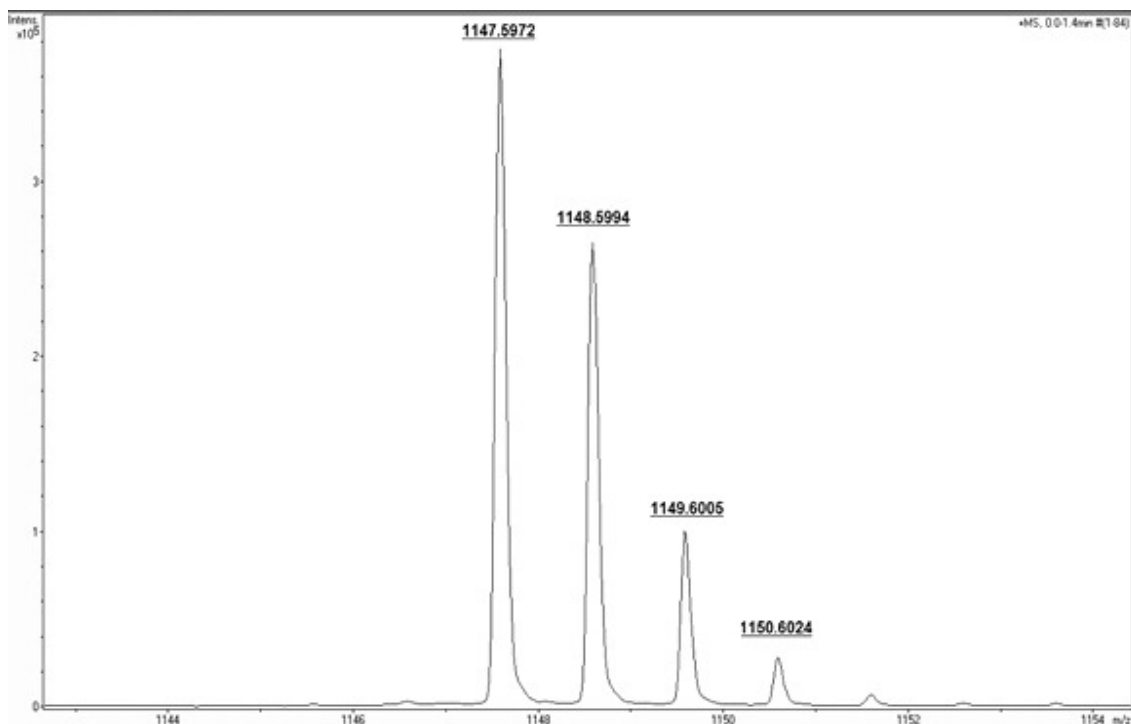




**Figura 4 B.** Espectro do PSLEM 11011 representação da série isotópica obtida por ESI.

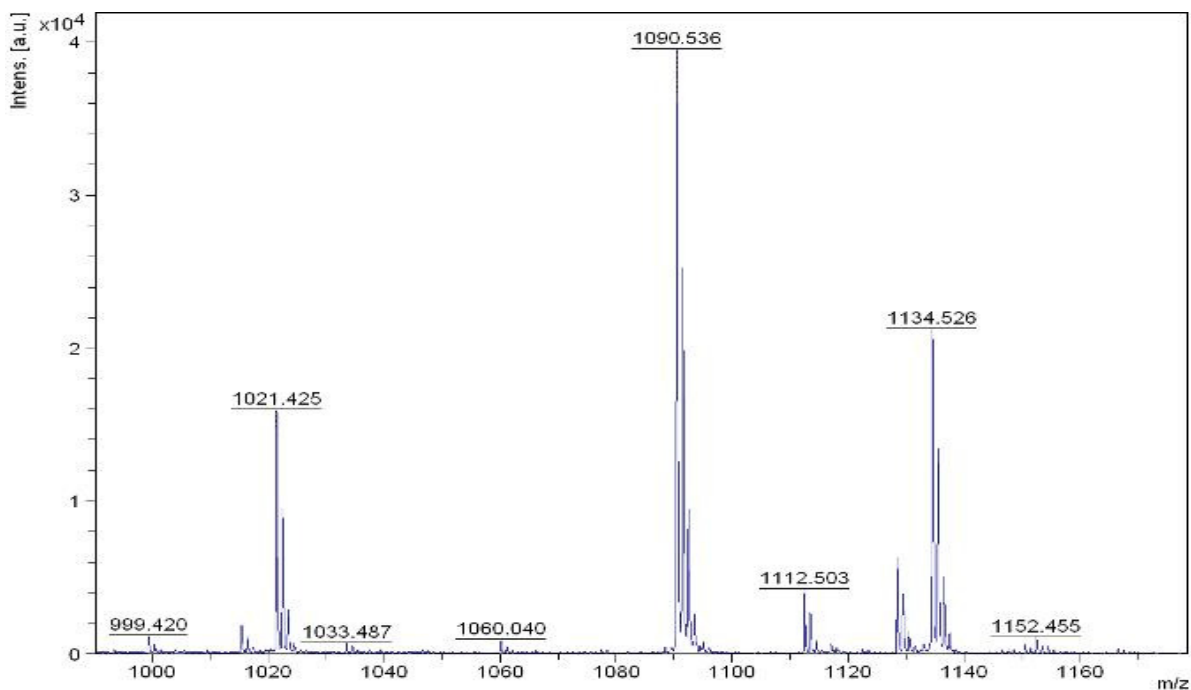


**Figura 5 A:** Espectro com a série isotópica teórica para o PSLEM 11012 obtido por meio do programa *Compass Isotopic Pattern*.

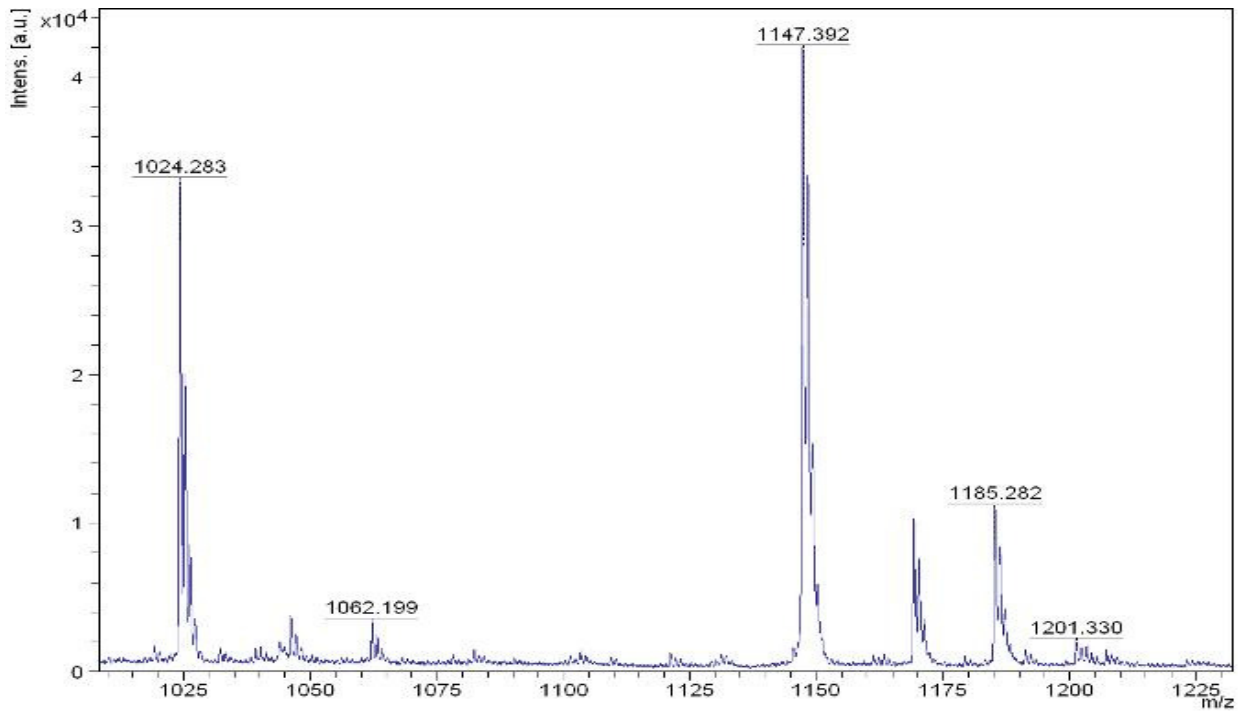


**Figura 5 B.** Espectro do PSLEM 11012 representação da série isotópica obtida por ESI.

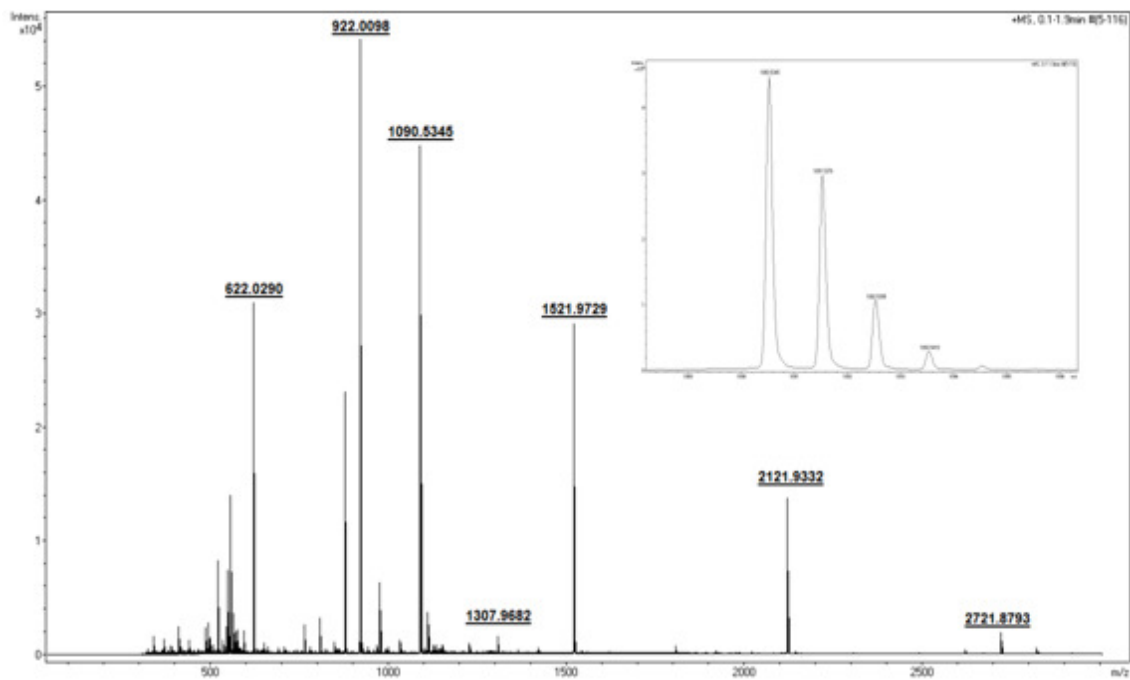
Os íons precursores dos peptídeos de interesse estão mostrados nas figuras 9 e 10 e foram obtidos a partir da análise por *MALDI-TOF* do peptídeo bruto, após ser clivado e liofilizado. Nas figuras 10 e 11 estão os espectros obtidos por *Eletrospray* (ESI) dos PSLEM 11011 e 11012 respectivamente, após a purificação.



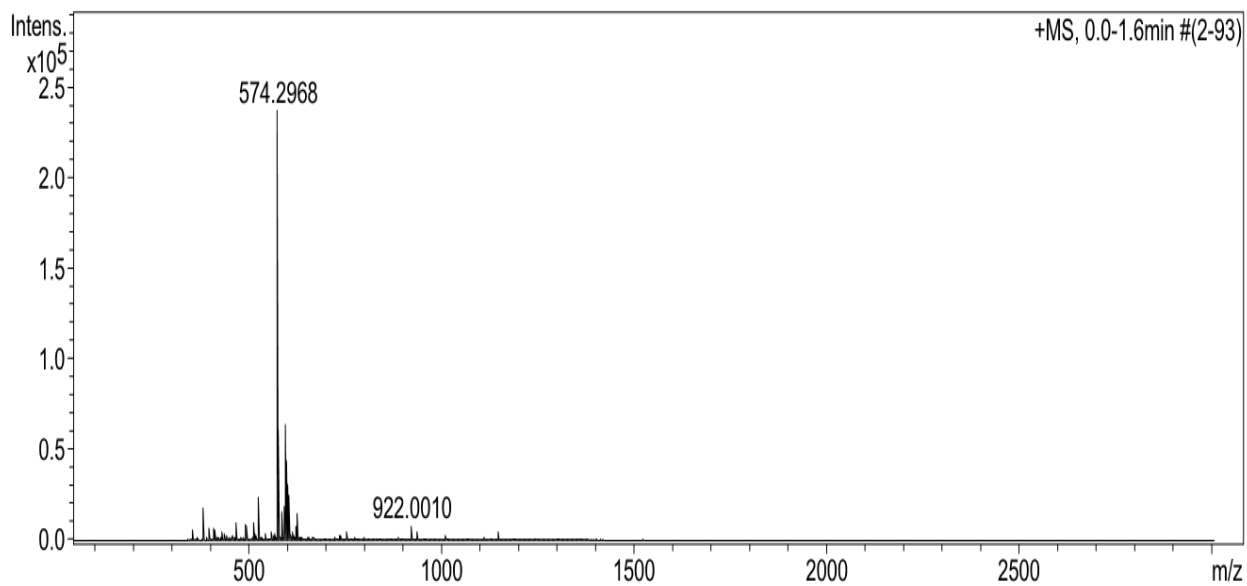
**Figura 6.** PSLEM 11011, bruto, mostrando o aduto de sódio  $[M + Na^+] = 1112.503$  Da.



**Figura 7.** PSLEM 11012 , bruto, mostrando o aduto de potássio  $[M+K^+]=1185.282$  Da.



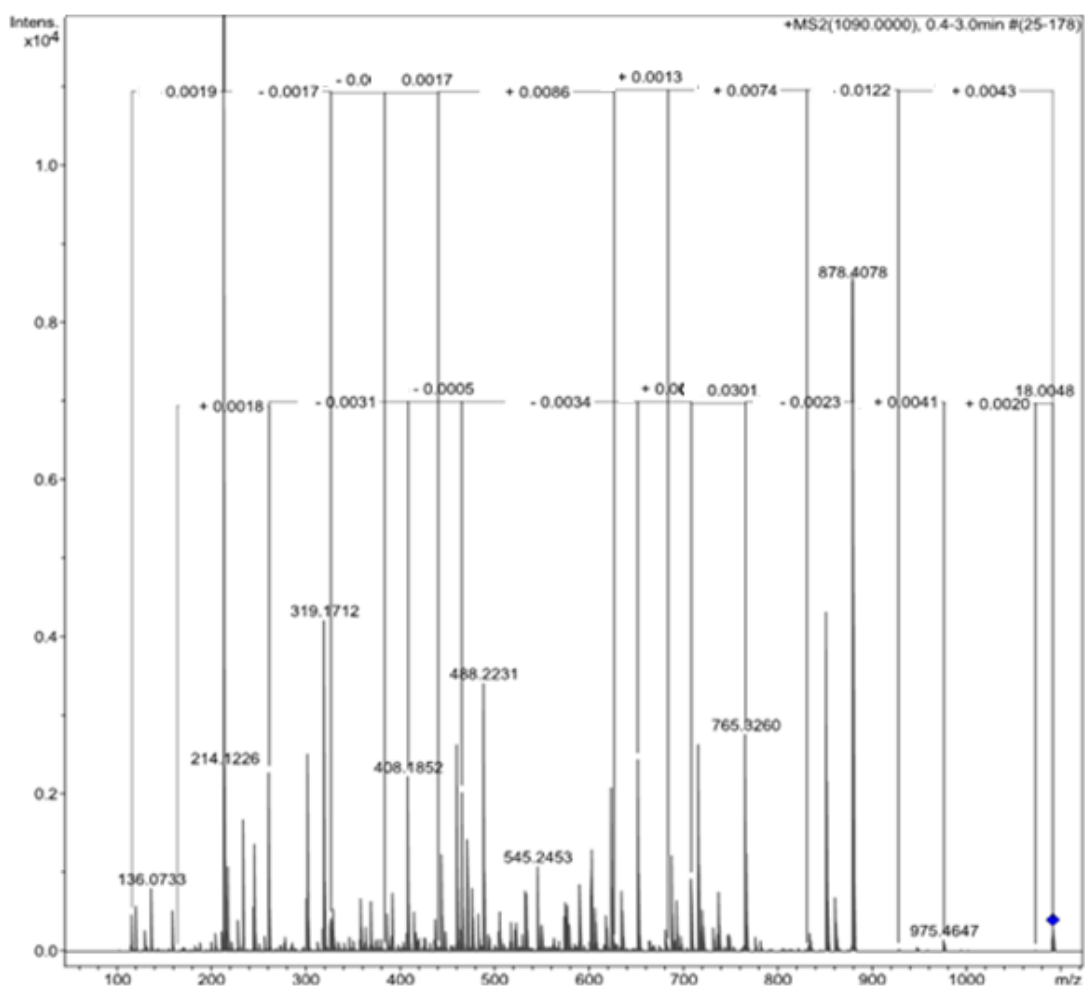
**Figura 8.** Espectro obtido para o PSLEM 11011 purificado, após análise por *eletrospray*, monocarregado 1090.5340 Da. Espectro com calibração interna indicando as massas moleculares dos calibrantes.



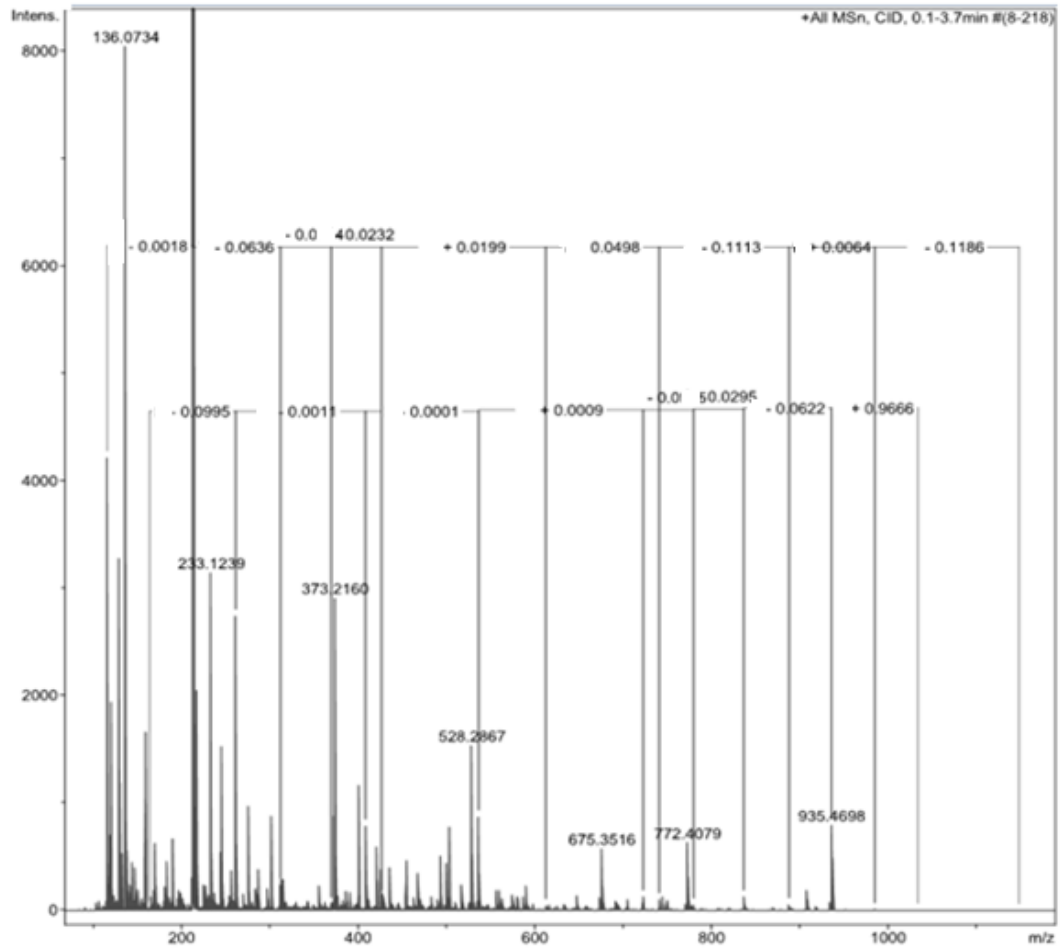
**Figura 9.** Espectro obtido para o PSLEM 11012 purificado, após análise por *eletrospray*, dupla carga 574.2968 Da.

## 5.2. Confirmação da identidade molecular

A determinação da estrutura primária dos peptídeos foi realizada utilizando a técnica de ionização por *electrospray*, por meio de fragmentação do íon precursor, experimento de MS/MS. A partir da fragmentação foi possível obter as séries y e b. A interpretação dos espectros foi realizada de modo manual com o auxílio do programa computacional *Compass Data Analysis (Bruker Daltonics, Alemanha)*. A seguir nas figuras 11 e 12 os espectros com o sequenciamento para o PSLEM 11011 e PSLEM 11012. Devido ao processo de patenteamento, as sequências não podem ser reveladas.



**Figura 10.** Espectro obtido por MS/MS para confirmação da identidade do PSLEM 11011. A série y íons fragmentados no C-terminal e a série b fragmentos no N-terminal.

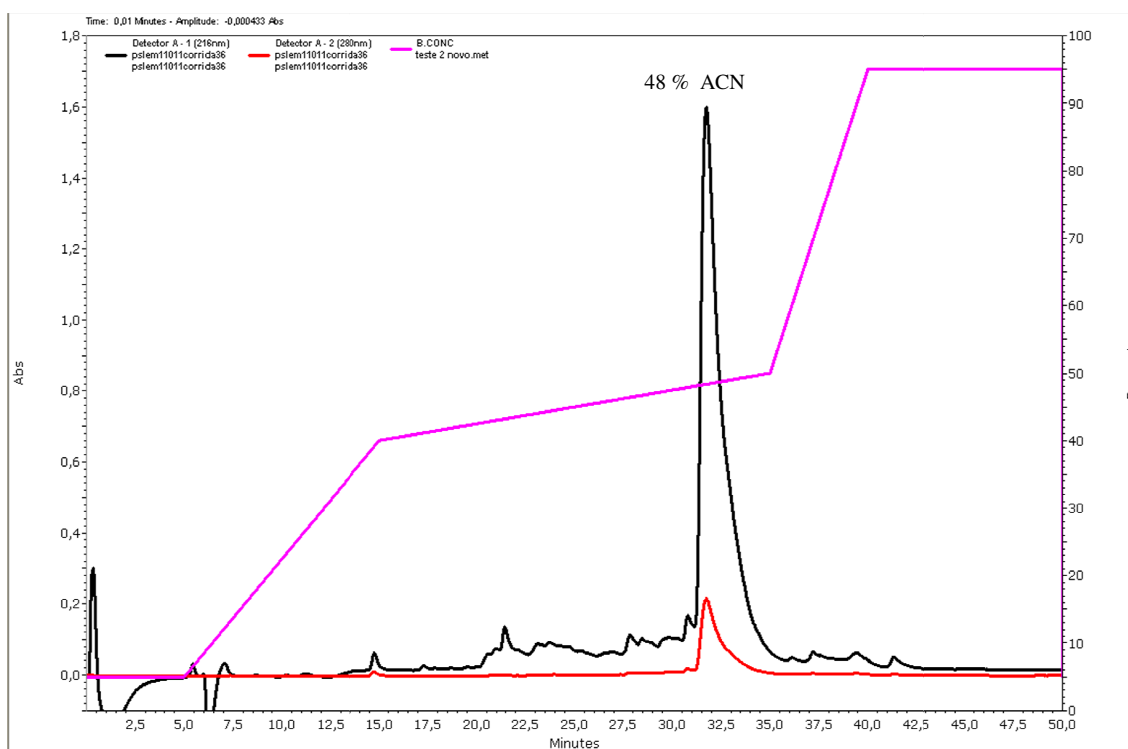


**Figura 11.** Espectro obtido por MS/MS para confirmação da identidade do PSLEM 11012. A série y íons fragmentados no C- terminal e a série b fragmentos no N-terminal.

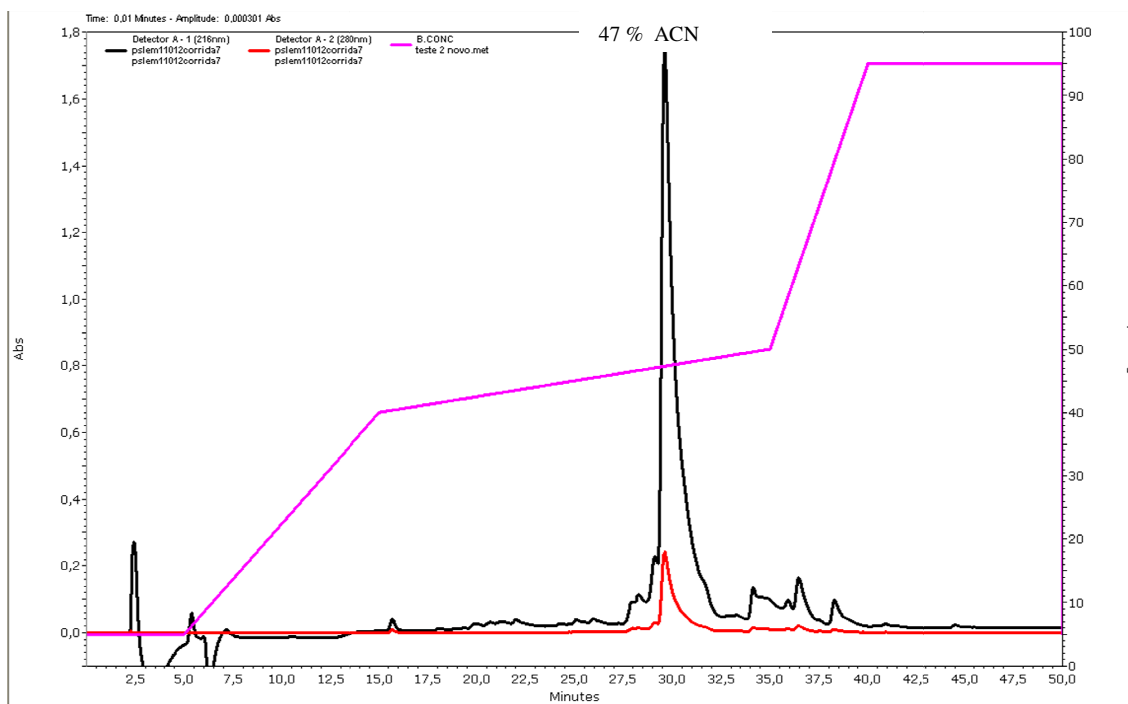
### 5.3. Purificação dos peptídeos

Os peptídeos sintetizados foram fracionados utilizando-se o sistema de cromatografia líquida em fase reversa. As frações coletadas tiveram seus tempos de retenções, de acordo com a concentração de acetonitrila, em que eluíram. Foi observada uma diferença no tempo de retenção do PSLEM 11011 com o PSLEM 11012 que está sendo exibido nos cromatogramas nas figuras 11 e 12.

A cromatografia foi monitorada nos comprimentos de onda de 216 nm e 280 nm. A linha em preto representa a absorbância no comprimento de onda em 216nm e a linha vermelha indica a absorbância no comprimento de onda em 280 nm. O método utilizado com variação na concentração da fase móvel de 5% até 95% foi representado pela linha rosa.



**Figura 12.** Cromatograma obtido para o PSLEM 11011. A eluição ocorreu aos 31 min. utilizando-se um gradiente linear de ACN (5% - 95%) com fluxo de 2,5 ml/ min à temperatura ambiente.



**Figura 13** . Cromatograma obtido para o PSLEM 11012. A eluição ocorreu aos 29 min. utilizando-se um gradiente linear de ACN (5% - 95%) com fluxo de 2,5 ml/ min à temperatura ambiente.

A partir desses resultados pode se observar que o PSLEM 11011 tem mais afinidade pela coluna do que o PSLEM 11012, por isso o tempo de retenção é maior o que confere também uma hidrofobicidade superior ao PLSEM 11012.

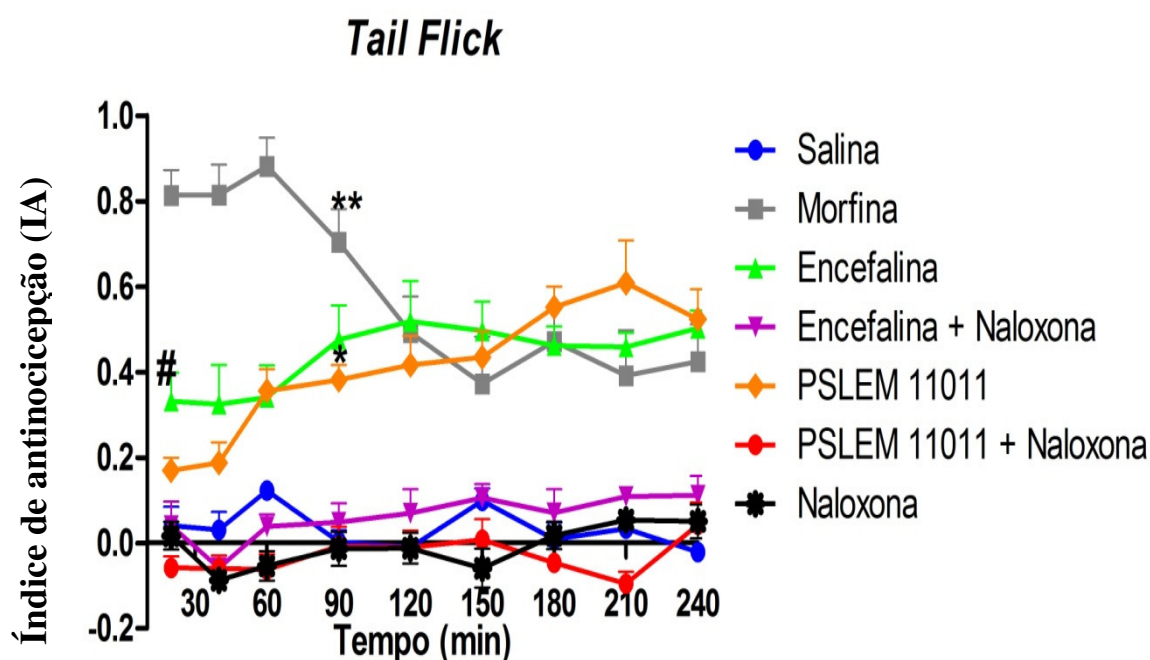
#### 5.4. Verificação da pureza

Após a purificação dos peptídeos, foram obtidos novos espectros de massa, utilizando a técnica por eletrospray (ESI), para análise das frações adquiridas por cromatografia. Os espectros apresentados nas figuras 9 e 10 mostram os espectros com peptídeo purificado o qual indica que foi possível purificar os peptídeos sintetizados para a realização dos testes *in vivo*.

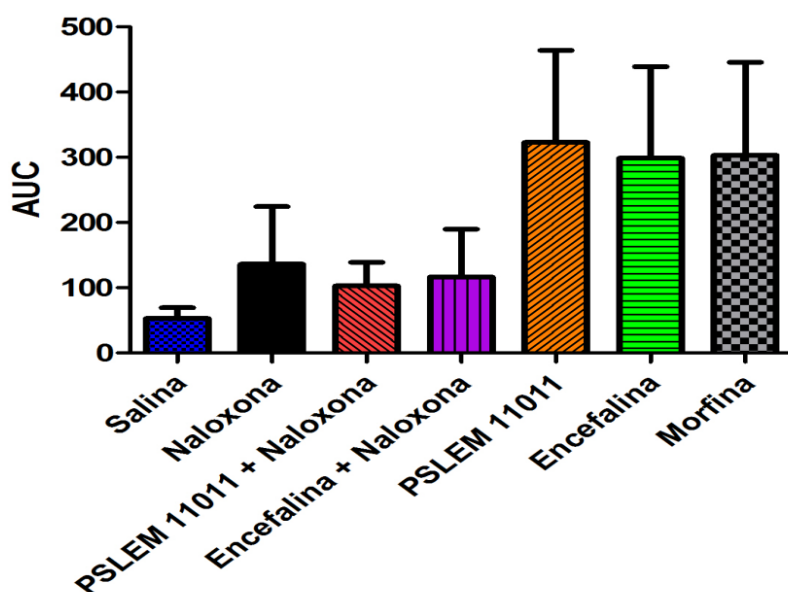


## 5.5 Análise antinociceptiva

Os gráficos que serão apresentados ao longo do presente texto (figuras 17,18, 19 e 20) representam os dados brutos após análise estatística. Onde estão representados os símbolos (\*, \*\*, #) indica o início da atividade estatisticamente significativa (S) ou as diferenças estatisticamente não significativas (NS). As análises da atividade opióide foram realizadas em dois modelos clássicos de estudos para esta atividade: *Tail Flick* ou teste de retirada da cauda e o *Hot Plate* ou teste da placa quente.



**Figura 14 A.** Índice de antinociceção representado com símbolos (\*, \*\*, #) referente a atividade estatisticamente significativa (S) e ou quando não ocorre diferenças significativas (NS) do PSLEM11011 quando comparado com a salina, morfina e Leu-encefalina. Em (\*) início da atividade do PSLEM 11011,  $P < 0.001$  (S). (\*\*) PSLEM 11011 x Morfina com  $P > 0.05$  (NS). (#) leu-encefalina x PSLEM 11011,  $P > 0.05$  (NS).



**Figura 14 B.** Área abaixo da curva para o PSLEM 11011 no teste do *Tail Flick*.

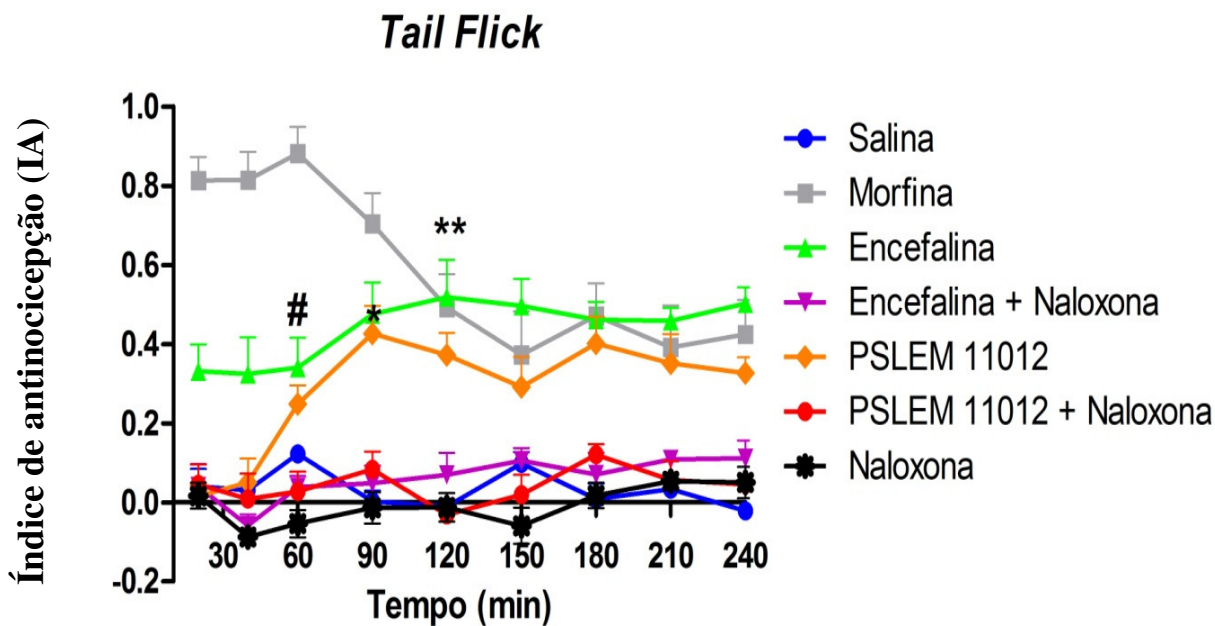
Com a realização da análise estatística, foi possível determinar em qual tempo (após a aplicação) o peptídeo começou a apresentar uma atividade antinociceptiva estatisticamente significativa e compará-la com os outros grupos, nos testes do *Tail Flick* e *Hot Plate*.

No teste do *Tail Flick* ou teste de retirada da cauda, o PSLEM 11011 iniciou sua ação, estatisticamente significativa a partir de 90 min. (\*) até 240 min. com  $P < 0.001$ , em relação a salina, grupo controle negativo. Comparando com a morfina, controle positivo, o PSLEM 11011 não exibiu diferença significativa a partir dos 90 min. (\*\*) com valores de  $P > 0.05$ . Já com a Leu-encefalina, controle positivo peptídico, não houve diferença significativa durante todo o ensaio, ou seja, o PSLEM 11011 apresentou um perfil de atividade similar ao da Leu-encefalina (#) com  $P > 0.05$ .

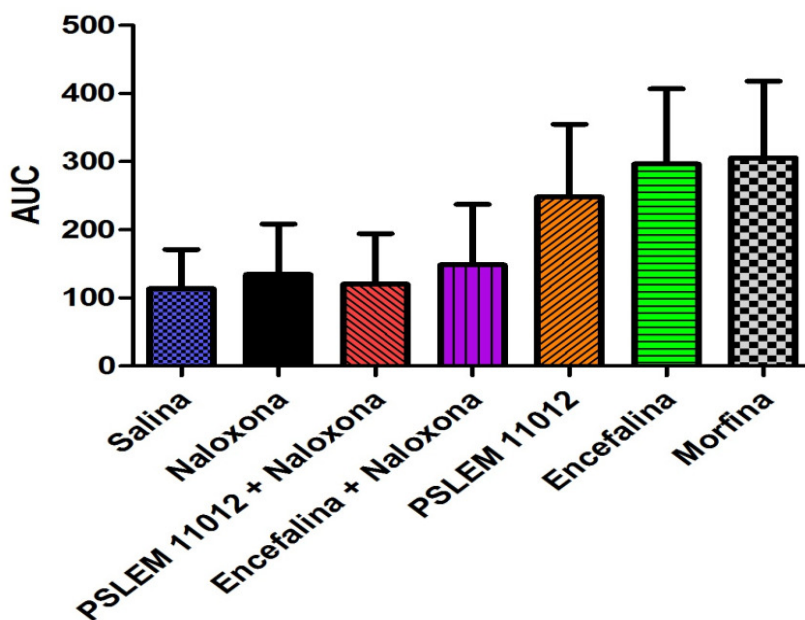
Com exceção do tempo de 30 min., houve diferenças significativas entre o PSLEM 11011 e o PSLEM 11011 + naloxona durante as 4 horas de análise, com valores de  $P < 0,001$ .

Como era esperado, não ocorreu diferenças significativas no perfil de atividade entre os seguintes grupos: salina, naloxona, PSLEM 11011 + naloxona e Leu-encefalina + naloxona.

Além da análise de variância, também foi realizada a determinação da área abaixo da curva (AUC) para cada grupo, essa análise visa obter valores para o efeito acumulado adquirido durante o ensaio. A figura 14 B mostra que o PSLEM 11011 apresentou um efeito acumulado ao longo do tempo superior aos outros grupos com exceção da Leu- encefalina o qual não apresentou diferenças estatísticas ao longo do ensaio com  $P > 0.05$  (NS).



**Figura 15 A.** Índice de antinociceção referente ao PSLEM11012 quando comparado com a salina, morfina e Leu-encefalina. Em (\*) início da atividade do PSLEM 11012,  $P < 0.001$  (S). (\*\*) PSLEM 11012 x Morfina com  $P > 0.005$  (NS). (#) leu-encefalina x PSLEM 11012,  $P > 0.05$  (NS).



**Figura 15 B.** Área abaixo da curva para o PSLEM 11012 no teste do Tail Flick.

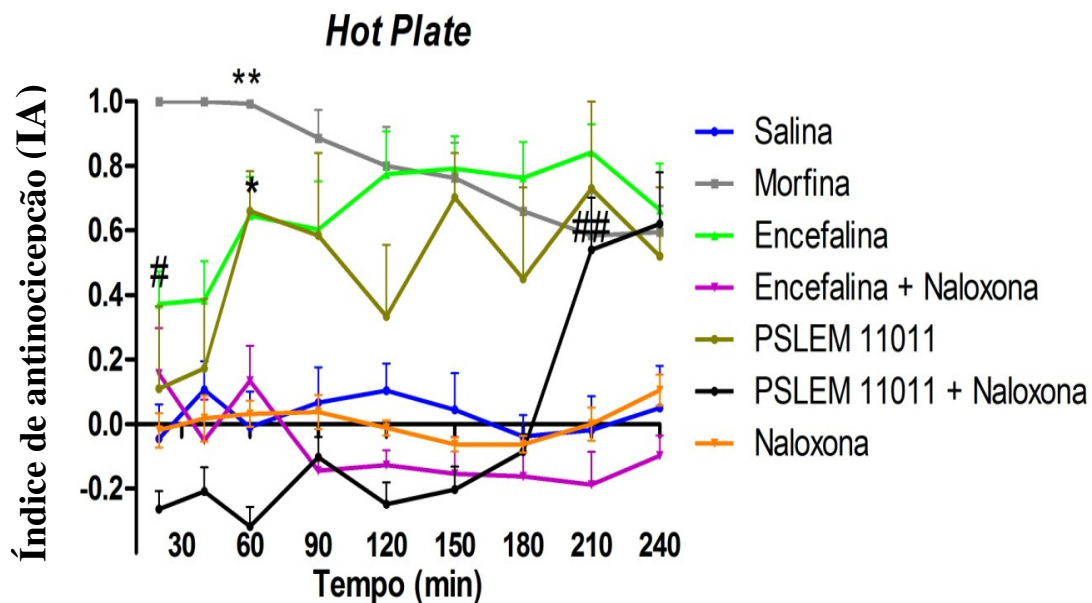
Analisando o PSLEM 11012, sua atividade foi iniciada a partir de 90 min. quando comparado com a salina (\*)  $P < 0.001$  e perdurou até o final do ensaio com exceção no tempo de 150 min. o qual não foi encontrado diferença significativa com a

salina  $P < 0.05$ . Em relação a morfina a partir no tempo de 120 min. não houve diferenças significativas ( $P > 0.005$ ) com o PSLEM 11012 até terminar o ensaio aos 240 min.

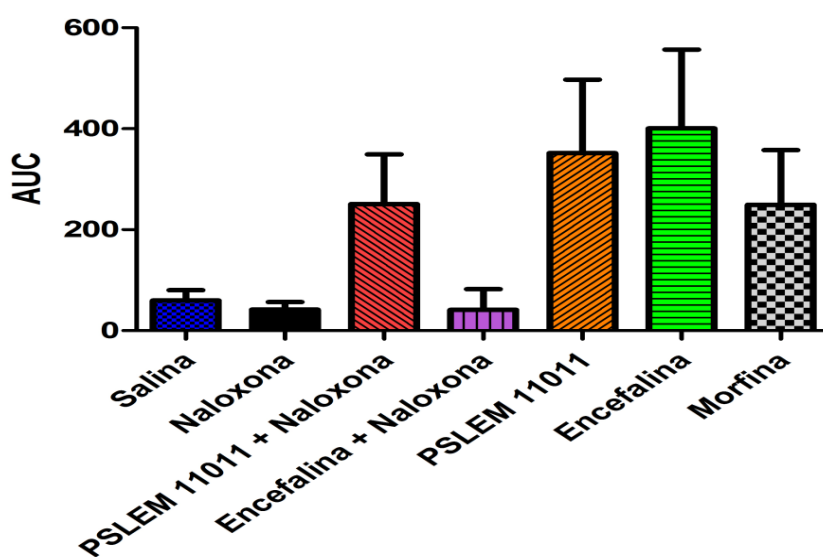
Quando comparado com a Leu-encefalina, a partir do tempo de 60 min. o PSLEM 11012 não apresentou diferenças significativas (#) com  $P > 0.05$ . Nos outros tempos (anterior aos 60 min. a diferença foi estatisticamente significativa com  $P < 0.01$ ). A partir dos 60 min. houve diferença significativa no perfil de atividade entre o PSLEM 11012 quando comparado com o PSLEM 11012 + naloxona com  $P < 0.001$  e foi mantido até 240 min.

Não ocorreram diferenças significativas no perfil de atividade entre os seguintes grupos (o que era esperado): salina, naloxona, PSLEM 11012 + naloxona e Leu-encefalina + naloxona.

Em relação a área abaixo da curva pode-se notar que o PSLEM 11012 no teste do *Tail Flick*, apresentou efeito acumulado inferior a morfina e a Leu-encefalina (ver figura 15 B).



**Figura 16 A.** Índice de antinociceção referente ao PSLEM11011 quando comparado com a salina, morfina e Leu-encefalina. Em (\*) início da atividade do PSLEM 11011,  $P < 0.01$  (S). (\*\*) PSLEM 11011 x Morfina com  $P > 0.05$  (NS). (#) leu-encefalina x PSLEM 11011,  $P > 0.05$  (NS). (##) PSLEM 11011 x PSLEM11011 + naloxona  $P > 0.05$  (NS).



**Figura 16 B.** Área abaixo da curva para o PSLEM 11011 no teste do *Hot Plate*.

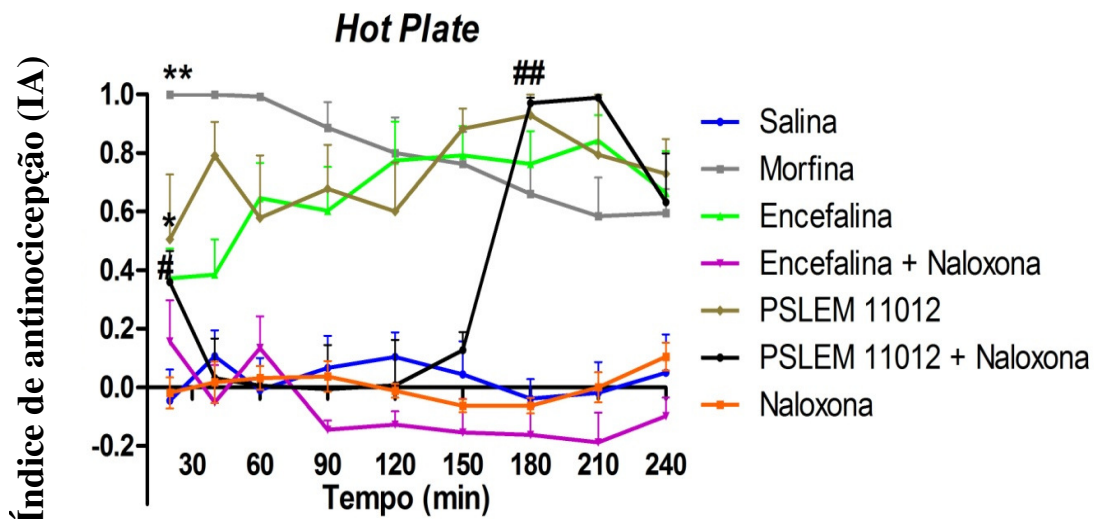
No teste do *Hot Plate* ou teste da placa quente, o PSLEM 11011 inicia sua atividade aos 60 min., pois apresenta diferenças estatisticamente significativas em relação a salina com  $P < 0.01$  (\*). Vale ressaltar que no tempo de 120 min. não ocorreu diferença significativa,  $P > 0.05$ .

Comparando o perfil de atividade do PSLEM 11011 com a morfina, no tempo de 30 min., houve diferença significativa com  $P < 0.001$ . A partir dos 60 min. não ocorre diferenças estatisticamente significativas a qual permanece até os 240 min.(\*\*) com  $P > 0.05$ . Também não existe diferenças estatisticamente significativas entre o PSLEM 11011 e a Leu-encefalina (#) com o valor de  $P > 0.05$  sendo este valor constante ao longo do teste.

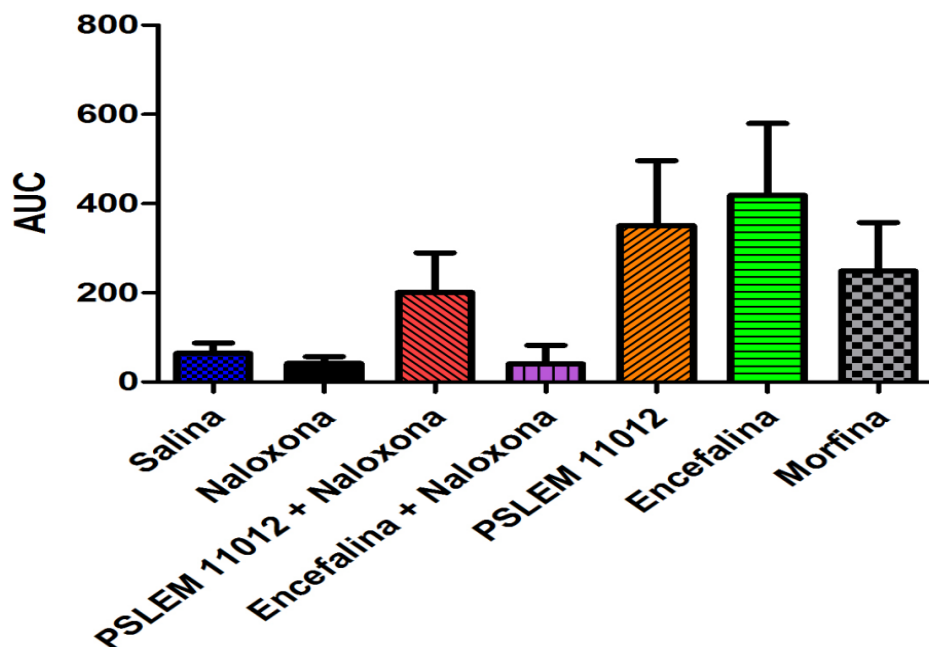
Nos ensaios com o PSLEM 11011 + naloxona quando comparado com o PSLEM 11011, não há diferenças significativas apenas nos tempos de 210 min. e 240 min. (\*\*\*)  $P > 0.05$  que são os tempos no qual o peptídeo volta a atuar, após interrupção da administração da naloxona.

Não ocorreram diferenças significativas no perfil de atividade entre os seguintes grupos (o que era esperado): salina, naloxona, PSLEM 11011 + naloxona e Leu-encefalina + naloxona.

A área abaixo da curva no *Hot Plate*, demonstra que o PSLEM 11011 exibiu um efeito acumulado superior a morfina e semelhante a Leu-encefalina, porque não houve diferença significativa (PSLEM11011 X Leu-encefalina) com valor de  $P > 0.05$  (NS) durante todo o ensaio. O PSLEM 11011 + naloxona teve um efeito acumulado maior que nos outros ensaios (*Tail Flick*) provavelmente porque o PSLEM 11011 volta a atuar após suspensão da naloxona (ver figura 16 B).



**Figura 17 A.** Índice de antinociceção referente ao PSLEM11012 quando comparado com a salina, morfina e Leu-encefalina. Em (\*) início da atividade do PSLEM 11012,  $P < 0.001$  (S). (\*\*) PSLEM 11012 x Morfina com  $P > 0.005$  (NS). (#) leu- encefalina x PSLEM 11012,  $P > 0.05$  (NS). (##) PSLEM 11012x PSLEM11012 + naloxona  $P > 0.05$  (NS).



**Figura 17 B.** Área abaixo da curva para o PSLEM 11012 no teste do *Hot Plate*.



Desde do início do ensaio o PSLEM 11012 começou a atuar, houve diferenças estatisticamente significativas, em relação a salina (\*) com  $P < 0.001$  o qual perdurou ao longo do teste.

O PSLEM 11012 quando comparado com a morfina (\*\*) e a Leu - encefalina (#), não apresentou diferenças estatisticamente significativa, com  $P > 0.05$  durante a realização de todo o ensaio.

Nos tempos de 180 min. até 240 min. não houve diferenças estatisticamente significativas entre o PSLEM 11012 + naloxona e o PLSEM 11012, (##) com  $P > 0.05$ . Os outros tempos exibiram diferenças significativas com  $P < 0.001$ .

Não ocorreram diferenças significativas no perfil de atividade entre os seguintes grupos (o que era esperado): salina, naloxona, PSLEM 11011 + naloxona e Leu-encefalina + naloxona.

O efeito acumulado do PSLEM 11012 no *Hot Plate*, também apresentou índices de área abaixo da curva (AUC) maior que a morfina e semelhante a Leu-encefalina ( $P > 0.05$ ). O ensaio com o PSLEM 11012 + naloxona também teve um aumento na (AUC) quando comparado com o *Tail Flick*, porque o PSLEM 11012 voltou a atuar apenas no *Hot Plate*. ver figura 17 B.

## 6. DISCUSSÃO

Os dois peptídeos estudados nessa dissertação foram desenhados intencionalmente para apresentar dupla atividade, ou seja peptídeos híbridos. Até o momento não foi encontrado em bancos de dados (NCBI, Expasy, PDB) sequências similares as que foram propostas, sendo então inéditas. Os peptídeos foram desenvolvidos com o intuito de apresentar atividade antinociceptiva semelhante à morfina, agindo nos receptores opióides, e a de inibidores da ECA, para o controle da pressão arterial, como o captopril. Entretanto, ainda não foi possível testar essa atividade que será realizada em colaboração com o Instituto do Coração , Incor- SP.

Foram obtidos então dois peptídeos que variam moderadamente quanto às suas propriedades físico-químicas, como massa molecular e hidrofobicidade. Essas variações físicos - químicas são devido a diferenças na estrutura primária dos peptídeos. Entre o PSLEM 11011 e o PSLEM 11012 um dos peptídeos contém resíduos de aminoácidos que possui maior volume molecular de hidrocarbonetos, o que deve favorecer uma maior hidrofobicidade e também pode ser que influencie na interação com o substrato da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Voet & Voet 2006).

Houve a ocorrência de padrões de retenção distintos nos cromatogramas obtidos para os peptídeos sintetizados, devido às diferenças na sequência dos mesmos. O PSLEM 11011 exibiu maior tempo de retenção do que o PSLEM 11012, provavelmente devido à diferença na hidrofobicidade ( Lanças, 2009).

A massa molecular foi determinada por duas técnicas de espectrometria de massa, a dessorção/ionização de matriz assistida por laser (*Maldi*) e a ionização por *eletrospray* (ESI), o que possibilitou a comparação entre a massa teórica e a massa obtida após a síntese e mostrou que as massas possuem acurácia. Também foi realizada a fragmentação, na qual foram obtidas as séries complementares y/b.

Os testes antinociceptivos mostram que os peptídeos apresentaram a atividade opióide desejada. Esses peptídeos contém resíduos de aminoácidos os quais possuem grupos farmacofóricos semelhante aos da morfina. Os grupos farmacofóricos pode ser definido como os grupos moleculares que permitem o reconhecimento pelo receptor e que são essenciais para a atividade desejada (Barreiro & Fraga, 2008).

Esses grupos farmacofóricos podem fazer as seguintes interações com receptores  $\mu$  opióides: ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interação ion - ion (Patrick, 2009). Nos primeiros resíduos de cada peptídeo temos os grupamentos que possibilitam essas interações. Com isso a interação com receptores  $\mu$  opióide é possível, pois a morfina age sobre receptores do tipo  $\mu$  e o peptídeo foi desenhado com base na farmacodinâmica da mesma. (Granier *et al.*, 2012) Assim, os peptídeos tiveram afinidade por receptores opióides e promoveram a antinocicepção. Não cabe aqui afirmar se é apenas nos receptores do tipo  $\mu$  opióide que ocorre a interação, já que não é este o objetivo do trabalho. Por este motivo não foram realizados ensaios que permitam elucidar a afinidade com outros tipos de receptores opióides.

Além da interação, outro fator importante na ação dos peptídeos é a organização da molécula no espaço tridimensional. Mesmo que este não seja um dos objetivos do trabalho, podemos afirmar que os peptídeos se organizam de forma a permitirem a classificação como agonistas. A estrutura do antagonista de receptores opióides, a naloxona, possui os mesmos grupos farmacofóricos que a morfina, mas quando interage com o receptor promove o efeito contrário, de antagonismo. Isso ocorre devido a um impedimento estérico provocado por outro grupo OH que faz com que a amina da naloxona interaja em outro sítio do receptor e não no mesmo sítio que a morfina (Goldeberg, 2010; Kane *et al.*, 2006; Patrick, 2009).

A estrutura primária dos PSLEMS na região N-terminal são semelhantes as encefalinas e endomorfina-1 e 2 que são peptídeos endógenos com afinidade maior para receptores do tipo  $\mu$  e  $\delta$  no caso das encefalinas e as endomorfina-1 com maior afinidade para receptor do tipo  $\mu$ . Elas possuem atividade antinociceptiva e estão localizadas principalmente, no mesencéfalo, *locus coeruleus*, no hipotálamo, substância gelatinosa e corno dorsal da medula espinhal. As endomorfina-1 podem ser clivadas por peptidases (exo e endopeptidases) no meio extra celular e também no meio intracelular (Fichna, *et al.*, 2007). O que sugere que após administração i.p. os peptídeos (PSLEM 11011 e 11012) também podem ser clivados antes de chegar próximo a barreira hematoencefálica ou após considerando a possibilidade deles terem atravessados.

Poucos estudos relatam a atividade desses neuropeptídeos após administração intraperitoneal em camundongos. Li e colaboradores (2001) em estudos com ratos e aplicação i.p. para a dor visceral, observaram que a endomorfina-1 apresentou atividade

antinociceptiva que também foi revertida na presença da naloxona. Outros estudos identificaram a ação sinérgica desses peptídeos nas vias descendentes inibitórias para dor, provocando a liberação de serotonina (5-HT) e noradrenalina o que sugere que as endomorfina-2 também pode liberar a Met-enkefalina para agir nos receptores delta provocando antinocicepção. (Ohsawa, *et al.* 2000; Tseng, 2002). Com base nessas informações, a possibilidade dos PSLEMs também apresentarem efeito antinociceptivo associado a outros receptores não pode ser descartada.

A via de administração dos peptídeos foi intraperitoneal e não intra cérebro ventricular (i.c.v.). A via i.c.v. permite administração do fármaco direto no cérebro sem passar pela barreira hematoencefálica (Cook *et al.*, 2009). Assim devido a administração intraperitoneal dos peptídeos, foi possível observar que os mesmos podem ter atravessado a barreira hematoencefálica, essa barreira é rica em enzimas e separa o cérebro da circulação sistêmica, sendo considerada uma barreira que impede a ação de drogas no sistema nervoso central (SNC) (Witt & Daves, 2006). Muitos trabalhos disponíveis na literatura relatam que apenas moléculas com baixa massa molecular passariam pela barreira hematoencefálica (Janecka *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2006; Shechter *et al.*, 2010). Entretanto, o PSLEM 11011 e o PSLEM 11012 com mais de 1000 Da podem ter atravessado, de acordo com o comportamento observado no teste. Novamente, não é possível afirmar de que modo ocorreu esse processo, se foram os peptídeos com os 10 resíduos ou apenas a região presente no N-terminal. Nem se houve clivagem por neuropeptidases ou especificamente pela enzima tripsina que possui isoformas no SNC (Wang *et al.*, 2008).

Os ensaios com o antagonista naloxona foram necessários para confirmar que a atividade analgésica dos peptídeos era provenientes de mecanismos opióides os quais visam o bloqueio da nocicepção, a antinocicepção.

Os resultados obtidos mostram que, na presença da naloxona, não houve atividade nos testes do *Tail Flick* e *Hot Plate* sugerindo que são peptídeos agonistas de receptores opióides. No modelo de teste da placa quente, *Hot Plate*, houve atividade após a interrupção da administração da naloxona, o que não aconteceu no teste do *Tail Flick* sugerindo que os peptídeos poderiam estar localizado nas vias modulatórias para

controle de inibição da dor (vias ascendentes e descendentes), e que na ausência do antagonista competitivo conseguiram interagir e promover a antinocicepção.

Também foram utilizados a Leu-encefalina como controle positivo, um peptídeo endógeno que atua sobre receptores opióides, e quando administrada por via i.p. conjugada com a glicose atravessa a barreira hematoencefálica por meio de difusão mediada pelo transportador para glicose (GLU-T1) (Li *et al.*, 2012; Polt *et al.*, 1994). A morfina que é considerada o controle positivo padrão para os tipos de testes realizados também foi utilizada (teste do *Tail Flick* e *Hot Plate*) (Rang & Dale, 2011; Shechter *et al.*, 2010).

Com os dados obtidos por meio dos experimentos, pode-se notar que os peptídeos apresentaram um perfil de atividade mais tardio e duradouro, o que pode ser atribuído à farmacocinética dos mesmos, a absorção pode ser que seja mais lenta quando comparada com a da morfina, devido ao tamanho da molécula. No que se refere às outras fases da farmacocinética como a distribuição, o metabolismo e a excreção estes não podem ser correlacionados, pois essas propriedades não foram avaliadas especificamente. Outro ponto relevante é o tempo de ação prolongado que pode ser devido à biodisponibilidade que os peptídeos apresentaram durante o ensaio, a qual pode constituir-se em uma das maiores adversidades na utilização de peptídeos para o desenvolvimento de possíveis candidatos a fármacos. (Liskamp *et al.*, 2011; Mason, 2010; Sato *et al.*, 2006).

A partir das análises estatísticas realizadas com o programa *Graphpad prism* foi possível confirmar a atividade antinociceptiva dos peptídeos. A análise de variância entre os grupos controles e experimentais e o tempo, mostrou que a atividade foi estatisticamente significativa quando comparada com a da solução salina. O PSLEM 11011 apresentou um perfil de atividade mais tardio e duradouro, semelhante a Leu-encefalina em ambos os testes. O PSLEM 11012 também apresentou semelhança no perfil de atividade com a Leu-encefalina, e no teste do *Hot Plate* também não ocorreu diferenças estatisticamente significativa entre a atividade dele e a morfina desde do início dos testes até os 240 min. O nível de significância determinado nos testes foi de 0.05 ( $P < 0.05$ ).

A área abaixo da curva, que integra os pontos dos gráficos e mostra o efeito cumulativo de cada grupo durante o ensaio, mostra que o PSLEM 11011 no teste do

*Tail Flick* apresentou índices maiores do que os da morfina e semelhante aos da Leu-encefalina. Já o PSLEM 11012 apresentou índices inferiores aos controles positivos no *Tail Flick*. No teste do *Hot Plate* tanto o PSLEM 11011 quanto o PSLEM11012 apresentaram índices de área abaixo da curva, superiores à morfina e semelhantes a Leu-encefalina.

Os peptídeos propostos apresentaram atividade antinociceptiva nos dois modelos de testes utilizados, é provável que sejam capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e possuem tempo de atividade prolongada.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou o desenho e a caracterização de peptídeos os quais apresentam sequências inéditas e que possam desempenhar dupla atividade em alvos biológicos distintos. Até o momento foi realizada parte das análises das atividades propostas.

Foi possível avaliar a atividade antinociceptiva dos dois decapeptídeos desenhados, ambos exibiram perfis de atividade farmacológica *in vivo*, os quais podem ser denominados de agonistas de receptores opióides, pois provocaram a antinocicepção em camundongos quando expostos ao estímulo térmico. Na presença da naloxona não houve atividade, por isso pode-se afirmar que os peptídeos tem como alvo molecular receptores opióides.

Diversas dificuldades descritas na literatura sobre o uso de peptídeos como possíveis candidatos a fármacos foram superadas neste trabalho. Tanto o PSLEM 11011 como o PSLEM 11012, são moléculas com tamanhos superiores a 1000 Da consideradas grandes pela literatura para agir no sistema nervoso central (SNC) e os peptídeos podem ter atravessado a barreira hematoencefálica (BHE), eles também mostraram ter um tempo de ação prolongado em relação a morfina.

A partir das análises realizadas e dos argumentos relatados ao longo desse estudo pode-se afirmar que os peptídeos sintetizados para atividade antinociceptiva são promissores para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos utilizando peptídeos. Assim, é interessante continuar caracterizando essas atividades como também iniciar o desenvolvimento de novos peptídeos sintéticos que possam atuar em alvos moleculares e exercer sua atividade biológica *in vivo*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya, K. R. *et al.* Ace revised: a new target for structure - based drug design. *Nature, drug discovery.* vol. 2, p. 891-902, 2003.
- Andersen, M.R. *et al.* Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nature, drug discovery.* vol. 10, p. 579-590, 2011.
- Antosova, Z. *et al.* Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever?. *Cell, trends in biotechnology.* vol.27, n.11, p. 628-635, 2009.
- Arrowsmith, J.A decade of change. *Nature, drug discovery.* vol. 11, p. 17-18, 2012.
- Barreiro, E.J. & Fraga, C.A.M. Química medicinal as bases moleculares da ação dos fármacos. 2ed. Artmed, Porto Alegre, 2008, p.178-187.
- Basbaum, A.L., Scherrer. G., Bautista, D.M. & Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.* vol. 139, n.2 ,p.267-284, 2009.
- Berge, O.G. Predictive validity of behavioural animal models for chronic pain. *British journal of pharmacology.* n. 164, p.1195–1206, 2011.
- Boelsma, E. & Kloek, J. IPP- rich milk protein hydrolysate lowers blood pressure in subjects with stage 1 hypertension a randomizes controlled trial. *Nutrition journal.*vol. 9, p. 1 – 7, 2010.
- Brand, G. D. *et al.* Probing protein sequences as sources for encrypted antimicrobial peptides. *Plos one.* vol. 7, p. 1-14, 2012.
- Brand, G. D. *et al.* Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. *Journal of biological chemistry.* vol. 277, n. 51, p. 49332-49340, 2002.
- Bruehl, S. *et al.* Prevalence of clinical hypertension in patients with chronic pain compared to nonpain general medical patients. *Clinical journal of pain.* vol. 21, n. 2, p. 147-153, 2005.
- Camargo, C. M. *et al.* Bradykinin – potentiating peptides: beyond captopril. *Toxicon.* vol. 59. p. 516 – 523, 2012.
- Cavanaugh, D.N. *et al.* Restriction of TRPV1 to the peptidergic subset of primary afferent neurons follows its developmental downregulation in nonpeptidergic neurons. *Journal of neuroscience.* vol. 31, n. 28, p. 10119-10127, 2011.
- Chain, W.C & White, P.D. Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach. *The practical approach series.* Oxford, chapter 1-9 p. 1 218, 2000.
- COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Disponível em <http://www.cobea.org.br/>. Acessado em janeiro de 2013.



- Cook, A.M. *et al.* Intracerebro ventricular administration of drugs. *Pharmacotherapy*. vol. 29, p. 832-845, 2009.
- Cotton, J. *et al.* Selective inhibition of the C-domain of angiotensin I converting enzyme by bradykinin potentiating peptides. *Biochemistry*. vol. 41, n. 19, p. 6065 – 6071, 2002.
- Dietis, N., Rowbotham, D.J. & Lambert, D.G. Opioid receptor subtypes: fact or artifact?. *British journal of anaesthesia*. vol. 107, n. 7, p. 8-18, 2011.
- Domon, B. & Aebersold, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, vol. 312, p. 212-217, 2006.
- Du, C. & Xie, X. G protein- coupled receptors as therapeutic targets for multiple sclerosis. *Cell*. vol.22, p. 1108-1128, 2012.
- Durántez, E.R. *et al.* Attenuation of acute and chronic effects of morphine by the imidazoline receptor ligand 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline in rat locus coeruleus neurons. *British journal of pharmacology*. vol 138, p. 494-500, 2003.
- Dworkin, R.H. & Turk, D.C. Accelerating the development of improved analgesic treatments: the action public–private partnership. *Pain Medicine*. vol. 12, p. 109-117, 2011.
- Fatakia, S.N., Costanzi, S. & Chow, C.C. Molecular evolution of the transmembrane domains of G protein- coupled receptors. *Plos one*. vol.6, n.11, p. 1-12, 2011.
- Fichna, *et al.* The endomorphin system and its evolvin neurophysiological role. *Pharmacological reviews*. vol. 59, n.1, p. 88-123, 2007.
- Fjell, C. D. *et al.* Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature, drug discovery*. vol. 11, p. 37- 51, 2012.
- Giménez, P.R. *et al.* Novel antihypertensive hexa and heptapeptides with ACE-inhibiting properties: from the in vitro ACE assay to the spontaneously hypertensive rat. *Peptides*. n. 32, p. 1431-1438, 2011.
- Gold, M. & Gebhart, G.F. Nociceptor sensitization in pain. *Nature, medicine*. vol. 16, n. 11, p.1248-1257, 2010.
- Goldberg, J.S. Low molecular weight opioid peptide esters could be developed as a new class of analgesics. *Perspect. medicin. chem.* n. 5, p. 19-26, 2011.
- Goldberg J.S. Stereochemical basis for a unified structure activity theory of aromatic and theory of aromatic and heterocyclic rings in selected opioids and opioid peptides. *Perspect. medicin. chem.*, n. 4, p. 1-10, 2010.
- Goolcharran , C. & Borchardt, R.T. Kinetics of diketopiperazine formation using model peptides. *Journal of pharmaceutical sciences*. vol.87, No. 3, p. 283-287, 1998.

Gorzo, A.B. *et al.* Increased morphine analgesia and reduced side effects in mice lacking the *tac1* gene. *British journal of pharmacology*. vol. 160, p. 1443-1452, 2010.

Hachmann, J. & Lebl, M. Alternative to piperidine in fmoc solid-phase synthesis. *J. Comb. Chem.* vol. 8, p. 149, 2006.

Hanlon, K.E. *et al.* Novel peptide ligands with dual acting pharmacophores designed for the pathophysiology of neuropathic pain. *Brain research*. vol. 1395, p. 1-11, 2011.

Hao, S. *et al.* The Role of *ttna* in the periaqueductal gray during naloxone-precipitated morphine withdrawal in rats. *Nature, neuropsychopharmacology*. vol. 36, p. 664-676, 2011.

Hong, J. Natural product diversity and its role in chemical biology and drug discovery. *Current Opinion Chemistry Biol.*, vol. 15, p. 350-354, 2012.

Hopikins, A.L. & Groom, C.R. The druggable genome. *Nature, drug discovery*. vol. 1, p. 727-730, 2002.

Howl, J. Peptide synthesis and applications. 1ed. Humana press, New Jersey, USA, vol.298, p. 18, 2005.

Hunt, S.P. & Mantyh, P.W. The molecular dynamics of pain control. *Nature, neuroscience*. vol. 2, p. 83-91, 2001.

IASP - International Association For The Study of Pain. Disponível em <http://www.iasp-pain.org>. Acessado em dezembro de 2012.

Ibegbu, A.O. *et al.* The roles of opioid receptors and agonists in health and disease conditions. *Br.J. pharmacol.toxicol*. vol. 2. p. 84 – 91, 2011.

Janecka, A. *et al.* Development of opioid peptide analogs for pain relief. *Current pharmaceutical design*. vol. 16, p. 1126 – 1135, 2010.

Julius, D. & Basbaum, A.L. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. vol. 413, p. 203-210, 2001.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessell, T.M. Principles of neural science. 4 ed. McGraw-hill companies, United States of America, 2000, p. 473.

Kane, B.E., Svensson, B. & Ferguson, D.M. Molecular recognition of opioid receptor ligands. *Journal of the american association of pharmaceutical scientists*. vol. 8, n.15, p. 126-137, 2006.

Katritch, V., Cherezov, V. & Stevens, R.C. Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Cell*. vol.33, n.1, p. 17-27, 2012.

Klein, S.L. *et al.* More than a pain in the neck: how discussing chronic pain affects hypertension medication intensification. *Journal of general internal medicine*. n. 24(8), p. 911-916, 2009.

- Lamberts, J. T. *et al.* Mu opioid receptor coupling to  $G\alpha_0$  plays an important role in opioid antinociception. *Nature, neuropsychopharmacology*. vol. 26, p.2041-2053, 2011.
- Lanças, F.M. *Cromatografia líquida moderna*. 1ed. Átomo, São Paulo, 2009, p. 202-203.
- Law, P.Y. & Loh, H. H. Opioid receptors. *Encyclopedia of biological chemistry*. vol.3, p. 167-171, 2004.
- Le Bars, D. *et al.* Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev.* n. 53, p. 597-652, 2001.
- Leite, J.R.S.A. *et al.* Phylloseptins: a novel class of anti-bacterial and anti-protozoan peptides from the *Phyllomedusa* genus. *Peptides*. n. 26, p.565–573, 2005.
- Li, J. W. H. & Vederas, J.C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. *Science*, n. 325, p. 161- 165, 2009.
- Li, J. X., Zhang, Y. & Winter, J.C. Morphine-induced antinociception in the rat: Supra-additive interactions with imidazoline I2 receptor ligands. *European journal of pharmacology*. n.669, p. 59–65, 2011.
- Li, Z. H. *et al.* Analgesic effect of endomorphin-1. *Acta pharmacol sin.* vol. 22, p.976-980, 2001.
- Li, Y. *et al.* Opioid glycopeptide analgesics derived from endogenous enkephalins and endorphins. *Future Med Chem*. vol. 4, p. 205–226, 2012.
- Liskamp, R.M.J. *et al.* Peptides and proteins as a continuing exciting source of inspiration for peptidomimetics. *Journal of chemistry and biology, chembiochem*. vol. 12, p. 1626-1653, 2011.
- Llobet, A.I., Alvarez, M. & Albericio, F. Amino acid-protecting groups. *Chemical Reviews*. vol. 109, n. 06, p A-AW, 2009.
- Lumpkin, E.A. & Caterina, M. J. Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*. vol. 444, p. 858-865, 2007.
- Machado, A. *et al.* Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 5, p. 781-789, 2004.
- Manglik, A. *et al.* Crystal structure of the  $\mu$ - opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*. vol. 485, p.321- 327, 2012.
- Martin, J.F.V. *et al.* Hypertensive crisis: clinical – epidemiological profile. *Nature, hypertension research*. n. 34, p. 367-371, 2011.
- Mason, J.M. Design and development of peptides and peptide mimetics as antagonists for therapeutic intervention. *Future Med. Chem.* n. 2, p. 1813-1822, 2010.

Menezes, C.M. *et al.* Disintegrin-like/cysteine-rich domains of the reprotolysin HF3: Site-directed mutagenesis reveals essential role of specific residues. *Biochimie*. vol. 93, p. 345-351, 2011.

Mergler, M. & Durieux, J.P. The Bachem practice of SPPS tips and tricks from the experts at Bachem. Bachem publication disponível em [http://www.bachem.com/service-support/technical-library/catalogs\\_brochures/#top](http://www.bachem.com/service-support/technical-library/catalogs_brochures/#top) , p.1-83, 2005.

Meunier, J.C. *et al.* Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL receptor. *Nature*. vol. 377, p. 532- 535, 1995.

Montesinos, E. Antimicrobial peptides and plant disease control. *Fems microbial lett.* n. 270. p. 1 -11, 2007.

Moreira, K. G. *et al.* Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurusfrontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. *Toxicon*. n. 56, p. 55-63, 2010.

Morón, J. A. *et al.* Modulation of opiate related signaling molecules in morphine dependent conditioned behavior: conditioned place preference to morphine induces CREB phosphorylation. *Nature, neuropsychopharmacology*. vol.35, p. 955-966, 2010.

Muñoz, M.R. *et al.* The Mu- opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: implications in pain control. *Nature neuropsychopharmacology*. vol.37, p. 338-349, 2012.

Nestler, E.J. & Aghajanian, G.K. Molecular and cellular basis of addiction. *Science*. vol. 278, n. 58, p. 58-63, 1997.

Neumann, H. & Staubitz, P.T. Synthetic biology approaches in drug discovery and pharmaceutical biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*. n. 87, p. 75-86, 2010.

Novabiochem. Fmoc resin cleavage and desprotection. Webbrochure, disponível em [www.novabiochem.com](http://www.novabiochem.com) ,p.2, 2007.

Ohsawa, M. *et al.* Differential mechanisms mediating descending pain controls for antinociception induced by supraspinally administered endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. vol. 294, n. 3, p. 1106-1111, 2000.

Olsen, R.B. *et al.* Hypertension prevalence and diminished blood pressure related hypoalgesia in individuals reporting chronic pain in a general population: The Tromsø Study. *Pain*. vol. 154, p. 257-262, 2013.

Ossipov, M.H., Dussor, G.O. & Porreca, F. Central modulation of pain. *Journal of clinical investigation*. vol.120, n. 11, p 3779-3787, 2010.

Patrick, G.L. An introduction to medicinal chemistry. 4ed. Oxford university press, Oxford, Inglaterra, 2009, p. 634-638.

Perl, E.R. Ideas about pain, a historical view. *Nature, neuroscience*. vol. 8, p. 71- 80, 2007.

Polt, R. *et al.* Glycopeptide enkephalin analogues produce analgesia in mice: evidence for penetration of the blood-brain barrier. *Proc.Natl.acad. Sci. USA*. vol. 91, p. 7114-7118,1994.

Rajendran, L. *et al.* Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nature, drug discovery*. vol. 9, 2010.

Rang, H.P. & Dale, M.M. *Rang & Dale farmacologia*. 7 ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2012, p. 503- 507.

Sato, A.K. *et al.* Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Current Opinion in Biotechnology*. n. 17, p. 638–642, 2006.

SBED - Sociedade Brasileira para o estudo da dor. Disponível em [www.dor.org.br](http://www.dor.org.br) Acessado em janeiro de 2013.

Schechter, Y. *et al.* Delivery of neuropeptides from the periphery to the brain: studies with enkephalin. *American chemistry society (ACS) chemical neuroscience*, vol. 1, p. 399-406, 2010.

Scherrer, G. *et al.* Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell*. vol. 137, p. 1148-1159, 2009.

Schutting, R.D. *et al.* Erasure of spinal memory trace of pain by a brief, high-dose opioid administration. *Science*. vol. 335, p. 235-238, 2012.

Snyder, S.H. & Pasternak, G.W. Historical review: opioid receptors. *Trends in pharmacological sciences*. vol.24, n.4, p. 198- 205, 2003.

Stein, C. & Lang, L.J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Current opinion in pharmacology*. n.9 , p. 3-8, 2009.

Stein, C. *et al.* Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain research reviews*. vol. 60, p. 90- 113, 2009.

Stein, C. *et al.* Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nature, medicine*. vol. 9. n. 8. p. 1003 – 1008, 2003.

Stevenson, C.L. Advances in peptide pharmaceuticals. *Current Pharmaceutical Biotechnology*.vol. 10, n. 1, p. 122-137, 2009.

Swift, R.M & Lewis, D. C. in Golan D.E. *et al.* *Principio de farmacologia a base fisiopatológica da farmacoterapia*. 2ed.Guanabara koogan, Brasil, 2009, p. 260-278.

Thompson, A.A. *et al.* Structure of the nociceptin/ orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature*. vol. 485, p. 395- 399, 2012.

Todd, A.J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature*. vol.11, p. 823-836, 2010.

Traynor, J.  $\mu$ -opioid receptors and regulation of G protein signaling (RGS) proteins: from a symposium on new concepts in mu opioid pharmacology. *Drug and alcohol dependence*. vol. 121, p. 173-180, 2012.

Tseng, L.F. Recent advances in the search for the  $\delta$ -opioidergic system the antinociceptive properties of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *Jpn. J. Pharmacol.* vol. 89, p. 216-220, 2002.

Vanderah, T.W. Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain. *Clinical journal of pain*. vol. 26, n.1, p. 10-15, 2009.

Vlieghe, P.*et al.* Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug discovery today*. vol.15, n 1/2.p. 40-56, 2010.

Voet, D. & Voet, J.G. *Bioquímica*. 3 ed. Artmed, Porto Alegre, 2006, p. 66-78.

Zaslouff, M., Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. vol. 415., p. 389 – 395, 2002.

Wang, Y., Luo, w. & Reiser, G. Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. *Cell mol life science*. vol. 65, p. 237-252, 2008.

Whalen, E.J. , Rajagopal, S. & Lefkowitz, R.J. Therapeutic potential of  $\beta$ - arrestin and G protein biased agonists. *Cell*. vol.17 , n.3, p. 126-139, 2011.

Witt, K. A. & Davis, T.P. CNS drug delivery: Opioid peptides and the blood-brain barrier. *Journal of the american association of pharmaceutical scientists*. vol. 8, n.9, p. 76-88, 2006.

Woodcock, J., Witter, J. & Dionne, R.A. Stimulating the development of mechanism based, individualized pain therapies. *Nature, drug discovery*. vol. 6, p. 703-710, 2007.

Wu, H. *et al.* Structure of the human  $\kappa$  - opioid receptor in complex with JDtic. *Nature*. vol. 000, p. 1-8, 2012.

## ANEXO



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 08 de janeiro de 2013.



### DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS FARMACOLÓGICOS IN VITRO, IN SITU E IN VIVO DE COMPOSTOS BIOATIVOS LIVRES OU ENCAPSULADOS EM NANOSSISTEMAS DE LIBERAÇÃO SUSTENTADA."**, UnBDOC n.º 131758/2012, sob responsabilidade do pesquisador Luciano Paulino da Silva foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.





Prof. Fernando Pacheco Rodrigues  
Vice-Coordenador da CEUA