



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Programa de Pós Graduação em Biologia Animal

**Análise de arquétipos estruturais de desintegrinas para
o desenvolvimento de moléculas inibidoras da
agregação plaquetária**

Luisa Mayumi Arake de Tacca

Dissertação de Mestrado

Orientador: Carlos Bloch Jr.



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Programa de Pós Graduação em Biologia Animal

**Análise de arquétipos estruturais de desintegrinas para
o desenvolvimento de moléculas inibidoras da
agregação plaquetária**

Luisa Mayumi Arake de Tacca

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Biologia Animal

Orientador: Carlos Bloch Jr.

Área de Concentração: Toxinologia

Estude bastante o que mais lhe interessa da forma mais indisciplinada,

irreverente e original possível.

Richard Feynman

Dedico esse trabalho ao meu marido
e ao meu filho que, mesmo antes de nascer,
já faz parte de toda essa bioquímica da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu desorientador Carlos Bloch Jr.

Agradeço aos colegas do laboratório.

Agradeço ao colaborador e amigo Guilherme Dotto Brand.

Agradeço ao colaborador Joseph Aslan, da Universidade do Rio de Janeiro.

Agradeço à banca.

Agradeço ao fiel amigo, de experimentos e jornadas, Diego Arantes Pires.

Agradeço aos meus amigos.

Agradeço à minha família de doidos amados, pais e irmão.

Agradeço ao CNPq, pela bolsa.

Agradeço à Biologia Animal.

Agradeço ao meu marido.

Agradeço ao meu filho.

Agradeço aos meus próprios ideais.

Obrigada.

RESUMO

Os anfíbios anuros são animais que vêm sendo estudados e utilizados como modelos para descoberta de novas moléculas há algum tempo. Sua pele secreta uma mistura de substâncias ativas em grande parte já isoladas e estruturalmente caracterizadas. Dentre tais compostos, podemos citar peptídeos antimicrobianos, hipotensores e opióides, aminas biogênicas, alcaloides e esteróis.

O trabalho em questão analisou um peptídeo oriundo da secreção cutânea do anfíbio *Hypsiboas punctatus*. Tal peptídeo apresenta uma sequência de 15 resíduos de aminoácidos e um motivo ativo composto pelo tripeptídeo KGD característico das proteínas da família das desintegrinas, até o momento inédito em anfíbios.

O peptídeo em questão foi modificado em mais cinco análogos e sintetizado por meio de síntese química sólida. As moléculas foram purificadas, caracterizadas e testadas e, ao final do processo, tiveram os modelos das suas estruturas tridimensionais determinados por meio de Ressonância Magnética Nuclear.

A sequência peptídica original foi modificada para gerar cinco análogos sintéticos obtidos por meio de síntese química em fase sólida. Todos os análogos foram submetidos à oxidação do par de resíduos de cisteína para formação das respectivas pontes dissulfeto, purificados, caracterizados e testados. Ao final deste processo, tiveram suas respectivas estruturas tridimensionais determinadas por meio de Ressonância Magnética Nuclear.

O peptídeo natural não apresentou qualquer atividade anti- plaquetária *in vitro* quando testado por meio da metodologia de impedância elétrica, no entanto é possível atribuir-se a esta molécula discreta atividade relativa de inibição de agregação em

ensaios de espalhamento plaquetário. Contudo, quando avaliados comparativamente sob mesma metodologia, os análogos sintéticos demonstram atividade anti-plaquetária significativamente superior ao peptídeo natural, utilizado neste trabalho como um arquétipo estrutural de desintegrina. Tais evidências, isto é, a comprovação experimental do surgimento de uma nova atividade biológica em análogos sintéticos, originalmente inexistente na molécula arquetípica, corrobora nossa hipótese sobre a importância da redistribuição das cargas (positiva e negativa) ao longo do eixo maior da estrutura 3D de cada análogo e da necessidade de um reposicionamento “Taylor-Made” dos motivos (Arg-Gly-Asp; Lys-Gly-Asp; His-Gly-Asp) para que as novas moléculas fossem ativas.

ABSTRACT

Anurans are animals that have been much explored as models. Their skin is part of their immune system and it has special glands which secrete a rich mixture of substances related to their innate defense against predators and microorganisms. Among this molecules are active peptides which have been isolated and tested for many pathogens and are a growing field within pharmacology.

The present work analyzed a specific peptide from the skin secretion of the amphibian *Hypsiboas punctatus*. It is formed by a 15 amino acid sequence with a KGD disintegrin-like motif in the center of a loop constricted by a disulfide bridge. This motif has never been registered for amphibians before.

The natural peptide was modified into five analogues which were synthesized through solid phase tButyl/FMOC strategy. They were purified (Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography), characterized (Mass Spectrometry), had their biological activity tested and their 3D structures calculated with the use of Nuclear Magnetic Resonance.

The natural peptide did not show any anti-platelet inhibition activity when tested through electric impedance methodology; however it did show relative biological activity when tested through platelet spreading assay methodology. The modified analogues showed a higher activity rate. The results indicate the verification of the hypothesis of the importance of an improved positioning of the positive and negative charges along the molecule structure and also of the need for the ligand section of the peptide to be centered in the active loop.

Índice

Lista de Abreviaturas e Acrônimos	III
Lista de Figuras	IV
Lista de Tabelas	V

1. Introdução		
1.1	Similaridade entre os seres vivos	1
1.2	Peptídeo natural da biblioteca de expressão	7
1.3	<i>Hypsiboas punctatus</i>	11
1.4	Desintegrinas	13
1.5	Desenho de moléculas ativas com base em produtos naturais	17
2. Objetivos		
2.1	Objetivos Gerais	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3. Justificativa		21
4. Metodologia		
4.1	Seleção das Moléculas a serem sintetizadas	22
4.2	Síntese Química dos peptídeos	23
4.3	Purificação	27
4.4	Oxidação dos peptídeos sintéticos	29
4.5	Ensaio Biológicos	30
4.6	Caracterização	34
4.7	Elucidação das Estruturas por RMN	35
5. Resultados e Discussão		
5.1	Identificação de Peptídeo	39
5.2	Caracterização e Purificação dos Peptídeos	42
5.3	Experimento de Inibição de Agregação Plaquetária	57
5.4	Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear	64
5.5	Rearranjo da estrutura primária dos peptídeos	68
5.6	Caracterização e Purificação dos Peptídeos rearranjados	69
5.7	Experimento de Inibição de Agregação Plaquetária por impedância	79
5.8	Experimento de Inibição de agregação plaquetária por espalhamento	81
6. Conclusão		95
Referências Bibliográficas		96

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

ACN – Acetonitrila

L-BApNA – N- benzoil-L-arginil p-nitroanilida

BPTI – *Bovine pancreatic trypsin inhibitor* -Inibidor de tripsina de pâncreas bovino

Boc – terc-butiloxicarbonila

cDNA – *Complementary DNA* – DNA complementar

DIPEA – N,N-Diisopropiletilamina

DMF – N,N-Dimetilformamida

ESI – *Eletrospray Ionization* – Ionização por eletrospray

EDT – 1,2-etanoditiol

FID – *Free Induction Decay* -Decaimento livre de indução

Fmoc – Fluorenilmetiloxicarbonil

HBTU-[*benzotriazol-1-yloxy(dimethylamino)methylidene*]-dimethylazanium
hexafluorophosphate

HMQC – *Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation* –Correlação heteronuclear de múltiplo quantum

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* - Cromatografia líquida de alta eficiência

HSQC – *Heteronuclear Single-Quantum Correlation* – Correlação Heteronuclear de quantum unitário

LEM – Laboratório de Espectrometria de Massa

MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* – Dessorção e ionização a laser assistida por matriz

MS – *Mass Spectrometry* - Espectrometria de Massa

MS/MS – Espectro de Fragmentação

NOE – *Nuclear Overhauser Effect* - Efeito de Overhauser Nuclear

NOESY – *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* – Espectroscopia de efeito overhauser nuclear

Pbf – 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonila

PSLEM- Peptídeo Sintético do Laboratório de Espectrometria de Massa.

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMN 1D – Ressonância Magnética Nuclear em uma dimensão

RMN 2D – Ressonância Magnética Nuclear em duas dimensões

RMSD – *Root of Mean Square Deviation* - Raiz Quadrada da média do quadrado dos desvios.

ROE – *Rotating Frame Overhauser Effect*

ROESY – *Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy*

TFA – *Trifluoroacetic Acid* - Ácido Trifluoroacético

TIS – Triisopropilsilano

TOCSY – *Total Correlated Spectroscopy* – Espectroscopia de correlação total

TOF – *Time-of-flight* – Tempo de voo

Trt – tritil

IM – *Ion Mobility* - Mobilidade Iônica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representando a tradução da informação genética em aminoácidos que, juntos, dão origem às proteínas.

Figura 2. Alinhamento de sequências primárias de abaecinas.

Figura 3. Cartograma ilustrando a diversidade global de anfíbios por país. A escala mostrada no canto esquerdo inferior diz respeito ao número de espécies em cada região.

Figura 4. Esquema representando um corte histológico da pele de um anfíbio.

Figura 5. Imagens do anfíbio *Hypsiboas punctatus*.

Figura 6. Distribuição geográfica e fotografia do anfíbio *Hypsiboas punctatus*.

Figura 7. Espécie de víbora da qual foi isolada a primeira desintegrina (*T. gramineus*) (fotografia de Vinayak Puranik) e uma imagem de desintegrina e de uma proteína ADAM.

Figura 8. Alinhamento de aminoácidos de desintegrinas.

Figura 9. Estrutura tridimensional da disintegrina salmosina evidenciando a alça flexível, a qual comporta o motivo tripeptídico RGD.

Figura 10. Estrutura de RMN em solução de vhr1. O primeiro ciclotídeo extraído de tecido de raíz.

Figura 11. Esquema simplificado da síntese em fase sólida realizada para os peptídeos de interesse.

Figura 12. Esquema representando o processo de síntese do peptídeo na íntegra.

Figura 13. Alinhamento da sequência da biblioteca de cDNA que codifica os respectivos aminoácidos.

Figura 14. Espectro de Massa referente ao peptídeo PSLEM 1002, KGD, logo após a síntese.

Figura 15. Espectro de massa de MS/MS correspondente à fragmentação do íon precursor referente ao peptídeo PSLEM 1002, KGD de $[M+H]^+ = 1669,578$ Da.

Figura 16. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente ao peptídeo PSLEM 1002, KGD obtido após a síntese.

Figura 17. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente ao peptídeo PSLEM 1002, KGD, após a purificação semipreparativa com uma coluna (C₁₈).

Figura 18. Espectro de Massa evidenciando o íon desejado após a purificação juntamente com a sua distribuição monoisotópica

Figura 19. Análise da mobilidade iônica do peptídeo PSLEM 1002.

Figura 20. Espectro de Massa referente ao peptídeo PSLEM 1018, RGD, logo após a síntese.

Figura 21. Espectro de Massa referente ao peptídeo PSLEM 1019, HGD, logo após a síntese.

Figura 22. Espectro de massa de MS/MS referente à fragmentação o íon precursor $[M+H]^+ = 1698,0$ Da correspondente ao peptídeo PSLEM 1018, RGD.

Figura 23. Espectro de massa de MS/MS do peptídeo PSLEM 1019, HGD.

Figura 24. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente ao peptídeo PSLEM 1018, RGD obtido após a síntese com a utilização de uma coluna semipreparativa (C₁₈).

Figura 25. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente ao peptídeo PSLEM 1019, HGD obtido após a síntese com a utilização de uma coluna semipreparativa (C₁₈).

Figura 26 Cromatograma de HPLC de fase reversa referente ao peptídeo PSLEM 1018, RGD, após a purificação semipreparativa com coluna (C₁₈).

Figura 27. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente ao peptídeo PSLEM 1019, HGD, após a purificação semipreparativa (C₁₈).

Figura 28. Espectro de massa referente ao peptídeo PSLEM 1018, RGD. Evidenciando a distribuição monoisotópica e a pureza do peptídeo.

Figura 29. Espectro de massa referente ao peptídeo PSLEM 1019, HGD, mostrando a distribuição monoisotópica e a pureza da forma oxidada desejada.

Figura 30. Figura ilustrando o controle negativo, no qual só há a presença de agregantes.

Figura 31. Figura ilustrando o controle positivo no qual há a presença do agente inibidor ácido acetilsalicílico, agente inibidor.

Figura 32. Figura ilustrando a medição de agregação plaquetária na presença do peptídeo PSLEM 1002/KGD.

Figura 33. Figura ilustrando a medição de agregação plaquetária na presença do peptídeo PSLEM 1018/RGD.

Figura 34. Espectro de Massa MS/MS do peptídeo controle retirado da literatura evidenciando a fragmentação referente ao íon precursor de $[M+H]^+=738,296$ Da.

Figura 35. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente a cromatografia semipreparativa (coluna C₁₈) do peptídeo controle retirado da literatura.

Figura 36. Figura ilustrando a medição de agregação plaquetária na presença do peptídeo PSLEM 1053/CONTROLE.

Figura 37. Plaquetas humanas lavadas e testadas contra os peptídeos de interesse pelo método de espalhamento plaquetário.

Figura 38. Estrutura tridimensional dos peptídeos KGD (A), RGD (B) e HGD (C) de cadeia longa (PSLEM 1002, PSLEM 1018 e PSLEM 1019) determinadas por Ressonância Magnética Nuclear

Figura 39. Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor do peptídeo desejado na sua forma oxidada.

Figura 40. Cromatograma de HPLC de fase reversa com a utilização de uma coluna semipreparativa C₁₈.

Figura 41. Espectro de massa do peptídeo PSLEM 1225 oxidado e após a purificação.

Figura 42. Espectro de massa (MS) mostrando a distribuição monoisotópica do íon na forma oxidada e após a purificação.

Figura 43. Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor do peptídeo de interesse PSLEM 1050 na sua forma reduzida

Figura 44. Cromatograma de HPLC de fase reversa com a utilização de uma coluna semipreparativa C₁₈.

Figura 45. Cromatograma de HPLC de fase reversa com a utilização de uma coluna analítica C₁₈.

Figura 46. Espectro de Massa (MS) evidenciando a forma oxidada e pura do íon referente ao peptídeo PSLEM 1050.

Figura 47. Espectro de massa (MS) mostrando a distribuição monoisotópica do íon referente ao peptídeo PSLEM 1050 na sua forma oxidada e pura.

Figura 48. Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor referente ao peptídeo PSLEM 1226 na sua forma oxidada.

Figura 49. Gráfico de impedância evidenciando a ausência de agregação plaquetária no sangue quando na presença do peptídeo PSLEM 1050_RGD novo.

Figura 50. A: agregação plaquetária do peptídeo PSLEM 1050 pelo método de impedância elétrica. B: agregação plaquetária do controle positivo, ácido acetilsalicílico (aspirina), pelo mesmo método.

Figura 51. Plaquetas humanas lavadas aplicadas contra os peptídeos de interesse pelo método de espalhamento plaquetário.

Figura 52. Estrutura tridimensional dos peptídeos KGD (A), e HGD (B) de cadeia curta (PSLEM 1225 e PSLEM 1050) determinadas por Ressonância Magnética Nuclear.

Figura 53. Estrutura tridimensional do peptídeo PSLEM 1225 KGD obtida por RMN

Figura 54. Imagem comparativa dos modelos estruturais tridimensionais calculados para os cinco peptídeos sintéticos do estudo.

Figura 55. . Espectro de Massa (microTOF-QII) obtido por ESI do peptídeo PSLEM 1050 agregado.

Figura 56. Espectro de Massa (microTOF-QII) obtido por ESI do peptídeo PSLEM 1050 agregado. Aumentado na região de dupla e tripla carga.

Figura 57. Espectro de Massa (microTOF-QII) obtido por ESI do peptídeo PSLEM 1050 agregado. Aumentado na região de dupla carga.

Figura 58 Espectro de Massa (microTOF-QII) obtido por ESI do peptídeo PSLEM 1050 não agregado.

Figura 59 Espectro de Massa (microTOF-QII) obtido por ESI do peptídeo PSLEM 1050 não agregado aumentado na região de dupla carga.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos bioativos utilizados na medicina atual.

Tabela 2. Aminoácidos e grupos protetores utilizados tal como as suas massas com excesso molar.

Tabela 3. Gradiente de eluição linear.

Tabela 4. Gradiente de eluição 1

Tabela 5. Gradiente de eluição 2

Tabela 6. Parâmetros de aquisição para os experimentos de RMN 2D.

Tabela 7. Dados de aquisição para os experimentos de TOCSY para a determinação de ligações de hidrogênio.

Tabela 8. Sequência de aminoácidos dos peptídeos sintetizados

Tabela 9. . Relação de peptídeos sintéticos do presente estudo apresentados juntamente com peptídeos de atividade antiplaquetária estabelecida RGD e KGD provenientes da literatura

Tabela 10. Resultados obtidos por meio de dois métodos distintos de teste de inibição plaquetária.

Tabela 11 Guia de qualidade de modelo de estrutura determinada por RMN.

Tabela 12.. Estrutura primária dos novos peptídeos sintéticos rearranjados e desenhados pelo Laboratório de Espectrometria de Massa.

Tabela 13.. Resultados obtidos por meio de dois métodos distintos de teste de inibição plaquetária.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Similaridade entre os seres vivos

Todos os seres vivos, das bactérias aos seres humanos, compartilham uma característica bastante conservada. As células, assim como todos os componentes do seu organismo, seguem instruções escritas em uma linguagem universal definida pelo DNA. Os genes fazem parte das coordenadas apresentadas pelo DNA e são responsáveis pela codificação das proteínas (Figura 1). Problemas relacionados ao código genético estão relacionados a defeitos proteicos, causando, muitas vezes, doenças e anomalias graves.

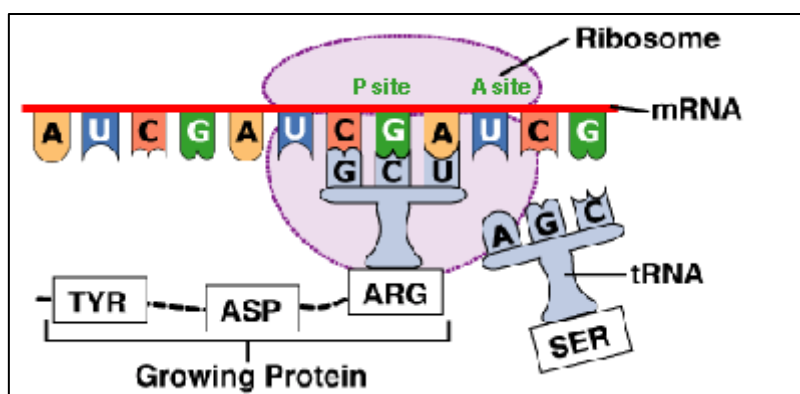


Figura 1. Esquema representando a tradução da informação genética em aminoácidos que, juntos, dão origem às proteínas. Imagem retirada da *National Biological Information Infrastructure*.

Os eucariotas são organismos que possuem organelas membranosas. Organizados nesse domínio, estão quase todos os organismos vivos que conhecemos. Os quatro organismos modelo: a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), o verme (*Caenorhabditis elegans*), o rato (*Mus musculus*) e a mosca (*Drosophila melanogaster*) são representantes dos eucariotos e compartilham com o ser humano (*Homo sapiens*) um vasto número de genes e proteínas (HHMI, 2001).

Mesmo com diferenças na complexidade, os organismos vivos fabricam proteínas responsáveis pelas mesmas funções centrais de sobrevivência, como o crescimento, a reprodução, a imunidade e a morte. Por mais que esses organismos modelo não sofram das mesmas enfermidades que os homens, genes humanos responsáveis por tais doenças possuem, nos modelos animais, genes paralelos em representações menos complexas, logo podendo ser estudados mais facilmente. Como exemplo, foi identificado que 61% dos genes mutados em humanos, os quais estão relacionados a 289 tipos de doenças, possuem equivalentes no genoma das moscas.

Mutações genéticas causam danos em proteínas específicas, sendo responsáveis por uma série de doenças como, por exemplo, câncer de tireoide, leucemia e fibrose cística (Rubin *et al.*, 2010). Outro exemplo de alta relevância é o histórico de produção de insulina sintética a partir de purificações de tecidos pancreáticos extraídos de animais como bovinos e suínos; sendo produzida, atualmente, por vias biosintéticas de DNA recombinante (International Diabetes Federation).

As proteínas são consideradas a estrutura base do organismo vivo. No entanto, elas não atuam sozinhas e interagem constantemente entre si, criando uma cadeia coordenada de atuação. Dessa forma, quando um gene mutante produz uma proteína defeituosa, esta pode afetar cadeias complexas de interação – aumentando a gravidade das doenças. Tais proteínas podem, ainda, ser degradadas em moléculas menores chamadas peptídeos. Os peptídeos são formados pela ligação de dois ou mais aminoácidos por meio de ligações peptídicas. Eles permanecem inativos dentro das proteínas e tornam-se ativos quando liberados por hidrólises enzimáticas *in vivo* ou *in vitro* (Korhonen e Pihlanto, 2006). Não existe uma barreira clara entre as atividades biológicas das proteínas e dos peptídeos. Enquanto proteínas possuem uma série de funções catalíticas e se mostram importantes nos tecidos, os peptídeos possuem papel essencial no organismo como neurotransmissores, hormônios e moduladores (Gante, 1994).

Com o marco do século XVIII, presenciamos a descoberta do tratamento de uma gama de pragas e doenças devido ao desenvolvimento de antibióticos e vacinas. Desde então, diferentes tipos de drogas estão disponíveis no mercado. No entanto, à medida com que a sociedade prospera, as doenças, antes combatidas com tais drogas, tornam-se resistentes em um processo de co-evolução, melhor ilustrado pela Hipótese da Rainha

Vermelha (“*It takes all the running you can do, to keep in the same place*”) (Carroll, 1960). A descoberta de novas moléculas se torna um objetivo necessário e constante que, adicionalmente ao papel de neutralizar a crescente resistência medicamentosa, devem ser melhoradas para a erradicação de problemas associados as suas precursoras tais como: efeitos colaterais, retenção prolongada nos tecidos e interações medicamentosas e, como será mencionado ao longo do texto, os modelos animais tornam-se aliados nessa busca, devido às similaridades orgânicas com o homem.

Os peptídeos surgem como uma alternativa interessante na busca por tais moléculas, uma vez que possuem atividades específicas e baixa massa, podendo funcionar como alternativas a drogas de pequena escala.

Quando comparados a moléculas convencionais de baixa massa, os peptídeos bioativos apresentam uma série de vantagens; possuem alta atividade biológica, alta especificidade pelo alvo, amplo espectro de ação, baixos níveis de toxicidade, diversidade estrutural e baixos níveis de retenção nos tecidos (Marx, 2005).

O papel dos peptídeos bioativos no aumento da imunidade natural por meio da modulação das respostas do sistema imune inato é bastante documentado. O sistema imunológico é uma maquinaria especial de defesa que mantém os organismos sadios. Como um reflexo da semelhança genômica dos seres vivos, o sistema imunológico também possui características comuns. Dentre os vários componentes desse sistema, peptídeos antimicrobianos foram selecionados ao longo de milhares de anos de evolução e, semelhantemente a nós, os outros animais e também as plantas possuem tal defesa para protegê-los de micro-organismos e predadores (Zasloff, 2002; Boman, 2003; Resende *et al.*, 2009). Peptídeos antimicrobianos são alvos de alta relevância no desenvolvimento de novas drogas bactericidas, como é o caso da utilização medicinal da “vacina do sapo”, mais conhecida como Kambô, retirada da secreção cutânea do anfíbio *Phyllomedusa bicolor* (Bernarde e Santos, 2009).

Além das atividades antimicrobianas mencionadas, os peptídeos bioativos podem induzir funções como anti-oxidativa, anti-hipertensiva, citomodulatória e imunomodulatória e o meio científico continua a revelar novas sequências peptídicas com possíveis aplicações no controle e prevenção de doenças. Incluídas na tabela 1 estão exemplificadas frações de peptídeos bioativos e suas respectivas atividades biológicas (Altman, 2004).

Tabela 1. Peptídeos bioativos utilizados na medicina atual. Figura modificada de Altman, 2004.

Nome	Forma Isolada	Nº de Aminoácidos	Uso Terapêutico
Angiotensina II	Plasma Humano	8	Vasoconstrictor
Bradicinina	Plasma Humano	9	Vasodilatador
Calcitonina	Gl. Paratireóide Humana	32	Regulador de Cálcio
Colecistoquinina	Intestino Porcino	33	Aumentador de secreção biliar
Corticotropina	Gl. Pituitária Porcina	39	Hormônio
Eleudoisina	Toxina de Octopoda	11	Hipotensivo
Melitina	Toxina de Hymenoptera	26	Antireumático
Oxitocina	Gl. Pituitária Bovina	9	Oxitocínico
Somatostatina	Hipotálamo Bovino	14	Inibidor Hormonal

Ao prestarmos atenção na enorme variedade de proteínas e peptídeos, duas características chamam atenção: a alta diversidade de funções biológicas e as infinitas variações estruturais. Sequências primárias de peptídeos com diferentes resíduos podem manter a mesma atividade biológica quando regiões específicas dentro da sequência mantem-se conservadas. Na figura 2, é mostrado um alinhamento de precursores de peptídeos antimicrobianos com diferenças na sequência de determinados resíduos de aminoácidos e atividade antimicrobiana mantida (Zhang e Zhu, 2012).

A

	Signal peptide	Mature peptide
Type 1		
Amabaecin	MKVVIFIFALLATICAFA-A	YVPLPNVPQGR-RPFPTF-PGQGFNPKI-----KWFQGY-
Nabaecin-3	MKFLASLLLLIVAVMVAIDA	YVPKIPKQPNK-PNFPSTF-PGHGPFNPHA-----SRFPR+65aa
Botabaecin	MKAVMFIFVMLATICGIL-A	FVPY-NPPRPGQSKPFPTF-PGHGPFNPKTQWPYPLPNPGH-
Atabaecin1	MKFHLFIIFTLTLLAVMTVF-A	YQSPVRKPPPGWKKPFPTF-PGQGPYNPKI-----RFPH
Acabaecin1	MKFHLFIIFTLTLLAVMTVF-A	YQSPVRKPPAGGWKPFPTF-PGQGPYNPKI-----RFPH
Siabaecin1	MKFHLFIIFVLLLATIAIL-A	YQPPIRNPPPGWKKPFPTF-PGQGPYNPKI-----RFPH
Hasabaecin1	MKFHLFIIFTLTLLAVMAAL-A	FRVPPQPPPGWKKPFPTF-PGQGFNPKI-----GK---
Pobabaecin1	MRLHLFIIFALLTVMAAF-A	YKSTVRSPPPGWKKPFPTF-PGQGPYNPKI-----KRY--
Type 2		
Atabaecin2	MKFTMYIVML-IAICALF-A	----DHTFSTHKIRLNG-PGYGFNPHQSWIPWPNG--
Acabaecin2	MRLTMYIVMLITICALF-A	----DIHTLSTHKIRLNG-PGYGFNPHQPWPWPNG--
Pobabaecin2	MRFAAYIVTLLVAICALF-A	----DTHALPKHRLRLPGGGPGYGFNPRLPWIPLPNRDH-
Siabaecin2	MRLATYIMMLLVAICALF-T	----DTHALPEHRPRLPEG-PGYVLENPRQPWPWPVWNGR-

Figura 2. Alinhamento de estruturas primárias de precursores de abaecinas. Imagem retirada de Zhang e Zhu, 2012.

Entretanto, em diversos casos, a modificação de apenas um resíduo de aminoácido causa estragos consideráveis em porções específicas do código genético, sendo que uma série de danos fenotípicos graves é resultante de tais anomalias genéticas (Lori *et al.*, 2013; Clancy, 2008). Responsáveis por tamanhas diferenças estruturais e funcionais, os 20 aminoácidos proteinogênicos conectados entre si por ligações peptídicas, podem combinar-se em 8000 tripeptídeos diferentes e até 64 milhões de possibilidades de hexapeptídeos (Lizkamp *et al.*, 2011). Adicionalmente às mudanças sequenciais nos peptídeos e proteínas, a natureza também se encarrega de proporcionar, nos mesmos, modificações pós-traducionais, incrementando suas estruturas com, por exemplo, controladores de liga/desliga representados pelo processo de fosforilação.

A natureza, por meio de inúmeras combinações de resíduos de aminoácidos, além de modificações pós-traducionais e aminoácidos enantiômeros, é capaz de gerar uma diversidade proteica inigualável. Por que, então, os peptídeos são alvos de modificações e alterações em estudos de peptidomimética? Peptidomiméticos são, por definição, análogos peptídicos sintéticos cujos elementos principais imitam, tridimensionalmente, peptídeos e proteínas naturais; sendo conservada a capacidade de interagir com o alvo desejado, produzindo o mesmo efeito biológico. A resposta para a pergunta anterior parece estar nas propriedades e estruturas biológicas. Estas são recordativas dos aspectos estruturais dos peptídeos, das proteínas e dos aminoácidos que os compõem. Em vários casos, propriedades estruturais e biológicas podem ser alteradas e melhoradas visando à atividade biológica. Dessa forma, o estudo da peptidomimética desenvolve compostos sintéticos a fim de lograr problemas associados a peptídeos naturais tal como instabilidade proteolítica e baixa disponibilidade biológica (Vagner *et*

al., 2009).

Chegamos a um ponto em que parece inevitável a união de todos os conceitos apresentados. Os modelos animais aparecem como ideais na busca de moléculas análogas/semelhantes àquelas dos humanos. Ao mesmo tempo, temos como alvo peptídeos bioativos presentes em tais organismos. Espera-se que tais peptídeos, quando em contato com organismos humanos, mantenham as suas atividades biológicas principais. No entanto, tais moléculas precisam ser melhoradas e as modificações realizadas em suas sequências primárias devem visar uma série de fatores como: aumento de disponibilidade no organismo, estabilidade, baixa toxicidade, aumento de potência biológica etc.

É importante, no entanto, que estudos aprofundados tenham como objetivo a simples investigação das implicações estruturais geradas a partir de modificações na sequência primária dos peptídeos. A busca pelo conhecimento deve procurar afastar-se da imprudência, na qual peptídeos são sintetizados sem muita atenção. O pesquisador deve distanciar-se da construção descuidada de “*Franksteins*”, os quais coloca a culpa no acaso da ocorrência natural dos fatos. Seguindo por esse caminho, o estudo de modelos peptídicos se mostra interessante, uma vez que podem funcionar como um esqueleto de mudanças específicas.

Modelos peptídicos facilitam a análise de dados devido ao seu tamanho. É possível, por meio deles, enunciar certos acontecimentos que possam, talvez, ser extrapolados para modelos mais complexos.

A análise estrutural de peptídeos de origem natural animal e de seus arquétipos sintéticos modificados foi realizada durante esse projeto. O estudo em questão foi de grande valia para o desenvolvimento de um método de ensaio, assim como para o desenvolvimento de uma molécula estável com atividade biológica adquirida.

1.2 - Peptídeo natural oriundo de biblioteca de expressão do anuro *Hypsiboas punctatus*

Toxinas naturais podem ser consideradas ferramentas úteis no estudo de novas moléculas e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de novos compostos de interesse biotecnológico e farmacêutico.

Durante anos, as plantas foram a principal fonte de compostos ativos com intuítos farmacêuticos. Delas vinham substâncias ativas, drogas e produtos de extração e purificação. Recentemente, a busca por remédios provenientes de substâncias de origem natural intensificou-se e foi expandida de forma a incluir outras fontes além da oferecida pelas plantas. Com esse intuito, a comunidade científica voltou-se para as secreções animais como objeto de estudo. A análise do modo de vida e do meio ambiente dos animais funciona como pista sobre os tipos de compostos produzidos como também sobre os motivos fisiológicos para a sua produção (Clarke, 1997).

As toxinas animais são misturas químicas complexas que, tipicamente, contém proteínas e compostos não proteicos. Tal gama de moléculas, em muitos casos, resulta na imobilização de presas e na defesa contra predadores e microrganismos (Morgenstern e King, 2013). Artrópodes e répteis são animais bastante explorados nesse contexto. Toxinas oriundas do veneno de escorpiões tem desempenhado um papel central na investigação da função fisiológica dos canais de potássio tal como da sua função biofísica relacionada às membranas. Toxinas quiméricas, desenhadas a partir de inúmeros arcabouços, são utilizadas para explorar a especificidade dos canais; enquanto a quimerização avançada de epítomos auxiliou no desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas (Bergeron e Bingham, 2012). A exploração do veneno advindo dos escorpiões também gerou frutos no desenvolvimento de inseticidas, uma vez que, em seu ambiente natural, são utilizados para captura de presas e defesa contra predadores e micro-organismos; isto é, agindo contra alvos moleculares específicos presente nos invertebrados (Schwartz *et al.*, 2012). O veneno de determinadas famílias de víboras também possui papel importante na descoberta de novas moléculas com atividades biológicas exploráveis pelo homem. Compostos proteicos como a fosfolipase A2, as metaloproteinases e as L-aminoácido-oxidases são exemplos de moléculas com valor antimicrobiano agregado (Oliveira Jr. *et al.*, 2013). Peçonhas oriundas das serpentes contribuíram significativamente para o desenvolvimento de novas drogas e muitos

estudos descrevem o potencial anticarcinogênico de tais compostos com exemplos de peptídeos e proteínas isolados dessas toxinas ligando-se especificamente a membranas cancerígenas, afetando a migração e a proliferação dessas células (Vyas *et al.*, 2013). As serpentes utilizam o seu veneno para paralisar/deter presas em uma rápida e eficiente imobilização, dessa forma, o foco de estudo básico das implicações tóxicas de tais compostos é o da sua atividade no sistema nervoso central, presentes na literatura na forma de análises de interações de proteínas e peptídeos com o sistema nervoso central e periférico de mamíferos (Osipov e Utkin, 2012).

Em tal contexto de toxinas animais, os anfíbios são criaturas particularmente interessantes. São indivíduos quase cosmopolitas na sua distribuição e, com exceção da Antártica, podem ser encontrados em todos os continentes do mundo. Tal distribuição é ilustrada em um mapa de diversidade de anfíbios por país na figura 3 (Savage, 1973).

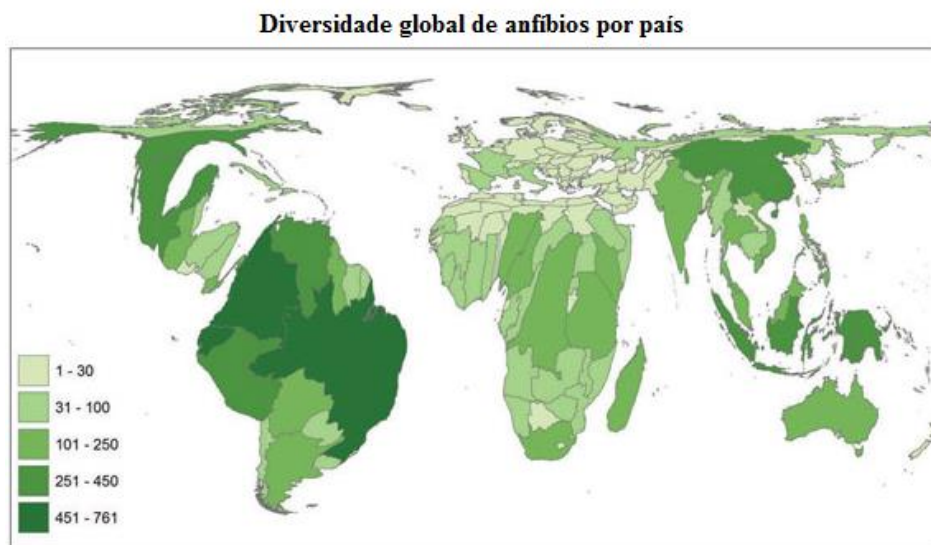


Figura 3. Cartograma ilustrando a diversidade global de anfíbios por país. A escala mostrada no canto esquerdo inferior diz respeito ao número de espécies em cada região. Figura retirada de *AmphibianWeb* em 2013.

A capacidade desses animais de sobreviver em ambientes tão diversos pode ser atribuída à evolução de várias características adaptativas morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais. Sua vulnerabilidade a fatores ambientais adversos é alta devido ao seu papel tanto de presa quanto de predador dentro da teia alimentar. São consumidores de insetos e outros artrópodes e, ao mesmo tempo, são presas de uma

série de espécies de vertebrados e invertebrados. Além do posicionamento na teia alimentar, a maioria dos anfíbios possui grande preferência por ambientes úmidos e aquáticos nos quais bactérias e fungos encontram-se em abundância, dessa forma precisam proteger-se contra infecções e à evolução credita-se o desenvolvimento de um sistema integrado de defesa antimicrobiana. A pele desses animais possui o importante papel de defesa contra predadores e patógenos, tendo sido objeto de considerável interesse nos últimos anos (Clarke, 1997 e Garg, Hippargi e Grandhare, 2008).

A pele dos anfíbios é um órgão complexo que exerce uma ampla gama de funções. É ricamente vascularizada e repleta de glândulas secretoras de uma vasta quantidade de moléculas bioativas. Tais glândulas podem ser classificadas como glândulas mucosas ou granulares, sendo estas consideradas venenosas. A figura 4 mostra um corte histológico evidenciando tais glândulas. (Duellman e Trueb, 1986; Davidson e Abramowits, 2013).

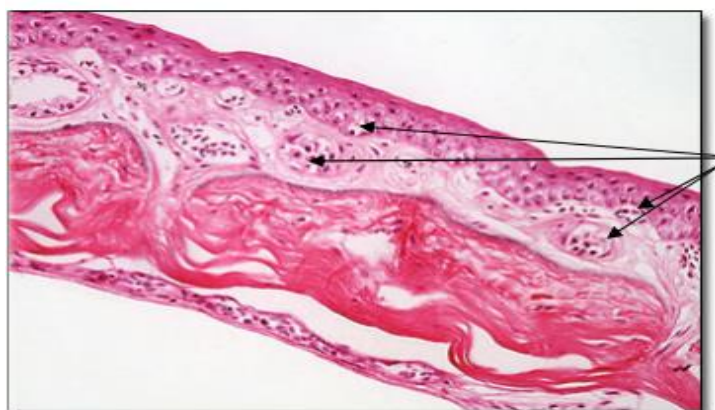


Figura 4. Esquema representando um corte histológico da pele de um anfíbio feito por Davidson e Abramowits, no qual as setas apontam para as glândulas granulares.

Além de possuírem propriedades químicas singulares e mecanismo de síntese especialmente interessante, os compostos advindos da pele dos anfíbios possuem um papel terapêutico que se destaca como peça principal no desenvolvimento de novas drogas (Erspamer e Vialli, 1951; Duellman e Trueb, 1986; Zasloff, 2002; Calderon *et al.*, 2010).

Em resposta a uma variedade de estímulos, compostos tóxicos são secretados pelas glândulas cutâneas dorsais desses animais. As secreções granulares dos anuros

incluem desde aminas, proteínas e peptídeos a esteróides e alcalóides. Tais moléculas têm sido isoladas e têm se revelado modelos úteis para estudos fisiológicos e farmacológicos, possuindo efeitos cardiotoxícos, miotóxicos, neurotóxicos etc (Yan *et al.* 2012). Entretanto, uma característica singular dos anfíbios é o fato de peptídeos bioativos comporem grande parte da mistura secretada.

As toxinas liberadas pela pele auxiliam na sobrevivência do animal ao agirem como sinal de aviso ou mesmo como veneno, tóxicas aos predadores. Peptídeos com atividades farmacológicas equivalentes ou semelhantes podem ser encontrados em espécies diferentes de anfíbios. Suas sequências primárias, embora raramente idênticas, são altamente conservadas (Zasloff, 1987).

Uma observação de valor considerável, prevista por Erspamer e Melchiorri em 1980, é que grande parte desses componentes amínicos e peptídicos possuem, de maneira menos concentrada e menos variada, correspondentes nos tecidos dos mamíferos. À medida que mais compostos são descobertos e caracterizados, tal previsão se mostra real, como no caso da analogia entre a bombesina e o peptídeo liberador de gastrina humano (GRP). Adicionalmente, análogos de peptídeos oriundos da pele de anfíbios são, geralmente, encontrados no Sistema Nervoso Central, nas células neuroendócrinas e nos nervos peptinérgicos dos tratos intestinal e respiratório dos mamíferos (Zasloff, 1987).

Comumente, os peptídeos em questão são descobertos no momento em que as atividades biológicas presentes na secreção são desvendadas com a utilização de testes fisiológicos. São caracterizados por meio da determinação da massa molecular e da determinação estrutural, utilizando-se os mais diversos métodos, desde a simples análise da sequência dos aminoácidos, pelo método de degradação de Edman, quanto de técnicas biofísicas e bioquímicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massa em *tandem*.

No entanto, ao longo das duas últimas décadas, a clonagem molecular do DNA complementar que codifica os precursores de tais peptídeos tem sido a ferramenta preferida pelos pesquisadores para a elucidação da estrutura primária dos componentes proteicos dessas secreções (Evaristo *et al.* 2012).

1.3-*Hypsiboas punctatus*

O anfíbio *Hypsiboas punctatus* (Figura 5), presente desde a Amazônia até as proximidades do rio Paraguai-Paraná na Argentina, é uma espécie comum na família dos hilídeos. A figura 6 mostra a distribuição de tal anfíbio pela América (La Marca *et al.*, 2010). Como em todos os anfíbios, os membros dessa espécie liberam secreções cutâneas quando submetido a situações de estresse.



Figura 5. Imagens do anfíbio *Hypsiboas punctatus* cedidas pelo Dr. Carlos Bloch Jr.

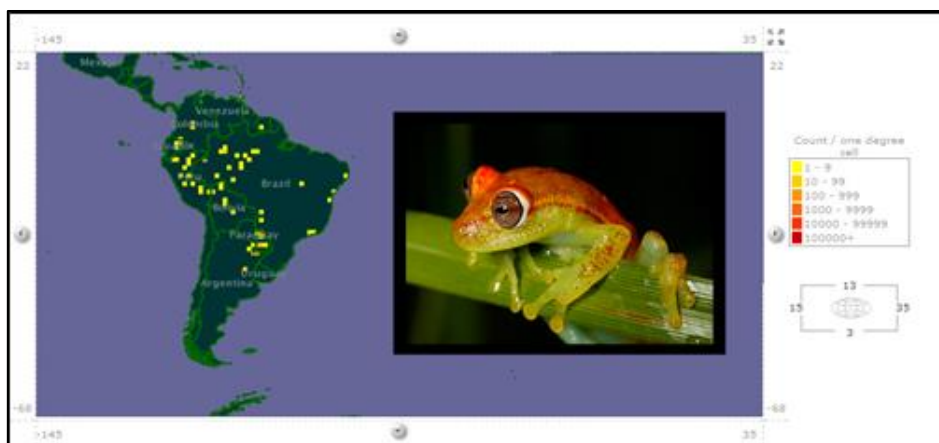


Figura 6. Distribuição geográfica e fotografia do anfíbio *Hypsiboas punctatus*.

Desde a criação do Laboratório de Espectrometria de Massa do CENARGEN, os anfíbios anuros tem sido objeto de estudo constante em busca de novas moléculas e de novas metodologias e, ao analisarmos a biblioteca de cDNA de clones que codificam os precursores de peptídeos antimicrobianos da secreção cutânea do anuro *H. punctatus*, uma sequência específica foi, fortuitamente, detectada. O fragmento encontrado codifica um precursor que possui 15 resíduos de aminoácidos, sendo duas cisteínas nas porções C e N terminais que, possivelmente, sofrem uma modificação pós traducional formando uma ligação dissulfeto. Como um grampo, a estrutura possui em seu centro o motivo KGD, característico das proteínas da família das Desintegrinas, comum na toxina das serpentes (Minoux *et al.*, 2000), mas até então inédita na literatura em relação aos anfíbios anuros.

1.4. Desintegrinas

As Desintegrinas foram introduzidas na comunidade científica em 1984 por Pierschbacher e Ruoslahti (Pierschbacher e Ruoslahti, 1984 em Pierschbacher e Ruoslahti, 1996). A descoberta de que somente três resíduos de aminoácidos fossem capazes de formar um sítio de reconhecimento bastante potente foi recebida com algum descrédito. Foi quando Niewiarowski e Tur Fur huang, de *Temple University*, descobriram que proteínas pequenas não enzimáticas isoladas do veneno da serpente *Trimeresurus gramineus* inibiam a agregação plaquetária de forma a ligar-se competitivamente ao fibrinogênio, conectando-se a plaquetas estimuladas por ADP (Huang *et al.*, 1987 ; Calvete *et al.*, 2002). Na figura 7, uma imagem da víbora *T. gramineus* juntamente com as estruturas tridimensionais de uma desintegrina e de uma proteína ADAM.

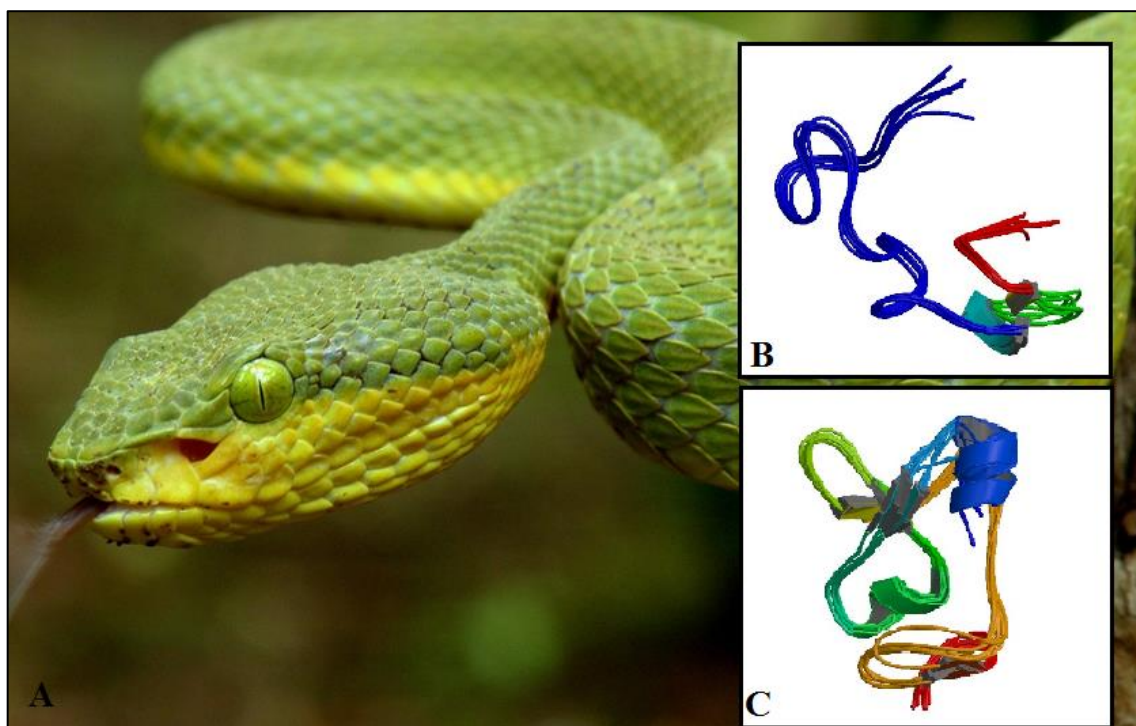


Figura 7. A- *T. gramineus* (fotografia de Vinayak Puranik). B – Região C-terminal de uma desintegrina exibindo a alça inibitória RGD ([10.2210/pdb2m75/pdb](https://www.rcsb.org/structure/10.2210/pdb2m75/pdb)) e C – Porção próxima da membrana de uma proteína ADAM ([10.2210/pdb2m2f/pdb](https://www.rcsb.org/structure/10.2210/pdb2m2f/pdb)).

As desintegrinas apresentam homologia com proteínas denominadas ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) que são encontradas em diversos tecidos de mamíferos, as quais combinam características de proteases e de adesão celular atuando

em diversos processos fisiológicos (Wolfsberg *et al.*, 1995).

Como em várias toxinas venenosas, a inibição da integrina pelas desintegrinas é dependente da combinação exata das cisteínas em suas sequências primárias. As ligações conservadas entre cisteínas determinam a conformação da alça inibitória contendo o tripeptídeo ativo. É possível observar na figura 8 o alinhamento da sequência de aminoácidos de uma série de desintegrinas e o posicionamento conservado das cisteínas. Estudos de desintegrinas de diversos tamanhos, por RMN e Cristalografia, revelaram que uma alça móvel de 11 resíduos abriga o sítio ativo (R/K)GD que protrude do centro da proteína, corroborando hipóteses anteriores que previam que os receptores de integrina utilizavam um “bolso” de reconhecimento localizado na interface entre as subunidades α e β (Main *et al.*, 1992, Saudek *et al.* 1991). Além disso, a alça C-terminal, na qual está inserido o motivo, é pouco definida, possuindo estrutura flexível (Figura 9) (Calvete *et al.*, 2002).

	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50																																							
Viperistatin	C	T	T	G	F	C	C	R	O	C	K	L	P	A	G	T	T	C	W	-	-	K	T	S	R	T	S	H	Y	C	T	G	K	S	C	D	C	P	V	Y	Q	G								
Obtustatin	C	T	T	G	F	C	C	R	O	C	K	L	P	A	G	T	T	C	W	-	-	K	T	S	L	T	S	H	Y	C	T	G	K	S	C	D	C	P	L	Y	P	G								
Echistatin	E	C	E	S	G	F	C	C	R	N	C	K	F	L	K	E	G	T	I	C	K	R	A	R	G	D	D	M	D	D	Y	C	N	G	K	T	C	D	C	P	R	N	P	H	K	G	P	A	T	
Eristostatin	Q	E	E	P	C	A	T	G	F	C	C	R	R	C	K	F	K	R	A	G	K	V	C	R	V	A	R	G	D	W	N	D	D	Y	C	T	G	K	S	C	D	C	P	R	N	P	W	N	G	
Ocellatusin	D	C	E	S	G	F	C	C	D	N	C	K	F	L	K	E	G	T	I	C	K	M	A	R	G	D	N	M	H	D	Y	C	N	G	K	T	C	D	C	P	R	N	P	Y	K	G	E	H	D	T
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		

Figura 8. Alinhamento de aminoácidos de desintegrinas retirado de Kisiel *et al.*, 2004. Os resíduos com asteriscos embaixo são aqueles absolutamente conservados em desintegrinas monoméricas.

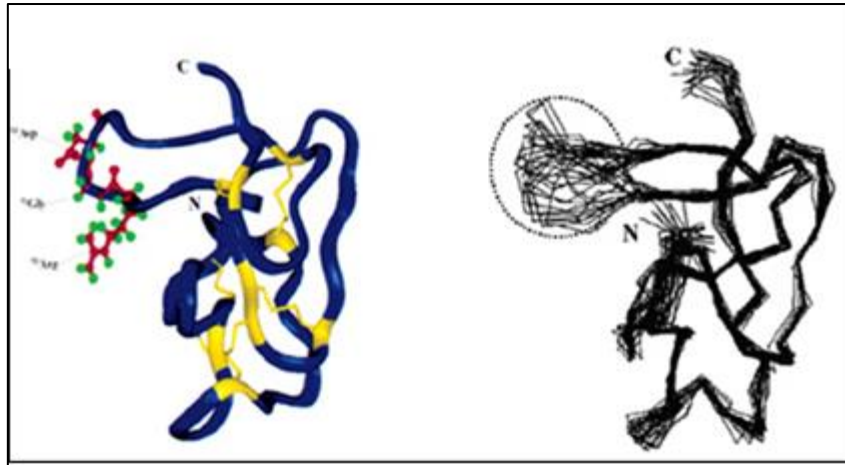


Figura 9. Estrutura tridimensional da desintegrina salmosina evidenciando a alça flexível, a qual comporta o motivo tripeptídico RGD.

A sequência Arg/Lys, Gly, Asp (R/K GD) funciona como um sítio adesivo importante para a conexão de diversas proteínas extra-celulares como o fibrinogênio e a fibronectina a receptores específicos de integrina (Sutcliffe *et al.*, 1994, Hynes, 1987). As desintegrinas, portanto, competem pela ligação de tais receptores, agindo como um potente inibidor de ligações célula-célula e célula- matriz das integrinas.

No peptídeo identificado pelo nosso grupo, o sítio ativo está no centro de um grampo de 12 resíduos cuja composição de aminoácidos deve ser analisada. Deve-se atentar para os estudos que expõem a importância do ambiente físico químico do tripeptídeo para sua função biológica, não bastando, somente, a conservação do posicionamento das cistinas para aquisição de atividade biológica (Reiss *et al.*, 2005). Além do tripeptídeo, outras áreas da molécula de fibronectina interagem com a superfície celular. O (R/K)GD funciona como o sítio de interação primário, enquanto um segundo motivo ativo de cada tipo de ligante é responsável pela especificidade da molécula (Ruoslahti e Pierschbacher, 1987).

Uma observação importante, apontada por Ruoslahti e Pierschbacher, em 1987, é que o ácido aspártico presente no RGD é a peça mais importante para a atividade adesiva da molécula, uma vez que se observou durante um experimento que, em determinada situação, acontecia uma mudança estereoquímica do resíduo de ácido aspártico na conformação L para a conformação D tornando o peptídeo inativo. Adicionalmente, ao realizar-se uma substituição, trocando o ácido aspártico pelo ácido glutâmico, o peptídeo também perdia a atividade. Entretanto, ao substituir-se a arginina

por lisina, a atividade se mantinha (Chen *et al.*, 2009). Tal fato ocorreu, possivelmente, devido ao potencial do ácido aspártico em contribuir para a ligação de cátions divalentes, uma vez que o ligante oferece um sítio de coordenação para tal ligação (Edwards *et al.*, 1988). A subunidade α da integrina possui quatro sequências que se assemelham a topologia hélice-alça-hélice (*EF-Hand*) de algumas proteínas. No entanto, um dos sítios ácidos conservados está ausente na integrina, que serve como um local de coordenação nas *EF-Hand* canônicas. Possivelmente, o ácido aspártico presente no RGD supre o local de coordenação quando a integrina liga-se ao peptídeo.

No entanto, não são todas as proteínas que contém os resíduos RGD que possuem atividades biológica e adesiva. Isso acontece devido à indisponibilidade da sequência ativa RGD nessas moléculas, ou mesmo podendo estar presente em um contexto não compatível com o reconhecimento da integrina, uma vez que os aminoácidos flanqueadores, ao redor do tripeptídeo, podem estar silenciando sua atividade (Ruoslahti e Pierschbacher, 1987). Podemos notar, portanto, que a eficiência das desintegrinas depende, em grande parte, da sua sequência primária e da sua conformação, definida, em grande parte, pelas pontes dissulfeto (Yamamoto *et al.*, 1998).

O estudo das moléculas que possuem tal sequência ativa é importante para o desenvolvimento terapêutico contra doenças como a trombose, uma vez considerada a sua atividade de inibição plaquetária. Além disso, é sabido que durante o processo de invasão de metástases tumorais, as células cancerígenas precisam aderir-se e tomar a membrana basal penetrando no estroma intersticial. Dessa forma, os componentes da superfície das células doentes desempenham funções essenciais, fornecendo um conjunto de receptores adesivos. O evento de adesão celular da metástase é considerado o processo inicial da invasão do tumor. A capacidade das células tumorais de se ligar às desintegrinas e a conseguinte inibição da adesão dessas células à membrana basal faz com que as desintegrinas também possam atuar como fator de inibição de formação de metástases (Cominetti, 2004).

1.5. Desenho de moléculas ativas com base em produtos naturais

Os estudos realizados pelo nosso grupo, durante os últimos anos, acerca da secreção cutânea dos anfíbios anuros, nos levaram a algumas observações interessantes acerca da relação entre estrutura primária, conformação tridimensional e atividade biológica de peptídeos. A relação direta entre tais fatores começa a ser entendida por meio de análises de química de proteínas e de caracterização de peptídeos. Parte dessa elucidação é apresentada nessa dissertação.

Pela primeira vez, um peptídeo com características semelhantes à desintegrinas foi encontrado na secreção cutânea de um anfíbio anuro e o estudo de suas propriedades parece interessante no contexto do descobrimento de novas moléculas e na possibilidade de sua utilização no desenho molecular “sob medida” de substâncias específicas que possam apresentar valor econômico.

O conhecimento acerca da estrutura da molécula é de suma importância para o entendimento da sua função (Lance *et al.*, 2010). A existência de um peptídeo com potencialidade para exercer duas atividades biológicas distintas e concomitantes nos levou a analisar, além da presença das atividades em questão, também a sua estrutura tridimensional, de forma a identificar o nível de estabilidade conformacional apresentado por ele.

Um arcabouço estável e propício a alterações nos permitiria modificar os motivos peptídicos presentes na alça flexível de forma a não alterar a estabilidade estrutural. Novas moléculas poderiam ser desenvolvidas dessa forma; intercambiando os pequenos sítios ativos com a manutenção da estabilidade estrutural.

A exploração de produtos naturais figurou, durante muito tempo, como o principal recurso de descobrimento de novas drogas. No entanto, devido à vasta informação genômica disponível e ao crescente avanço nas técnicas de caracterização como a cristalografia, a ressonância magnética nuclear e a espectrometria de massa, o desenvolvimento do desenho racional de novas moléculas, a partir de substâncias já conhecidas, se tornou o principal foco da farmacologia moderna (Butler, 2005).

Um exemplo bastante explorado no contexto do desenho de novas drogas é a utilização de peptídeos denominados ciclotídeos como arcabouço para sítios ativos

distintos. Os ciclotídeos são “nós” de ligações dissulfeto nos quais três motivos estruturais dissulfeto se entrelaçam, conferindo alto nível de rigidez à molécula. São muito comuns em toxinas e, devido a sua estabilidade, bastante estudados com viés farmacológico (figura 10) (Craik *et al.*, 2000).

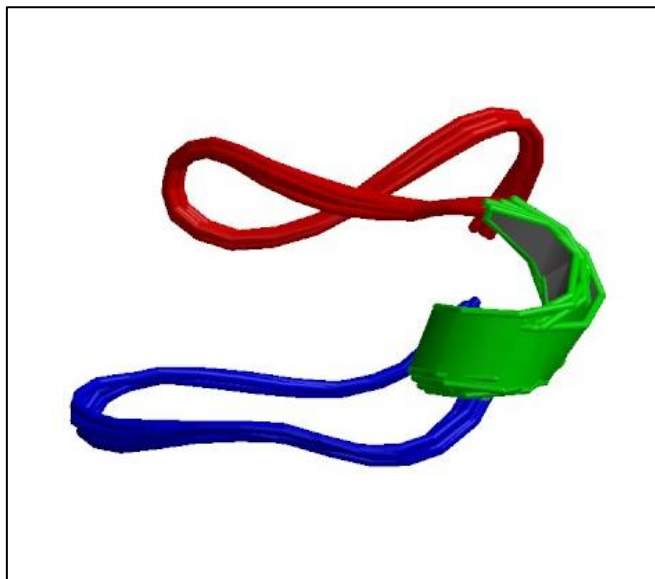


Figura 10. Estrutura de RMN em solução de vhr1. O primeiro ciclotídeo extraído de tecido de raiz. Imagem retirada do Protein Data Bank (PDB) de referência [10.2210/pdb1vb8/pdb](https://www.rcsb.org/entry/10.2210/pdb1vb8/pdb).

Le-Nguyen e colaboradores, já em 1993, mostraram possível a geração de uma proteína quimérica capaz de manter a atividade de dois peptídeos quando mesclados um ao outro. Eles desenvolveram quimeras nas quais a β -galactosidase foi utilizada como arcabouço estrutural para uma série de motivos funcionais. Tal enzima possui uma sequência primária cujo N-terminal aceita grandes proteínas ou domínios proteicos sem que haja perda significativa de atividade. Por essa razão, ela é explorada como carreador molecular para estabilizar moléculas heterólogas produzidas em bactérias (Feliu *et al.*, 1998).

O tripeptídeo RGD foi inserido em um arcabouço de molécula de insulina por Liu e colaboradores, em 2002, de forma a verificar a necessidade de uma estrutura estável e flexível para a atividade antitrombótica. Mais uma vez, verificamos a

manipulação sintética da sequência primária dessas moléculas, explorando as qualidades desejadas.

Peptídeos RGD também foram enxertados em ciclotídeos e observou-se que a atividade de inibição plaquetária nesses casos superou àquela dos peptídeos naturais. Corroborando a importância da estabilidade estrutural para a atividade biológica das moléculas (Reiss *et al.*, 2006).

Para podermos entender a função molecular de diversos organismos, utilizando como ferramenta a crescente informação genômica disponível, é importante que possamos prever a estrutura do objeto de estudo a partir da sequência primária do mesmo (Lance *et al.*, 2009).

2 - OBJETIVOS

2.1-Objetivos Gerais:

Esse projeto tem como objetivo principal o isolamento, o estudo e a caracterização de peptídeos naturais provenientes da toxina cutânea advinda do anfíbio *H. punctatus*, tal como a manipulação da estrutura primária original para o desenvolvimento de peptídeos sintéticos melhorados com o intuito do estudo acerca da relação entre sequência, estrutura terciária e atividade biológica.

2.2- Objetivo Específico:

Síntese em fase sólida, purificação, caracterização e determinação estrutural de novas moléculas com diferentes atividades biológicas selecionadas em estudos já iniciados no Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM) - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a partir de bancos de dados exclusivos do laboratório e dos disponíveis na literatura.

Um peptídeo específico será utilizado como arcabouço para o desenvolvimento de modelos a relacionar estrutura e atividade biológica. Serão sintetizados por síntese em fase sólida, purificados por cromatografia de fase reversa e caracterizados por espectrometria de massa. Após sua síntese, purificação e caracterização, terão suas estruturas tridimensionais estudadas por mobilidade iônica e serão submetidos a ensaios biológicos. Serão, então, submetidos à Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para que as suas estruturas sejam elucidadas.

Uma seqüência peptídica de 15 resíduos de aminoácidos presente na pele do anfíbio *H. punctatus* com um motivo *Lysil-Glycil-Aspartil* (KGD) típico de anti-agregantes da família das desintegrinas terá o resíduo original de LISINA (K) substituído, respectivamente, por resíduos de ARGININA (R) e HISTIDINA (H), com o intuito de desenvolver um modelo peptídico que apresente atividade anti-plaquetária característica das desintegrinas.

3 - JUSTIFICATIVA

A análise da composição da secreção cutânea dos anfíbios anuros é um ramo da toxilogia que cresce à medida com que novas moléculas de interesse comercial são isoladas a partir de tal fonte. A mistura de substâncias advindas da pele dos anuros é, em grande parte, um complexo peptidoma que apresenta componentes análogos a peptídeos regulatórios endógenos presentes nos vertebrados.

O anfíbio *H. punctatus* é comumente encontrado na Amazônia e a construção de uma biblioteca de cDNA a partir de sua pele foi realizada pelo nosso grupo em trabalhos anteriores. Dentre as sequências de aminoácidos que são transcritos nas glândulas dérmicas do anuro, identificamos uma sequência codificadora de um peptídeo com características primárias semelhantes à de proteínas antitrombóticas da família das Desintegrinas, presentes na peçonha de diversas serpentes.

Um peptídeo de 15 resíduos de aminoácidos apresenta-se, então, com possibilidade de possuir atividade anti-plaquetária. Tal fato estimulou o desenvolvimento do presente projeto e justificou o desenvolvimento de um modelo de estudo que envolvesse a relação entre sequência primária, secundária, conformação tridimensional e atividade biológica de peptídeos bioativos.

A atividade biológica em questão faz parte de áreas de relevância para o desenvolvimento de novos fármacos. A trombose é uma doença ainda presente na sociedade atual e um peptídeo com características de inibição de agregação plaquetária torna-se um alvo interessante para a indústria farmacêutica.

Dessa maneira, além da justificativa técnico-científica do desenvolvimento de um modelo visando à relação entre estrutura e atividade de peptídeos, existe também um viés de cunho socioeconômico na realização desse projeto.

4- METODOLOGIA

4.1 - Seleção das moléculas a serem sintetizadas

As moléculas serão selecionadas a partir de bancos de dados de domínio público e de bibliotecas de cDNA do LEM.

A seleção das moléculas iniciais foi feita a partir da biblioteca de cDNA do anfíbio *H. punctatus* desenvolvida por membros do grupo (Éder Barbosa e Mariana Quezado) em trabalho ainda não publicado.

4.2 - Síntese química dos peptídeos

A síntese dos peptídeos foi realizada manualmente, via estratégia de síntese de fase sólida Fmoc/T-butyl.

- Síntese Manual em Fase Sólida pela estratégia Fmoc/TButyl

Utiliza-se uma seringa de plástico com um filtro de polipropileno (Plástico), na qual é inserida a resina sólida *Rink-Amide* (resina amidada) de escala de síntese igual a 0,1 mmol de peptídeo.

O peso da resina é determinado de acordo com o grau de substituição = 0,52 meq.

- 1) Lavagem da resina com 2- propanol, seguido por N,N-dimetilformamida (DMF). Realiza-se tal ciclo de lavagem três vezes e ambos os solventes são retirados da seringa com a utilização da bomba de vácuo.
- 2) Desproteção do Fmoc protetor por meio do tratamento com 2,5 mL de 4-metilpiperidina/DMF (1:4, v/v) agitando-se a seringa por 15 minutos. Esse processo deve ser repetido 2 vezes e a 4-metilpiperidina retirada ao final com a ajuda da bomba de vácuo.
- 3) Repetição do processo de lavagem do passo 1.
- 4) Realização do teste de Kaiser
- 5) Lavagem da resina (Mesmo processo descrito no ponto número 01)
- 6) Teste de Kaiser

Realizado em um tubo de ensaio, no qual são inseridos alguns grãos de resina retirados da seringa. Tratamento dos grãos com uma solução feita com 2mL de KCN (1mmol.L^{-1}) e 98 mL de piperidina, duas gotas de solução fenólica a 80% (em massa) em etanol e uma gota de solução de nihidrina a 5% em etanol. O tubo é, então, aquecido a 110°C por três minutos. A leitura é realizada de acordo com a cor dos grãos. Transparente para grupo amino protegido e marrons/azuis para grupo amino desprotegido.

7) Inicia-se o acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido a começar pelo lado C-terminal da molécula. O pó referente ao aminoácido em questão é adicionado à

seringa. É utilizado 0,4 mmol de derivado de aminoácido, no qual se adiciona 0,4 mmol de HBTU e 0,8 mmol de DIPEA, solubilizando-se com 1,5 mL de DMF destilado. A seringa é, então, submetida à agitação por 1h e 30 min à temperatura ambiente.

8) Realiza-se novamente o teste de Kaiser.

O ciclo de síntese (acoplamento/desproteção) é repetido até o resíduo final do N-terminal da molécula. Após o acoplamento de todos os aminoácidos é realizada a clivagem do peptídeo da resina. Um esquema simplificado da síntese é apresentado na figura 10.

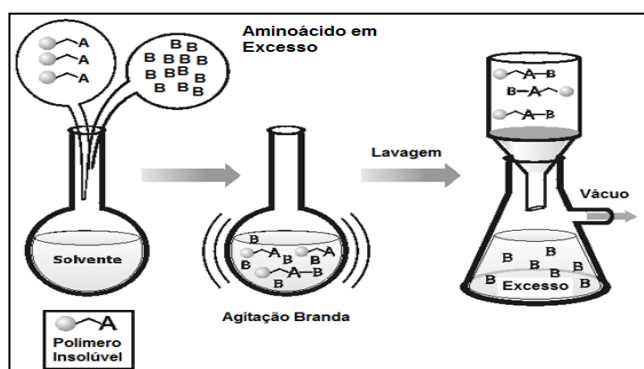


Figura 11. Esquema simplificado da síntese em fase sólida realizada para os peptídeos em questão

Abaixo é mostrada uma tabela (Tabela 2) com as massas moleculares dos resíduos de aminoácidos utilizados e seus grupos protetores.

Tabela 2. Aminoácidos e grupos protetores utilizados tal como as suas massas com excesso molar.

Fmoc-aminoácidos	MM (g/mol)	Massa para 0,4 mmol (mg)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	648,8	259,5
Fmoc-Asp(O <i>t</i> Butil)-OH	411,5	164,6
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585,7	234,2
Fmoc-Gly-OH	297,3	118,9
Fmoc-His(Trt)-OH	619,7	247,8
Fmoc-Ile-OH	353,4	141,3
Fmoc-Leu-OH	353,4	141,3
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468,5	187,4
Fmoc-Ser(<i>t</i> Butil)-OH	383,4	153,3
Fmoc-Thr(<i>t</i> Butil)OH	397,5	159
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526,6	210,6
Fmoc-Tyr(<i>t</i> Butil)-OH	459,6	183,8

9) Após o acoplamento do último resíduo de aminoácido, realiza-se a fase de desproteção final para que possamos progredir com a clivagem.

10) Para que aconteça a clivagem, a resina é submetida a um processo de liofilização durante 2 horas. Após essa etapa, a resina é retirada da seringa e transferida para um tubo *falcon* de 50 mL. Adiciona-se ao tubo 10mL de uma solução contendo 81,5 % de TFA, 5% de tioanisol, 5% de fenol, 5% de água, 2,5% de EDT e 1% de TIS (em volume). O recipiente é tampado e submetido a agitação por 1h e 30 minutos.

11) É utilizada uma mangueira com nitrogênio gasoso dentro do tubo para que a solução evapore

12) Utiliza-se a bomba de vácuo para a filtração do peptídeo com a ajuda de um filtro de vidro sinterizado. A resina é suspendida em éter diisopropílico gelado e a fração etérea é a primeira a ser filtrada. Essa fração é descartada.

13) A segunda filtragem é realizada primeiramente com água milli-Q e secundariamente com ACN (50%). Nessas frações está o peptídeo. A filtragem é recolhida em balões de vidro que são congelados e submetidos a um processo de liofilização para secagem.

Um esquema de síntese é mostrado na figura a seguir, (figura 12).

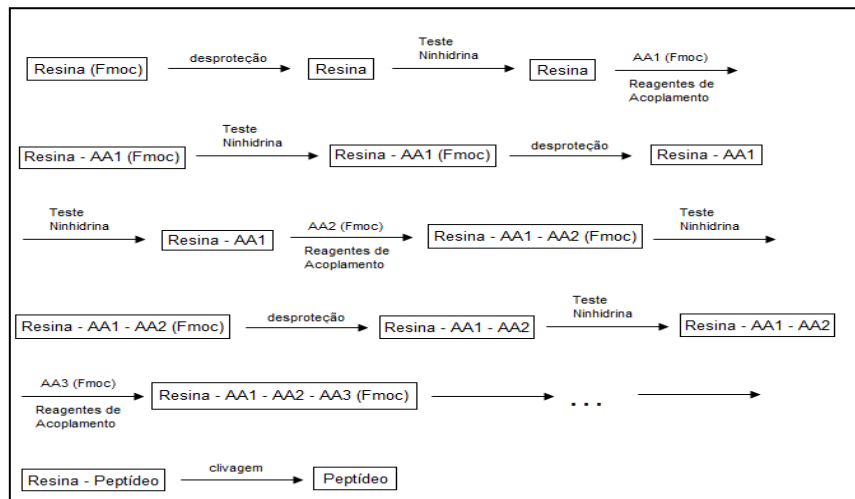


Figura 12. Esquema representando todo o processo de síntese do peptídeo.

4.3 - Purificação

Todos os peptídeos sintetizados serão purificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa. O monitoramento aconteceu a 216 nm e 280 nm, referentes à absorção na faixa da ligação peptídica e na faixa da absorção de grupamentos aromáticos. O gradiente de eluição para ambos os fracionamentos foi linear variando de 5% de ACN a 95% de ACN.

1) Extrato bruto recém sintetizado é solubilizado em água milli-Q em uma proporção inicial de 1mg/ 500 μ L. A amostra é fracionada primeiramente em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (LC 10AD VP, *Shimadzu Co*) em colunas C₁₈ semi-preparativas (Vydac 218TP510) com o fluxo de 2,5 mL/min e um gradiente de eluição com água Milli-Q e Acetonitrila como solventes, ambos com 0,1% de TFA.

2) A fração de interesse é manualmente coletada em eppendorfs de 2mL, congelada e seca novamente.

3) Os eppendorfs contendo a fração seca seca solubilizados em água Milli-Q e deixados abertos em contato com o ar à temperatura ambiente por 48 horas.

4) A fração desejada é fracionada novamente no mesmo cromatógrafo em colunas C₁₈ analíticas (Vydac 218TP54) com um fluxo de 1,0 mL/min e água e acetonitrila como solventes, ambos com 0,1% de TFA

O método de purificação da segunda etapa do trabalho divergiu do método de purificação da primeira etapa apenas no que diz respeito ao gradiente de eluição utilizado. Enquanto que na primeira etapa ele foi linear, como mostrado na tabela 11, na segunda etapa ele foi modificado buscando uma melhor separação cromatográfica.

Foram utilizados três tipos de método gradiente, de maneira a otimizar o tempo de análise. Os três vão de 5% de ACN a 95% de ACN, mudando-se somente os tempos em cada etapa. A tabela 3, 4 e 5 apresentam os três tempos distintos de gradiente de eluição.

Tabela 3. Gradiente de eluição linear.

Tempo (minutos)	Porcentagem de ACN (%)
0,01	5%
5	5%
15	25%
20	35%
30	40%
40	95%
50	95%

Tabela 4. Gradiente de eluição 1.

Tempo (minutos)	Porcentagem de ACN (%)
0,01	5%
5	5%
60	95%
70	95%

Tabela 5. Gradiente de eluição 2.

Tempo (minutos)	Porcentagem de ACN (%)
0,01	5%
5	5%
25	40%
35	50%
45	95%
55	95%

4.4 – Oxidação dos peptídeos sintéticos

A oxidação dos peptídeos sintéticos foi realizada com a utilização do elemento químico Tálho (Tl). O protocolo seguiu as seguintes etapas do protocolo 7 mostrado por Chen *et al.*, 2001 e também utilizado por Angeletti *et al.*, 1997, e segue as seguintes etapas.

1) Após a desproteção do último resíduo de aminoácido, o peptídeo é submetido a um tratamento com Tl e DMF, em excesso molar de duas vezes o do peptídeo, durante 40 minutos.

2) Amostra é lavada de maneira convencional utilizada na síntese, com a utilização de isopropanol, DMF e diclorometano.

3) Após essa etapa, a resina é colocada no dessecador e é realizada a etapa de clivagem convencional descrita no capítulo 2.

4.5 - Ensaio Biológico

- Testes de inibição de tripsina

Os testes de inibição de tripsina foram realizados em parceria com o laboratório da professora Fátima Grossi Sá, utilizando a metodologia que emprega l-BApNA como substrato da tripsina. Tal experimento foi realizado utilizando-se L-BApNA como substrato e BPTI como controle positivo (Erlanger *et al.*, 1961; Kakade, Simons & Liener, 1969).

1) Utilização do composto benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) como substrato.

2) São aplicados em poços de placa de elisa de 0,2 a 1,0 mL das soluções peptídicas de interesse, em triplicata, e o volume final ajustado para 1,0 mL com água MilliQ.

3) Adiciona-se a cada poço, previamente acondicionado em banho maria a 37°C, 1,0 mL de solução de tripsina (0,05 mg/mL de HCl 0,001 N) e após 5 min., 7,0 mL de BAPNA (0,3 mg/mL de tampão Tris 50 mM, pH 8,2, contendo CaCl₂ 20 mM).

4) Interrupção da reação após 10 minutos com a adição de 1,0 mL de ácido acético a 30%.

5) A placa é lida a uma absorbância de 410 nm.

A tripsina, EC 3.4.21.4 (T-8253, 12700 unidades/mg proteína), foi obtida da Sigma Chemical Co. (*St. Louis, E.U.A.*), assim como o BAPNA (N^o-benzoil-DL-arginina p-nitroanilida, B-4875).

- Testes de inibição de agregação plaquetária

Método 1: Impedância Elétrica (Realizado no Hospital Sarah Kubitschek pelo funcionário Guilherme Brand)

A amostra de sangue total é diluída 1:1 com solução salina e colocada em uma cubeta na qual está inserido um eletrodo de paládio. O teste foi realizado utilizando um Agregômetro (*Crono-log, U.S.A*) e ADP como agente estimulante de agregação.

- 1) Coleta de sangue do mesmo doador para todos os testes.
- 2) Realização de um hemograma para quantificação de plaquetas por volume.
- 3) Diluição do sangue total 1:1 com solução salina.
- 4) Inserção do eletrodo na cubeta para a estabilização do sistema.
- 5) Adição dos agentes agonistas.

Teste realizado com menos de 3 horas depois da extração do sangue. Controle positivo utilizado foi um peptídeo sintético com atividade de inibição plaquetária demonstrada proveniente da literatura (Kim *et al.*, 2005) e o agente antiplaquetário ácido acetilsalicílico (aspirina).

Método 2. Espalhamento Plaquetário (Realizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo pesquisador Joseph Aslan)

A atividade inibitória de agregação plaquetária foi determinada de acordo com o protocolo proposto por Aslan e colaboradores em 2012, no qual é utilizado o método de microscopia de interferência diferencial de contraste (DIC) para caracterização de mudanças morfológicas plaquetárias em tempo real.

O método consiste em:

1) Preparação de plaquetas – isolamento e purificação de plaquetas humanas.

- Amostras de sangue total de voluntários são coletadas em seringas contendo citrato de sódio a uma concentração final de 0,38%. Sangue anticoagulado aquecido é adicionado.
- O sangue anticoagulado é centrifugado por 20 minutos ($200 \times g$) e o sobrenadante rico em plasma é recolhido. Uma série de centrifugações são realizadas de forma a resgatar amostras ricas em plasma.
- As plaquetas são contadas por meio de um hematocítômetro e a concentração das plaquetas é ajustada para $2 \times 10^8/\text{mL}$. As plaquetas devem ficar por, no máximo, 4 horas a temperatura ambiente antes de serem utilizadas para análises de adesão.

2) Ensaio de adesão estática

- Fibrinogênio é imobilizado em placas de vidro.
- Plaquetas são tratadas com cada um dos seis peptídeos ($65\mu\text{M}$).
- Incubação por 45 minutos a 37°C graus.
- Visualização das placas no microscópio DIC. Softwares são utilizados para quantificar o grau de adesão e a área superficial de plaquetas aderentes.

3) Ensaio de espalhamento em tempo real

- Revestimento do centro da placa com 150 microlitros de proteínas adesivas por 1 hora a temperatura ambiente. Lavagem com PBS e bloqueio com 150

microlitros de BSA por 1 hora a temperatura ambiente. Lavagem repetida por mais três vezes com PBS.

- Placas são colocadas na câmara de observação
- Plaquetas são tratadas com agonista e aquecidas a 37° C graus. Gentilmente, são pipetados 150 microlitros de plaquetas na câmara de observação (Concentração final de 2×10^7 /mL).

O experimento foi realizado três vezes para cada amostra.

4.6 - Caracterização dos peptídeos de interesse

O processo de caracterização dos peptídeos, que inclui a determinação da massa molecular e da estrutura primária foi realizado por meio de espectrometria de massa, pelas técnicas MALDI-TOF, utilizando os espectrômetros *AutoFlexSpeed* e *Ultraflex III* MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics). O estudo de mobilidade iônica do peptídeo PSLEM 1002 foi realizado com a utilização do espectrômetro *Ion Mobility Synapt G1 e G2 HDMS* (Waters Co. Milford-USA). As análises por ionização eletrospray (ESI) foram realizadas em um espectrômetro de massa *micrOTOF-Q II* (Bruker Daltonics)

- Verificação de massa molecular após a síntese química: Ultraflex III (MALDI-TOF MS) no modo refletor com calibração externa, usando a mistura de calibração Bruker contendo bradicinina, angiotensinas I e II, substância P, bombesina, substrato de renina, ACTH e insulina. O sequenciamento *de novo* dos peptídeos foi realizado através da fragmentação do precursor, usando N₂ como gás indutor de dissociação, sendo que a pressão da célula de colisão foi mantida em $2,8 \times 10^{-6}$ torr.

- 1) Retirar um pouco da amostra seca, solubilizar em água Milli-Q e com a ajuda de um microeppendorf misturar 2µL de amostra para 6µL de matriz α -Cyano-4-Hydroxycinnamic acid (α -Cyano) preparada nas proporções: 5mg de α -Cyano, 250 µL de ACN, 200 µL de água Milli-Q e 50 µL de TFA (3%).

- 2) Aplicação de dois µL de cada amostra, em triplicata, em placas anchorship (384).

- 3) Secagem da placa à temperatura ambiente

- 4) Análise da placa utilizando MS para conferência da massa e MS/MS para o sequenciamento de novo e verificação da sequência.

- Estudo da mobilidade iônica

- 1) Retirar um pouco da amostra seca, solubilizar em água Milli-Q e dissolver em calibrantes específicos do espectrômetro.

- 2) Inserir amostra em agulha de vidro específica do espectrômetro.

- 3) Análise da amostra.

4.7. - Elucidação da estrutura por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Essa etapa foi realizada em parceria com os laboratórios do Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear, localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro, e do Instituto Militar de Engenharia (IME) com os professores Fabio Almeida e Figueroa Villar. O projeto de parceria da Embrapa com o IME foi aprovado com o professor Figueroa (Edital Conjunto Capes - Embrapa nº 001/2011), para a utilização de equipamentos para a aquisição de espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) em aparelhos de 800 MHz (Bruker BioSpin) e de 600 MHz (Agilent Technologies). A análise de dados tal como o processamento de espectros, bem como o assinalamento das estruturas e os cálculos serão executados no LEM.

Os experimentos foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III 18,8 T (800 MHz para hidrogênio) a uma temperatura controlada de 298 K. Utilizou-se H₂O/D₂O (60%/40%) como solvente e trabalhou-se com a amostra a uma concentração de 1 mmol/L em um volume de 0,6 mL.

Foram adquiridos os espectros TOCSY, HSQC (¹H-¹³C), NOESY e DQF-COSY. Utilizou-se o sinal da H₂O a 298 K em 4,773 ppm para referenciar o espectros. Os parâmetros de aquisição destes experimentos podem ser observados na Tabela 4. O experimento HSQC foi dividido em região aromática e região alifática. No HSQC alifático utilizou-se uma janela espectral de 80 ppm, com o centro da janela em 39 ppm; no HSQC aromático utilizou-se uma janela espectral de 40 ppm, com o centro da janela em 124 ppm. O experimento HSQC adquirido foi HSQC editado, em que -CH e -CH₃ são sinais positivos e -CH₂ são sinais negativos. O experimento TOCSY foi adquirido utilizando a sequência MLEV para spin-lock (Levitt, 1986) e a técnica *excitation sculpting* para eliminação do sinal da água (Huang e Shaka, 1995). Todos os experimentos foram adquiridos no modo sensível à fase.

Tabela 6: Parâmetros de aquisição para os experimentos de RMN 2D. TD = *time domain*; NS = número de scans; NI = número de incrementos; DS = *dummy scans*.

Experimentos	Parâmetros	F1	F2
TOCSY	TD	4096	512
	NS	96	
	NI	512	
	DS	512	
HSQC alifático	TD	1024	200
	NS	216	
	NI	200	
	DS	256	
HSQC aromático	TD	1024	200
	NS	128	
	NI	200	
	DS	256	
NOESY	TD	4096	512
	NS	128	
	NI	512	
	DS	256	
COSY	TD	4096	512
	NS	64	
	NI	512	
	DS	256	

Foram utilizados os valores de 60 ms e 130 ms para os experimentos de TOCSY e NOESY, respectivamente.

Os FIDs obtidos foram processados utilizando os programas NMRPipe e NMRDraw (Delaglio *et al.*, 1995). Utilizou-se o programa NMRView 5.0 (Kirby *et al.*, 2004) para assinalamento dos espectros. Para o processamento, aplicou-se a função “cosine-bells” em cada dimensão e também uma função polinomial para correção da linha base. Os ajustes de fase foram realizados manualmente utilizando o programa NMRDraw.

Os cálculos estruturais utilizando parâmetros obtidos por experimentos de RMN foram realizados utilizando o programa CNS_Solve (Brunger *et al.*, 1998 e Brunger, 2007) (método de simulated annealing). Os volumes dos NOEs assinalados pelo espectro de NOESY foram integrados e convertidos em restrições de distância: 2,8, 3,5 e 5,0 Å para intensidades fortes, médias e fracas, respectivamente.

Os deslocamentos químicos dos átomos H_{α} , H_{β} , C_{α} , C_{β} e H_N foram utilizados para calcular os ângulos de diedros pelo programa TALOS (Shen *et al.*, 2009).

As estruturas calculadas foram visualizadas pelo programa MOLMOL (Koradi *et al.*, 1996) e as 20 estruturas mais estáveis (de menor energia) foram sobrepostas. O valor do RMSD para estas 20 estruturas sobrepostas também foi calculado pelo programa MOLMOL. O gráfico de Ramachandran foi gerado pelo programa DeepView Swiss/PDBviewer.

Para observar possíveis ligações de hidrogênio do H_N , foram realizados experimentos de TOCSY com baixo número de *scans* e incrementos a diferentes temperaturas (278, 298 e 308 K) (Jung *et al.*, 2004). Tais experimentos também foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance III 18,8 T (800 MHz para hidrogênio). Utilizou-se H_2O/D_2O (60%/40%) como solvente, a uma concentração de 1 mmol/L em um volume de 0,6 mL. Foi utilizado o valor de 60 ms como mixing time e os espectros foram referenciados pelo sinal da H_2O : 4,964 ppm a 278 K, 4,773 ppm a 298 K e 4,676 a 308 K. Os dados de aquisição podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 7: Dados de aquisição para os experimentos de TOCSY para determinação de ligações de hidrogênio. TD = *time domain*; NS = número de scans; NI = número de incrementos; DS = *dummy scans*.

Dados	F1	F2
TD	4096	60
NI	60	
NS	8	
DS	32	

Os FIDs obtidos foram processados como descrito anteriormente.

Foram realizados os cálculos de CSI (Chemical Shift Index) em que o valor do deslocamento químico dos átomos de C_{α} e C_{β} foi subtraído do valor do deslocamento químico dos mesmos átomos dos mesmos resíduos de aminoácido quando em uma

estrutura randômica. Segundo essa metodologia, quando o valor da subtração for negativo, atribui-se valor “-1” para o CSI, o valor “+1” quando o valor da subtração for positivo, e “0” quando o resultado da subtração também for zero (Wishart *et al.*, 1992 e Wishart *et al.*, 1995).

5– RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Identificação do peptídeo

Após análise de uma biblioteca de cDNA contendo sequências de aminoácidos que são transcritos nas glândulas dérmicas do anuro *H. punctatus*, foi detectada uma sequência codificadora de um peptídeo possuindo um motivo KGD. Esse tripeptídeo compõe uma estrutura primária de 15 resíduos com duas cisteínas nas posições 4 e 14, sendo a sequência completa escolhida HTGCWYTSK**GD**LICS (Figura 13). A sequência em questão foi escolhida com base na presença da lisina anterior à histidina, à qual sofreria uma hidrólise quando em contato com enzimas específicas.



Figura 13. Alinhamento da sequência da biblioteca de cDNA que codifica para os respectivos aminoácidos. O peptídeo de interesse é mostrado em vermelho.

Para estudar a atividade dessa molécula, três análogos foram sintetizados quimicamente contendo R (Arg), K (Lys) e H (His) (Tabela 8) como substituintes na posição do resíduo de aminoácido da posição nove. Os peptídeos sintéticos foram amidados na porção C terminal devido ao fato de que uma gama de proteínas ADAM com motivos RGD provenientes de humanos possuem tal amidação (Takahashi, 2001).

Tabela 8. Sequência de aminoácidos dos três peptídeos sintetizados.

Peptídeos	Sequência de Aminoácidos	[M+H] ⁺
PSLEM 1002_KGD	HTG C WYTSK GDLICS -NH ₂	1669,7
PSLEM 1018_RGD	HTG C WYTSR GDLICS -NH ₂	1697,7
PSLEM 1019_HGD	HTG C WYT SHGDLICS -NH ₂	1678,7

Esses peptídeos foram, então, submetidos à oxidação para a formação das ligações dissulfeto e purificados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa tanto em etapas semi-preparativas quanto analíticas e caracterizados utilizando espectrometria de massa. As frações eluídas em diferentes tempos de retenção foram submetidas a análises de mobilidade iônica as quais mostraram diferenças entre os tempos de migração das formas reduzida e oxidada. Um miligrama de cada peptídeo purificado foi então submetido à espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) para que suas estruturas tridimensionais pudessem ser calculadas e elucidadas.

O peptídeo PSLEM 1002 apresenta similaridades consistentes com a alça ativa inibitória das proteínas da família das desintegrinas. A presença de duas cisteínas, constringindo uma alça, na qual está presente um sítio ativo tripeptídico de ligação KGD são indícios para acreditarmos na possibilidade de que tal peptídeo possua atividade antitrombótica semelhante à encontrada nas desintegrinas.

O resíduo de aminoácido da lisina, presente no motivo ativo, foi intercambiado por arginina e por histidina, como mencionado acima. Tal substituição foi realizada pelo fato de a maioria das desintegrinas encontradas naturalmente possuírem o aminoácido arginina em tal posição. A histidina, por sua vez, foi utilizada devido à similaridade estrutural com os outros dois resíduos além de ser frequentemente identificada em reações enzimáticas e também possuir papel importante no auxílio da estabilização de estruturas proteicas devido à presença do anel imidazólico.

A tabela 9 mostra algumas sequências de aminoácidos de desintegrinas provenientes da literatura juntamente com os peptídeos sintéticos desenhados do nosso estudo.

Tabela 9. Relação de peptídeos sintéticos do presente estudo apresentados juntamente com peptídeos de atividade antiplaquetária estabelecida RGD e KGD provenientes da literatura. Os peptídeos provenientes da literatura dizem respeito à fragmentos de proteínas escolhidos de acordo com a porção ativa constricta por cistina. O restante da proteína foi omitido da tabela.

Peptídeo	Sequência de Aminoácidos
Peptídeo KGD	HTGCWYTSKGDLIC _S -NH ₂
Peptídeo RGD	HTGCWYTSRGDLIC _S -NH ₂
Peptídeo HGD	HTGCWYTSHGDLIC _S -NH ₂
Ocellatusina	C KMA RGD NMHDY C
Echistatina	C KRA RGD DMDDY C....
Eristotatina	C RVA RGD WNDDY C
Flavoridina	C RIA RGD DFPDDR C
Kistrina	C RIP RGD MPDDR C
Barbourina	CRVA KGD WNDDTC
Piscivostatina	CHRA KGD DLDDYC

5.2 – Caracterização e purificação dos peptídeos sintéticos

O peptídeo KGD, de sequência original, não modificada, foi denominado PSLEM 1002, sendo o PSLEM 1018 referente ao RGD e o PSLEM 1019 referente ao HGD, como mostrado na tabela 6.

- PSLEM 1002 - KGD - Caracterização

A massa da forma reduzida esperada $[M+H]^+$ para o peptídeo KGD, denominado PSLEM 1002 é 1669,72 Da. O espectro de massa (MS) mostrado na figura 14 evidencia a massa experimental, confirmando o valor e massa esperado para a molécula. Além do íon desejado, esse com a maior abundância relativa, também estão presentes no espectro íons relacionados à massa de adutos de sódio (+22 Da) e potássio (+38 Da) além de íons de produtos indesejados provenientes da fase de síntese química e de clivagem, os quais devem ser eliminados por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de fase reversa.

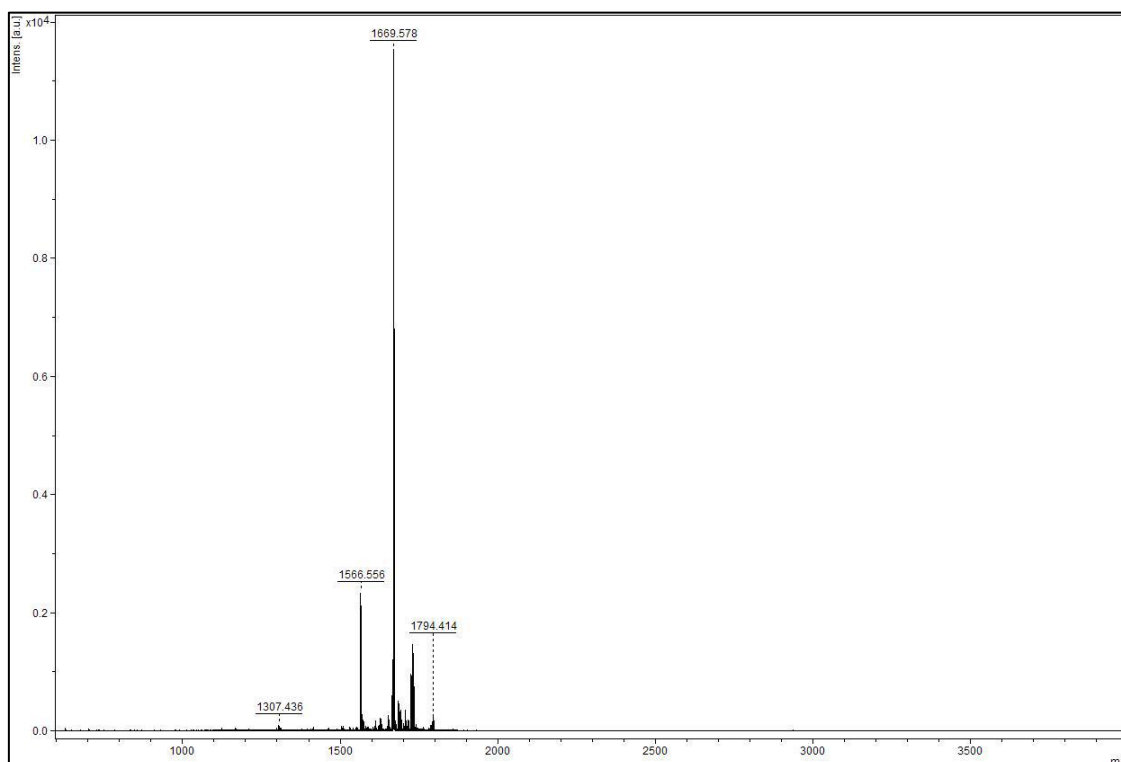


Figura 14. Espectro de Massa referente ao peptídeo PSLEM 1002, KGD, logo após a síntese. O espectro adquirido foi realizado para conferência da massa correta após processo de síntese. O íon com maior abundância relativa possui $[M+H]^+ = 1669,578$ Da referente à massa da forma reduzida do peptídeo em questão.

Para a confirmação da estrutura primária do peptídeo sintetizado, procedeu-se à fragmentação do íon correspondente mostrado na figura 17. Tal fragmentação é mostrada na figura 15 por meio de um espectro de massa de MS/MS. O processo de fragmentação por MS/MS acontece por duas etapas de MS acopladas, o que nos possibilita a análise de séries específicas de íons, no caso série y e série b, para a confirmação da sequência primária do íon de interesse (Biemann e Papayannopoulos, 1994).

A ligação peptídica se quebra, dando origem a fragmentos típicos, no caso os íons da série b e da série y. Tais íons possuirão diferentes massas de acordo com o radical da cadeia lateral de cada aminoácido. As cadeias y e b são complementares e podem ser dessa forma utilizadas para a confirmação uma da outra (Cantu *et al.*, 2009).

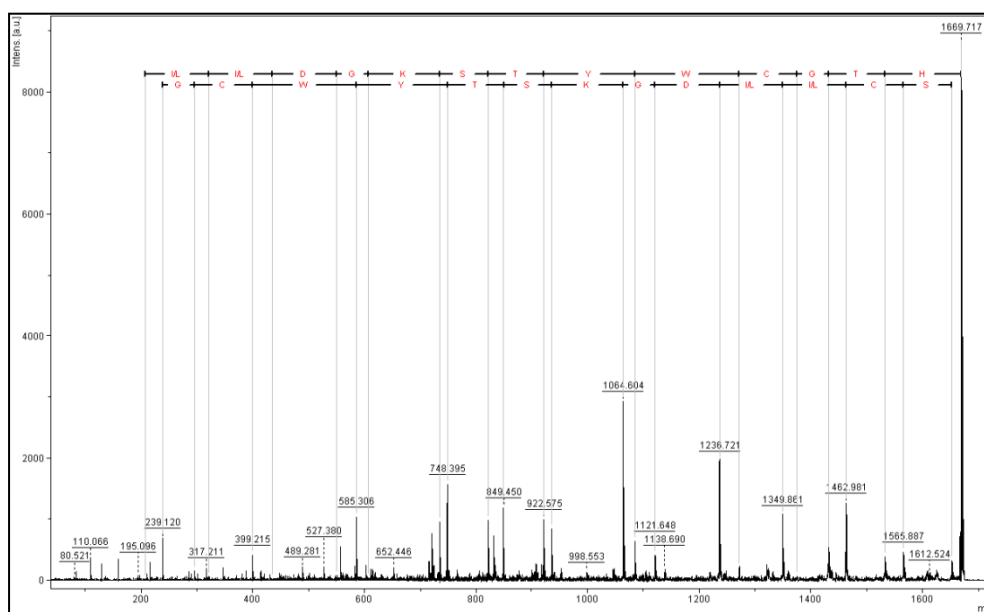


Figura 15. Espectro de massa de MS/MS correspondente a fragmentação do íon precursor referente ao peptídeo PSLEM 1002, KGD de $[M+H]^+ = 1669,578$ Da. Tal fragmentação evidencia a correta sequência primária do mesmo.

No caso do sequenciamento do peptídeo PSLEM 1002, é possível observar que o íon precursor utilizado foi àquele referente à massa da molécula na forma reduzida. Isso se deve ao fato de que, muitas vezes, devido à forma oxidada do íon ser bastante estável, o processo de fragmentação é dificultado, gerando um padrão de íons derivados que não se mostra ideal para o sequenciamento.

- PSLEM 1002 - KGD - Purificação

O cromatograma referente ao peptídeo KGD (PSLEM1002) é apresentado na figura 16. Todas as frações foram coletadas manualmente e analisadas por espectrometria de massa a fim de determinar a fração de interesse.

O processo de purificação é necessário devido à diversas impurezas resultantes da síntese química, além da presença de fragmentos de peptídeo os quais não tiveram todos os aminoácidos acoplados durante esse processo, possuindo massas menores e incompletas.

Inicialmente, a fração de interesse possui a massa $[M+H]^+ = 1669,7$ Da; por se tratar da forma reduzida do peptídeo PSLEM 1002. Na primeira etapa de purificação, foi utilizada uma coluna C_{18} semipreparativa. Foi isolada a fração reduzida, na qual as pontes dissulfeto ainda não foram formadas. Tal fração foi acumulada por meio de repetições da etapa cromatográfica semipreparativa. Ela foi então congelada e liofilizada de maneira a eliminar a acetonitrila (ACN) presente na amostra.

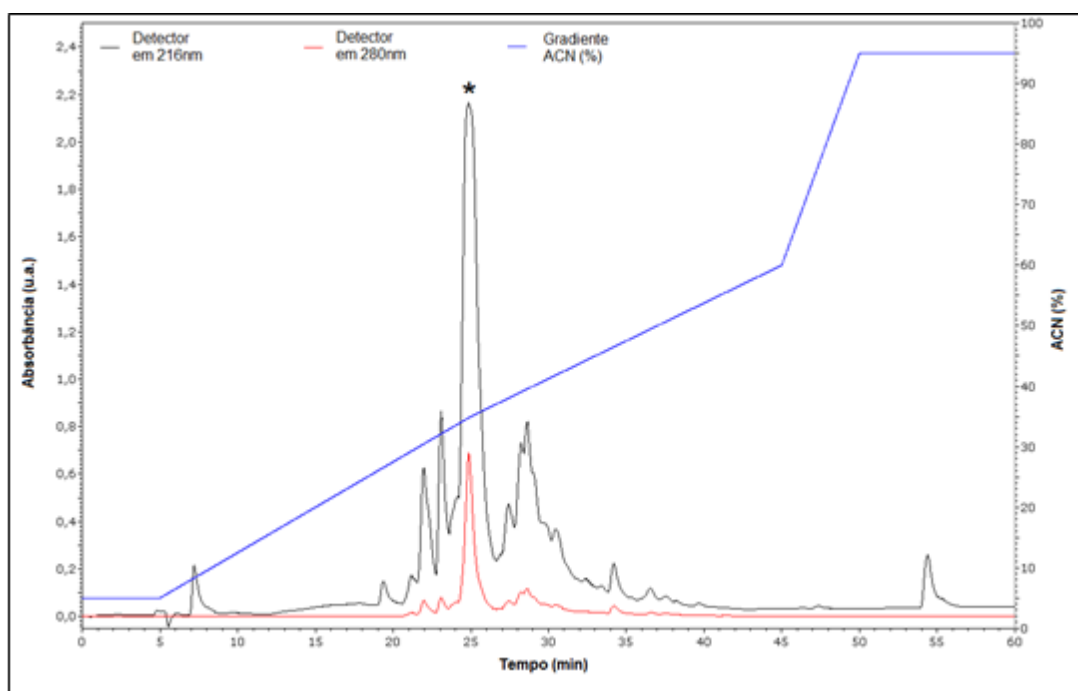


Figura 16. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente ao peptídeo PSLEM 1002, KGD obtido após a síntese com a utilização de uma coluna semipreparativa C_{18} . *Fração correspondente ao íon de massa $[M+H]^+ = 1669,578$ Da.

Por se tratar de um peptídeo contendo duas cisteínas, estando posicionadas em terminais opostos, encontramos duas frações cromatográficas de interesse, uma vez que o peptídeo na forma oxidada interage diferentemente com a fase estacionária da coluna do que o peptídeo na forma reduzida. É esperado que o peptídeo oxidado possuísse um tempo de eluição menor quando comparado com o peptídeo reduzido. Haja vista que possui uma estrutura constricta e menos volumosa, possui menos pontos de interação com a fase estacionária, facilitando a eluição pela fase móvel. Tal comportamento pode ser observado no cromatograma analítico apresentado na figura 17 no qual a primeira fração corresponde à forma oxidada da molécula.

O processo de oxidação foi realizado em água Milli-Q, na presença de oxigênio proveniente do ar durante 48 horas. O oxigênio do ar possibilitou a oxidação do peptídeo, levando à formação das pontes dissulfeto entre as cisteínas.

Após a oxidação da amostra, iniciou-se outra etapa de purificação, na qual foi utilizada uma coluna analítica C₁₈ para o isolamento da fração desejada oxidada do restante da porção ainda reduzida na amostra. Tal cromatograma é mostrado na figura 17, na qual a primeira absorvância refere-se à porção oxidada e a segunda à porção reduzida.

Com o passar das horas, a amostra sendo utilizada para a cromatografia permanecia por mais tempo em solução, aumentava-se a abundância da fração oxidada e diminuía-se a abundância da fração reduzida, evidenciando que o processo de oxidação ainda estava acontecendo. A fração que pode ser observada entre as duas frações de maior absorvância diz respeito a impurezas, não devendo ser coletada.

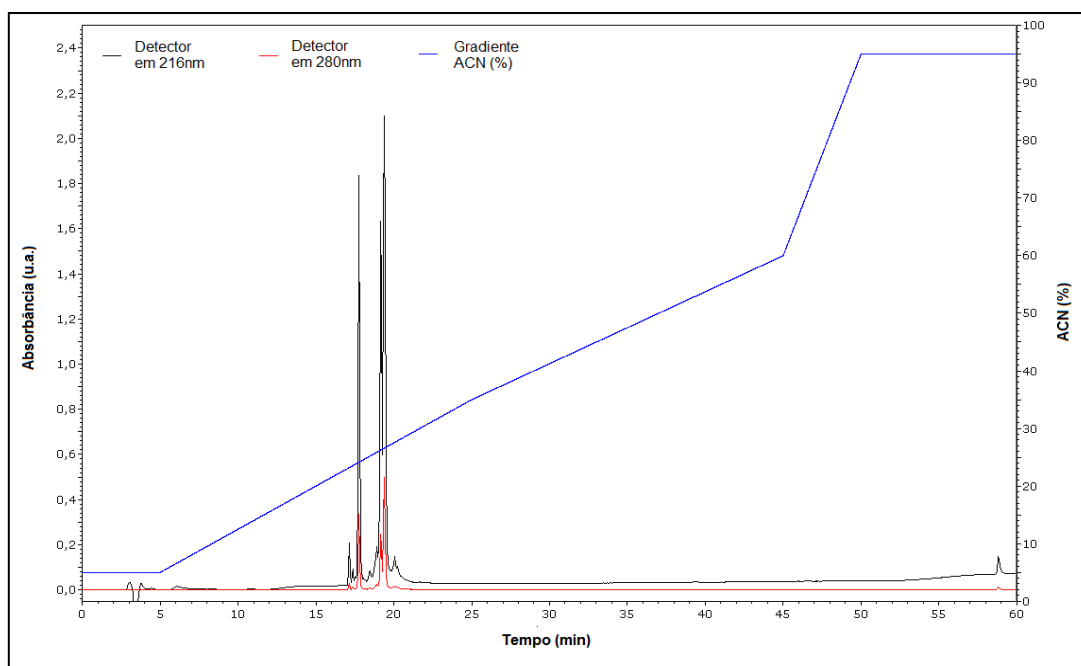


Figura 17. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente ao peptídeo PSLEM 1002, KGD, após a purificação semipreparativa com uma coluna C_{18} . Tal cromatograma foi obtido com a utilização de uma coluna analítica (C_{18}) e as duas frações de maior intensidade dizem respeito à forma oxidada e reduzida do peptídeo, respectivamente.

O espectro de massa referente à distribuição monoisotópica da fração oxidada é mostrado na figura 18 e a sua ampliação evidencia o grau de pureza do material, livre de íons adicionais. É possível notar um valor de massa com duas unidades de massa a menos do que o observado anteriormente referente à perda de dois hidrogênios durante a formação da ponte dissulfeto entre as cisteínas.

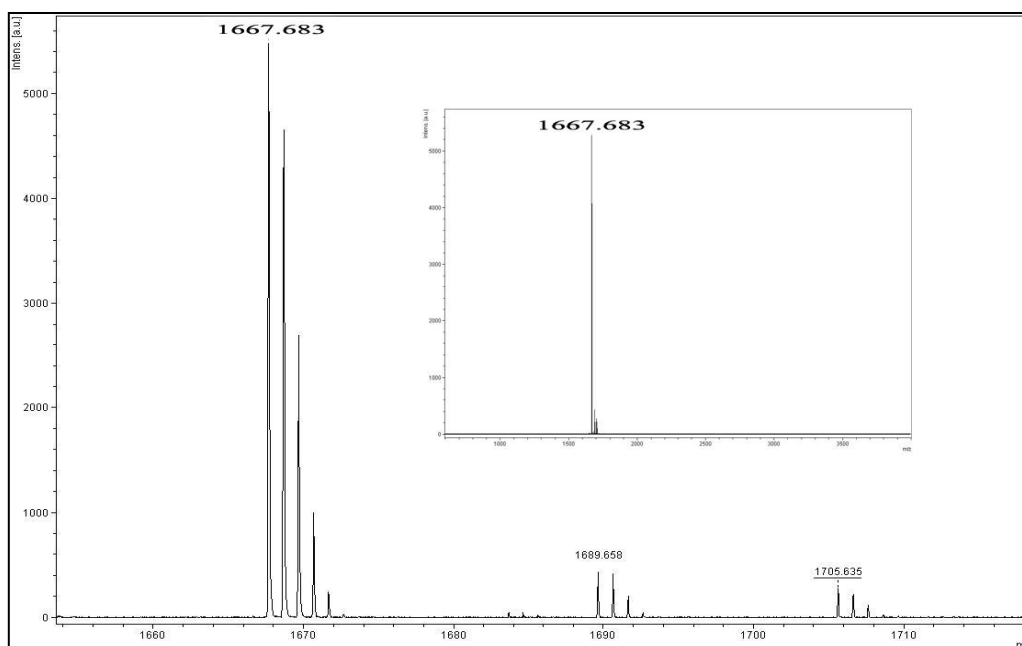


Figura 18. Espectro de massa referente ao peptídeo PSLEM 1002, KGD, mostrando a distribuição monoisotópica e a pureza da forma oxidada desejada.

As análises cromatográficas mostradas anteriormente foram monitoradas a 216 e 280nm, referentes às absorvâncias características da ligação peptídica e do anel indólico do triptofano respectivamente (Shibue *et al.*, 2005). O método de eluição por gradiente foi empregado com o objetivo de obtenção de melhor resolução de detectabilidade tal como, também, devido ao menor tempo de análise (Collins *et al.*, 2009).

O peptídeo com a sequência primária natural foi, ainda, submetido a análises de mobilidade iônica (Figura 19) com o objetivo de identificar a diferença de mobilidade entre as frações oxidada e reduzida dentro de uma mesma amostra.

Verificamos, por meio de tal experimento, que a forma oxidada do peptídeo possui estruturação mais compacta e se difunde mais rapidamente pelo gás quando comparada à forma reduzida. A estruturação em alça da forma oxidada está diretamente ligada à existência de atividade biológica no caso das desintegrinas e o nível de estabilidade da alça relaciona-se ao espaço de ligação do sítio ativo nas integrinas.

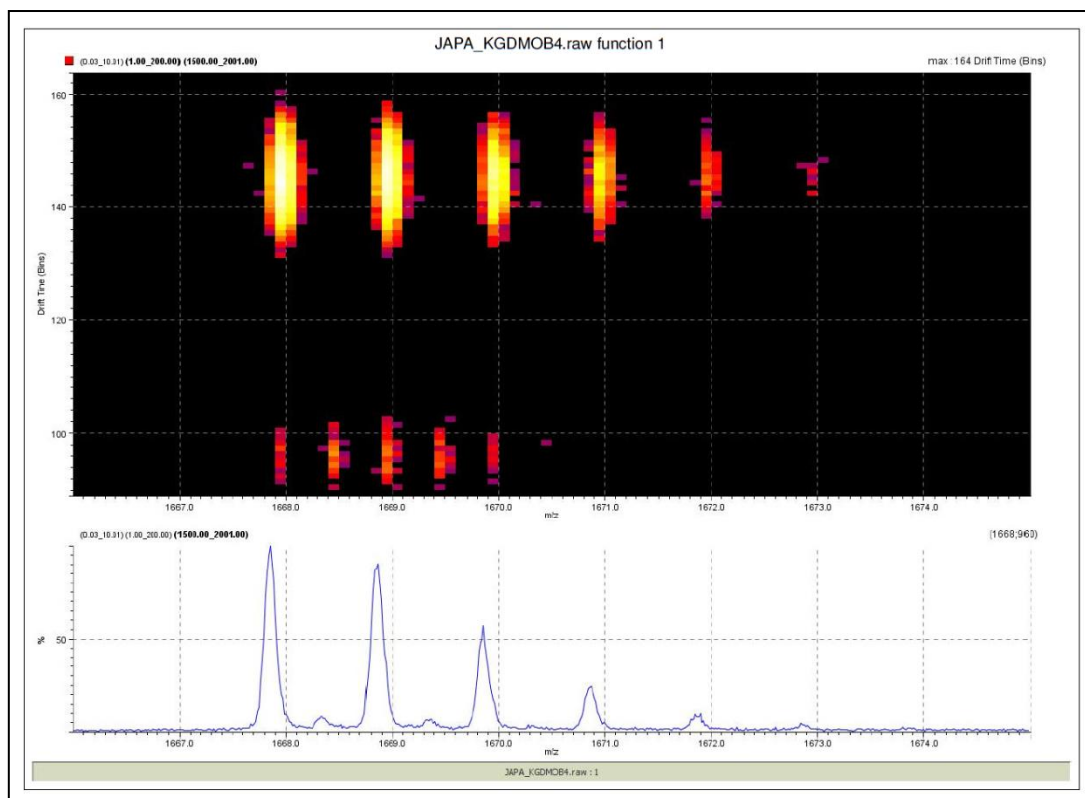


Figura 19. Análise da mobilidade iônica do peptídeo PSLEM 1002 mostrando que o peptídeo na forma oxidada tem diferente mobilidade do que o peptídeo na forma reduzida devido a sua diferença conformacional.

- PSLEM 1018 (RGD), PSLEM 1019 (HGD) – Caracterização e Purificação.

Uma vez que os processos de caracterização e purificação realizados para os outros dois análogos sintéticos substituídos foram os mesmos, os resultados serão apresentados em conjunto.

Assim como para o peptídeo KGD, os espectros de massa e as figuras referentes aos cromatogramas de purificação dos peptídeos análogos podem ser observados nas figuras seguintes.

A massa teórica esperada $[M+H]^+$ para os peptídeos PSLEM 1018 e PSLEM 1019 são 1697,73 Da e 1678,69 Da respectivamente, ambos nas suas formas reduzidas. É possível observar nos espectros de massa (MS) a seguir, nas figuras 20 e 21, a presença dos íons referentes aos peptídeos desejados com massa experimental adequada.

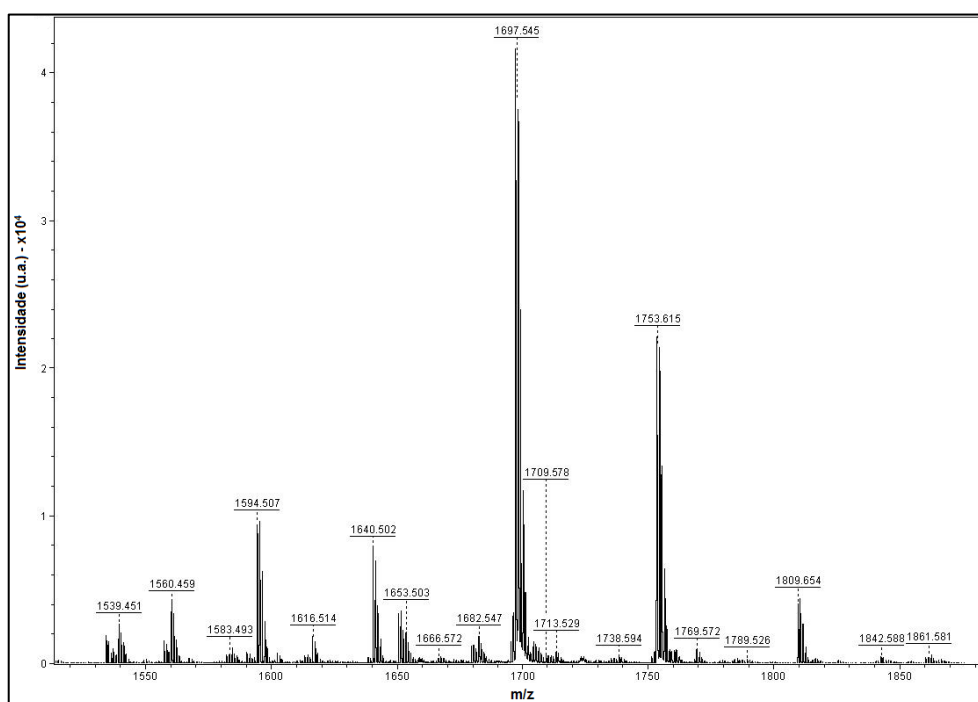


Figura 20. Espectro de Massa referente ao peptídeo PSLEM 1018, RGD, logo após a síntese. Espectro adquirido foi realizado para conferência da massa correta após o processo de síntese. O íon com maior abundância relativa possui $[M+H]^+ = 1697,545$ Da referente à massa da forma reduzida do peptídeo em questão. Os outros íons no espectro correspondem à adutos do peptídeo RGD e a impurezas provenientes da síntese.

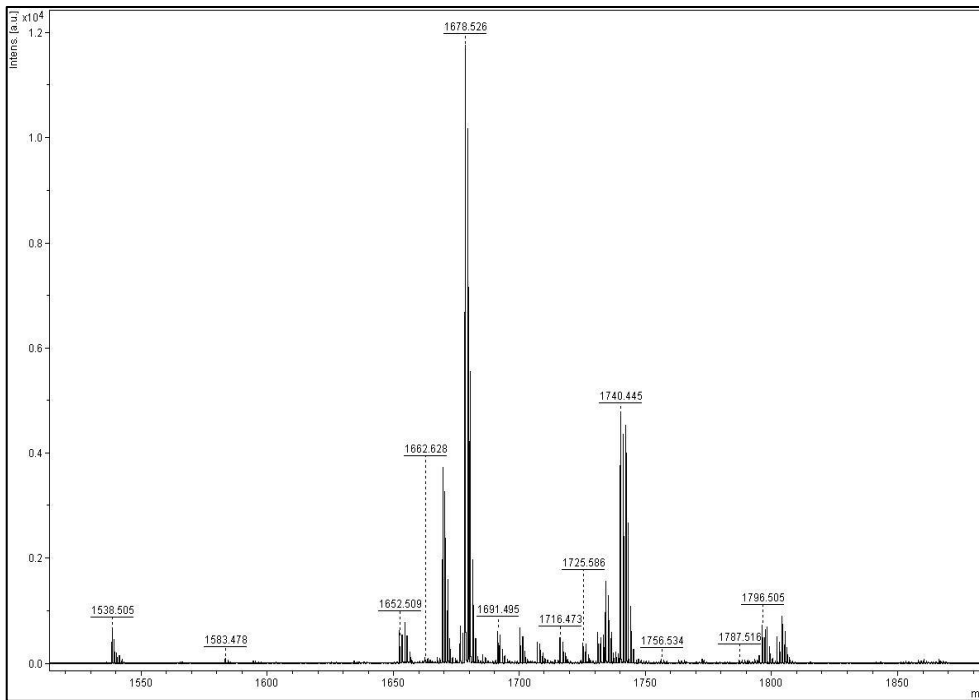


Figura 21. Espectro de Massa referente ao peptídeo PSLEM 1019, HGD, logo após a síntese. O íon com maior abundância relativa possui $[M+H]^+ = 1678,526$ Da referente à massa da forma reduzida do peptídeo em questão. Os outros íons no espectro correspondem à adutos do peptídeo HGD e a impurezas provenientes da síntese

Para a conferência da estrutura primária do peptídeo, realizamos uma fragmentação por MS/MS no íon desejado referente ao peptídeo PSLEM 1018. O espectro resultante desse processo pode ser conferido na figura 22. O sequenciamento dos fragmentos do íon precursor foram feitos via séries y e b.

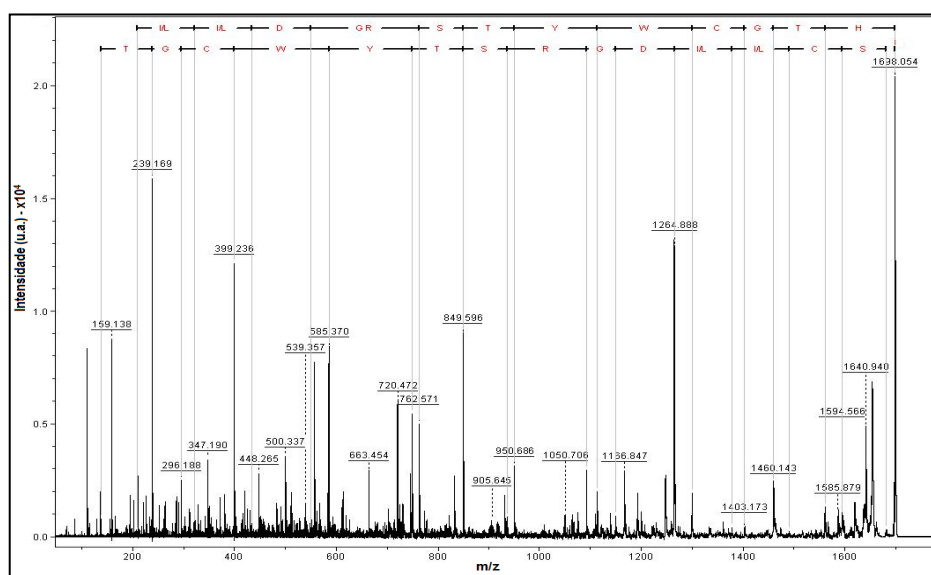


Figura 22. Espectro de massa de MS/MS referente à fragmentação o íon precursor 1698,0 correspondente ao peptídeo PSLEM 1018, RGD.

O mesmo processo foi realizado para o íon referente ao peptídeo PSLEM 1019 e o espectro em questão é mostrado na imagem 23.

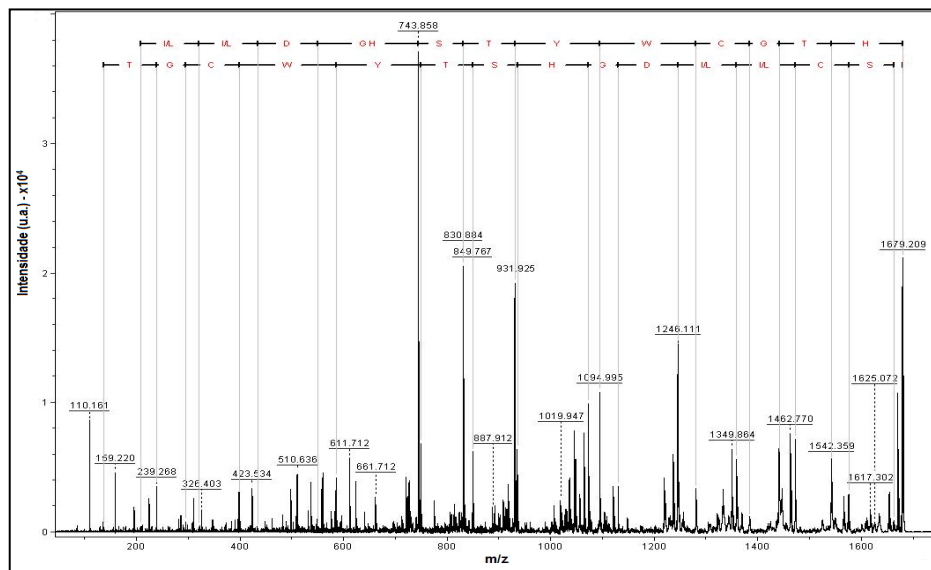


Figura 23. Espectro de massa de MS/MS do peptídeo PSLEM 1019, HGD. O espectro corresponde a fragmentação do íon precursor $[M+H]^+ = 1679,2$ Da mostrado no espectro anterior. Evidencia a correta sequência primária do peptídeo.

Devido às impurezas provenientes da síntese e da clivagem, foram necessários processos adicionais de purificação. Os mesmos métodos de cromatografia líquida de alto desempenho e as mesma colunas foram utilizados para todos os três peptídeos.

O cromatograma a seguir, figura 24, evidencia a primeira purificação semipreparativa do peptídeo PSLEM 1018 após a síntese. A fração em destaque com um asterisco diz respeito à fração de interesse na qual o peptídeo está na sua forma reduzida.

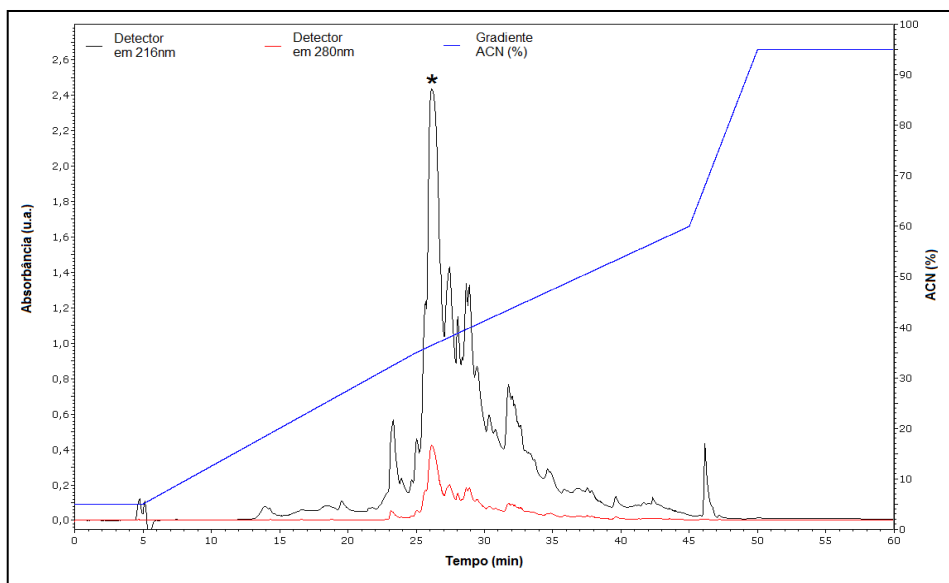


Figura 24. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente ao peptídeo PSLEM 1018, RGD obtido após a síntese com a utilização de uma coluna semipreparativa (C₁₈). *Fração correspondente ao íon de massa $[M+H]^+ = 1698,0$ Da.

O mesmo processo de purificação foi realizado para o peptídeo PSLEM 1019 e o respectivo cromatograma é mostrado na figura 25.

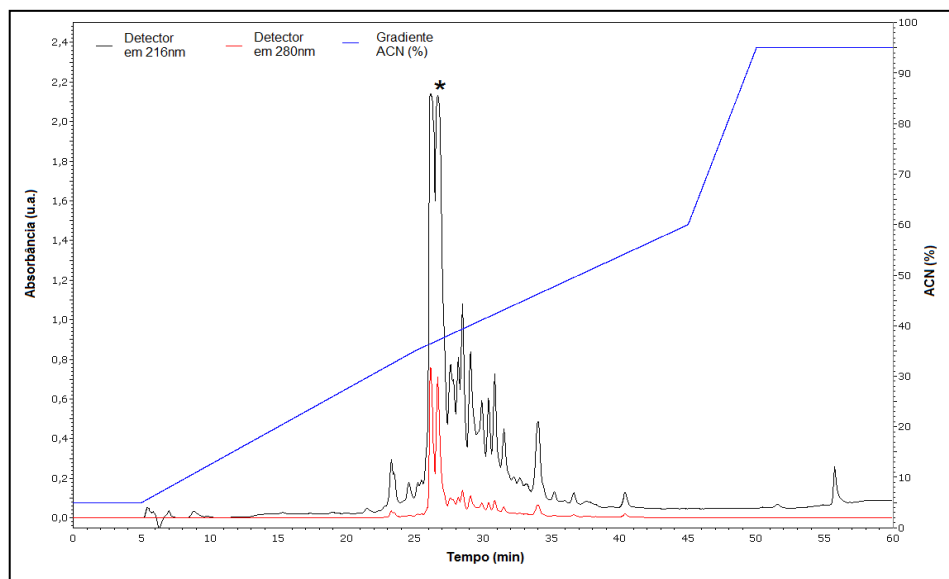


Figura 25. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente ao peptídeo PSLEM 1019, HGD obtido após a síntese com a utilização de uma coluna semipreparativa (C₁₈). *Fração correspondente ao íon de massa $[M+H]^+ = 1678,5$ Da.

É possível observar na figura 24 que o peptídeo PSLEM 1019 já inicia o seu processo de oxidação na primeira etapa de purificação. Esse comportamento é

evidenciado pela fração majoritária de interesse já apresentar-se de forma bipartida. O fato em questão pode estar acontecendo devido à interação da molécula com a fase estacionária da coluna, processo esse que facilitaria a oxidação do peptídeo. Parte da molécula interage com a fase estacionária ao mesmo tempo em que a parte solta do peptídeo é empurrada pela fase móvel, facilitando o envelhecimento estrutural.

A fração de interesse foi então submetida a um período de oxidação da mesma maneira que o peptídeo PSLEM 1002 e o cromatograma de HPLC referente à purificação analítica do peptídeo PSLEM 1018 é apresentado na figura 26.

A primeira fração corresponde à forma oxidada e a segunda fração corresponde à forma reduzida. É possível observar que a forma oxidada apresenta menor abundância do que a forma reduzida. Tal fato pode ter ocorrido devido ao tempo de exposição da amostra ao oxigênio. À medida que a amostra passa mais tempo exposta, mais oxidação ela sofre. No entanto, tal exposição é um fator delicado devido ao fato do peptídeo estar suspenso em água e à temperatura ambiente- o que pode ocasionar a sua degradação.

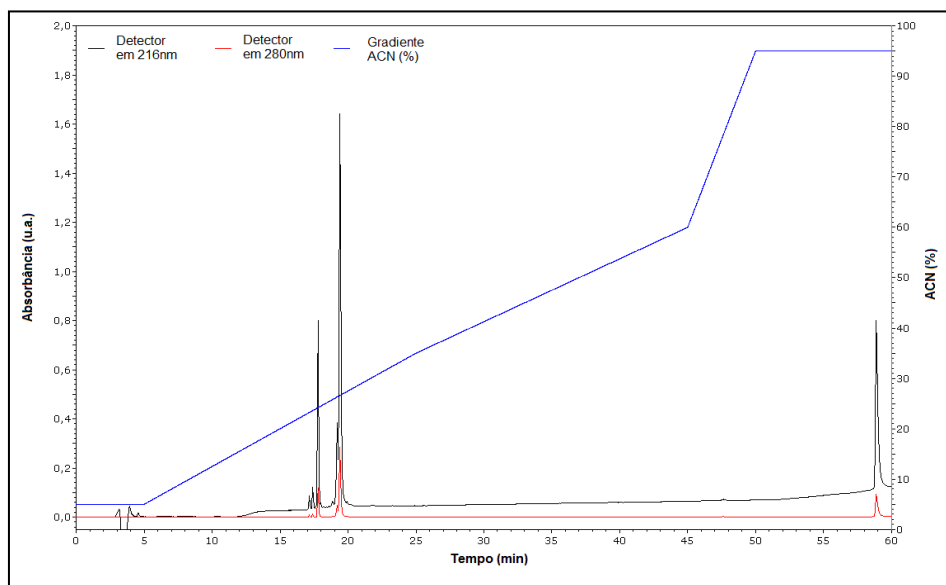


Figura 26. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente ao peptídeo PSLEM 1018, RGD, após a purificação semipreparativa com coluna C_{18} . Tal cromatograma foi obtido com a utilização de uma coluna analítica (C_{18}) e as duas frações majoritárias dizem respeito à forma oxidada e reduzida do peptídeo, respectivamente.

O mesmo processo foi realizado para o peptídeo PSLEM 1019 e o cromatograma analítico é mostrado na figura 27.

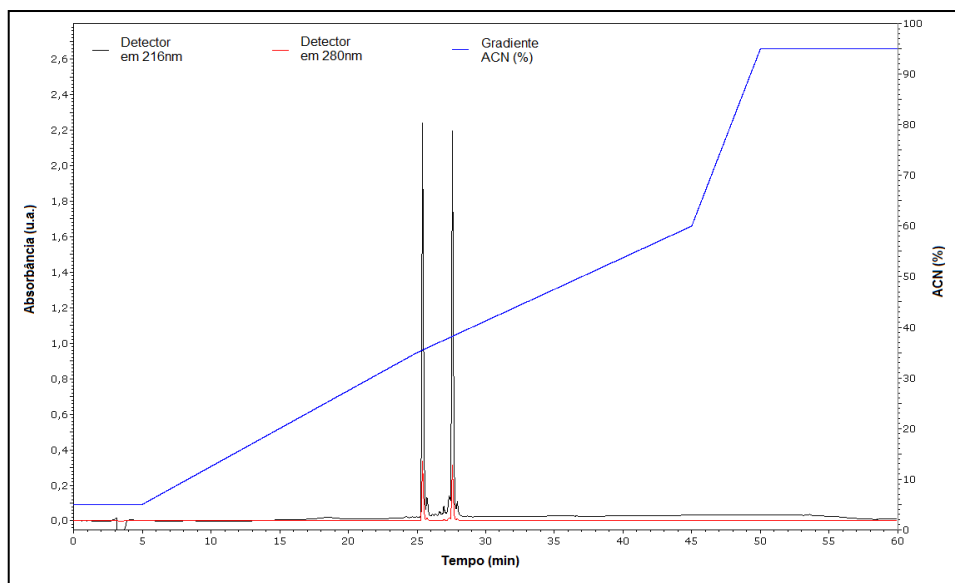


Figura 27. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente ao peptídeo PSLEM 1019, HGD, após a purificação semipreparativa (C_{18}). Tal cromatograma foi obtido com a utilização de uma coluna analítica (C_{18}) e as duas frações majoritárias dizem respeito à forma oxidada e reduzida do peptídeo, respectivamente.

As frações referentes aos peptídeos na forma oxidada foram acumuladas e tiveram a sua pureza verificada por espectrometria de massa. Os espectros referentes à pureza dos peptídeos tal como as suas distribuições monoisotópicas são mostrados para os peptídeos PSLEM 1018 e PSLEM 1019 nas figuras 28 e 29 respectivamente.

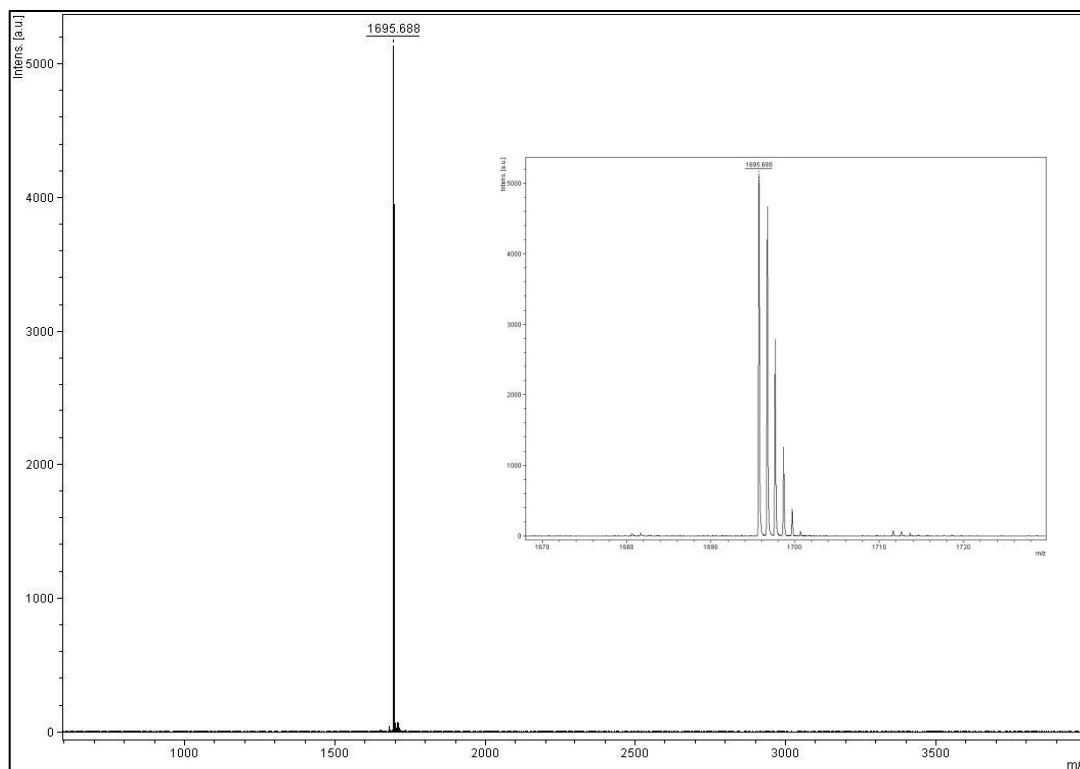


Figura 28. Espectro de massa referente ao peptídeo PSLEM 1018, RGD, mostrando a distribuição monoisotópica e a pureza da forma oxidada desejada.

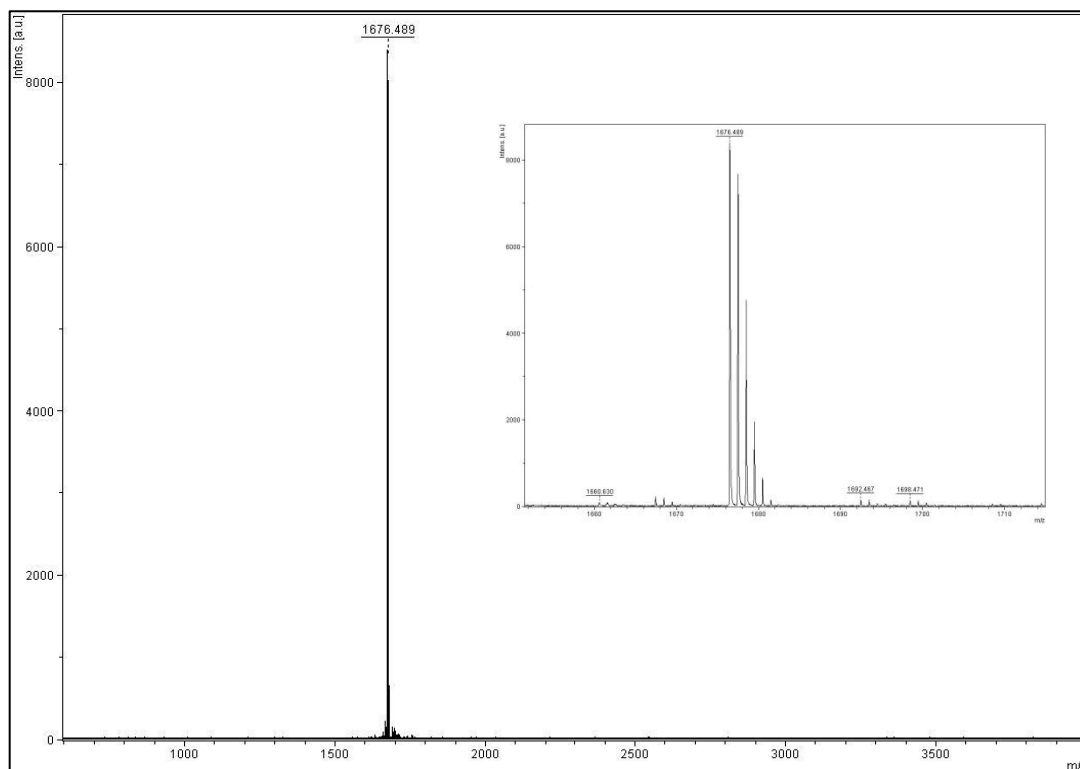


Figura 29. Espectro de massa referente ao peptídeo PSLEM 1019, HGD, mostrando a distribuição monoisotópica e a pureza da forma oxidada desejada.

Os resultados de caracterização e purificação evidenciaram o sucesso da síntese em fase sólida para os três peptídeos bem como a sua oxidação para a realização dos testes e determinações de estrutura.

5.3 - Experimento de inibição de agregação plaquetária

Os ensaios de inibição de agregação plaquetária foram realizados parcialmente no Hospital Sarah Kubitschek, mas devido a problemas de infra-estrutura e mão de obra, tiveram que ser realizados novamente com parceria com o Laboratório de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo pesquisador de pós doutorado Joseph Aslan.

Por se tratar de um teste realizado fora do ambiente físico do LEM, o que resulta em dificuldades relacionadas a burocracias de outras instituições, optamos por não fazer o ensaio com o peptídeo PSLEM 1019-HGD, por entendermos que, devido à semelhança entre as sequências, o mesmo também não apresentaria atividade.

Resultados Parciais de Experimentos Realizados no Hospital Sarah Kubitschek

Testes realizados pelo pesquisador Dr. Guilherme Dotto Brand

O método de impedância elétrica é comumente utilizado para monitorar terapias relacionadas à agregação plaquetária. Um eletrodo é inserido em uma amostra de sangue citratado. Por meio desse eletrodo, a variação de resistência elétrica é quantificada de acordo com os níveis de agregação plaquetária.

As plaquetas aderem aos fios de paládio do eletrodo e formam uma camada em cima do mesmo. Quando a diferença de voltagem é aplicada, a impedância causada pela camada de plaquetas é medida e espera-se até que haja um platô de estabilização no perfil, como mostrado na figura 30 durante o primeiro minuto de experimento.

Uma vez que os agonistas, no caso o ADP e o Ácido Aracônico, são inseridos na amostra, as plaquetas são ativadas e inicia-se a agregação, fazendo com que a camada sobre os fios de paládio fique mais espessa, aumentando a medição da impedância.

O controle negativo do teste foi realizado apenas na presença dos agentes agregantes e o perfil de agregação está representado na figura 30. No controle positivo, o experimento foi realizado com a administração de ácido acetilsalicílico juntamente com os agentes agregantes. A terapia antiplaquetária com ácido acetilsalicílico reduz em até 25 % o risco de infartos do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais isquêmicos ou

mortes de causa vascular em pacientes de alto risco. Ele inibe uma enzima constitutiva, bloqueando irreversivelmente o acesso do ácido aracdônico ao sítio catalítico da enzima.

2. Controle negativo

- Agentes agregantes

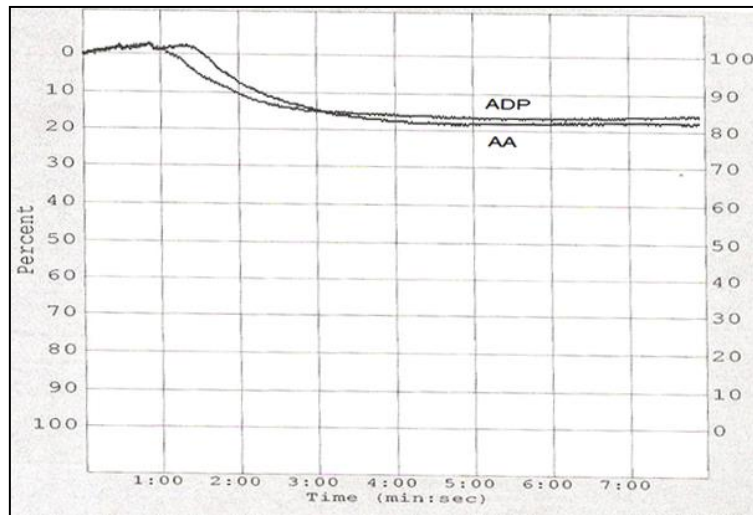


Figura 30. Figura ilustrando o controle negativo, no qual há apenas a presença de agregantes. Sendo ADP = Difosfato de adenosina e AA = ácido aracdônico

3. Controle Positivo

- Ácido acetilsalicílico (AAS)

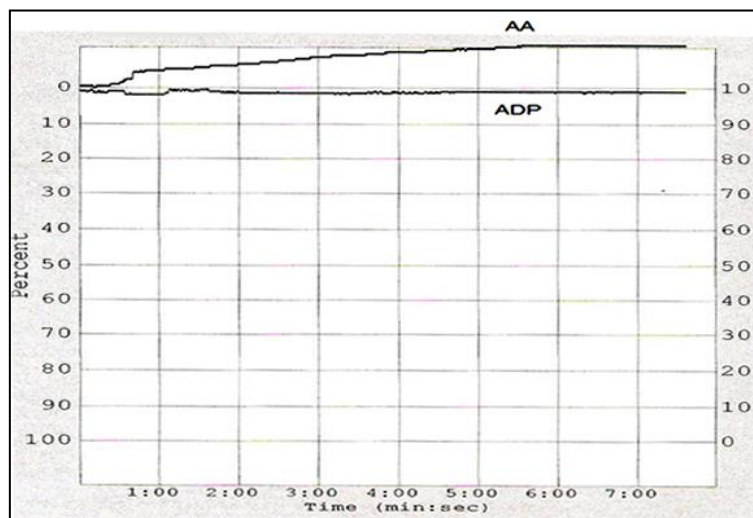


Figura 31. Figura ilustrando o controle positivo no qual há a presença de ácido acetilsalicílico, agente inibidor. Sendo AA = ácido aracdônico e ADP = Difosfato de adenosina.

Nenhum dos peptídeos testados apresentaram atividade de inibição de agregação plaquetária.

- Teste de Inibição plaquetária do peptídeo PSLEM 1002_KGD

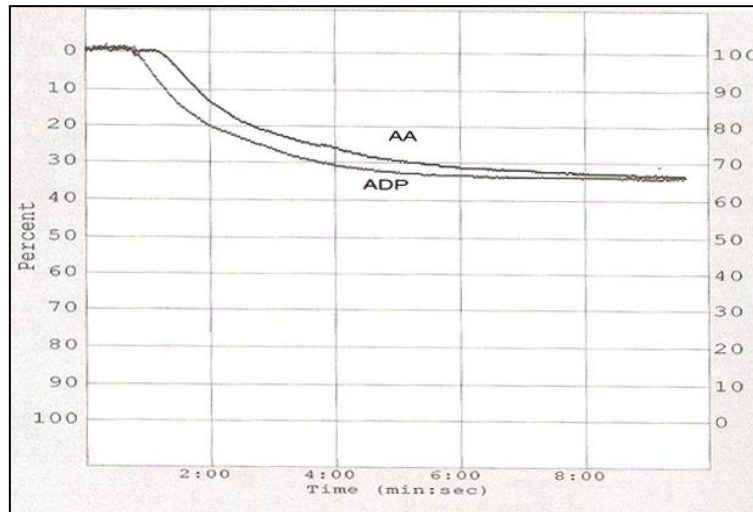


Figura 32. Figura ilustrando a medição de agregação plaquetária na presença do peptídeo PSLEM 1002/KGD. Sendo AA = Ácido aracdônico e ADP= difosfato de adenosina.

- Teste de Inibição plaquetária do peptídeo PSLEM 1018_RGD

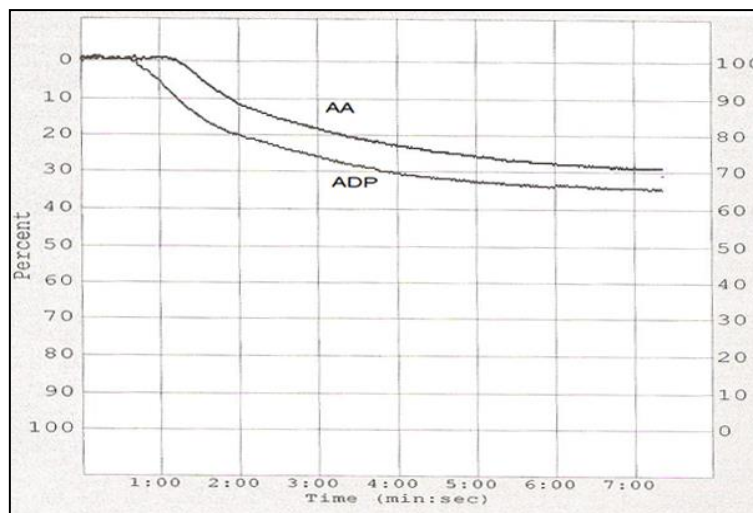


Figura 33. Figura ilustrando a medição de agregação plaquetária na presença do peptídeo PSLEM 1018/RGD. Sendo AA = Ácido aracdônico e ADP= difosfato de adenosina.

Para a utilização de um segundo controle positivo, utilizamos o peptídeo RGD-6 proveniente da literatura, de sequência primária CARGDDC- NH₂, que foi sintetizado manualmente, clivado, oxidado e purificado utilizando o mesmo protocolo dos demais (Figuras 34 e 35) (Kim *et al.*, 2005). No entanto tal peptídeo não mostrou nenhuma atividade de inibição, como mostrado na figura 38.

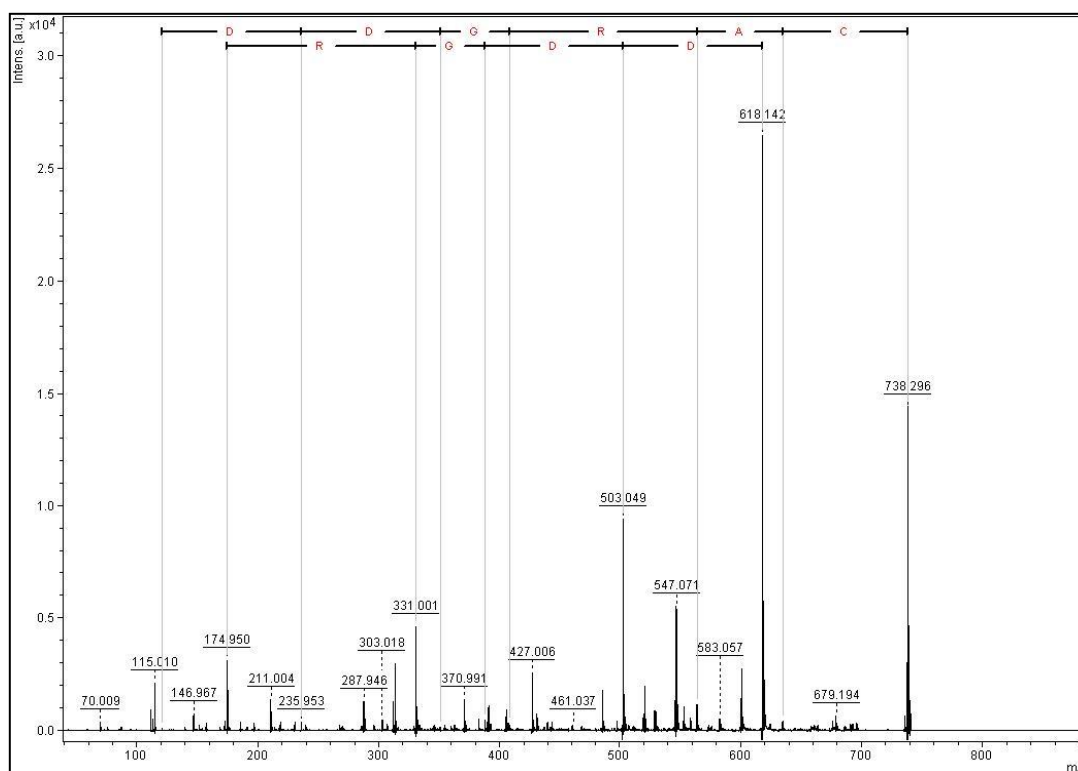


Figura 34. Espectro de Massa MS/MS do peptídeo controle retirado da literatura evidenciando a fragmentação referente ao íon precursor de 738,296 Da e sua correta estrutura primária presente na literatura.

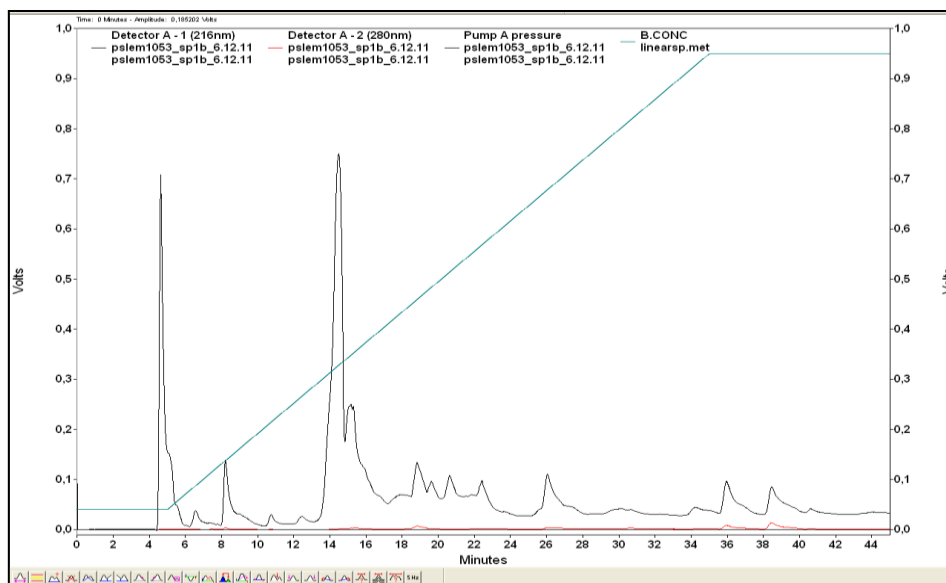


Figura 35. Cromatograma de HPLC de fase reversa referente à cromatografia semipreparativa (coluna C₁₈) do peptídeo controle. O peptídeo de interesse é eluído e a fração majoritária eluída a 14 minutos.

- Teste de inibição do peptídeo controle

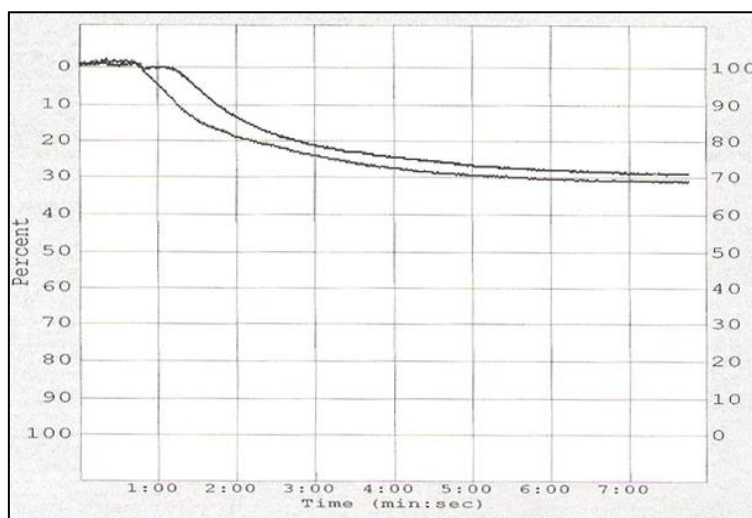


Figura 36. Figura ilustrando a medição de agregação plaquetária na presença do peptídeo PSLEM 1053/CONTROLE. Sendo AA = Ácido aracdônico e ADP= difosfato de adenosina.

Abaixo, na tabela 10 são mostrados os resultados dos dois métodos de testes.

Tabela 10. Primeiros peptídeos estudados de cadeia longa e segunda leva de peptídeos estudados de cadeia mais curta organizados de acordo com os resultados para os dois tipos de testes de agregação plaquetária: impedância elétrica e Espalhamento plaquetário. NT= não testado.

Peptídeo	Estrutura Primária	Método	
		Impedância	Espalhamento
PSLEM 1002 - KGD	HTGCWYTSKGD LICS - NH ₂	Nenhuma	Nenhuma
PSLEM 1018 - RGD	HTGCWYTSRGLICS - NH ₂	Nenhuma	Baixa
PSLEM 1019 - HGD	HTGCWYTSHGLICS - NH ₂	NT	Nenhuma
PSLEM 1225 - KGD	GCWYTKGDSLICS-NH ₂	NT	Nenhuma
PSLEM 1050 - RGD	GCWYTRGDSLICS-NH ₂	Presente	Elevada
PSLEM 1226 - HGD	GCWYTHGDSLICS-NH ₂	NT	Baixa
Integrilina	MPA-RGDWPC-NH ₂	NT	Elevada
Nenhum Tratamento	Controle Negativo		Nenhuma

A ausência de atividade biológica de inibição de agregação para os peptídeos de interesse pode ser explicada pelo posicionamento da porção ativa dentro da molécula. Na literatura, é explicado que o tripeptídeo KGD/RGD está posicionado no centro da alça constrita pelas folhas β . No entanto, tanto no controle positivo escolhido quanto nos peptídeos sendo estudados, o motivo ativo encontra-se deslocado lateralmente na alça ao longo do eixo longitudinal da molécula. Tal deslocamento pode interferir na capacidade do motivo ativo em interagir com a integrina, uma vez que se porta de forma menos flexível devido à proximidade às cistinas.

Resultados dos Experimentos de Espalhamento Plaquetário

Testes realizados pelo pesquisador Dr. Joseph Aslan

As plaquetas iniciam a formação do trombo a partir do seu ancoramento seguindo por espalhamento e agregação na superfície dos vasos. Quando acontece algum ferimento no vaso, as plaquetas são ativadas por cascatas e induzem uma rápida reorganização do seu citoesqueleto de actina, arredondando-se e ligando-se a uma

superfície estabilizada. Tal mudança conformacional aumenta a área de superfície da plaqueta uma vez que elas estendem braços denominados filopodia e formam lamelipodia de forma a reforçar o contato com a superfície e com as outras plaquetas.

Os resultados provenientes de ensaios de espalhamento plaquetário submetidos juntamente com os peptídeos sendo estudados são apresentados na figura 37.

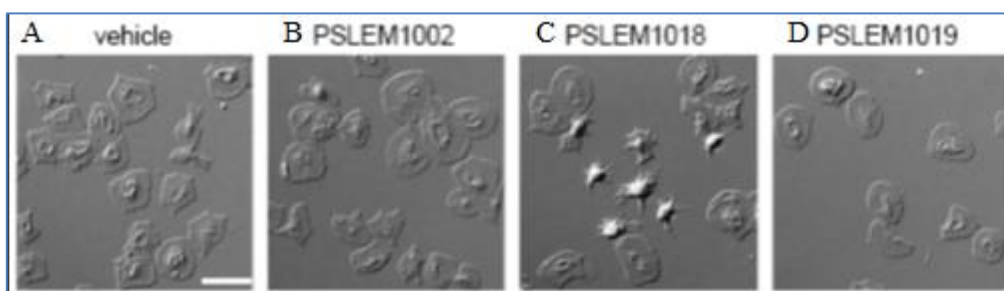


Figura 37. Adesão plaquetária a fibrinogênio imobilizado. Plaquetas humanas lavadas (2×10^7) foram colocadas em placas cobertas por fibrinogênio por 45 minutos a 37°C e verificadas por imagem em microscopia de escaneamento diferencial. No tratamento em questão, as plaquetas foram tratadas previamente por 10 minutos com veículo (0,1% (v/v) DMSO), Peptídeo KGD de cadeia longa, RGD de cadeia longa e HGD de cadeia longa ($100\mu\text{g}$). Espalhamento completo de plaquetas pode ser observado na superfície de fibrinogênio contendo apenas o veículo (A) e nos peptídeos KGD (B) e HGD(D). Plaquetas parcialmente espalhadas podem ser observadas na superfície de fibrinogênio contendo o peptídeo RGD (C).

Os peptídeos PSLEM 1002 e PSLEM 1019 não apresentaram qualquer tipo de atividade. No entanto, diferentemente do observado nos experimentos de impedância elétrica, o peptídeo PSLEM 1018 apresentou um baixo efeito de inibição do espalhamento plaquetário, o que pode ser observado pela presença de algumas plaquetas nas quais houve uma inibição na extensão de filopodia. O peptídeo em questão é aquele que possui a sequência com o motivo RGD, compatível com a presente literatura, na qual as desintegrinas com RGD são mais abundantes e possuem atividade mais alta do que aqueles com KGD.

5.4 - Experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Por meio de experimentos de TOCSY, NOESY e HSQC foi possível a obtenção dos diferentes sistemas de *spin* de cada resíduo de aminoácido presente nos peptídeos. Após a aquisição dessas informações, foi possível o assinalamento (sequencial) de todos os átomos de hidrogênio do peptídeo.

O espectro de NOESY é particularmente interessante para a determinação da estrutura de peptídeos, uma vez que fornece informações sobre relações intra-residuais, inter-residuais de curta distância (sequenciais) e inter-residuais de longa distância.

Após o assinalamento, possuímos os valores de deslocamento químico dos hidrogênios H_{α} , H_{β} e H_N , juntamente com os assinalamentos dos carbonos C_{α} e C_{β} , o que nos possibilita prosseguir para o cálculo dos ângulos diedro. Os NOEs assinalados no NOESY são convertidos em restrições de distância, que juntamente com os ângulos diedro, foram o parâmetro utilizado para o cálculo da estrutura. A sobreposição das 20 estruturas de menor energia pode ser vista nas figuras 38.

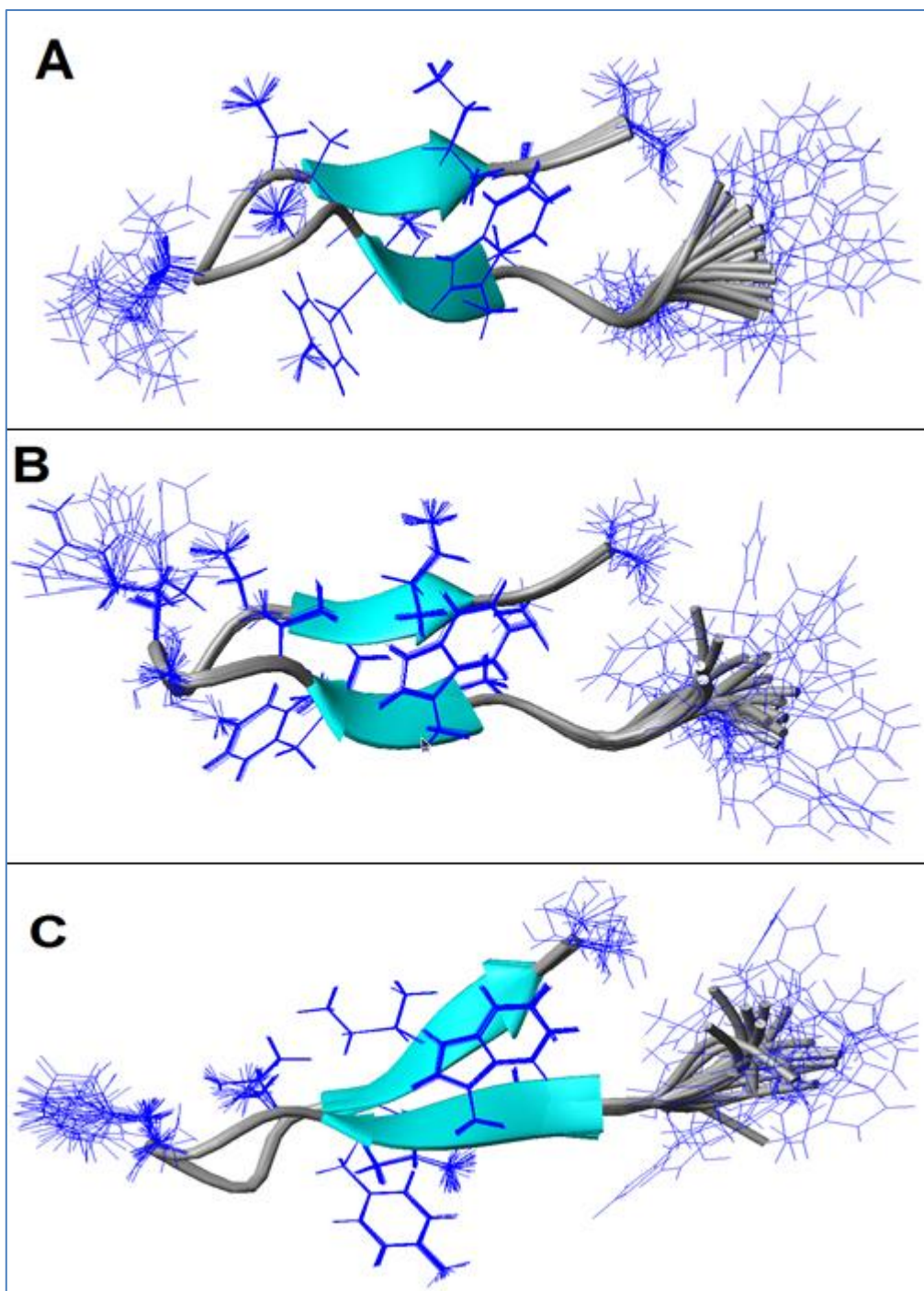


Figura 38. Estrutura tridimensional dos peptídeos KGD (A), RGD (B) e HGD (C) de cadeia longa (PSLEM 1002, PSLEM 1018 e PSLEM 1019) determinadas por Ressonância Magnética Nuclear. Imagens adquiridas com o auxílio do software molmol na qual as 20 estruturas de menor energia (mais estáveis) estão sobrepostas para cada molécula.

Como parâmetros de qualidade de estrutura podemos utilizar a comparação do resultado teórico com o resultado prático, valores da raiz quadrada dos desvios médios quadrados (RMSD), número de restrições por resíduo e pelo gráfico de Ramachandran (Spronk *et al.*, 2004).

Uma estrutura de resolução adequada possui mais de 15 restrições por resíduo e um RMSD menor do que 0,4 Å (Cavanagh *et al.*, 2007). A tabela a seguir funciona como um guia para julgamento da resolução de estruturas adquiridas por RMN.

Tabela 11. Guia para análise da qualidade de estruturas adquiridas por RMN.

Critério	Resolução Bastante Alta	Resolução Alta	Resolução Mediana	Resolução Baixa
Restrições por resíduo	>18	14 a 18	10 a 15	<10
RMSD	<0.3	0.3-0.5	0.5-0.8	>0.8
Qualidade de Gráfico de Ramachandran	95	85-95	75-85	<75

As estruturas calculadas para o peptídeo PSLEM 1002 (KGD) foram obtidas com 285 restrições de distância, com a média de 19 NOEs por resíduo de aminoácido. O valor do RMSD para a sobreposição das estruturas de menor energia foi de 0.109.

As estruturas calculadas para o peptídeo PSLEM 1018 (RGD) foram obtidas com 287 restrições de distância, com a média de 19 restrições por resíduo de aminoácido. O valor do RMSD para a sobreposição das 20 estruturas de menor energia foi de 0.579.

As estruturas calculadas para o peptídeo PSLEM 1019 (HGD) foram obtidas com 298 restrições de distância, com a média de 20 restrições por resíduo de aminoácido. O valor do RMSD para a sobreposição das 20 estruturas de menor energia foi de 0.603.

É possível observar que todas as estruturas estão de acordo com a tabela de qualidade correspondentes a uma estrutura de resolução alta, possibilitando confiabilidade nos modelos calculados. O gráfico de Ramachandran de cada peptídeo também se apresenta de acordo com estruturas confiáveis, sendo que mais de 95% dos aminoácidos estão constrictos na área esperada. O aminoácido representado pelo quadrado diz respeito à glicina a qual é o resíduo que possui liberdade estrutural para assumir conformações fora da área esperada.

Foi possível observar a formação de uma região pequena em folha β antiparalela, sendo que as cadeias laterais nessa região apresentam melhor estruturação e menor mobilidade.

Nenhum dos dois peptídeos testados por impedância apresentou atividade de inibição de agregação plaquetária. No entanto, quando testados pelo método de

espalhamento plaquetário, o peptídeo PSLEM 1018 (RGD) apresentou tal atividade.

O método de impedância é relativamente menos sensível do que o método de espalhamento, já que no método de espalhamento é feita uma análise sobre a capacidade de ligação das plaquetas no fibrinogênio. Por outro lado, no método de impedância, é analisada a agregação em si, processo esse que acontece em meio mais complexo (sangue total) e envolve outros fatores como, por exemplo, a secreção, capazes de interferir paralelamente no resultado, mascarando a atividade.

Um dos principais indícios para a ausência/baixa atividade dos peptídeos apresentados é a proximidade do ácido aspártico da estruturação de folha β . De acordo com a literatura, assim como apresentado na introdução, o resíduo D (Asp) é um dos aminoácidos essenciais para a ligação ao receptor de integrina. Dessa forma, a sua proximidade à folha β faz com que a sua cadeia lateral fique mais estruturada, mais rígida, dificultando a sua disponibilidade à ligação.

5.5 – Rearranjo da sequência primária dos peptídeos análogos

Observamos, com a ajuda da estrutura tridimensional elucidada por Ressonância Magnética Nuclear, que os resíduos de aminoácidos pertencentes aos motivos ativos encontravam-se deslocados longitudinalmente na estrutura primária do peptídeo. Ao invés de estarem posicionados no centro da alça inibitória, como é o caso das desintegrinas, estavam ligeiramente deslocados para a lateral, fazendo com que o ácido aspártico apresentasse uma estrutura tridimensional bastante rígida, uma vez constricto na folha β . A fim de confirmar se tal deslocamento foi o motivo da ausência de atividade antiplaquetária prevista para a molécula, modificamos a sequência primária de forma que o sítio de ligação ficasse centralizado na alça. A nova sequência primária é apresentada na tabela abaixo (Tabela 12).

Tabela 12. Estrutura primária dos novos peptídeos sintéticos rearranjados e desenhados pelo Laboratório de Espectrometria de massa.

Peptídeos	Sequência de Aminoácidos	$[M+H]^+$
KGD	GCWYTKGDSLICS – NH ₂	1429,6 Da
RGD	GCWYTRGDSLICS – NH ₂	1459,6 Da
HGD	GCWYTHGDSLICS – NH ₂	1438,6 Da

5.6 – Caracterização e purificação dos peptídeos rearranjados

- PSLEM 1225 – KGD rearranjado

A massa esperada, $[M+H]^+$ para o peptídeo PSLEM 1225 é de 1431,6 Da na sua forma reduzida. O espectro de massa (MS) obtido pode ser observado na figura 44. Pelo espectro é possível a visualização do íon de maior abundância relativa possuindo a massa experimental adequada para a sequência primária desejada.

Devido às impurezas provenientes da síntese e da clivagem, o peptídeo deve ser submetido a processos de purificação posteriores à síntese química, de forma a isolá-lo para futuras análises.

Para a confirmação da sequência primária do íon desejado, o mesmo foi submetido a um processo de fragmentação (espectro de MS/MS, figura 39). Com a utilização dos espectros resultantes da fragmentação, é possível sequenciar o peptídeo utilizando as séries y e b, confirmando a sequência desejada.

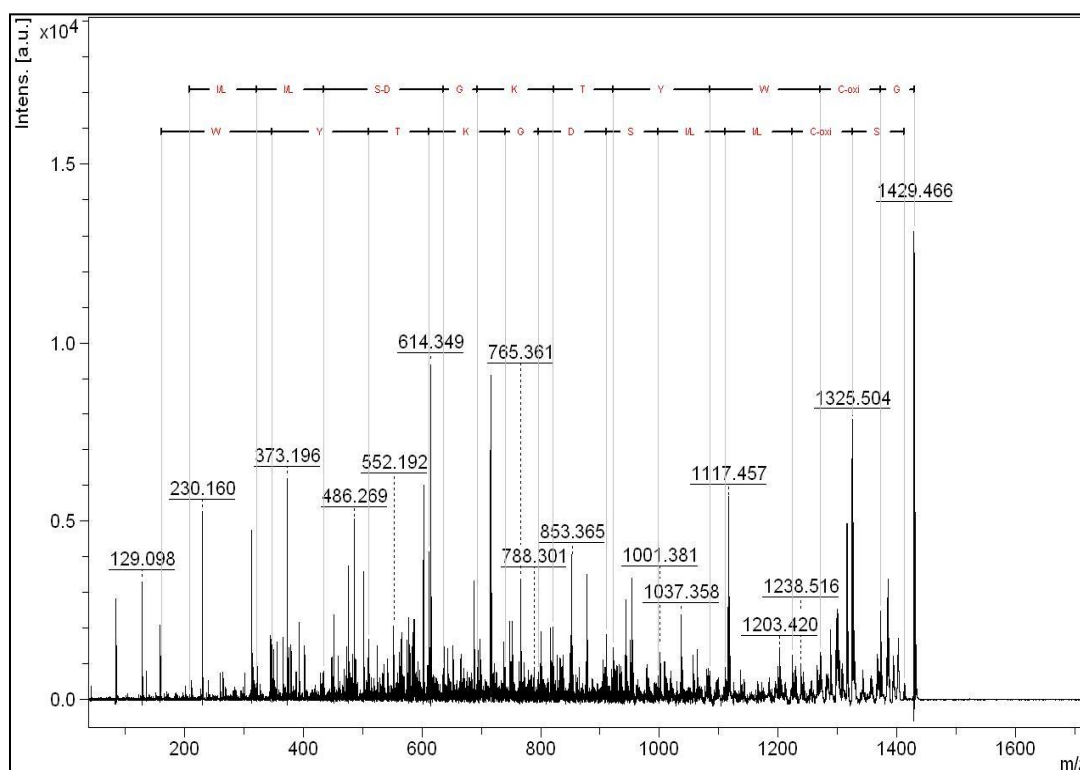


Figura 39. Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor do peptídeo desejado na sua forma oxidada.

O processo de purificação do peptídeo foi realizado em apenas uma etapa, diferentemente dos peptídeos anteriores. Para aperfeiçoar o passo cromatográfico, realizamos uma oxidação química com a utilização de Tálcio III, como descrita na metodologia.

Optamos por realizar tal oxidação para que não fosse preciso duas etapas de purificação, uma semipreparativa e uma analítica. Antes mesmo da clivagem do peptídeo, ele foi oxidado. Dessa forma, as impurezas referentes aos subprodutos da oxidação foram lavadas juntamente com as da síntese no momento de filtragem.

A figura 40 mostra o cromatograma referente à purificação do peptídeo PSLEM 1225. É possível observar que o cromatograma contém mais impurezas quando comparado com aquele pertencente aos peptídeos apresentados no capítulo dois. Isso decorre do fato de que os subprodutos da síntese, como peptídeos inacabados, peptídeos com grupamentos de proteção etc, também passam pelo processo oxidativo, gerando um cromatograma com mais contaminações.

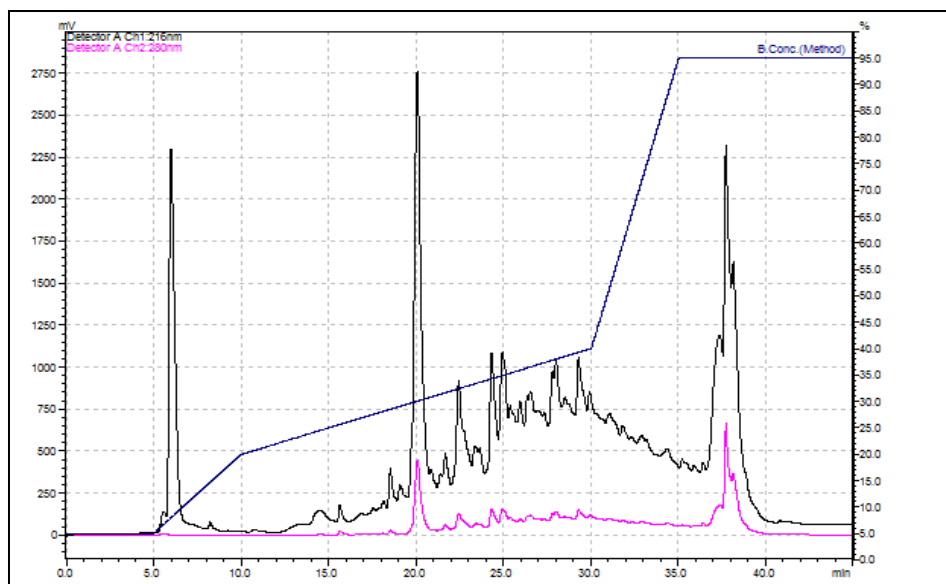


Figura 40. Cromatograma de HPLC de fase reversa com a utilização de uma coluna semipreparativa C₁₈. O peptídeo desejado é mostrado com tempo de eluição de 20 minutos, no centro do cromatograma.

O espectro de massa referente à fração cromatográfica de interesse, figura 41, indica a presença do íon na sua forma oxidada e livre de impurezas.

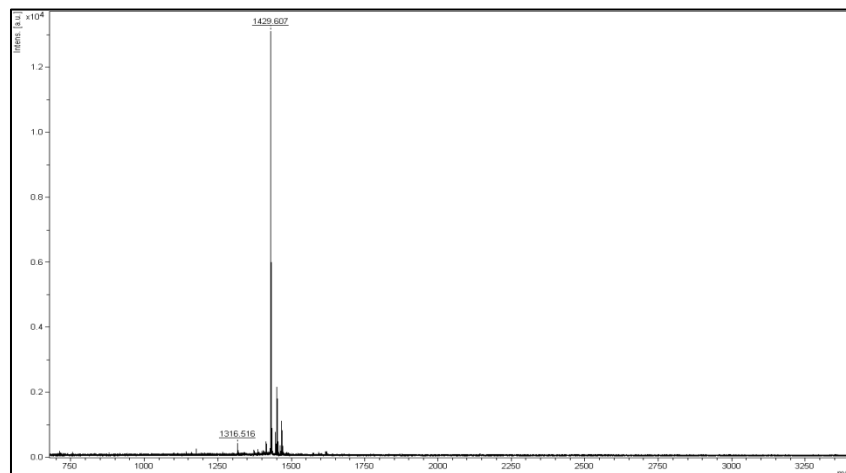


Figura 41. Espectro de massa do peptídeo PSLEM 1225 oxidado e livre de impurezas.

Os íons de menor abundância relativa ao lado do íon principal são referentes à adutos de sódio e potássio que não influenciam na pureza do peptídeo.

A distribuição monoisotópica do íon desejado é mostrada na figura 42. É importante que sempre observemos tal característica de um espectro de massa, uma vez que ela é diretamente relacionada com a qualidade do espectro, tal como a sua confiabilidade de acurácia.

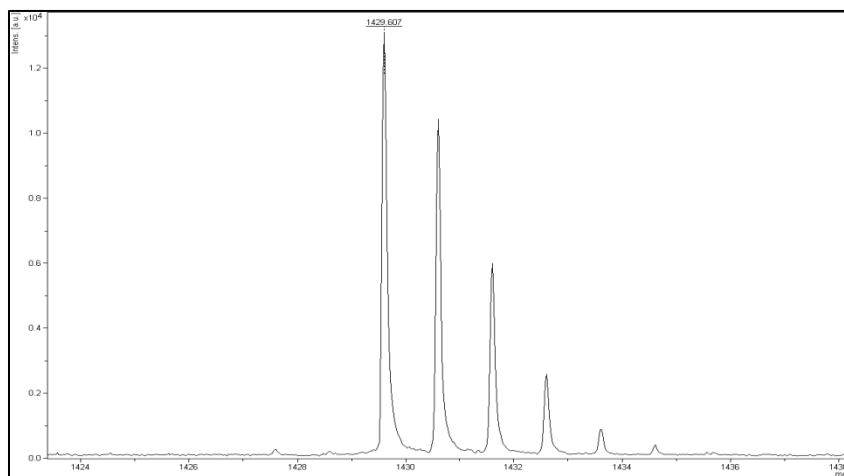


Figura 42. Espectro de massa (MS) mostrando a distribuição monoisotópica do íon na forma oxidada e livre de impurezas.

- PSLEM 1050 - RGD rearranjado

A massa teórica esperada, $[M+H]^+$ para o peptídeo PSLEM 1050 é de 1459,62 Da na sua forma reduzida. É possível observar no espectro de massa adquirido (MS), na figura 46, a presença de íon com massa experimental adequada.

Devido às impurezas provenientes da síntese e da clivagem, o peptídeo deve ser submetido a processos de purificação posteriores à síntese química, de forma a purificá-lo para futuras análises.

Para a confirmação da sequência primária do íon desejado, o mesmo foi submetido a um processo de fragmentação (espectro de MS/MS, figura 43). Com a utilização dos espectros resultantes da fragmentação, é possível sequenciar o peptídeo utilizando as séries y e b, confirmando a sequência desejada.

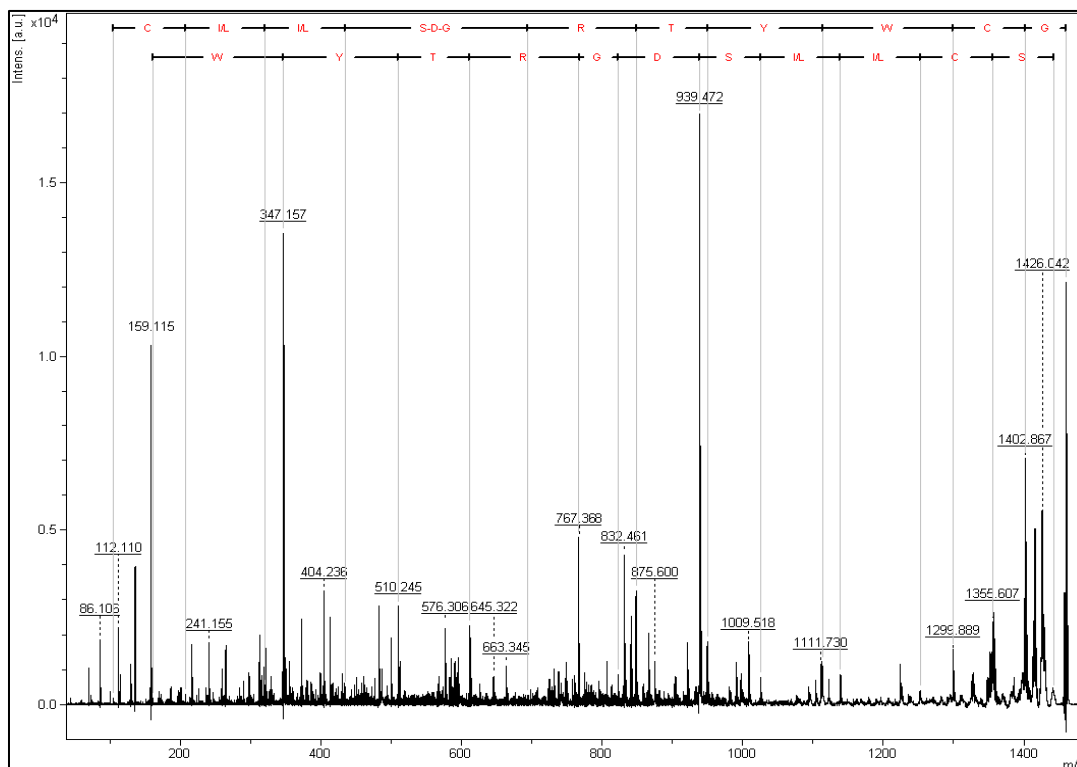


Figura 43. Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor do peptídeo desejado PSLEM 1050 na sua forma reduzida.

O cromatograma referente ao peptídeo PSLEM1050 é apresentado na figura 47. Todas as frações foram coletadas manualmente e analisadas por espectrometria de massa a fim de determinar a fração desejada.

Como é possível observar na nomenclatura laboratorial referente aos peptídeos, o exemplar PSLEM 1050 aparece anteriormente ao PSLEM 1225 e ao PSLEM1216. Significa que ele foi sintetizado durante o ano de 2010, juntamente com os outros três peptídeos apresentados no capítulo 2. Dessa maneira, o método cromatográfico utilizado para o PSLEM 1050 difere daquele aplicado para os seus análogos PSLEM 1225 e PSLEM 1226. No entanto, em nada implica tal diferença de metodologia. Trata-se, somente, de um encurtamento de método, com o objetivo de análises que possam ser feitas mais rapidamente.

Inicialmente, a fração desejada possuiu a massa $[M+H]^+ = 1459,6$ Da; por se tratar da forma reduzida do peptídeo PSLEM 1050. Na primeira cromatografia realizada, foi utilizada uma coluna C_{18} semipreparativa (Figura 44). Foi isolada a fração reduzida, na qual

as pontes dissulfeto ainda não foram formadas. Tal fração foi acumulada através de repetições da etapa cromatográfica semipreparativa. Ela foi então congelada e liofilizada de maneira a eliminar a acetonitrila (ACN) presente na amostra.

O processo de oxidação foi realizado em água Milli-Q, na presença de oxigênio proveniente do ar durante 48 horas. O oxigênio do ar possibilitou a oxidação do peptídeo, levando à formação das pontes dissulfeto entre as cisteínas. Após a oxidação da amostra, iniciou-se outra etapa de purificação, na qual foi utilizada uma coluna analítica C₁₈ para o isolamento da fração desejada oxidada do restante da porção ainda reduzida na amostra. Tal cromatograma é mostrado na figura 45, na qual a primeira absorbância refere-se à porção oxidada e a segunda à porção reduzida.

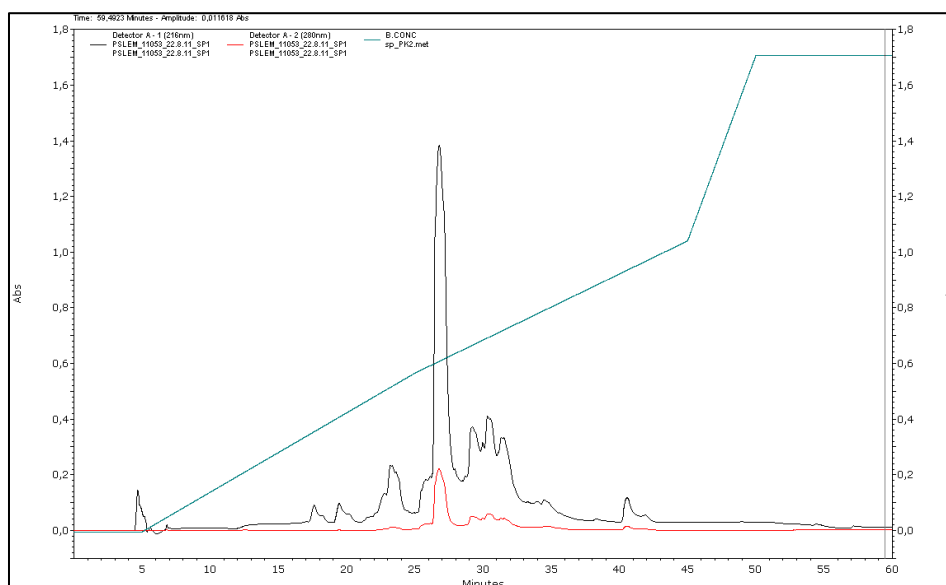


Figura 44. Cromatograma de HPLC de fase reversa com a utilização de uma coluna semipreparativa C₁₈. O peptídeo desejado é mostrado com tempo de eluição de 25 minutos, no centro do cromatograma.

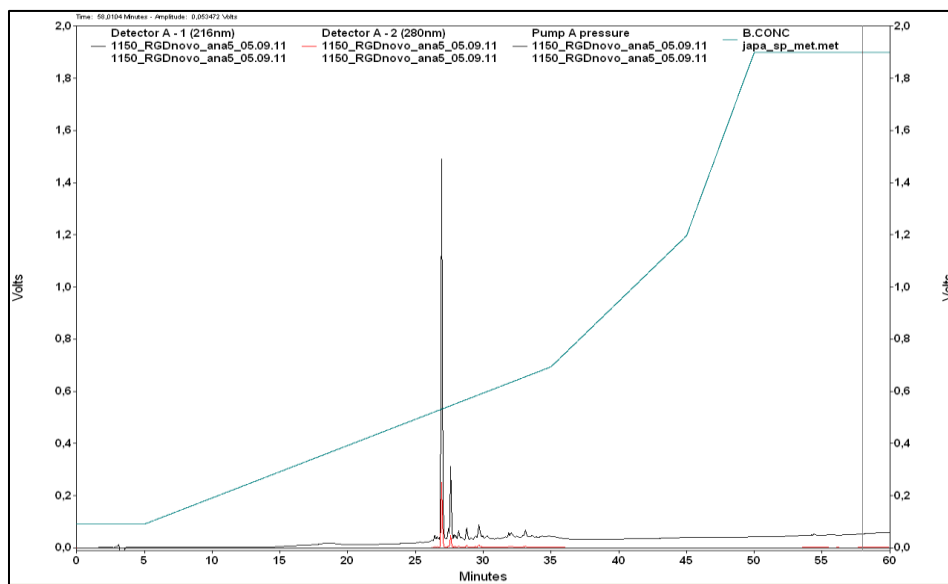


Figura 45. Cromatograma de HPLC de fase reversa com a utilização de uma coluna analítica C₁₈. O sinal com a maior abundância é referente à forma oxidada desejada do peptídeo PSLEM 1050.

O espectro de massa (MS) referente ao sinal desejado mostrado no cromatograma anterior é mostrado na figura 46. É possível observar sua massa oxidada com duas unidades de massa a menos, referente à perda de dois hidrogênios para a formação da ligação dissulfeto. É possível notar, também, a ausência de subprodutos antes identificados.

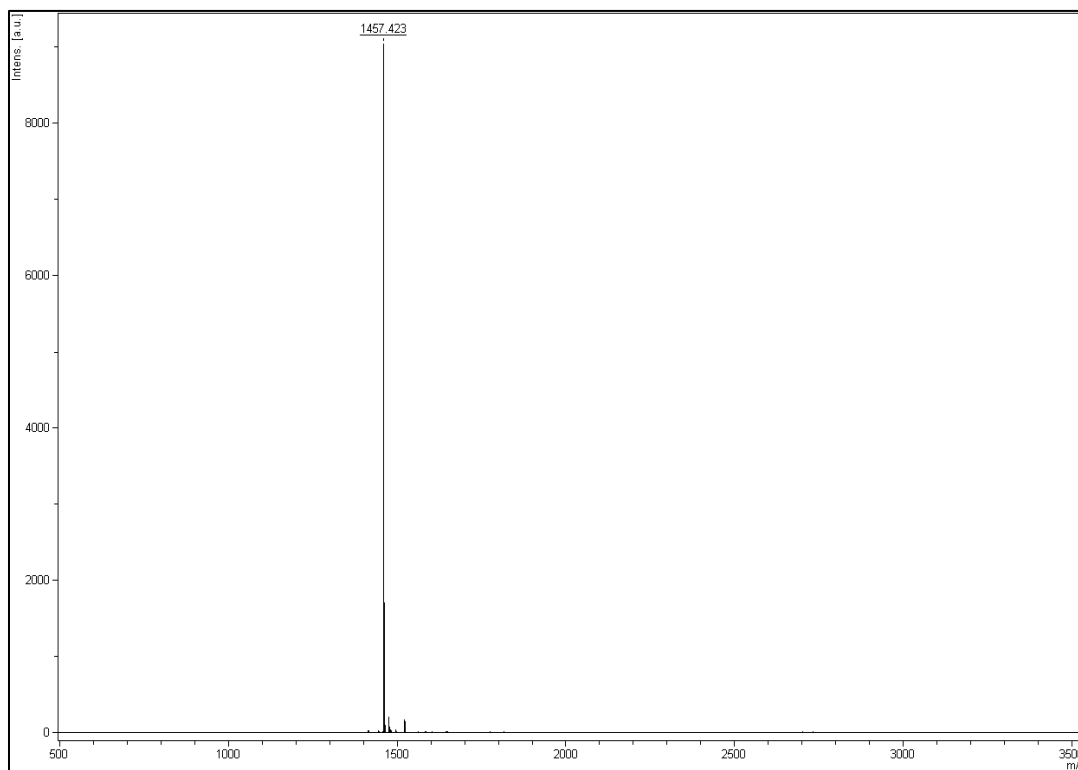


Figura 46. Espectro de Massa (MS) evidenciando a forma oxidada e pura do íon referente ao peptídeo PSLEM 1050.

A distribuição monoisotópica do íon em questão é mostrada na figura 47, evidenciando uma boa resolução, fato relacionado à acurácia de massa molecular do espectro.

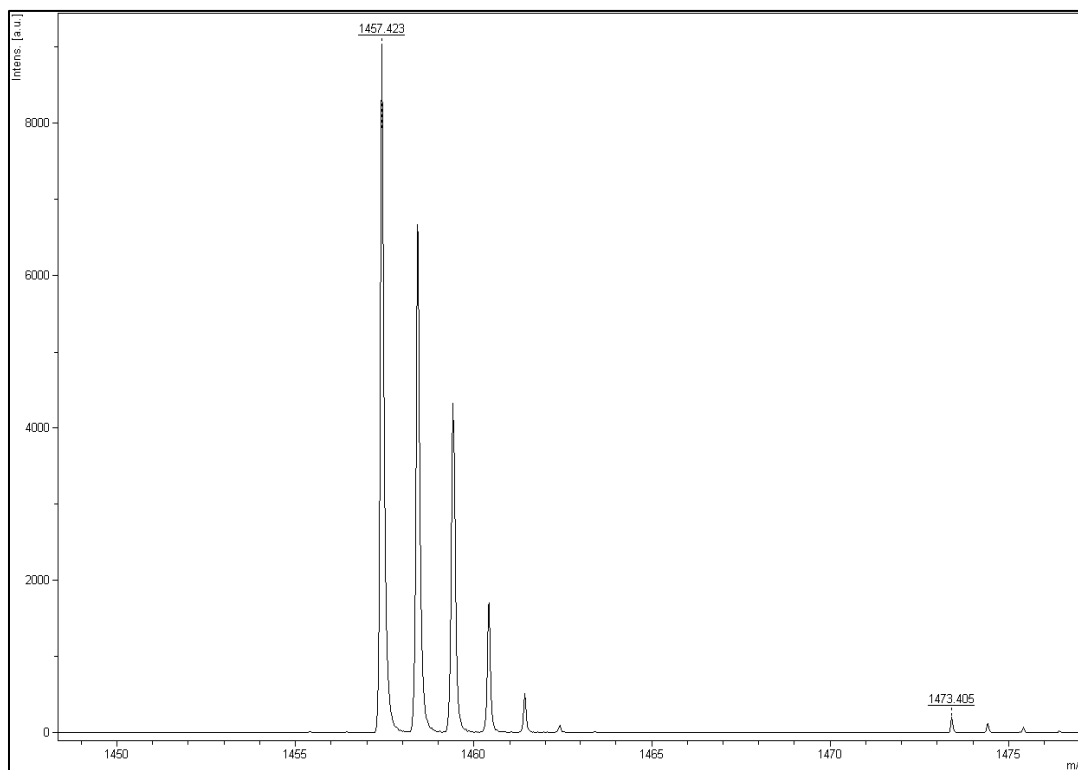


Figura 47. Espectro de massa (MS) mostrando a distribuição monoisotópica do íon referente ao peptídeo PSLEM 1050 na sua forma oxidada e pura.

- PSLEM 1226 – HGD rearranjado

A massa teórica esperada, $[M+H]^+$, para o peptídeo PSLEM 1226 é de 1440,58 Da na sua forma reduzida. É possível observar no espectro de massa adquirido (MS), na figura 48, a presença de íon com massa experimental adequada para a fração oxidada.

Devido às impurezas provenientes da síntese e da clivagem, o peptídeo necessita ser submetido a processos de purificação posteriores à síntese química, de forma a purifica-lo para futuras análises.

Para a confirmação da sequência primária do íon desejado, o mesmo foi submetido a um processo de fragmentação (espectro de MS/MS, figura 48). Com a utilização dos espectros resultantes da fragmentação, foi possível sequenciar o peptídeo utilizando as séries y e b, confirmando a sequência de interesse correta.

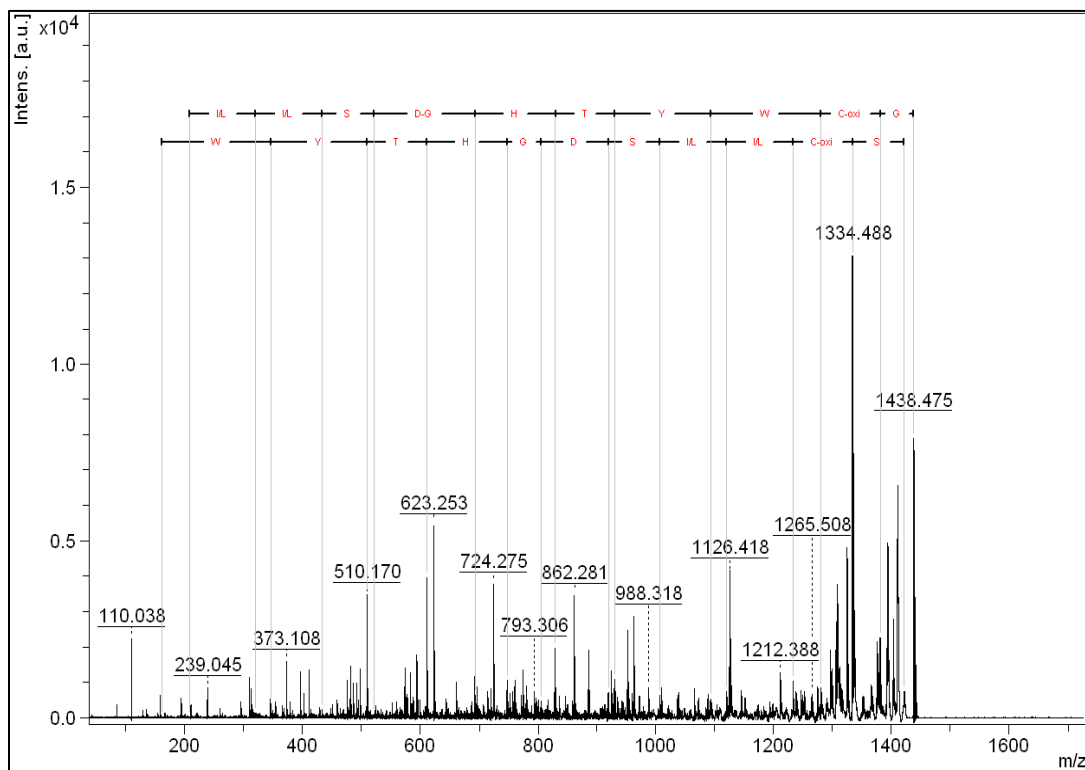


Figura 48. Espectro de MS/MS referente à fragmentação do íon precursor referente ao peptídeo PSLEM 1226 desejado na sua forma oxidada.

5.7 - Experimento de inibição de agregação plaquetária por impedância elétrica

Os experimentos de inibição de agregação plaquetária foram feitos por meio de duas metodologias distintas. No entanto, somente parte dos resultados foram coletados com base na metodologia 1 e todos os resultados foram coletados com base na metodologia 2.

Podemos observar claramente que o peptídeo PSLEM 1050, referente ao rearranjo do peptídeo PSLEM 1018, relacionados ao motivo ativo RGD, demonstrou atividade antitrombótica considerável quando comparada à da aspirina (Figura 49). A porcentagem de agregação permanece inalterada, evidenciando que não acontece agregação plaquetária, isto é, não existe variação de impedância elétrica quando a amostra é ministrada no teste.

Por motivos de problemas de colaboração, somente o peptídeo PSLEM 1050 possuiu atividade testada pelo método de impedância elétrica durante a segunda etapa desse estudo. No entanto, o resultado é de grande valia para o projeto, não podendo ser descartado.

- PSLEM 1050 - RGD rearranjado

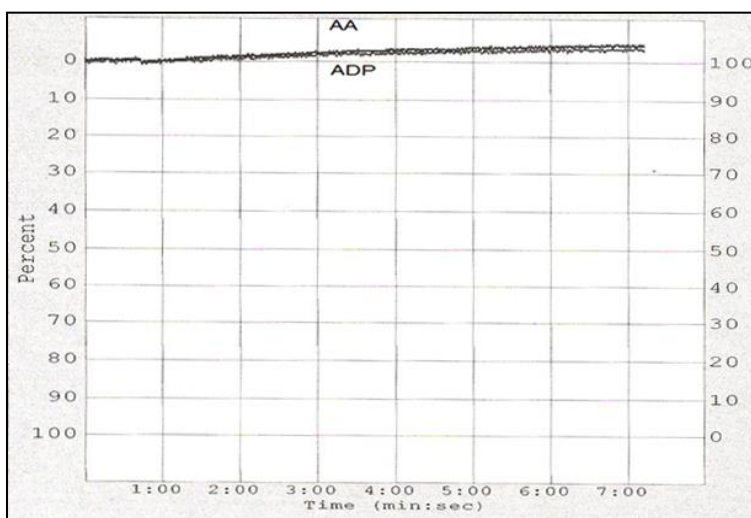


Figura 49. Gráfico de impedância evidenciando a ausência de agregação plaquetária no sangue quando na presença do peptídeo PSLEM 1053_RGD novo. Sendo AA = ácido aracdônico e ADP = Difosfato de adenosina.

Diferentemente dos primeiros peptídeos, a nova sequência com o sítio ativo no centro da alça mostrou atividade de inibição plaquetária comparável a do controle positivo (aspirina).

O resultado apresentado relaciona-se com a importância da localização do sítio ativo para que a molécula mantenha a atividade biológica. No peptídeo rearranjado, o sítio ativo está exatamente no centro da alça inibitória, expondo-se de maneira flexível e disponível para a ligação com a integrina.

5.8 – Experimento de inibição de agregação plaquetária por espalhamento plaquetário

Todos os peptídeos tiveram a sua atividade antitrombótica testada novamente por meio do método de espalhamento plaquetário. Os resultados, no entanto, mostram-se diferentes daqueles obtidos por impedância elétrica. A tabela 13 mostra os dados obtidos pelo método de impedância elétrica juntamente com os dados obtidos por espalhamento plaquetário

Tabela 13. Resultados obtidos por meio de dois métodos distintos de teste de inibição plaquetária. NT= não testado.

Peptídeo	Estrutura Primária	Método	
		Impedância	Espalhamento
PSLEM 1002 - KGD	HTGCWYTSKGLICS - NH2	Nenhuma	Nenhuma
PSLEM 1018 - RGD	HTGCWYTSRGLICS - NH2	Nenhuma	Baixa
PSLEM 1019 - HGD	HTGCWYTSHGDLICS - NH2	NT	Nenhuma
PSLEM 1225 - KGD	GCWYTKGDSLICS-NH2	NT	Nenhuma
PSLEM 1050 - RGD	GCWYTRGDSLICS-NH2	Presente	Elevada
PSLEM 1226 - HGD	GCWYTHGDSLICS-NH2	NT	Baixa
Integrilina	MPA-RGDWPC-NH2	NT	Elevada
Nenhum Tratamento	Controle Negativo		Nenhuma

A proposta de ambos os testes era de uma análise qualitativa de inibição, não acontecendo uma quantificação real em nenhum deles. No método por impedância, como obtivemos apenas o resultado de um peptídeo apresentando atividade antitrombótica, não podemos comparar a intensidade de atividades. No entanto, é possível comparar o resultado do peptídeo ativo ao resultado do controle positivo (tratamento com aspirina). A comparação em questão é mostrada na figura 50.

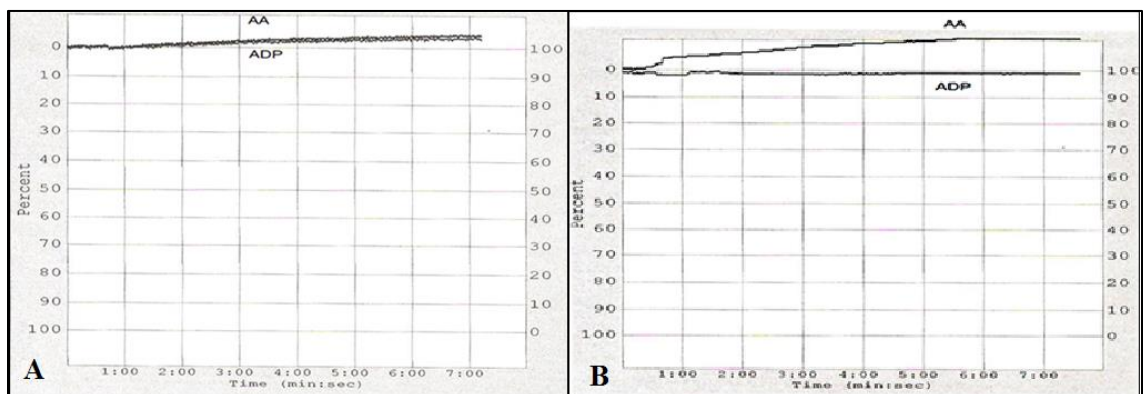


Figura 50. No segmento A é apresentado o dado de agregação plaquetária do peptídeo PSLEM 1050 pelo método de impedância elétrica e no segmento B é apresentado o dado de agregação plaquetária do controle positivo, ácido acetilsalicílico (aspirina), pelo mesmo método.

São perfis bastante semelhantes, nos quais a medida da impedância elétrica mantem-se em zero, significando que não houve agregação plaquetária sobre o fio de paládio. Esse resultado nos leva a crer que a atividade antitrombótica apresentada pelo peptídeo PSLEM 1050 é considerável quando comparada com a da aspirina.

Os resultados obtidos pelo método de espalhamento plaquetário devem ser interpretados de forma diferente do que os anteriormente mostrados. Estes são apresentados na figura 51.

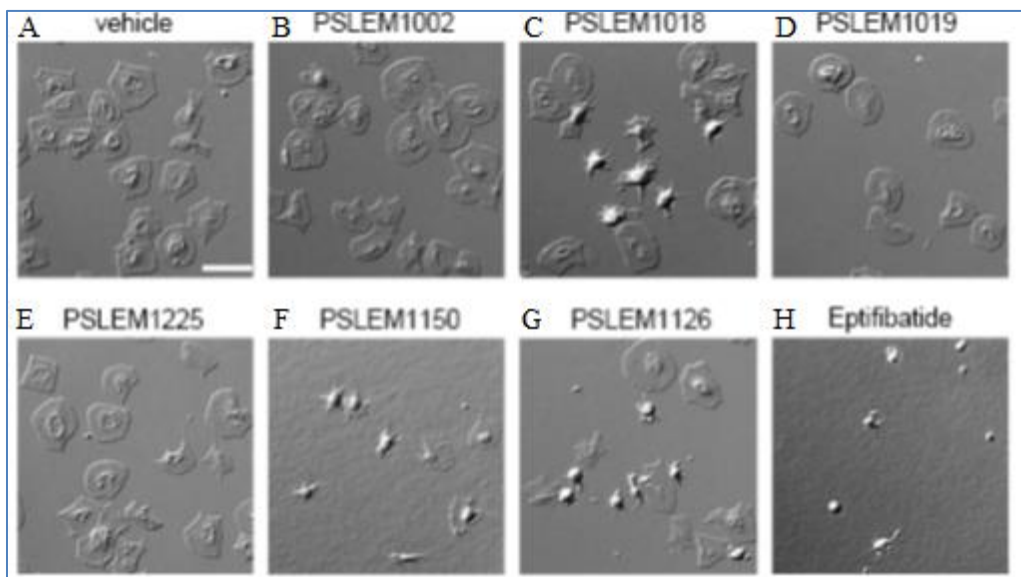


Figura 51 Adesão plaquetária a fibrinogênio imobilizado. Plaquetas humanas lavadas (2×10^7) foram colocadas em placas cobertas por fibrinogênio por 45 minutos a 37°C e verificadas por imagem em microscopia de escaneamento diferencial. No tratamento em questão, as plaquetas foram tratadas previamente por 10 minutos com veículo (0,1% (v/v) DMSO), Peptídeos KGD (B) de cadeia longa, RGD (C) de cadeia longa e HGD (D) de cadeia longa, KGD (E) de cadeia curta, RGD (F) de cadeia curta e HGD (G) de cadeia curta ($100\mu\text{g}$) e controle positivo (H). O espalhamento completo de plaquetas pode ser observado na superfície de fibrinogênio contendo apenas o veículo (A) e nos peptídeos KGD (B) e HGD(D) e KGD curto (E). Plaquetas parcialmente espalhadas podem ser observadas na superfície de fibrinogênio contendo o peptídeo RGD (C) e HGD curto (G) e plaquetas que não se espalharam podem ser observadas nas superfícies contendo o peptídeo RGD curto (F) e o controle positivo (H).

Ambos os peptídeos RGD e o peptídeo HGD rearranjado possuíram atividade de inibição de espalhamento plaquetário. Sendo o RGD rearranjado com alta atividade biológica quando comparado ao controle integrilina (Epifibatide).

Ao analisarmos a estrutura terciária dos peptídeos rearranjados (Figuras 52), podemos observar que o motivo funcional tripeptídico localiza-se centralizado longitudinalmente ao longo da molécula. Possivelmente, tal localização permite maior mobilidade de ligação para o mesmo, diferentemente do que acontecia quando a sua localização era deslocada e o ácido aspártico estava rígido próximo à folha β .

A rigidez da alça inibitória, assim como mostrado pelo presente trabalho, está diretamente relacionada à atividade biológica do motivo ativo em questão. Resultados semelhantes foram obtidos no trabalho de Wermelinger e colaboradores em 2009, no qual

duas desintegrinas possuem sua potência inibitória relacionada à flexibilidade da estrutura tridimensional. Arcabouços mais estáveis apresentaram maior atividade.

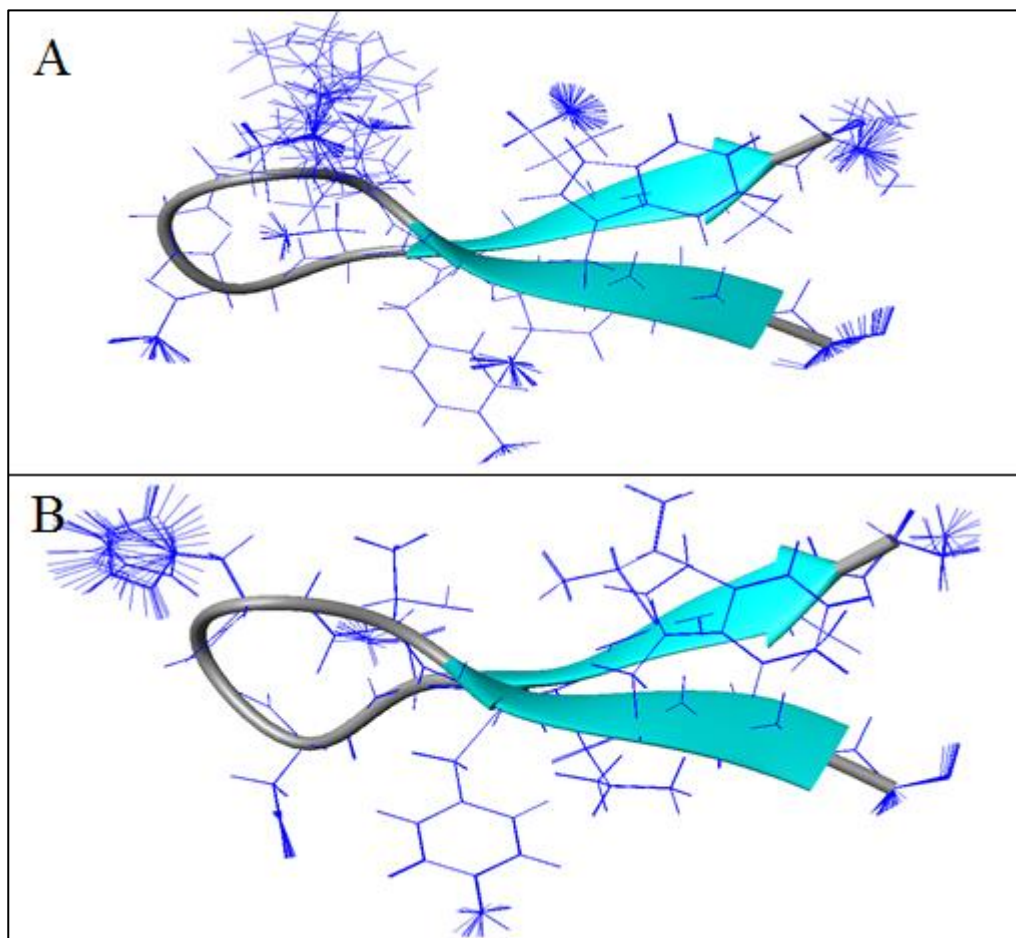


Figura 52. Estrutura tridimensional dos peptídeos KGD (A), e HGD (B) de cadeia curta (PSLEM 1225 e PSLEM 1050) determinadas por Ressonância Magnética Nuclear. Imagens adquiridas com o auxílio do software molmol na qual as 20 estruturas de menor energia (mais estáveis) estão sobrepostas para cada molécula.

As estruturas calculadas para o peptídeo PSLEM 1225 (KGD rearranjado) foram com base em 203 restrições, com média de 15.6 restrições por resíduo de amino ácido. O RMSD calculado para as 20 estruturas de menor energia foi de 0.003 Å.

As estruturas calculadas para o peptídeo PSLEM 1226 (HGD rearranjado) foram com base em 205 restrições, com média de 15.7 restrições por resíduo de amino ácido. O RMSD calculado para as 20 estruturas de menor energia foi de 0.010 Å.

Ambos os modelos de estruturas estão compatíveis com estruturas de boa a excelente resolução de acordo com a tabela 10. O gráfico de Ramachandran também está de acordo com o padrão para estruturas de boa qualidade visto que mais de 95 % dos resíduos de aminoácidos estão nas regiões previstas.

É possível que o grau de liberdade do sítio ativo tenha influenciado na capacidade dos peptídeos em ligar-se aos receptores. De acordo com a literatura apresentada, para que haja atividade é requisito que o motivo ativo esteja localizado no centro da alça inibitória de maneira flexível que possibilite a ligação. Ao mesmo tempo, o restante do arcabouço deve manter-se rígido e estável devido à conformação de β -*hairpin* com folha β adquirida.

Os peptídeos rearranjados possuem o sítio ativo, composto por três resíduos de aminoácidos, no centro da alça inibitória. Tal propriedade não estava presente nos peptídeos anteriores. No entanto, somente dois peptídeos rearranjados apresentaram atividade inibitória. É possível que o peptídeo com o motivo KGD necessite de maior similaridade sequencial para aquisição de atividade, dependendo, dessa forma, dos aminoácidos flanqueadores na sua vizinhança. Outro fator que pode ter influenciado na ausência de atividade para o peptídeo KGD é a aparente interação entre a Lisina (pertencente ao motivo ativo) e a treonina (pertencente ao arcabouço). Tal interação impede que a lisina fique livre para interagir com a integrina. É possível observar a aproximação dos resíduos em questão na figura 53, o que indica uma possível interação entre suas cadeias laterais. Ainda assim, tal peptídeo não possui semelhança de ambiente físico químico vizinho ao motivo tripeptídico. Nas desintegrinas presentes na literatura nas quais o motivo ativo é o KGD, o ambiente vizinho é composto por glicina, triptofano, prolina e alanina, ao passo que no peptídeo estudado pelo nosso grupo o ambiente é composto por

treonina, serina, leucina e isoleucina.

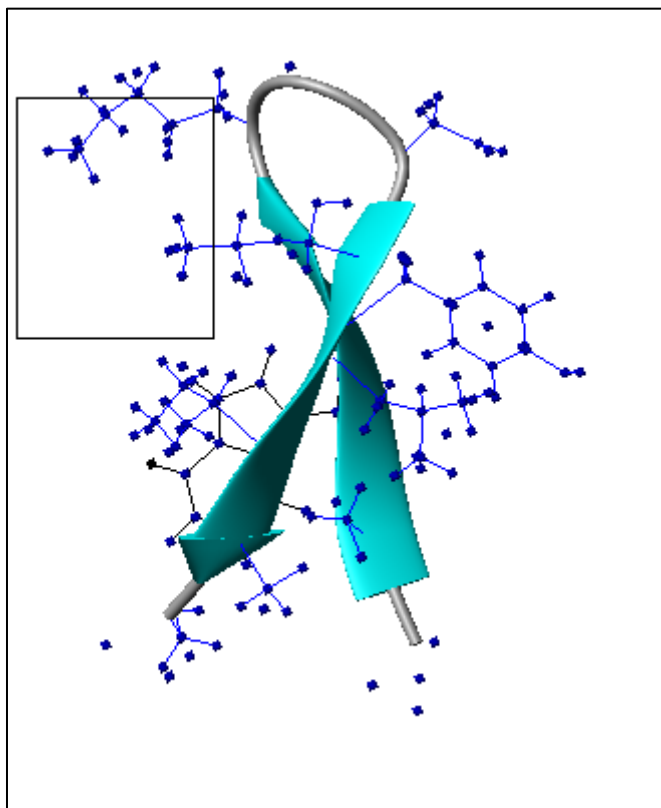


Figura 53. Estrutura tridimensional do peptídeo PSLEM 1225 KGD obtida por RMN. Em evidência é possível a visualização da aproximação das cadeias laterais do resíduo de aminoácido de lisina e de treonina.

A presença de atividade biológica de inibição de agregação plaquetária para ambos os peptídeo RGD concordam com a literatura atual, na qual o tripeptídeo Arg-Gly-Asp figura desintegrinas com atividades biológicas mais potentes. Além disso, foi importante observar que a atividade biológica em questão foi aumentada quando o motivo funcional foi deslocado para o centro exato da alça inibitória. Ao rearranjarmos a molécula, o motivo ativo tornou-se mais disponível ao passo que a estrutura restante do arcabouço permaneceu rígida devido às folhas β adquiridas. A centralização longitudinal de cargas e motivo ativo pode ser observada na figura 54, na qual todas as estruturas encontram-se dispostas na mesma figura.

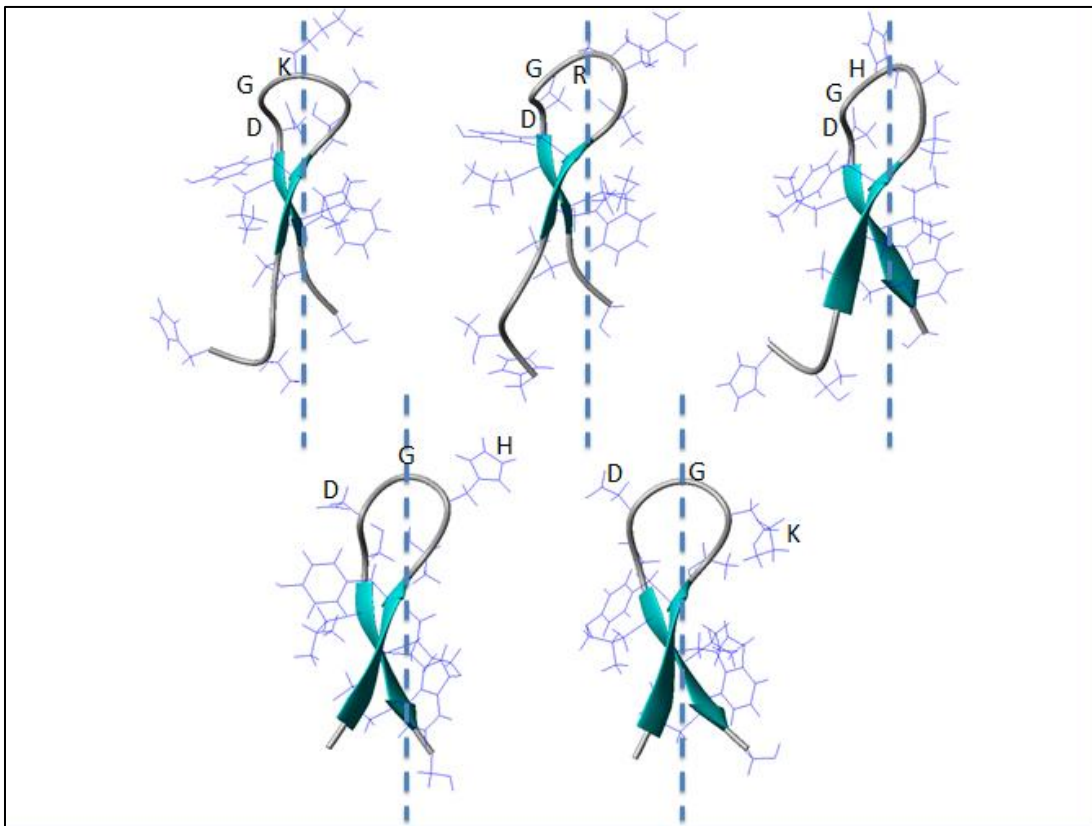


Figura 54. Imagem comparativa dos modelos estruturais tridimensionais calculados para os cinco peptídeos sintéticos do estudo. A linha tracejada ao longo do eixo longitudinal das moléculas evidencia a centralização da porção ativa R/K/H GD na alça inibitória. As letras dizem respeito aos aminoácidos do tripeptídeo ativo.

Um resultado bastante particular foi o da presença de atividade biológica no peptídeo HGD, motivo esse não muito estudado até o presente momento. O trabalho de Lu e colaboradores, em 2006 também testou a atividade de desintegrinas nas quais a arginina foi substituída por lisina e histidina, como no nosso caso e, semelhantemente ao nosso trabalho, também encontrou que as desintegrinas com HGD foram mais potentes do que aquelas com KGD.

Os resultados estão de acordo com a literatura mencionada ao longo do trabalho, na qual vários estudos evidenciaram que desintegrinas KGD possuíam atividade de inibição menos pronunciada do que desintegrinas RGD. O fato de o arcabouço do peptídeo HGD ser o melhor estruturado pode ter influenciado na sua atividade moderada, visto que agora o motivo ativo, centralizado, está livre para ligar-se ao receptor.

O peptídeo PSLEM 1050 referente ao motivo ativo RGD passa por um processo de agregação quando suspenso na concentração ideal para aquisição de dados de RMN (1mg/0.6 mL). Tal fato impossibilitou a aquisição dos espectros necessários para o cálculo de sua estrutura. Abaixo, nas figuras 55, 56 e 57 estão mostrados espectros de massa adquiridos no MicrOTOF-Q no qual o comportamento de multimerização é evidente.

Quando comparamos o espectro adquirido no equipamento Ultraflex-III por MALDI (Figuras 49 e 50) notamos a pureza do peptídeo em questão. O espectro tem um aspecto “limpo” e livre de íons adjacentes. No entanto, ao analisarmos o espectro adquirido no equipamento micrOTOF-QII, por ESI (Figura 56, 57 e 58) podemos verificar um comportamento diferenciado com vários íons adjacentes – o que corresponde a um processo de agregação.

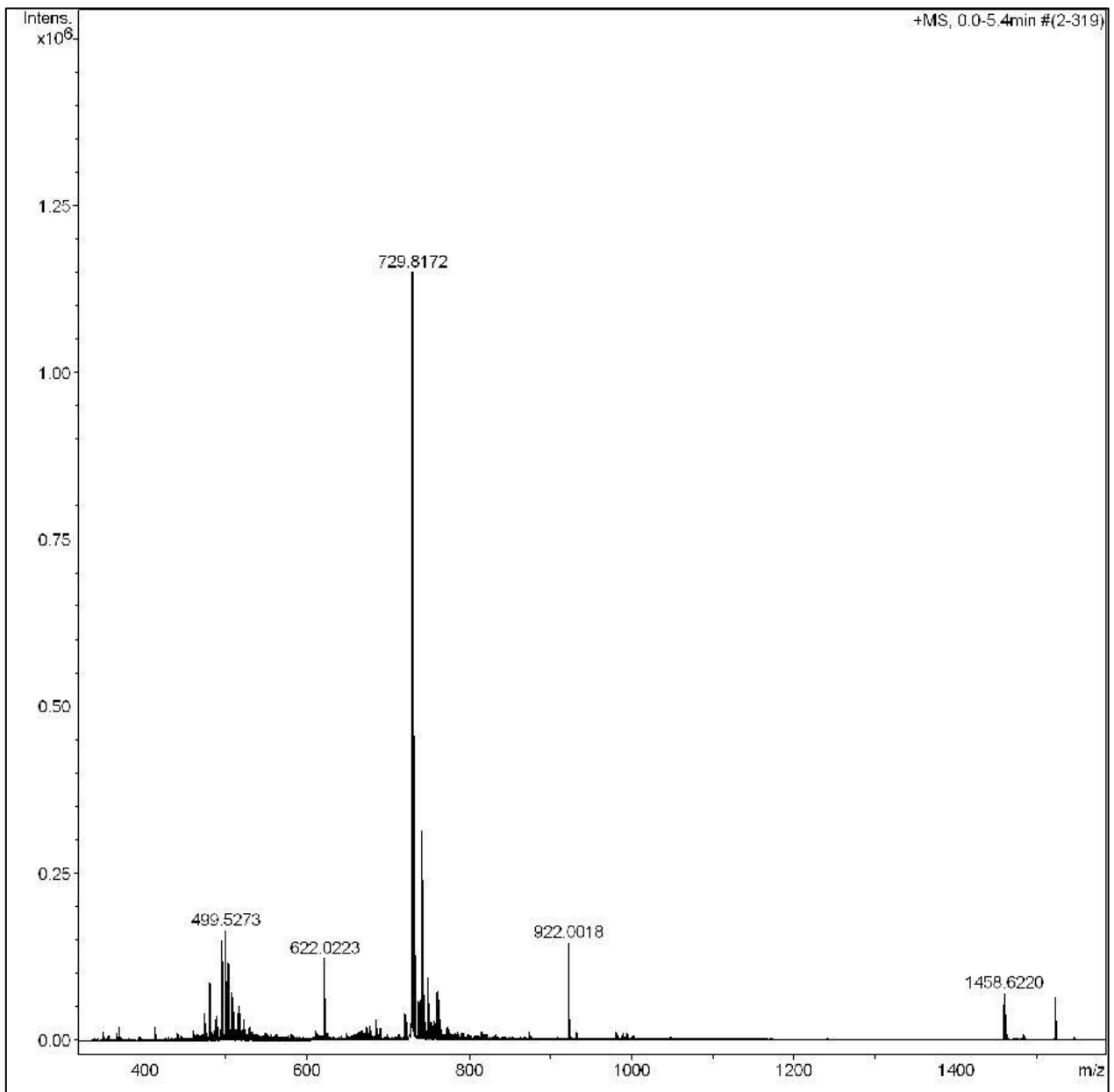


Figura 55. Espectro de massa adquirido em um ESI micrOTOF no qual é possível a identificação de um comportamento referente à uma amostra na qual acontece a agregação do peptídeo. O íon de maior intensidade diz respeito à forma dupla carga do peptídeo de interesse PSLEM 1050 – RGD.

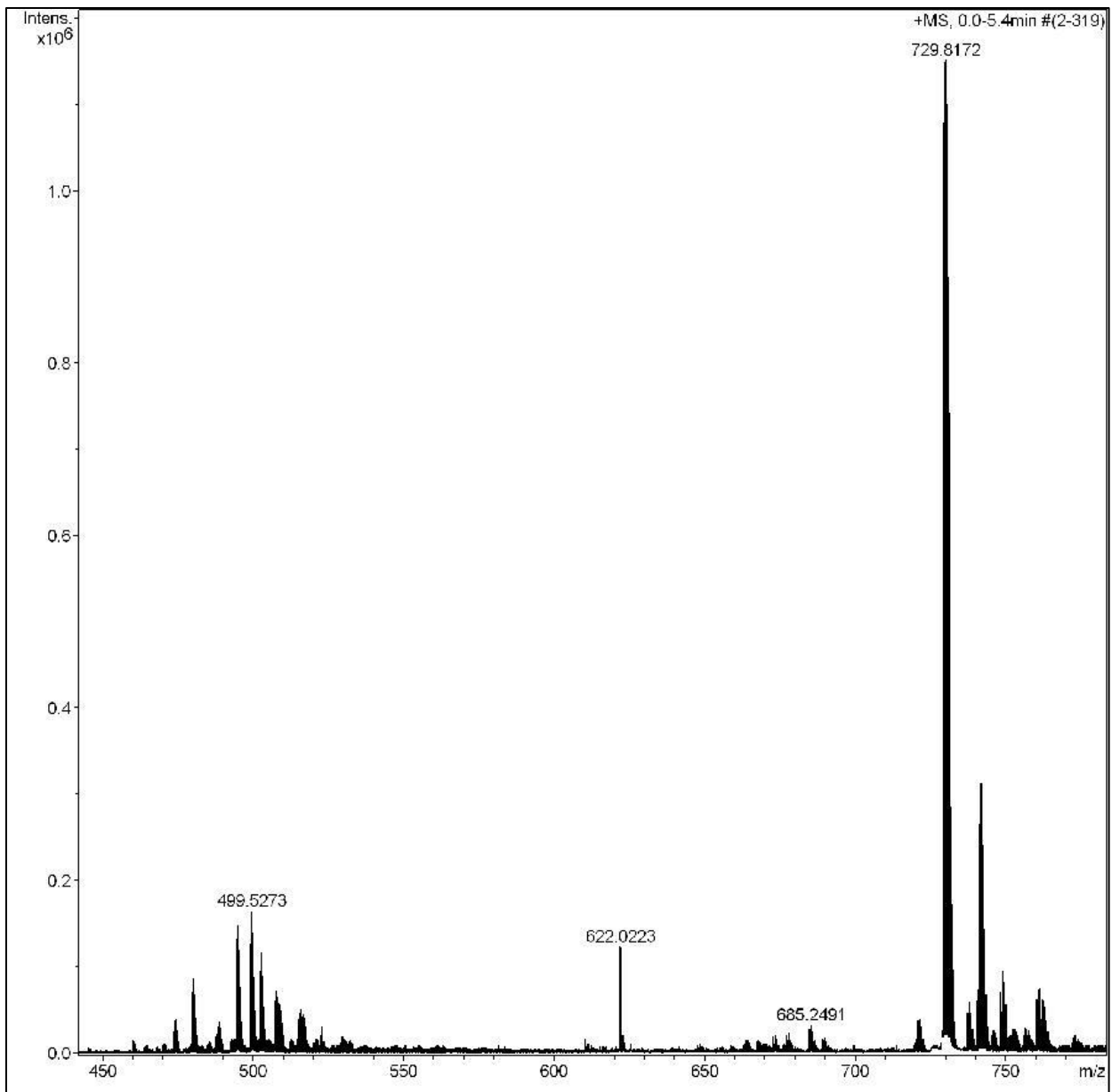


Figura 56. Espectro de massa apresentado na figura 57 com um aumento na região dos íons de dupla e tripla carga do peptídeo PSLEM 1050.

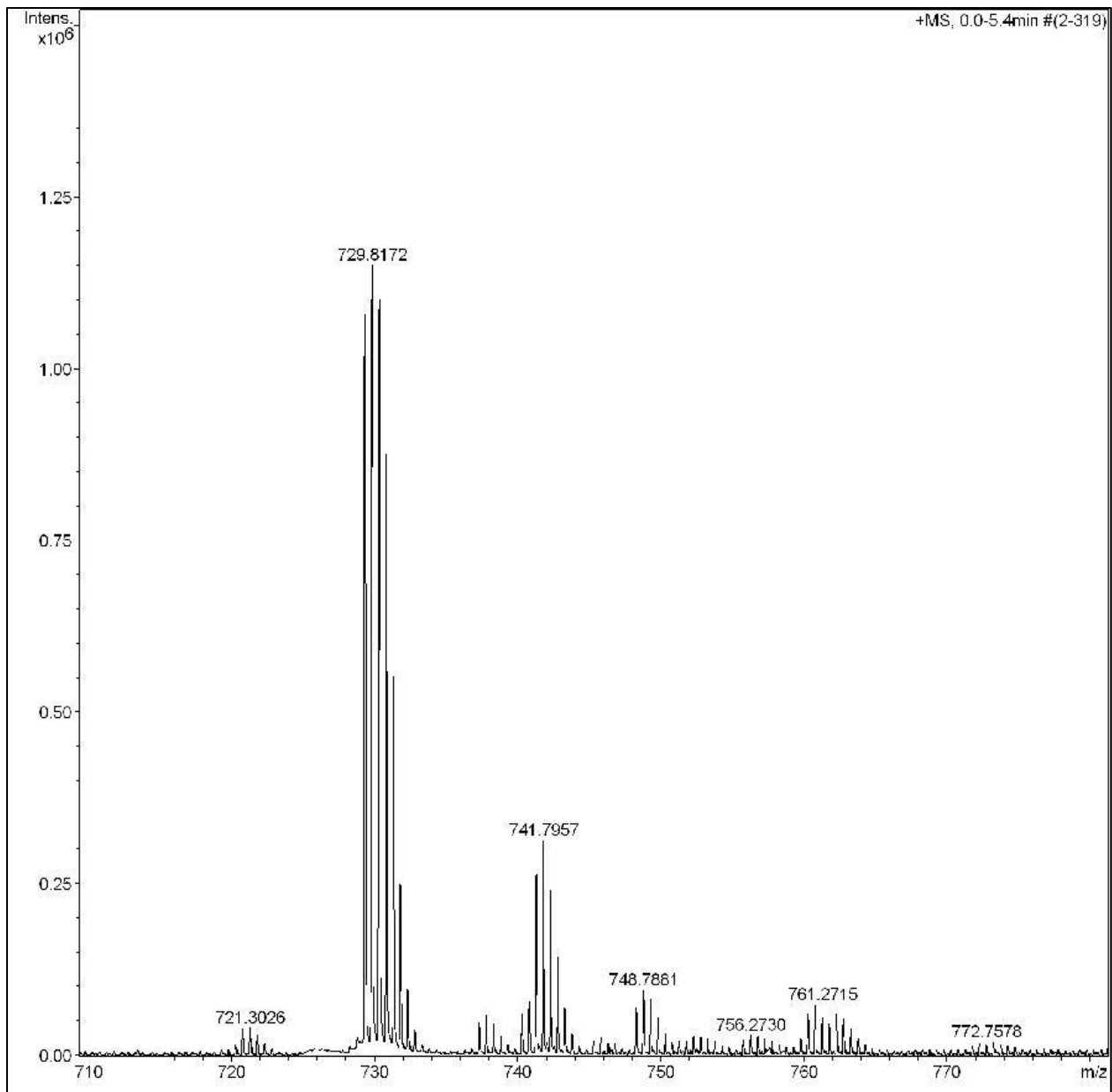


Figura 57. Espectro de massa apresentado nas figuras 57 e 58 com um aumento na região de dupla carga do peptídeo PSLEM 1050.

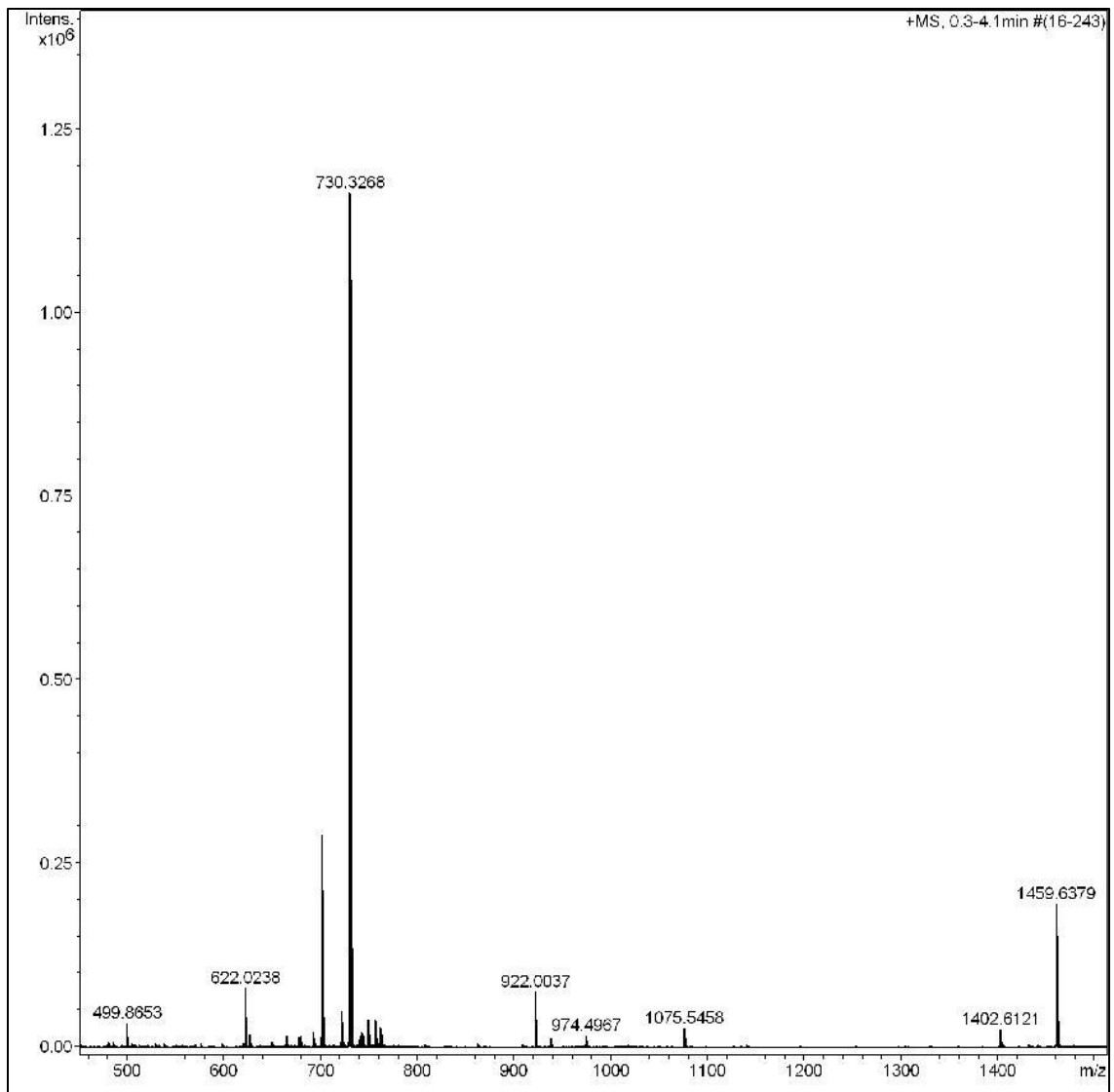


Figura 58. Espectro de massa adquirido por ESI em equipamento microTOF-QII no qual é possível a observação de um espectro normal do peptídeo PSLEM 1550.

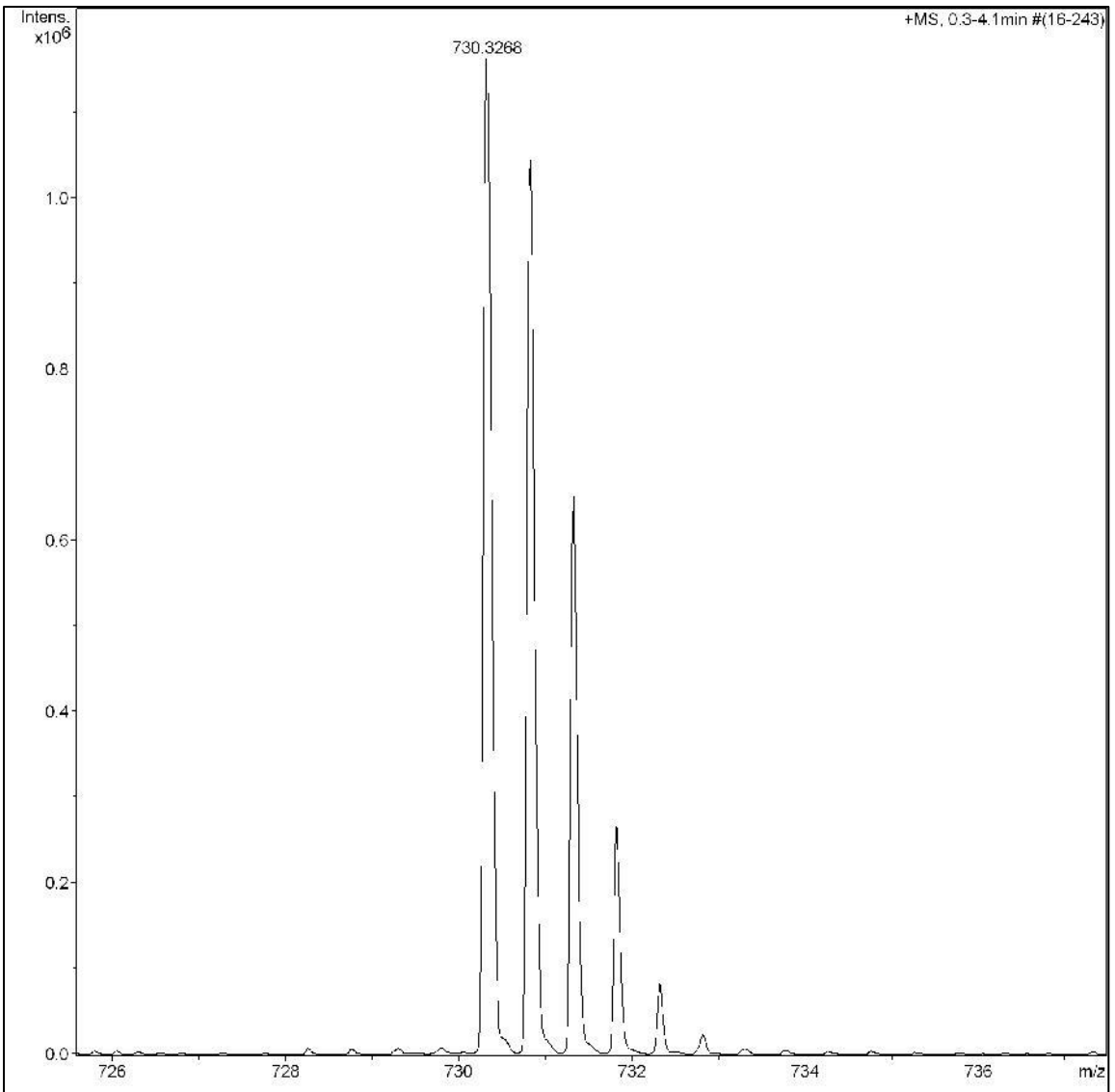


Figura 59. Espectro de massa apresentado na figura 60, no qual aumentamos a imagem para visualização da área na qual está situado o íon referente à dupla carga do peptídeo PSLEM1050 sem agregação.

Nas figuras 57 e 58 é possível observar os espectros de massa do peptídeo PSLEM 1050 adquiridos no equipamento micrOTOF-QII, por ESI. No entanto, os espectros em questão foram obtidos no peptídeo não agregado. Dessa forma podemos comparar a diferença nas representações gráficas de ambos.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados podemos concluir que o peptídeo natural proveniente da pele do anfíbio *H. punctatus* teve a sua atividade antitrombótica aumentada após a modificação estrutural realizada na sua estrutura primária.

Tal fato nos leva a crer que a sequência do peptídeo possui uma íntima relação com o enovelamento tridimensional da molécula e, por conseguinte, com a atividade biológica adquirida. A modificação de três resíduos de aminoácidos foi o bastante para uma mudança considerável na atividade biológica da molécula.

Podemos concluir, também, que peptídeos pequenos (10-15 resíduos de aminoácidos), ao contrário do que propõe a presente literatura, podem apresentar estruturas tridimensionais bastante estáveis e convergentes, como no caso dos peptídeos rearranjados cujo RMSD foi igual a 0.05 e 0.003.

Tamanha estabilidade em estruturas da magnitude de, em média, 1500 Da nos abre caminhos para uma maior exploração de arcabouços e motivos ativos, de maneira que tais motivos poderiam ser inseridos na alça ativa sem prejuízo à integridade da estrutura.

O projeto foi concluído de maneira satisfatória. No entanto, o motivo da agregação do peptídeo PSLEM 1050, assim como quais aminoácidos estão envolvidos em dada multimerização ainda é objeto de investigação e pretendemos utilizar a Ressonância Magnética Nuclear, novamente, para tal estudo.

Referências Bibliográficas

- AmphibiaWeb: *Information on amphibian biology and conservation*. [web application]. 2013. Berkeley, California: AmphibiaWeb. Disponível em: <http://amphibiaweb.org/>. (Acessado em: Sep 9, 2013).
- Angeletti R. H., Bonewald L. F. 1997. *Fields G. B. Six-year study of peptide synthesis*. **Methods Enzymol.** 289:697–717.
- Aslan J. E., Itakura A., Gertz J. M., McCarty O. J. T. 2012. *Platelet shape change and spreading*. **Methods Mol Biol.**;788:91–100.
- Bergeron, Z. L., Bingham, J. P. 2012. *Scorpion toxins specific for potassium (K⁺) channels: a historical overview of peptide bioengineering*. **Toxins**, 4, pp. 1082–1119.
- Bernarde P. S., Santos R. A. 2009. *Utilização medicinal da secreção ("vacinado sapo") do anfíbio kambô (Phyllomedusa bicolor)(Anura: Hylidae) por população não-indígena em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil*. **Revista Biotemas**, 22:213-220.
- Biemann, K., Papayannopoulos, I. A. 1994. *Amino acid sequencing of proteins*. **Acc. Chem. Res.**, 27, pp. 370–378.
- Boman, H. G. 2013. *Antibacterial Peptides: basic facts and emerging concepts*. **J. Intern. Med.** 254, 197-215.
- Brunger, A. T.; Adams, P. D.; Clore, G. M.; DeLano, W. L.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Jiang, J. S.; Kuszewski, J.; Nilges, M.; Pannu, N. S.; Read, R. J.; Rice, L. M.; Simonson, T.; Warren G. L. 1998. *Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination*. **Acta Cryst.** 54, 905.
- Brunger, A. T. 2007. *Version 1.2 of the Crystallography and NMR system*. **Nat. Protoc.** 2, 2728.
- Butler, M. S. 2008. *Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials* **Nat. Prod. Rep.**, 25, pp. 475–516.
- Calderon L. A., Silva A. A. E., Ciancaglini P., Stabeli R. G. 2010. *Antimicrobial peptides from Phyllomedusa frogs: from biomolecular diversity to potential nanotechnologic medical applications*. **Amino Acids** 40:29–49.
- Calvete, J. J, Fox, J. W, Agelan, A., Niewiarowski, S., Marcinkiewicz, C. 2002. *The presence of the WGD motif in CC8 heterodimeric disintegrin increases its inhibitory effect on alphaII(b)beta3, alpha(v)beta3, and alpha5beta1 integrins*. **Biochemistry.** 12;41(6):2014–2021.

- Cantu, M. D.; Carrilho, E.; Wulff, N. A.; Palma, M. S. 2008. *Sequenciamento de peptídeos usando Espectrometria de Massa: um guia prático*. **Quim. Nova**, 31(3), 669.
- Carroll, L. 1960. *The Annotated Alice: Alice's Adventures in Wonderland and Through the Looking-Glass*, **The New American Library**, New York, 345 pp.
- Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G., Rance, M., Skelton, N. J. 2007. em **Protein NMR Spectroscopy**. 2 ed, Elsevier, London (2007).
- Chen, C. Y.; Shiu, J. H.; Hsieh, Y. H.; Liu, Y. C.; Chen, Y. C.; Chen, Y. C.; Jeng, W. Y.; Tang, M. J.; Lo, S. J.; Chuang, W. J. 2009. *Effect of D to E mutation of the RGD motif in rhodostomin on its activity, structure, and dynamics: importance of the interactions between the D residue and integrin*. **Proteins**, 76, 808.
- Chen, L.; Annis, I., Barany, G. 2001. *Dissulfide bond Formation in peptides*. **Current Protocols in Protein Science** 10.1002/0471140864.ps1806s23.
- Clancy, S. 2008. *DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity*. **Nature Education** 1(1).
- Clarke, B. T. 1997. *The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications*. **Biol. Rev.** 72:365–379.
- Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P. S. 2009. *Fundamentos de Cromatografia*, 1 ed., **Unicamp, São Paulo**.
- Cominetti M. R., Terruggi C. H., Ramos O. H., Fox J. W., Mariano-Oliveira A., De Freitas M. S., Figueiredo C. C., Morandi V., Selistre-de-Araujo H. S. Alternagin-C. 2004. *A disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro*. **J Biol Chem**; 279: 18247–55.
- Craik D. J., Daly N. L., Waite C. 2001. *The cystine knot motif in toxins and implications for drug design*. **Toxicon** 39: 43-60.
- Davidson, M., Abramowitz, M. "Amphibian Skin.". Disponível em <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/anatomy/brightfieldgallery/amphibianskin20xsm.all.html> Acessado em: 09/09/2013
- Delaglio, F.; Grzesiek, S.; Vuister, G. W.; Zhu, G.; Pfeifer, J.; Bax, A. 1995. *A multidimensional spectral processing system based on Unix pipes*. **Journal of Biomolecular NMR**, 6, 277.
- Duellman, W. E., Trueb, L. 1986. *Biology of amphibians*, **Johns Hopkins Paperbacks edition**, Baltimore and London.

Edwards, J., Hameed, H., Campbell, G. 1988. *Induction of fibroblast spreading by Mn 2C: a possible role for unusual binding sites for divalent cations in receptors for proteins containing Arg-Gly-Asp.* **J. Cell Sci.** 89:507–13.

Erlanger, B. F., Kokowsky, N., Cohen, W. 1961. *The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin.* **Arch. Biochem. Biophys.** 96, 271-278.

Erspamer, V. and Melchiorri, P. 1980. *Active polypeptides from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals.* **Trends Pharmacol. Sci.** 1, 391–395.

Erspamer, V., and Vialli, M. 1951. *Presence of Enteramine in the skin of Amphibia* **Nature** 167, 1033.

Evaristo G. P., Verhaert P. D., et al. 2012. *PTM-driven differential peptide display: survey of peptides containing inter/intra-molecular disulfide bridges in frog venoms.* **J Proteomics** 77: 215-24.

Gante, J. A. 1994. *Pepdomimetics – Tailored Enzyme Inhibitors.* **Chem., Int. Ed. Engl,** 33, 1699-1720.

Garg, A. D., Hippargi, R., Gandhare, A. N. 2008. *Toad skin-secretions: Potent source of pharmacologically and therapeutically significant compounds.* **The Internet Journal of Pharmacology.** Volume 5 Number 2.

Howard Hughes Medical Institute (HHMI) The Genes We Share with Yeast, Flies, Worms, & Mice: New Clues to Human Health & Disease. Disponível em: <<http://www.hhmi.org/genes-we-share-with-yeast-flies-worms-and-mice>> Acessado em 18/08/2013

Hwang, T. L.; Shaka, A. J.; J. 1995. *Water Supression that works. ExcitationSculpting Using Arbitrary Waveforms and Pulsed Field Gradients.* **Magn. Reson.** 112, 275.

Huang, T. F., Holt, J. C., Lukasiewicz, H., Niewiarowski, S. 1987. *Trigramin: A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex.* **Journal of Biological Chemistry** Volume 262, Issue 33, Pages 16157-16163.

Hynes, R.O. 1987. *Integrins: a family of cell surface receptors.* **Cell.** 48:549- 554.

International Diabetes Federation. Disponível em: <http://www.idf.org/about-insulin-0> acessado em: 18/08/2013

J.X. Feliu, R. Cubarsi, A. Villaverde. 1998. *Biotechnol. Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of E. coli cells.* **Bioeng.,** 58, pp. 536–540.

Jiang, L. Svane, A. S. P., Sorensen, H. P. et al. 2011. *The Binding Mechanism of a Peptidic Cyclic Serine Protease Inhibitor.* **J. Mol. Biol.** 412, 235–250.

- Jung, A.; Bamann, C.; Kremer, W.; Kalbitzer, H. R.; Brunner, E. 2004. *High-temperature solution NMR structure of TmCsp*. **Protein Science**, 13, 342.
- Kakade, M. L.; Simons, N.; Liener, I. E. 1969. *An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the anti tryptic activity of soybean samples*. **Cereal Chem.**, 46: 518-526.
- Kim, J.; Hong, S. Y.; Park, H.; Kim, D.; Lee, W. 2005. *Structure and function of RGD peptides derived from disintegrin proteins*. **Mol Cells** 19, 205-211.
- Kirby, N. I.; DeRose, E. F.; London, R. E.; Mueller, G. A. 2004. *Nv Assign: protein NMR spectral assignment with NMRView*. **Bioinformatics**, 20(7),1.
- Kisiel, D. G., Calvete, J. J., Katzhendler, J., Fertala, A., Lazarovici, P. e Marcinkiewicz, C. 2004. *Structural determinants of the selectivity of KTS-disintegrins for the alpha1beta1 integrin*. **FEBS Lett** 577, 478-482.
- Koradi R, Billeter M, Wüthrich K. 1996. *MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures*. **J Mol Graph**. Feb;14(1):51–32.
- Korhonen H, Pihlanto A. 2006. *Bioactive peptides: production and functionality*. **Int Dairy J**, 16:945-960.
- L. Wang, G. Evaristo, M. Zhou, M. Pinkse, M. Wang, Y. Xu et al. 2010. *Nigrocin-2 peptides from Chinese Odorrana frogs – integration of UPLC/MS/MS with molecular cloning in amphibian skin peptidome analysis* **FEBS J**, 277, pp. 1519–1531.
- La Marca, E., Scott, N. Aquino, L., Azevedo-Ramos, C., Coloma, L. A., Faivovich, S. R. J., Baldo, D., Hardy, J., Amorós, C. L. B. *Hypsiboas punctatus*. **In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em <www.iucnredlist.org>. Acessado em: 09/09/2013
- Le-Nguyen, D., Heitz, A., Chiche, L., E. Hajji, Castro, M. B. 1993. *Characterization and 2D NMR study of the stable [9±21, 15±27] 2 disulfide intermediate in the folding of the 3 disulfide trypsin inhibitor EETI II*. **Protein Sci**. 2, 165±174.
- Levitt, M. H. 1986. *Composite Pulses*. **Progress in NMR Spectroscopy**, 18, 61.
- Liskamp, R. M. J., Rijkers, D. T. S., Kruijtzter, J. A. W. & Kemmink, J. 2011. *Peptides and proteins as a continuing exciting source of inspiration for peptidomimetics*. **ChemBioChem** 12, 1626–1653.
- Liu, K., Paterson, A. J., Konrad, R. J., Parlow, A. F., Jimi, S., Roh, M., Chin E., Kudlow, J. E. 2002. *Streptozotocin, an O-GlcNAcase inhibitor, blunts insulin and growth hormone secretion*. **Mol Cell Endocrinol**;194(1-2):135-46.

- Liu, L.; Yang, X. W.; Chen, W. Q.; Tang, J. G. 2002. *Effect of disulfide bond on the conformation and anticoagulant activity of an Arg-Gly-Asp motif displayed on a mutant insulin protein framework*. **Letters in Peptide Science**, 9, 179.
- Lori, C., Lantella, A., Pasquo, A., Alexander, L. T., Knapp, S., Chiaraluce, R., Consalvi, V. 2013. *Effect of Single Amino Acid Substitution Observed in Cancer on Pim-1 Kinase Thermodynamic stability and Structure*. **PLoS one** 8(6): e64824.
- Losso J. N. 2008. *The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk Inhibitor*. **Crit Rev Food Sci Nutr** 48: 94–118.
- Lu, X., Davies, J., Lu, D., Xia, M., Wattam, B., Shang, D., Sun, Y., Scully, M., Kakkar, V. 2006. *The effect of the single substitution of arginine within the RGD tripeptide motif of a modified neurotoxin dendroaspin on its activity of platelet aggregation and cell adhesion*. **Cell Commun. Adhes.**, vol. 13, no. 3.
- Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J. and Campbell, I. D. 1992. *The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions*. **Cell** 71, 671-678.
- Mans B. J., Louw A. I., Neitz A. W. H. 2002. *Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick Ornithodoros savignyi, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold*. **J. Biol. Chem.** 277:21371–78.
- Marx, V. 2005. *Watching peptides drugs grow up*. **Chemical and Engineering News**, 83, 17-24.
- Minoux, H., Chipot, C., Brown, D., Maigret, B. 2000. *Structural analysis of the KGD sequence loop of barbourin, an alpha(IIB)beta(3)-specific disintegrin*. **J. Comp.-Aided Mol. Design** 14 317–327.
- Morganstern, D., King, G. F. 2013. *The venom optimization hypothesis revisited*. **Toxicon** 63, 120–128.
- National Biological Information Infrastructure (NBII). Disponível em <<http://biology.about.com/library/bltranslation.htm>> Acessado em: 20/08/2013
- Oliveira Jr., N. G., Cardoso, M. H. S, Franco, O. L. 2013. *Snake Venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes*. **Cell. Mol. Life Sci.** s00018-013-1345-x.
- Osipov, A., Utkin, Y. 2012. *Effects of snake venom polypeptides on central nervous system*. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**;12(4):315-28.
- Plow, E. F.; Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E.; Marguerie, G. A. 1985. *Ginsberg, M. H. The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 82, 8057.

- Ramachandran, G.N., Ramakrishnan, C., Sasisekharan. 1963. *Stereochemistry of polypeptide chain configurations*. **J. Mol. Biol.** 7 95–99.
- Reiss, S., Sieber, M., Oberle, V., Wentzel, A., Spangenberg, P., Claus, R., Kolmar, H., Lösche, W. 2006. *Inhibition of platelet aggregation by grafting RGD and KGD sequences on the structural scaffold of small disulfide-rich proteins*. **Platelets** 17(3):153-157.
- Resende, J.M., Moraes, C.M., Munhoz, V.H., Aisenbrey, C., Verly, R.M., Bertani, P., Cesar A., Pilo-Veloso, D, Bechinger, B. 2009. *Membrane structure and conformational changes of the antibiotic heterodimeric peptide distinctin by solid-state NMR spectroscopy*, **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 106 16639–16644.
- Rubin, C. *et al.* 2010. *Whole-genome resequencing reveals loci under selection during chicken domestication*. **Nature** 464, 587–591.
- Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 12, pp. 697–715 (1996).
- Ruoslahti, E., M. D. Pierschbacher. 1987. *New perspectives in cell adhesion*. **Science** 238:491-497.
- Saudek, V., Atkinson, A., Pelton, J. T. 1991. *Three-dimensional structure of echistatin, the smallest active RGD protein*. **Biochemistry**, 30, 7369-7372.
- Savage, J. M. 1973. *The geographic distributions of frogs: patterns and predictions. In Evolutionary Biology of the Anurans, Contemporary Research on Major Problems (ed. J. L. Vial)*, pp. 351±445. University of Missouri Press, Colombia.
- Schwartz, E. F., Schwartz, C. A. Sebben, A. 1998. *Occurrence of hemolytic activity in the skin secretion of the caecilian Siphonops paulensis*. **Natural Toxins**, Holanda, v. 6, p. 179-182.
- Schwartz, E. F., Mourão, C. B. F., Moreira, K. G., Camargis, T. S., Mortari, R. 2012. *Arthropod Venoms: A vast arsenal of insecticidal neuropeptides*. **Biopolymers**. New York. V.98, p. 385-405.
- Shen, Y.; Delaglio, F.; Cornilescu, G.; Bax, A.; J. 2009. *TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts*. **Biomol. NMR**, 44, 213.
- Shibue, M.; Mant, C. T.; Hodges, R. S. 2005. *Effect of anionic ion-pairing reagent concentration (1-60 mM) on reversed-phase liquid chromatography elution behaviour of peptides*. **Journal of Chromatography**, 1080, 58 (2005).
- Silva, L. L.; D'amico, E. A. 2010. *Estudo comparativo entre agregação plaquetária por turbidimetria e impedância elétrica em pacientes sob terapia antiplaquetária à base de ácido acetilsalicílico*. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 32, n. 6.

Steen, H. & Mann, M. 2004. *The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing*. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 5, 699–711.

Stephens, W. E. 1946. *A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion* **Phys. Rev.**69, 691.

Sutcliffe, M. J., Jaseja, M., Hyde, E. I., Lu, X., Williams, J. 1994. *Three-dimensional structure of the RGD-containing neurotoxin homologue dendroaspin*. **Struct. Biol.** 1, 802–807.

Szczeklik A, Musial J, Undas A, Sanak M, Nizankowski R. 2005. *Aspirin resistance*. **Pharmacol Rep** ;57 Suppl:33-41.

Tamburino, R. , Severino, V , Sandomenico, A., Ruvo, M. , Parente, A., Chambery, A., Di Maro, A. 2012. *De novo sequencing and characterization of a novel Bowman–Birk inhibitor from Lathyrus sativus L. seeds by electrospray mass spectrometry* **Mol. BioSyst.** 8, 3232-3241.

The University of Georgia Research Foundation, Inc. Elliot Altman. Stabilized Bioactive peptides and methods of identification, synthesis and use. **WO2004011485 A2**. Disponível em: <<http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2004011485>>. Acesso em: 28/08/2013

Vagner, J., Qu, H., Hruby, V. J. 2008. *Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery*. **Curr Opin Chem Biol.** 12(3): 292–296.

Vyas, V. K., Brahmabhatt, K., Bhatt, H., Parmar, U. 2013. *Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives*. **Asian Pac J Trop Biomed**; 3(2): 156-162.

Wermelinger, L. S.; Geraldo, R. B.; Frattani, F. S.; Rodrigues, C. R.; Juliano, M. A.; Castro, H. C.; Zingali, R. B. 2009. *Integrin inhibitors from snake venom: exploring the relationship between the structure and activity of RGD-peptides*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 482, 25.

Wishart D. S., Bigam C. G., Holm A., Hodges R. S., Sykes B. D. 1995. *¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects*. **J Biomol NMR.** 5(1):67–81.

Wishart, D. S.; Sykes, B. D.; Richards, F. M. 1992. *The chemical shift index: a fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy*. **Biochemistry**, 31, 1647.

Wolfsberg, T. G., Straight, P. D., Gerena, R. L., Huovila, A. P., Primakoff, P., Myles, D. G. and White, J. M. 1995. *ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain*. **Dev. Biol.** 169, 378-383.

Yamamoto, M., Fisher, J. E., Gentile, M., Seedor, J. G., Leu, C.-T., Rodan, S. B., Rodan, G. A. 1998. *The integrin ligand echistatin prevents bone loss in ovariectomized mice and rats.* **Endocrinology** 139, 1411-1419.

Yan, X.; Liu, H.; Yang, X.; Che, Q.; Liu, R.; Yang, H.; Liu, X.; You, D.; Wang, A.; Li, J.; Lai, R. 2012. *Bi-functional peptides with both trypsin-inhibitory and antimicrobial activities are frequent defensive molecules in Ranidae amphibian skins.* **Amino Acids**, 17, 1.

Zasloff, M. 1987. *Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor.* **Proc Natl Acad Sci U S A** 84, 5449-5453

Zasloff, M. 2002. *Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms.* **Nature** 415, 389–395.

Zhang Z, Zhu S. 2012. *Comparative genomics analysis of five families of antimicrobial peptide-like genes in seven ant species.* **Dev Comp Immunol** 38: 262–274.