

**Embrapa**

Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Biologia – IB

Programa de Pós-graduação – PPG

Departamento de Biologia Animal - BioAni

**Síntese Química e Purificação de Análogos de  
Somatostatina de *Hypsiboas punctatus***

Ana Carolina de Jesus Ribeiro

Brasília-DF

-1/2011-



Universidade de Brasília – UnB  
Instituto de Biologia – IB  
Programa de Pós-graduação – PPG  
Departamento de Biologia Animal - BioAni

Síntese Química e Purificação de Análogos de Somatostatina de  
*Hypsiboas punctatus*

Ana Carolina de Jesus Ribeiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Dra. Maura Vianna Prates.

Brasília – DF

## **AGRADECIMENTOS**

### **Agradecimentos institucionais**

Ao departamento de Biologia Animal pela oportunidade de realização do projeto

À EMBRAPA– Recursos Genéticos e Biotecnologia pela infraestrutura disponibilizada para a realização do projeto.

Ao Prof. Alberto Spisni, atual chefe do *Dipartimento di Medicina Sperimentale* da *Università degli Studi di Parma*, Itália pela contínua colaboração neste projeto desde 2003, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron-LNLS, ocasião na qual a estrutura da Hp-Somatostatina foi determinada por RMN.

Ao laboratório do Prof. Enzo Poli do *Dipartimento di Anatomia Umana, Farmacologia e Scienze Medico-Forensi, Sezione di farmacologia* pela realização dos ensaios *biológicos in vitro* da *Università degli Studi di Parma*, Itália.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo suporte financeiro.

### **Agradecimentos pessoais**

Primeiramente, agradeço aos meus pais (Romiro e Vani Ribeiro) e irmãos (Felipe e William) pelo apoio dado ao longo de toda esta jornada, desde o início da graduação até o final desta etapa de pós-graduação. Sempre estiveram presentes quando eu precisei.

À minha querida orientadora, Maura Vianna Prates que, há alguns anos, me recebeu de braços abertos no laboratório, pelo apoio, paciência, disposição, respeito e, acima de tudo, sinceridade.

Ao Carlos Bloch Júnior, pelas frases sempre inesperadas/inusitadas, pelas conversas (des)orientadoras, pelos cine-LEM e por todos os momentos descontraídos proporcionados no LEM afinal, *In Bloch we trust*.

À Mariana Torquato Quezado de Magalhães pela amizade e por continuar sendo a mãe-Mari por ainda ser “mãe” nas horas de aprendizagem e MÁ-riana quando precisava.

Ao pessoal do Laboratório de Espectrometria de Massa – LEM Cenargen – cujos nomes faço questão de citar: Eder Barbosa\_Ediinho, Kelliane\_Kelly Key, Nathy, Tati\_tatebs, Daniel Sifuentes\_Sifu, Alice\_Bacurinha, Eduardo Barbosa\_Eduarrdo vovô, Karlinha, Flávio, Luciano Paulino e, Marcelo Bemquerer.

Ao Núcleo Jovem do LEM: Luisa Mayumi\_Migs, Sophia Wiczorek\_Sophis, Diego Arantes pelas saídas, conversas e discussões (científicas e não-científicas) até altas horas da madrugada em diferentes ocasiões.

Aos membros agregados do LEM: Ingrid Heimbeck, Gabriel Alves, Felipe Vinecky , Caroline\_ Caroline, e Pollyanna Campos\_Polly pelos vários momentos de alegria, pelas inúmeras conversas e pelo incentivo durante todo o percurso.

Ao pessoal da [LISTA] por todos os momentos de descontração e apoio.

À minha grande amiga Paula Cristina Pena Soares, que nada tem a ver com a ciência, mas que sempre acreditou e esteve “lá” por mim.

Às minhas queridas de São Paulo, Melissa Bars\_Xãxãs, Renata Brandt\_RenaTia, Patrícia Lacouth\_Pati-beijo, Carol Scarpellini\_carci... que sempre me apoiaram com palavras de incentivo e motivação e, claro, pela *groselhagem* diária!

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma e que, por algum infortúnio me faltam na memória, saibam que influenciaram no processo.

“Cada livro é um testemunho do momento em que foi escrito, um instantâneo do assunto. Entretanto, só porque uma pessoa será diferente amanhã não há porque não fotografá-la hoje.”

**Joseph O'Connor & John Seymour**

## RESUMO

A somatostatina é um neuropeptídeo multifuncional que inibe a secreção de diversos hormônios em diferentes organismos. Seus análogos são utilizados para tratar disfunções endócrinas, bem como para inibir alguns fatores de crescimento em tumores. Em sua estrutura primária são encontrados dois resíduos do aminoácido cisteína que formam uma ligação dissulfeto conferindo à molécula sua conformação característica. Um análogo natural da somatostatina presente na secreção cutânea do anuro *Hypsiboas punctatus* foi caracterizado por técnicas de RP-HPLC e ESI/MS, MALDI-TOF-TOF/MS e MALDI-TOF-TOF/MS/MS. Infere-se dos resultados obtidos que esse análogo possui uma estrutura mais estável em relação ao natural (dados de RMN não publicados). Portanto, o objetivo deste trabalho foi utilizar a molécula previamente caracterizada como arcabouço para o desenho de peptídeos produzidos sinteticamente, pela estratégia Fmoc/t-butila, bem como sua purificação e a realização de testes biológicos *in vitro*, a fim de compreender o papel dos aminoácidos-chave em suas estruturas primárias. Os resultados da fase de purificação/MS mostram a ocorrência de oxidação espontânea dos análogos e a tendência em formar agregados não covalentes e/ou dímeros quando em meio aquoso, o que tornou complexo o isolamento de uma forma única e pura destes compostos; testes *in vitro* de contratilidade em células de músculo liso de mamíferos revelaram atividade dos peptídeos sintetizados como agonistas dos SSTRs. As perspectivas deste projeto incluem a caracterização estrutural dos peptídeos por RMN.

**Palavras-chave:** *análogos sintéticos, somatostatina, disfunções endócrinas*

Apoio financeiro: CAPES

## ABSTRACT

Somatostatin is a multifunctional neuropeptide that inhibits the secretion of many hormones in different organisms. Somatostatin analogues are used to treat endocrinological dysfunctions such as acromegaly and also to inhibit some types of tumor growth factors. This molecule has two Cysteine residues in its primary structure forming a disulfide bond that grants the molecule its characteristic conformation. In a skin-secretion study of the anuran *Hypsiboas punctatus*, a naturally occurring somatostatin-like peptide was characterized by techniques such as RP-HPLC, ESI/MS, MALDI-TOF-TOF/MS and MALDI-TOF-TOF/MS/MS. The results suggested that its primary structure may contribute to distinguished conformation stability (NMR data not published). Therefore, this study aimed to utilize the primary structure of this Somatostatin-like peptide as a framework to the design, synthesis (Fmoc/t-butyl strategy), purification, and structural characterization of somatostatin analogues, in order to investigate the role of key amino acids in its structure. The RP-HPLC/MS results showed the occurrence of spontaneous oxidation of the molecule as well as the formation of dimmers and/or peptide aggregates which made the isolation of great quantities of one specific form with high purity hard to obtain. Induced contraction *in vitro* experiments data showed that the analogues interacted functionally with the SSTRs of smooth muscle mammalian cells. The study's perspectives involve the elucidation of the 3D structure by NMR.

Key words: *synthetic analogues, somatostatin, endocrinological dysfunctions*

**Supported by:** CAPES

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCK - Colecistocinina

CHCA - Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico

CRH – Hormônio liberador de corticotropina, do inglês *Corticotropin-releasing hormone*

Da - Dalton

DIC - diisopropilcarbodiimida

DIPEA – diisopropiletilamina

DCM - diclorometano

DMF – N,N- dimetilformamida

EDT – etanoditiol

EFS – *Electrical field stimulation*

ESI/MS – *Electron Spray Ionization/Mass Spectrometry*

Fmoc - 9-fluorenilmetoxicarbonila

GH – Hormônio do crescimento, do inglês *Growth hormone*

GHRH – Hormônio liberador do hormônio do crescimento, do inglês *Growth-hormone-releasing hormone*

HOBt - 1- hidroxibenzotriazol

MALDI TOF - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight*

MALDI-TOF-TOF/MS - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight/ Mass spectrometry*

MALDI-TOF-TOF/MS/MS - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight/ Mass spectrometry* referente à fragmentação e sequenciamento do íon de interesse

MeOH – metanol

MeCN – acetonitrila

NOEs – *Nuclear overhauser effect*

PRL - Prolactina

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSD – Root mean square deviation

RP-HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês *Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography*

SNC – Sistema nervoso central

SS – somatostatina

SSTR – Receptor de somatostatina

TBTU - O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametilurônio tetrafluoroborato

TFA - Ácido trifluoracético

TSH – Hormônio estimulante da tireóide ou tirotropina, do inglês *Thyroid-stimulating hormone*.

TRH – Hormônio liberador da tiroprotina, do inglês *thyrotropin-releasing hormone*.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

**Tabela 1:** Relação de peptídeos descritos em cérebro e trato gastrintestinal (TGI) de mamíferos em comparação aos encontrados em pele de anfíbios. Em destaque, a molécula de somatostatina encontrada em mamíferos. Tabela modificada e traduzida de *The peptide triangle* disponível no domínio público da internet ([http://www.montegen.com/Montegen/Nature\\_of\\_Business/The\\_Gate/The\\_Business\\_Objective/Licensing\\_Opportunities/Biodiversity/The\\_peptide\\_triangle/the\\_peptide\\_triangle.htm](http://www.montegen.com/Montegen/Nature_of_Business/The_Gate/The_Business_Objective/Licensing_Opportunities/Biodiversity/The_peptide_triangle/the_peptide_triangle.htm)).

**Tabela 2:** Lista de Fmoc-Aminoácidos utilizados na síntese dos peptídeos análogos da Somatostanina.

**Tabela 3:** Lista de peptídeos sintetizados. Estão apresentados os códigos dos análogos, sua sequência peptídica bem como suas massas moleculares calculadas e observadas experimentalmente. Onde, a\* - estado reduzido; b\* - estado oxidado.

**Figura 1:** Alinhamento múltiplo de somatostatinas de diferentes representantes do filo Chordata. As sequências observadas foram obtidas por meio de pesquisa no banco de dados do site do *National Center for Biotechnology Information* na aba *Protein*. A ferramenta utilizada para análise foi o *T-Coffee* que encontra-se disponível no domínio público da internet. Os aminoácidos marcados de azul são aqueles idênticos entre as sequências enquanto que os de vermelho são os diferentes.

**Figura 2:** Consenso das 20 estruturas calculadas em água sobrepostas na região F5-T18, baseado no pareamento mínimo do desvio padrão do esqueleto do peptídeo.

**Figura 3:** Estruturas calculadas da Hp-somatostatina indicando uma conformação mais rígida devido à interações específicas entre os resíduos (A) D<sup>14</sup> – K<sup>2</sup>; (B) H<sup>15</sup> – F<sup>5</sup>; e (C) F<sup>4</sup> – W<sup>6</sup>.

**Figura 4:** Tabela contendo os vinte aminoácidos de ocorrência natural com suas cadeias laterais em destaque. A tabela foi traduzida da original disponível em *Lehninger Principles of biochemistry, fourth edition*, capítulo 3, página 79.

**Figura 5:** Perfil cromatográfico do peptídeo sintético bruto denominado HpS-TDH-NH<sub>2</sub>. Cromatografia realizada em coluna de fase reversa 218TP510 (*Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*). As principais frações foram denominadas F1 e F2. O experimento foi monitorado em 216 nm (preto) e em 280 nm (vermelho) simultaneamente. A linha azul representa o gradiente crescente de solvente B.

**Figura 6:** Perfil cromatográfico analítico da F1 da amostra HpS-TDH-NH<sub>2</sub>. Cromatografia realizada em coluna de fase reversa 218TP54 (*Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*). A fração de maior absorvância é aquela que contém o peptídeo de interesse. O experimento foi monitorado em 216 nm (preto) e em 280 nm (vermelho) simultaneamente. A linha azul representa o gradiente crescente de solvente B.

**Figura 7:** Perfil cromatográfico analítico da F2 da amostra HpS-TDH-NH<sub>2</sub>. Cromatografia realizada em coluna de fase reversa 218TP54 (*Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*). O experimento foi monitorado em 216 nm (preto) e em 280 nm (vermelho) simultaneamente. A linha azul representa o gradiente crescente de solvente B.

**Figura 8:** Espectro de massa da amostra HpS-TDH-NH<sub>2</sub>. O íon de maior intensidade, representado pela massa monoisotópica 1831,9 Da, é o peptídeo de interesse. O espectrômetro de massa utilizado foi o MALDI TOF-TOF, *Ultraflex III, Bruker Daltonics (Billerica, MA-USA)*.

**Figura 9:** Perfil cromatográfico semi-preparativo da amostra HpS-TDH-NH<sub>2</sub>. Cromatografia realizada em coluna de fase reversa 238TP510 (*Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*). As frações destacadas indicam as moléculas de interesse. O experimento foi monitorado em 216 nm (preto) e em 280 nm (vermelho) simultaneamente. A linha azul representa o gradiente crescente de solvente B.

**Figura 10:** Espectros de massa das frações destacadas no cromatograma da figura 9. Em (A) a distribuição isotópica da amostra HpS-TDH-NH<sub>2</sub>-F7 em seu estado oxidado e em (B) a amostra HpS-TDH-NH<sub>2</sub>-F8, em seu estado reduzido.

**Figura 11:** Perfil cromatográfico semipreparativo da amostra HpS-TDH-OH em fase reversa 218TP10 (*Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*). As frações denominadas F9 e F10 são aquelas que contêm as moléculas de interesse.

**Figura 12:** Espectros de massa das frações F9 e F10. Em (A) a massa monoisotópica de 1832,70 Da é indicativo da amostra em seu estado oxidado e, em (B) em seu estado reduzido, cuja massa monoisotópica é de 1834,71 Da.

**Figura 13:** Perfil cromatográfico do peptídeo sintético HpS-TDQ-NH<sub>2</sub> realizado em coluna de dimensões semi-preparativas. O experimento foi monitorado em 216 nm (preto) e em 280 nm (vermelho) simultaneamente. A linha azul representa o gradiente crescente de solvente B.

**Figura 14:** Espectros de massa da amostra HpS-TDQ-NH<sub>2</sub>. Em (A) há a presença do íon da molécula em seu estado majoritariamente reduzido de 1824,85 Da e em (B), em seu estado oxidado de 1822,88 Da.

**Figura 15:** Sequência de perfis cromatográficos da amostra HpS-TNH-NH<sub>2</sub>. Em (A) o perfil cromatográfico HpS-TNH-NH<sub>2</sub>\_09, em (B) HpS-TNH-NH<sub>2</sub>\_10 e, em (C) HpS-TNH-NH<sub>2</sub>\_11. As frações sinalizadas são aquelas que contêm a molécula de interesse. As cromatografias foram realizadas em coluna de fase reversa 218TP510 (*Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*) e o experimento foi monitorado em 216 nm (preto) e em 280 nm (vermelho) simultaneamente. A linha azul representa o gradiente crescente de solvente B.

**Figura 16:** Espectro de massa da fração F3. O íon em evidência de 1830,83 Da representa a massa monoisotópica do peptídeo HpS-TNH-NH<sub>2</sub>.

**Figura 17:** Espectro de massa da fração F4. Os íons em evidência de 1830,84 Da e de 1832,84 Da representam as massas monoisotópicas da amostra HpS-TNH-NH<sub>2</sub> em seus estados oxidados e reduzidos respectivamente.

**Figura 18:** Efeito do octreotídeo e da Hp-Somatostatina ( $10^{-7}$ M e  $10^{-6}$  M) na taxa de acidificação extracelular medido pelo sistema Citotensor em células do tipo INS-1. Os dados representam médias  $\pm$  S.E dos valores da taxa de acidificação extracelular realizados em triplicata.

**Figura 19:** Estimulação elétrica de contração induzida em tecido de musculatura lisa. Os análogos testados foram HpS-TDH-OH; HpS-TNH-NH<sub>2</sub> e; HpS-TDQ-NH<sub>2</sub>.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1 TOXINAS DE ANFÍBIOS</b> .....	12
<b>1.2 NEUROPEPTÍDEOS</b> .....	14
<b>1.3 EFEITOS DA SOMATOSTATINA</b> .....	20
<b>1.4 HP-SOMATOSTATINA</b> .....	21
<b>1.5 DADOS NÃO PUBLICADOS</b> .....	21
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	28
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1 SÍNTESE DOS PEPTÍDEOS</b> .....	30
<b>4.2 OXIDAÇÃO DA AMOSTRA</b> .....	32
<b>4.3 PURIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS</b> .....	32
<b>4.4 ESPECTROMETRIA DE MASSA</b> .....	33
<b>4.5 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS</b> .....	33
<b>4.6 EFEITO DO OCTREOTÍDEO E DA SOMATOSTATINA NA TAXA DE ACIDIFICAÇÃO     EXTRACELULAR</b> .....	34
4.6.1 <i>Cultura celular</i> .....	34
4.6.2 <i>Ensaio de Microfisiometria funcional</i> .....	34
<b>4.7 ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA – CONTRAÇÃO INDUZIDA</b> .....	<b>35</b>
4.7.1 <i>Preparação dos tecidos isolados</i> .....	35
4.7.2 <i>Testes farmacológicos</i> .....	36
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
<b>5.1 SÍNTESES COMPLETAS</b> .....	38
<b>5.2 PERFIS CROMATOGRÁFICOS E ESPECTROS DE MASSA</b> .....	39
<b>5.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS</b> .....	<b>53</b>
<b>5.3.1. MICROFISIOMETRIA FUNCIONAL</b> .....	<b>53</b>
<b>5.3.2. ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA – CONTRAÇÃO INDUZIDA</b> .....	<b>54</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>6.3 ANÁLOGOS DE SOMATOSTATINA</b> .....	56
<b>6.4 SÍNTESE QUÍMICA EM FASE SÓLIDA</b> .....	58
<b>6.5 PURIFICAÇÃO DOS ANÁLOGOS DE HP-SOMATOSTATINA</b> .....	58
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
<b>8 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>65</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 Toxinas de anfíbios

Sabe-se, desde meados dos anos 80, que pesquisas na área de peptídeos biologicamente ativos encontrados em mamíferos têm sido continua e substancialmente estimuladas e enriquecidas por aquelas conduzidas a partir da extração de secreções cutâneas de anfíbios. Houve ocasiões em que a descoberta de peptídeos relacionados ao cérebro e/ou ao trato gastrintestinal encontrados em mamíferos foram precedidas pelo isolamento e pela caracterização de seu peptídeo equivalente encontrado em secreção cutânea de anfíbios. Portanto, os estudos a respeito de peptídeos oriundos da secreção cutânea de anfíbios têm servido para a elucidação das relações entre o cérebro e o TGI de mamíferos (Renda *et al.*, 1989).

Muitos anfíbios produzem um arsenal de toxinas como parte de sua imunidade inata. Nas células que revestem as paredes das glândulas granulares presentes na pele desses animais é produzida uma variedade de princípios ativos que compreendem diferentes tipos de moléculas. Existe uma diversificada gama de esteróides, de alcalóides, de aminas biogênicas, de derivados guanidínicos, de proteínas e de peptídeos, incluindo-se, na produção desses dois últimos, seus precursores e todo o sistema enzimático envolvido na sua biossíntese (Sebben *et al.*, 1993).

Alguns peptídeos bioativos são moléculas efetoras do sistema imunológico inato dos organismos multicelulares, desempenhando um importante papel nos indivíduos. Estas moléculas são essenciais para a integridade fisiológica tanto de organismos que possuem sistema imunológico adaptativo quanto para aqueles não possuem células especializadas para o combate de agentes patogênicos (Boman & Hultmark, 1987).

Vários compostos presentes na secreção da pele protegem os anfíbios contra a predação, munindo-os de um gosto e/ou de um odor repelente, de propriedades adesivas que interferem nos processos de ingestão, além de causarem náuseas, perda da coordenação e da consciência e morte (Stone *et al.*, 1992).

Dentre esses compostos, determinados peptídeos têm despertado bastante interesse não só devido às suas atividades como neurotransmissores, mas também por serem similares a hormônios encontrados nos sistemas gastrintestinal e nervoso de mamíferos. Os exemplos mais frequentes de hormônios encontrados tanto na pele de anfíbios, quanto em mamíferos, inclusive na espécie *Homo sapiens*, são a bradicinina, o hormônio liberador de tirotrina (TRH), as bombesinas e os peptídeos opióides (Erspamer *et al.*, 1976). As classes de peptídeos encontrados no cérebro e no trato gastrintestinal de mamíferos e na pele dos anfíbios estão relacionadas na tabela 1. Supõe-se que a presença destes peptídeos encontrados na secreção cutânea de anfíbios deva-se a fatores evolutivos das relações de predação destes animais por mamíferos (Renda *et al.*, 1989).

**Tabela 1:** Relação de peptídeos descritos em cérebro e trato gastrintestinal (TGI) de mamíferos em comparação aos encontrados em pele de anfíbios. Em destaque, a molécula de somatostatina encontrada em mamíferos. Tabela modificada e traduzida de *The peptide triangle* disponível no domínio público da internet ([http://www.montegen.com/Montegen/Nature\\_of\\_Business/The\\_Gate/The\\_Business\\_Objective/Licensing\\_Opportunities/Biodiversity/The\\_peptide\\_triangle/the\\_peptide\\_triangle.htm](http://www.montegen.com/Montegen/Nature_of_Business/The_Gate/The_Business_Objective/Licensing_Opportunities/Biodiversity/The_peptide_triangle/the_peptide_triangle.htm)).

CÉREBRO	TRATO GASTRINTESTINAL	PELE
<i>Mamíferos</i>	<i>Mamíferos</i>	<i>Anfíbios</i>
Substância P	Substância P	Taquicininas
Colecistocinina	Colecistocinina	Ceruleínas
Bradicininas	Bradicininas	Bradicininas
Gastrina	Gastrina (7)	-
Neurotensina	Neurotensina	Xenopsina
Encefalinas e dermophin-like	Encefalinas e endorfinas	Dermofinas
Hormônio estimulante da tireóide (TSH)	Hormônio estimulante da tireóide (TSH)	Hormônio estimulante da tireóide (TSH)
<b>Somatostatina</b>	<b>Somatostatina</b>	<b>?</b>
Bombesin-like	Bombesin-like	Bombesina
Peptídeo intestinal vasoativo	Peptídeo intestinal vasoativo	Peptídeo intestinal vasoativo
Angiotensina I e II	Angiotensina I e II	Crinia angiotensina
Fator de liberação de corticotropina Sauvagein-like e Urotensin-like	Fator de liberação de corticotropina Sauvagein-like e Urotensin-like	Sauvageínas
-	-	Triptofilinas

Peptídeos como as bradicininas, as taquicininas, as ceruleínas e as bombesinas são conhecidos pela capacidade em aumentar a motilidade gástrica podendo induzir a êmese da presa (Conlon & Aronsson, 1997), ou agir estimulando as glândulas salivares e lacrimais de mamíferos, bem como causar resposta gástrica integrada atuando no aumento da liberação de bicarbonato e de muco, inibindo a secreção ácida e de pepsina e, ainda, aumentando a atividade motora (Ayalon *et al.*, 1981). Além disso, também podem provocar mudanças no comportamento dos predadores, tais como a inibição de ingestão de alimentos e água e, em alguns casos, sedação do predador (Schwartz *et al.*, 2007).

## **1.2 Neuropeptídeos**

Desde o final dos anos 60 e o início dos 70 do século passado, ficou demonstrado que os fatores reguladores do hipotálamo, as endorfinas e as encefalinas são peptídeos, e que hormônios do sistema digestivo como a colecistocinina (CCK), o peptídeo intestinal vasoativo e a somatostatina são também produzidos no cérebro. Esses achados fizeram aumentar substancialmente as pesquisas envolvendo neuropeptídeos e, conseqüentemente, o número de publicações sobre o assunto (Strand *et al.*, 1999).

As estruturas dos neuropeptídeos têm sido fortemente conservadas ao longo da evolução, indicando que devem existir mecanismos para perpetuar essas moléculas sinalizadoras. As insulinas de alguns mamíferos como bovinos, suínos e humanos são altamente conservadas podendo apresentar, no máximo, dois resíduos de aminoácidos diferentes em suas sequências, sugerindo que quase tudo da estrutura da insulina é essencial para a sua função, o que inclui não somente a ligação ao receptor, mas também, muito provavelmente, a regulação do processamento do seu precursor biossintético e dos grânulos de armazenagem da insulina ativa.

Todavia, a conservação da estrutura não previne o sistema primitivo de ganhar novas funções. A economia do desenvolvimento evolutivo resultou na retenção da estrutura química de muitos neuropeptídeos, mesmo que seus receptores e suas funções tenham se modificado. A prolactina (PRL), um dos peptídeos hormônios mais antigos, teve sua função modificada radicalmente ao longo da evolução. Em todas as espécies, desde os peixes aos humanos, a PRL está relacionada ao metabolismo de sais e de água. Nas fêmeas dos mamíferos, é responsável pela lactação e, nos machos, incluindo os humanos, a PRL está envolvida na espermatogênese, na síntese de testosterona e na libido. Esse fato contribui com fortes evidências de que há um ancestral comum para muitos neuropeptídeos, uma vez que peptídeos derivados de plantas, anfíbios, peixes e outros mamíferos são capazes de ativar processos fisiológicos em humanos (Strand *et al.*, 1999).

O modelo molecular neuroendócrino de controle das funções de um organismo descrito por Acher e Chauvet (1995) constitui um processo em cascata, que se inicia com o processamento do polipeptídeo precursor em peptídeo ativo e é estocado em vesículas de armazenamento, até ser disponibilizado na corrente sanguínea. A partir daí, o hormônio circulante atinge sua célula-alvo, ou seja, aquela que possui os receptores capazes de reconhecê-lo em sua membrana. Uma vez ativados, os receptores transferem a mensagem molecular ao efetor bioquímico no interior da célula, produzindo uma função biológica específica, por meio de um processo de transdução de sinal, mediado por proteínas-G. A cascata pressupõe que cada passo ao longo do caminho depende de um reconhecimento molecular específico.

A secreção da pele dos anfíbios já é conhecida há algum tempo como fonte rica de peptídeos biologicamente ativos (Erspamer *et al.*, 1985). Mais de 200 desses peptídeos já foram caracterizados estruturalmente e classificados em várias famílias, com base em suas estruturas primárias. Muitos chegam a ser idênticos a moléculas produzidas por animais superiores, como a bradicinina e a bombesina, que são dois neuropeptídeos extraídos da secreção da pele de anfíbios, análogos a neuropeptídeos produzidos endogenamente pelos sistemas nervoso e digestório dos vertebrados (Anastasi *et al.*, 1965; Anastasi *et al.*, 1971)

A bombesina foi detectada pela primeira vez na pele de anfíbios do gênero *Bombina* por Erspamer e seus colaboradores, em 1971 (Anastasi *et al.*, 1971). Seu análogo nos mamíferos foi identificado, pouco tempo depois, por Walsh *et al.* (1979), como o peptídeo liberador da gastrina, com a propriedade de estimular a liberação da secreção ácida gástrica. Atualmente, a lista de atividades biológicas atribuídas à bombesina sobre o trato gastrointestinal (TGI) e o sistema nervoso central de mamíferos é extensa e inclui a contração da musculatura lisa, a secreção de outros hormônios gastrintestinais, a regulação do apetite e a termorregulação (Ghatei *et al.*, 1982; Itoh *et al.*, 1995; McCoy & Avery, 1970; Severi *et al.*, 1991).

A somatostatina (SS), originalmente isolada do hipotálamo de carneiro, é um tetradecapeptídeo caracterizado funcionalmente por sua ação como inibidor fisiológico da secreção pituitária de GH, motivo pelo qual foi chamada inicialmente de fator inibidor da liberação de hormônio do crescimento (GH ou somatotropina). Nos mamíferos, sabe-se que a somatostatina existe em duas formas biologicamente ativas, SS-14 (H-A<sup>1</sup>-G<sup>2</sup>-[C<sup>3</sup>-K<sup>4</sup>-N<sup>5</sup>-F<sup>6</sup>-F<sup>7</sup>-W<sup>8</sup>-K<sup>9</sup>-T<sup>10</sup>-F<sup>11</sup>-T<sup>12</sup>-S<sup>13</sup>-C<sup>14</sup>]-OH) e a SS-28 (H-S<sup>1</sup>-A<sup>2</sup>-N<sup>3</sup>-S<sup>4</sup>-N<sup>5</sup>-P<sup>6</sup>-A<sup>7</sup>-M<sup>8</sup>-A<sup>9</sup>-P<sup>10</sup>-R<sup>11</sup>-E<sup>12</sup>-R<sup>13</sup>-K<sup>14</sup>-A<sup>15</sup>-G<sup>16</sup>-[C<sup>17</sup>-K<sup>18</sup>-N<sup>19</sup>-F<sup>20</sup>-F<sup>21</sup>-W<sup>22</sup>-K<sup>23</sup>-T<sup>24</sup>-F<sup>25</sup>-T<sup>26</sup>-S<sup>27</sup>-C<sup>28</sup>]-OH), ambas codificadas por um gene comum e processadas a partir de um precursor único (Brazeau *et al.*, 1979). Sua síntese ocorre na forma de pré-pró-somatostatina, passa por uma clivagem proteolítica tecido-específica, gerando os dois peptídeos bioativos (SS-14 e SS-28), correspondentes aos C-terminais 14 e 28, respectivamente (Devos *et al.*, 2002).

A SS-14 é um peptídeo cíclico que possui uma ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína 3 e 14, produzindo uma estrutura em anel, considerada essencial para a sua atividade biológica. Existem formas múltiplas de somatostatina estendidas na região N-terminal, como a SS-28 também de mamíferos, as SS-22, -25 e -28 de peixes em geral e as SS-34 e -37 identificadas somente nas lampreias.

O hormônio SS-14 tem sua estrutura primária conservada na maioria das classes de seres vivos. A comparação de seqüências entre as somatostatinas encontradas em mamíferos (humana e de camundongo), em uma ave, em um anuro e em um peixe podem ser observadas no alinhamento peptídico da figura 1.

[ <i>Homo sapiens</i> ]	AGCKNFFWKTF <span style="color: blue;">TSC</span>
[ <i>Mus musculus</i> ]	AGCKNFFWKTF <span style="color: blue;">TSC</span>
[ <i>Gallus gallus</i> ]	AGCKNFFWKTF <span style="color: blue;">TSC</span>
[ <i>Xenopus tropicalis</i> ]	AGCKNFFWKTF <span style="color: blue;">TSC</span>
[ <i>Trachemis scripta</i> ]	AGCKNFFWKTF <span style="color: blue;">TSC</span>
[ <i>Danio rerio</i> ]	<span style="color: red;">T</span> GCKN <span style="color: red;">Y</span> FWK <span style="color: red;">SR</span> T <span style="color: red;">A</span> C
<i>Consensus</i>	:****:***: *:*

**Figura 1:** Alinhamento múltiplo de somatostatinas de diferentes representantes do filo Chordata. As sequências foram obtidas por meio de pesquisa no banco de dados do *site* do *National Center for Biotechnology Information* na aba *Protein*. A ferramenta utilizada foi *T-Coffee*, disponível no domínio público da *internet*. Aminoácidos em azul são aqueles idênticos entre as sequências enquanto que os em vermelho os não conservados.

As sequências peptídicas listadas na figura 1 têm alto grau de identidade, demonstrando a conservação de suas estruturas ao longo da evolução destes grupos e, com exceção da somatostatina encontrada no exemplar de *Danio rerio* (peixe paulistinha), as estruturas primárias encontradas nos demais exemplares mostram-se idênticas.

A somatostatina é uma molécula multifuncional que não só inibe a liberação de GH e de GHRH (hormônio liberador do hormônio do crescimento), mas que também controla a liberação de muitos outros hormônios, pituitários, pancreáticos e do trato digestório e regula as secreções do TGI. As células produtoras de SS ocorrem em alta densidade nos sistemas nervoso central e periférico, no sistema digestório e no pâncreas endócrino, e em densidade menor em outros tecidos periféricos e tipos celulares, incluindo as glândulas tireóide e adrenal, a placenta, os rins, as glândulas submandibulares, o sistema reprodutivo e as células inflamatórias e imunológicas (Strand *et al.*, 1999).

A atuação da SS é sistêmica, a exemplo de um hormônio clássico ou local, como um neurotransmissor ou regulador parácrino/autócrino, exercendo, dessa forma, diversas funções fisiológicas, que podem ser separadas em três categorias. Na primeira delas, a SS age como um neurotransmissor no cérebro sobre as funções cognitivas, locomotoras, sensoriais e autônomas. Na segunda, a SS inibe a proliferação celular

(células T), enquanto na terceira, considerada a mais importante, a SS inibe uma gama de secreções celulares endócrinas e exócrinas. No cérebro, a SS inibe a liberação de dopamina, de norepinefrina, de hormônio liberador de GH, de hormônio liberador da tirotropina (TRH), de hormônio liberador da corticotropina (CRH) e da própria SS (Gugger & Reubi, 2006).

De modo geral, a SS-28 é a variante mais potente dos mamíferos, por inibir o GHRH, o GH, a PRL e o TSH — hormônio estimulador da tireóide — e a secreção de insulina, enquanto a SS-14 é muito mais seletiva nas suas atividades inibidoras, agindo especificamente sobre a secreção do glucagônio, sobre a secreção exócrina gástrica, sobre o fluxo sanguíneo esplâncnico (proveniente das vísceras) e sobre a motilidade intestinal (Gugger & Reubi, 2006).

Os efeitos biológicos diversos da SS são mediados por uma família de receptores acopladores de proteínas G pelos receptores da SS (SSTR), os quais compreendem uma cadeia polipeptídica simples característica, com sete domínios transmembrana. Existem atualmente cinco subtipos de receptores SSTR humanos clonados e codificados por cinco genes não alélicos, localizados em cromossomos separados. Embora os subtipos de SSTR sejam 40-60% homólogos estruturalmente, cada subtipo medeia atividades biológicas distintas da SS. Dependendo da célula-alvo, os cinco SSTRs são acoplados a uma variedade de caminhos de transdução de sinal, incluindo os da adenilatociclase e os da guanilatociclase, os das fosfolipases A<sub>2</sub> e C, os dos canais de K<sup>+</sup> e de Ca<sup>+</sup>, os da troca Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, os das proteínas quinases e os das tirosinas fosfatases. Todavia todos eles são ativados por uma proteína G com subunidade  $\alpha$  do tipo inibidora (G<sub>oi</sub>) (Lamberts *et al.*, 2002).

Os receptores da SS-14 são distribuídos de forma abundante pelo cérebro, com maior concentração no córtex cerebral, concentração intermediária no hipotálamo, no tálamo e no hipocampo e menos concentrados nas porções cerebrais medial e posterior. As concentrações de SSTs na pituitária anterior, na zona glomerulosa do córtex adrenal e no pâncreas exócrino são tão elevadas quanto no córtex cerebral (Strand *et al.*, 1999). Nas ilhotas do pâncreas, os SSTRs estão presentes nas células  $\delta$  produtoras de SS, nas células  $\beta$  produtoras de insulina e nas células  $\alpha$  produtoras de glucagônio.

Estudos recentes mostraram que alguns análogos da SS inibem o crescimento de tumores, dentre os quais os ósteo e condrossarcomas, os adenocarcinomas pancreáticos ductores e acinares, os pituitários, os insulinomas e bem como carcinomas de mama e de próstata. Por sua vez, o crescimento dos adenocarcinomas humanos do cólon e do pâncreas e dos cânceres de células do pulmão transplantados para camundongos mostrou ser inibido pela administração de análogos da SS. Tal inibição pode ser devida ao fato de que a maioria dos tumores neuroendócrinos humanos expressa SSTR<sub>2</sub> em concentrações elevadas, homogênea e densamente distribuídos ao longo das células tumorais (Fisher *et al.*, 2002). Em outros estudos, constatou-se que terapias prolongadas com octreotídeo e lanreotídeo — análogos sintéticos da somatostatina — específicos para SSTR<sub>2</sub>, suprimiram a liberação de GH pelos adenomas pituitários secretores de GH em pacientes com acromegalia (Pawlikowsk & Melen-Mucha, 2002).

Um estudo realizado por Ushakova e colaboradores (2010) levanta uma importante questão no que diz respeito à evolução simbiogenética entre procariotos e eucariotos. Em seu trabalho, a equipe estuda a influência de um peptídeo análogo à somatostatina que é produzido por colônias de *Bacillus subtilis* que compõem a microbiota intestinal de uma ave selvagem. Os resultados desta pesquisa sugerem que o análogo é capaz de desempenhar um papel regulatório nas interações inter-celulares da ave, estimulando o crescimento de indivíduos jovens. Isso evidencia o fato de que há moléculas sinalizadoras compartilhadas por bactérias e por eucariotos e que estas podem manifestar alguma influência nos tecidos multicelulares no qual se encontram (Markov, 2005).

Segundo Chatterjee *et al.* (2002), a administração de octreotídeo em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni* não só reduz a pressão do sistema-porta, o peso do baço e o do fígado, a deposição de ovos no fígado, o tamanho e a quantidade de células do granuloma, mas também previne a fibrose hepática severa. Entretanto, o efeito da SS poderia ser maior do que o mediado pelo octreotídeo, uma vez que este análogo é restrito aos SSTR<sub>2</sub> e SSTR<sub>5</sub>. Por esse motivo, análogos da SS mais similares à sua forma nativa representariam um agente terapêutico potencial para a esquistossomose. Não é a primeira vez que um hormônio mostra-se de valor terapêutico, a exemplo da insulina e da cortisona.

### 1.3 Efeitos da somatostatina

Desde a elucidação da estrutura primária da somatostatina em 1973 por Roger Burgus e colaboradores (Burgus *et al.*, 1973), o número de estudos concernindo seu papel em sistemas biológicos aumentaram em quantidade e narraram as diversas atividades que esta molécula pode desempenhar em sistemas biológicos.

As investigações acerca das atividades da somatostatina revelaram que se trata de um dos peptídeos mais importantes na regulação do trato gastrointestinal em mamíferos. Sua síntese por diferentes tipos de células, principalmente pelas células- $\delta$ , espalhadas pelo sistema gastroentérico garantem suas funções moduladoras neste sistema e nos órgãos periféricos que estão associados ao eixo central-periférico, especificamente cérebro-trato gastrointestinal de mamíferos (Den Bosch *et al.*, 2009).

Uma das principais características funcionais gastroentéricas afetadas pela presença da somatostatina está relacionada com os padrões de atividade motora no trato gastrointestinal. Por exemplo, este peptídeo possui um potente efeito supressor no esvaziamento gástrico e na contratilidade da vesícula biliar (Abdu *et al.*, 2002) e uma atividade propulsora nos intestinos grosso e delgado (Corleto *et al.*, 2006).

Estudos voltados para o entendimento dos modos de ação entre análogos de SS e seus subtipos de receptores vêm ampliando as perspectivas para o desenvolvimento de estruturas análogas que possam ser empregadas de forma terapêutica. Análises estruturais utilizando a técnica de RMN para a elucidação de análogos da somatostatina apontam dificuldades na caracterização conformacional destas moléculas. No entanto, algumas pesquisas prosperaram em demonstrar que o consenso da conformação estrutural do octreotídeo é um equilíbrio entre uma porção de folha  $\beta$ -antiparalela e uma formação em hélice na porção C-terminal (Melancini *et al.*, 1997; Grace *et al.*, 2006).

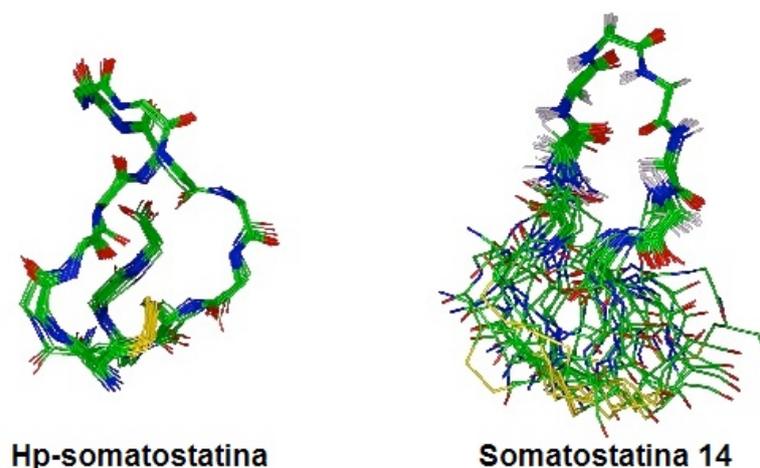
#### **1.4 Hp-somatostatina**

A partir do extrato total da secreção cutânea de *Hypsiboas punctatus*, foi obtida uma fração peptídica, a qual foi submetida a análises de massa e de pureza por MALDI-TOF/MS. O peptídeo foi sequenciado por dois métodos distintos e complementares, cujos resultados foram compatíveis entre si (Prates, 2003).

Sua estrutura primária revelou que o composto em questão apresenta identidade com moléculas bem caracterizadas, depositadas nos bancos de dados de proteínas disponíveis por via eletrônica, mostrando elevado grau de identidade (94%) com o hormônio peptídeo somatostatina, classicamente encontrado no cérebro e no sistema digestivo de vertebrados superiores, inclusive nos humanos (Guillemin & Gerich, 1976).

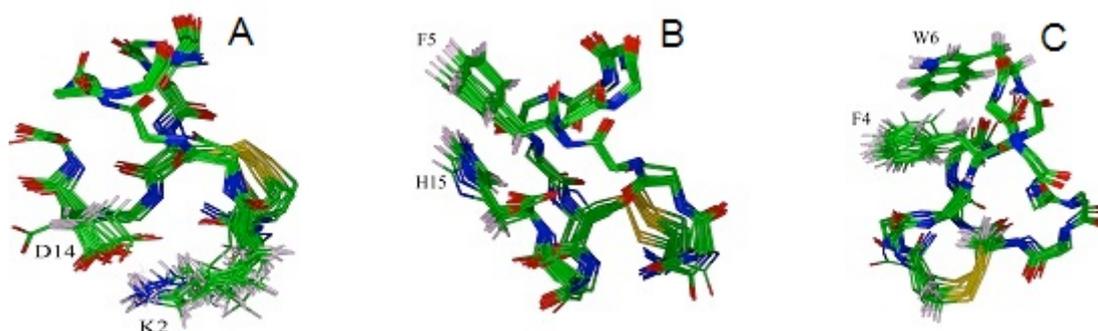
#### **1.5 Dados não publicados**

Segundo dados preliminares obtidos por nossos colaboradores do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, 2004), é possível especular que a curta meia-vida plasmática da somatostatina humana (SS-14) esteja relacionada à sua flexibilidade estrutural. As primeiras evidências que apóiam esta hipótese vem da comparação das estruturas tridimensionais entre um análogo da SS-14 e a Hp-somatostatina, que revelou mudanças relevantes na dinâmica molecular desses peptídeos e nas posições das cadeias laterais dos resíduos de triptofano (W), fenilalanina (F) e lisina (K). No caso da Hp-somatostatina, a porção C-terminal (T-D-H), Hp-somatostatina-TDH-NH<sub>2</sub>, confere a esta molécula uma maior rigidez, quando comparada ao análogo humano como pode ser observado na figura 2.



**Figura 2:** Consenso das 20 estruturas calculadas em água sobrepostas na região F5-T18, baseado no RMSD do peptídeo.

Os dados de ressonância magnética nuclear (RMN) confirmam a presença de vários *NOEs* de até 3,0Å entre prótons das cadeias laterais do D<sup>14</sup> com a K<sup>2</sup>, sugerindo a formação de uma ponte salina entre esses dois resíduos, além da sobreposição (*stacking*) dos anéis da F<sup>4</sup> e da H<sup>15</sup>, o que proporciona maior rigidez estrutural para a Hp-somatostatina, em relação à SS-14, como pode ser observado na figura 3. Dados de dicroísmo circular da SS-14 também foram comparados aos da HpS-TDH-NH<sub>2</sub> e corroboram as diferenças estruturais entre os dois.



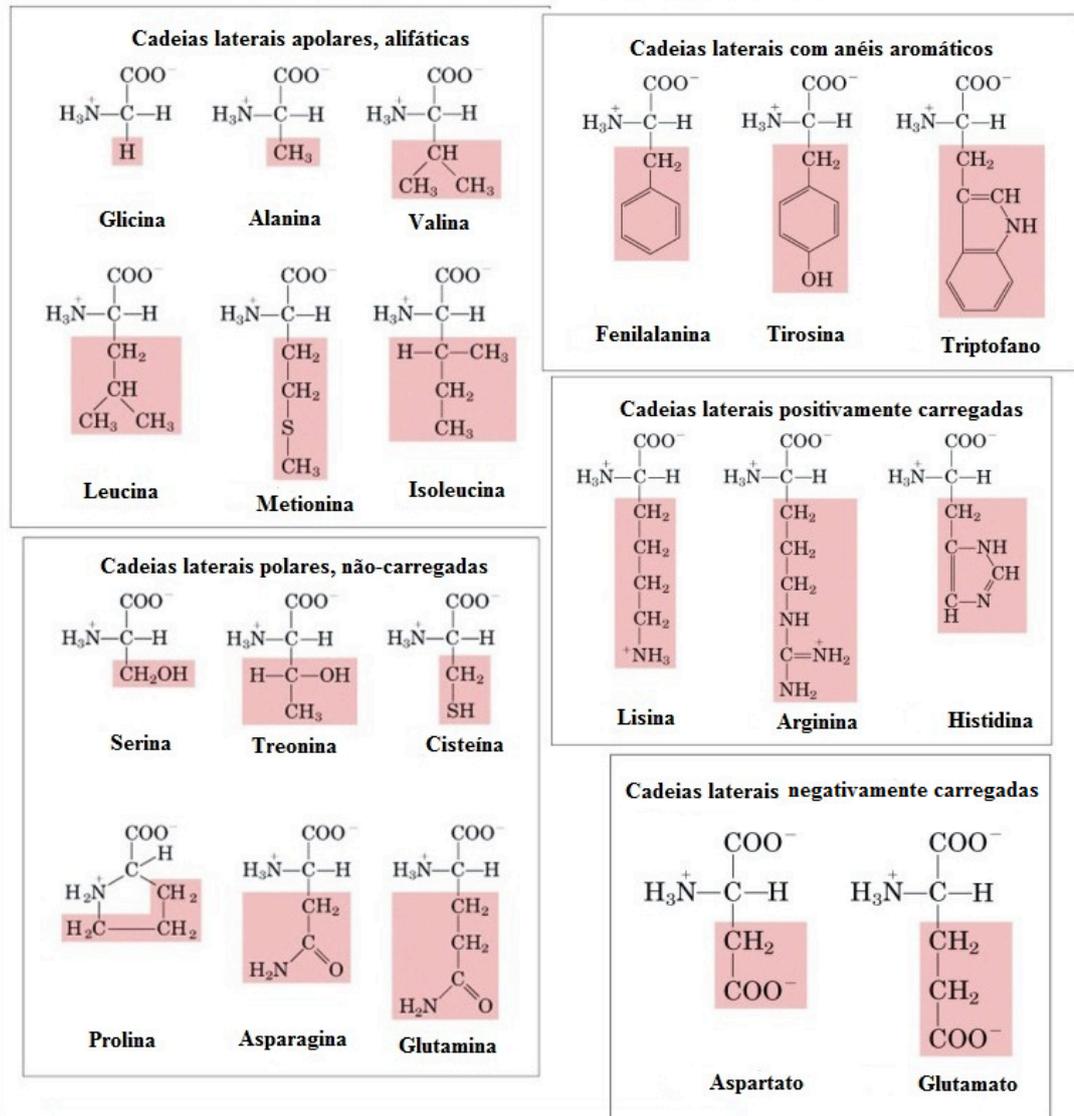
**Figura 3:** Estruturas calculadas da Hp-somatostatina indicando uma conformação menos flexível nas extremidades devido às interações específicas entre os resíduos (A) D<sup>14</sup> – K<sup>2</sup>; (B) H<sup>15</sup> – F<sup>5</sup> e; (C) F<sup>4</sup> – W<sup>6</sup>.

As atividades biológicas *in vitro* do octreotídeo (análogo da SS-14 utilizado com fins terapêuticos) e da Hp-somatostatina foram avaliadas, por meio da análise de acoplamento funcional a receptores, utilizando um sistema de microfisiômetro citosensor. Foram monitoradas mudanças na velocidade de acidificação do meio extracelular na presença das duas substâncias, ficando demonstrado que, após administração de  $10^{-7}$  M de octreotídeo e  $10^{-6}$  M de Hp-somatostatina, houve aumento similar nos níveis de acidez basal, em meios de cultura contendo células pancreáticas do tipo  $\beta$  (INS-1) expressando receptores de somatostatina (Cheng *et al.*, 2003).

A partir da análise destes dados formulamos a hipótese de que os aminoácidos lisina<sup>2</sup>, fenilalanina<sup>4</sup>, fenilalanina<sup>5</sup>, triptofano<sup>6</sup>, ácido aspártico<sup>14</sup>, histidina<sup>15</sup> são fundamentais para a rigidez e a estabilidade da estrutura terciária da Hp-somatostatina, uma vez que relação entre a estrutura das proteínas com a sua função biológica já é estudada há anos. Sabe-se que a composição de aminoácidos em uma cadeia polipeptídica influencia diretamente na estruturação secundária e terciária, designando, também, sua função biológica nos sistemas vivos (Nelson & Cox, 2005).

A figura 4 mostra os vinte aminoácidos comumente encontrados na natureza. A escolha dos resíduos de aminoácidos a serem modificados para a síntese dos análogos teve como bases: a análise da estrutura adquirida a partir da técnica de RMN (Prates, 2003); as interações entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos; e suas características químicas que podem mudar os padrões de interação intra e intermoleculares da estrutura.

## Os vinte aminoácidos-padrão



**Figura 4:** Tabela contendo os vinte aminoácidos de ocorrência natural com suas cadeias laterais em destaque. A tabela foi traduzida da original disponível em *Lehninger Principles of biochemistry, fourth edition*, capítulo 3, página 79.

## **2 JUSTIFICATIVA**

---

Atualmente, apenas dois análogos de atividade prolongada da somatostatina têm sido utilizados clinicamente. O octreotídeo e o lanreotídeo têm alta afinidade, sobretudo, pelo receptor SSTR<sub>2</sub> e as indicações estabelecidas para o tratamento com esses análogos são: acromegalia, tumores neuroendócrinos do pâncreas e do trato gastrointestinal, pancreatite, úlcera e fístulas intestinais. As investigações recentes permitem que se faça uma projeção para a ampliação das aplicações terapêuticas dos análogos da SS, com ênfase no tratamento de tumores glandulares endócrinos. Todavia esse progresso depende da introdução de novos análogos com afinidade pelos demais subtipos de receptores e não somente pelo subtipo 2 (Pawlikowsk & Melen-Mucha, 2002).

Estudos clínicos revelaram que a terapia com análogos da SS não produziu resposta clínica adequada em pacientes portadores de câncer avançado de cólon e de pâncreas. Há indícios de que tal fato seja devido à falta de sítios de ligação para a SS, especialmente de SSTR<sub>2</sub> nesses tumores. De fato, o octreotídeo melhorou os sintomas de pacientes com câncer pancreático avançado, mas mostrou pouco efeito no aspecto antitumor (Lee *et al.*, 2002). Por outro lado, o uso da SS em sua forma nativa não teve resultados animadores. Por maior que seja a amplitude dos papéis fisiológicos desempenhados pelas SS-14 e SS-28 e a intensidade de sua afinidade por todos os tipos de receptores, sua meia-vida no plasma é muito curta. Consequentemente, o desenvolvimento de análogos mais estáveis permanece como meta, na tentativa de se abranger um número cada vez maior de patologias tratáveis com o uso da somatostatina (Krsek, 2003).

### **3 OBJETIVOS**

---

### 3.1 Objetivo geral

Verificar as alterações estruturais dos análogos da Hp-somatostatina decorrentes da substituição de resíduos de aminoácidos específicos da estrutura primária.

### 3.2 Objetivos específicos

**3.2.1.** Síntese de 4 análogos de Hp-somatostatina contendo substituições pontuais. As seqüências propostas são:

**Hp-somatostatina:** H-[C<sup>1</sup>-K<sup>2</sup>-N<sup>3</sup>-F<sup>4</sup>-F<sup>5</sup>-W<sup>6</sup>-K<sup>7</sup>-T<sup>8</sup>-F<sup>9</sup>-A<sup>10</sup>-S<sup>11</sup>-C<sup>12</sup>]-T<sup>13</sup>-D<sup>14</sup>-H<sup>15</sup>-NH<sub>2</sub>

**Hp-somatostatina Gln<sup>15</sup>:** H-[C<sup>1</sup>-K<sup>2</sup>-N<sup>3</sup>-F<sup>4</sup>-F<sup>5</sup>-W<sup>6</sup>-K<sup>7</sup>-T<sup>8</sup>-F<sup>9</sup>-A<sup>10</sup>-S<sup>11</sup>-C<sup>12</sup>]-T<sup>13</sup>-D<sup>14</sup>-Q<sup>15</sup>-NH<sub>2</sub>

**Hp-somatostatina Asn<sup>14</sup>:** H-[C<sup>1</sup>-K<sup>2</sup>-N<sup>3</sup>-F<sup>4</sup>-F<sup>5</sup>-W<sup>6</sup>-K<sup>7</sup>-T<sup>8</sup>-F<sup>9</sup>-A<sup>10</sup>-S<sup>11</sup>-C<sup>12</sup>]-T<sup>13</sup>-N<sup>14</sup>-H<sup>15</sup>-NH<sub>2</sub>

**Hp-somatostatina Glu<sup>14</sup>:** H-[C<sup>1</sup>-K<sup>2</sup>-N<sup>3</sup>-F<sup>4</sup>-F<sup>5</sup>-W<sup>6</sup>-K<sup>7</sup>-T<sup>8</sup>-F<sup>9</sup>-A<sup>10</sup>-S<sup>11</sup>-C<sup>12</sup>]-T<sup>13</sup>-E<sup>14</sup>-H<sup>15</sup>-NH<sub>2</sub>

**Hp-somatostatina:** H-[C<sup>1</sup>-K<sup>2</sup>-N<sup>3</sup>-F<sup>4</sup>-F<sup>5</sup>-W<sup>6</sup>-K<sup>7</sup>-T<sup>8</sup>-F<sup>9</sup>-A<sup>10</sup>-S<sup>11</sup>-C<sup>12</sup>]-T<sup>13</sup>-D<sup>14</sup>-H<sup>15</sup>-OH

**3.2.2.** Purificação dos peptídeos sintéticos na sua forma ativa em quantidades suficientes para posterior realização de ensaios biológicos *in vitro* e a determinação de suas possíveis estruturas terciárias por RMN.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

---

#### 4.1 Síntese dos peptídeos

A síntese dos análogos e do peptídeo nativo foi conduzida utilizando-se a estratégia Fmoc/t-butila (9-fluorenilmetoxicarbonila) de síntese manual em suporte sólido (Chan & White, 2000).

A resina utilizada como suporte sólido foi a *Rink Amide-MBHA Resin* cujo grau de substituição é de 0,52 meq/g. A escala de síntese foi de 0,1 mmol e o excesso molar dos Fmoc-Aminoácidos foi de 4 vezes, calculados a partir de suas respectivas massas molares.

Na tabela abaixo, estão listados os Fmoc-Aminoácidos utilizados para a síntese dos análogos com os respectivos grupos protetores das cadeias laterais.

**Tabela 2:** Lista de Fmoc-Aminoácidos utilizados na síntese dos peptídeos análogos da Somatostanina.

<b>Fmoc-Aminoácidos</b>	<b>MM</b>	<b>0,4 mmol (mg)</b>
Fmoc-Ala-OH	311.3	124.52
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596.7	238.68
Fmoc-Asp(OtBu)	411.5	164.6
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585.7	234.28
Fmoc-Glu(tbu)-OH	443.5	170.2
Fmoc-His(Trt)-OH	619.7	247.88
Fmoc-Lys-(Boc)-OH	468.5	187.4
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383,4	153,3
Fmoc-Phe-OH	387.4	154.96
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397.5	159
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.6	210.64

Para a síntese do peptídeo não-amidado, foi utilizada uma resina específica de acordo com o último resíduo de aminoácido da extremidade C-terminal. A resina utilizada para a síntese da HpS-TDH-OH foi a *Fmoc-His (Trt)-Wang Resin* que possui um grau de substituição de  $0,42 \text{ mmol.g}^{-1}$ .

As etapas de síntese seguiram ciclos para a extensão da cadeia polipeptídica. A primeira etapa, chamada de desproteção, foi a de remoção do grupamento Fmoc da resina pela adição de, aproximadamente, 1,5 mL, de Piperidina em 25% de Dimetilformamida (DMF) deixado em agitação por 15 minutos, sendo esse processo realizado por 2 vezes para garantir a retirada do grupo Fmoc do resíduo de aminoácido a ser acoplado à cadeia polipeptídica. Para o escoamento da solução empregada para a etapa de desproteção, foi utilizada uma bomba a vácuo.

Após essa etapa, a fase sólida foi lavada de forma intercalada com DMF e Metanol (MeOH) por três vezes, sendo a quarta lavagem feita com Diclorometano (DCM) para a preservação do material e realização do teste colorimétrico de Kaiser (azul: desproteção; amarelo/translúcido: acoplamento).

Após a desproteção da resina, o primeiro Fmoc-Aminoácido foi acoplado. Para os ciclos de acoplamento, foram calculados os volumes dos reagentes necessários e a quantidade de Fmoc-Aminoácidos acrescentados ao reator que continha o suporte sólido.

Os valores dos reagentes utilizados nesses ciclos foram: 750  $\mu\text{L}$  de Dimetilformamida; 130  $\mu\text{L}$  de Diisopropiletilamina (DIPEA); 118,8 mg de O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU). Para o acoplamento das Fmoc-Cisteínas, utilizou-se 55 mg de 1H-hidroxibenzotriazol (HOBT) e 65  $\mu\text{L}$  de diisopropilcarbodiimida (DIC) em vez de TBTU e DIPEA. A duração do ciclo de acoplamento foi de, aproximadamente, 1 h e 30 min sendo que para o acoplamento da cisteína o tempo de reação foi de 2 h.

Os ciclos se repetiram até o acoplamento e desproteção do último Fmoc-Aminoácido. Quando o último Fmoc-Aminoácido foi acoplado e desprotegido, o produto da síntese foi secado a vácuo por 2 h. Para a clivagem da resina dos peptídeos de interesse, foi consultado pelo *site* da NovaBiochem.

Pesou-se, 315 mg de Fenol, adicionou-se 8 mL de Ácido Trifluoracético (TFA), 250 µL de Etanoditiol (EDT), 500 µl de Metilfenilsulfideo, 500 µL de água Milli-Q<sup>®</sup> e 100 µL de Triisopropilsilano. Foi feita uma solução com esses reagentes e esta foi adicionada ao peptil-resina em um tubo de polipropileno sob agitação magnética durante 1 h e 30 min. Após essa etapa, foi necessária a evaporação da solução pela fumeação de Nitrogênio gasoso por 40 min.

Após a evaporação da solução, foi adicionado ao tubo éter di-isopropílico resfriado por nitrogênio líquido, a fim de precipitar o peptídeo da resina. Essa solução foi despejada em um funil com placa porosa de sílica sinterizada e o filtrado foi coletado em outro tubo de polipropileno. Foram realizadas 2 lavagens com água Milli-Q<sup>®</sup> e uma com Acetonitrila (MeCN) e água Milli-Q<sup>®</sup> em proporção de 1:1. Em seguida, as frações foram congeladas em nitrogênio líquido e colocadas para secar em um liofilizador.

## **4.2 Oxidação da amostra**

Método 1: Oxidação com Iodo pré e pós-clivagem;

Método 2: Bicarbonato de amônio sob agitação/aeração;

Método 3: Oxidação espontânea em água a 4 °C

## **4.3 Purificação dos peptídeos sintéticos**

Para a purificação dos peptídeos sintetizados, os produtos procedentes das clivagens foram fracionados por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando colunas cromatográficas de fase reversa (RPs) de dimensões semipreparativa (C<sub>18</sub> 218TP510; 238TP510 *Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*) e analíticas (C<sub>18</sub> 218TP54 *Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA* ; *Source<sup>TM</sup> 5RPC ST 4.6/150 GE Health Care<sup>®</sup>* e 238TP54 *Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*), dependendo do estágio de purificação, acopladas a um cromatógrafo *Shimadzu LC 10AD VP* equipado com bomba binária.

Para a cromatografia, foram pesados cerca de 500 µg do peptídeo por corrida cromatográfica, e dissolvidos em água deionizada (Milli-Q<sup>®</sup>) adicionada de 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) e denominada fase móvel A. As frações foram eluídas em um fluxo de 2,5 mL/min (RP-semipreparativa) e 1 mL/min (RP-analítica), coletadas e identificadas manualmente ao longo de um gradiente crescente de fase móvel B, composto por Acetonitrila (MeCN) adicionada de 0,1% de TFA.

#### 4.4 Espectrometria de Massa

A partir da avaliação dos perfis cromatográficos gerados, as amostras de interesse foram selecionadas e analisadas em espectrômetro de massa com ionização do tipo *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight* (MALDI TOF/TOF – *Ultraflex III, Bruker Daltonics, Billerica, MA-USA*) a fim de determinar as massas moleculares e o grau de pureza das frações. Para tal, foi preparada uma solução de matriz contendo 10 mg/mL de matriz ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) em acetonitrila (100%); TFA (3%); água Milli-Q<sup>®</sup>, na proporção de 50:10:40. A amostra foi aplicada em duplicata sobre a placa de amostra (1,5 µL por poço) e deixada à temperatura ambiente para a formação dos cristais para análise.

#### 4.5 Quantificação das amostras

A quantificação das amostras teve como base a lei de *Lambert-Beer*, tendo em vista que os peptídeos possuem resíduos de Triptofano. A equação utilizada para os cálculos da quantificação é mostrada a seguir. O valor do coeficiente de absorvidade molar foi obtido a partir do *software ProtParam* encontrado no pacote de programas do *ExPASy Tools* disponível na *internet*.

$$A = a.b.c$$

Onde:

**A** representa a leitura da absorbância em um comprimento de onda de 280 nm;

**a** o coeficiente de extinção molar; **b** o caminho óptico da cubeta (1 cm)

**c** a concentração molar desejada.

## **4.6 Efeito do octreotídeo e da somatostatina na taxa de acidificação extracelular**

A metodologia descrita a seguir foi realizada pelos pesquisadores colaboradores: Edson Lucas dos Santos da Universidade da Grande Dourados – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais; João Bosco Pesquero da Universidade Federal de São Paulo – Departamento de Biofísica.

### **4.6.1 Cultura celular**

Células- $\beta$  pancreáticas (INS-1) expressando receptores de somatostatina (Cheng *et al.*, 2003) foram mantidas em meio RPMI 1640 (GIBCO-BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100  $\mu$ L de penicilina, 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina, 1 mM de piruvato de sódio e 50  $\mu$ M de 2-mercapoetanol a 37 °C em atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.6.2 Ensaios de Microfisiometria funcional**

Os ensaios com as células do tipo INS-1 foram transferidas com 24 h de antecedência para *transwells* feitos de membranas de policarbonato com 12 mm de diâmetro e poros de 3  $\mu$ m ( $5 \times 10^5$  células/poços). O Microfisiômetro Citotensor (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) foi utilizado para medir a taxa de acidificação em meio extracelular de acordo com a atividade metabólica celular (McConnel *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 2004). As células depositadas nos *transwells* foram perfusadas com DMEM, pH 7,4 contendo BSA 0,1% e 44,4 mM NaCl com uma bomba peristáltica, alterando os ciclos de perfusão a 1  $\mu$ L/min (1 min: 40 s) e pausas (20 s). Para aferir mudanças nas taxas de acidificação extracelular, as células foram estimuladas com os peptídeos (Octreotídeo e Hp-somatostatina) em concentrações de  $10^{-7}$  M e  $10^{-6}$  M após um período de estabilização de 60 min. Todas as medições foram aferidas em triplicata e os dados foram analisados utilizando o *software* PRIMIS 3.02 (Graph-Pad, San Diego, CA, USA).

#### **4.7 Estimulação elétrica – contração induzida**

Os experimentos descritos a seguir foram realizados pela equipe do Professor Enzo Poli do *Dipartimento di Anatomia Umana, Farmacologia e Scienze Medico-Forensi, Sezione di farmacologia* da *Università degli Studi di Parma*, Itália.

##### **4.7.1 Preparação dos tecidos isolados**

Indivíduos masculinos de porquinhos-da-Índia (*Cavia porcellus*) Dunkin Hartley (250-450 g) ou ratos do tipo Sprague-Dowley (200-300 g) foram sacrificados por deslocamento cervical após leve anestesia com éter. A porção terminal do íleo (porquinho-da-Índia) ou pares de ductos deferentes (rato) foram removidos e depositados em uma solução de meio de Krebs modificada (mM): NaCl (118), NaHCO<sub>3</sub> (25), KCl (4,7), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,6), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2), CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (1,3), D-Glicose (11,1).

Os preparados de íleo dos porquinhos-da-Índia e de ducto deferente dos ratos foram colocados entre um par de eletrodos de platina em câmaras de 10 mL para registrar mudanças na tensão isotônica utilizando um transdutor (DYO) aplicando uma força passiva de 0,5 g (ducto deferente) ou 1 g (íleo), que mantiveram-se constantes durante todo o experimento. A temperatura do banho foi mantida a 37 °C e a solução de Krebs foi continuamente gaseificada com uma mistura de 5% CO<sub>2</sub> em oxigênio.

As soluções com os preparados foram deixados para o equilíbrio por um período de pelo menos 30 min antes do estímulo elétrico ser aplicado. Então, os tecidos receberam pulsos de ondas quadradas por meio dos eletrodos de platina, posicionados a 1 cm de distância e conectados à um isolador de pulsos, por sua vez, impulsionado por um estimulador eletrônico. Os padrões de estimulação ocorreram da seguinte maneira: íleo: estimulação contínua 0,1 Hz, 0,1 ms; ducto deferente: 0,1 Hz, 0,5 ms 100-300 mA a 50 V.

Experimentos realizados previamente revelaram que contrações causadas por estimulação elétrica tanto em íleo quanto em ducto deferente são geradas pela liberação de neurotransmissores de nervos intrínsecos. Portanto, as contrações musculares foram anuladas pelo bloqueador de canais para  $\text{Na}^+$  pelo bloqueador tetrodotoxina, o N-Type  $\text{Ca}^{2+}$  pela  $\omega$ -Conotoxina, sugerindo o envolvimento da exocitose de neurotransmissores atuando nos receptores pós-juncionais localizados nas membranas de músculo liso.

#### **4.7.2 Testes farmacológicos**

Os valores do agonista pEC50 (Log da concentração do agonista produzindo 50% da resposta máxima) foram determinados pela regressão não-linear da curva concentração-efeito individual da somatostatina utilizando o software *GraphPad Prism*. Os valores médios são apresentados como as médias aritméticas de pelo menos quatro experimentos.

## **5 RESULTADOS**

---

## 5.1 Sínteses completas

A tabela 3 lista os peptídeos análogos da somatostatina que foram sintetizados e que tiveram suas massas moleculares calculadas e confirmadas experimentalmente por espectrometria de massa.

**Tabela 3:** Lista de peptídeos sintetizados. Estão apresentados os códigos dos análogos, sua sequência peptídica bem como suas massas moleculares monoisotópicas calculadas e observadas experimentalmente. Onde, a\* - estado reduzido; b\* - estado oxidado.

Código	Sequência peptídica	Massa Calculada (Da)	Massa Observada (Da)
HpS-TDH-NH <sub>2</sub>	H-[C-K-N-F-F-W-K-T-F-A-S-C]-T-D-H-NH <sub>2</sub>	1833.8a - 1831.8b	1833.84a- 1831.78b
HpS-TDH-OH	H-[C-K-N-F-F-W-K-T-F-A-S-C]-T-D-H-OH	1834.8a - 1832.8b	1834.85a - 1832.85b
HpS-TDQ-NH <sub>2</sub>	H-[C-K-N-F-F-W-K-T-F-A-S-C]-T-D-Q-NH <sub>2</sub>	1824.8a - 1822.8b	1824a - 1822.8b
HpS-TNH-NH <sub>2</sub>	H-[C-K-N-F-F-W-K-T-F-A-S-C]-T-N-H-NH <sub>2</sub>	1832.81a - 1830.81b	1832.85a - 1830.82b

Os peptídeos sintéticos foram denominados HpS-TDH-NH<sub>2</sub> (PSLEM 08/23); HpS-TDQ (PSLEM 09/13); HpS-TNH (PSLEM 09/14) e; HpS-TDH-OH (PSLEM 09/50) e; HpS-TDH-NH<sub>2</sub> (PSLEM 09/51). Uma nova síntese do peptídeo nativo, HpS-TDH-NH<sub>2</sub>, foi conduzida para a obtenção de uma maior quantidade do material para a realização dos testes *in vitro*.

A primeira sequência listada na tabela 3 passou pelas etapas de oxidação das pontes dissulfeto, purificação do material, quantificação e envio para testes no laboratório do doutor Alberto Spisni, na Universidade de Parma na Itália no ano de 2009.

Com o intuito de iniciar a síntese, foi preciso remover o grupo Fmoc da resina e a cada passo de acoplamento. Para tal, foi utilizada a solução de Piperidina em DMF (como descrito na seção Material e Métodos). Uma vez desprotegido, o aminoácido seguinte pode ser acoplado na cadeia polipeptídica, para que as reações de acoplamento ocorressem, foi preciso adicionar reagentes capazes de ativar a função carboxílica do aminoácido, tornando-o um amino-éster reativo concomitantemente à adição de um agente acoplador, para promover a ativação da formação da ligação peptídica caracterizada quimicamente como uma ligação do tipo amida (Nájera, 2002).

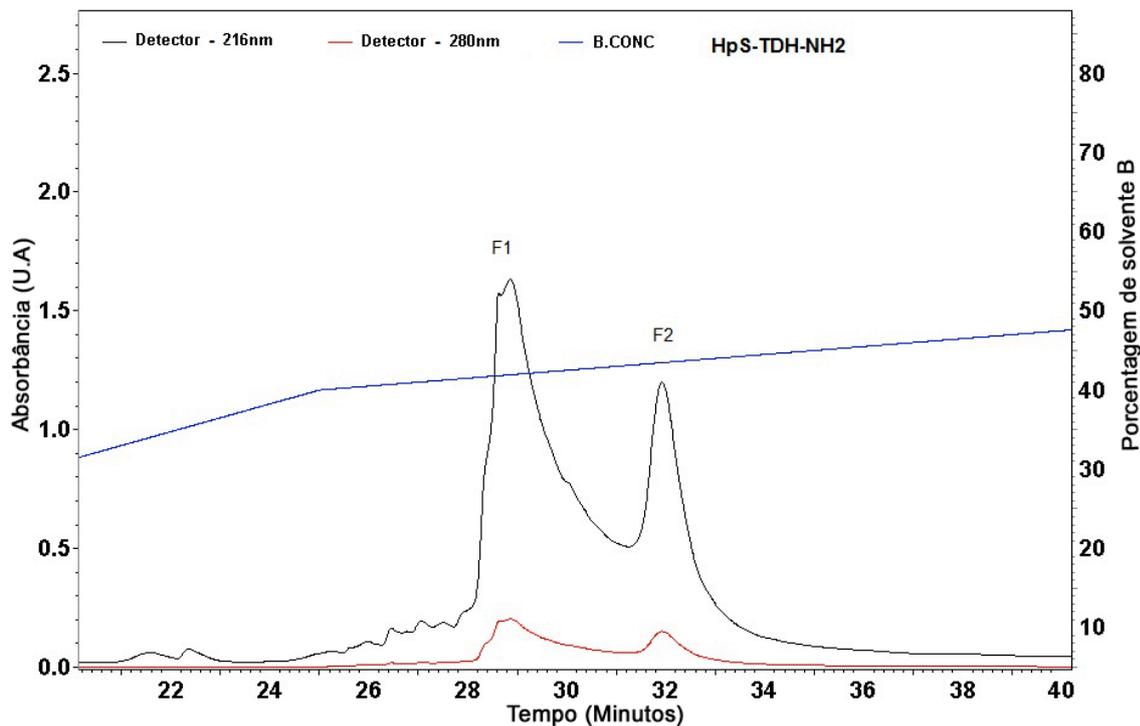
Neste trabalho, as bases utilizadas para a desprotonação do grupo carboxílico foram a DIPEA e a DIC enquanto que os agentes acopladores foram o TBTU e o HOBt. A cada etapa de desproteção e acoplamento, a fase sólida foi lavada de forma intercalada com solventes de diferentes polaridades para exercer um efeito de compactação/descompactação do polímero, favorecendo a exclusão dos subprodutos da reação de acoplamento (Marquadt & Eifler-Lima, 2001).

O peptídeo **Hp-somatostatina Glu<sup>14</sup>**: H-[C<sup>1</sup>-K<sup>2</sup>-N<sup>3</sup>-F<sup>4</sup>-F<sup>5</sup>-W<sup>6</sup>-K<sup>7</sup>-T<sup>8</sup>-F<sup>9</sup>-A<sup>10</sup>-S<sup>11</sup>-C<sup>12</sup>]-T<sup>13</sup>-E<sup>14</sup>-H<sup>15</sup>-NH<sub>2</sub> teve sua síntese iniciada, no entanto, houve dificuldades no acoplamento entre os resíduos H~N<sup>3</sup>-F<sup>4</sup>-F<sup>5</sup>~NH<sub>2</sub>. O resíduo de Fmoc-Fenilalanina<sup>4</sup> necessitou de 2 etapas de acoplamento, a primeira utilizando HOBt-DIC e a segunda com a adição do reagente 1-metil-pirrolidona. O resíduo de Fmoc-Asparagina não foi acoplado com sucesso mesmo utilizando HOBt-DIC. Dessa forma, a síntese não pôde ser finalizada da forma prevista.

## 5.2 Perfis cromatográficos e espectros de massa

O emprego da técnica de RP-HPLC utilizou a MeCN como o modificador orgânico levando em consideração sua baixa absorvância nos comprimentos de onda utilizados (216 nm e 280 nm) e sua baixa viscosidade para prevenir pressões demasiadamente elevadas no cromatógrafo. As fases móveis foram adicionadas de TFA à concentração de 0,1% (v/v) para servir de contra-íon para as moléculas a serem eluídas tornando-as mais hidrofóbicas, aumentando sua afinidade pela coluna e, conseqüentemente, aumentando a resolução durante o gradiente crescente da fase móvel B (MeCN + 0,1% TFA) (Shibue *et al.*, 2005; Conlon, 2007).

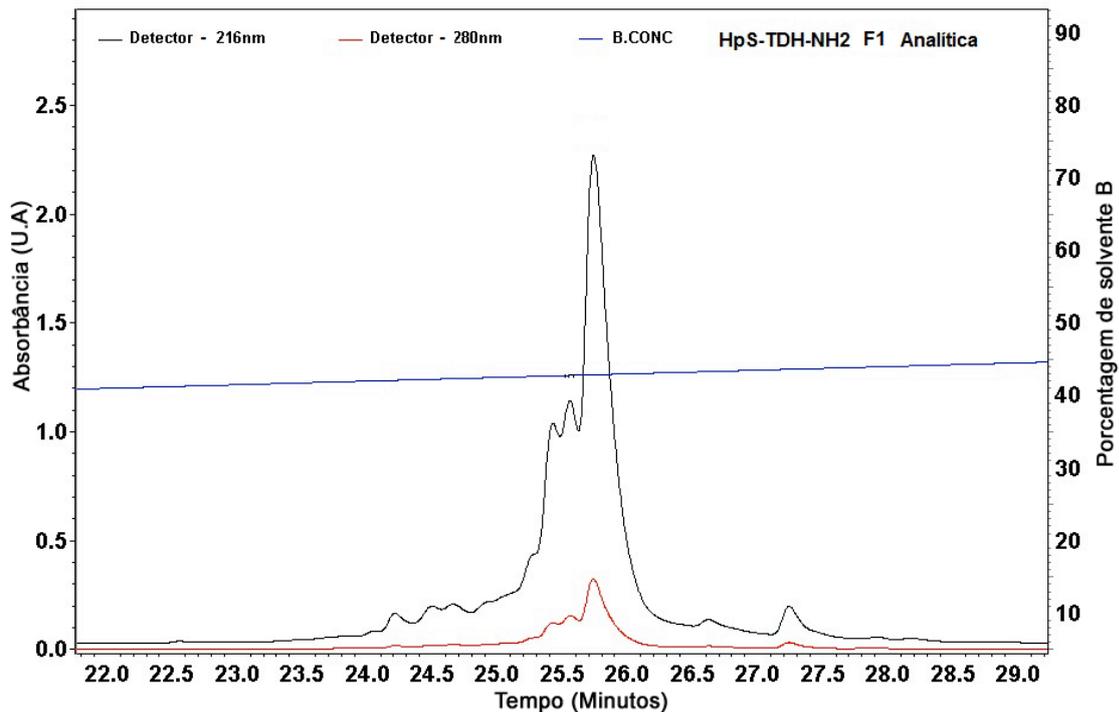
O produto bruto resultante da primeira síntese da amostra HpS-TDH-NH<sub>2</sub> foi submetido a purificação em sistema HPLC de fase reversa e o seu perfil cromatográfico pode ser observado na figura 5.



**Figura 5:** Perfil cromatográfico do peptídeo sintético bruto denominado HpS-TDH-NH<sub>2</sub>. Cromatografia realizada em coluna de fase reversa 218TP510 (*Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*). As principais frações foram denominadas F1 e F2. Método 1 pré-clivagem de oxidação. O experimento foi monitorado em 216 nm (preto) e em 280 nm (vermelho) simultaneamente. A linha azul representa o gradiente crescente de solvente B.

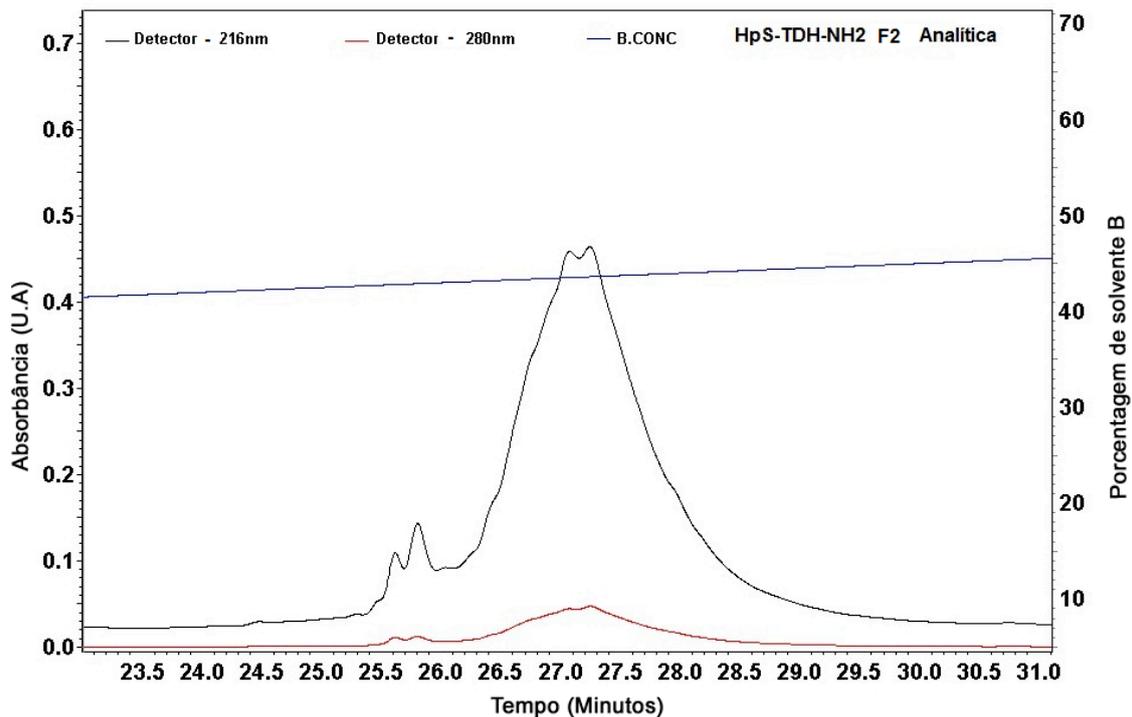
O cromatograma da figura 5 representa o perfil geral das diversas corridas cromatográficas realizadas como primeira etapa de purificação do peptídeo. Nota-se que há duas frações principais eluídas em tempos diferentes as quais foram denominadas F1 e F2.

Após as análises realizadas por MS, as frações passaram por etapas de purificação em escala analítica, cujo perfil (F1) pode ser observado na figura 6, evidenciando a presença de pelo menos 3 frações com tempos de retenção distintos.



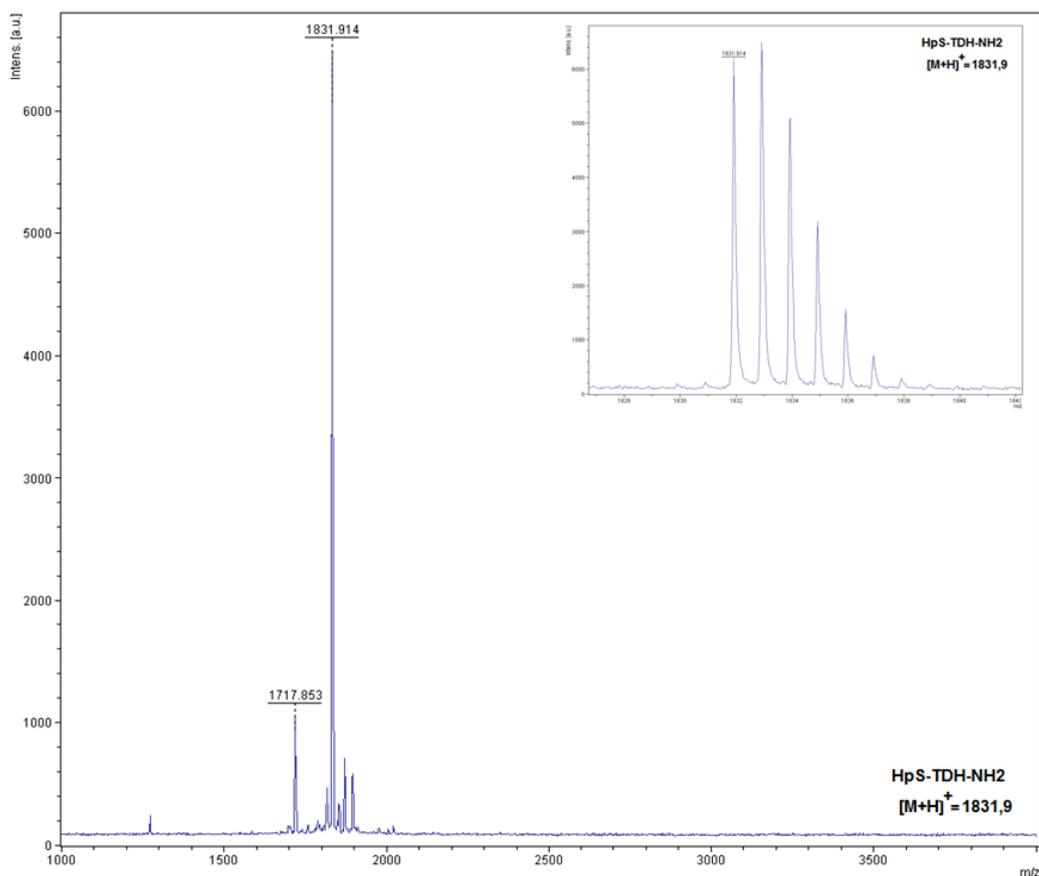
**Figura 6:** Perfil cromatográfico analítico da F1 da amostra HpS-TDH-NH<sub>2</sub>. Cromatografia realizada em coluna de fase reversa 218TP54 (*Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*). A fração de maior absorvância é aquela que contém o peptídeo de interesse. O experimento foi monitorado em 216 nm (preto) e em 280 nm (vermelho) simultaneamente. A linha azul representa o gradiente crescente de solvente B.

A F2 também foi submetida a nova cromatografia em coluna de dimensões analíticas e seu perfil cromatográfico pode ser observado na figura 7 na qual se nota a presença de 4 frações eluídas em tempos e concentrações de solvente B diferentes, sendo as frações de maior absorvância, aquelas com maior concentração da amostra de interesse, como demonstrado por MS.



**Figura 7:** Perfil cromatográfico analítico da F2 da amostra HpS-TDH-NH<sub>2</sub>. Cromatografia realizada em coluna de fase reversa 218TP54 (*Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*). O experimento foi monitorado em 216 nm (preto) e em 280 nm (vermelho) simultaneamente. A linha azul representa o gradiente crescente de solvente B.

Após análises por espectrometria de massa, as frações que continham a massa de  $[M+H]^+ = 1831,80$  Da foram unidas e então submetidas a novas corridas cromatográficas analíticas. Ao final de diversas etapas de união de frações e de re-cromatografias, o maior grau de pureza obtido do peptídeo sintético HpS-TDH-NH<sub>2</sub> foi o observado na figura 8.

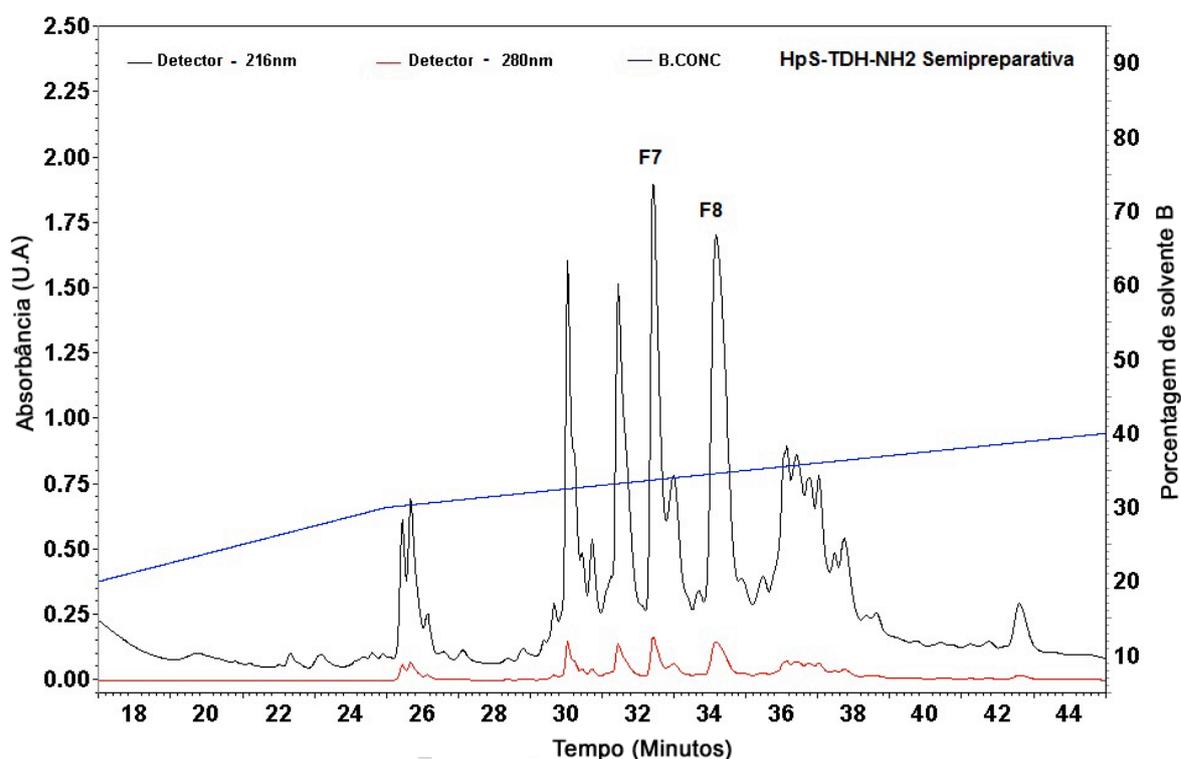


**Figura 8:** Espectro de massa da amostra HpS-TDH-NH<sub>2</sub>. O íon de maior intensidade, representado pela massa monoisotópica  $[M+H]^+ = 1831,91$  Da, é o peptídeo de interesse. Experimento realizado em espectrômetro de massa MALDI TOF-TOF, *Ultraflex III*, *Bruker Daltonics (Billerica, MA-USA)*.

A figura 8 apresenta dois íons majoritários, sendo o de massa molecular  $[M+H]^+ = 1831,91$  Da, o de interesse e o de  $[M+H]^+ = 1717,85$  Da um possível subproduto da síntese, cuja separação não foi possível com as estratégias utilizadas. A diferença em Daltons observada entre os dois íons é de 114,06, sugerindo a falta do aminoácido asparagina (na posição 3) no de menor massa molecular, uma vez que este ciclo apresentou problemas na reação de acoplamento durante a síntese química. Os demais íons presentes no espectro correspondem aos adutos de sódio e de potássio,  $[M+H]^+ = 1831,91 + 22$  Da e  $[M+H]^+ = 1831,91 + 39$  Da, respectivamente.

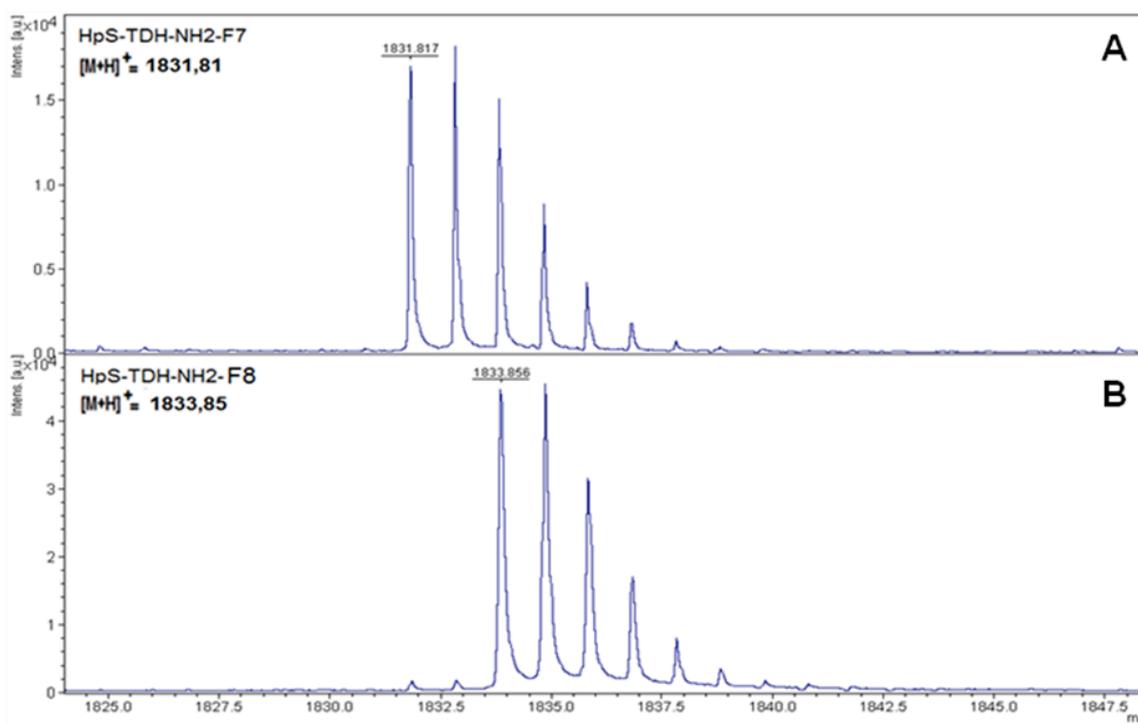
Ao término das etapas de purificação e de verificação do grau de pureza do material, a amostra foi quantificada. A concentração estimada de 75  $\mu\text{M}$  foi enviada para análise de atividade biológica ao Laboratório de Farmacologia (Università Degli Studi di Parma, Facoltà de Medicina e Chirurgia, Parma-Itália), aos cuidados do Prof Enzo Poli. Na ocasião, foram realizados ensaios farmacológicos, com o intuito de averiguar a interação funcional entre o análogo sintético e os dois tipos mais frequentes de receptores de somatostatina, SSTR2 e SSTR5, utilizando a SS-14 como controle positivo. Com base nos resultados preliminares obtidos, as demais sequências análogas foram sintetizadas, a fim de se obter dados mais conclusivos acerca do papel biológico da família de peptídeos, assim como a solução de suas estruturas por RMN.

A partir das novas sínteses, aproximadamente 45 mg do material bruto da amostra denominada HpS-TDH-NH<sub>2</sub> foram submetidos ao fracionamento por RP-HPLC, cujo perfil cromatográfico pode ser observado na figura 9.



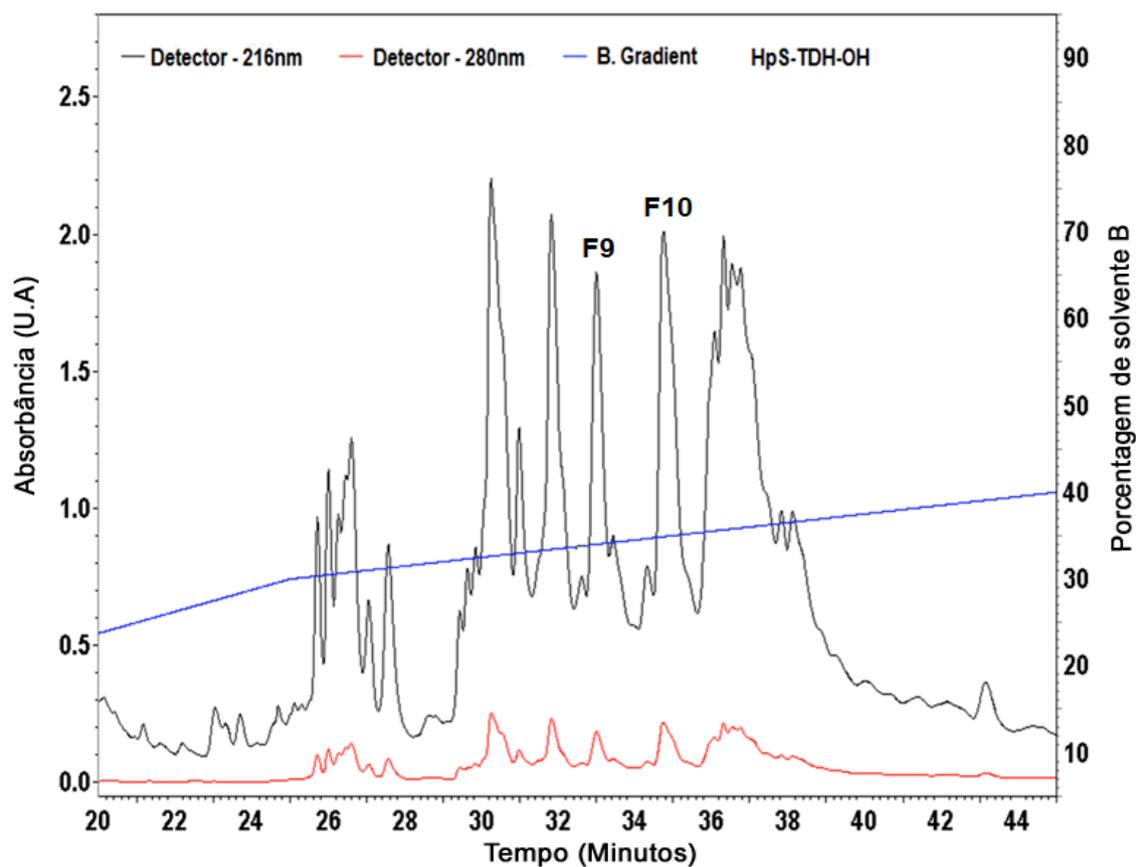
**Figura 9:** Perfil cromatográfico semi-preparativo da amostra HpS-TDH-NH<sub>2</sub>. Cromatografia realizada em coluna de fase reversa 238TP510 (*Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*). As frações destacadas indicam as moléculas de interesse. O experimento foi monitorado em 216 nm (preto) e em 280 nm (vermelho) simultaneamente. A linha azul representa o gradiente crescente de solvente B.

As diferenças nos perfis cromatográficos das amostras são evidentes. Isto pode ser decorrente do fato de que foram utilizadas resinas distintas para a síntese da cadeia polipeptídica e, ainda, a amostra passou por procedimentos de oxidação diferentes. Contudo, as frações de interesse destacadas na figura 9 foram analisadas em espectrômetro de massa com ionização do tipo MALDI e os perfis das distribuições isotópicas podem ser observados na figura 10, na qual a molécula encontra-se em seus estados oxidado e reduzido respectivamente.



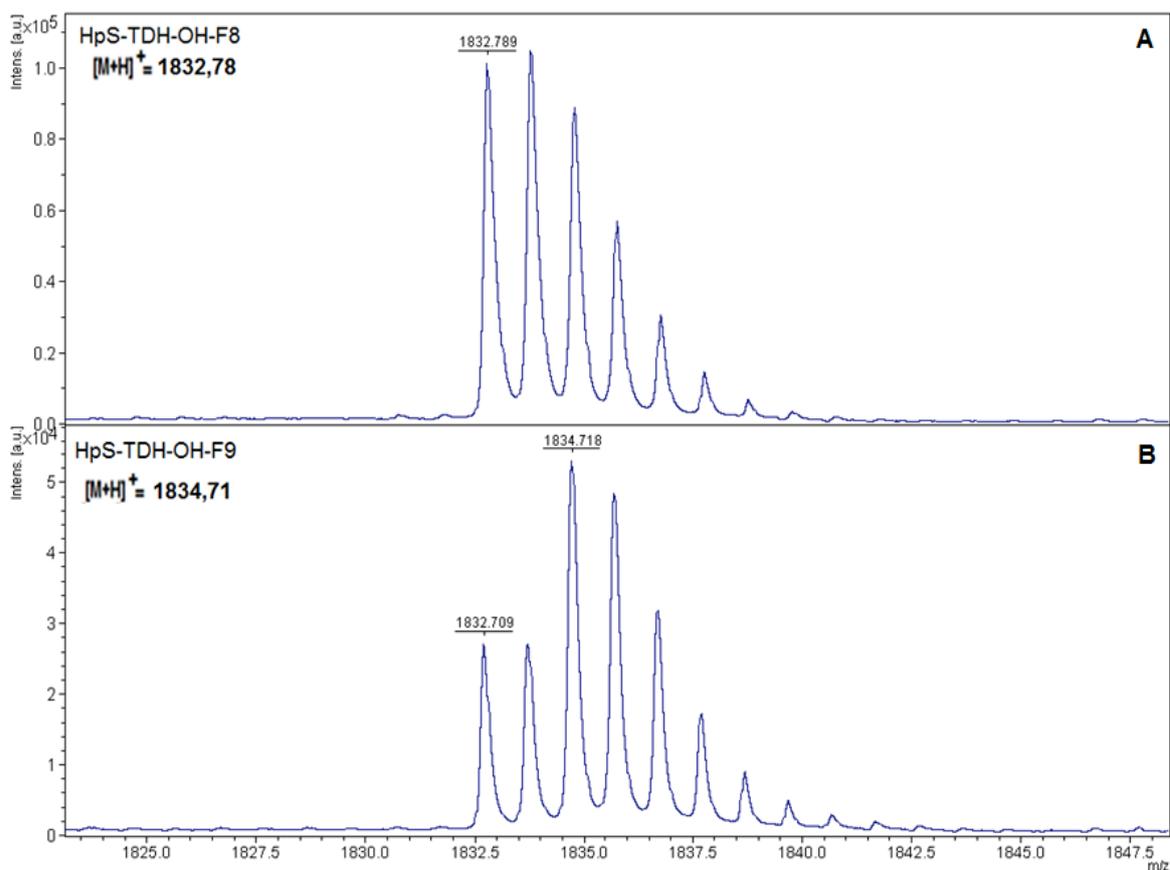
**Figura 10:** Espectros de massa das frações destacadas no cromatograma da figura 9. Em (A) encontra-se a distribuição isotópica da amostra Hps-TDH-NH<sub>2</sub>-F7 em seu estado oxidado e em (B) a amostra Hps-TDH-NH<sub>2</sub>-F8 está em seu estado reduzido.

O produto bruto contendo o peptídeo sintético denominado HpS-TDH-OH passou por etapas de purificação e o perfil cromatográfico semi-preparativo observado na figura 11 mostra a eluição de diversas frações, todas elas posteriormente submetidas a MS para a detecção da molécula de interesse.



**Figura 11:** Perfil cromatográfico semi-preparativo da amostra HpS-TDH-OH em fase reversa 218TP10 (*Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA*). As frações denominadas F9 e F10 são aquelas que contêm a molécula de interesse.

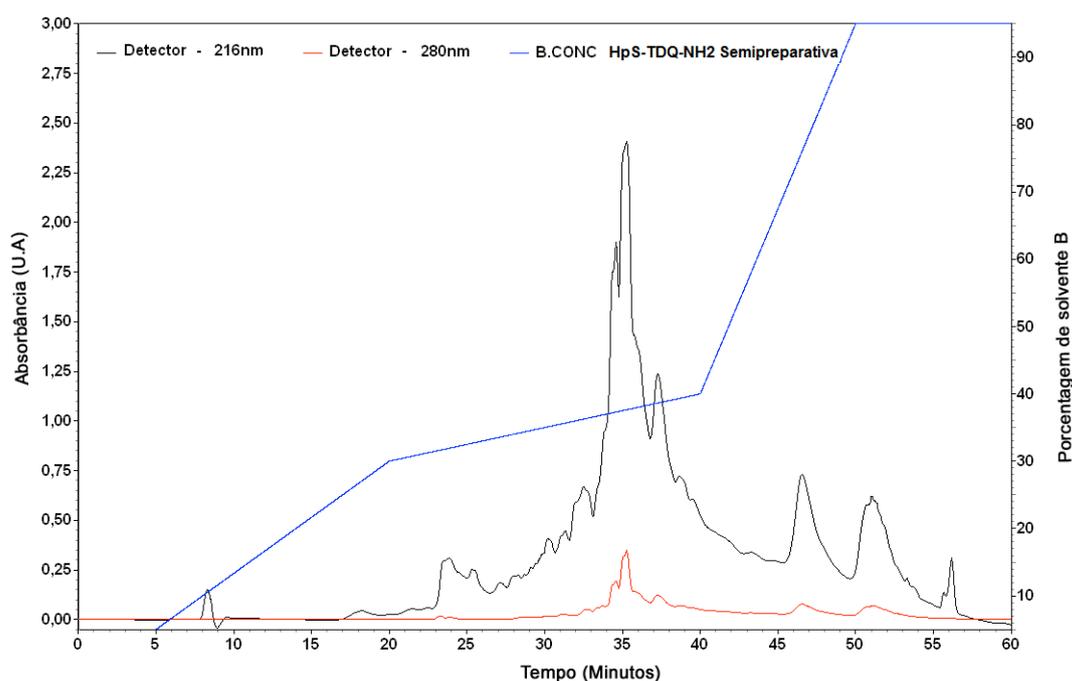
Nota-se que a eluição das frações da amostra HpS-TDH-OH é semelhante àquela do perfil cromatográfico da amostra HpS-TDH-NH<sub>2</sub> (figura 9) apresentando também duas frações – F8 e F9 – nas quais o peptídeo de interesse é eluído.



**Figura 12:** Espectros de massa das frações F9 e F10. Em (A) a massa monoisotópica de  $[M+H]^+ = 1832,70$  Da é indicativo da amostra em seu estado oxidado e, em (B) em seu estado reduzido, cuja massa monoisotópica é de  $[M+H]^+ = 1834,71$  Da.

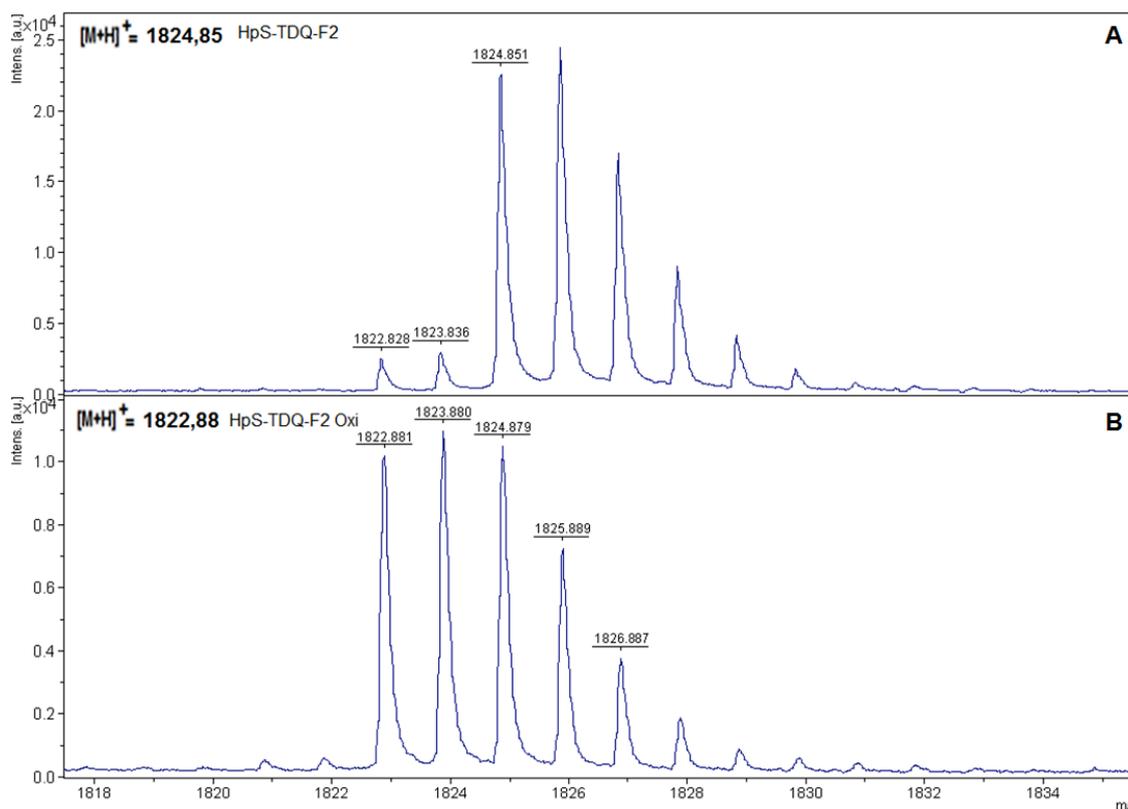
Torna-se importante notar que as diferenças observadas nos tempos de retenção da molécula estão diretamente relacionadas à presença ou à ausência da cistina, isto é, se a molécula encontra-se em seu estado oxidado ou reduzido, e que a oxidação pode ocorrer de forma espontânea.

Os peptídeos sintéticos HpS-TDQ-NH<sub>2</sub> e HpS-TNH-NH<sub>2</sub> também passaram por etapas de purificação e os perfis obtidos podem ser observados nas figura 13 e 15 respectivamente.



**Figura 13:** Perfil cromatográfico do peptídeo sintético HpS-TDQ-NH<sub>2</sub> realizado em coluna de dimensões semi-preparativas. O experimento foi monitorado em 216 nm (preto) e em 280 nm (vermelho) simultaneamente. A linha azul representa o gradiente crescente de solvente B.

Neste perfil cromatográfico, pode-se observar que a fração de maior absorvância é co-eluída com outras. Ao analisar os espectros de massa, notou-se que os íons correspondentes a estes picos cromatográficos pertencem à mesma molécula de interesse em seus estados oxidado e reduzido, como mostrado na figura 14.

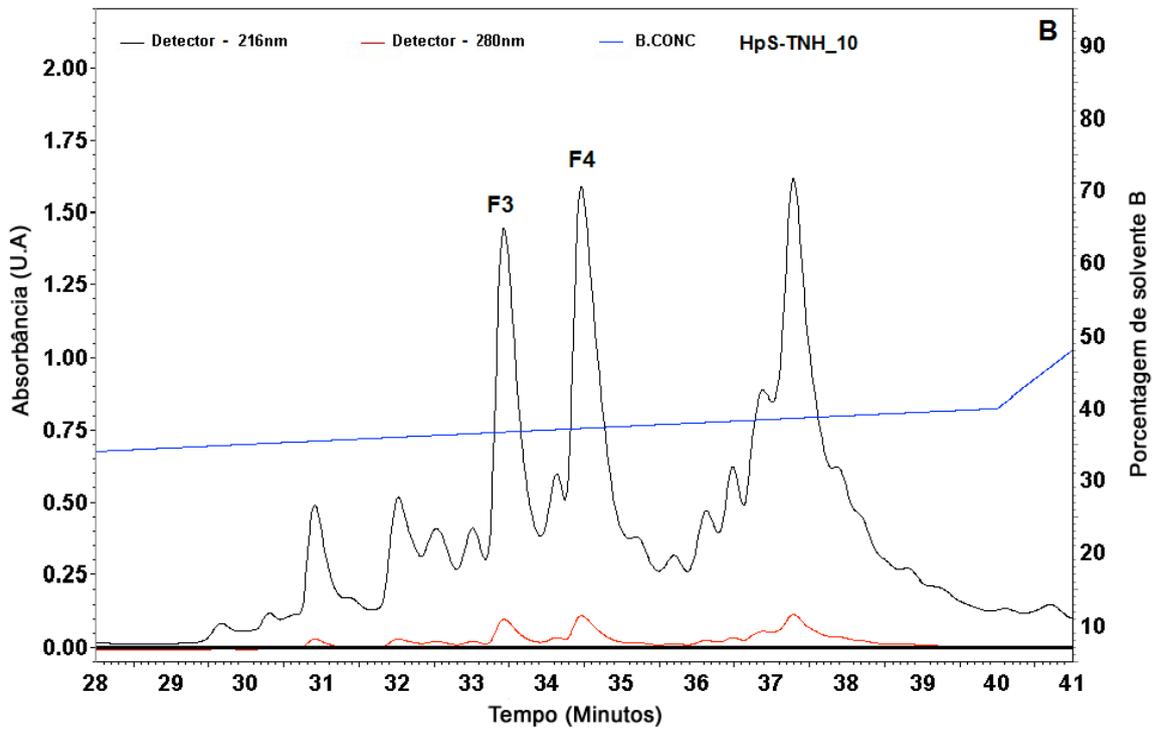
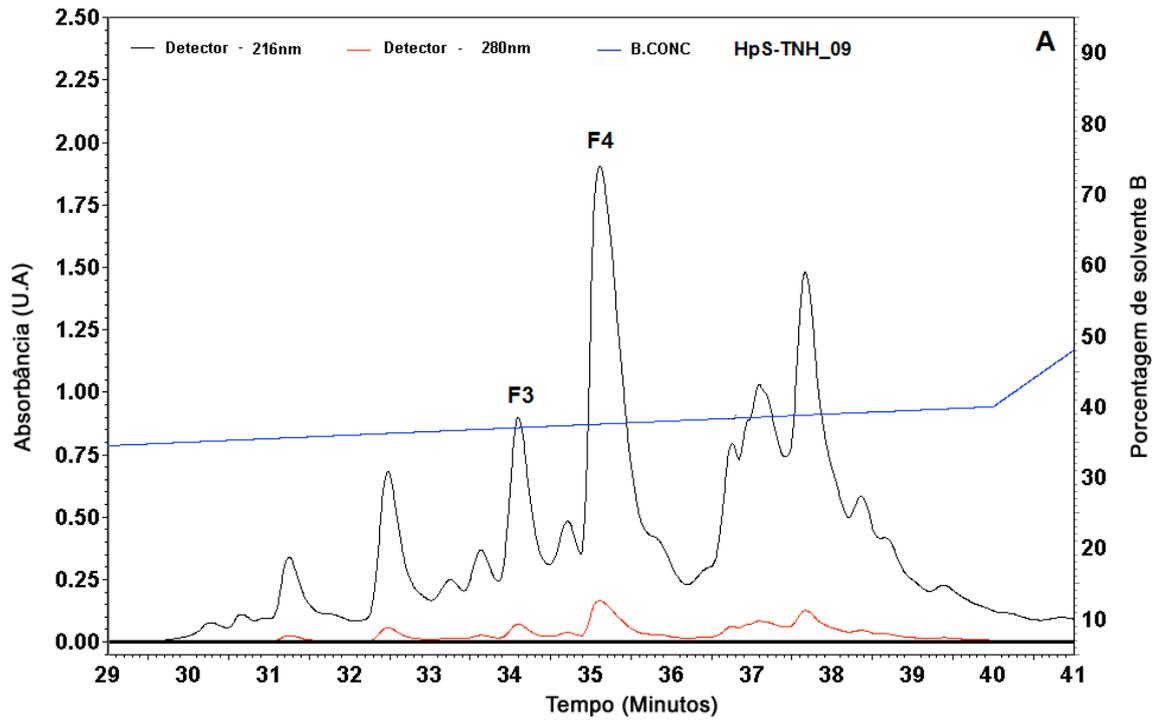


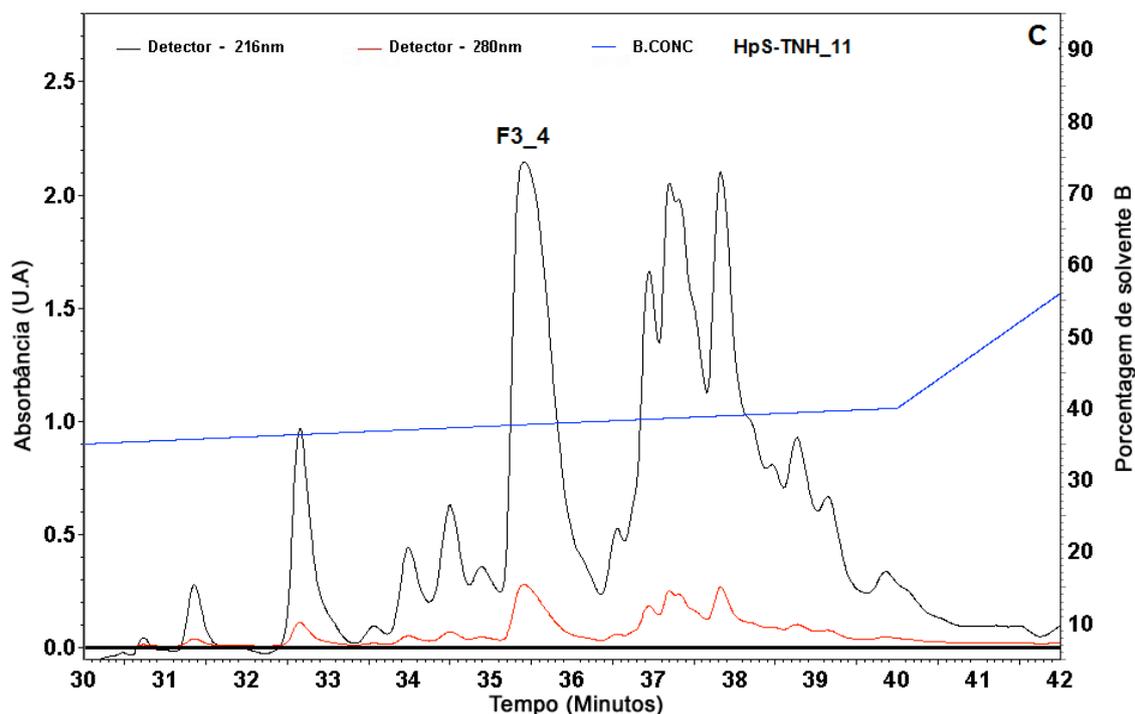
**Figura 14:** Espectros de massa da amostra HpS-TDQ-NH<sub>2</sub>. Em (A) há a presença do íon da molécula em seu estado majoritariamente reduzido de  $[M+H]^+ = 1824,85$  Da e em (B), em seu estado oxidado de  $[M+H]^+ = 1822,88$  Da.

Percebe-se que o peptídeo sofre oxidação durante o processo de purificação. Nesta etapa, a fração cromatográfica de maior absorvância foi ressuspensa em água deionizada para que a formação das pontes dissulfeto ocorresse.

Ao observar que o material de interesse deste e dos outros análogos tinham tendência a sofrer oxidação quando em meio aquoso, a amostra foi ressuspensa em um volume de aproximadamente 10 mL de água Milli-Q<sup>®</sup> por um período de 8 h, sob agitação manual branda em intervalos de 1 h. O espectro de massa apresentado na figura 14-B resultou do experimento de oxidação com água deionizada a 4° C. O mesmo procedimento foi utilizado para a amostra seguinte.

O análogo denominado HpS-TNH-NH<sub>2</sub> passou por diversas etapas de purificação nas quais pôde-se observar diferenças nítidas no processo de oxidação da molécula de interesse ao longo de um período de 10 h e após sucessivos procedimentos cromatográficos, como demonstrado na figura 15.

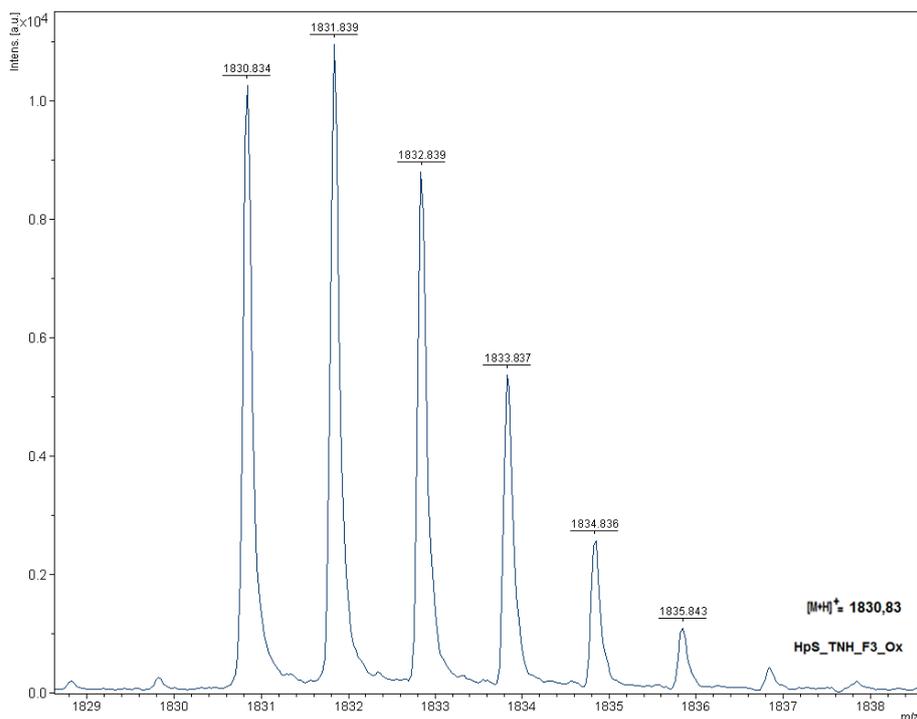




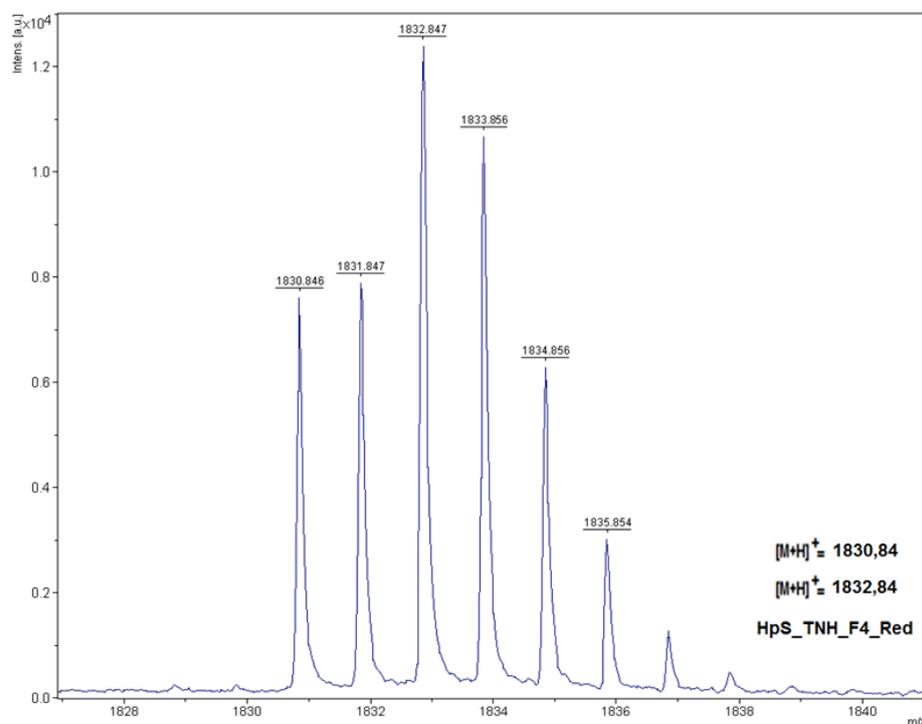
**Figura 15:** Sequência de perfis cromatográficos da amostra HpS-TNH-NH<sub>2</sub>. Em (A) o perfil cromatográfico HpS-TNH-NH<sub>2</sub>\_09, em (B) HpS-TNH-NH<sub>2</sub>\_10 e, em (C) HpS-TNH-NH<sub>2</sub>\_11. As frações sinalizadas são aquelas que contêm a molécula de interesse. As cromatografias foram realizadas em coluna de fase reversa 218TP510 (Dionex/Vydac, Sunnyvale, CA-USA) e o experimento foi monitorado em 216 nm (preto) e em 280 nm (vermelho) simultaneamente. A linha azul representa o gradiente crescente de solvente B.

Na sequência de cromatogramas da figura 15, é interessante observar as variações nas absorbâncias das frações F3 e F4. No cromatograma 15-A, observa-se que a fração F3 representa a amostra em seu estado oxidado enquanto F4 representa a amostra em seu estado majoritariamente reduzido. Foram fracionados cerca de 35 mg do peptídeo HpS-TNH-NH<sub>2</sub> bruto em coluna de fase reversa. O intervalo de tempo entre a injeção da amostra neste experimento foi de aproximadamente 60 minutos.

No processo de purificação da amostra denominada HpS-TNH-NH<sub>2</sub>\_10 (figura 15-B), observou-se absorbância maior para F3 em relação à mesma fração na figura 15-A e que F4, por sua vez, mostrou comportamento inverso. Subseqüentemente, na amostra HpS-TNH-NH<sub>2</sub>\_11 (figura 15-C) não houve separação entre as frações F3 e F4, o que não foi observado nos processos anteriores. Após as análises, constatou-se que o dinamismo durante as etapas de purificação pode ser devido à oxidação espontânea do peptídeo sintético, como sugerem os espectros de massa das figuras 16 e 17.



**Figura 16:** Espectro de massa da fração F3. O íon em evidência de  $[M+H]^+ = 1830,83$  Da representa a massa monoisotópica do peptídeo HpS-TNH-NH<sub>2</sub>.

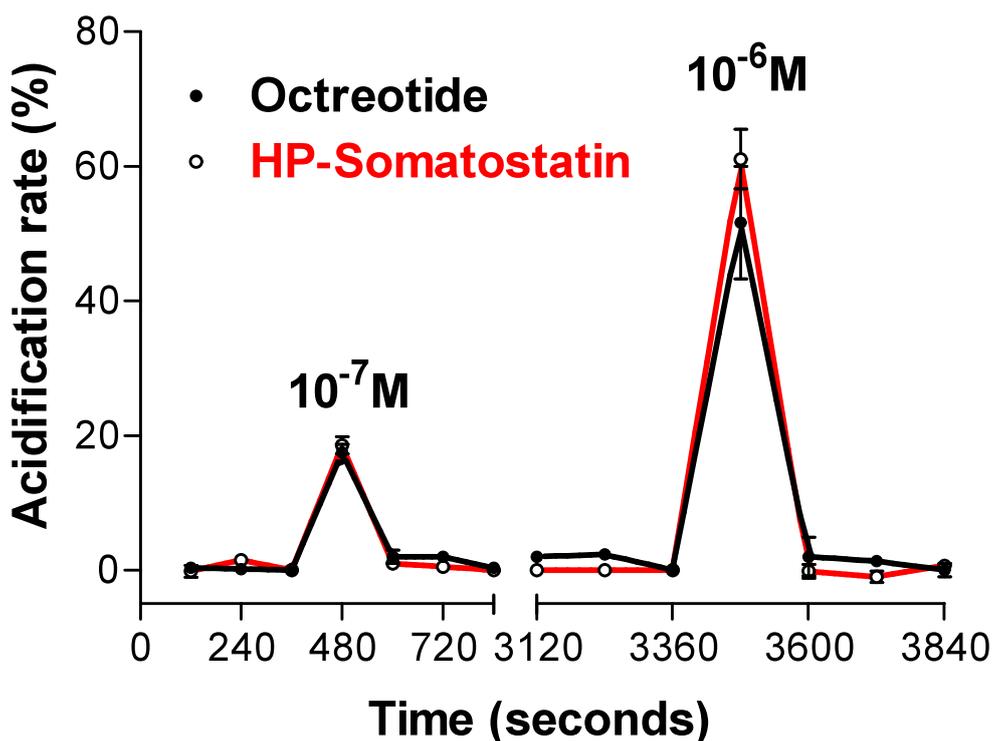


**Figura 17:** Espectro de massa da fração F4. Os íons em evidência de  $1[M+H]^+ = 1830,84$  Da e de  $[M+H]^+ = 1832,84$  Da representam as massas monoisotópicas da amostra HpS-TNH-NH<sub>2</sub> em seus estados oxidados e reduzidos respectivamente.

### 5.3. Ensaio Biológicos

#### 5.3.1. Microfisiometria Funcional

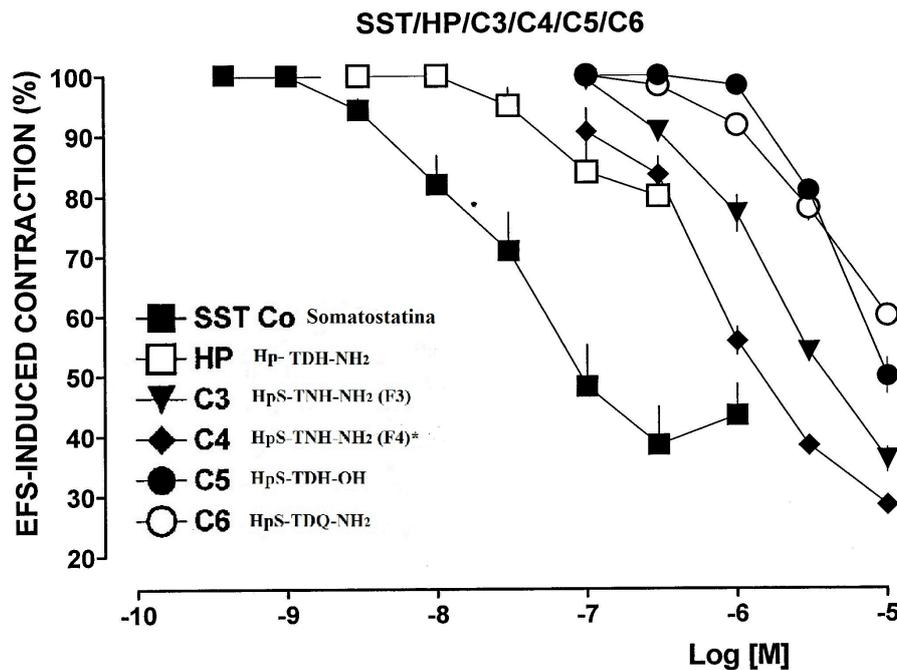
As atividades do octreotídeo e da Hp-somatostatina foram avaliadas pela análise de seus acoplamentos funcionais com os receptores no sistema de microfisiômetro citotensor, que mede as mudanças nas taxas de acidificação do meio extracelular. Após a administração, aumentos similares nos níveis das taxas de acidificação basal em células do tipo INS-1 foram observadas em uma concentração de  $10^{-7}$  M ( $17,5 \pm 1,2$  e  $18,5 \pm 1,3\%$ ) e  $10^{-6}$  M ( $51,6 \pm 8,3$  % e  $61,1 \pm 4,4$  %) para o octreotídeo e para a Hp-somatostatina respectivamente.



**Figura 18:** Efeito do octreotídeo e da Hp-somatostatina ( $10^{-7}$ M e  $10^{-6}$  M) na taxa de acidificação extracelular medido pelo sistema Citotensor em células do tipo INS-1. Os dados representam médias  $\pm$  S.E dos valores da taxa de acidificação extracelular realizados em triplicata. Ensaio prévios realizados em 2004.

### 5.3.2. Estimulação Elétrica – Contração Induzida

A atividade biológica dos análogos sintéticos foi avaliada pelo experimento de contração induzida por estímulo elétrico que pode ser observada na figura 19.



**Figura 19:** Estimulação elétrica de contração induzida em tecido de musculatura lisa. Os análogos testados foram HpS-TDH-OH; HpS-TNH-NH<sub>2</sub> e; HpS-TDQ-NH<sub>2</sub>.

Nesta figura, estão mostrados os Log da concentração do agonista produzindo 50% da resposta máxima em relação à concentração da musculatura lisa de mamíferos. Nota-se que o análogo HpS-TNH-NH<sub>2</sub> (F4) é aquele que causa resposta do tecido a uma concentração menor do peptídeo.

Apesar dos resultados do ensaio serem preliminares, eles sugerem que os análogos possam ser agonistas dos SSTRs presentes na musculatura lisa destes mamíferos (porquinhos-da-Índia e ratos do tipo Sprague-Dowley) mantendo a atividade biológica semelhante à da SS-14.



### 6.3 Análogos de somatostatina

Desde a introdução para o uso clínico, os análogos de somatostatina vem sendo aplicados no tratamento de distintas disfunções como a acromegalia, para lidar com manifestações inflamatórias no TGI e, ainda, como analgésico pós-cirúrgico devido à sua capacidade em se ligar à receptores opióides. Os subtipos de receptores expressos em casos de tumores e disfunções endócrinas são essenciais para que o potencial de emprego terapêutico dos análogos possa ser explorado de forma eficiente. (Freda, 2002; Dahaba *et al.*, 2009).

Atualmente, o tratamento de pacientes cujos casos clínicos envolvem a expressão dos SSTR2 e SSTR5 tem sido realizado com os octapeptídeos análogos disponíveis no mercado, tais como Sandostatin LAR<sup>®</sup> e Lanreotide-PR<sup>®</sup> (Somatulina). Esses medicamentos possuem registro em diversos países onde são empregados no controle de sintomas hormonais em pacientes com carcinomas, tumores neuroendócrinos e pancreáticos e em pacientes portadores de acromegalia. Apesar de sua aceitação no mercado, há efeitos colaterais moderados associados ao seu uso, tais como desconfortos abdominais, flatulência, diarréia, esteatorréia, náusea, formação de pedras vesiculares dentre outros (de Herder & Lamberts, 2002).

A seletividade dos medicamentos disponíveis se faz útil para os tratamentos de pacientes com disfunções neuroendócrinas. Porém, o desenvolvimento de análogos com maior afinidade pelos demais tipos poderá ser mais eficiente para aqueles pacientes cujos organismos expressam os outros subtipos de receptores em maior quantidade.

Há uma ampla variedade de estudos sobre os possíveis empregos de análogos da somatostatina bem como o papel dos subtipos de receptores. Um exemplo é o estudo que relaciona a presença da somatostatina como agente regulador do apetite em modelos murinos quando acontecem interações entre o peptídeo e os receptores  $\mu$ -opióides (Seoane *et al.*, 2009), demonstrando que sua estrutura molecular é capaz de interagir funcionalmente com demais tipos de receptores, podendo modular outros sistemas.

Um outro estudo teve como alvo a dimerização dos SSTR2 e SSTR5 e sua relevância clínica em pacientes portadores de adenomas pituitários e tumores que hipersecretam GH indicando a importância da proteína G como mediadora da resposta molecular (Grant & Kumar, 2009). Há ainda um estudo envolvendo alguns SSTR com o aumento das correntes em canais para potássio em certos tipos celulares, o que faz diminuir os níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  e, conseqüentemente, a inibição da liberação de GH no plasma (Yang *et al.*, 2005).

Todos esses relatos das atividades biológicas da somatostatina e de seus análogos apontam para a versatilidade que estas moléculas possuem. Como as estruturas destas moléculas análogas são distintas e, logo, sua estrutura terciária também, infere-se que seu reconhecimento molecular por determinados tipos de receptores decorre disto.

Portanto, de acordo com as evidências experimentais apontadas neste trabalho, acreditamos que os análogos por nós sintetizados, purificados e testados possam, além de ser mais estáveis, devido à rigidez estrutural conferida pelas interações intra-cadeia especificadas anteriormente, sem conseqüente perda da sua atividade biológica, ter meia-vida mais longa do que a SS-14, quando circulante. Ainda, aparentam ser mais potentes do que a SS endógena e do que o atual análogo utilizado para o tratamento da acromegalia, o octreotídeo, uma vez que seriam necessárias doses menores de Hp-somatostatina para se obter o mesmo efeito dos análogos em concentrações maiores nos ensaios realizados por nossos colaboradores.

#### **6.4 Síntese química em fase sólida**

A síntese orgânica dos análogos propostos neste projeto foi conduzida de tal forma a gerar quantidades suficientes das amostras para a realização de ensaios biológicos bem como a suas caracterizações conformacionais. As cadeias polipeptídicas foram alongadas, fixadas covalentemente aos ligantes de uma fase sólida constituída por um polímero insolúvel e inerte às condições empregadas para uma síntese bem sucedida (Marquadt & Eifler-Lima, 2001).

Durante a síntese dos peptídeos, houve algumas etapas de acoplamento que precisaram ser repetidas, uma vez que o teste da ninhidrina muitas vezes acusava a presença de amins primárias livres na resina. Mesmo seguindo os procedimentos descritos na literatura, constatou-se que houve etapas custosas durante a síntese dos análogos. Por exemplo, os resíduos de asparagina<sup>3</sup>, fenilalanina<sup>4</sup>, triptofano<sup>6</sup> foram os aminoácidos que precisaram ser reacoplados em todos os análogos sintetizados neste trabalho. A substituição de um ácido aspártico por um ácido glutâmico pareceu gerar interações entre as cadeias laterais, o que impossibilitou o término da síntese do análogo HpS-TEH-NH<sub>2</sub>.

#### **6.5 Purificação dos análogos de Hp-somatostatina**

Durante as sínteses em fase sólida utilizando a estratégia Fmoc/t-butila, foram gerados subprodutos que precisaram ser eliminados nas etapas de purificação. Além disso, foram produzidas formas truncadas do peptídeo-alvo, as quais não continham o mesmo número de resíduos de aminoácidos da seqüência desejada. Portanto, foi necessária a sua eliminação, com o intuito de se evitar interações cruzadas capazes de gerar resultados falso-positivos ou negativos.

O sistema de RP-HPLC, normalmente, mostra-se eficiente na separação de compostos protéicos de baixa massa molecular. No entanto, nos resultados apresentados nesse trabalho, as etapas de purificação necessitaram de diversas repetições e análises por MS para que se obtivesse o material com o grau de pureza necessário para a realização dos ensaios biológicos.

Apesar das interações entre pequenas moléculas e uma coluna cromatográfica serem bem compreendidas, quando se trata de moléculas biológicas como proteínas, estas interações podem ocorrer de diversas formas. Uma proteína pode interagir com o adsorvente em diferentes pontos de sua superfície; podem ocorrer diferentes forças intermoleculares entre o analito e o adsorvente; e, ainda, forças intramoleculares podem influenciar no processo de separação das moléculas (Scopes, 1994).

De acordo com estudos estruturais recentes, quando a SS-14 encontra-se sob condições não-desnaturantes, esta possui uma característica intrínseca de formar estruturas supramoleculares de fibrilas, organizando-se em agregados não-covalentes. Acredita-se que este tipo de organização possa ser uma forma biologicamente mais econômica de estocagem e liberação nos sistemas fisiológicos (van Gondrelle *et al.*, 2007).

Estes fatores condizem com o observado durante o desenvolvimento deste trabalho, já que constatamos uma tendência para interações intra e inter-moleculares entre os resíduos de cisteína dos análogos de somatostatina que geraram complicações para a etapa de purificação. Além disto, foi observado que as intensidades de absorvância de alguns análogos variou após a amostra ter sido exposta à fase móvel A (H<sub>2</sub>O +01% TFA) (vide figura 15). Sabendo que um dos métodos mais simples de se favorecer a formação de cistinas em peptídeos sintéticos é o de oxidação em água, na presença de oxigênio (Chan&White, 2000) os perfis cromatográficos complexos, aliados aos espectros de MS evidenciando a presença de formas diméricas dos análogos sintetizados, bem como aqueles de mobilidade iônica demonstrando a existência de vários tipos de conformação (*Synapt, Waters*, dados não mostrados), ficou justificado o grau de dificuldade para a obtenção das quantidades puras necessárias para a conclusão do trabalho.

Nos espectros de massa, pôde-se observar a presença dos estados oxidado e reduzido com a presença igualmente de complexos de massa monoisotópica correspondente ao dobro da massa molecular dos analitos, os quais acreditamos ser dímeros destes análogos e/ou agregados não-covalentes.

## **7 CONCLUSÕES**

---

A síntese dos análogos resultou em diversos subprodutos revelados pelas etapas cromatográficas e pelas análises por MS. Sua oxidação espontânea e a sua tendência em formar dímeros e/ou agregados não-covalentes dificultaram o estabelecimento de uma metodologia padrão a ser empregada no processo de oxidação e de purificação das moléculas produzidas.

As quantidades obtidas das amostras com elevado grau de pureza estiveram constantemente abaixo do esperado devido aos fatores mencionados acima (HpS-TNH-NH<sub>2</sub>\_F3: 630 µg; HpS-TNH-NH<sub>2</sub>\_F4: 710 µg; HpS-TDH-OH: 520 µg; HpS-TDQ-NH<sub>2</sub>: 3,8 mg). No entanto, dados preliminares obtidos em Parma (figura 19), por meio de ensaios biológicos *in vitro* de contratilidade em células de musculatura lisa, sugerem fortemente que pequenas quantidades dos análogos propostos nesta pesquisa sejam capazes de agir como agonistas em SSTRs de células de mamíferos.

Apesar da produção e purificação dos análogos da SS terem se mostrado processos onerosos, a realização dos testes *in vitro* durante o desenvolvimento deste trabalho foi possível e os resultados se mostraram promissores, indicando a importância da realização de novos testes *in vitro* e *in vivo*.

## **8 PERSPECTIVAS**

---

A próxima etapa deste trabalho envolve a obtenção das estruturas terciárias dos peptídeos propostos. Para tanto os análogos HpS-TDH-OH HpS-TNH-NH<sub>2</sub>, HpS-TDQ-NH<sub>2</sub> estão em fase de aquisição dos respectivos espectros de RMN para a conseqüente verificação do objetivo geral proposto no projeto.

O análogo HpS-TDH-NH<sub>2</sub> está sendo sintetizado para a obtenção de maior quantidade de material com a finalidade de se realizar novos testes *in vitro* com células de musculatura lisa de mamíferos.

O desenvolvimento de análogos mais eficientes da somatostatina poderá não somente minimizar os efeitos colaterais como também aprimorar a qualidade de vida dos pacientes que necessitam destes medicamentos no tratamento das disfunções mencionadas neste trabalho. Ainda, como a Hp-somatostatina é de ocorrência natural, a identificação do gene que a codifica possibilitaria sua clonagem. Tal processo poderia ser empregado como alternativa à síntese química, resultando na produção em maior escala do peptídeo na sua forma ativa e reduzindo o custo. De acordo com o informe anual de 2007 da empresa Novartis, atualmente, o medicamento Sandostatin<sup>®</sup> LAR é o líder de mercado — mas não necessariamente a melhor opção do ponto de vista terapêutico e econômico — para o tratamento da acromegalia, sendo que sua produção e comercialização movimentam expressivos volumes de recursos da ordem de 1 bilhão de dólares por ano. Portanto, se fosse possível a obtenção de uma droga igualmente ou de maior eficácia por uma via alternativa e menos onerosa, o tratamento das diversas patologias aqui levantadas abrangeria uma parcela da população muito mais expressiva. Desta maneira, o problema passaria a ser tratado de forma mais humana, visando menos o lucro e mais a qualidade de vida.

Por isto, torna-se de interesse confirmar a ação farmacológica da Hp-somatostatina, e verificar experimentalmente se, além de ser mais estável estruturalmente, este análogo pode atuar como agonista de um maior número de subtipos de SSTRs. Adicionalmente, pretendemos avaliar diferentes substituições pontuais de alguns dos resíduos de aminoácidos considerados essenciais para a manutenção de sua estrutura/função, afim de produzir mudanças estruturais que possam incrementar a aplicabilidade farmacêutica do peptídeo natural.

Portanto, existe uma necessidade real do constante aprimoramento tanto das técnicas de administração dos medicamentos quanto da produção de análogos mais eficientes e que causem menos efeitos colaterais nos pacientes. O fato do tratamento para indivíduos portadores de acromegalia ser vitalício garante uma oportunidade para tais melhorias assim como abre espaço para novas pesquisas acadêmicas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ABDU F.; HICKS, G. A.; GARETH, A.; HENNIG, G.; ALLEN, J. P.; GRUNDY, D. Somatostatin SST2 receptors inhibit peristalsis in the rat and mouse jejunum. *Am J Physiol: Gastrointest Physiol*, **282**:G624–33, 2002.

ACHER, R; CHAUVET, J. The neurohypophyseal regulatory cascade: precursors, mediators, receptors and effectors. *Front. Neuroendocrinol.*, **16**:237-289, 1995.

ANASTASI, A.; ERSPAMER, V.; BERTACCINI, G. Occurrence of bradikinin in the skin of *Rana temporaria*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **14**:43-52, 1965.

ANASTASI, A.; ERSPAMER, V.; BUCCI, M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia*, **27**:166-167, 1971.

AYALON, A.; YAZIGI, R.; THOMPSON, J.C.; DEVITT, P.G.; RAYFORD, P.L. & THOMPSON, J.C. Direct effect of bombesin on isolated gastric mucosa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **99** (4): 1390-1397, 1981.

AZIZ, Q.; THOMPSON, D.G.. Brain-gut axis in health and disease. *Gastroenterology Special Reports and Reviews*, **114**: 559-578, 1998.

BOMAN, H.G., HULTMARK, D. Cell-free immunity in insects. *Annual Review Microbiology*, **41**: 103-26, 1987.

BRAZEAU, P.; EPELBAUM, J.; Benoit R. *Somatostatin: physiological studies and blood determinations in* Callu, R.; Ducharme, J. R.; Barbeau, A. e Rochefort, J-G., *Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and Other Peptides*. Raven Press, NY., 367-379, 1979.

BURGUS, R.; LING, N.; GUILLEMIN, R. Primary structure of Somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **70** ( 3): 684-688, 1973.

CHENG, H.; STRAUB, S G.; SHARP, G.W.G. Protein acylation in the inhibition of insulin secretion by norepinephrine, somatostatin, galanin, and PGE2. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **285**: E287–E294, 2003.

CHAN, W.C.; WHITE, P.D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis a practical approach*. Ed. Oxford. Nova Iorque, 2000.

CHATTERJEE, S.; MBAYE, A.; DE MAN, J.G.; VAN MARCK, A.E. Does the neuropeptide somatostatin have therapeutic potential against schistosomiasis? *TRENDS in Parasitology*, **18**:295-298, 2002.

CHENG H, STRAUB S.G, SHARP G.W. Protein acylation in the inhibition of insulin secretion by norepinephrine, somatostatin, galanin, and PGE2. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285** (2):E287-94, 2003.

CONLON, J.M.; ARONSSON, U. Multiple bradykinin-related peptides from the skin of the frog, *Rana temporaria*. *Peptides*, 18(3): 361-365. 1997.

CONLON, J.M. Purification of naturally occurring peptides by reversed-phase HPLC. *Nature Protocols*, **2** (1): 191-197, 2007.

CORLETO, V.D.; SEVERI, C.; ROMANO, G.; TATTOLI, I.; WEBER, H.C.; STRIDSBERG, M.; RINDI, G.; CAMPANINI, N.; TOMASSINI, F.; PAGOTTO, U.; COY, D.H.; JENSEN, R.T.; DELLE, F. Somatostatin receptor subtypes mediate contractility on human colonic smooth muscle cells. *Neurogastroenterol. Moti.***18**:217–25, 2006.

DAHABA, A. A.; MUEALLER, G.; MATTIASSICH, G.; RUMPOLD-SEITLINGER, G.; BORNEMANN, H.; REHAK, P.H.; LINCK, G.; MISCHINGER, H. J.; METZLER, H. Effect of somatostatin analogue octreotide on pain relief after major abdominal surgery. *European Journal of Pain*, 13: 861-864, 2009.

DAVIES, N.; COOKE, T.G.; JENKINS, S.A. Therapeutic potential of octreotide in the treatment of liver metastases. *Anticancer Drugs*, **1**:23-31, 1996.

De HERDER, W.W.; LAMBERTS, S.W.J. Somatostatin and somatostatin analogues: diagnostic and therapeutic uses. *Curr. Opin. Oncol.* **14**: 53-57, 2002.

DEN BOSCH, J. V. O.; ADRIAENSEN, D.; NASSAUW, L. V.; TIMMERMANS, J.P. The role(s) of somatostatin, structurally related peptides and somatostatin receptors in the gastrointestinal tract: a review. *Regulatory peptides*, **156**: 1-8, 2009.

DEVOS, N.; DEFLORIAN, G.; BIEMAR, F.; BORTOLUSSI, M.; MARTIAL, J.A.; PEERS, B; ARGENTON, F. Differential expression of two somatostatin gene during zebrafish embryonic development. *Mechanism of Development*, **115**:133-137, 2002.

DUELLMAN, E.W.; TRUEB, L. *Biology Of Amphibians*. Mcgraw-Hill Book Company, Johns Hopkins Univ Press. ISBN:080184780X. pp:1-371, 1986.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P. Proceedings: Amphibian skin polypeptides active on the gut. *J Endocrinol.*, **70**:12P-13P, 1976.

ERSPAMER, V.; MELCHIORRI, P.; FALCONIERI-ERSPAMER, G.F.; MONTECUCCHI, P.P.; DE CASTIGLIONE, R. *Phyllomedusa* skin: a huge factory and store-house of a variety of active peptides. *Peptides*, 6 Suppl **3**:7-12, 1985.

FISHER, W.E.; WU, V.; AMAYA, F.; BERGER, D. H. Somatostatin receptor subtype 2 gene therapy inhibits pancreatic cancer *in vitro*. *J. Surgical Research*, **105**:58-64, 2002.

FREDA, P. U. Somatostatin analogs in acromegaly. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **87** (7): 3013-3018, 2002.

GHATEI, M.A.; JUNG, R.T.; STEVENSON, J.C.; HILLYARD, C.J.; ADRIAN, T.E.; LEE, Y.C.; CHRISTOFIDES, N.D.; SARSON, D.L.; MASHITER, K.; MACINTYRE, I.; BLOOM, S.R. Bombesin: action on gut hormones, and calcium in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **54**:980-985, 1982.

GUGGER, M.; REUBI, J.C. Somatostatin. In: Handbook of biologically active peptides. Copyright Elsevier, 2006, cap. 154, p. 1123-1130.

GRACE, C. R. R.; ERCHEGYI, J.; KOERBER, S. C.; REUBI, J. C.; RIVIER, J.; RIEK, R. Novel sst2-selective somatostatin agonists. Three-dimensional consensus structure by NMR. *J. Med. Chem.*, **49** (15): 4487-4496, 2006.

GRANT, M.; KUMAR, U. The role of G-proteins in the dimerisation of human somatostatin receptor types 2 and 5. *Regulatory Peptides*. DOI: 10.1016/j.regpep.2009.08.011.

GUILLEMIN, R.; GERICH, J.E. Somatostatin: physiological and clinical significance. *Annu. Rev. Med.*, 379-388, 1976.

ITOH S.; TAKASHIMA, A.; ITOH, T.; MORIMOTO, T. Effects of neuromedins and related peptides on the body temperature of rats. *Jpn. J. Physiol.*, **45**:37-45, 1995.

KRSEK, M. Somatostatin, somatostatin analogs and their clinical use, *Cas Lek Cesk.*, **142**:134-8, 2003.

LAMBERTS, S.W.J.; DE HERDER, W.W.; HOFLAND, L.J. Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. *TRENDS in Endocrinology and Methabolism*, **13**:451-457, 2002.

LEE, J-U.; HOSOLANI, R.; WADA, M.; DOI, R.; KOSHIBA, T.; FUJIMOTO, K.; MIYAMOTO, Y.; TSUJI, S.; NAKAJIMA, S.; HIROHASHI, M.; UEHARA, T.; ARANO, Y.; FUJII, N.; IMAMURA, M. Antiproliferative activity induced by the somatostatin analogue, TT-232, in human pancreatic cancer cells. *Eur. J. Cancer*, **38**:1526-1534, 2002

MARKOV, A.V. On the origin of the eukaryotic cell. *Paleontological Journal*, **39** (2): 109-116, 2005.

MARQUARDT, M.; EIFLER-LIMA, V. A síntese orgânica em fase sólida e seus supores poliméricos mais empregados. *Quim. Nova*, **24** (6): 846-855, 2001.

MCCOY, J.G.; AVERY, D.D. Bombesin: potential integrative peptide for feeding, and satiety. *Peptides*, **11**:595-607, 1990.

MELANCINI, G.; ZHU, Q.; GOODMAN, M.; Multiconformational NMR Analysis of Sandostatin (Octreotide): Equilibrium between  $\alpha$ -Sheet and Partially Helical Structures. *Biochemistry*, **(36)**: 1233-1241, 1997.

MCCONNELL, H.M., OWICKI, J.C., PARCE, J.W., MILLER, D.L., BAXTER, G.T., WADA, H.G., PITCHFORD, S. The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology. *Science* **257** (5078): 1906-12, 1992.

NÁJERA, C. From  $\alpha$ -Amino Acids to Peptides: All You Need for the Journey. *Accounts and Rapid Communications in Synthetic Organic Chemistry*, **9**: 1388-1403, 2002.

NELSON, D.L., COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4 ed., New York: Editora W. H. Freeman and Company, 2005. P. 79 & p.116-130.

PAWLIKOWSKI, M.; MELEN-MUCHA, G. Perspectives of potential therapeutic applications of somatostatin analogs. *Neuroendocrinology Letters*, **24**:22-27, 2002.

PRATES, M.V. *Peptídeos bioativos do anuro *Hyla punctata** – Tese (Doutorado). Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2003.

RENDA, T.; LOREDANA, E.; FASOLO, A.; LAZARUS, L. H.; MINNITI, F.; ERSPAMER, V. Brain-gut-skin peptides: an overview. *Arch. Histol. Cytol.*, **52**: 317-323, 1989.

SANTOS, E.L., PESQUERO, J.B., OLIVEIRA, L., PAIVA, A.C.M., COSTA-NETO, C.M. Mutagenesis of the AT<sub>1</sub> receptor reveals different binding modes of angiotensin II and [Sar<sup>1</sup>]-angiotensin II *Regul. Pept.* **119** (3):183-8, 2004.

SCOPEL, P.K.; Protein Purification: Principles and Practice. 3.ed. Boston: Singer, 1994. 375p. Cap. 5 101-126p.

SCHWARTZ, C.A.; CASTRO, M. S.; PIRES JÚNIOR, O. R.; MACIEL, N. M.; SCHWARTZ, E. F.; SEBBEN, A. Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas. In: Sociedade Brasileira de Herpetologia. Herpetologia no Brasil II, 2007 146-168.

SEBBEN, A.; SCHWARTZ, C.A.; CRUZ, J.S. A defesa química dos anfíbios. *Ciência Hoje*, **15**:25-33, 1993.

SEOANE, L.M.; LÓPEZ, M.; TOVAR, S.; CASANUEVA, F.F.; SEÑARÍS, R.; DIÉGUEZ, C. Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin in the rat hypothalamus. *Endocrinology*. **144** (2): 544–551, 2009.

SEVERI, C.; JENSEN, R. T. ERSPAMER, V.; D'ARPINO, L.; COY, D.H.; TORSOLI, A.; DELLE FAVE, G. Different receptors mediate the action of bombesin-related peptides on gastric smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, **260**:683-690, 1991.

SHIBUE, M.; MANT, C. T.; HODGES, R. S. Effect of anionic ion-pairing reagent concentration (1-60mM) on reversed-phase liquid chromatography elution behavior of peptides. *Journal of Chromatography A*, **1080**: 58-67, 2005.

STONE, D.M.J.; WAUGH, R.J.; BOWIE, J.H.; WALLACE, J.C.; TYLER, M.J. Peptides from Australian frogs: structures of the caerins and caeridin-1 from *Litoria splendida*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**(23):3173-3178, 1992.

STRAND, F.L. *Neuropeptides: regulators of physiological processes*, A Bradford Book, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts. ISBN:0262194074. pp:3-8, 1999.

VAN GONDRELLE, W.; IGLESIAS, C. L.; COLL, E.; ARTZNER, F.; PATERNOSTRE, M.; LACOMBE, F.; CARDUS, M.; MARTINEZ, G.; MONTES, M.;

CHERIF-CHEIKH, R.; VALÉRY, C. Spontaneous fibrillation of the native neuropeptide hormone Somatostatin-14. *Journal of Structural Biology*, **160**: 211-223.

WALSH, J.H.; WONG, H.C.; DOCKRAY, G.J. Bombesin-like peptides in mammals. *Fed. Proc.*, **38**:219-225, 1979.

YANG, S.K.; PARKINGTON, H.C.; BLAKE, A.D.; KEATING, D.J.; Chen, C. Somatostatin Increases Voltage-Gated K<sub>v</sub> Currents in GH3 Cells through Activation of Multiple Somatostatin Receptors. *Endocrinology*. **146** (11):4975–4984, 2005.