

**SÍNTESE E ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PEPTÍDEO  
BIOATIVO *ER $\alpha$ 17p***

**DANIELA PEREIRA VIEIRA SOUZA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**MARÇO, 2017.**



## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

41/2017

Souza, Daniela Pereira Vieira

Síntese e estudo da atividade biológica do peptídeo bioativo ER $\alpha$ 17p / Daniela Pereira Vieira Souza. – Campos dos Goytacazes, 2017.

xix, 110 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Ciências Químicas. Campos dos Goytacazes, 2017.

Orientador: Edmilson José Maria.

Coorientador: Fabienne Burlina

**SÍNTESE E ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PEPTÍDEO  
BIOATIVO *ER $\alpha$ 17p***

**DANIELA PEREIRA VIEIRA SOUZA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências Naturais.

Orientador: Edmilson José Maria.

Co-orientadora: Fabienne Burlina.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES**

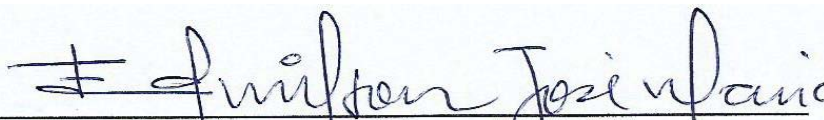
**MARÇO, 2017.**

**SÍNTESE E ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PEPTÍDEO  
BIOATIVO  $ER\alpha 17p$**

**DANIELA PEREIRA VIEIRA SOUZA**

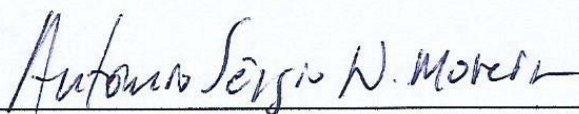
Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências Naturais.

Aprovada em 29 de março de 2017



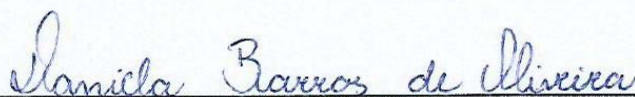
---

Orientador: Edmilson José Maria – LCQUI / UENF



---

Prof. Antônio Sérgio Nascimento Moreira – IFF / Guarus



---

Prof. Daniela Barros de Oliveira – LTA / UENF



---

Prof. Ivo José Curcino Vieira – LCQUI / UENF

## DEDICATÓRIA

**À Deus por me permitir  
alcançar meus sonhos.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas experiências vividas durante esse trabalho.

Ao meu esposo Miquéias da Vitória Souza por estar ao meu lado em cada decisão e por abrir mão de seus objetivos pessoais para realizar os meus.

À minha família que sempre me apoiou e me incentivou a trilhar esse caminho.

Ao meu orientador Edmilson José Maria pelo ensinamentos e companheirismo nos últimos anos e pela oportunidade de me permitir trabalhar em uma grande equipe de pesquisa.

Aos meus orientadores franceses Fabienne Burlina e Yves Jacquot pela paciência e pelos muitos ensinamentos acadêmicos.

Ao meu amigo e eterno professor Roberto Pereira Santos que sempre esteve ao meu lado com conselhos e orientações.

Aos professores Daniela Barros de Oliveira, Ivo José Curcino Vieira e Antônio Sérgio Moreira Nascimento por participarem da banca examinadora.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>PEPTÍDEOS SINTETIZADOS .....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABREVIações .....</b>	<b>XVI</b>
<b>1. APRESENTAÇÃO DOS ESTUDOS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>2.1. PEPTÍDEOS: DEFINIÇÃO E SÍNTESE.....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Os Peptídeos.....	5
2.1.2. Aplicação dos Peptídeos .....	9
2.1.3. A Síntese dos Peptídeos .....	12
2.1.3.1. Síntese Orgânica Clássica de Peptídeos .....	15
2.1.3.2. Síntese de Peptídeo em Fase Sólida - SPFS.....	16
2.1.3.2.1. Resinas utilizadas na SPFS .....	19
2.1.3.2.2. Grupos protetores da cadeia lateral .....	21
2.1.3.2.3. Protetores do grupo $\alpha$ -amino.....	22
2.1.3.2.4. O rendimento final na síntese de peptídeos em fase sólida.....	27
2.1.3.3. Síntese enzimática ou Biocatalizada de peptídeos .....	29
2.1.3.4. Síntese de Peptídeos via DNA-Recombinante.....	29
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2.2. OS CPP's E A INTERNALIZAÇÃO.....</b>	<b>30</b>
2.2.1. Os CPP .....	31
2.2.1.1. Penetratina (pAntp).....	33
2.2.1.2. Peptídeos sintéticos RW <sub>9</sub> e R <sub>9</sub> .....	35



2.2.2. Internalização .....	37
<b>CAPÍTULO III</b>	
2.3. O CÂNCER E O PEPTÍDEO BIOATIVO ERA17P.....	41
2.3.1. O câncer de mama e os marcadores hormonais.....	42
2.3.2. O peptídeo bioativo ERa17p.....	45
3. OBJETIVOS.....	48
3.1 – Objetivo geral.....	49
3.2 – Objetivos específicos.....	49
3.2.1 – Síntese dos peptídeos.....	49
3.2.1.1 – Síntese do peptídeo ERa17p e seus derivados .....	49
3.2.1.2 – Síntese dos CPP's.....	49
3.2.1.3 – Síntese dos peptídeos conjugados.....	50
3.2.1.4 – Caracterização das soluções estoques contendo os CPP's .....	50
3.2.2 - Testes biológicos.....	50
3.2.2.1 – Toxicidade e proliferação .....	50
3.2.2.2 – Internalização .....	50
4. MATERIAIS E METODOLOGIA .....	51
4.1 - Síntese e caracterização dos peptídeos .....	52
4.1.1 – Materiais e equipamentos.....	52
4.1.2. Metodologias .....	53
4.1.2.1. Procedimento geral para a síntese em estratégia Boc.....	54
4.1.2.2. Clivagem dos Peptídeos em Estratégia Boc .....	54
4.1.2.3. Procedimento geral para a síntese em estratégia FMOC .....	54
4.1.2.4. Clivagem dos Peptídeos em Estratégia FMOC.....	55
4.1.2.5. Procedimento comum para as sínteses em ambas as estratégias .....	55
4.1.2.6. Conjugação dos peptídeos .....	56
4.1.2.7. A purificação e caracterização dos peptídeos.....	56
4.2 - Os estudos biológicos .....	57
4.2.1 - Materiais.....	57
4.2.2. Metodologias .....	58
4.2.2.1. Preparação das células .....	58
4.2.2.2. Toxicidade e proliferação .....	58

4.2.2.3. Procedimento Geral para Internalização .....	58
4.2.2.4. Ajuste da Metodologia de Internalização.....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	63
5.1. Síntese dos Peptídeos.....	64
5.2. Testes Biológicos.....	79
5.2.1. Toxicidade e Proliferação .....	80
5.2.2. Ajustes na metodologia de internalização .....	84
5.2.3. Internalização .....	90
6. CONCLUSÃO .....	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Os resíduos <i>N</i> -terminal e <i>C</i> -terminal em um peptídeo.....	6
Figura 2 – Átomo de carbono $\alpha$ . .....	6
Figura 3 – Os 20 aminoácidos comumente encontrados nas proteínas. Nos organismos vivos estão presentes na forma de L-aminoácidos (NELSON; COX, 2008).....	7
Figura 4 – Porcentagem de utilização dos peptídeos como fármaco entre os anos de 1940 e 2008 (REICHERT, 2010). .....	10
Figura 5 – O uso de peptídeos no desenvolvimento de novos fármacos (LAU; DUNN, 2016).....	11
Figura 6 – Porcentagem de utilização dos peptídeos conjugados em casos clínicos (LAU; DUNN, 2016). .....	11
Figura 7 – Estruturas utilizadas por Emil Fisher. ....	14
Figura 8 – Grupo protetor utilizado por Max Bergmann e Leonidas Zervas. ....	14
Figura 9 – Grupos protetores da cadeia lateral derivados da uretanas utilizados na SPFS. ....	21
Figura 10 – Grupos protetores da cadeia lateral utilizados na SPFS.....	22
Figura 11 – A diversidade na origem e na sequência peptídica.....	33
Figura 12 – Representação 3D da ligação do homeodomínio da Penetratina ao DNA. <a href="http://www.biosci.ki.se/groups/tbu/homeo.html">http://www.biosci.ki.se/groups/tbu/homeo.html</a> .....	34
Figura 13 – Representação helicoidal dos CPP's <i>Penetratina</i> , <i>RW<sub>16</sub></i> e <i>RW<sub>9</sub></i> . <a href="http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi">http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi</a> .....	36
Figura 14 – Representação da Espectroscopia de Massas MALDI-TOF. <a href="http://www.nanocell.org.br/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/">http://www.nanocell.org.br/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/</a> .....	38
Figura 15 – Identificação do H-peptídeo internalizado e comparação ao controle D-peptídeo.....	39
Figura 16 – Região <i>hinge</i> do receptor de estrogênio .....	46
Figura 17 – Passagem do peptídeo <i>ER<math>\alpha</math>17p</i> para o interior celular.....	46
Figura 18 – Protocolo de quantificação do peptídeo internalizado.....	61

- Figura 19 – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo P1 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo P1 após purificação por CLAE analítico. .... 66
- Figura 20 – a. Espectro de Massa em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo P2 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo P2 após purificação por CLAE analítico. .... 67
- Figura 21 – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo P3 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo P3 após purificação por CLAE analítico. .... 68
- Figura 22 – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo P4 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo P4 após purificação por CLAE analítico. .... 69
- Figura 23 – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo P<sub>D</sub> após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo P<sub>D</sub> após purificação por CLAE analítico. .... 70
- Figura 24 – Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo V1 após purificação por CLAE preparativo..... 71
- Figura 25 – Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo V2 após purificação por CLAE preparativo..... 72
- Figura 26 – Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo V3 após purificação por CLAE preparativo..... 73
- Figura 27 – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo V4 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo V4 após purificação por CLAE analítico. .... 74
- Figura 28 – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo V5 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo V5 após purificação por CLAE analítico. .... 74
- Figura 29 – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo V6 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo V6 após purificação por CLAE analítico. .... 75

Figura 30 – Peptídeo conjugado C1: reação de acoplamento do peptídeo P4 ao peptídeo V4 monitorada por CLAE analítico. ....	76
Figura 31 – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo C1 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo C1 após purificação por CLAE analítico. ....	77
Figura 32 – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo C2 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo C2 após purificação por CLAE analítico. ....	78
Figura 33 – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo C3 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo C3 após purificação por CLAE analítico. ....	79
Figura 34 – Mecanismo de ação da solução CCK-8. ....	81
Figura 35 – Quantificação das células CHO-K1 após 1 hora de incubação.....	81
Figura 36 – Quantificação das células MCF-7 após 1 hora de incubação. ....	82
Figura 37 – Quantificação das células MCF-7 após 1, 24, 48 e 72 horas de incubação em meio de cultura contendo 10% SBF/DMEM.....	83
Figura 38 – Quantificação das células MCF-7 após 1, 24, 48 e 72 horas de incubação em meio de cultura contendo 10% SBF-D/DMEM.....	83
Figura 39 – Perfil obtido em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF do procedimento controle do estudo da inativação da ação da tripsina pela solução TCEP.....	87
Figura 40 – Perfil obtido em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF do procedimento controle do estudo da ação da tripsina.....	88
Figura 41 – Perfil obtido em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF da ação das soluções TCEP e tripsina nas proporções 2:5 e 3,5:5.....	89
Figura 42 – Perfil obtido em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF da ação das soluções TCEP e tripsina na proporções 1:1. ....	90
Figura 43 – Quantificação do peptídeo $V_{Penetratina}$ em células CHO-K1 e MCF-7. ....	91
Figura 44 – Quantificação do peptídeo $V_{RW9}$ em células CHO-K1 e MCF-7.....	92
Figura 45 – Quantificação do peptídeo $V_{R9}$ em células CHO-K1 e MCF-7. ....	92

Figura 46 – Resultado das internalizações dos CPP's (BiotO <sub>2</sub> Gly <sub>4</sub> CPP-NH <sub>2</sub> ) em células CHO-K1 e MCF-7.....	93
Figura 47 – Quantificação do peptídeo C1 em células CHO-K1.....	94
Figura 48 – Quantificação do peptídeo C2 em células CHO-K1.....	95
Figura 49 – Quantificação do peptídeo C3 em células CHO-K1.....	95
Figura 50 – Resultado das internalizações dos peptídeos conjugados em células CHO-K1.....	96
Figura 51 – Quantificação do peptídeo C1 em células MCF-7.....	97
Figura 52 – Quantificação do peptídeo C2 em células MCF-7.....	98
Figura 53 – Quantificação do peptídeo C3 em células MCF-7.....	99
Figura 54 – Resultado das internalizações dos peptídeos conjugados em células MCF-7.....	99
Figura 55 – Resultado das internalizações de todos peptídeos em células CHO-K1.....	100
Figura 56 – Resultado das internalizações de todos peptídeos em células MCF-7.....	101

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1– Aminoácidos encontrados na natureza e suas funções nos sistemas biológicos.....	8
Tabela 2 – Algumas das principais sequências peptídicas e suas aplicações nos sistemas biológicos.....	12
Tabela 3 – Exemplos de resinas utilizadas em síntese de peptídeos em fase sólida com as respectivas condições de clivagem e o grupo terminal resultante. ....	20
Tabela 4 – Rendimento final de uma síntese dependendo da eficiência dos acoplamentos parciais.....	27
Tabela 5 – As principais sequências peptídicas de CPP's e a fonte de origem.....	32
Tabela 6 – Protocolo de lavagem e remoção dos fragmentos das células. ....	60
Tabela 7 – Ajuste do protocolo de lavagem. ....	62
Tabela 8 – Dados detalhado das análises de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF e CLAE. ....	64
Tabela 9 – Contagem de células MCF-7 após um e dois dias de replicagem. ....	84

**LISTA DE ESQUEMAS**

Esquema 1 – Formação de um peptídeo pela junção de dois resíduos de aminoácidos. a) Representa a reação de condensação entre o grupo $\alpha$ -amino de um resíduo de aminoácido com o grupo $\alpha$ -carboxila de outro resíduo de aminoácido; b) Representa a formação de um peptídeo através da ligação dissulfeto que ocorre entre dois resíduos de cisteína. .	5
Esquema 2 – Proposta para a reação de Theodor Curtius. ....	13
Esquema 3 – Preparação de cloretos de aminoácidos proposto por Fisher.....	14
Esquema 4 – Procedimento geral da Síntese de peptídeos em Fase Sólida. ....	18
Esquema 5 – Síntese de peptídeos via estratégia Boc. ....	24
Esquema 6 – Ativação da carbonila do Fmoc-aminoácido.....	25
Esquema 7 – Síntese de peptídeos via estratégia Fmoc. ....	26



## PEPTÍDEOS SINTETIZADOS

### 1. O peptídeo ER $\alpha$ 17p e seus derivados

- **P1** - ER $\alpha$ 17p-OH  $\Rightarrow$  H-PLMIKRSKKNLALSALT-OH
- **P2** - Ac-ER $\alpha$ 17pC-NH<sub>2</sub>  $\Rightarrow$  Ac-PLMIKRSKKNLALSALTC-NH<sub>2</sub>
- **P3** - BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-ER $\alpha$ 17p-OH
- **P4** - BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-ER $\alpha$ 17p-C-NH<sub>2</sub>
- **PD** - BiotinO<sub>2</sub>-G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>-ER $\alpha$ 17p-C-NH<sub>2</sub>

### 2. Os CPP's

- **V1** – Ac-Pénétratine-NH<sub>2</sub>  $\Rightarrow$  Ac-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH<sub>2</sub>
- **V2** – Ac-RW<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>  $\Rightarrow$  Ac-RRWRRRWR-NH<sub>2</sub>
- **V3** – Ac-R<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>  $\Rightarrow$  Ac-RRRRRRRRR-NH<sub>2</sub>
- **V4** – Ac-C-Pénétratine-NH<sub>2</sub>  $\Rightarrow$  Ac-Cys(NPys)-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH<sub>2</sub>
- **V5** – Ac-C-RW<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>  $\Rightarrow$  Ac-Cys(NPys)-RRWRRRWR-NH<sub>2</sub>
- **V6** – Ac-C-R<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>  $\Rightarrow$  Ac-Cys(NPys)-RRRRRRRRR-NH<sub>2</sub>

### 3. Peptídeos conjugados

- **C1** – (**P4** – **V4**) BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-ER $\alpha$ 17p-C-NH<sub>2</sub>-Ac-C-Pénétratine-NH<sub>2</sub>

BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-PLMIKRSKKNLALSALTC-NH<sub>2</sub>

S  
|  
S  
Ac-C-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH<sub>2</sub>

- **C2 – (P4 – V5)** BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-ERα17p-C-NH<sub>2</sub>-Ac-C-RW<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>

BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-PLMIKRSKKNLALS~~L~~SLTC-NH<sub>2</sub>

**S**  
**I**  
**S**  
Ac-C-RRWWRRWRR-NH<sub>2</sub>

- **C3 – (P4 – V6)** BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-ERα17p-C-NH<sub>2</sub>-Ac-C-R<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>

BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-PLMIKRSKKNLALS~~L~~SLTC-NH<sub>2</sub>

**S**  
**I**  
**S**  
Ac-C-RRRRRRRRR-NH<sub>2</sub>

## ABREVIATÓES

Boc - Radical tert-butiloxicarbonila

BSA - Albumina Bovina Sérica

CCK8 – Cell Counting Kit-8

CHO-K1 - Linha de célula cancerígena derivadas de tecido epitelial do ovário

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CPP - Peptídeo Penetrante em Células

DCC - Diciclohexilcarbodimida

DIEA - N,N-diisopropiletilamina

DTT - Di-tiotréitol

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ER $\alpha$ + - Receptor de estrogênio positivo

ER $\alpha$ 17p - Sequência peptídica P<sub>(295)</sub>LMIKRSKKNLALS<sub>(311)</sub>LT

Fmoc - 9-fluorenil-metiloxicarbonila

HEPES – Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazina-1-il]etanosulfônico

HBTU - 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-luronium hexafluorofosfato

HBSS - Solução de sal Hank's Balanced

HCCA - Ácido- $\alpha$ -ciano-4-hidroxiamino

HD - Homeodomínio

HOBt - Hidroxibenzotriazole

MALDI TOF - Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry

MeOH - Metanol

Me<sub>2</sub>S - Dimetilsulfureto

MBHA - Resina Sal de 4-Metil-benzidrilamina hidrocloreto

MCF-7 - Linha de célula cancerígena extraída de tecido epitelial mamária

NMP - N-metil-2-pirrolidone

PNA - Ácido nucleico peptídico

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SBF – Soro bovino fetal

SBF-D – Soro bovino fetal sem esteroides

SPFS - Síntese de peptídeo em fase sólida

TCEP - Cloridrato de Tris-(2-carboxietil)fosfina

TFMSA – Ácidotrifluorometanosulfônico

Tis – Tri-isopropilsilano

Tris – 2-amino-2-hidroximetil-propan-1,3-diol

TMSOTf - Trimetilsilil trifluorometanosulfonato

## RESUMO

SOUZA, D. P. V. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Março, 2017. **Síntese e estudo da atividade biológica do peptídeo bioativo  $ER\alpha 17p$ .** Professor Orientador: Prof. Dr. Edmilson José Maria. Professor Co-orientador: Fabienne Burlina.

O peptídeo  $ER\alpha 17p$  corresponde aos resíduos  $P_{295}LMIKRSKKNLALS_{311}$  do  $ER\alpha$ . Essa sequência peptídica é um regulador multifacetados de células cancerígenas mamária. Apresenta atividade biológica na modificação do citoesqueleto da actina, na redução da metástase, na indução da apoptose e na redução de tumores. As atividades biológicas do peptídeo  $ER\alpha 17p$  são obtidas no interior da célula, sendo necessário transpassar a membrana plasmática.

Ao conjugar o peptídeo  $ER\alpha 17p$  aos CPP's Penetratina,  $RW_9$  e  $R_9$  a sequência peptídica bioativa foi detectada no interior celular em maior concentração e apresentou atividade biológica de toxidez. O peptídeo C1 apresentou melhor desempenho nos estudos de internalização e os efeitos biológicos estudados apresentaram melhores resultados.

A sequência peptídica dos CPP's interfere na passagem do peptídeo conjugado para o interior da célula. Cargas catiônicas seguidas reduzem o valor do peptídeo internalizado.

Palavras Chaves:  $ER\alpha 17p$ , CPP's, Internalização.

## ABSTRACT

SOUZA, D. P. V. University of Northern of Rio de Janeiro Darcy Ribeiro, March, 2017. **Synthesis and study of the biological activity of the bioactive peptide *ER $\alpha$ 17p***. Teacher Orientation: Prof. Dr. Edmilson José Maria. Co-counselor: Fabiene Burlina.

The *ER $\alpha$ 17p* peptide corresponds to residues P<sub>295</sub>LMIKRSKKNLALS<sub>311</sub> of the ER $\alpha$ +. This sequence is a multifaceted regulator of mammary cancer cells. It demonstrates biological activity in modifying the actin cytoskeleton, reducing metastasis, inducing apoptosis and reducing tumors. The biological activities of the *ER $\alpha$ 17p* peptide are obtained intracellularly, it being necessary to traverse the plasma membrane.

When conjugating the peptide *ER $\alpha$ 17p* to CPPs *Penetratina*, *RW<sub>9</sub>* and *R<sub>9</sub>* the bioactive sequence was detected intracellularly in greater quantity and presented biological activity of cytotoxicity. The peptide C1 presented greater quantification of the internalization studies and the effects of studied biological presented better results

The peptide sequence of the CPPs interferes in traverse of the conjugated peptide to into the cell. Cationic charges together reduce the amount of the internalized peptide.

Keys Words: *ER $\alpha$ 17p*, CPP's, Internalization.

## **1. APRESENTAÇÃO**

## APRESENTAÇÃO DOS ESTUDOS

Este trabalho foi financiado pela CAPES com uma bolsa na modalidade de doutorado sanduíche por um período no exterior de um ano em colaboração entre as universidades *Université Pierre e Marie Curie – UPMC* – localizada em Paris/França e a *Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF* – localizada em Campos dos Goytacazes/Brasil.

O tema proposto é uma das linhas do grupo de pesquisas do laboratório de biomoléculas da *UPMC*. A Dr<sup>a</sup>. Fabienne Burlina, co-orientadora deste trabalho, desempenha como atividade principal a execução dos testes biológicos de toxidez, proliferação e internalização no grupo de pesquisa.

O projeto teve a colaboração do Dr. Yves Jacquot, que trabalha com a síntese de peptídeos do grupo de pesquisa do laboratório de biomoléculas da *UPMC*. Este pesquisador recentemente identificou o peptídeo *ER $\alpha$ 17p*, uma sequência de 17 aminoácidos localizados na região “*hinge*” do receptor de estrogênio ER $\alpha$  que apresenta atividades biológicas em células cancerígenas e foi a sequência de estudo desse trabalho.

As sínteses dos peptídeos foram desenvolvida em conjunto com o Dr Cillian Byrne que auxiliou o trabalho de laboratório e a interpretação dos resultados obtidos em cada síntese.

O aperfeiçoamento dos estudos concernentes ao mecanismo de ação do *ER $\alpha$ 17p* em células cancerígenas mamárias e de ovário foi desenvolvido em conjunto com Françoise Illien que auxiliou no cultivo e preparo das células.

Durante o doutorado sanduíche o laboratório acolhedor exigiu a minha frequência e participação nas reuniões do grupo de pesquisa. Foram realizadas apresentações esporádicas nas reuniões de grupo para expor e debater as propostas do trabalho e os resultados preliminares e na conclusão do estágio foi entregue um relatório com todos os resultados obtidos.



## INTRODUÇÃO

O termo receptor de estrogênio positivo ( $ER\alpha+$ ) exprime a capacidade de um grupo de células agir como um receptor do hormônio feminino estrogênio (BURLINA et al., 2005).

O peptídeo *ER $\alpha$ 17p* corresponde a uma sequência peptídica localizada na região *hinge* do receptor de estrogênio ( $ER\alpha$ ), os resíduos P<sub>(295)</sub>LMIKRSKKNLSLALSLT<sub>(311)</sub>. Essa sequência tem sido estudada a fim de verificar as atividades biológicas relacionada ao  $ER\alpha+$  (BURLINA et al., 2005).

Os efeitos do peptídeo *ER $\alpha$ 17p* em células cancerígenas é dependente do tipo celular e das condições de cultura. As células epitelial mamárias, MCF-7, e epitelial do ovário, CHO-K1 são exemplos de  $ER\alpha+$  e a sequência peptídica apresenta atividade biológica (PELEKANOU et al., 2011; KAMPA et al., 2011).

Os estudos dos efeitos do *ER $\alpha$ 17p* em células cancerosas demonstram que essa sequência apresenta efeitos biológicos na modificação do citoesqueleto nos microfilamentos da actina; no potencial metastático em câncer de mama; na indução da apoptose; e na regressão de tumores mamários (PELEKANOU et al., 2011; KAMPA et al., 2011).

A primeira etapa de trabalho consistiu na síntese do peptídeo *ER $\alpha$ 17p* e de seus derivados; na síntese dos CPP's; e na conjugação dos CPP's aos peptídeo *ER $\alpha$ 17p*. O peptídeo conjugado potencializa a passagem pela membrana plasmática e aumenta a estabilidade no interior celular.

A segunda etapa desse trabalho consistiu no aperfeiçoamento dos estudos concernentes ao mecanismo de ação do *ER $\alpha$ 17p* em células mamárias cancerígenas. Esse trabalho estudou a capacidade do peptídeo *ER $\alpha$ 17p* transpor células MCF-7 e CHO-K1 e os efeitos biológicos de toxidez e proliferação.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **CAPÍTULO I**

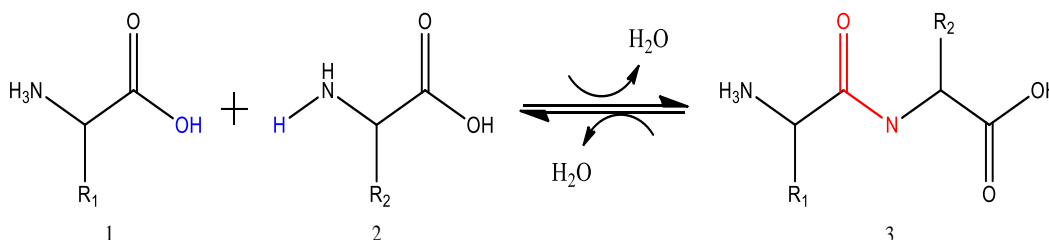
### **2.1. PEPTÍDEOS: DEFINIÇÃO E SÍNTESE**

### 2.1.1. Os Peptídeos

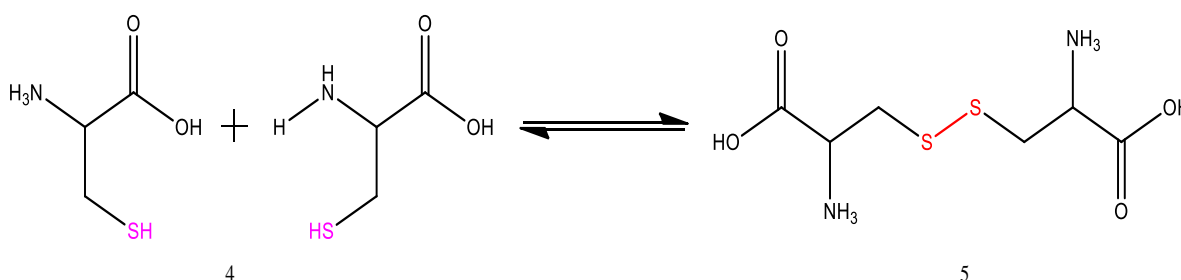
Os peptídeos são biomoléculas formadas pela união de dois ou mais aminoácido. O termo “*resíduo de aminoácido*” ou apenas “*resíduo*” é utilizado para indicar que os aminoácidos estão unidos pela ligação peptídica (NELSON; COX, 2008).

A ligação peptídica é formada por uma reação de condensação entre o grupamento  $\alpha$ -carboxila (**1**) de aminoácido com o grupamento  $\alpha$ -amino (**2**) de outro aminoácido por uma ligação covalente que forma uma ligação amida substituída (**3**) (**Esquema 1.a**). Em sequências peptídicas contendo pares do resíduo cisteína forma uma ligação dissulfeto (**S-S**) entre os resíduos e como produto o peptídeo cistina (**5**) (**Esquema 1.b**) (NELSON; COX, 2008).

#### a. Ligação Peptídica



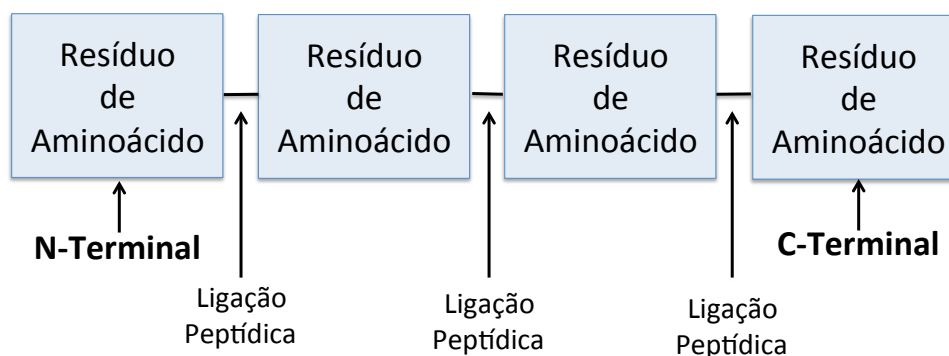
#### b. Peptídeo Cistina



**Esquema 1** - Formação de um peptídeo pela junção de dois resíduos de aminoácidos. a) Representa a reação de condensação entre o grupo  $\alpha$ -amino de um resíduo de aminoácido com o grupo  $\alpha$ -carboxila de outro resíduo de aminoácido; b) Representa a formação de um peptídeo através da ligação dissulfeto que ocorre entre dois resíduos de cisteína.

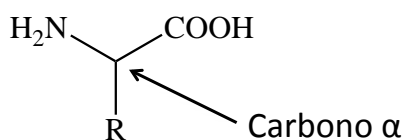
Em um peptídeo o resíduo de aminoácido de extremidade com o grupo  $\alpha$ -amino livre é denominado resíduo aminoterminal (*N-terminal*), enquanto o resíduo de

extremidade com o grupo carboxila livre é denominado carboxiterminal (C-terminal) (**Figura 1**) (NELSON; COX, 2008).



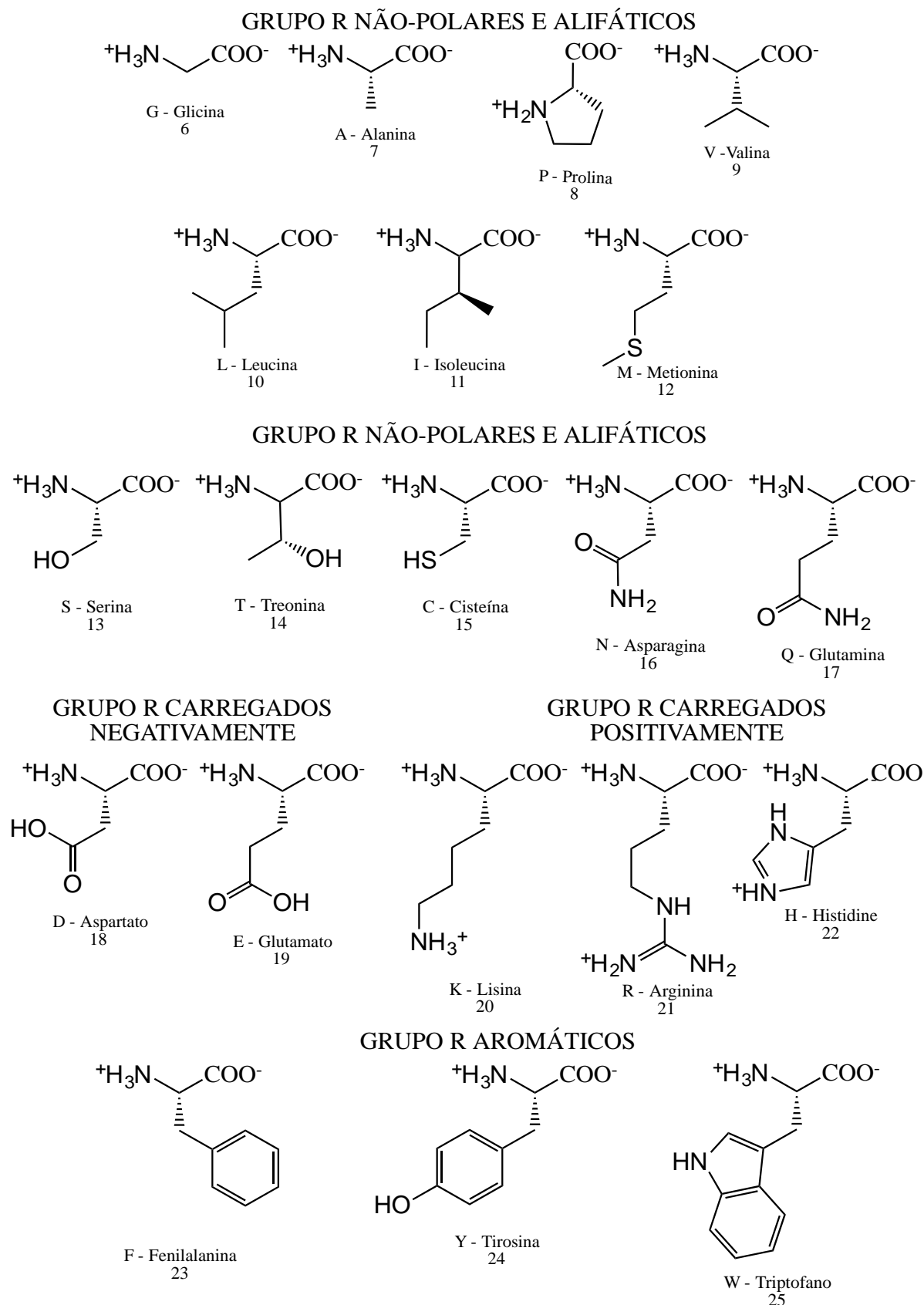
**Figura 1** - Os resíduos N-terminal e C-terminal em um peptídeo.

Na natureza são comumente encontrados 20 aminoácidos e são chamados de aminoácidos essenciais ou aminoácidos naturais por apresentarem características estruturais comuns. São os principais constituintes das biomoléculas; são  $\alpha$ -aminoácidos, pois contem um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono, o carbono  $\alpha$ ; com exceção da glicina o átomo de carbono  $\alpha$  é um centro quiral; e nos sistemas biológicos a forma estereoisomérica L-aminoácido é predominante (**Figura 2**) (NELSON; COX, 2008).



**Figura 2** - Átomo de carbono  $\alpha$ .

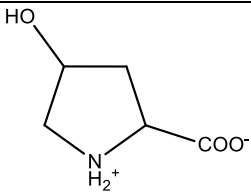
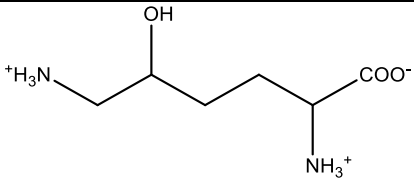
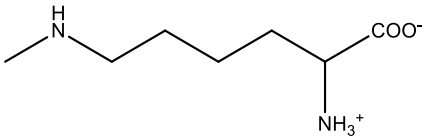
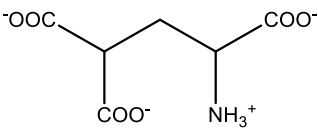
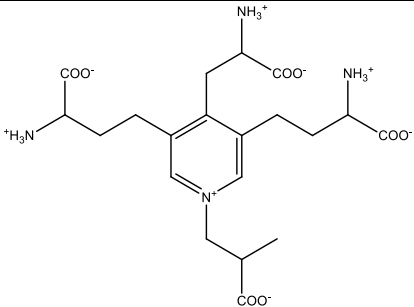
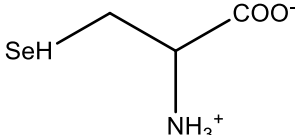
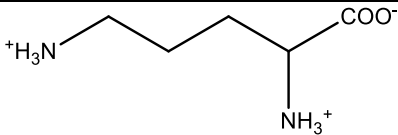
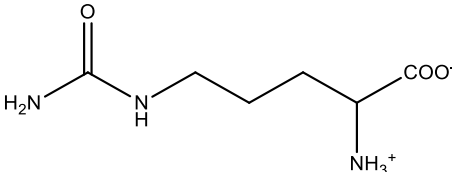
Os aminoácidos essenciais são classificados em 5 grupos de acordo com o radical da cadeia lateral (**R**) do carbono  $\alpha$ , os alifáticos não polares, os aromáticos, os não carregados polares, os carregados positivamente e os carregados negativamente. (**Figura 3**) (NELSON; COX, 2008).



**Figura 3** - Os 20 aminoácidos comumente encontrados nas proteínas. Nos organismos vivos estão presentes na forma de L-aminoácidos (NELSON; COX, 2008).

Além dos aminoácidos essenciais existem cerca de 300 aminoácidos encontrados nas células que desempenham funções importantes nos sistemas biológicos, os principais estão descritos na tabela abaixo (**Tabela 1**) (LIMA, 2013; NELSON; COX, 2008).

**Tabela 1-** Aminoácidos encontrados na natureza e suas funções nos sistemas biológicos.

Nome	Estrutura	Características
4-hidroxiprolina		É derivado da prolina e está presente em proteínas da parede celular das plantas e no colágeno.
5-hidroxislisina		É proveniente da lisina e constitui a estrutura do colágeno.
6-N-metil-lisina		É oriundo da lisina e constitui a miosina, uma proteína contrátil do músculo.
carboxiglutamato		É derivado do glutamato e se encontra na protombina, protepina de coagulação do sangue.
Desmosina		Tem como precursor a lisina e se encontra na constituição da elastina, proteína fibrosa.
Selenocisteína		É um resíduo de aminoácido raro derivado da serina que é introduzido durante a síntese de proteínas.
Ornitina		São intermediários chaves na biossíntese da arginina e no ciclo da ureia. Não constituem proteínas
Citrulina		

A união dos aminoácidos dá origem aos peptídeos ou proteínas. É comum usar o termo peptídeo para referir a uma proteína, porém esses dois grupos de moléculas se distinguem pela estrutura terciária. Os peptídeos em solução aquosa não possuem uma estrutura terciária definida. Já as proteínas, a estrutura terciária é definida em solução aquosa (BAILEY, 1990).

As sequências peptídicas apresentam cadeias lineares; semicírculos, em peptídeos contendo ligações dissulfetos; e cíclicas, ao ocorrer a ligação entre os grupos *N*-Terminal e *C*-terminal em uma mesma sequência peptídica. Algumas sequências podem conter um ácido piroglutâmico como resíduo *N*-terminal e conter *D*-aminoácidos e/ou aminoácidos incomuns em sua constituição (MACHADO et al., 2004).

Essas diferenças tornam os peptídeos quimicamente mais versáteis que as proteínas, por possibilitar que reações secundárias ocorram na cadeia peptídica. Os resíduos de aminoácidos podem ser aminados ou esterificados nos resíduos *C*-terminal; acetilados nos resíduos *N*-Terminal e *C*-terminal; e fosforilados ou sulfatados em resíduos de serina, treonina ou tirosina (BAILEY, 1990).

### **2.1.2. Aplicação dos Peptídeos**

O principal interesse em estudar os peptídeos relaciona com as propriedades farmacológicas que esse grupo de substâncias desempenha e por serem produzidos por todos os seres vivos. Os peptídeos têm sido isolados de glândulas de vertebrados, bactérias, fungos, insetos, pele de anfíbios, plantas e venenos de serpentes. Exercem funções de mensageiro químico, hormonais, mediadores intra- ou extra-celular, ação antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, estimuladores e inibidores celulares altamente específicos e ação no sistema nervoso central (MACHADO et al., 2004).

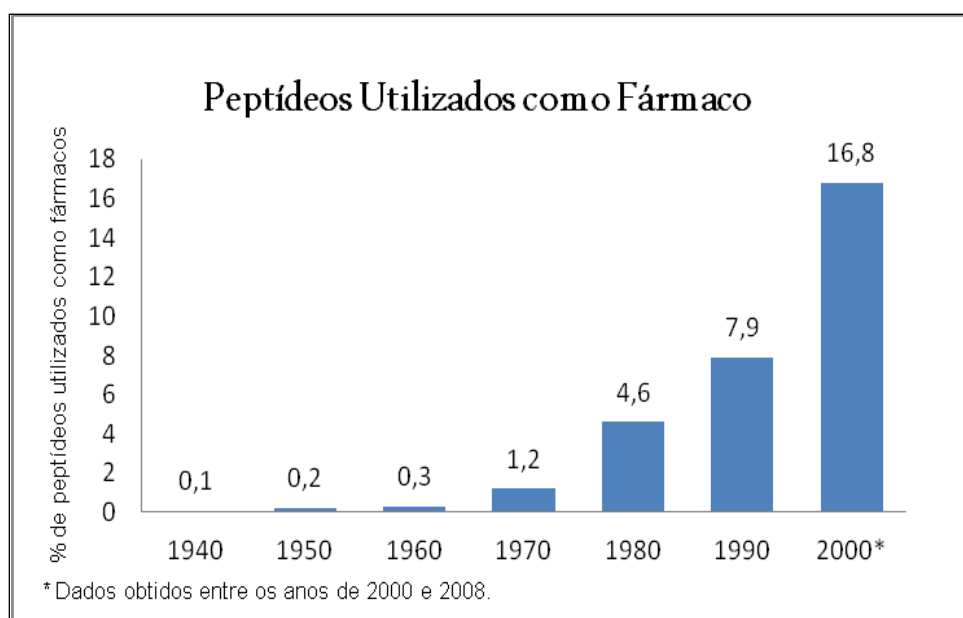
No geral, as fontes naturais apresentam baixas concentrações dos peptídeos, o que dificulta os processos para isolar massas suficiente para estudos biológicos e



modo de ação, determinação estrutural, estereoquímica e o uso como um fármaco (BAILEY, 1990).

Tem sido investigado o potencial farmacológico dos peptídeos há anos, porém o uso dos peptídeos como fármaco ganhou representatividade após a década de 80, com a evolução da síntese de peptídeos que ocorreu após a segunda Guerra mundial (**Figura 4**) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011; REICHERT, 2010).

A Fundação Terapêutica de Peptídeos publicou no ano de 2010 a crescente evolução do uso de peptídeos como fármaco. Esse crescimento acompanhou a evolução da síntese de peptídeos (REICHERT, 2010).



**Figura 4** - Porcentagem de utilização dos peptídeos como fármaco entre os anos de 1940 e 2008 (REICHERT, 2010).

No ano de 2016 a publicação da *Fundação Terapêutica de Peptídeos* expõe que os peptídeos são alvo constantes nos estudos e desenvolvimento de novos fármacos, principalmente na área da oncologia (**Figura 5**) (PEPTIDE THERAPEUTIC FOUNDATION, 2017; LAU; DUNN, 2016).

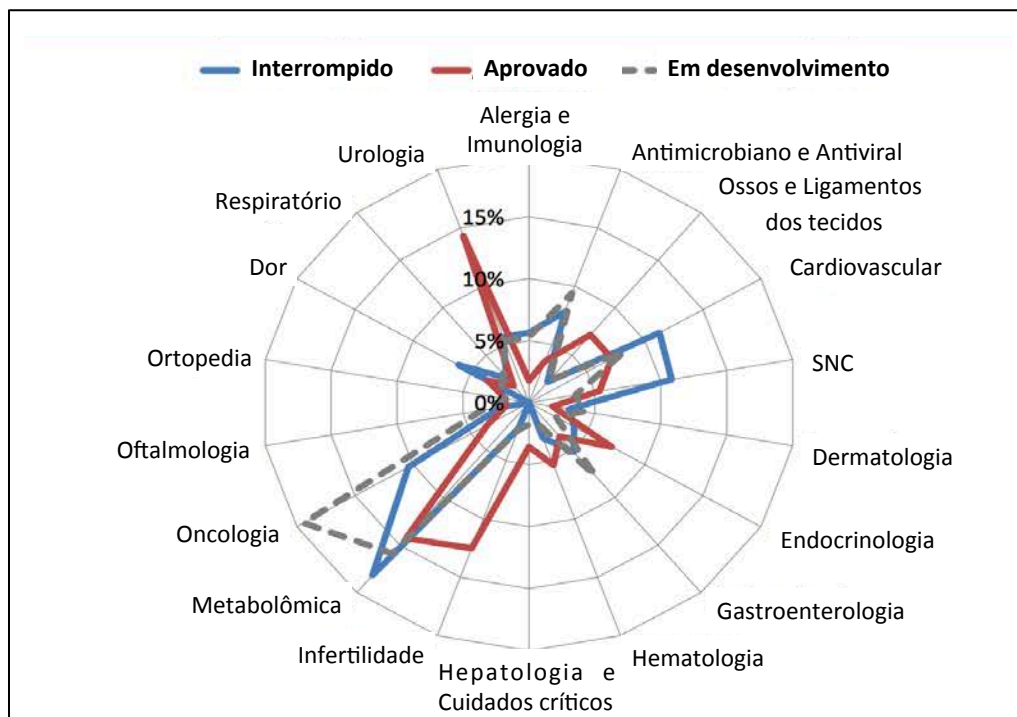


Figura 5 – O uso de peptídeos no desenvolvimento de novos fármacos (LAU; DUNN, 2016).

Outro fator importante é o desenvolvimento de peptídeos conjugados nos estudos clínicos dos peptídeos. Na década de 80 foram registrados 14% dos estudos clínicos com uso de peptídeos conjugados, no período de 2010 à maio de 2016 foram registrados 21% dos estudos clínicos com uso de peptídeos conjugados (Figura 6) (PEPTIDE THERAPEUTIC FOUNDATION, 2017; LAU; DUNN, 2016).

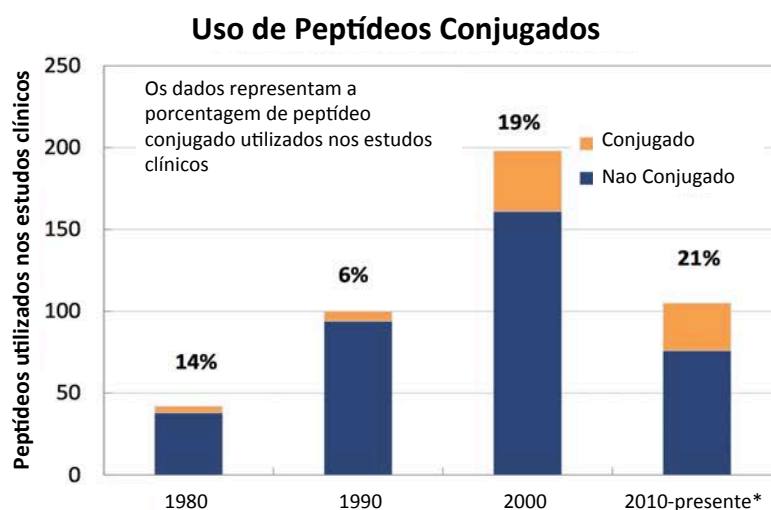


Figura 6 - Porcentagem de utilização dos peptídeos conjugados em casos clínicos (LAU; DUNN, 2016).

Algumas sequências peptídicas desempenham ações importantes nos sistemas biológicos e são comumente utilizadas como fármacos importantes (**Tabela 2**) (LIMA, 2013; ALLES, 2005; MACHADO et al., 2004; WIELAND, 1995).

**Tabela 2** - Algumas das principais sequências peptídicas e suas aplicações nos sistemas biológicos.

Nome	Sequência	Função
Angiotensina II	N-R-V-Y-I-H-P-F	Hormônio hipertensor.
$\alpha$ -Conotoxina Iml	ciclo(2-8,3-14)G-C-C-S-N-P-R-C-A-TW-R-C-NH <sub>2</sub>	Bloqueador do receptor nicotínico de acetilcolina no sistema nervoso central.
Oxitocina	ciclo(1-6)C-Y-I-G-N-C-P-L-G	Estimula contrações uterinas e o processo de lactação.
Enkefalinas	T-G-G-F-M T-G-G-G-L	Indução de analgesia em células do cérebro.
Grelina	G-S-S-F-L-S-P-E-H-Q-R-V-Q-Q-R-K-Q-S-K-K-Q-Q-P-P-A-L-K-E-P-R	Hormônio gastrointestinal estimulador da liberação do hormônio de crescimento e relacionado ao controle da ingestão de alimentos.
Vasopressina*	ciclo(1-6)C-Y-I-G-N-C-P-R-G	Ação anti-diurética.
Insulina	G-I-V-E-Q-C-C-T-S-I-C-S-L-Y-Q-L-E-N-I-C-N	Controle da glicose
Glucagon	H-S-Q-G-T-F-T-S-D-I-S-K-Y-L-D-S-R-R-A-Q-D-F-V-Q-W-L-M-N-T	

\* Existem três análogos da vasopressina. A arginina-vasopressina (AVP) é encontrada em humanos, a lisina-vasopressina (LVP) é encontrada em hipopótamos e a fenilpressina (FVP) é encontrada em araras australianas e todas desempenham a mesma função.

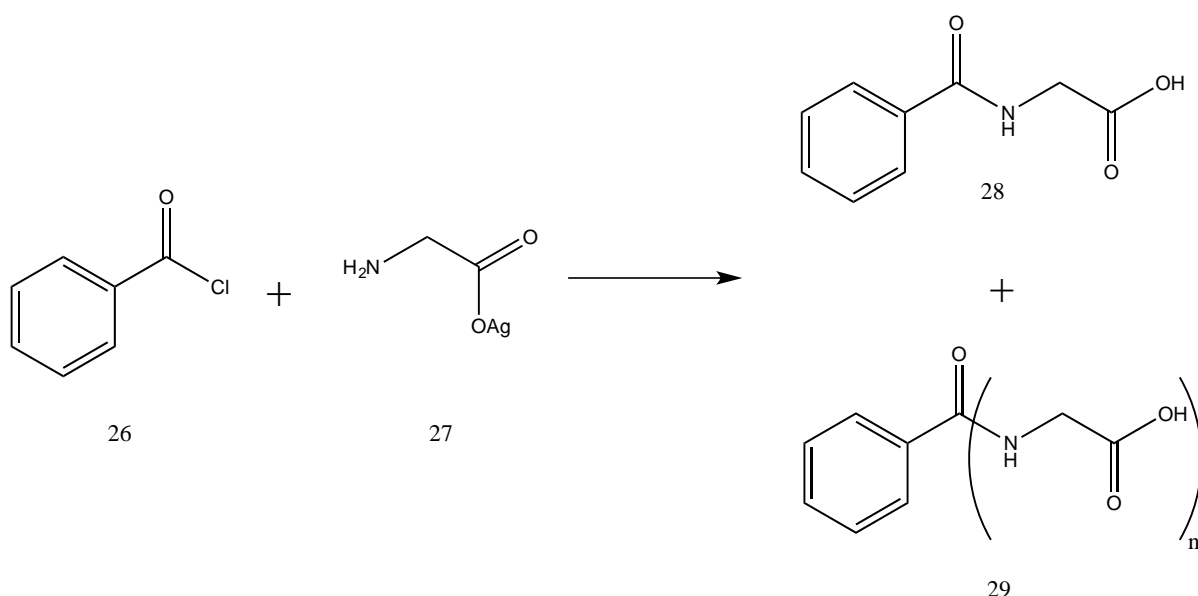
A versatilidade e o potencial dos peptídeos para serem utilizados como fármacos fez necessário o aprimoramento de métodos sintéticos que permitissem obter grandes massas dos peptídeos com pureza elevada (BAILEY, 1990; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

### 2.1.3. A Síntese dos Peptídeos

Os estudos sobre peptídeos iniciaram por John Dalton entre os anos de 1808 e 1810 a partir da necessidade de conhecer as fórmulas estruturais das proteínas e

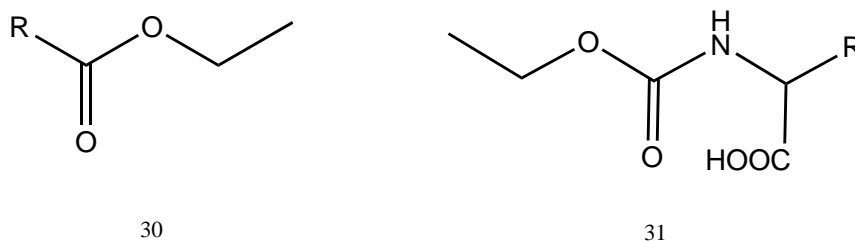
pelo início da descoberta dos aminoácidos, asparagina (**16**) em 1806, cisteína (**15**) em 1810 e glicina (**6**) em 1820 (JULIANO, 1990).

Porém, os primeiros relatos da síntese de peptídeos foram registrados por Theodor Curtius em 1881. Curtius reagiu cloreto de benzoíla (**26**) com glicina-prata (**27**) e obteve o ácido hipúrico (**28**) e alguns produtos indesejáveis (**29**) que continham mais de uma glicina acoplada ao grupo de benzoíla, formando um benzoil-peptídeo (**Esquema 2**). Nesse momento essa síntese de peptídeos foi fracassada, pois Curtius não conseguiu remover o grupo protetor benzoíla e isso impossibilitou o alongamento da cadeia (WIELAND, 1995).



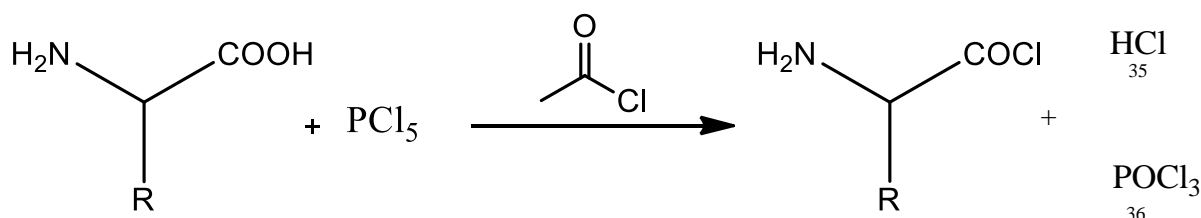
**Esquema 2** – Proposta para a reação de Theodor Curtius.

Em 1889, Emil Fisher concedeu uma importante contribuição à química de peptídeos. Sugeriu usar o grupo etoxicarbonila (**30**) para proteger o grupamento amino dos aminoácidos, pois esse grupo é facilmente removido com amônia ou bases inorgânicas. Essa metodologia converteu os N-carbetoxipeptídeos (**31**) em derivados da ureia (**Figura 7**) (WIELAND, 1995).



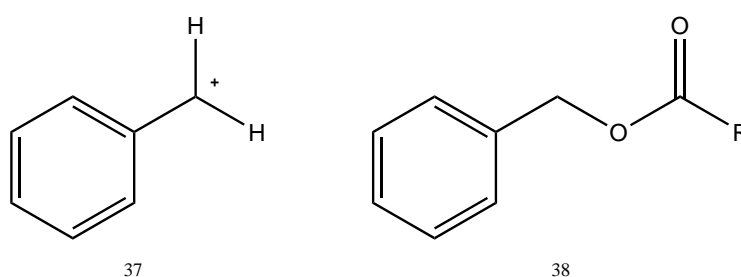
**Figura 7** – Estruturas utilizadas por Emil Fisher.

Fisher iniciou um trabalho de preparação de cloretos de aminoácidos que poderiam ser acoplados a ésteres de aminoácidos em solvente não aquoso para obter peptídeos de grupamento amino livre e possibilitar o alongamento da cadeia (**Esquema 3**) (WIELAND, 1995; JULIANO, 1990).



**Esquema 3** - Preparação de cloretos de aminoácidos proposto por Fisher.

Essa metodologia possibilitou nova descoberta relacionada com a investigação de um novo grupo protetor. Max Bergmann e Leonidas Zervas trocaram o grupo etoxicarbonila (**30**) pelo grupo benzila (**37**), formando o benziloxicarbonila (**38**) que é removido por hidrogenação catalítica para a formação do tolueno, CO<sub>2</sub> e aminoácido livre (**Figura 8**) (RUIZ, 2003).



**Figura 8** – Grupo protetor utilizado por Max Bergmann e Leonidas Zervas.

No período da segunda guerra mundial grupos de pesquisas foram formados com intuito de desenvolver novas técnicas para a detecção, purificação e análise

estrutural de peptídeos. Após esse período, surgiram novas metodologias e foram aprimoradas as investigações sobre os grupos protetores (JULIANO, 1990).

A descoberta de uma substância ativa era realizada praticamente por meio de abordagens empíricas e básicas, uma vez que os compostos eram sintetizados, ou obtidos muitas vezes a partir de fontes naturais, e eram testados, tanto *in vitro* como *in vivo*, de forma randomizada o que necessitava de grande massa dos produtos (RUIZ, 2003; JULIANO, 1990).

Os avanços alcançados após este período aprimorou a síntese de peptídeo. Conseqüentemente potencializou a busca por novas substâncias com atividade terapêutica (CRAIK, 2013). As melhorias permitiram desenvolver metodologias para a obtenção dos peptídeos em processos químicos: com a síntese orgânica clássica de peptídeos e a síntese de peptídeo em fase sólida/SPFS, que será detalhada nesse trabalho por ser a metodologia adotada para a obtenção dos peptídeos; e em processos biológicos, com a síntese enzimática e a síntese via DNA-recombinante (JULIANO, 1990).

#### 2.1.3.1. Síntese Orgânica Clássica de Peptídeos

Síntese orgânica clássica, síntese química ou síntese em solução representa a metodologia que utiliza métodos e técnicas convencionais da síntese orgânica. Essa metodologia se desenvolveu durante a II Guerra mundial com o aperfeiçoamento e advento dos métodos clássicos de purificação, degradação e análises na química orgânica (RUIZ, 2003; JULIANO, 1990).

No geral essa metodologia ocorre com o uso de reagentes químicos para ativar a carbonila do aminoácido que funcionará com doador de grupos acila para a formação da ligação peptídica. Nessa metodologia a síntese orgânica é realizada em solução, ou seja, todos os componentes encontram-se devidamente solubilizados e em pleno contato com o solvente (MARQUERDT; EIFLER-LIMA, 2001).

A reação é monitorada e após certo período de tempo, certifica-se que a reação atingiu seu término com o auxílio das técnicas de análises de Cromatografia

em Camada Delgada, Espectroscopia de Ressonância Magnética nuclear ou no Infra Vermelho. Em seguida começa um processo de purificação que pode ser mais demorado que a própria etapa da síntese (RUIZ, 2003; MARQUERDT; EIFLER-LIMA, 2001).

Na síntese química é comum obter gama variada de produtos secundários devido às reações paralelas e/ou as reações de degradações. O que implica no uso de uma ou mais técnicas de purificação, tais como, extração, Cromatografia em Coluna, cristalização, destilação e outras técnicas (MARQUERDT; EIFLER-LIMA, 2001).

Isso acarreta em um baixo rendimento no processo final da síntese. Primeiramente, o emprego de diversas técnicas favorece a perda de produto devido à própria rotina de trabalho, com a impossibilidade de recuperação total do mesmo após uma etapa de purificação. A demora na remoção do produto do meio reacional pode também levar a uma degradação do mesmo, devido o contato com o ar, exposição à luz, reação com produtos secundários ou restos de reagentes (MARQUERDT; EIFLER-LIMA, 2001; JULIANO, 1990).

O gasto de tempo ocasionado pelo processo de purificação, é uma grande desvantagem da síntese orgânica clássica; deve-se considerar o volume expressivo de solventes usada nesse processo, que ocasiona aumento de resíduos químicos no laboratório (RUIZ, 2003).

O custo financeiro para obter um peptídeo inviabiliza o uso dessa metodologia, pois é necessário diversas etapas de reações e purificações para atingir o objetivo, o que pode ocasionar um enorme prejuízo financeiro para a obtenção de produtos (RUIZ, 2003).

### 2.1.3.2. Síntese de Peptídeo em Fase Sólida - SPFS

A SPFS foi desenvolvida logo após a síntese química e foi proposta por Bruce Merrifield em 1963 como uma síntese rápida, de fácil execução e eficiente para a síntese de peptídeos e pequenas proteínas. Este projeto concedeu ao cientista o

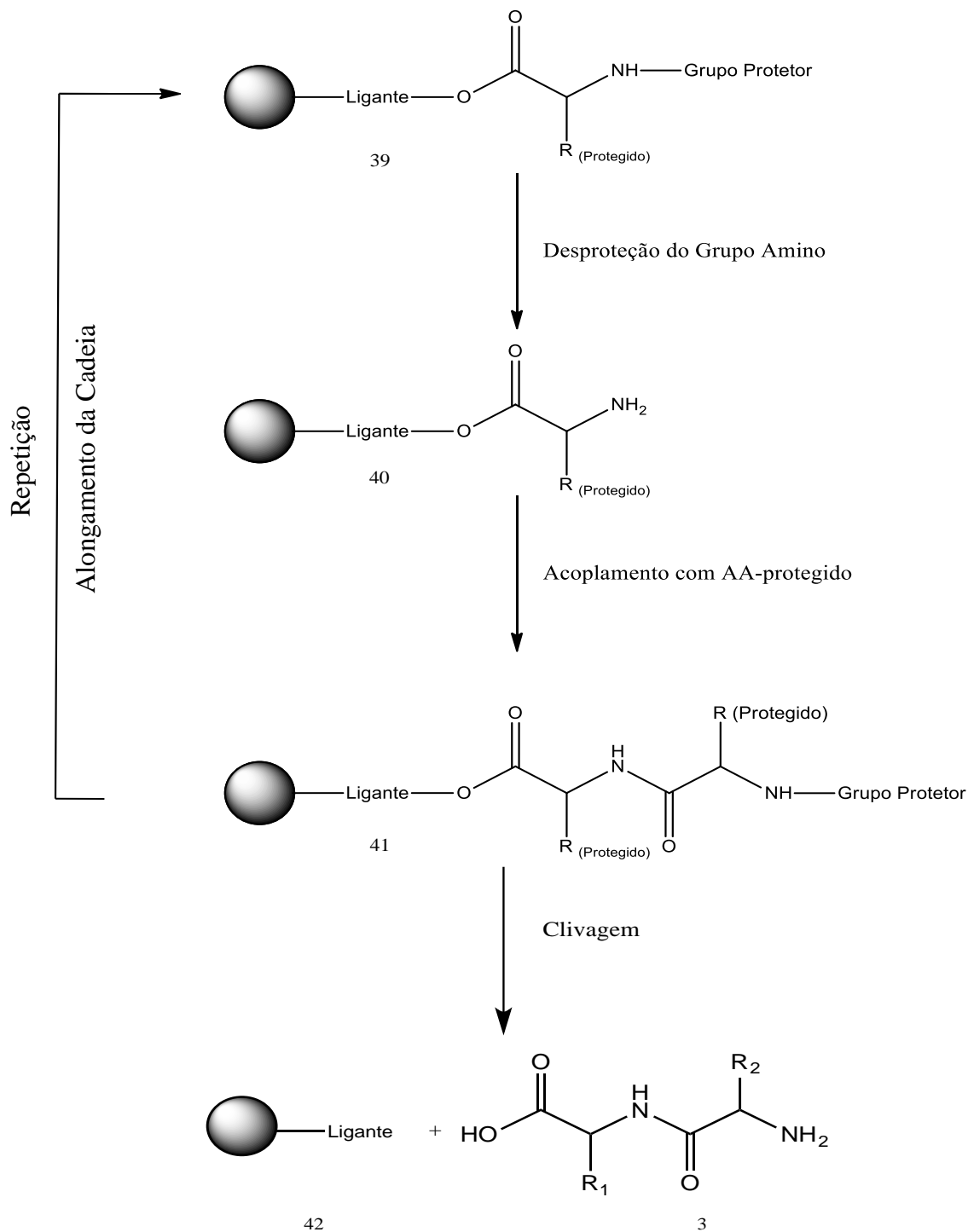
Prêmio Nobel de Química em 1984 com a síntese da bradicinina (MERRIFIELD, 1963).

Essa metodologia revolucionou a síntese orgânica por suas características peculiares, uma vez que abandonou a síntese orgânica clássica e introduziu o uso de polímeros insolúveis como suporte (JULIANO, 1990; MERRIFIELD, 1963).

Atualmente, é um dos métodos mais utilizados para a síntese de peptídeos e proteínas em laboratórios. Em comparação com a síntese orgânica clássica, essa metodologia apresenta vantagens de ter acoplamentos mais eficientes e seletivos, procedimentos simplificados nas etapas da síntese e da purificação e a possibilidade de obter peptídeos e proteínas com longa cadeia de aminoácidos (MERRIFIELD, 1974; MERRIFIELD, 1963).

Na SPFS o resíduo de aminoácido é fixado pela extremidade C-terminal à resina (**39**) que contem um grupo amino livre, halogênio ou hidroxila. O grupo amino do resíduo de aminoácido que se encontra protegido é então desprotegido (**40**) e possibilita o acoplamento a outro resíduo de aminoácido (**41**). Com sucessivas etapas de desproteção e acoplamento a cadeia peptídica é alongada e o problema de racemização é praticamente inexistente. Ao final a resina (**42**) e os grupos protetores são removidos e o peptídeo (**3**) é liberado (**Esquema 4**) (MERRIFIELD, 1974; MERRIFIELD, 1963).





**Esquema 4** – Procedimento geral da Síntese de peptídeos em Fase Sólida.

Ao desejar utilizar a SPFS com eficiência, deve-se considerar a resina, os protetores dos grupos funcionais da cadeia lateral, a proteção do grupo  $\alpha$ -amino e os reagentes para desproteger e ativar os resíduos dos aminoácidos (MERRIFIELD, 1997).

#### 2.1.3.2.1. Resinas utilizadas na SPFS

As resinas ou suporte polimérico apresentam aspectos de pequenos grãos, são permeáveis e insolúveis em solução aquosa e em solventes orgânicos. É necessário um estudo detalhado sobre a resina a ser utilizada, pois as condições de clivagem e o grupo C-terminal resultante após a clivagem é determinado pela resina utilizada (MACHADO et al., 2004).

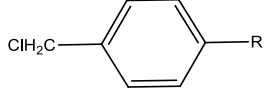
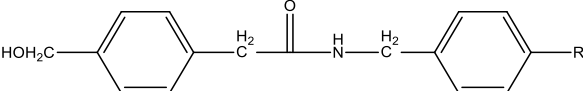
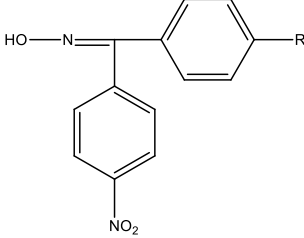
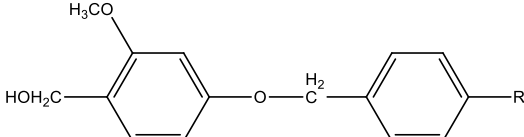
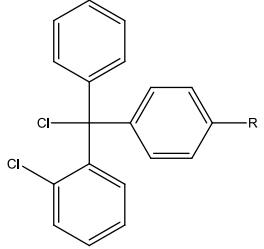
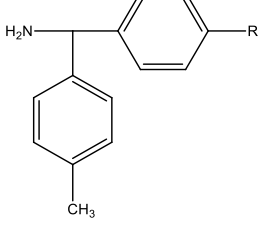
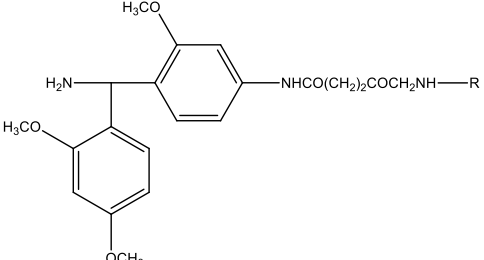
As resinas são originadas por síntese química através da polimerização de monômeros ou por modificação química de polímeros já existentes, sendo este o processo de obtenção mais utilizado. O desenvolvimento de novas resinas busca aprimorar as características básicas de descompactação frente a diversos solventes para favorecer a exposição dos ligantes, melhorar a estabilidade mecânica, tornar inertes quimicamente aos diversos tipos de reações e favorecer a reação desejada (MARQUERDT; EIFLER-LIMA, 2001).

A resina se liga covalentemente à sequência de aminoácidos até a etapa final da síntese. No geral, a clivagem peptídeo-resina geralmente é a etapa mais delicada da SPFS, a eficiência dessa etapa é influenciada pela escolha da resina e pelo primeiro aminoácido acoplado (NELSON; COX, 2008; MACHADO et al., 2004).

Em um peptídeo com resíduo C-terminal hidrofóbico a clivagem tende a ocorrer de forma mais lenta e apresentar baixo rendimento. A sequência peptídica com resíduos C-terminal hidrofílicos tem como características clivagem mais rápida e eficiente devido a estabilidade da interação resina-aminoácido (NELSON; COX, 2008).

A diversidade de substâncias utilizadas como resina empregadas na SPFS possibilita obter peptídeos de C-terminal ácido, éster ou amida em diferentes condições de clivagem (**Tabela 3**) (MACHADO et al., 2004; RUIZ, 2003; MARQUERDT; EIFLER-LIMA, 2001).

**Tabela 3** - Exemplos de resinas utilizadas em síntese de peptídeos em fase sólida com as respectivas condições de clivagem e o grupo terminal resultante.

Resina	Condições de clivagem	C-terminal resultante
 Merrifield (cloreto de metilfenila)	HF	Ácido
 PAM (ácido 4-hidroximetilfenilacético)	HF; TFMSA <sup>1</sup> ; TMSOTf <sup>2</sup>	Ácido
 KOR (oxima de 4-nitrobenzofenona)	HF; HOip <sup>3</sup> ; AA+N(nBu) <sub>4</sub> <sup>4</sup>	Ácido
	H <sub>2</sub> N-CH(R)COX <sup>5</sup>	Amida
	H <sub>2</sub> N-peptídeo-COXe	Éster
 SASRINTM (álcool 2-metoxi-4-alcóxibenzílico)	TFA diluído	Ácido
 cloreto de 2-clorotritila	TFA; AcOH	Ácido
 MBHA (4-metilbenzidrilamina)	HF; TFMSA <sup>1</sup> ; TMSOTf <sup>2</sup> ; HBr/TFA	Amida
 SAMBHA (4-succinilamino-2,2',4'-trimetoxibenzidrilamina)	TFA	Amida

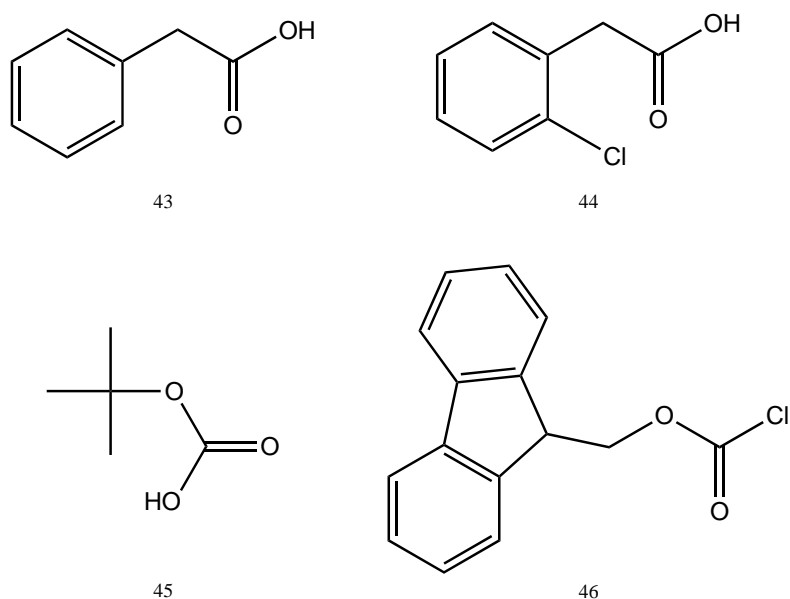
R= co-polímero de poliestireno e divinilbenzeno (1-2%); 1. ácido trifluorometanosulfônico; 2. trifluorometanosulfonato de trimetilsilila; 3. 1-hidroxipiperidina; 4.AA: aminoácido; 5.X: NH<sub>2</sub>, OR.

### 2.1.3.2.2. Grupos protetores da cadeia lateral

Na SPFS apenas um sítio específico em cada um dos aminoácidos deve estar disponível para formar uma nova ligação peptídica. Sendo obrigatório a proteção dos grupos funcionais passíveis de sofrer reações laterais (ALLES, 2005).

Os 20 aminoácidos essenciais recebem grupos protetores de acordo com a estrutura da cadeia lateral. Os aminoácidos (**Figura 3, página 7**) cisteína (**15**) e lisina (**20**) recebem proteção obrigatória; os aminoácido metionina (**12**), serina (**13**), treonina (**14**), asparagina (**16**), glutamina (**17**), aspartato (**18**), glutamato (**19**), arginina (**21**), histidina (**22**), tirosina (**24**) e triptofano (**25**), recebem proteção facultativa, porém, é recomendável que a proteção seja efetuada, pois aumenta a solubilidade em solventes orgânicos e potencializa o acoplamento; os demais aminoácidos, glicina (**6**), alanina (**7**), prolina (**8**), valina (**9**), lisina (**10**), isoleucina (**11**) e fenilalanina (**23**) e, não necessitam de proteção (ALLES, 2005).

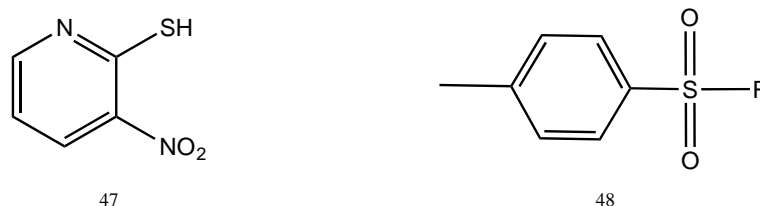
Grupos protetores derivados da uretana são as principais substâncias utilizadas na SPFS, pois minimizam consideravelmente o problema da racemização e são facilmente removidos ao final da síntese. São representantes dessa classe de grupos protetores o grupo benziloxicarbonila (Z - **43**), 2-cloro-benziloxicarbonila (2-Cl-Z - **44**), o grupo *t*-butiloxicarbonila (Boc - **45**) e o grupo 9-fluorenil-metiloxicarbonila em cloroformato (Fmoc - **46**) (**Figura 9**) (ALLES, 2005).



**Figura 9-** Grupos protetores da cadeia lateral derivados da uretanas utilizados na SPFS.

O grupo Z (**43**) possui como características a facilidade de obtenção, formação de derivados cristalinos e remoção por hidrogenação catalítica ou por acidólise com os ácidos bromídrico e acético. O grupo Boc (**45**) tem como vantagem ser facilmente removido por adição do gás cloreto de hidrogênio, HBr ou TFA e é estável sob condições de hidrogenação catalítica. O grupo Fmoc (**46**) é utilizado por ser estável em condições ácidas e a hidrogenação catalítica, a remoção deste grupo ocorre por adição de base fraca (A'IVAREZ; ALBERICIO, 2009; ISIDRO-LLOBET; ALLES, 2005).

Existem grupos protetores que não são derivados da uretanas, como por exemplo o grupo *o*-nitro-piridiltiol (NPys - **47**) que é comumente utilizado para proteger o aminoácido cisteína (**15**), o grupo tosila (Tos - **48**) utilizados como protetor do aminoácido arginina (**24**) e o grupo benzila (**37**) utilizados como protetor do aminoácido serina (**13**) (**Figura 10**) (ISIDRO-LLOBET; A'IVAREZ; ALBERICIO, 2009; ALLES, 2005).



**Figura 10-** Grupos protetores da cadeia lateral utilizados na SPFS.

#### 2.1.3.2.3. Protetores do grupo $\alpha$ -amino

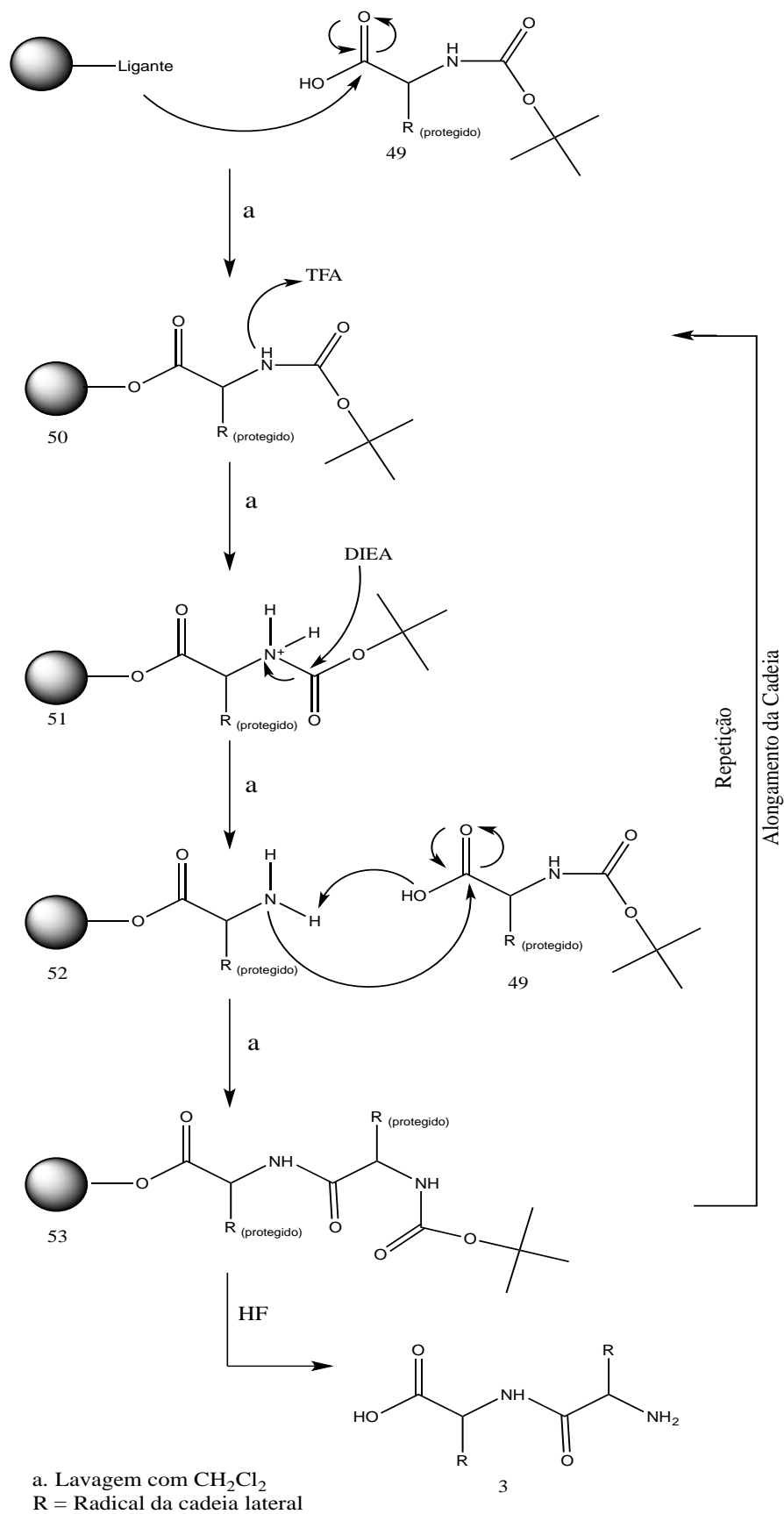
Existem dois principais protetores do grupo  $\alpha$ -amino na SPFS, o grupo protetor Boc (**45**) e o grupo protetor Fmoc (**46**), ambos utilizados nas estratégias de síntese desse trabalho (**Figura 9**) (NELSON; COX, 2008).

Cada grupo protetor necessita de condições especiais para desproteção, ativação, acoplamento e clivagem. As principais diferenças se relacionam aos reagentes necessários para serem usados na etapa de remoção do grupo protetor temporário da amina e na etapa da clivagem final dos peptídeos (ISIDRO-LLOBET; A'IVAREZ; ALBERICIO, 2009).

Na estratégia Boc, o grupo protetor temporário é estável a ação de base e nucleófilos e os grupos protetores da cadeia lateral geralmente são derivados do grupo benzila (**37**), que se mantém estável à ação dos ácidos, no geral TFA. O grupo Boc é removido com facilidade por ácidos orgânicos e inorgânicos, geralmente utiliza o TFA em duas etapas de lavagem em constante agitação para remover o grupo protetor da amina (**51**) (NELSON; COX, 2008; MACHADO et al., 2004).

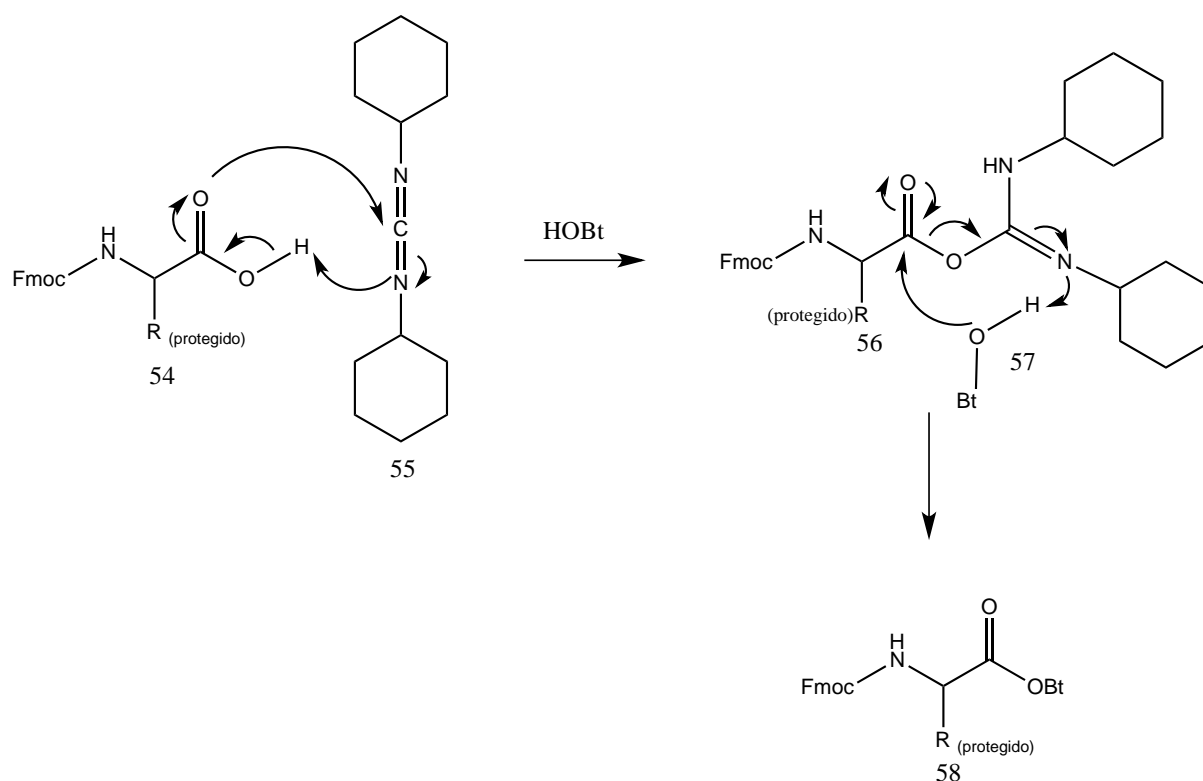
Em seguida a amina é neutralizada com ação de DIEA (**52**) que possibilita o acoplamento ao novo aminoácido (**53**). A clivagem ocorre com HF à 0°C ou com TFMSA à 25 °C, ambos na presença de reagentes sequestradores de carbocátions, “scavengers” (**Esquema 5**) (AMBLAR et al., 2006).

Os “scavengers” utilizados na clivagem em HF são os reagentes anisol (1,5 µL/mg da resina seca), Me<sub>2</sub>S (0,25 µL/mg da resina seca) e p-toluenotiol (0,30 µL/mg da resina seca) ao conter o resíduo cisteína com grupo protetor NPys na sequência peptídica (AMBLAR et al., 2006).



Esquema 5 – Síntese de peptídeos via estratégia Boc.

Na estratégia Fmoc uma reação paralela de ativação da carbonila (**54**) do resíduo que será acoplado ocorre pelo DCC (**55**) e HOBT (**57**) que possibilita o acoplamento (**Esquema 6**) (MURRAY et al., 2014; MACHADO et al., 2004).

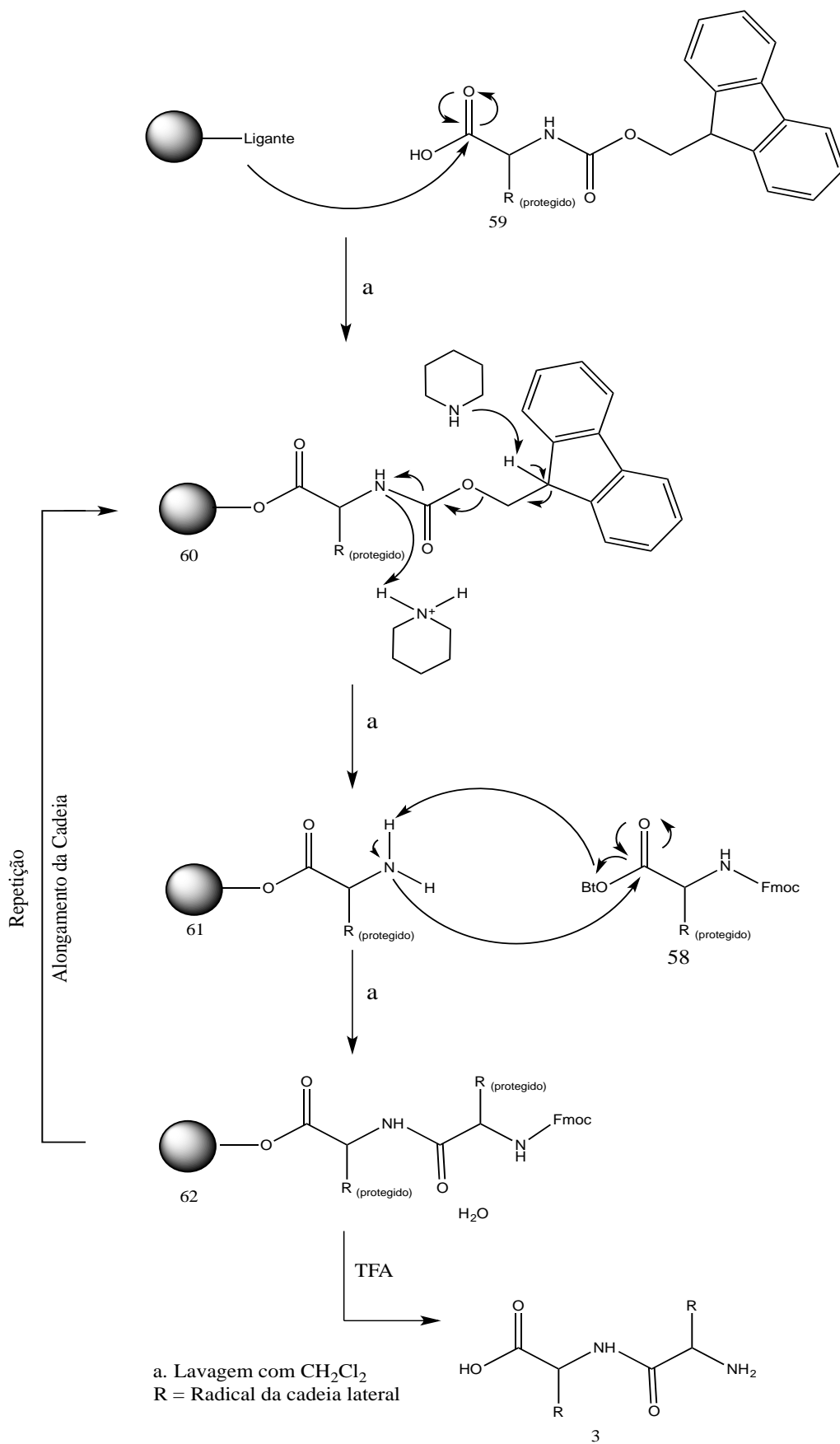


**Esquema 6** – Ativação da carbonila do Fmoc-aminoácido.

O grupo protetor temporário (**59**) é removido com a ação de base, no geral utiliza uma solução 20% de piperidina em NMP (**60**). Os grupos protetores da cadeia lateral são derivados do *t*-butil, que se mantém estável a ação da base (MURRAY et al., 2014; MACHADO et al., 2004).

A clivagem ocorre com procedimento mais simples, a resina e os grupos protetores da cadeia lateral são removidos por lavagem com TFA a 25 °C (**Esquema 7**) (MURRAY et al., 2014; MACHADO et al., 2004).





Esquema 7 - Síntese de peptídeos via estratégia Fmoc.

#### 2.1.3.2.4. O rendimento final na SPFS

O rendimento final de uma síntese em fase sólida é dependente dos efeitos parciais dos acoplamentos. O uso de aminoácidos em excesso e bons reagentes ativadores do grupo  $\alpha$ -carboxila favorecem um acoplamento parcial eficiente (MURRAY et al., 2014).

O rendimento final é dependente do número de resíduos, da eficiência do rendimento parcial em cada acoplamento e da clivagem, processo de separação peptídeo-resina ao final da síntese. Uma estimativa para os rendimentos finais na SPFS de acordo com o número de resíduos e o rendimento parcial de cada acoplamento, considerando rendimento de 100% no processo de clivagem (**Tabela 4**) (NELSON; COX, 2008).

**Tabela 4** – Rendimento final de uma síntese dependendo da eficiência dos acoplamentos parciais.

<b>Número de resíduos</b>	<b>Rendimento Parcial</b>	<b>Rendimento Final</b>
11	98%	66%
21	96%	44%
31	94%	29%
51	90%	13%
100	82%	1,7%

O rendimento do acoplamento parcial é dependente do reagente de desproteção e dos reagentes ativadores que possibilitam os acoplamentos (NELSON; COX, 2008).

O teste Kaiser, também conhecido como teste da Ninhidrina, auxilia na identificação de aminas primárias, caso não ocorra o acoplamento total ou uma parte dos aminoácidos amino-desprotegido estejam livre é possível identificar por este teste (CHAN; WHITE, 2000).

Ao realizar a desproteção do grupo  $\alpha$ -amino ou acoplamento de um aminoácido uma pequena porção da resina é transferida para um tubo de ensaio e adicionado uma gota da solução 5% de ninhidrina em etanol, duas gotas da solução 80% de fenol em etanol e uma gota da solução 2% de KCN (1 mmol/L) em piridina.

A mistura é agitada e aquecida à 120 °C entre 4 à 6 minutos (CHAN e WHITE, 2000).

O teste positivo apresenta cor violeta, indicando a presença do NH<sub>2</sub> livre, enquanto que a cor amarela indica um teste negativo, ausência do grupo NH<sub>2</sub> livre. Nos casos dos acoplamentos sobre um suporte polimérico, um teste positivo indica que o rendimento do acoplamento foi inferior a 99% e um teste com resultado negativo, assegura que o acoplamento foi realizado com rendimento superior a 99% (NELSON e COX, 2008).

### 2.1.3.3. Síntese Enzimática ou Biocatalisada de Peptídeos

Na síntese enzimática ou biocatalisada a formação da ligação peptídica não ocorre por um reagente químico, mas sim por uma enzima em sua forma livre ou imobilizada. Da mesma forma que ocorre na síntese química, a síntese enzimática pode requerer várias etapas durante o processo da síntese total (MACHADO et al., 2004).

A formação de uma ligação peptídica catalisada por uma enzima baseia-se em simples inversão da reação de hidrólise, aminólise de amidas (também chamada de transpeptidação) e aminólise de ésteres. Sendo que a inversão da hidrólise e a aminólise de amidas são reversíveis e, portanto, são termodinamicamente controladas. A aminólise de ésteres é irreversível, podendo assim ser considerada cineticamente controlada (KITAGUCHI, 1996).

Essa metodologia oferece vantagens em relação à síntese química: i) elevada estereo- e regioseletividade; ii) ausência de racemização e de outras reações secundárias típicas da síntese química; iii) proteção parcial dos substratos; iv) tolerância à presença de água nos meios reacionais; v) possibilidade de emprego de reatores para a produção em larga escala e vi) menor custo. Por outro lado, o fato de não existir uma enzima universal faz com que a metodologia não seja geral ou aplicável a qualquer sequência peptídica (MACHADO et al., 2004).

#### 2.1.3.4. Síntese de Peptídeos via DNA-Recombinante

A síntese de peptídeos via DNA-recombinante utiliza todos os métodos modernos de clonagem e expressão gênica via microorganismos modificados, podendo produzir um peptídeo recombinante ou vários deles simultaneamente (NELSON; COX, 2008; MACHADO et al., 2004).

Grande parte dos trabalhos desenvolvidos em laboratórios utilizam bactérias como sistemas de expressão, esses microorganismos são desprovidos do aparato biológico necessário à introdução de modificações pós-transdução nas sequências peptídicas recém-produzidas (WANG, 1976).

Outros empregam a técnica de “phage display” em que o peptídeo desejado é secretado, mas se mantém ligado ao organismo (fago) que o produz. Em ambos os casos, são gerados peptídeos contendo apenas os aminoácidos proteínogênicos não modificados (MACHADO et al., 2004).

Essa síntese de peptídeo é ainda pouco empregada para a preparação de peptídeos contendo modificações químicas de amidação, fosforilação, sulfatação, acetilação ou ciclização, sendo o método mais utilizado a SPFS (NELSON; COX, 2008; MACHADO et al., 2004).

## **CAPÍTULO II**

### **2.2. OS CPP's E A INTERNALIZAÇÃO**

### 2.2.1. Os CPP's

O peptídeo penetrante celular (**CPP**) indica sequência peptídica capaz de atravessar a membrana plasmática de células eucarióticas e desempenhar funções biológicas ou permitir a entrada de outras substâncias (PUJALS et al., 2006).

Os CPP's são peptídeos catiônicos de cadeias com até 35 resíduos de aminoácidos e no geral são solúveis em fase aquosa. São capazes de atravessar a membrana plasmática de células eucarióticas, sendo internalizados eficazmente com baixa toxicidade através de um mecanismo que obriga ou não uma fonte de energia. Apresenta a capacidade de encaminhar uma carga hidrofílica para o interior de células vivas, resultando na expressão de uma atividade biológica desejada (PUJALS et al., 2006; MAGZOUB; GRASLUND, 2004).

Os primeiros indícios do uso de CPP's ocorreram por volta de 1965 com Ryser e Hancock, eles demonstraram que a adição de homopolímeros catiônicos em um meio celular contendo albumina radiomarcada melhorava a passagem da radioatividade para o interior das células (RYSER; HANCOCK, 1965). Em 1970 Shen e Ryser demonstraram que a conjugação de poli-L-lisina à proteínas ou à pequenas moléculas aumentava a capacidade de atravessar a membrana plasmática e ao utilizar o metotrexato, antimetabólico utilizado em tratamento de câncer, a conjugação potencializava a atividade biológica (RYSER; SHENW, 1978).

Dez anos mais tarde, foi demonstrado que a proteína TAT do vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) penetrava nas células e era capaz de transativar o promotor viral. A sequência ativa dessa proteína compreende os resíduos de aminoácidos 48-60 (GRKKRRQRRRPPQ) e atualmente é conhecido como peptídeo TAT (FRANKEL; PABO, 1988).

Pouco depois, o homeodomínio de Antennapedia, um fator de transcrição a partir de *Drosophila*, foi descrito como sendo capaz de penetrar células nervosas e aumentar a sua diferenciação morfológica (JOLIOT et al., 1991). Essa propriedade foi atribuída à uma sequência de 16 aminoácidos a partir da terceira hélice do

homeodomínio da Antennapedia, os resíduos 43-58 que é conhecida como penetratina (DEROSSÌ et al., 1994)

Depois disso, um grande número de peptídeos que possuem a capacidade de transpassar a membrana plasmática foram identificados. A origem da sequência é diversificada, podendo ser isolada de um domínio proteico ou em processos sintéticos (**Tabela 5**).

**Tabela 5** – As principais sequências peptídicas de CPP's e a fonte de origem.

Peptídeo	Origem	Sequência
<i>Domínio Proteico</i>		
pAntp	Antennapedia (43-58)	RQIKIWFQNRRMKWKK
Peptídeo Tat	Tat (48-60)	GRKKRRQRRPPQ
pVEC	Cadherine Mirine (615-632)	LLILRRRIRKQAHASK DAATATRGRSAASRPTERPRAPARS
VP22	Proteína viral do VSH	ASRPRRPVE
hCT (9-32)	Calcitonine Humana (9-32)	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP
<i>Peptídeo Sintético</i>		
Oligoarginina		RRRRRRRR(R) <sub>n</sub>
MAP		KLALKLALKLALKAALKLA
<i>Peptídeo de Fusão</i>		
Transportam	Galanina - Mastoparam	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
MPG	gp41(HIV) - Antígeno T (SV40)	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKRKV
Pep-1	Transcriptase (HIV) - Antígeno T (SV40)	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
<i>Peptídeo Antimicrobiano</i>		
SynB1	Protegrine-1	RGGRLSSYSRRRFSTSTGR
SynB3	Protegrine-1	RRLSSYSRRRF

Os CPP's apresentam grande diversidade na origem e no tipo de sequência peptídica (**Figura 11**), com isso o mecanismo de ação de cada CPP varia de acordo com o tipo celular e com o local de invasão na membrana plasmática. Essa diversidade dificulta uma compreensão geral para o mecanismo de penetração dos CPP's (FISCHER et al., 2005).

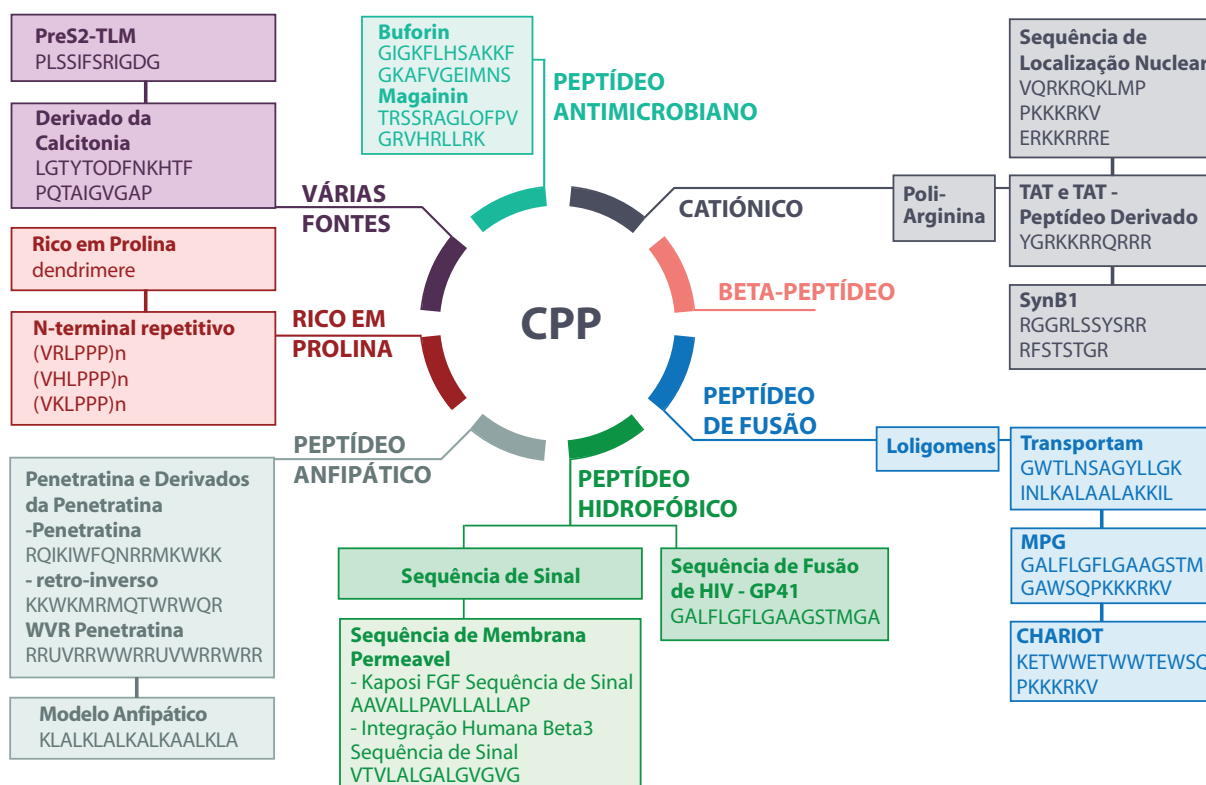


Figura 11 – A diversidade na origem e na sequência peptídica.

A seguir será detalhado as características dos CPP's Penetratina, RW<sub>9</sub> e R<sub>9</sub> que foram CPP's estudados neste trabalho.

### 2.2.1.1. Penetratina (pAntp)

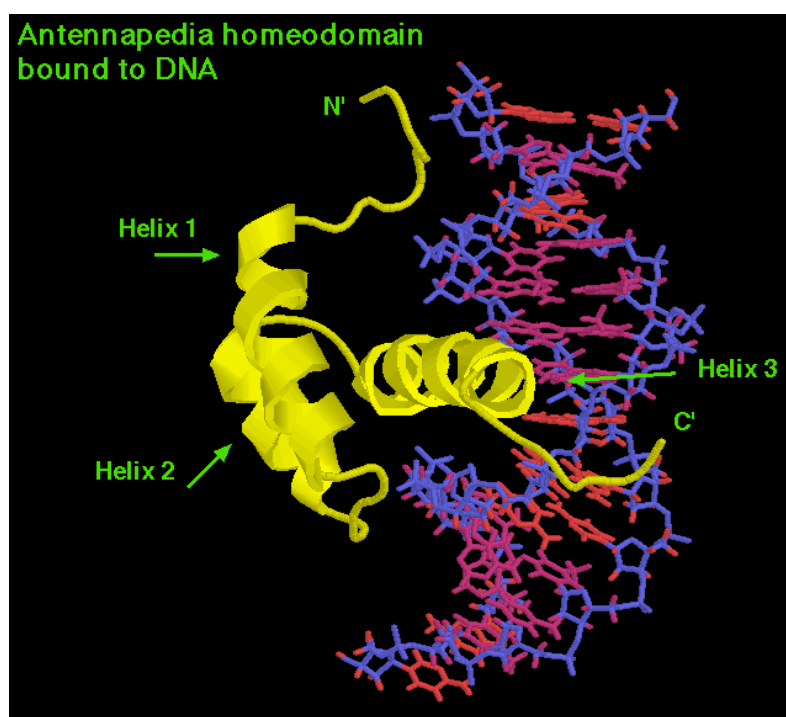
As homoproteínas fazem parte de uma classe de fatores de transcrição que estão envolvidos em processos chave de desenvolvimento de um ser vivo. A sua presença foi detectada em diversos tipos de organismos, desde as leveduras até os seres humanos (GEHRING, 1987).

Em experiências realizadas sobre o papel de uma homoproteína da *Drosophila* (Antennapedia) na morfogênese neuronal demonstrou que a proteína quando introduzida no meio de cultura transpassou a membrana celular e atingiu o núcleo (JOLIOT et al., 1991). Através de uma série de estudos efetuados sobre as formas truncadas ou mutada desta proteína, as propriedades foram atribuídas à



hélice 3, os resíduos 43-58 do homeodomínio (DEROSSI et al., 1994; ROUX et al., 1993).

Essa sequência de 16 resíduos (RQIKIWFQNRRMKWKK) foi o primeiro CPP descrito na literatura, conhecido como *Penetratina* ou *pAntp*. A principal característica é ligar-se ao DNA na região do homeodomínio (HD), uma sequência de 60 resíduos de aminoácidos altamente conservados pelas três hélices  $\alpha$  e uma curva  $\beta$  situada entre as hélices 2 e 3, uma região envolvida no reconhecimento do DNA (**Figura 12**) (GEHRING, 1987).



**Figura 12** – Representação 3D da ligação do homeodomínio da Penetratina ao DNA. <http://www.biosci.ki.se/groups/tbu/homeo.html>

Os primeiros estudos sobre as propriedades desse CPP demonstraram que a localização nuclear e citosólica são independentes da temperatura, sendo observados à 37 °C e também à 4 °C; e que os receptores da penetratina são do tipo não quiral, pois a sequência constituída por resíduos D-aminoácidos e/ou a sequência inversa possuem potencial para transpassar a membrana (DEROSSI et al., 1996; DEROSSI et al., 1994).

Estudos adicionais levaram à conclusão de que a estrutura do peptídeo em hélice  $\alpha$ , não interferiu com a internalização do peptídeo. A introdução de resíduos prolina na sequência da *Penetratina*, em diferentes localizações intramolecular, não resultaram em diminuição da eficácia da penetração para o interior célula (DEROSSI et al., 1996).

O estudo das sequências curtas pAntp (41-55) e pAntp (46-60) levaram à conclusão de que a C-terminal e N-terminal da *Penetratina* são essenciais para a internalização, uma vez que nenhuma destas duas formas não penetraram nas células (DEROSSI et al., 1996; DEROSSI et al., 1994). Esta diminuição da eficiência foi atribuída aos muitos resíduos básicos nas regiões truncadas. O papel destes resíduos tem sido destacado e confirmado por estudos de mutação por ponto alanina. Estas mutações resultaram em um decréscimo na eficiência de internalização de 50 a 80% (DRIN et al., 2001; FISCHER et al., 2000).

O papel de alguns resíduos hidrofóbicos também foram destacados, como a substituição dos resíduos de triptofano 48 e 56 por resíduos de fenilalanina levaram à supressão das propriedades da penetratina. Acredita-se que estes resíduos estão envolvidos na desestabilização da membrana (DEROSSI et al., 1994; DON et al., 2003).

Em vista das suas propriedades, a penetratina tem sido amplamente utilizada como um veículo para o sucesso de peptídeos, oligonucleotídeos e internalização do ácido nucléico peptídico (ANP) em linhas celulares diferentes (DEROSSI et al., 1996). A vetorização de substâncias biologicamente ativos (Antígenos de ANP) também foi realizada *in vivo* e provou-se que esse peptídeo pode atravessar a barreira hematoencefálica (MAZEL, 2001).

#### 2.2.1.2. Peptídeos sintéticos $RW_9$ e $R_9$

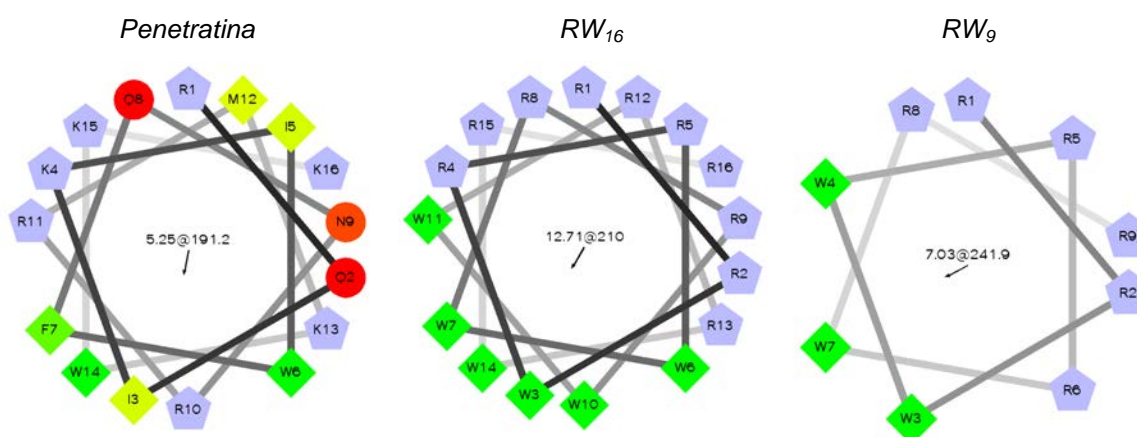
O peptídeo  $RW_9$  e  $R_9$  foram descobertos a partir de observações da estrutura primária do peptídeo Tat, que contem seis resíduos de Arginina (R) e dois resíduos de lisina (K) em um total de treze resíduos, e da penetratina, que contem três

resíduos de arginina (**R**) e quatro resíduos de lisina (**K**) em um total de dezesseis resíduos, e mostram claramente a importância dos resíduos básicos nos CPP's (DEROSSI; CHASSAING; PROCHIANTZ, 1998).

Na sequência dos estudos dos peptídeos *Tat* e *Penetratina*, foi elaborado um modelo de peptídeo consistindo apenas de resíduos de arginina (**R**) e triptofano (**W**). A sequência foi organizada de modo a formar uma hélice anfipática e para isso foram necessários a combinação de 16 resíduos (CHASSAING; PROCHIANTZ, 1997).

O  $RW_{16}$  (RRWRRWRRWRRWRR) possui uma sequência que mostrou a capacidade para atingir o citoplasma das células e ser utilizado como CPP. Estudos posteriores permitiram propor o encurtamento da sequência para obter o nonapeptídeo  $RW_9$  ou  $R_6W_3$  (RRWRRWRR) (DELAROCHE et al., 2007).

O peptídeo encurtado  $RW_9$  seguiu os padrões da conformação tridimensional dos resíduos básicos da *Penetratina* e  $RW_{16}$ . Em visualização por microscopia confocal de células fixadas e/ou eletroforese em gel é possível identificar as semelhanças nas estruturas das sequências peptídicas da *Penetratina*,  $RW_{16}$  e  $RW_9$ . Em azul apresentam os resíduos com radicais da cadeia lateral carregados positivamente e em verde representam os resíduos com radicais da cadeia lateral contendo grupos aromáticos (**Figura 13**) (CHASSAING; PROCHIANTZ, 1997).



**Figura 13** – Representação helicoidal dos CPP's *Penetratina*,  $RW_{16}$  e  $RW_9$ . <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>

A quantificação do CPP RW<sub>9</sub> ocorreu por espectrometria de massa MALDI-TOF. Comparando as áreas dos picos referente ao peptídeo RW<sub>9</sub> que transpassou a membrana plasmática às áreas dos picos referente aos CPP Tat e Penetratina. O novo CPP apresentou maior eficiência de internalização e teve como características de internalização rápida cinética de penetração e atingiu um patamar entre 30 à 60 min de incubação (**ver item 2.2.2**). De todos os peptídeos sintéticos o RW<sub>9</sub> é o único que combina a melhor capacidade de intenalização com a sequência mais simples (DELAROCHE et al., 2007).

Em estudos posteriores sobre a sequência do peptídeo Tat (49-60) enfatizou a importância do papel desempenhado pelos resíduos básicos na internalização e particularmente arginina (**R**). Esses achados levaram equipes Wender Futaki e professores a desenvolver homopolímeros desse aminoácido que mostraram uma forte capacidade de entrar nas células (MITCHELL et al., 2000).

As investigações realizadas sobre o tamanho do polímero concluiu-se que o número ótimo é entre oito e dez resíduos de arginina. Um mínimo de seis resíduos são necessárias para o peptídeo transpassar a membrana plasmática e muitos resíduos conduzem a uma diminuição significativa da eficiência do CPP e elevam a toxicidade da substância (FUTAKI et al., 2001).

Essa classe de substâncias tem um lugar importante no campo dos CPP's. Os estudos com homopolímero de arginina permitiu identificar um grande número de determinantes estruturais e funcionais que estão envolvidos no procedimento de internalização e levou ao desenvolvimento de novas sequências peptídicas sintéticas utilizadas como CPP's (FUTAKI et al., 2001).

### **2.2.2. Internalização**

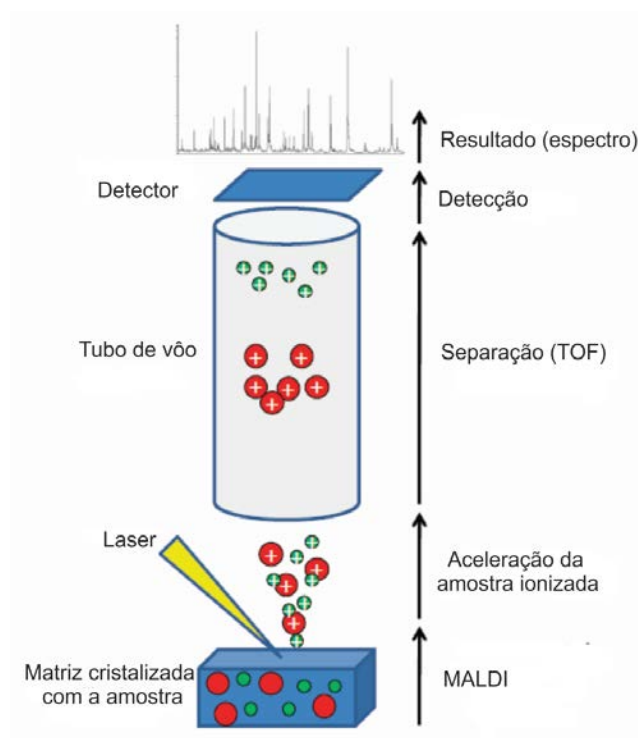
O termo “internalização” se refere a um protocolo desenvolvido pelo laboratório de biomoléculas da UPMC. O protocolo permite quantificar uma

biomolécula no interior celular através da Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (BURLINA et al., 2006).

A Espectroscopia de Massas MALDI-TOF corresponde à métodos de ionização (MALDI) e análise de massa (TOF) utilizados na Espectroscopia de Massas. O espectrômetro de massas apresenta cinco componente principais, a unidade de entrada da amostra, a fonte de ionização, o analisador de massas, o detector e o sistema de dados (PAIVA et al., 2010).

A técnica de ionização por dessorção MALDI utiliza laser de nitrogênio ou de infravermelho que colidem com a matriz cristalizada e ioniza algumas moléculas da amostra. Os íons expelidos são, então, acelerados na direção do analisador de massa (**Figura 12**) (PAIVA et al., 2010).

O analisador de massas por tempo de voo - TOF (*time of light*) separa os íons por tempo de voo, ou seja, por diferença de massas. Íons mais leves atingem o detector mais rápido (**Figura 12**) (PAIVA et al., 2010).



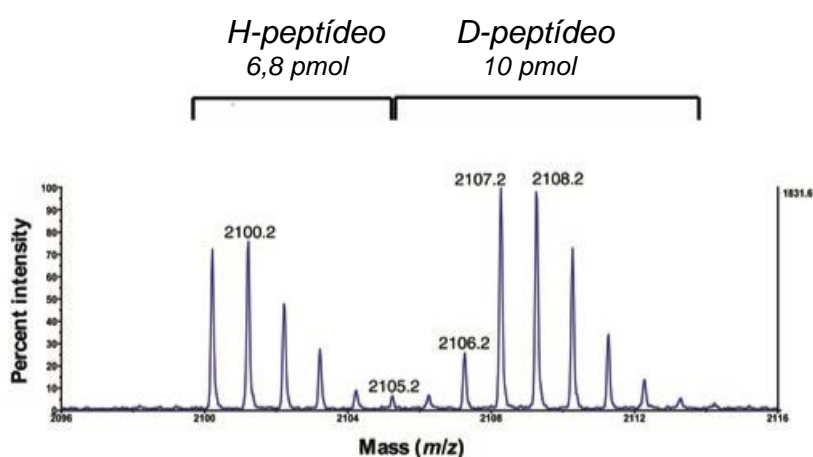
**Figura 14** – Representação da Espectroscopia de Massas MALDI-TOF. <http://www.nanocell.org.br/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/>.

A Espectroscopia de Massas MALDI-TOF significa *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*. Essa técnica determina de forma rápida e confiável a razão massa/carga ( $m/z$ ) do íon com através da ionização por dessorção a laser assistido por matriz.

Com a descoberta da ação dos CPP's a identificação e a quantificação de uma molécula biologicamente ativa no interior celular atraiu a atenção de grupos de pesquisa.

Quantificar um CPP ou um peptídeo no interior celular e estudar a sua estabilidade intracelular é importante tanto para a compreensão do mecanismo de penetração celular quanto para a seleção de novas portas de entrada para o meio intracelular (FUTAKI et al., 2001).

O protocolo desenvolvido pelo laboratório de biomoléculas da UPMC quantifica a incorporação celular de uma sequência peptídica baseando na detecção direta por Espectroscopia de Massas MALDI-TOF. O peptídeo quantificado por essa técnica é comparado através da utilização de um padrão interno, com a mesma sequência do peptídeo marcada com um isótopo estável. Para este efeito, a sequência da espécie internalizada deve conter uma marcação isotópica por quatro glicinas não-deuteradas (H-Peptídeo), e o padrão interno deve conter quatro glicinas bi-deuteradas (D-Peptídeo) (**Figura 15**) (BURLINA et al., 2006).



**Figura 15** – Identificação do H-peptídeo internalizado e comparação ao controle D-peptídeo.

Os peptídeos também são biotinizados para permitir a sua fácil extração no procedimento de lavagem das células e purificação após a lise celular. Durante o procedimento de lavagem utiliza-se esferas magnéticas revestidas com estreptavidina que se ligam à biotina (BURLINA et al., 2006).

Ambos os peptídeos têm a mesma estrutura química, por isso são recuperados com a mesma eficiência e apresentam a mesma resposta em intensidade em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF. A distinção entre o H-peptídeo e o D-peptídeo se dá pela diferença de  $\Delta m = 8$  proveniente do acoplamento com os resíduos de glicina não deuteradas e deuteradas (**Figura 15**) (BURLINA et al., 2006).

**CAPÍTULO III**

**2.3. O CÂNCER E O PEPTÍDEO BIOATIVO  $ER\alpha 17p$**



### 2.3.1. O câncer de mama e os marcadores hormonais

De acordo com a OMS - Organização Mundial da Saúde e o INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva o câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum e a responsável pela maior taxa de mortalidade entre as mulheres (INCA: Câncer de Mama, 2017; INCA, 2014).

Dados mundiais apresentam como o segundo tipo de neoplasia mais frequente na população, sendo superado apenas pelo o câncer de pele. No Brasil ocupa a terceira posição, ficando atrás do câncer de pele e o câncer de próstata (INCA, 2014).

O câncer de mama possui crescente incidência mundial, correspondendo cerca de 22% dos novos casos de câncer em cada ano em todo o mundo. A maior parte dos casos ocorre em países desenvolvidos, tendo a Holanda como o país com maior incidência, cerca de 90,2 casos/100 mil habitantes, seguido pelos Estados Unidos com taxa de 86,9 casos/100 mil habitantes (VIEIRA et al., 2008).

No Brasil esse tipo é mais frequente nas regiões sul e sudeste com 71 casos/100 mil habitantes, seguido pela região centro-oeste com 51 casos/100 mil habitantes, nordeste com 37 casos/100 mil habitantes e a região Norte com 21 casos/100 mil (INCA, 2014).

As causas não são totalmente definidas, mas estudos demonstram que além dos fatores hereditários e genéticos, a idade é um dos principais fatores de risco. O câncer de mama é raro em idade inferior aos 35 anos, após essa faixa etária o número de casos aumenta de forma acelerada. Sua ocorrência também está relacionada ao processo de urbanização da sociedade, evidenciando maior risco em mulheres com elevado nível socioeconômico (INCA, 2014; VIEIRA et al., 2008).

No Brasil, estima-se que tenha ocorrido mais 57 mil novos casos de câncer de mama no ano de 2014. As taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados (INCA: Câncer de Mama, 2017).

O carcinoma invasivo de mama compreende um grupo de tumores malignos que se desenvolvem nos tecidos epiteliais. A grande maioria destes tumores é derivado das células da unidade ducto terminal do lóbulo mamário, que são as células cuboidais luminiais secretoras e as células mioepiteliais e/ou basais (VIEIRA et al., 2008).

Possuem como características a invasão do tecido adjacente, a tendência de metástase até mesmo em longas distâncias, e é considerada uma neoplasia heterogênea com vários subtipos patológicos e diferentes aspectos histológicos, e apresentam características clínicas diferentes com diversas variações de respostas ao tratamento, e que torna um desafio o estudo e o tratamento de câncer de mama (VIEIRA et al., 2008).

A classificação morfológica (anátomo-patológica) atualmente utilizada é insuficiente para caracterizar os carcinomas de mama, uma vez que os tumores com o mesmo grau, estágio e tipo histológico podem apresentar diferentes prognósticos e respostas à terapia (VIEIRA et al., 2008).

Ao ser identificado um câncer de mama, os pacientes são submetidos à procedimentos de radiografia do tórax, ultrassonografia, tomografia computadorizada, cintilografia óssea e exames de sangue com marcadores tumorais. Estes procedimentos são realizados com intuito de obter uma avaliação diagnóstica detalhada, para identificar o estágio do tumor e o grau de malignidade e conseqüentemente o tamanho do tumor e se houve a ocorrência de metástases (INCA, 2014).

O prognóstico e o tipo de tratamento são influenciados pelas características do paciente e do tumor. São fatores importantes a idade do paciente, a relação do tumor com a menopausa, a saúde geral do paciente, o estadiamento da doença e principalmente as características do tumor primário, que permite avaliar a presença de necrose tumoral, os níveis de receptores de estrogênio e progesterona e as medidas da capacidade proliferativas do tumor (INCA, 2014; VIEIRA et al., 2008).

A cirurgia é um dos procedimentos indicado em quase todos os diagnósticos de câncer de mama. Os possíveis tratamentos cirúrgicos são a *lumpectomia* –

remoção do nódulo, *quadrantectomia* – remoção do quadrante ou *mastectomia* – remoção completa da mama, sempre seguidos da remoção dos gânglios linfáticos da axila homolateral (VEIGA et al., 2009).

Associado ao procedimento cirurgia, os tratamentos de quimioterapia e radioterapia são utilizados a fim de diminuir o tamanho do tumor e evitar metástase. Recentemente a hormonioterapia tem sido aplicada de forma isolada ou combinada com a finalidade curativa ou paliativa no tratamento de câncer (INCA: Hormonioterapia, 2017).

A manipulação do sistema endócrino é um procedimento bem estabelecido para o tratamento de algumas neoplasias malignas hormônio-sensíveis (INCA: Hormonioterapia, 2017).

Inicialmente utilizada no câncer de mama, a hormonioterapia foi sendo subsequentemente aplicada a outros tumores que mostravam hormônio-sensibilidade incontestável, como os carcinomas de endométrio e de próstata e os tumores tireoidianos iodocaptantes (INCA: Hormonioterapia, 2017).

Até há poucos anos, a hormonioterapia era baseada em critérios empíricos, resultando em esquemas terapêuticos de administração variável em dosagens e intervalos. Os critérios adotados, em caso de carcinoma mamário, eram o estado hormonal da paciente, indiretamente avaliado pela idade, e a distribuição predominante de metástases em ossos e partes moles (INCA: Hormonioterapia, 2017).

Novos subsídios endocrinológicos para a hormonioterapia antitumoral foram trazidos pela determinação da dosagem de receptores celulares específicos para estrogênios e progesterona em amostras tumorais, pelo estabelecimento de clara relação entre positividade do receptor e resposta terapêutica e pelos avanços verificados no conhecimento das interações entre receptores hormonais e processos bioquímicos intracelulares. Este desenvolvimento da hormonioterapia aplicou-se principalmente aos casos de câncer de mama e de endométrio (INCA: Hormonioterapia, 2017).

Os marcadores tumorais (ou marcadores biológicos) são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele ou, secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do tumor. É importante que a substância possa ser utilizada para diferenciar tecidos normais de neoplásicos e que possa ser caracterizada ou quantificada por procedimentos relativamente práticos (VEIGA et al., 2009).

A utilização dos marcadores tumorais na avaliação do prognóstico do câncer de mama tem crescido muito nos últimos anos. Muitos desses marcadores, os quais foram inicialmente identificados através de estudos moleculares ou bioquímicos, podem agora ser localizados em cortes de tecido pelo uso da *imuno*-histoquímica ou da hibridização *in situ*. Incluem-se nesta ampla categoria uma variedade de proteínas, algumas das quais estão associadas aos oncogêneses e medidores da atividade proliferativa do tumor (EISENBERG; KOIFMAN, 2001).

Desde que foi demonstrado que o crescimento dos carcinomas de mama é regulado por estrógenos, a presença de receptores específicos para o estrogênio em tumores mamários e a terapia ablativa desse hormônio tem produzido remissão clínica em pacientes com carcinoma de mama. Os tumores que respondem à terapia hormonal expressam altos níveis de receptores de estrogênio, enquanto que os tumores que não respondem têm níveis baixos ou indetectáveis (EISENBERG; KOIFMAN, 2001).

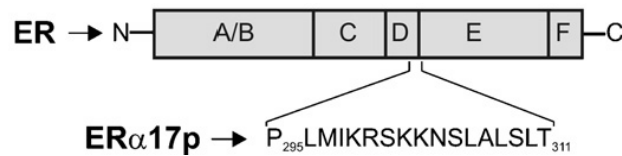
### **2.3.2. O peptídeo bioativo ER $\alpha$ 17p**

O termo receptor de estrogênio positivo (ER $\alpha$ -positivo) expressa a capacidade que um grupo de células cancerígenas tem para atuar como receptor do hormônio feminino estrogênio.

O peptídeo sintético ER $\alpha$ 17p tem apresentado relevância significativa em estudos de suas atividades biológicas frente ao ER $\alpha$ -positivo, dependendo do tipo de

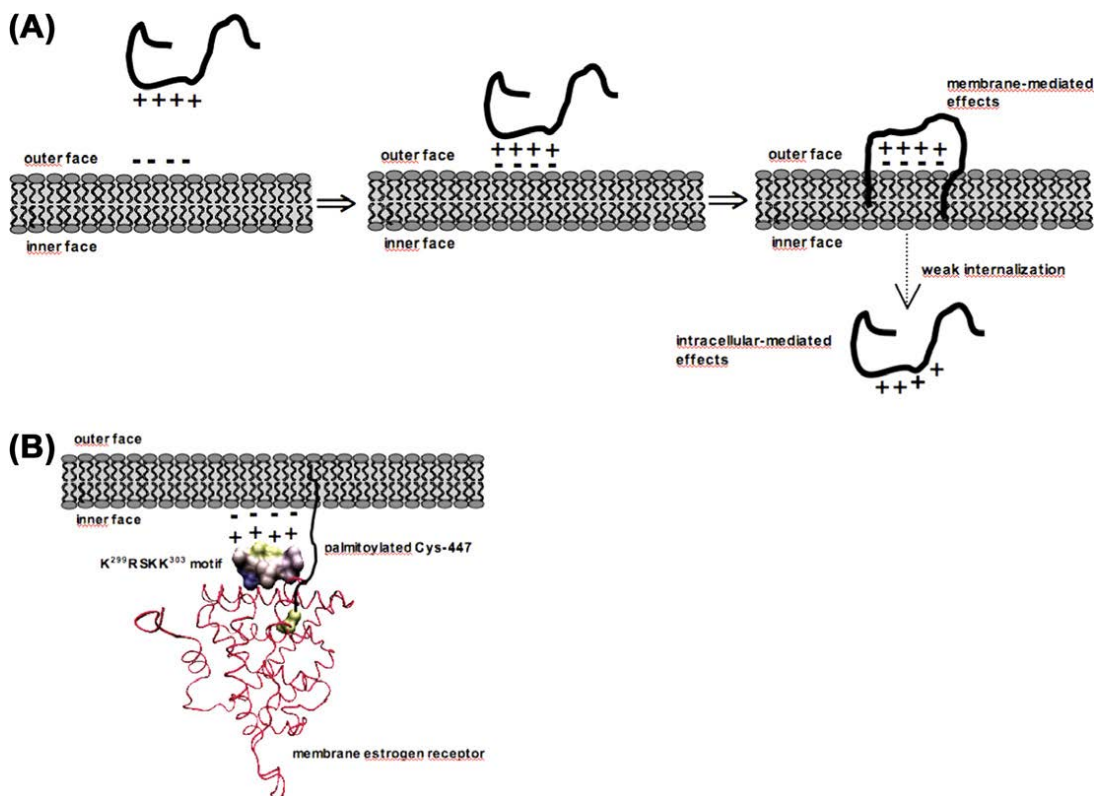
célula e das condições de cultura. Um tipo de célula que representa essa atividade biológica são as células cancerígenas de mama (GALLO et al., 2008).

O peptídeo ER $\alpha$ 17p corresponde a sequência da região *hinge* do receptor de estrogênio ER $\alpha$ , resíduo P<sub>295</sub>LMIKRSKKNLALSLT<sub>311</sub>. Essa sequência expressa uma região de efeitos farmacológicos em células cancerígenas (GALLO et al., 2008).



**Figura 16** – Região *hinge* do receptor de estrogênio

A sequência de resíduos básicos KRSKK foi identificada como responsável pela passagem do ER $\alpha$ 17p pela membrana plasmática. Essa sequência é reconhecida por proteínas contidas na membrana plasmática e permite a passagem do peptídeo para o interior celular (**Figura 17**) (BYRNE et al., 2012).



**Figura 17** – Passagem do peptídeo ER $\alpha$ 17p para o interior celular.

Os dados sobre a ação do ER $\alpha$ 17p em células cancerígenas estão em concordância de que este é um regulador multifacetado dedicado às várias ações em células cancerígenas. Os principais efeitos já relatados da ação do ER $\alpha$ 17p em células cancerígenas são que o peptídeo confere modificações no citoesqueleto da actina, responsável por manter a forma da célula e as junções celulares; apresenta característica inibitória de migração de células, efeito no potencial metastático de câncer de mama; em meio contendo estradiol induz a apoptose e a regressão celular de câncer de mama (PELEKANOU et al., 2011).

Porém, os alvos celulares envolvidos no modo de ação ainda não foram identificados. Assim como, a sua localização, no interior da célula ou sobre a membrana celular (KAMPA et al., 2011).

Nesse trabalho, os estudos com o peptídeo ER $\alpha$ 17p foram efetuados com peptídeo ativo acoplado aos peptídeos CPP's, visando a estabilidade dos mesmos nas células.

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1 – Objetivo geral

Sintetizar as sequências bases e derivadas dos CPP's e do peptídeo *ERα17p* e estudar a absorção e os efeitos biológicos em células cancerígenas *ERα+*.

### 3.2 – Objetivos específicos

#### 3.2.1 – Síntese dos peptídeos

##### 3.2.1.1 – Síntese do peptídeo *ERα17p* e seus derivados

- **P1** -  $ER\alpha17p-OH \Rightarrow H-PLMIKRSKKNLALSALT-OH$
- **P2** -  $Ac-ER\alpha17pC-NH_2 \Rightarrow Ac-PLMIKRSKKNLALSALTC-NH_2$
- **P3** -  $BiotinO_2-GGGG-ER\alpha17p-OH$
- **P4** -  $BiotinO_2-GGGG-ER\alpha17p-C-NH_2$
- **PD** -  $BiotinO_2-G_DG_DG_DG_D-ER\alpha17p-C-NH_2$

##### 3.2.1.2 – Síntese dos CPP's

- **V1** –  $Ac-Pénétratine-NH_2 \Rightarrow Ac-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH_2$
- **V2** –  $Ac-RW_9-NH_2 \Rightarrow Ac-RRWRRRWR-NH_2$
- **V3** –  $Ac-R_9-NH_2 \Rightarrow Ac-RRRRRRRR-NH_2$
- **V4** –  $Ac-C-Pénétratine-NH_2 \Rightarrow Ac-Cys(NPys)-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH_2$
- **V5** –  $Ac-C-RW_9-NH_2 \Rightarrow Ac-Cys(NPys)-RRWRRRWR-NH_2$
- **V6** –  $Ac-C-R_9-NH_2 \Rightarrow Ac-Cys(NPys)-RRRRRRRR-NH_2$



### 3.2.1.3 – Síntese dos peptídeos conjugados

- **C1 – (P4 – V4)** BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-ERα17p-C-NH<sub>2</sub>-Ac-C-Pénétratine-NH<sub>2</sub>
- **C2 – (P4 – V5)** BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-ERα17p-C-NH<sub>2</sub>-Ac-C-RW<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>
- **C3 – (P4 – V6)** BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-ERα17p-C-NH<sub>2</sub>-Ac-C-R<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>

### 3.2.1.4 – Caracterização das soluções estoques contendo os CPP's

- **V<sub>Pénétratina H</sub>** - BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-Pénétratine-NH<sub>2</sub>
- **V<sub>Pénétratina D</sub>** - BiotinO<sub>2</sub>-G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>-Pénétratine-NH<sub>2</sub>
- **V<sub>RW9 H</sub>** - BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-RW<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>
- **V<sub>RW9 D</sub>** - BiotinO<sub>2</sub>-G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>-RW<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>
- **V<sub>R9 H</sub>** - BiotinO<sub>2</sub>-GGGG-R<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>
- **V<sub>R9 D</sub>** - BiotinO<sub>2</sub>-G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>-R<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>

## 3.2.2 - Testes biológicos

### 3.2.2.1 – Toxicidade e proliferação

- Quantificar as células CHO-K1 vivas após 1 hora de incubação dos peptídeo descritos nos itens 3.2.1.1 e 3.2.1.3.
- Quantificar as células MCF-7 vivas após 1, 24, 48 e 72 horas de incubação dos peptídeo descritos nos itens 3.2.1.1 e 3.2.1.3.

### 3.2.2.2 – Internalização

- Quantificar os CPP's descritos no item 3.2.1.4. em célula CHO-K1 e em célula MCF-7.
- Quantificar os peptídeos conjugados descritos no item 3.2.1.3. em célula CHO-K1 e em célula MCF-7.

## **4. MATERIAIS E METODOLOGIAS**

## 4.1 - Síntese e caracterização dos peptídeos

### 4.1.1 – Materiais e equipamentos

- Reagentes e solventes utilizados para síntese e clivagem em estratégia Boc.

*Síntese:* Boc-aminoácido (Boc-AA); resina MBHA, com 0,54 mmol grupos funcionalizados em cada 1 g de resina; TFA; DIEA; HBTU; DCC; MNP; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; e MeOH.

*Clivagem:* HF; anisol; dimetilsulfureto; *p*-toluenotiol; gelo; éter dietílico; ácido acético; e nitrogênio líquido.

- Reagentes para síntese em estratégia Fmoc.

*Síntese:* Fmoc-aminoácido (Fmoc-AA); resina cloreto de 2-clorotritila, com 1,60 mmol grupos funcionalizados em cada 1 g de resina; Piperidina; HOBt; DCC; MNP; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; e MeOH.

*Clivagem:* TFA; Tis; H<sub>2</sub>O; e nitrogênio líquido.

- Sintetizador de peptídeos: Applied Biosystems 433a; Synth Assist 3.1.
- Seringas com filtro: 1, 5, 10 e 20 mL.
- Mesa vibratória controlada.
- Dessecador a vácuo.
- Linha de vácuo acoplada ao HF.
- Chapa de agitação magnética.
- Liofilizador.
- CLAE analítico: Ultimate 3000 Autosampler; Ultimate 3000 RS Variable Wavelength Detector; Coluna Proto 200 C18, 3 µm, 100x4,6mm; e injeção 20 µL.
- CLAE preparativo 1: Waters 2489 UV/Visible detector; Water 2535 Quaternary Gradient Module; VP260/16 Nucleodur; Macherey Nagel C18 HTec, 5 µm, 250x4,6 mm; e injeção 5 mL.

- CLAE preparativo 2: Waters 2487 UV/Visible detector; xBridge C18 5  $\mu\text{m}$ , 19x450 mm; e injeção 1 mL.
- MALDI TOF: ABI Voyager DE-Pro MALDI TOF Voyager Elite PerSeptive Biosystems mass spectrometer (Applied Biosystems); modo refletor ABI; placa inox.

#### 4.1.2. Metodologias

Os peptídeos foram sintetizados por métodos automáticos e manuais em dois tipos de estratégias para a SPFS, com grupo protetor de amina Boc e Fmoc (BYRNE et al., 2012; MARQUERDT; EIFLER-LIMA, 2001). A escolha de cada método e a resina foram determinadas pelo tamanho da sequência peptídica, o tipo e as modificações à sequência principal e o procedimento de clivagem.

As sequências peptídicas longas como a Penetratina e ER $\alpha$ 17p foram obtidas em grande escala no sintetizador automático Applied Biosystems 433a afim de minimizar o tempo de execução da síntese e obter um estoque da sequência base para acoplamentos e modificações posteriores.

Os acoplamentos secundários às sequências Penetratina e ER $\alpha$ 17p e os peptídeos RW<sub>9</sub> e R<sub>9</sub> foram sintetizados manualmente pelo método de SPFS.

O peptídeo ER $\alpha$ 17p e seus derivados foram sintetizados em suporte sólido em estratégia Fmoc, em resina cloreto de 2-clorotritila, por possibilitar modificações e novos acoplamentos à sequência principal e, especialmente, por permitir clivar pequenas porções da resina com um procedimento rápido e eficiente.

Os CPP's foram sintetizados em resina MBHA e com os resíduos de aminoácidos contendo proteção Boc do grupo amino. A escolha pela estratégia Boc foi determinada pela disponibilidade dos reagentes no estoque do laboratório, pela ausência de modificações significativas e de novos acoplamentos à sequência base e o conhecimento das duas principais estratégias para a SPFS.

#### 4.1.2.1. Procedimento geral para a síntese em estratégia Boc

Os peptídeos obtidos pela SPFS empregando a estratégia Boc foram sintetizados em método automático de peptídeos *Applied Biosystems 433A* e em métodos manuais de acoplamento e desproteção do grupo amino.

A resina utilizada como suporte sólido foi a MBHA (0,54 mmol/g) e os aminoácidos protegidos com o grupamento Boc.

A desproteção do grupo Boc foi efetivada por dois tratamentos sucessivos com TFA: o primeiro durante 30 segundos e o segundo por 3 minutos. Na etapa de acoplamento foi utilizado Boc-AA ou Biotina (3 eq. em relação aos grupos funcionalizados da resina), em solução contendo DIEA (20 eq.), HBTU (9,5 eq.) em NMP (5 mL) por constante agitação por uma hora (BYRNE et al., 2012).

O acoplamento com Boc-Cis(Npys)-OH foi realizado com DCC (5 eq.) em NMP. Após cada etapa foram efetuadas lavagens alternadas com os solventes NMP e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

#### 4.1.2.2. Clivagem dos Peptídeos em Estratégia Boc

Os peptídeos obtidos em estratégia Boc foram clivados com HF durante 2 h a 0°C em agitação constante. Para isso, foi utilizado para remover os grupos protetores os reagentes anisol (1,5 mL/mg resina), dimetilsulfureto (0,25 mL/mg resina) e para os peptídeos contendo cisteína, *p*-toluenotiol (300 mg/g resina).

Após a agitação, o HF foi evaporado em sucção a vácuo e os peptídeos foram precipitados em éter dietílico à 0°. Os grupos protetores foram eliminados por filtração a vácuo e em seguida os peptídeos foram solubilizados em ácido acético (25% v/v) e liofilizados (BYRNE et al., 2012).

#### 4.1.2.3. Procedimento geral para a síntese em estratégia Fmoc

Os peptídeos obtidos pela SPFS empregando a estratégia Fmoc (FIELDS e NOBLE, 1990) foram sintetizados em método automático de peptídeos *Applied Biosystems 433A* e em métodos manuais de acoplamento e desproteção do grupo amino.

A resina utilizada como suporte sólido foi a cloreto de 2-clorotritila (1,60 mmol/g) e os aminoácidos protegidos com o grupamento Fmoc.

A desproteção do grupo Fmoc foi efetivada pelo tratamento com piperidina (2 mL) em NMP (8 mL), em duas etapas de 5 minutos. Na etapa de acoplamento foi realizada uma reação paralela de ativação da carboxila com Fmoc-AA (3 eq.), HOBt (3 eq.) e DCC (2 eq.) em meio de NMP (5 mL), em relação aos grupos funcionalizados da resina (BYRNE et al., 2012).

As soluções contendo o aminoácido com carbonila ativa foi adicionado à resina em constante agitação por uma hora. Após cada etapa foram efetuadas lavagens alternadas com os solventes NMP e DCM.

#### 4.1.2.4. Clivagem dos Peptídeos em Estratégia Fmoc

Os peptídeos obtidos em estratégia Fmoc foram separados do suporte sólido e dos grupos protetores de cadeias laterais pela solução contendo TFA, Tis e H<sub>2</sub>O, na proporção 95:2,5:2,5, respectivamente. Sendo utilizado 1mL da solução para cada 100 mg da resina (BYRNE et al., 2012; PENNINGTON; DUNN, 1994). As soluções contendo a resina, foram agitadas durante 2 horas à temperatura ambiente.

Os peptídeos foram filtrados através da placa porosa da seringa, lavados com TFA e o mesmo evaporado por corrente de ar. Após a evaporação os peptídeos foram solubilizados em solução de ácido acético (25% v/v), congelados com nitrogênio líquido e liofilizados.

#### 4.1.2.5. Procedimento comum para as sínteses em ambas as estratégias

O sucesso de cada etapa de acoplamento e desproteção foi monitorado por meio do teste de ninhidrina (CHAN; WHITE, 2000). No caso de resultado positivo, a reação de acoplamento foi repetida.

Quando necessário, o grupo amino foi acetilado por tratamento com 20 % de anidrido acético (2 mL) em NMP (8 mL) em presença de DIEA (20 eq.) durante 20 minutos.

Uma vez a síntese concluída, a resina foi lavada com,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e MeOH (5 x 5 mL) e seca em um sistema a vácuo ou dessecador.

#### 4.1.2.6. Conjugação dos peptídeos

A reação de acoplamento foi realizada por ponte de sulfeto em solução tampão de acetato de sódio / ácido acético pH= 4,0. Essa solução foi preparada com 8,5 mL de uma solução de ácido acético 0,1 M com 1,5 mL de uma solução de acetato de sódio 0,1M .

Os peptídeos P4 e CPP's foram solubilizados a concentração de 1mM em recipientes separados, após a solubilização completa de cada peptídeo as soluções foram misturadas. As reações foram controladas e purificadas por CLAE, e os novos produtos obtidos foram caracterizados por Espectroscopia de Massas MALDI-TOF.

#### 4.1.2.7. A purificação e caracterização dos peptídeos

Os peptídeos foram analisados e purificados por técnicas de CLAE com detector de dual absorvância utilizando o solvente A (TFA à 0,1% em água) e o solvente B (TFA à 0,1% em acetonitrila). A detecção em CLAE foi realizada com o comprimento de onda de 220 e 280 nm para os peptídeos sem o grupo protetor NPys e de 220 e 340 nm para os peptídeos contendo o grupo NPys. Os peptídeos

purificados foram caracterizados por Espectroscopia de Massas MALDI-TOF com uso de HCCA como matriz (BYRNE et al., 2012).

## 4.2 - Os estudos biológicos

### 4.2.1 - Materiais

- Meio de cultura CHO-K1: DMEM/F-12 modificado com L-glutamina e fenolsulfoftaleína, e sem HEPES (Life Technologies).
- Meio de cultura MCF-7: DMEM modificado com glicose, L-glutamina e fenolsulfoftaleína, sem piruvato de sódio e HEPES (Life Technologies).
- HBSS: Solução de Sal Hanks' Balanceado com cálcio, magnésio, glicose e bicarbonato de sódio, sem fenolsulfoftaleína (Life Technologies).
- Tripsina: 0,05% de tripsina em EDTA (Life Technologies).
- SBF: Soro Bovino Fetal (Life Technologies).
- SBF-D: Soro Bovino Fetal sem esteroide (Sigma Aldrich).
- Tampões.

**Tampão A** – 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) e 0,1 mg/mL BSA em H<sub>2</sub>O;

**Tampão B** - 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mg/mL BSA e 0,1% SDS em H<sub>2</sub>O;

**Tampão C** - 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mg/mL BSA e 1,0 M em H<sub>2</sub>O;

- Solução de lise: 0,3% triton-X<sub>100</sub>, 1 M NaCl, 2mM DTT em H<sub>2</sub>O;
- Inibidor da tripsina: 5 mg/mL em H<sub>2</sub>O;
- DTT: solução 100 mM em Tris 50 mM;
- TCEP: solução 2 mM em Tris 50 mM;
- Fluorstar
- MALDI TOF: ABI Voyager DE-Pro MALDI TOF Voyager Elite PerSeptive Biosystems mass spectrometer (Applied Biosystems); modo refletor ABI; placa inox.



#### 4.2.2. Metodologias

##### 4.2.2.1. Preparação das células

As células foram cultivadas em placas de petri em meio contendo 10% SBF em DMEM em estufas de incubação à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para replicar, as células foram lavadas com HBSS (10 mL) e em seguida foi adicionado tripsina (1mL, 5 min à 37°C) para descolar as células. Para inibir a ação da tripsina, foi adicionado o meio de cultura contendo 10% SVF em DMEM (10 mL). Essa solução contendo as células foi homogeneizada e transferida uma alíquota 12 µL para uma placa de contagem.

##### 4.2.2.2. Toxidez e proliferação

Para esses estudos foram utilizadas placas contendo 96 poços e acrescentadas 100 µL de uma solução contendo as células CHO-K1 e MCF-7 para obter 2500 células/poço ao replicar.

Após um dia as células estavam aderidas sobre a placa e então os poços foram lavados com HBSS (100 µL) e adicionadas as soluções contendo os peptídeos (7,5 µM; 100 µL/poço). As células CHO-K1 foram incubadas durante 1h em meio de cultura contendo DMEM e 10% SBF em DMEM. E as células MCF-7 foram incubadas por um período de 1h, 24h, 48h e 72h, em meios de cultura contendo DMEM (apenas para 1h de incubação), 10% SBF em DMEM e 10% SBF-D em DMEM para os demais períodos de incubação.

Após a incubação, os poços foram lavados com HBSS (100 µL) e a solução contendo 10% CCK8 em DMEM foi adicionada (100 µL durante 1h). As medições foram realizadas com o equipamento Fluorstar com a detecção em 450 e 620 nm e os valores de absorbância foram tabelados em planilha de Excel.

Foi constatada que as células estavam aptas para os ensaios toxidez e proliferação após 72h de incubação com 2500 células/poço no dia da replicação.

#### 4.2.2.3. Procedimento Geral para Internalização

As células CHO-K1 foram replicadas em placas contendo 12 poços com 1 milhão de células/poço e foram utilizados 500  $\mu$ L da solução contendo os peptídeos conjugados com a concentração de 7,5  $\mu$ M em meios contendo DMEM com a presença e ausência de 10% SBF.

As células MCF-7 foram replicadas em placas contendo 6 poços com 1,3 milhões de células/poço e foram utilizados 1000  $\mu$ L da solução contendo os peptídeos conjugados com a concentração de 7,5  $\mu$ M em meios contendo DMEM com a presença ou ausência de 10% de SBF e SBD-D.

As soluções dos peptídeos foram incubados por 1h 15min em banho-maria à 37°C. Após a incubação os poços foram lavados com HBSS (2 x 1 mL) para remover o excesso do peptídeo que não foi internalizado e adicionado TCEP (200  $\mu$ L, 2mM) por 1 minuto para eliminar possíveis pontes de sulfeto do peptídeo com a membrana plasmática.

Em células CHO-K1, antes da ação da tripsina, a solução TCEP foi removida por aspiração e os poços foram lavados com HBSS. Essa etapa foi suprimida em células MCF-7.

As células foram descoladas pela ação da tripsina (500  $\mu$ L durante 5 min à 37°C) e a ação da tripsina foi inibida com a adição de 100  $\mu$ L da solução contendo o inibidor de tripsina e 100  $\mu$ L de BSA.

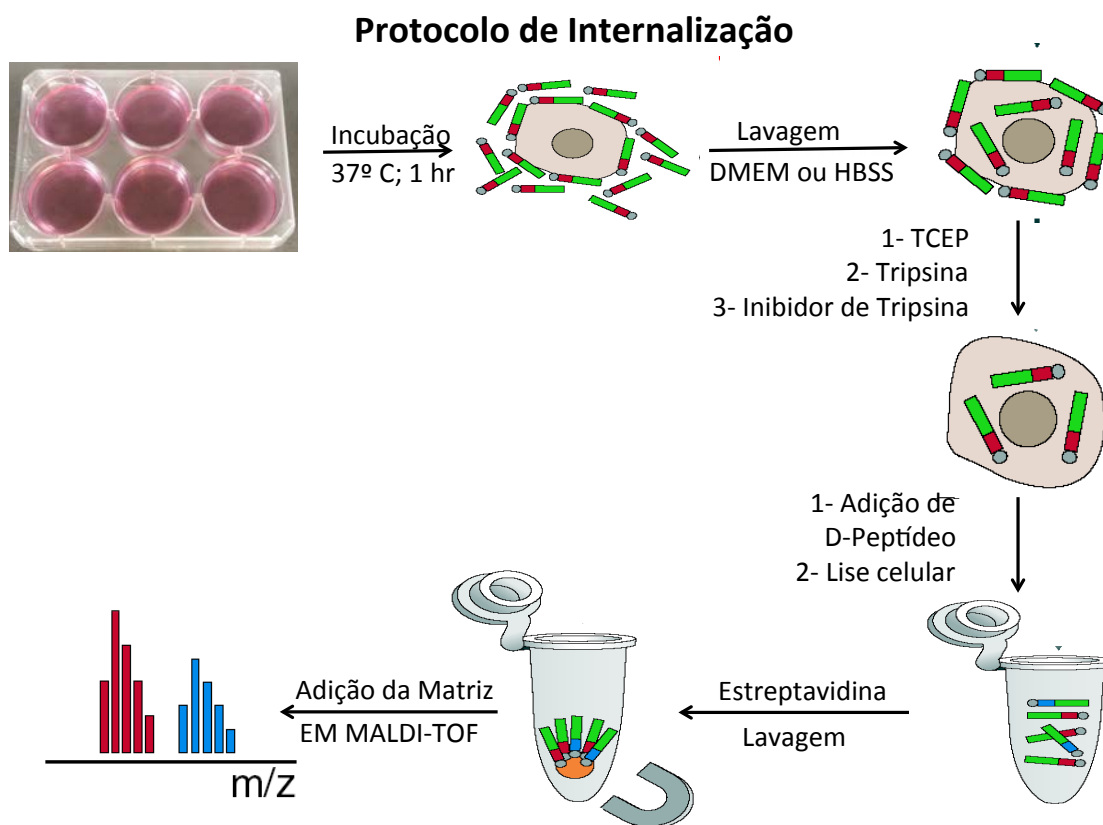
As células em suspensão foram transferidas para um eppendorf e o poço lavado com Tris 50 mM (500  $\mu$ L) para evitar perdas de células. Os extratos foram centrifugados (2 min à 3000 rpm), lavados com o tampão A (500  $\mu$ L) e novamente centrifugados. O sobrenadante foi removido e foi acrescentada a solução de lise celular (150  $\mu$ L) e o peptídeo deuterado, os eppendorfs foram homogeneizados por agitação, aquecido em banho Maria durante 15 min à 100°C e centrifugado em alta rotação (5 min à 10 000 rpm). O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf que continha as soluções de DTT (100 mM; 10  $\mu$ L), Tris BSA (850  $\mu$ L) e estreptavidina M<sub>280</sub> (10  $\mu$ L) durante 1h em agitação.

As etapas de lavagem (**Tabela 6**) foram realizadas com um auxílio de um suporte magnético e com o procedimento de lavagem contendo a solução azul.

**Tabela 6** – Protocolo de lavagem e remoção dos fragmentos das células.

<b>Procedimento de Lavagem</b>
2 x 200 $\mu$ L Tampão A
1 x 50 $\mu$ L Bleu (50 °C; 10 minutos)
1 x 200 $\mu$ L Tampão A
2 x 200 $\mu$ L Tampão B
2 x 200 $\mu$ L Tampão C
2 x 200 $\mu$ L H <sub>2</sub> O
1 x 500 $\mu$ L TCEP (2 mM)
1 x 100 $\mu$ L H <sub>2</sub> O
1 x 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O
1 x 50 $\mu$ L Biotina (10 $\mu$ M; 1 minuto)
1 x 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O
1 x 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O:AcCN (1:1)
3 $\mu$ L HCCA

Ao fim, todo o sobrenadante foi eliminado e a estreptavidina M<sub>280</sub> foi misturada com 3  $\mu$ L de matriz HCCA durante 10 min, em seguida a estreptavidina M<sub>280</sub> foi novamente isolada e 1  $\mu$ L da solução foi depositada sobre a placa metálica utilizada na Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (**Figura 18**).



**Figura 18** – Protocolo de quantificação do peptídeo internalizado.

#### 4.2.2.4. Ajuste da Metodologia de Internalização

O protocolo de internalização foi executado em células CHO-K1 e MCF-7. Porém, antes de começar essa etapa do trabalho foram realizadas adaptações na metodologia. As observações foram sobre os efeitos da solução de TCEP antes a ação da tripsina; a comparação dos procedimentos de lavagem tradicional com o acréscimo da solução azul (**Tabela 7**); e a adesão das células MCF-7 em placas de 6 e 12 poços.

**Tabela 7** – Ajuste do protocolo de lavagem.

<b>Lavagem tradicional</b>	<b>Lavagem com solução Bleu</b>
2 x 200 $\mu$ L Tampão A	2 x 200 $\mu$ L Tampão A
2 x 200 $\mu$ L Tampão B	1 x 50 $\mu$ L Bleu (50 °C; 10 minutos)
2 x 200 $\mu$ L Tampão C	1 x 200 $\mu$ L Tampão A
2 x 200 $\mu$ L H <sub>2</sub> O	2 x 200 $\mu$ L Tampão B
1 x 500 $\mu$ L TCEP (2 mM)	2 x 200 $\mu$ L Tampão C
1 x 100 $\mu$ L H <sub>2</sub> O	2 x 200 $\mu$ L H <sub>2</sub> O
1 x 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O	1 x 500 $\mu$ L TCEP (2 mM)
1 x 50 $\mu$ L Biotina (10 $\mu$ M; 1 minute)	1 x 100 $\mu$ L H <sub>2</sub> O
1 x 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O	1 x 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O
1 x 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O:AcCN (1:1)	1 x 50 $\mu$ L Biotina (10 $\mu$ M; 1 minuto)
3 $\mu$ L HCCA	1 x 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O
	1 x 50 $\mu$ L H <sub>2</sub> O:AcCN (1:1)
	3 $\mu$ L HCCA

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## 5.1. Síntese dos Peptídeos

A eficiência das sínteses das sequências peptídicas foram comprovadas pelos resultados obtidos nas análises de CLAE e Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (Tabela 8).

**Tabela 8**– Dados detalhado das análises de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF e CLAE.

Produtos	CLAE Analítico			CLAE Preparativo			MALDI-TOF
	T. Retenção	Método (B/A)	T. Retenção	Método (B/A)	T. Retenção		
<b>O Peptídeo ERα17p e seus derivados</b>							
P1 H-ERα17p-OH	7,1 min		9,1 min	15%-40%; 30 min; 14,0 mL.min <sup>-1</sup> ; λ=220/280 nm**		1899,8909	
P2 Ac-ERα17p-C-NH <sub>2</sub>	7,7 min	5% - 60%; 10 min; 1,0 mL.min <sup>-1</sup> ; λ=220/280 nm*	13,2 min			2045,0438	
P3 Biot(O <sub>2</sub> )-Gly <sub>4</sub> -ERα17p-OH	7,2 min		9,7 min	20%-35%; 30 min; 14,0 mL.min <sup>-1</sup> ; λ=220/280 nm*		2385,1372	
P4 Biot(O <sub>2</sub> )-Gly <sub>4</sub> -ERα17p-C-NH <sub>2</sub>	7,3 min		9,8 min			2488,0117	
PD Biot(O <sub>2</sub> )-Gly <sub>4</sub> -D-ERα17p-C-NH <sub>2</sub>	7,3 min		9,8 min			2496,0020	
<b>CPP's</b>							
V1 Ac-penetratina-NH <sub>2</sub>			11,3 min	20%-35%; 30 min; 14,0 mL.min <sup>-1</sup> ; λ=220/280 nm**		2286,1523	
V2 Ac-RW <sub>9</sub> -NH <sub>2</sub>			9,9 min	15%-40%; 30 min; 14,0 mL.min <sup>-1</sup> ; λ=220/280 nm**		1554,8575	
V3 Ac-R <sub>9</sub> -NH <sub>2</sub>			9,9 min	5%-35%; 30 min; 14,0 mL.min <sup>-1</sup> ; λ=220/280 nm**		1464,9456	
V4 Ac-C(NPys)-penetratina-NH <sub>2</sub>	8,1 min	5% - 60%; 10 min; 1,0 mL.min <sup>-1</sup> ; λ=220/340 nm*	5,1 min	27%-35%; 10 min; 10,0 mL.min <sup>-1</sup> ; λ=220/340 nm***		2391,0297	
V5 Ac-C(NPys)-RW <sub>9</sub> -NH <sub>2</sub>	7,1 min		25,0 min	5%-35%; 30 min; 14,0 mL.min <sup>-1</sup> ; λ=220/340 nm*		1658,0120	
V6 Ac-C(NPys)-R <sub>9</sub> -NH <sub>2</sub>	4,5 min		11,5 min			1567,9084	
<b>Peptídeos Conjugados</b>							
C1 Biot(O <sub>2</sub> )-Gly <sub>4</sub> -ERα17p-C-NH <sub>2</sub>	7,5 min		12,3 min			2390,3496;	
Ac-C-penetratina-NH <sub>2</sub>						2488,3499	
C2 Biot(O <sub>2</sub> )-Gly <sub>4</sub> -ERα17p-C-NH <sub>2</sub>	7,5 min	5% - 60%; 10 min; 1,0 mL.min <sup>-1</sup> ; λ=220/340 nm*	12,0 min	20%-35%; 30 min; 14,0 mL.min <sup>-1</sup> ; λ=220/340 nm**		1657,9479;	
Ac-C-RW <sub>9</sub> -NH <sub>2</sub>						2488,4092	
C3 Biot(O <sub>2</sub> )-Gly <sub>4</sub> -ERα17p-C-NH <sub>2</sub>	7,0 min		8,9 min			1567,9597;	
Ac-C-R <sub>9</sub> -NH <sub>2</sub>						2488,3555	

Solventes: A = H<sub>2</sub>O (99,9%); TFA (0,1%); B = AcCN (99,9%); TFA (0,1%);

\*Proto 200; C18; 3µm; 100x4,6 mm; Débit: 1,0 mL/min; Pump: Ultimate 3000; Detector: Ultimate 3000 RS Variable Wavelength;

\*\*Macherey-Nagel; C18; 5µm; 16 x 260 mm; Débit: 14 mL/min; Pump: Waters 2535 Quaternary Gradient Module; Detector: Waters 2489 UV/Visible;

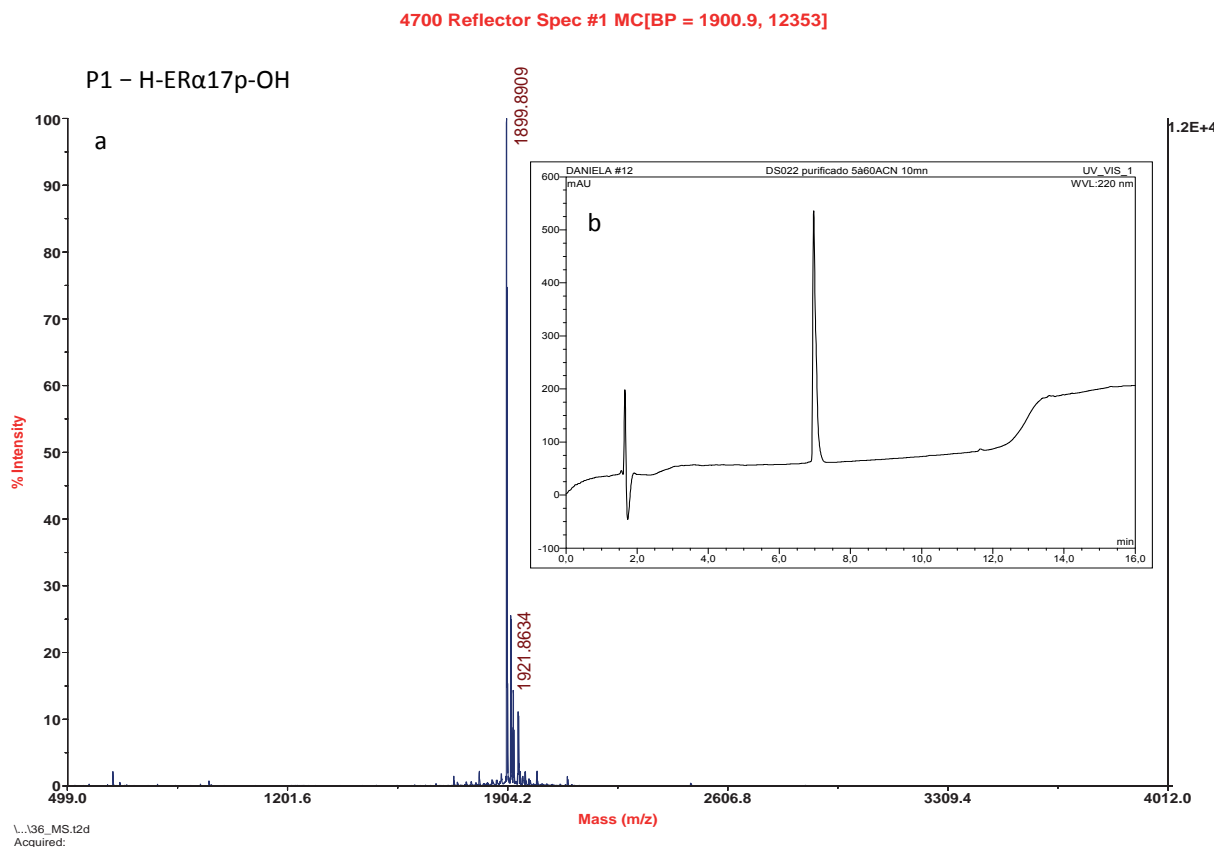
\*\*\* X-Bridge; C18; 3µm; 19 x 50 mm; Débit: 10 mL/min; Pump: Waters 600; Detector: Waters 2487 Dual λ Absorbance;

Durante a etapa de purificação do ER $\alpha$ 17p e dos seus derivados observou-se a formação de finas fibras e/ou a formação de gel, o que dificultou a solubilização desses peptídeos. Foi desenvolvido um procedimento para aumentar a solubilidade desse produto, que consistiu em preparar uma solução 10% v/v de AcCN em água aquecida até o início da ebulição e adicionar o peptídeo em agitação com movimentos circular. Após a adição completa do peptídeo, a solução foi transferida para o banho na frequência de ultrassom de 3 à 5 minutos, em constante agitação.

Os dois efeitos observados durante a execução desse trabalho já tem sido estudados, pelo grupo de pesquisa do laboratório de biomoléculas da UPMC, para avaliar as características físico-químicas tanto do gel como das fibras que são formadas ao solubilizar o peptídeo em água a temperatura ambiente. Até o momento sabe-se que a concentração do ER $\alpha$ 17p define a formação das fibras ou do gel, porém, por questão de confiabilidade dos dados, não puderam ser especificados os valores máximos e mínimos para a cada caso.

O peptídeo ER $\alpha$ 17p e seus derivados foram purificados em CLAE preparativo, as massas comprovadas por análises de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF e obtido o perfil cromatográfico em CLAE analítico. A primeira sequência peptídica a ser clivada e caracterizada correspondeu ao P1 - H-PLMIKRSKKNLSLALSLT-OH (**Figura 19**).

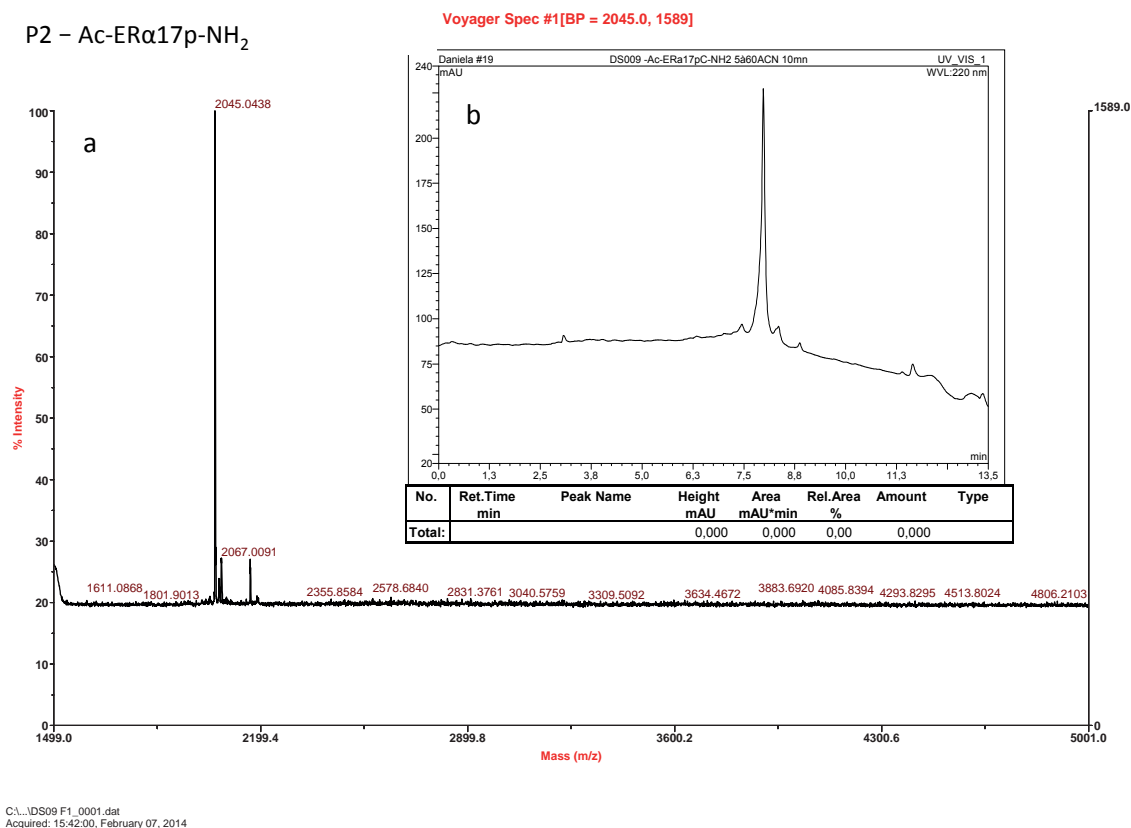




**Figura 19** – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo P1 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo P1 após purificação por CLAE analítico.

O sucesso da síntese do peptídeo P1 foi confirmado pelo perfil cromatográfico obtido em CLAE analítico e pela análise de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF que apresentou os fragmentos de massa 1899,8909 e 1921,8634  $m/z$ , correspondente aos íons  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$ , condizente com a massa molecular teórica 1900,36 u (**Figura 19**).

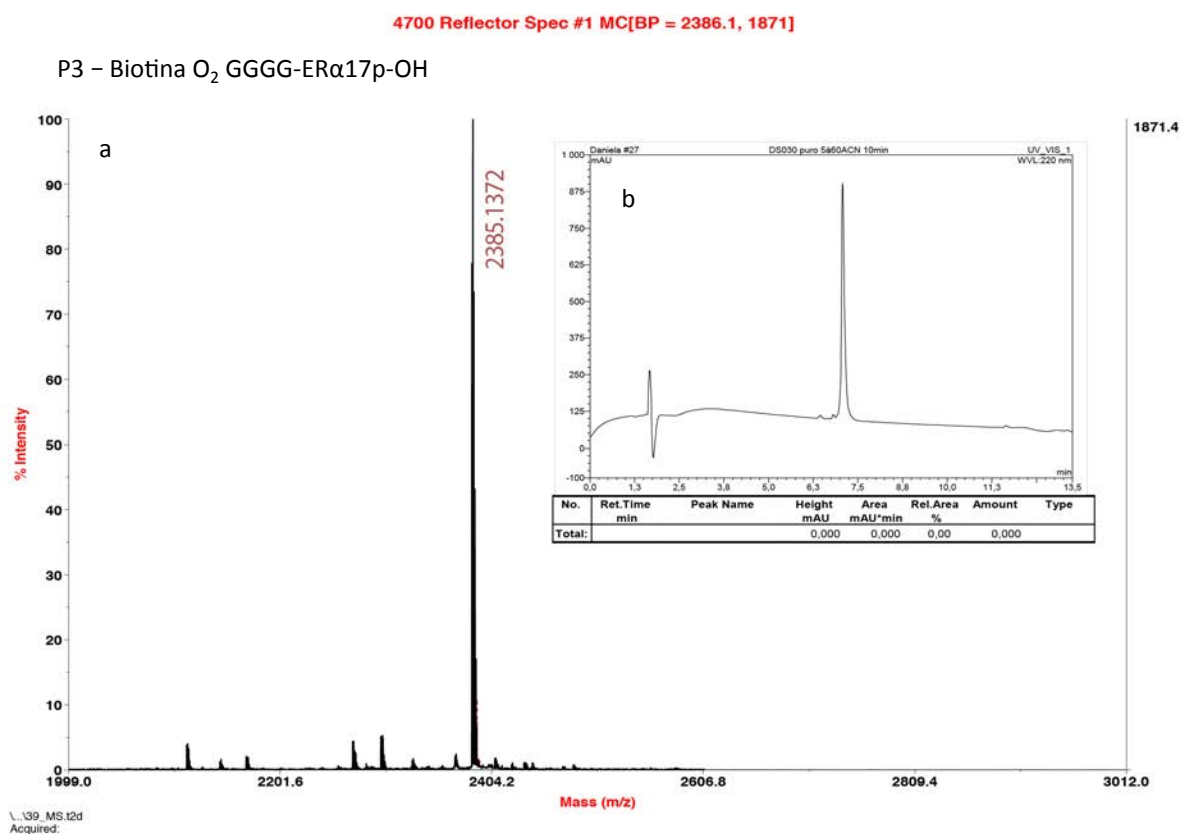
A caracterização e identificação do peptídeo P1 comprovou a eficiência do método automático para a síntese da sequência base do peptídeo ER $\alpha$ 17p. A etapa seguinte consistiu em modificar a sequência P1 com acréscimo de um resíduo cisteína terminal, para possibilitar a ligação dissulfeto com os CPP's, e acetilar o grupo carboxila livre, para obter o peptídeo P2 - Ac-PLMIKRSKNSLALS LTC-NH<sub>2</sub> (**Figura 20**).



**Figura 20** – a. Espectro de Massa em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo P2 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo P2 após purificação por CLAE analítico.

A síntese do peptídeo P2 foi confirmada pelo perfil cromatográfico obtido em CLAE analítico e pelos fragmentos de massa majoritários 2045,0438 e 2067,0091  $m/z$ , correspondentes, respectivamente, aos íons  $[M+H]^+$  e  $[M+Na]^+$  em análise de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF, condizente com a massa molecular teórica 2044,55 u dessa sequência (**Figura 20**).

Para a obtenção do peptídeo P3 – BiotinaO<sub>2</sub>-GGGG-PLMIKRSKKNLALSLOH, a sequência P1 foi modificada com acréscimo de quatro resíduos de glicina e biotina, por método manual descrito pelo procedimento 4.1.2.3. Essas modificações foram necessárias para possibilitar estudos de toxidez, proliferação e absorção dessa sequência peptídica em células CHO-K1 e MCF-7. As modificações foram comprovadas pelo perfil cromatográfico obtido em CLAE analítico e pela Espectrometria de Massa MALDI-TOF (**Figura 21**).



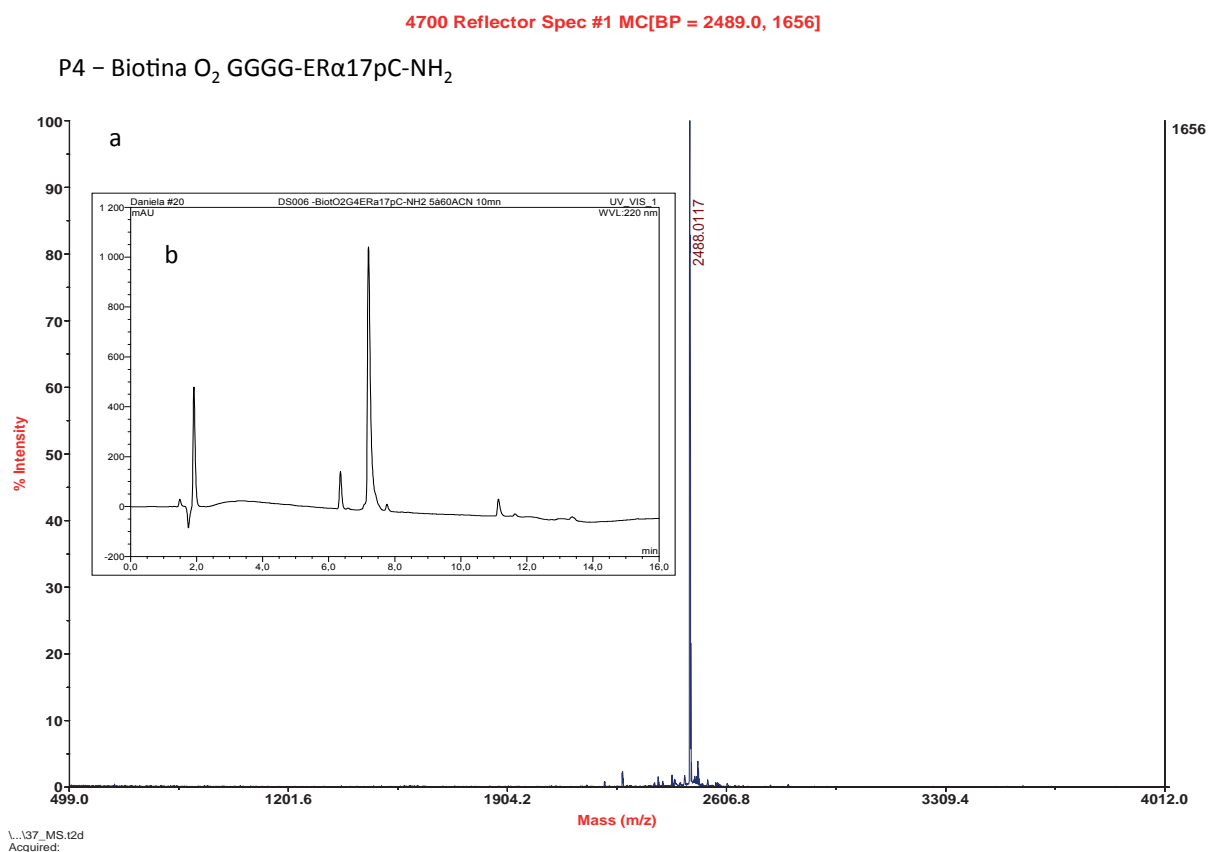
**Figura 21** – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo P3 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo P3 após purificação por CLAE analítico.

Os novos acoplamentos foram comprovados na análise de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF pelo pico 2385,1372  $m/z$ , condizente com a massa molecular teórica 2385,29 u.

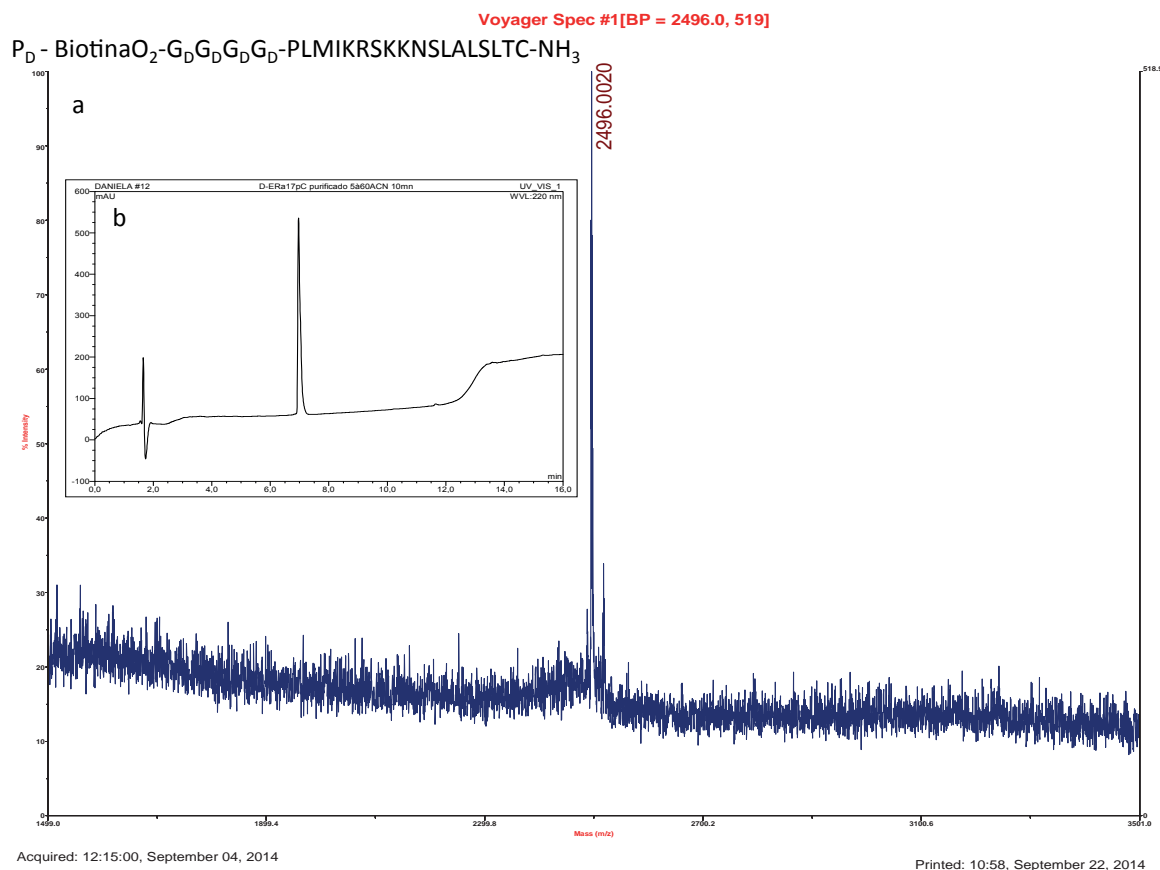
A sequência P2 recebeu duas modificações: a primeira o acoplamento de quatro resíduos de glicina e biotina, para a obtenção do peptídeo P4 - BiotinaO<sub>2</sub>-GGGG-PLMIKRSKKNLALSLTC-NH<sub>2</sub> (**Figura 22**); e a segunda o acoplamento de quatro resíduos de glicina deuturada e biotina, para a obtenção do peptídeo P<sub>D</sub> - BiotinaO<sub>2</sub>-G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>G<sub>D</sub>-PLMIKRSKKNLALSLTC-NH<sub>2</sub> (**Figura 23**). Ambas modificações foram realizadas por método manual descrito pelo procedimento 4.1.2.3.

Além dos estudos de toxidez e proliferação, as modificações foram importantes para possibilitar marcações indispensáveis no estudo de internalização.

O peptídeo P<sub>D</sub> foi utilizado como controle e permitiu quantificar por comparação o peptídeo P4 internalizados em células CHO-K1 e MCF-7. As modificações foram comprovadas em análises de Espectrometria de Massas MALDI-TOF e pelo perfil cromatográfico em CLAE analítico (**Figura 22** e **Figura 23**).



**Figura 22** – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo P4 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo P4 após purificação por CLAE analítico.



**Figura 23** – a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo  $P_D$  após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo  $P_D$  após purificação por CLAE analítico.

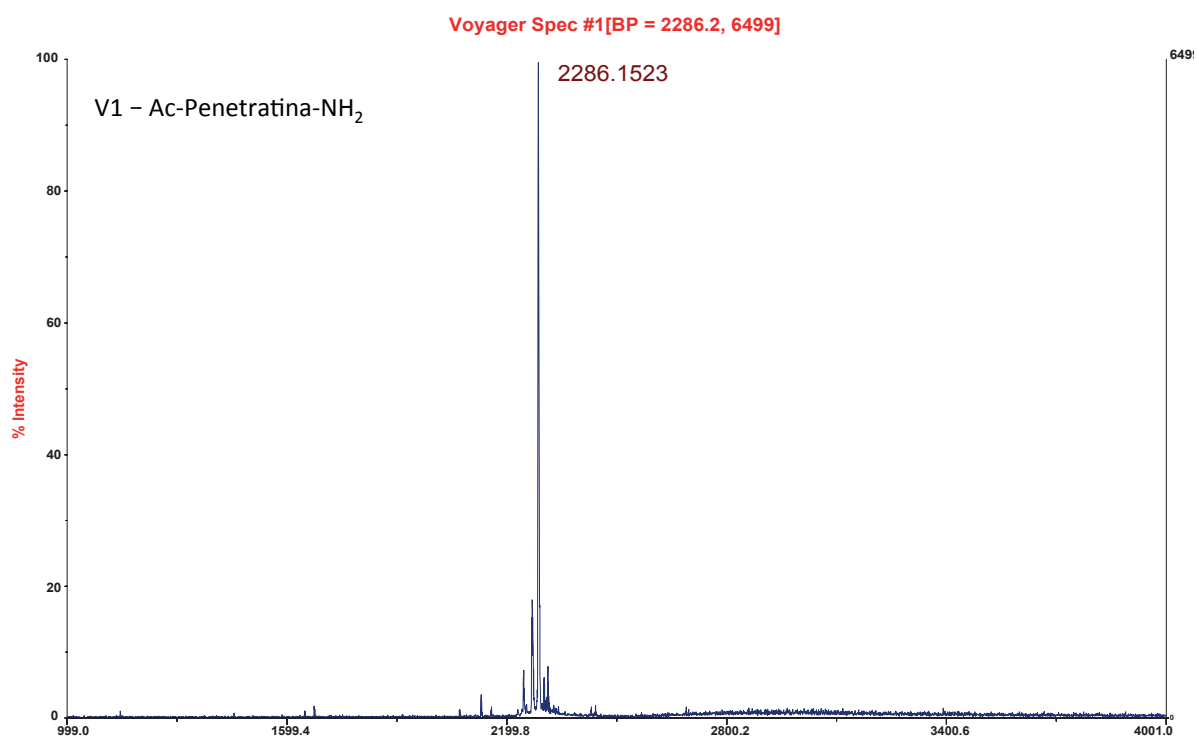
Os novos acoplamentos foram comprovados na análise de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF pelo fragmento 2488,0117  $m/z$  (**Figura 22**), condizente com a massa molecular teórica 2487,31 u do peptídeo P4 e pelo fragmento 2496,0020  $m/z$  (**Figura 23**), condizente com a massa molecular teórica 2497,00 u do peptídeo  $P_D$ .

A etapa seguinte consistiu na síntese das sequências bases dos CPP's. As sequências principais dos CPP's RW<sub>9</sub> e Penetratina foram sintetizados de forma rápida e eficiente, sendo obtidos em um único procedimento de síntese, sem dificuldades durante as etapas de acoplamento, clivagem e purificação.

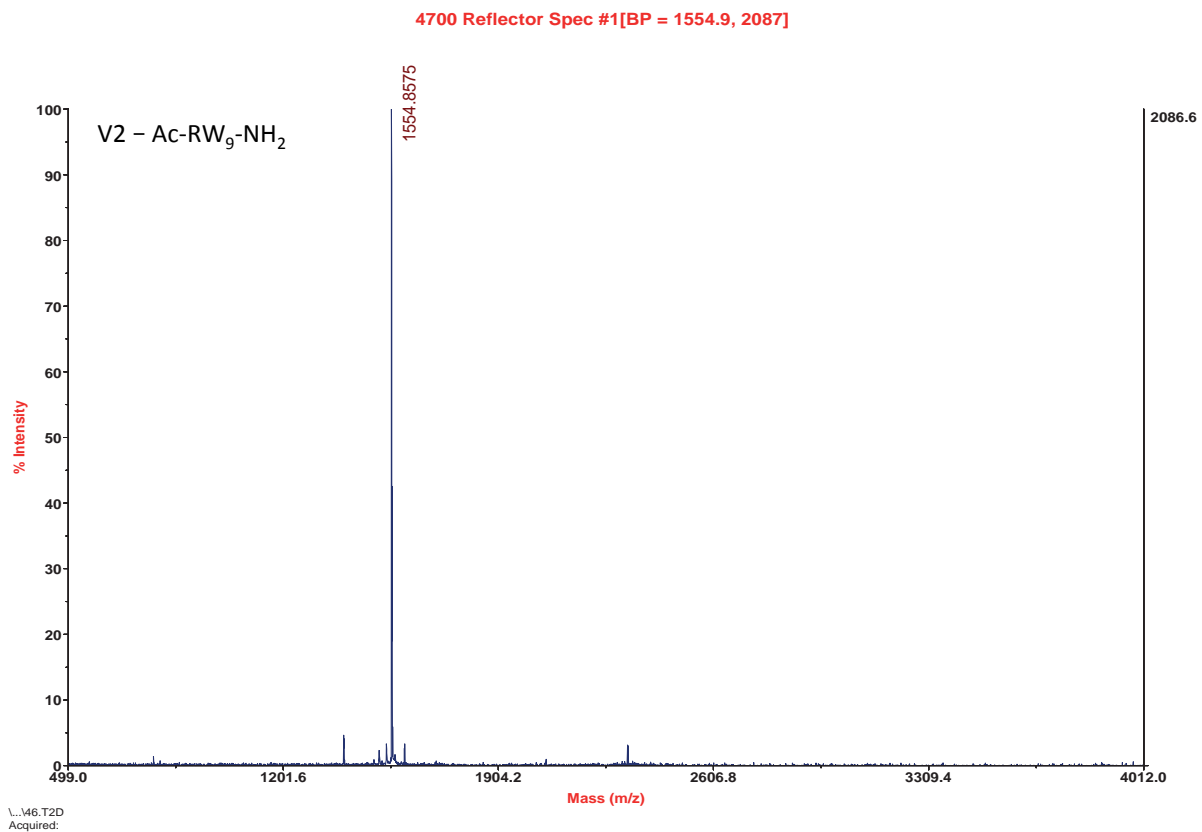
A síntese da sequência base do CPP R<sub>9</sub> exigiu uma atenção especial por se tratar de um polímero de cargas catiônicas. As etapas de síntese e caracterização foram reproduzidas três vezes até alcançar o produto desejado em massa significativa. Mesmo com o auxílio do teste da Ninhidrina, para acompanhar as

etapas de desproteção e acoplamento, foram obtidos subprodutos poliméricos contendo sete, oito e até dez resíduos de arginina em proporção expressiva e a purificação pela diferença de polaridade entre os polímeros R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> e R<sub>10</sub> inviável por CLAE.

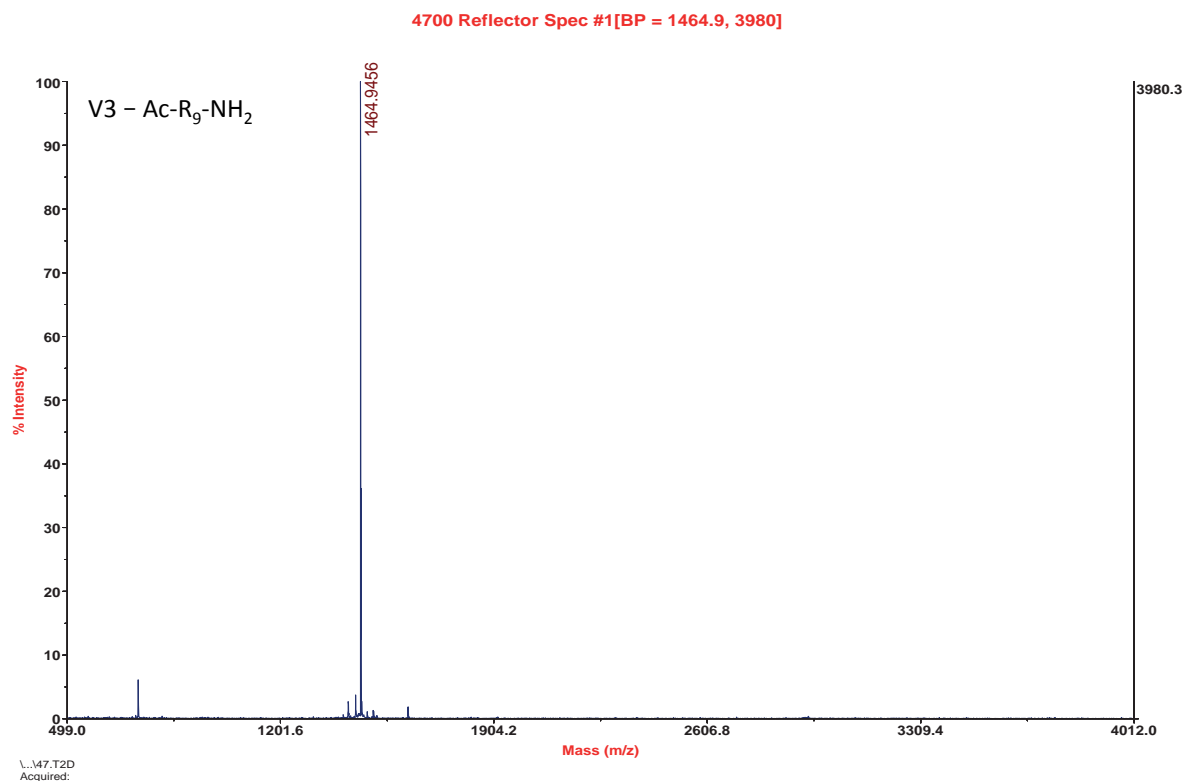
As sequências bases dos CPP's foram acetiladas antes da etapa da clivagem e a eficiência da síntese dos peptídeos V1 (**Figura 24**), V2 (**Figura 25**) e V3 (**Figura 26**) foram caracterizadas por análises de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF.



**Figura 24** - Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo V1 após purificação por CLAE preparativo.



**Figura 25** - Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo V2 após purificação por CLAE preparativo.

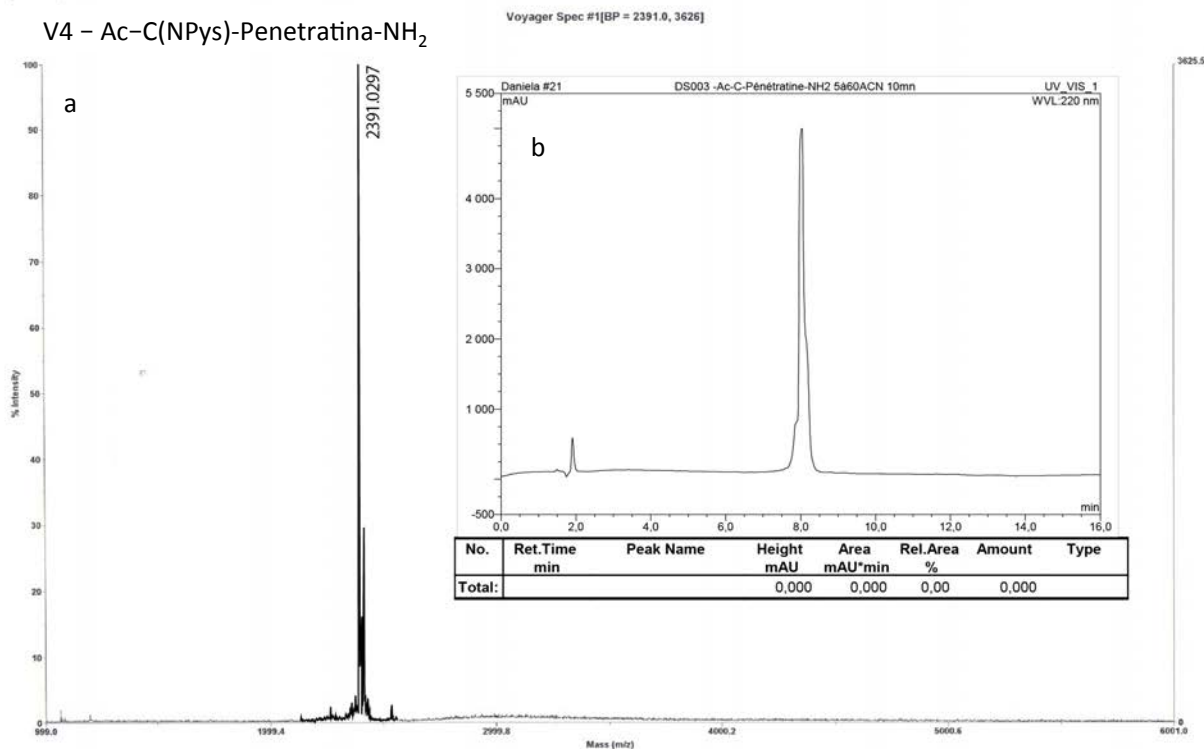


**Figura 26** - Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo V3 após purificação por CLAE preparativo.

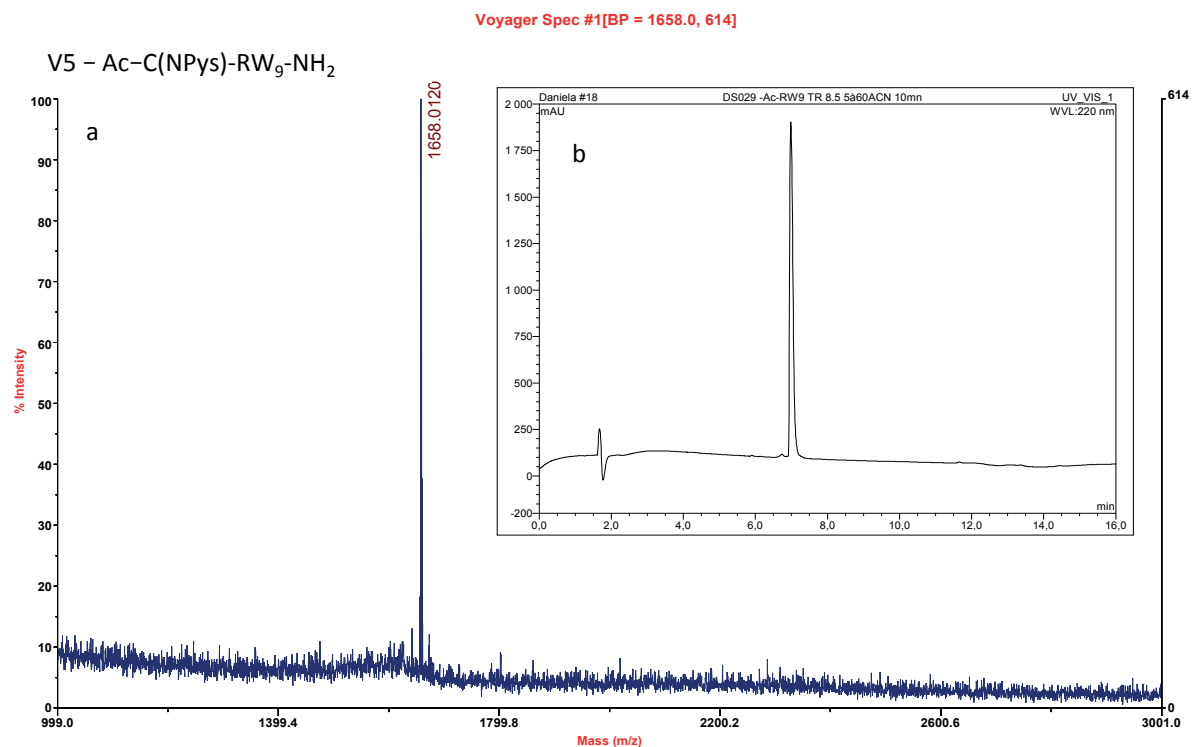
As sínteses dos CPP's foram comprovadas em análise de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF pelos fragmentos correspondente ao íons  $[M+H]^+$  2286,1523 (**Figura 24**), 1554,8575 (**Figura 25**) e 1464,9456 (**Figura 26**)  $m/z$ , condizentes com as respectivas massas moleculares teórica 2286,32, 1553,58 e 1463,95 u dos peptídeos V1, V2 e V3.

Ao confirmar a eficiência da síntese da sequência base dos CPP's, um resíduo Cis(NPys) foi acoplado e em seguida acetilado para possibilitar conjugar os CPP's ao peptídeo P4. As modificações às sequências bases dos CPP's foram confirmadas em análises de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF e pelo perfil cromatográfico obtidos em CLAE analítico.

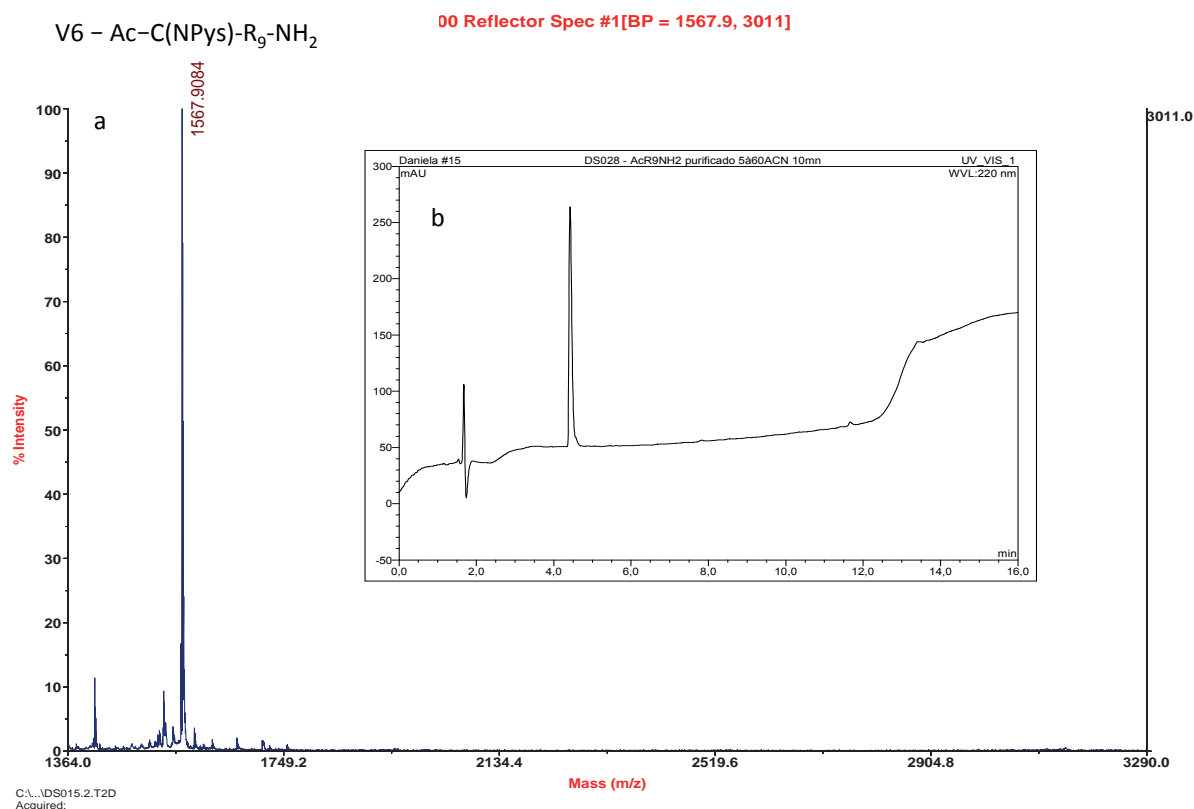




**Figura 27** - a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo V4 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo V4 após purificação por CLAE analítico.



**Figura 28** - a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo V5 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo V5 após purificação por CLAE analítico.



**Figura 29** - a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo V6 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo V6 após purificação por CLAE analítico.

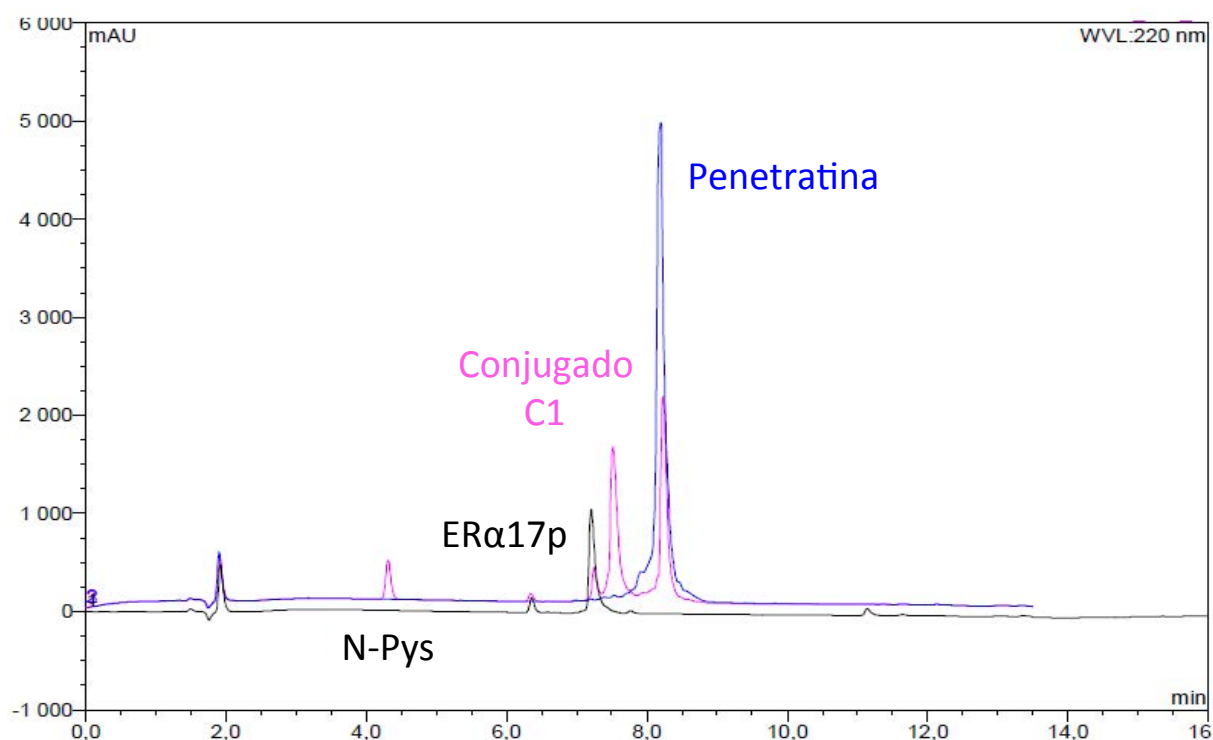
Os novos acoplamentos ao CPP's e a acetilação foram comprovados pelos fragmentos de massa 2391,0297 (**Figura 27**), 1658,0120 (**Figura 28**) e 1567,9084 (**Figura 29**)  $m/z$  em análise de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF, correspondente ao íons  $[M+H]^+$ , respectivamente dos peptídeos V4, V5 e V6. Condizente com a massa molecular teórica 2390,96, 1656,89 e 1566,96 u.

Após a conclusão das síntese dos peptídeos, o peptídeo P4 foi conjugado aos CPP's - V4, V5 e V6. A conjugação foi monitorada por CLAE analítico através de dois marcadores: i) a detecção do grupo protetor NPys do resíduo de cisteína do CPP's; ii) e a detecção de um novo produto – a detecção de um novo pico em análise de CLAE - com tempo de retenção diferente dos peptídeos isolados.

O grupo protetor NPys é detectado em comprimento de onda de 340 nm. Ao ocorrer a conjugação o grupo protetor NPys é abandonado durante a formação da ligação cistina e a detecção de um produto em comprimento de onda de 340 nm é

facilmente observada. Para os CPP's estudados neste trabalho e as condições do CLAE o grupo NPys foi detectado em tempo de retenção menor do que os CPP's e P4.

O outro marcador utilizado foi acompanhar a proporção do CPP's, do peptídeo P4 e de um novo pico formado. No t=0 minutos, foram identificados apenas dois picos nas análises de CLAE, um pico referente ao CPP e outro pico referente ao peptídeo P4. Durante a reação de conjugação houve a redução dos picos iniciais e formação um novo pico, no geral entre os dois picos anteriores, indicando o consumo dos peptídeos e a formação de um novo produto. Ao concluir a conjugação, a ausência de um dos picos iniciais foi o fator determinante. Neste trabalho o CPP foi utilizado em um ligeiro excesso, para garantir a conjugação total ao peptídeo P4 (**Figura 30**).

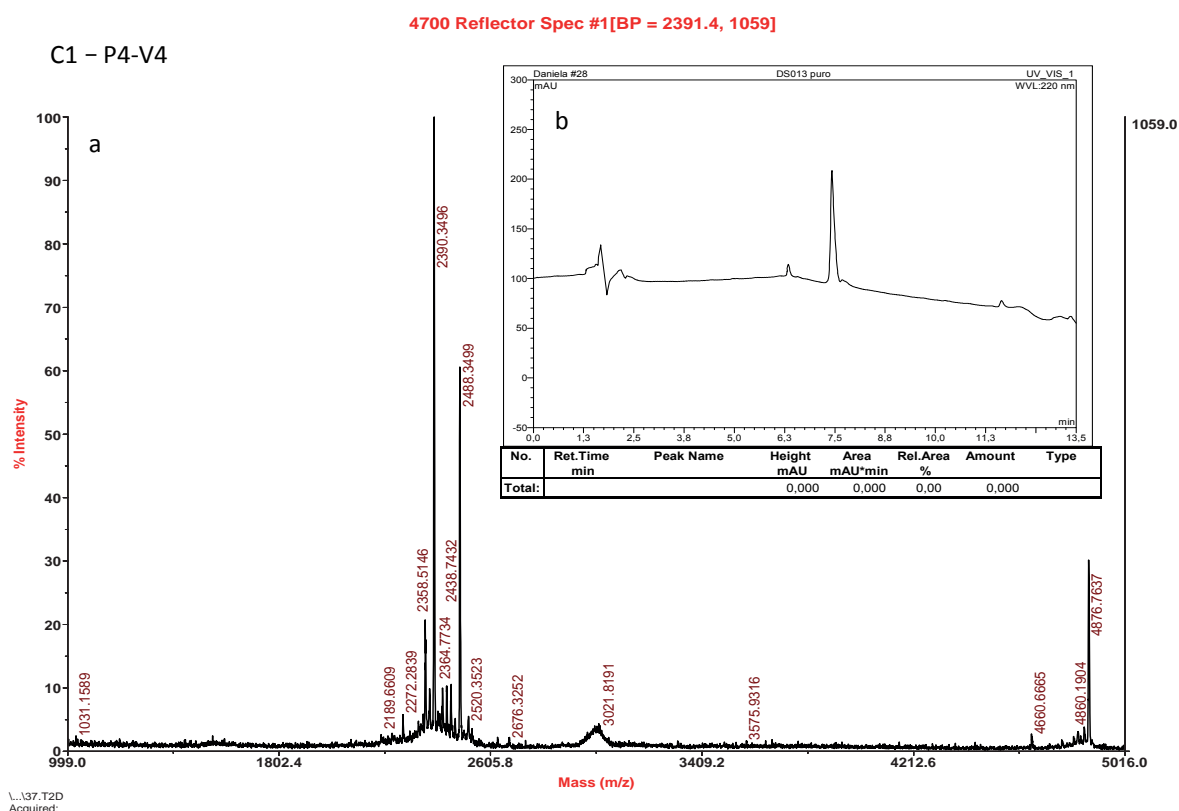


**Figura 30** - Peptídeo conjugado C1: reação de acoplamento do peptídeo P4 ao peptídeo V4 monitorada por CLAE analítico.

No monitoramento da reação de acoplamento entre P4 e V4 o perfil cromatográfico preto representa a solução de acetato de Buffer contendo o peptídeo P4, em azul a solução de acetato de Buffer contendo o peptídeo V4 e em rosa a

reação de acoplamento após 30 minutos de reação. Nesse perfil cromatográfico nota-se a redução dos picos referentes aos peptídeos P4 e V4 e o surgimento de um novo produto, o peptídeo conjugado C1 (**Figura 30**).

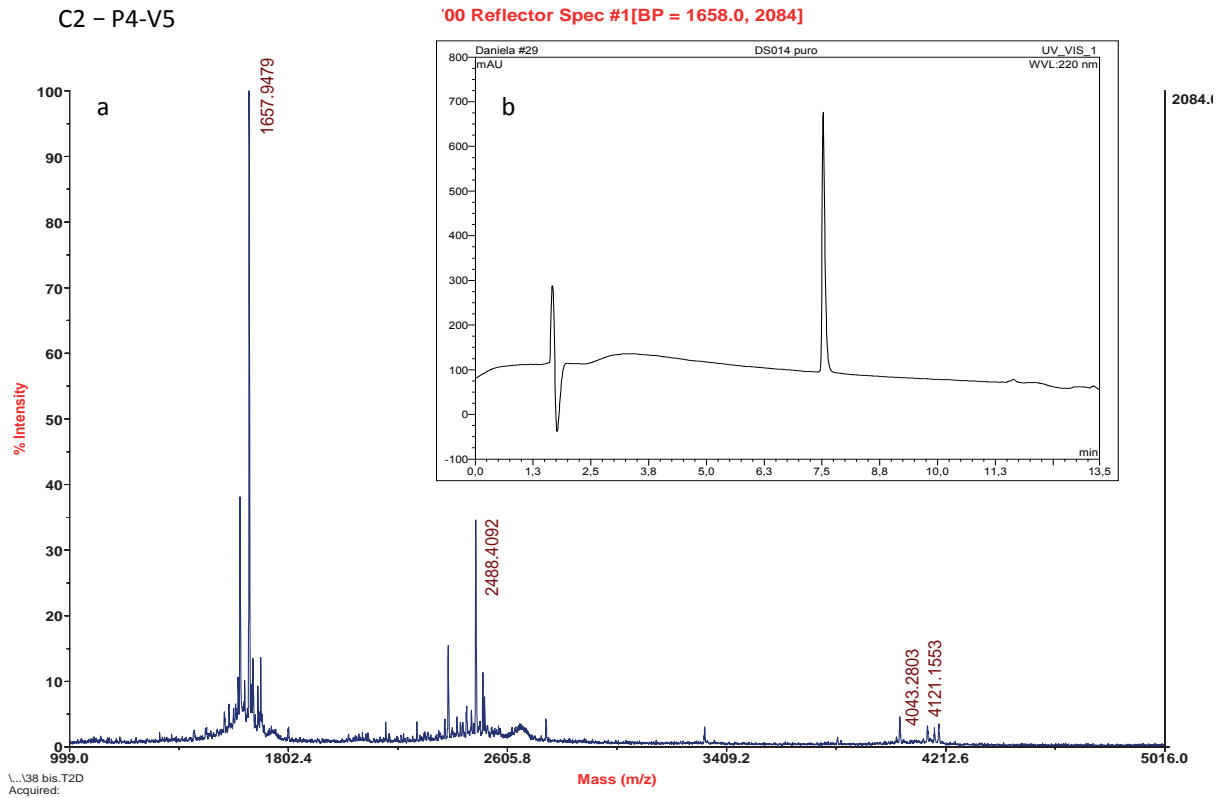
Após o consumo do peptídeo P4 a reação foi purificada em CLAE preparativo, o novo pico formado foi recuperado e submetido à análise de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF e obtido o perfil cromatográfico em CLAE analítico (**Figura 31**).



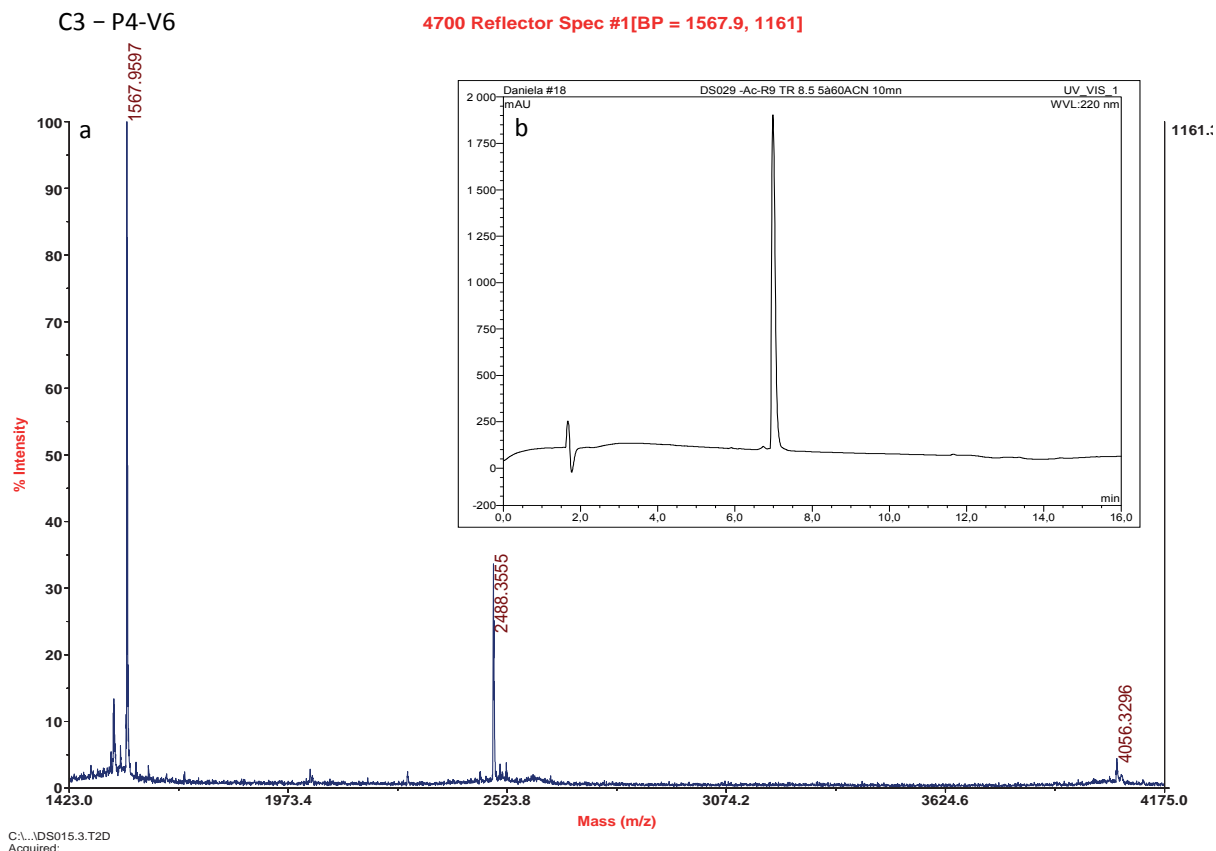
**Figura 31** - a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo C1 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo C1 após purificação por CLAE analítico.

O fragmento de massa correspondente ao peptídeo conjugado C1, 4876,7637  $m/z$ , é um valor aproximado da massa molecular teórica, 4864,62 u. Porém, os fragmentos correspondentes aos peptídeos P4 e V4 sem o grupo protetor (NPys), respectivamente 2488,3499 e 2390,3496  $m/z$ , são detectados em maior intensidade. Isso ocorre devido a ligação dissulfeto (S-S) ser facilmente quebrada na ionização em análise de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF.

Após a caracterização do peptídeo C1, foram realizados os procedimentos de conjugação do peptídeo P4 aos CPP's V5 e V6, purificação e caracterização dos peptídeos conjugados C2 (**Figura 32**) e C3 (**Figura 33**).



**Figura 32** - a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo C2 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo C2 após purificação por CLAE analítico.



**Figura 33** - a. Espectro de Massas em MALDI-TOF da amostra purificada da síntese do peptídeo C3 após purificação por CLAE preparativo; b. Perfil cromatográfico obtido do peptídeo C3 após purificação por CLAE analítico.

Assim como ocorreu na caracterização do peptídeo C1, a caracterização dos peptídeos C2 e C3 foi realizada pelo perfil cromatográfico por CLAE analítico, sendo detectado apenas um pico, e pelos fragmentos de massas correspondentes aos CPP's e P4, 1657,9479 e 2488,4092  $m/z$  (**Figura 32**) para o peptídeo C2 e 1567,9597 e 2488,3555  $m/z$  (**Figura 33**) para o peptídeo C3.

## 5.2. Testes Biológicos

Os testes biológicos foram realizados em células ER $\alpha$ + CHO-K1 e MCF-7.

A linha de célula CHO-K1 é derivada do tecido epitelial do ovário de hamster chinês. É utilizada nos estudos de biológicos e medicinal com caráter investigativo

de câncer de ovário (BUCKLEY et al., 1989).

A linha de célula MCF-7 foi extraída a partir do tecido tumoral mamário de uma mulher. Nos estudos referentes ao câncer de mama feminino essa linha de célula é amplamente utilizada (DOYLE et al., 1998).

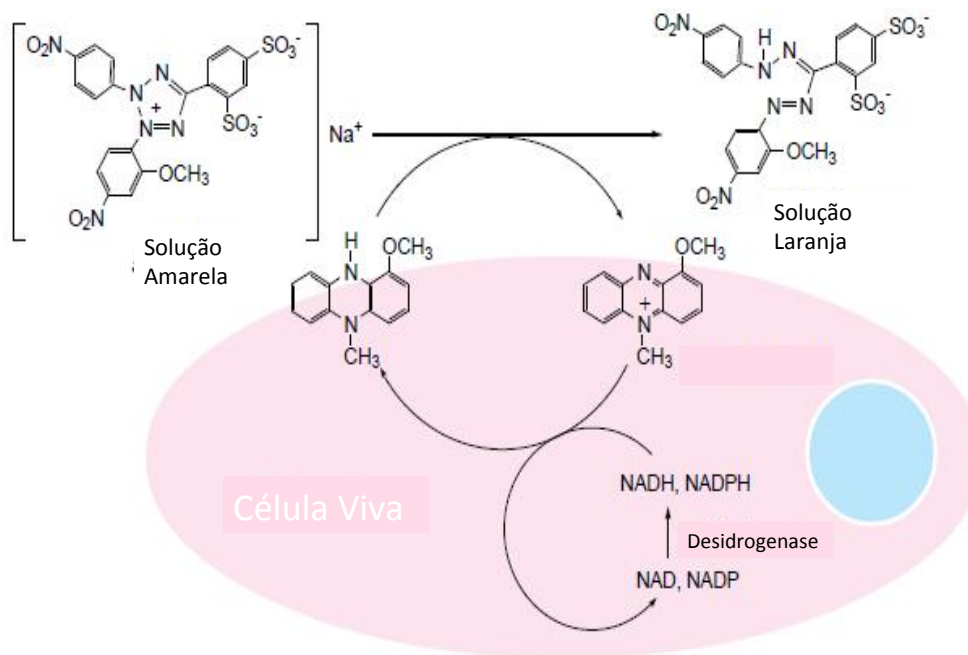
### 5.2.1. Toxicidade e Proliferação

O efeito da toxicidade da sequência peptídica *ER $\alpha$ 17p* em células de CHO-K1 e MCF-7 foram realizados com intuito de verificar se os peptídeos não apresentavam toxicidade nas condições necessárias para os estudos de internalização, concentração de 7,5 mM e uma hora de incubação; e avaliar a toxicidade dos peptídeo *ER $\alpha$ 17p* em incubação até 72 horas, para correlacionar com a ação esperada do peptídeo no meio intracelular.

A presença do SBF e SBF-D em DMEM foram importantes para simular as condições do meio intracelular necessárias para a ação do *ER $\alpha$ 17p* e para manter as células vivas durante o tempo necessário para os testes biológicos.

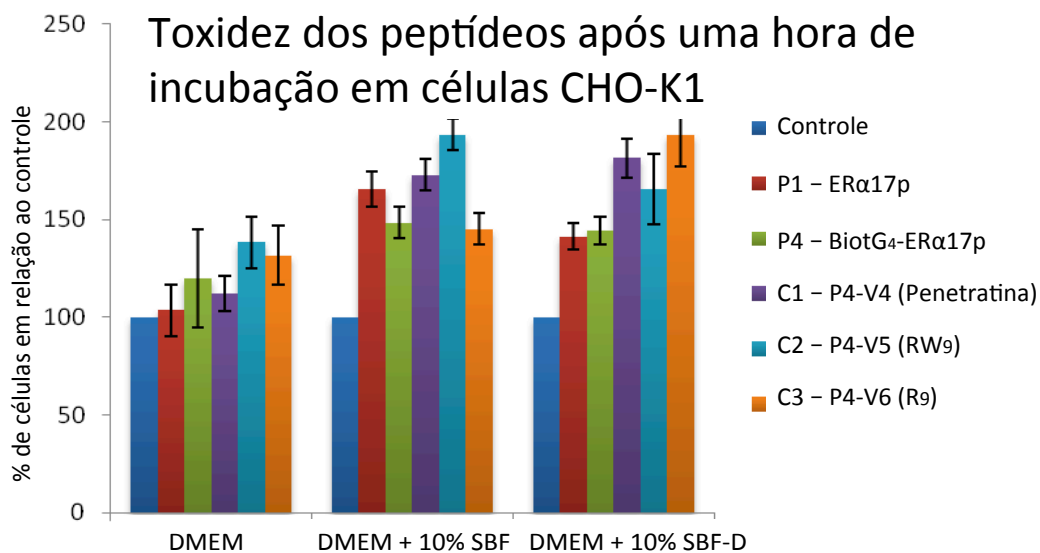
O SBF é uma substância composta por ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas, esteroides e fatores de crescimento e em solução de 10% promove o crescimento das células (MINGOTI; GARCIA; ROSA-E-SILVA, 1995). O SBF-D é um SBF sem esteroides que foi utilizado para verificar se essas moléculas influenciam na internalização e na ação do *ER $\alpha$ 17p*.

Os testes de toxicidade e proliferação em células de CHO-K1 foram realizados em triplicata em três, em replicações diferentes. Após a incubação dos peptídeos, as células vivas foi detectada pelo equipamento fluorstar que mede a intensidade da coloração laranja que as células vivas apresentam após absorver a solução CCK8 (**Figura 34**) (DOJINDO, 2017) .



**Figura 34** - Mecanismo de ação da solução CCK-8.

As células vivas foram estabelecida por uma relação percentual com células controle, poços que não receberam incubação dos peptídeos (**Figura 35**).



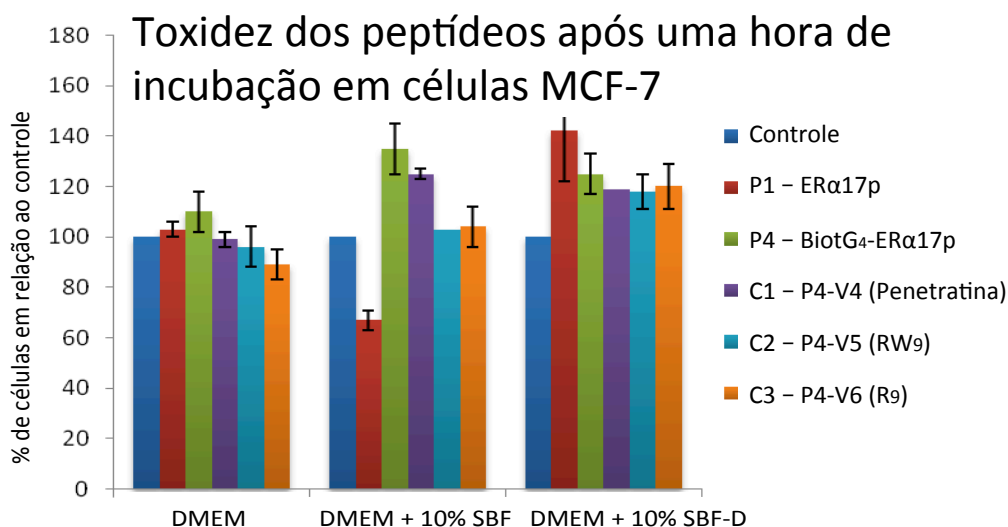
**Figura 35** - Quantificação das células CHO-K1 após 1 hora de incubação.

Em células de CHO-K1 os peptídeos estudados neste trabalho não apresentaram efeitos de toxicidade na concentração de 7,5 mM em um período de incubação de uma hora e nos diferentes meios de cultura. A presença do SBF e



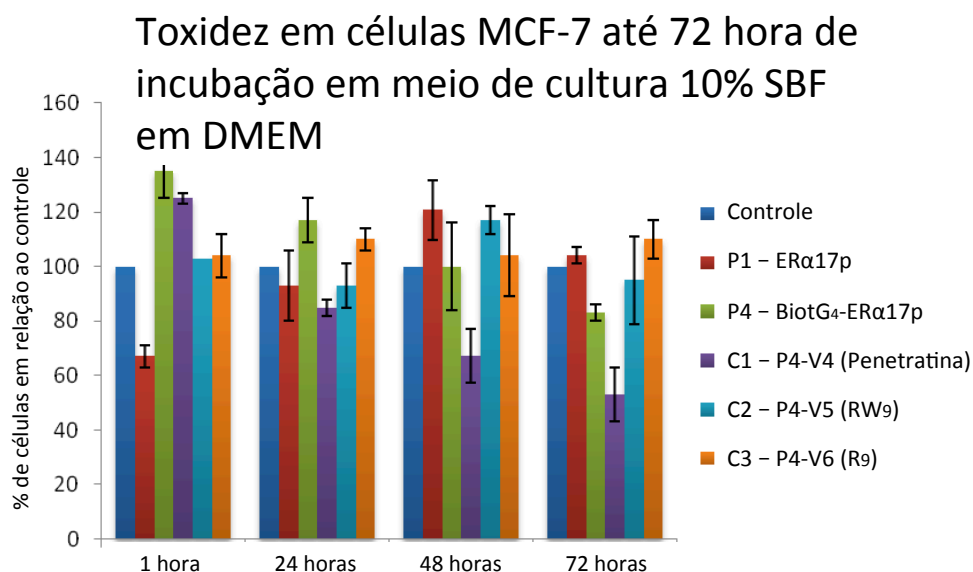
SBF-D propiciaram a proliferação celular em uma hora de incubação.

Em células de MCF-7 os estudos de toxicidade e proliferação foram realizados em triplicata em três replicações diferentes e as soluções contendo os peptídeos foram incubadas por 1 hora nos três meios de cultura (**Figura 36**), e por 24, 48 e 72 horas nos meios de cultura contendo 10% SBF (**Figura 37**) e 10%SBF-D (**Figura 38**).



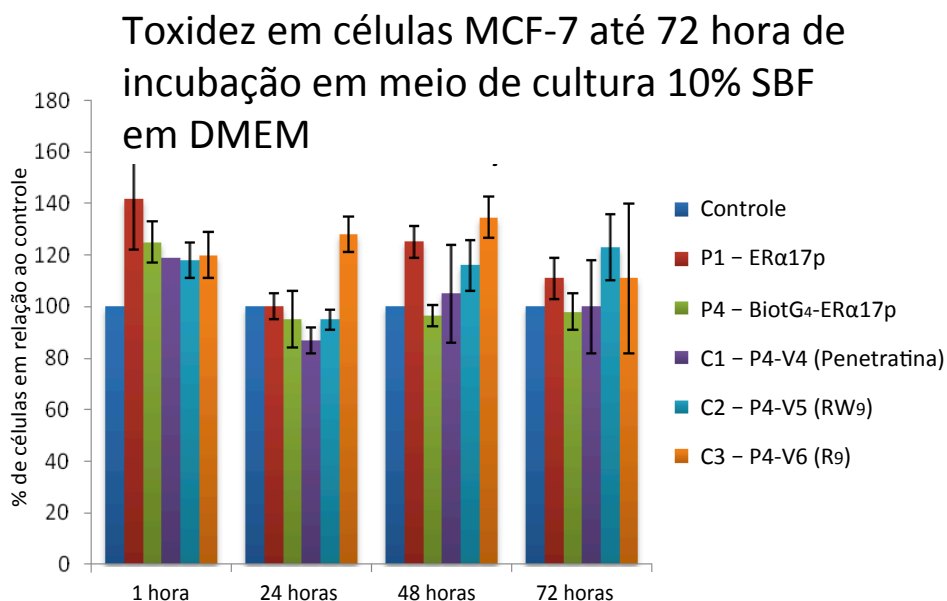
**Figura 36** - Quantificação das células MCF-7 após 1 hora de incubação.

Em células de MCF-7 apenas P1 no meio de cultura contendo 10%SBF em DMEM apresentou efeito de toxicidade em 1 hora de incubação. O efeito na proliferação celular relacionado com o tipo de meio de cultura, presença de soro, foi observado nos peptídeos P4 e C1 em meio de cultura contendo 10% SVF em DMEM, e no peptídeo P1 em meio de cultura contendo 10%SBF-D em DMEM (**Figura 36**).



**Figura 37** - Quantificação das células MCF-7 após 1, 24, 48 e 72 horas de incubação em meio de cultura contendo 10% SBF/DMEM.

Os efeitos de toxidez em meio de cultura 10% SBF em DMEM com período de incubação de até 72 horas indicaram uma redução significativa e regular na presença de P4 e C1, o que indica que P4 exerce um atividade biológica nesse tipo celular e a presença do CPP potencializa esse efeito em células de MCF-7 (**Figura 37**).



**Figura 38** – Quantificação das células MCF-7 após 1, 24, 48 e 72 horas de incubação em meio de cultura contendo 10% SBF-D/DMEM.

O meio de cultura 10% SBF-D em DMEM não apresentou respostas significativas nos efeitos de toxidez e proliferação. Indicando que a presença dos esteroides interferem nos efeitos biológicos do *ER $\alpha$ 17p* no meio intracelular (**Figura 38**).

### 5.2.2. Ajustes na metodologia de internalização

Ao iniciar os trabalhos com as células MCF-7 notou-se baixa adesão das células à placa de petri. Ao lavar a placa para trocar o meio de cultura as células se descolavam sem ação de processos mecânico ou de agentes químicos.

Este efeito tornou-se mais evidente ao tentar executar o primeiro procedimento de internalização, pois ao adicionar a solução de TCEP (2 mM, 200 ml) as células se descolaram em blocos e se aglomeravam, sem a ação da tripsina. Isso fez com que se executasse procedimentos teste de contagem de células para verificar se a solução TCEP diminuía a adesão das células MCF-7 à placa de petri (**Tabela 9**)

**Tabela 9** – Contagem de células MCF-7 após um e dois dias de replicagem.

<b>1º dia de Replicação Celular</b>					
<i>Número de células* e Procedimento</i>	<i>1ª Contagem (1µL)</i>	<i>Total (700µL)</i>	<i>2ª Contagem (1µL)</i>	<i>Total (700µL)</i>	<i>Média</i>
500 000 Células TCEP/Lavagem/Tripsina	57	428 400	50	355 950	392 175
	79		63		
600 000 Células TCEP/Lavagem/Tripsina	83	570 150	72	494 550	532 350
	98		85		
500 000 Células Tripsina	74	485 100	65	409 500	447 300
	80		65		
600 000 Células Tripsina	81	544 950	110	648 900	596 925
	92		96		
700 000 Células Tripsina	102	658 350	-	-	658 350
	107		-		

<b>2º dia de Replicação Celular</b>					
<i>Número de células* e Procedimento</i>	<i>1ª Contagem (1µL)</i>	<i>Total (700µL)</i>	<i>2ª Contagem (1µL)</i>	<i>Total (700µL)</i>	<i>Média</i>
250 000 Células TCEP/Lavagem/Tripsina	34	236 250	130	778 050	507 150
	41		117		
300 000 Células TCEP/Lavagem/Tripsina	57	512 400	78	573 300	542 850
	87		104		
350 000 Células TCEP/Lavagem/Tripsina	68	488 250	86	497 700	492 975
	87		72		
250 000 Células Tripsina	72	466 200	106	674 100	570 150
	76		108		
300 000 Células Tripsina	102	664 650	112	737 100	700 875
	109		122		
350 000 Células Tripsina	122	784 350	94	711 900	748 125
	127		132		

\* Número estimado de células depositada em cada poço

Em células MCF-7 a solução de TCEP iniciou o processo de descolamento das células à superfície da placa de petri. Ao incubar as células 1 minuto com solução de TCEP (2 mM), lavar os poços com HBSS e em seguida incubar 5 minutos com a tripsina, o número de células obtida por contagem foi menor do que nos poços com apenas a ação da tripsina. Confirmando o efeito observado que a solução de TCEP (2 mM) descola as células MCF-7 da placa de petri.

Outro fator importante ao realizar as contagens das células foi estimar o número de células, 24 e 48 horas após replicar as células. O número de células dobram em aproximadamente 48 horas após replica-las.

O TCEP reduz a ligação dissulfeto (RUEGG; RUDINGER, 1977), no protocolo de internalização utiliza lavar os poços da placa de petri com solução de TCEP (2 mM) para reduzir a ligação dissulfeto entre os CPP's e P4 para a obtenção do peptídeo conjugado e possíveis interações dos peptídeos com a membrana

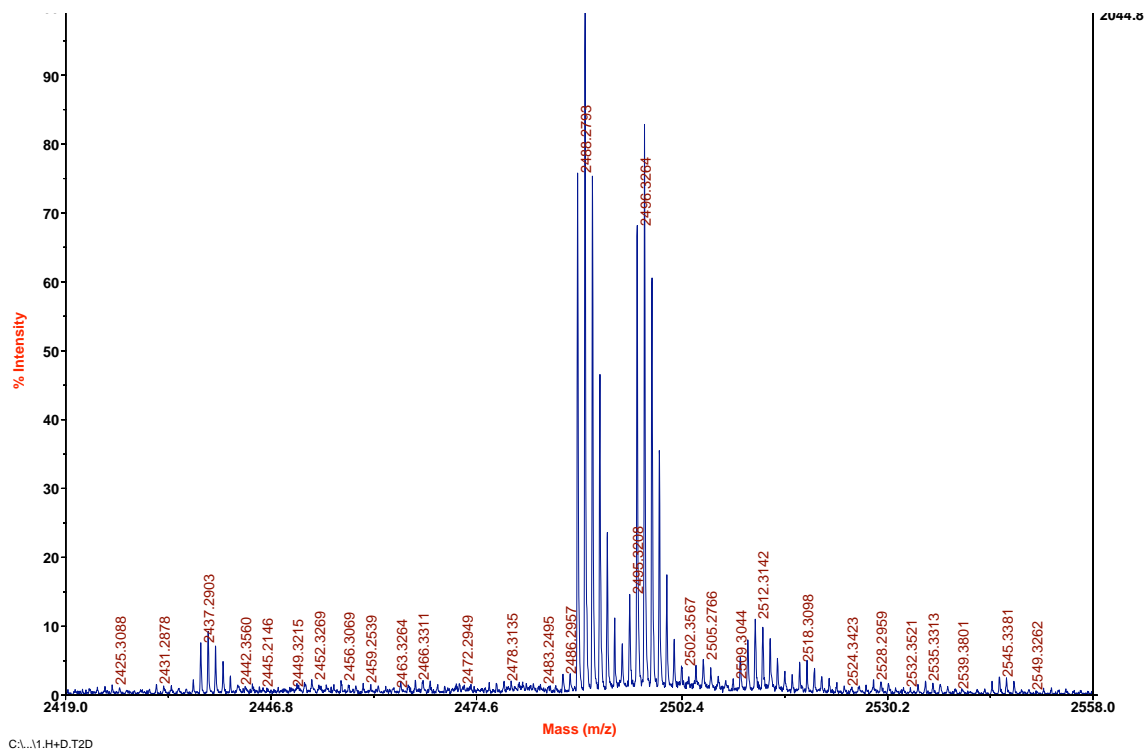
plasmática.

A tripsina é uma enzima digestiva secretada no intestino delgado pelo pâncreas que hidrolisam a ligação peptídica. No protocolo de internalização a tripsina é utilizada para quebrar as ligações peptídicas de biomoléculas da membrana plasmática que proporcionam a adesão das células à placa de petri e para degradar o excesso do peptídeo que não foi internalizado.

Tanto o TCEP quanto a tripsina são utilizados para remover o excesso do peptídeo conjugado do meio extracelular que não foi internalizado durante a incubação e para eliminar resíduos de proteínas que podem interferir nos resultados após a lise celular (BURLINA et al., 2006).

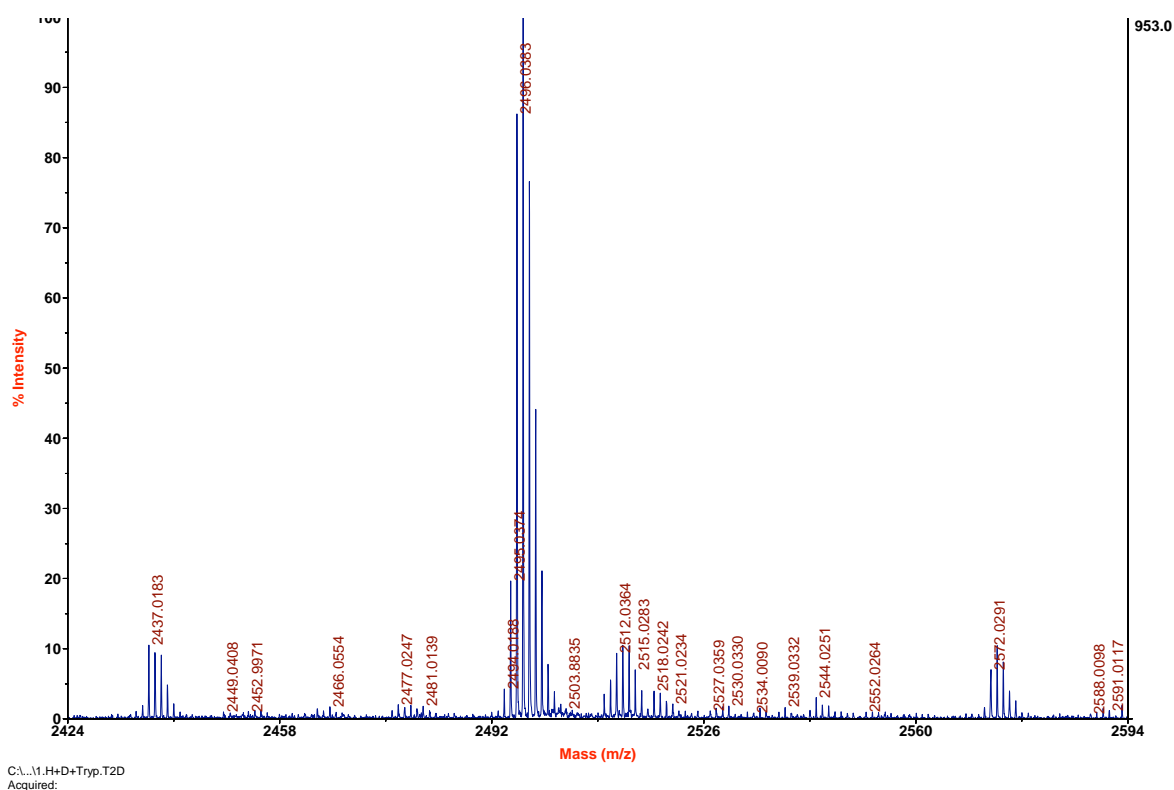
Ao notar que as células de MCF-7 se descolavam da placa de petri no momento da lavagem com a solução de TCEP, um procedimento foi iniciado para avaliar a ação dos dois reagentes, TCEP e tripsina, em conjunto, ou seja, eliminando a etapa de lavagem dos poços pela ação das duas soluções.

Como controle, foi adicionado em um eppendorf o peptídeo P4 em meio de HBSS e executado os procedimentos de incubação, lavagem e detecção do peptídeo H (P4) em comparação ao peptídeo D (P<sub>D</sub>), sendo eliminadas as etapas de adição das soluções TCEP (2 mM) e tripsina. Em análise de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF foram detectados os fragmento 2488,2799 e 2496,3264 *m/z*, respectivamente, aos peptídeos P4 e P<sub>D</sub> como controle padrão do protocolo (**Figura 39**)



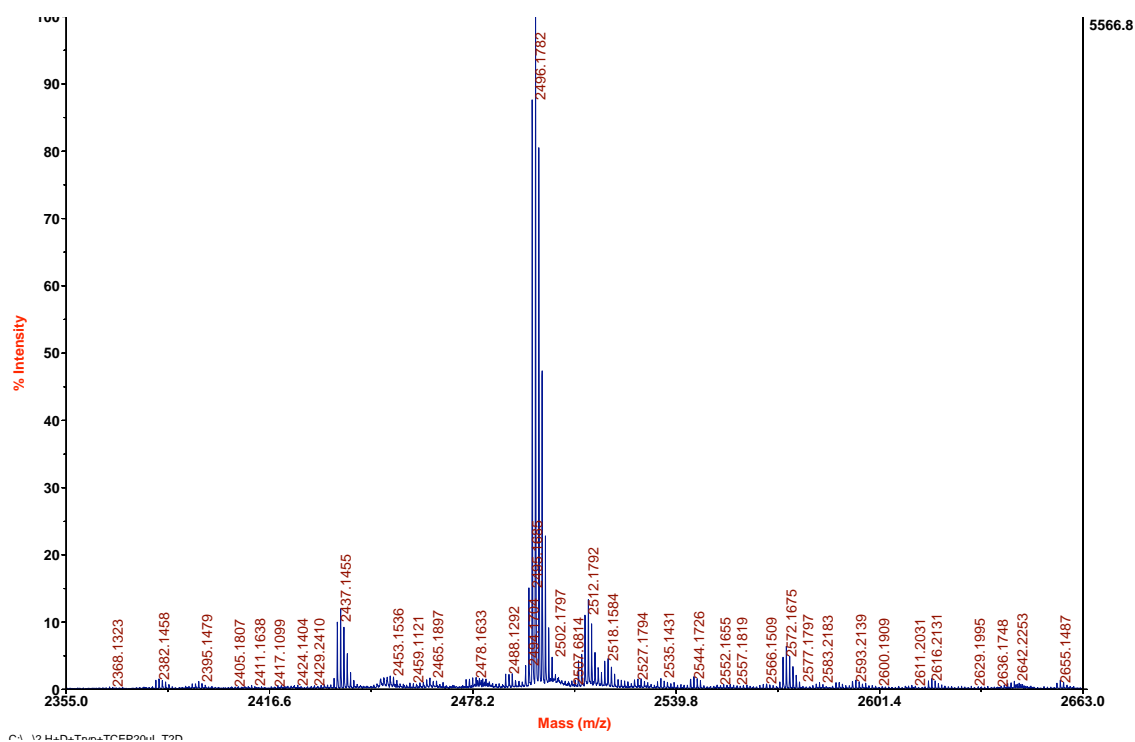
**Figura 39** – Perfil obtido em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF do procedimento controle do estudo da inativação da ação da tripsina pela solução TCEP.

Como controle da ação da tripsina foram adicionados em um eppendorf 50  $\mu$ L de tripsina entre as etapas de incubação do peptídeo P4 e lavagem. Em análise de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF não foi detectado o peptídeo P4. A tripsina degradou o peptídeo H, sendo detectado apenas o peptídeo controle P<sub>D</sub> em análise de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (**Figura 40**).



**Figura 40** – Perfil obtido em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF do procedimento controle do estudo da ação da tripsina.

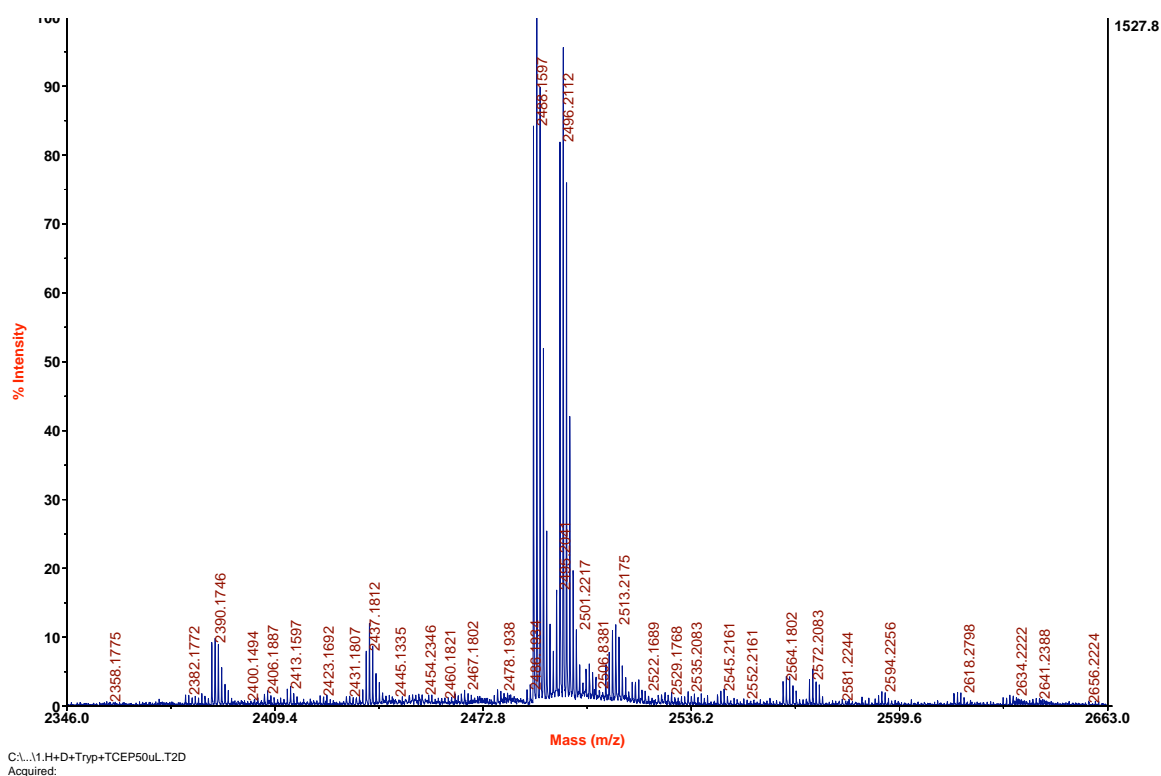
Nos recipientes contendo as soluções de TCEP e tripsina nas proporções de 2:5 e 3,5:5, respectivamente, foram detectados em análises de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF apenas o peptídeo controle P<sub>D</sub>, indicando que a ação da tripsina não foi inativada com a presença da solução de TCEP. A tripsina degradou completamente o peptídeo P4, que neste experimento simula o excesso do peptídeo no meio extracelular ou aderido à membrana plasmática (**Figura 41**).



**Figura 41** – Perfil obtido em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF da ação das soluções TCEP e tripsina nas proporções 2:5 e 3,5:5.

Porém em proporção de 1:1 a tripsina foi completamente inativada, sendo detectado os peptídeos P4 e P<sub>D</sub> nas análises de Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (**Figura 42**).





**Figura 42** – Perfil obtido em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF da ação das soluções TCEP e tripsina na proporções 1:1.

Com isso foi estabelecido a adição de 200 mL TCEP (2 mM) por 1 minuto e em seguida acrescentado a tripsina (500 mL), sendo eliminada a etapa de lavagem com HBSS entre as duas soluções em células de MCF-7.

### 5.2.3. Internalização

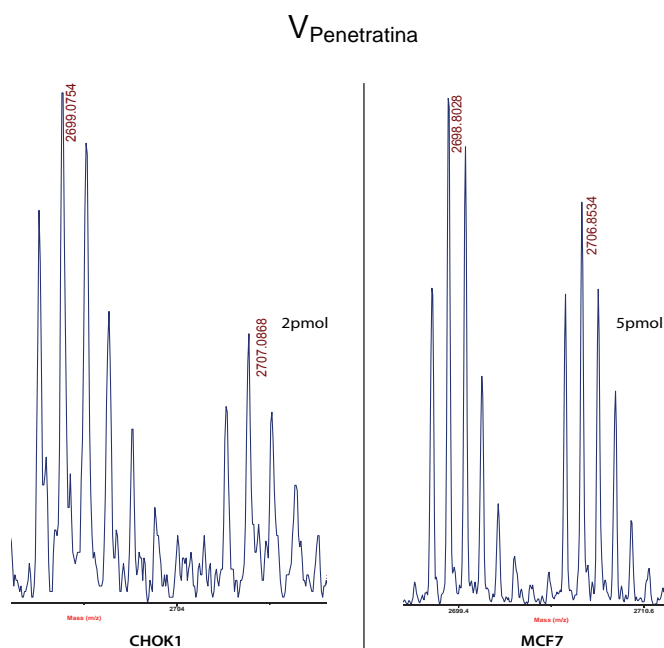
A quantificação do peptídeo internalizado se efetuou por Espectrometria de Massas MALDI-TOF. Essa quantificação se baseou em comparação da área formada pelo sinal com valor conhecido do peptídeo (D) com o peptídeo (H) (BURLINA et al., 2006).

A primeira etapa do estudo de internalização consistiu em quantificar os CPP's em células de CHO-K1 e MCF-7. Os peptídeos utilizados nesse procedimento foram obtidos a partir do estoque do laboratório, antes de realizar o estudo de internalização os produtos foram analisados por Espectroscopia de Massas MALDI-

TOF para confirmar a massa dos peptídeos e se a solução estoque estava com a concentração indicada nos rótulos.

Foram realizados três procedimentos de internalização em cada tipo de célula. O primeiro procedimento foi realizado para ajustar o peptídeo controle ( $P_D$ ), sendo cada CPP estudado em três poços com a adição de 2, 5 e 10 pmol do peptídeo  $P_D$ . Ao observar a melhor marcação do peptídeo  $P_D$  para quantificar os CPP's, os demais procedimentos foram realizados para quantificar os CPP's estudados neste trabalho em células de CHO-K1 e MCF-7.

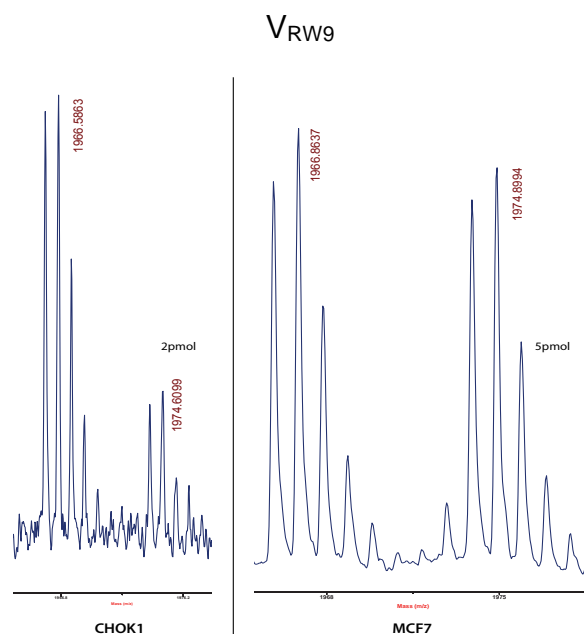
Para o CPP  $V_{Penetratina}$  a área formada pelos fragmentos de massas 2699,0754  $m/z$ , em células CHO-K1, e 2698,8028  $m/z$ , em células MCF-7, correspondem ao peptídeo H e a área formada pelos fragmentos de massas 2707,0868  $m/z$ , em células CHO-K1, e 2706,8534  $m/z$ , em células MCF-7, correspondem ao peptídeo D, em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (**Figura 43**).



**Figura 43** – Quantificação do peptídeo  $V_{Penetratina}$  em células CHO-K1 e MCF-7.

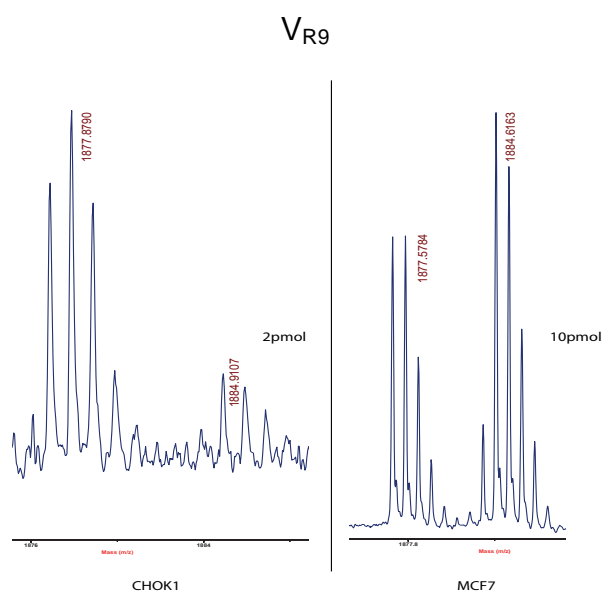
Para o CPP  $V_{RW9}$  a área formada pelos fragmentos de massas 1966,5863  $m/z$ , em células CHO-K1, e 1966,8637  $m/z$ , em células MCF-7, correspondem ao peptídeo H e a área formada pelos fragmentos de massas 1974,6099  $m/z$ , em

células CHO-K1, e 1974,8994  $m/z$ , em células MCF-7, correspondem ao peptídeo D, em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (**Figura 44**).



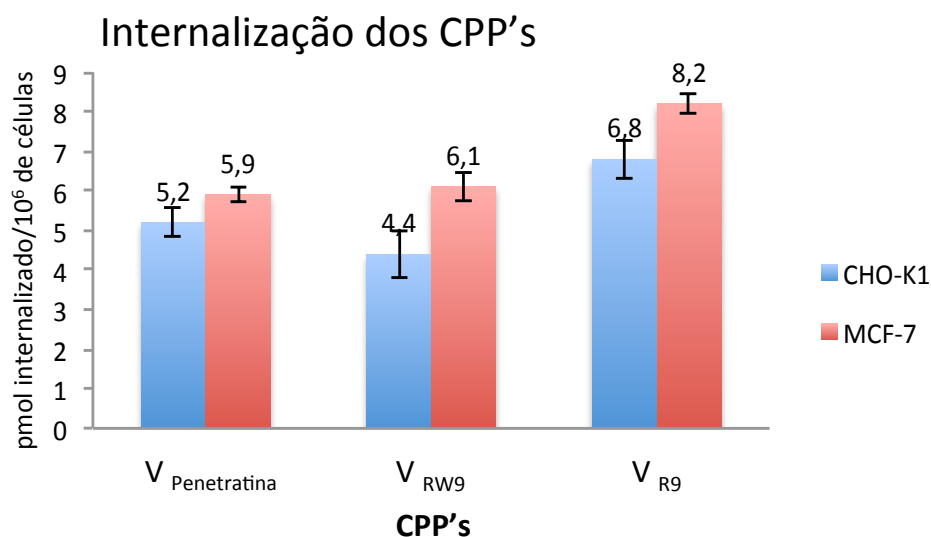
**Figura 44** – Quantificação do peptídeo  $V_{RW9}$  em células CHO-K1 e MCF-7.

Para o CPP  $V_{R9}$  a área formada pelos fragmentos de massas 1877,8790  $m/z$ , em células CHO-K1, e 1877,5784  $m/z$ , em células MCF-7, correspondem ao peptídeo H e a área formada pelos fragmentos de massas 1884,9107  $m/z$ , em células CHO-K1, e 1884,6163  $m/z$ , em células MCF-7, correspondem ao peptídeo D, em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (**Figura 45**).



**Figura 45** – Quantificação do peptídeo  $V_{R9}$  em células CHO-K1 e MCF-7.

Após realizar os procedimentos de internalização dos CPP's foram obtidos o valor médio e o desvio padrão de cada CPP em células de CHO-K1 e MCF-7 (**Figura 46**).



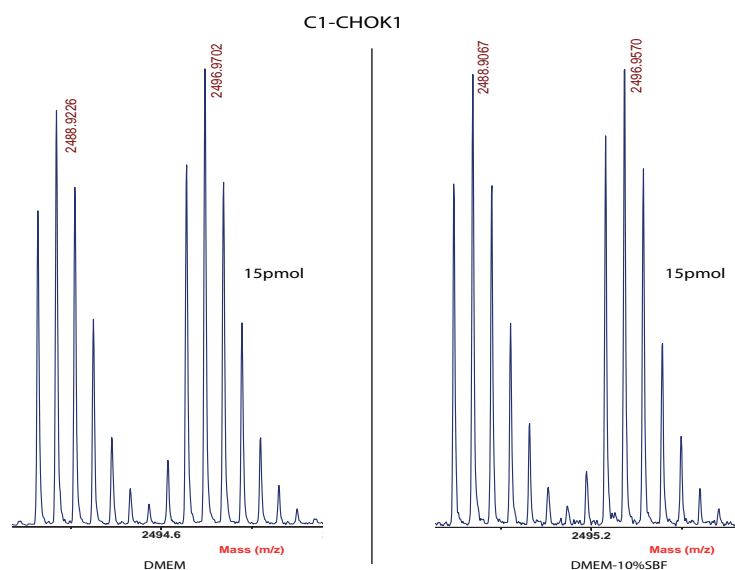
**Figura 46** – Resultado das internalizações dos CPP's (BiotO<sub>2</sub>Gly<sub>4</sub>CPP-NH<sub>2</sub>) em células CHO-K1 e MCF-7.

Os resultados comprovam que os CPP's escolhidos para a execução deste trabalho apresentam capacidade de penetração nos dois tipos celulares e os resultados obtidos para as células CHO-K1 estão de acordo com trabalhos publicados (DELAROCHE et al., 2007; DEROSI; CHASSAING; PROCHIANTZ, 1998).

Em seguida o procedimento de internalização foi efetuado com os peptídeos conjugados em células de CHO-K1. Foram realizados um total de cinco experimentos nesse tipo celular, sendo executado um experimento à cada semana e os peptídeos incubados em 3 poços, ou seja, em triplicata.

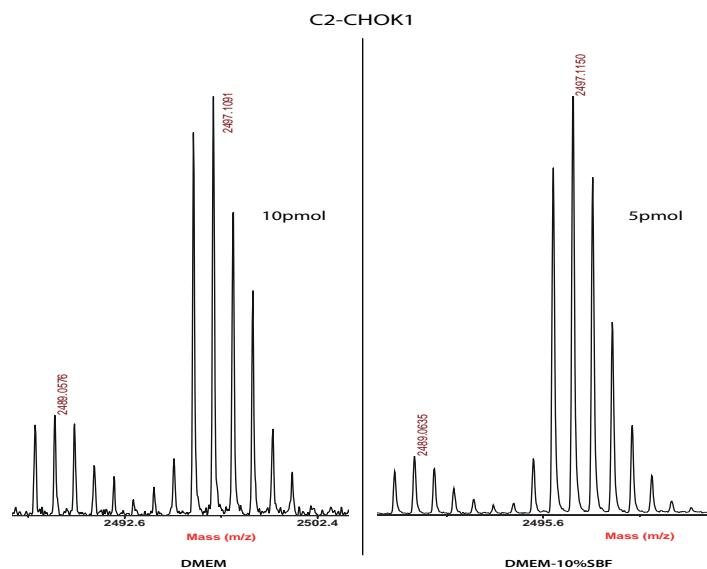
O primeiro procedimento executado permitiu ajustar o peptídeo P<sub>D</sub>, sendo adicionado 5, 10 e 15 pmol como controle. Em cada experimento foram comparadas as áreas correspondentes aos peptídeos H e D de cada peptídeo conjugado em células de CHO-K1 em meios de cultura DMEM e 10%SBF/DMEM (**Figura 47**, **Figura 48** e **Figura 49**).

Para o peptídeo conjugado C1, peptídeo P4 conjugado ao peptídeo V4, a área formada pelos fragmentos de massas 2488,9226  $m/z$ , em meio de cultura DMEM, e 2488,9067  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF em DMEM, correspondem ao peptídeo H e a área formada pelos fragmentos de massas 2496,9702  $m/z$ , em meio de cultura DMEM, e 2496,9570  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF em DMEM, correspondem ao peptídeo D, em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (**Figura 47**).



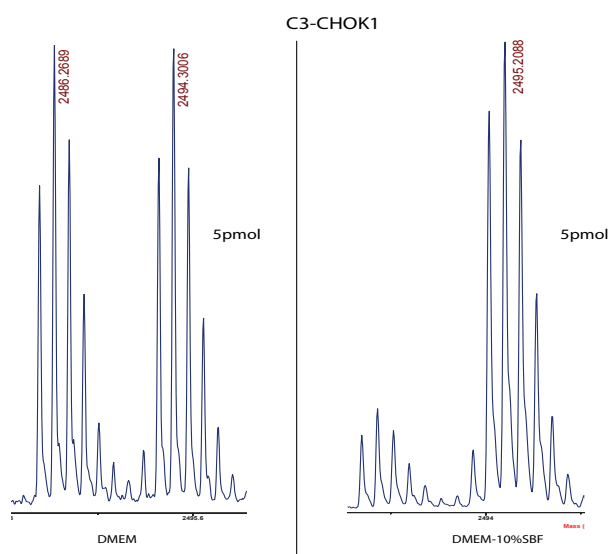
**Figura 47** – Quantificação do peptídeo C1 em células CHO-K1.

Para o peptídeo conjugado C2, peptídeo P4 conjugado ao peptídeo V5, a área formada pelos fragmentos de massas 2489,0576  $m/z$ , em meio de cultura DMEM, e 2489,0635  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF em DMEM, correspondem ao peptídeo H e a área formada pelos fragmentos de massas 2497,1019  $m/z$ , em meio de cultura DMEM, e 2497,1150  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF em DMEM, correspondem ao peptídeo D, em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (**Figura 48**).



**Figura 48** – Quantificação do peptídeo C2 em células CHO-K1.

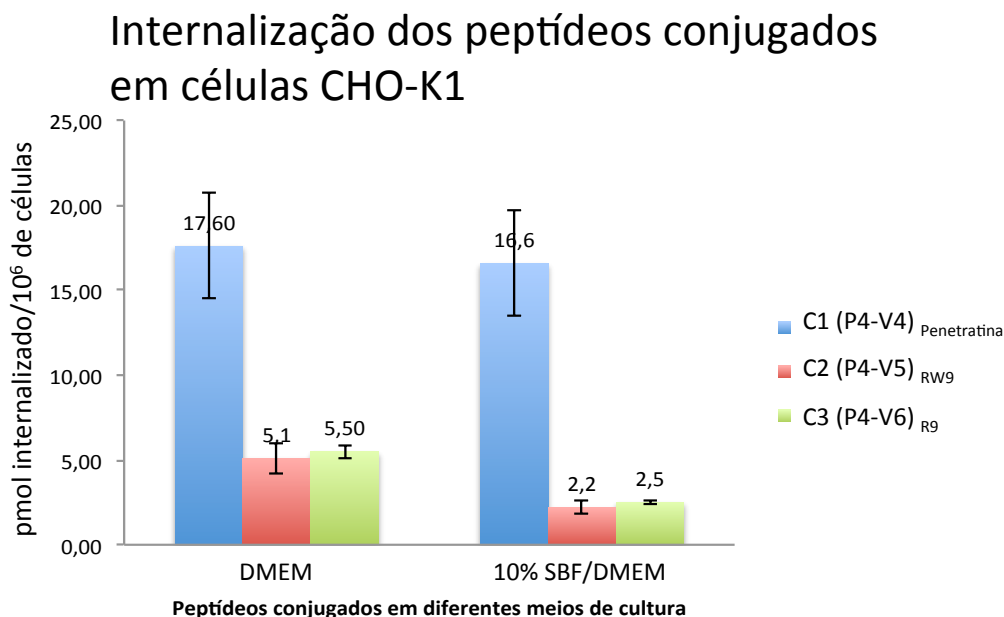
Para o peptídeo conjugado C3, peptídeo P4 conjugado ao peptídeo V6, a área formada pelos fragmentos de massas 2486,2689  $m/z$ , em meio de cultura DMEM, e 2486,1674  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF em DMEM, correspondem ao peptídeo H e a área formada pelos fragmentos de massas 2494,3006  $m/z$ , em meio de cultura DMEM, e 2495,2088  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF em DMEM, correspondem ao peptídeo D, em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (**Figura 49**).



**Figura 49** – Quantificação do peptídeo C3 em células CHO-K1.

Após a conclusão dos procedimentos foram obtidos o valor médio e o desvio

padrão de cada peptídeo nos diferentes meios de cultura (**Figura 50**).



**Figura 50** – Resultado das internalizações dos peptídeos conjugados em células CHO-K1.

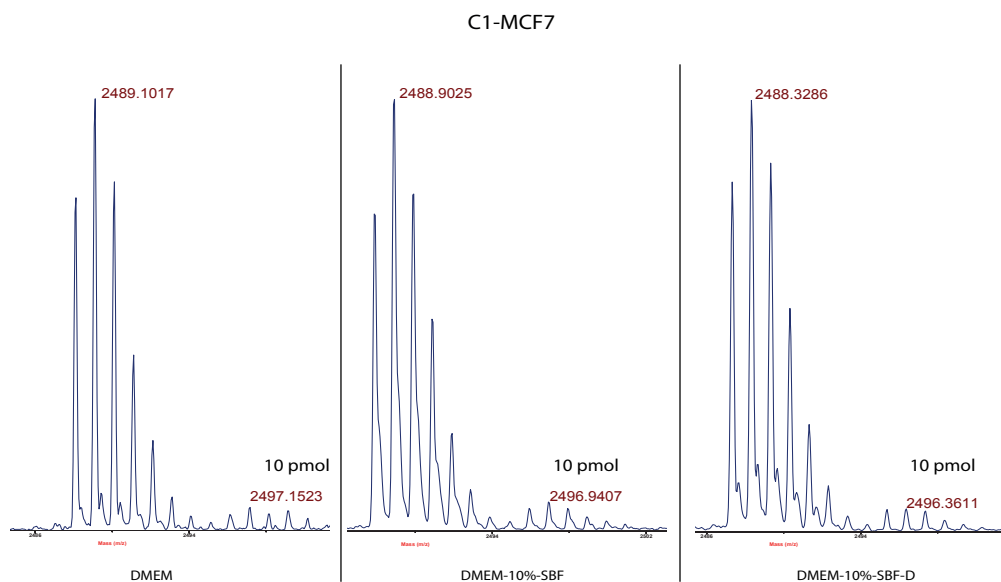
Em seguida, o procedimento de internalização foi efetuado com os peptídeos conjugados em células de MCF-7.

Foram realizados um total de quatro experimentos nesse tipo celular, sendo executado um experimento a cada semana, em triplicata e o primeiro procedimento realizado para ajustar o peptídeo controle, com adição de 5, 10 e 15 pmol do peptídeo P<sub>D</sub>.

Em cada experimento foram comparadas as áreas correspondentes aos peptídeos H e D de cada peptídeo conjugado em células de MCF-7 e nos diferentes meios de cultura (**Figura 51**, **Figura 52** e **Figura 53**).

Para o peptídeo conjugado C1, peptídeo P4 conjugado ao peptídeo V4, a área formada pelos fragmentos de massas 2489,1017 *m/z*, em meio de cultura DMEM, 2488,9025 *m/z*, em meio de cultura 10% SBF em DMEM, e 2488,3266 *m/z*, em meio de cultura 10% SBF-D em DMEM correspondem ao peptídeo H. A área formada pelos fragmentos de massas 2497,1523 *m/z*, em meio de cultura DMEM, 2496,9407 *m/z*, em meio de cultura 10% SBF em DMEM, e 2496,3611 *m/z*, em meio de cultura

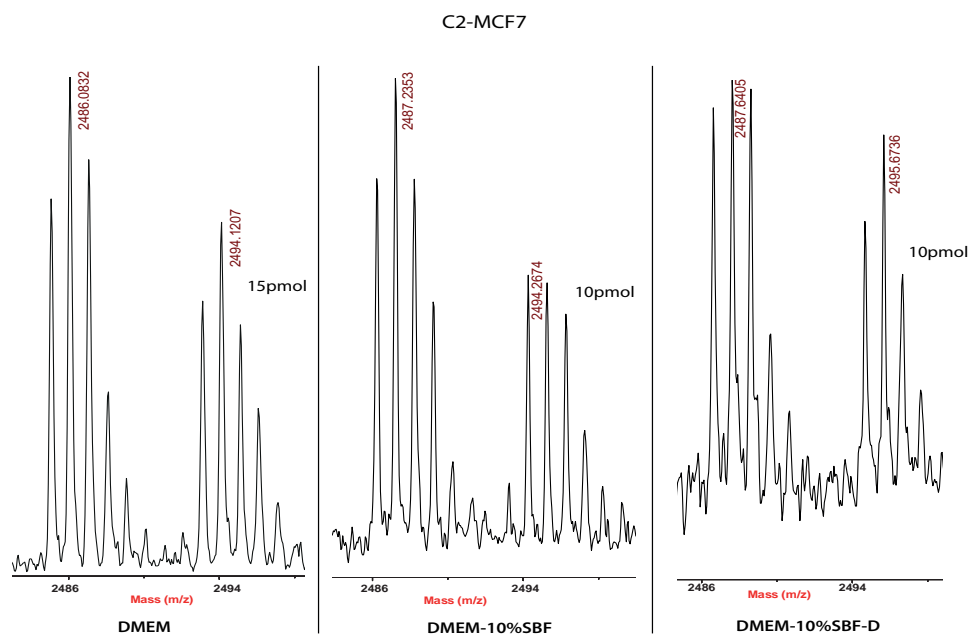
10% SBF-D em DMEM correspondem ao peptídeo D, em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (**Figura 51**).



**Figura 51** – Quantificação do peptídeo C1 em células MCF-7.

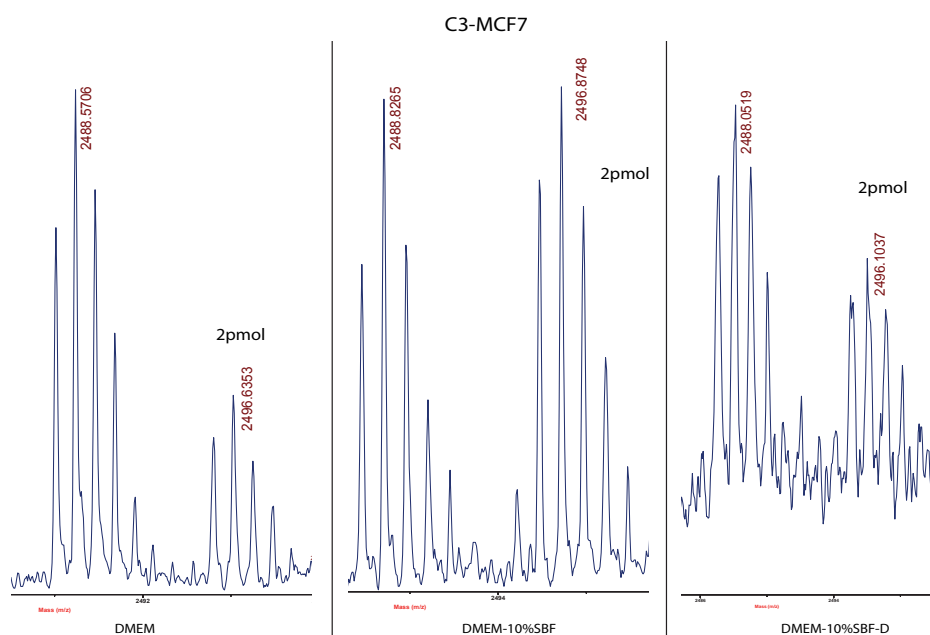
Para o peptídeo conjugado C2, peptídeo P4 conjugado ao peptídeo V5, a área formada pelos fragmentos de massas 2486,0832  $m/z$ , em meio de cultura DMEM, 2487,2353  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF em DMEM, e 2487,6405  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF-D em DMEM correspondem ao peptídeo H. A área formada pelos fragmentos de massas 2494,1207  $m/z$ , em meio de cultura DMEM, 2494,2674  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF em DMEM, e 2495,6736  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF-D em DMEM correspondem ao peptídeo D, em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (**Figura 52**).





**Figura 52** – Quantificação do peptídeo C2 em células MCF-7.

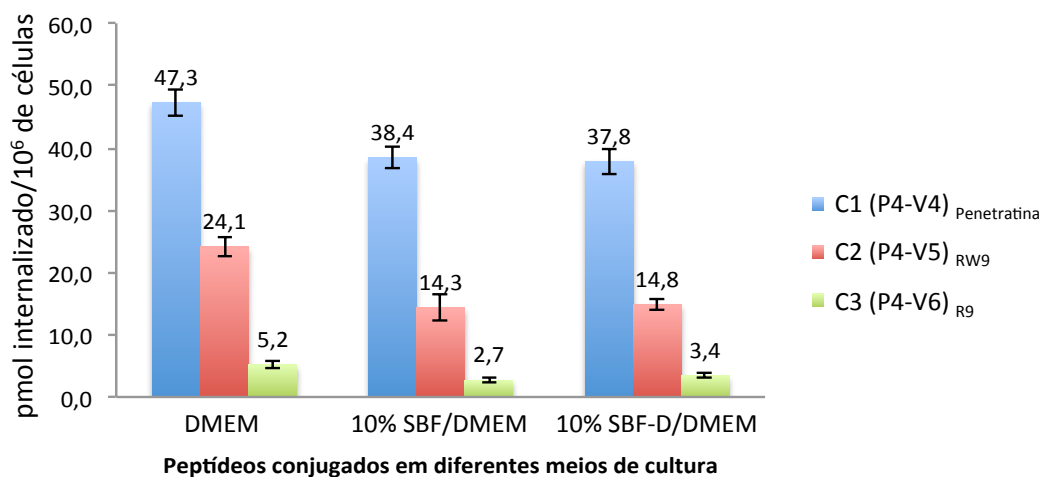
Para o peptídeo conjugado C3, peptídeo P4 conjugado ao peptídeo V6, a área formada pelos fragmentos de massas 2488,5706  $m/z$ , em meio de cultura DMEM, 2488,8265  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF em DMEM, e 2488,0519  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF-D em DMEM correspondem ao peptídeo H. A área formada pelos fragmentos de massas 2496,6353  $m/z$ , em meio de cultura DMEM, 2496,8748  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF em DMEM, e 2496,1037  $m/z$ , em meio de cultura 10% SBF-D em DMEM correspondem ao peptídeo D, em Espectroscopia de Massas MALDI-TOF (**Figura 53**).



**Figura 53** – Quantificação do peptídeo C3 em células MCF-7.

Após a conclusão dos procedimentos foram obtidos o valor médio e o desvio padrão de cada peptídeo nos diferentes meios de cultura (**Figura 54**).

### Internalização dos peptídeos conjugados em células MCF-7



**Figura 54** – Resultado das internalizações dos peptídeos conjugados em células MCF-7.

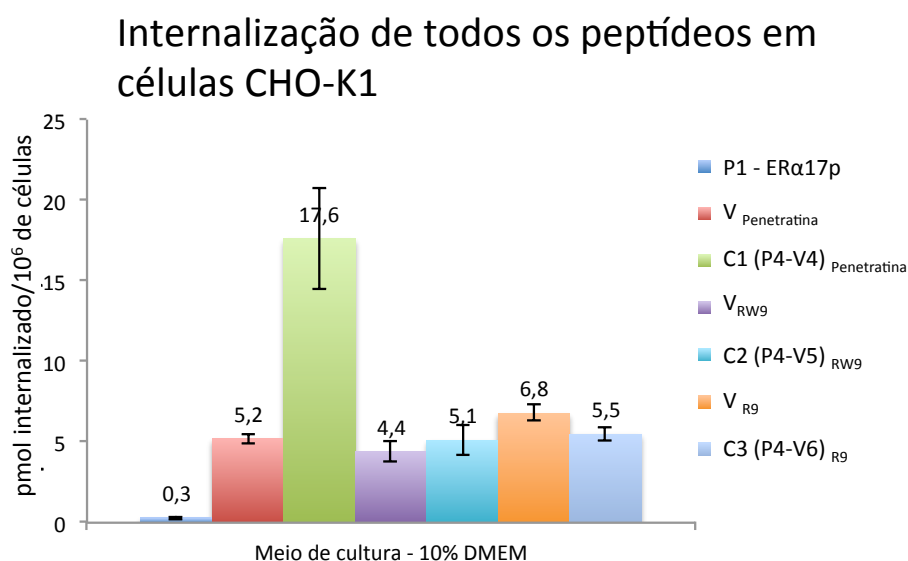
Os resultados obtidos no estudo da internalização do peptídeo P4 conjugado aos CPP's V4, V5 e V6, indicam que os CPP's permitem conformações que facilita ou dificulta a passagem do peptídeo conjugado pela membrana plasmática.

O CPP V4 conforma o peptídeo P4 e permite uma passagem eficiente pela membrana plasmática, independentemente do meio de cultura e do tipo de célula. Os peptídeos C2 e C3 apresentaram baixa quantificação no meio intracelular em ambas as células, porém em células de MCF-7 o peptídeo C2 apresentou melhor potencial para transpassar a membrana plasmática.

Em meio de cultura contendo DMEM se comparou a internalização dos CPP's e dos peptídeos conjugados observa-se uma inversão. O valor internalizado após uma hora de incubação demonstra um valor crescente nos CPP's  $V_{Penetratina}$ ,  $V_{RW9}$  e  $V_{R9}$ , porém, ao ser conjugado decresce nos peptídeos conjugados C1, C2 e C3.

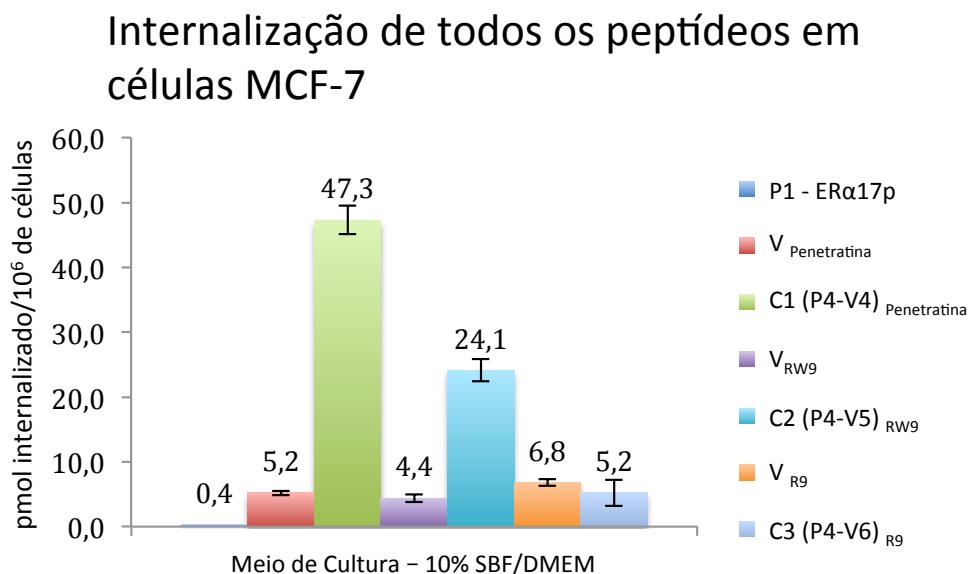
O CPP  $V_{Penetratina}$  apresenta maior número de resíduos e foi internalizado 5,2 pmol. Ao ser conjugado ao peptídeo P4 ampliou o potencial para transpassar a membrana plasmática para 17,6 pmol, em células CHO-K1, e 47,3 pmol, em células MCF-7, em meio de cultura DMEM.

Nos CPP's de cadeias curtas e com cargas catiônicas próximas ou seguidas,  $V_{RW9}$  e  $V_{R9}$ , foram internalizados, 4,4 e 6,8 pmol, respectivamente. Porém, em células CHO-K1 e meio de cultura DMEM, ao serem conjugados ao peptídeo P4 o valor internalizado do peptídeo C2, 5,1 pmol, permaneceu praticamente inalterada, e o valor internalizado do peptídeo C3, 5,5 pmol, foi menor do que o valor internalizado do CPP  $V_{R9}$  (**Figura 55**).



**Figura 55** – Resultado das internalizações de todos os peptídeos em células CHO-K1.

Em células MCF-7 o peptídeo C1 internalizou 47,3 pmol, valor superior ao CPP  $V_{Penetratina}$ , 5,9 pmol; ocorreu uma inversão com o peptídeo C2, mesmo contendo cargas catiônicas próximas o peptídeo internalizou 24,1 pmol, valor superior ao internalizado do CPP  $V_{RW9}$ , 6,1 pmol; e o peptídeo conjugado contendo cargas catiônicas seguidas, C3, manteve valor abaixo do valor internalizado do CPP correspondente (**Figura 56**).



**Figura 56** – Resultado das internalizações de todos peptídeos em células MCF-7.

As cargas catiônicas interferem na conformação dos peptídeos conjugados, maior números de cargas próximas diminuem a internalização.

Todos os CPP's estudados nesse trabalho permitiram a passagem da sequência bioativa para o interior da célula. O peptídeo P1 foi detectado  $0,3 \pm 0,1$  pmol e  $0,4 \pm 0,1$  pmol, respectivamente, em células CHO-K1 e MCF-7. Os valores obtidos nos estudos de internalização são condizentes com a literatura (BYRNE; et al., 2012).

Os peptídeos conjugados que apresentaram menor potencial de internalização, C2 e C3 em células CHO-K1, e C3 em células MCF-7, foram quantificados com valores superiores ao peptídeo P1.

## **6. CONCLUSÃO**

A SPFS foi realizada com êxito neste trabalho, sendo eficiente para obter todos os peptídeos. Realizar a síntese em estratégia Boc e Fmoc proporcionou conhecimento das duas principais estratégias de SPFS.

O procedimento de ajuste da metodologia da internalização, permitiu avanços e adaptações da metodologia em células MCF-7. A solução de TCEP é capaz de descolar as células da placa de petri, sendo necessária suprimir a lavagem entre a solução de TCEP e a tripsina. A adição dessas duas soluções na proporção 2:5 permite a ação desejada dos dois reagentes.

A sequência peptídica dos CPP's e o meio de incubação interferem na capacidade de penetração do ER $\alpha$ 17p, maior número de cargas catiônicas na estrutura do CPP e em meio de cultura contendo SBF diminui a internalização do peptídeo conjugado.

O peptídeo C1 apresentou maior capacidade para penetrar em ambos tipos de células. Em células de MCF-7 esse peptídeo apresentou efeitos de toxidez após 48 h de incubação em meio de cultura contendo 10%SBF em DMEM e inibiu a proliferação celular em meio de cultura contendo 10%SBF-D em DMEM.

Os resultados obtidos nos testes biológicos comprovam a importância do estudo e desenvolvimento de peptídeos conjugados e comprovam os CPP's facilitam a passagem pela membrana celular.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS A K; LICHTMAN A H; PILLAI S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier. 7 ed. Rio de Janeiro, 2011.

ALLES I M. **Síntese em fase sólida, caracterização e estudo conformacional da  $\delta$ -melanotropina e da  $\delta$ -melanotropina oxidada**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, área de Química Orgânica, da Universidade Federal de Santa Maria (RS), 2005.

AMBLAR D M. et al. **Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis**. *Molecular Biotechnology*. v. 33, p. 239-254, 2006.

BAILEY P D. **An Introduction to peptide chemistry**. Wiley and Sons. New York, USA. p. 1-9, 1990.

BUCKLEY. et al. **Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells**. *Molecular Pharmacology*. v. 35, n. 4, p. 469-476, 1989.

BURLINA F. et al. **Quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides by MALDI-TOF mass spectrometry**. *Angewandte Chemie International ed in English*. v. 44, n. 27, p. 4244–4247, 2005.

BURLINA F. et al. **A direct approach to quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides using MALDITOF mass spectrometry**. *Nature Protocols*. v. 1, n. 1, p. 200-205, 2006.

CHAN W C; WHITE P D. – Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis – A Practical Approach. Editora Oxford University Press, 2000.

CHASSAING G; PROCHIANTZ A. **Peptides usable as vectors for the intracellular addressing of bioactive molecules**. *PCT Int. Appl.* WO9712912, 1997.

CRAIK D J. et al. **The Future of peptide-based drugs**. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 81, p. 136-147, 2013.



DELAROCHE D. et al. **Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag.** *Analytical Chemistry*. v. 79, n. 5, p. 1932-1938, 2007.

DEROSSI D. et al. **The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes.** *The Journal of Biological Chemistry*. v. 269, p. 10444-10450, 1994.

DEROSSI D. et al. **Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent.** *The Journal of Biological Chemistry*. v. 271, n. 26, p. 18188-18193, 1996.

DEROSSI D; CHASSAING G; PROCHIANTZ A. **Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery.** *Trends Cell Biology*. v. 8, p. 84-87, 1998.

DOJINDO - MANUAL TÉCNICO. **Cell Counting Kit-8.** Disponível em: [https://www.dojindo.com/TechnicalManual/Manual\\_CK04.pdf](https://www.dojindo.com/TechnicalManual/Manual_CK04.pdf). Acesso em 07/02/2017.

DOM G. et al. **Cellular uptake of Antennapedia Penetratin peptides is a two-step process in which phase transfer precedes a tryptophan-dependent translocation.** *Nucleic Acids Research*. v. 31, p. 556-561, 2003.

DOYLE A A. et al. **A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells.** *This Issue*. v. 95, n. 26, p. 15665–15670, 1998.

DRIN G. et al. **Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide: Role of lipid-binding affinity.** *European Journal Biochemical*. v. 268, p. 1304-1314, 2001.

EISENBERG A L A; KOIFMAN S. **CÂNCER DE MAMA: MARCADORES TUMORAIS.** *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 47, n. 4, p. 377-88, 2001).

FIELDS, G B; NOBLE, R L. **Solid-phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids.** *International Journal of Peptide and Protein Research*. v. 35, n. 3, p. 161-214, 1990.

FISCHER P M. et al. **Structure-activity relationship of truncated and substituted analogues of the intracellular delivery vector Penetratin** *Journal of Peptide Research*. v. 55, p. 163-172, 2000.

FISCHER R. et al. **Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides.** *Chembiochem*. v. 6, p. 2126-2142, 2005.

FRANKEL A D; PABO C O. **Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus.** *Cell*. v. 55, p. 1189-1193, 1988.

FUTAKI S. et al. **Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery.** *Biology Chemistry*. v. 276, n. 8, p. 5836-5840, 2001.

GEHRING W. **Homeo boxes in the study of development.** *Science*. v. 236, p. 1245, 1987.

INCA, Câncer de Mama. Disponível em:  
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acesso em 07/02/2017.

INCA: Hormonoterapia. Disponível em:  
[http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=103](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=103). Acesso em: 07/02/2017.

INCA, 2014. Disponível em:  
[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca\\_ministerio\\_saude\\_apresentam\\_estimativas\\_cancer\\_2014](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014). Acesso em 07/10/2017.

ISIDRO-LLOBET A; A'IVAREZ M; ALBERICIO F. **Amino Acid-Protecting Groups.** *Chemical Review*. v. 109, p. 2455–2504, 2009.

JOLIOT A. et al. **Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. v. 88, p. 1864-1868, 1991.

JULIANO L. Química dos Peptídeos: uma breve revisão sobre o assunto. *Química Nova*. v. 13, n. 3, p. 176-190, 1990.

KAMPA M. et al. **ER $\alpha$ , an P295-T311 fragment, modifies the migration of breast cancer cells, through actin cytoskeleton rearrangements.** *Journal of Cellular Biochemistry*. v. 112, n. 12, p. 3786-3796, 2011.

KITAGUCHI H. **Peptide synthesis: enzymatic reaction inorganic media.** *Chapmann and Hall*, p. 224-243, 1996.

LAU J L; DUNN M K, Development trends for peptide therapeutics: status in 2016. *Peptide Therapeutic Foundation*, 2016.

LIMA M M. **Síntese de peptídeo modificado contendo grupo 1,2,3-triazol-1,4-dissubstituídos.** Dissertação apresentada ao programa de ciências farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – UPS, São Paulo, 2013.

MACHADO A. et al. **Sínteses químicas e enzimáticas de peptídeos: princípios básicos e Aplicações.** *Química Nova*. v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MAGZOUB M; GRASLUND A. **Cell-penetrating peptides: [corrected] from inception to application.** *Quarterly Reviews of Biophysics*. v. 37, p. 147-195, 2004.

MARQUERDT M; EIFLER-LIMA V L. **A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados.** *Química Nova*. v. 24, v. 6, p. 846-855, 2001.

MAZEL M. et al. **Doxorubicin-peptide conjugates overcome multidrug resistance.** *Anti-Cancer Drugs*. v. 12, p. 107-116, 2001.

MERRIFIELD B. **Solid phase peptide synthesis.** *Journal Organic Chemistry*. v. 85, p. 2149-2154, 1963.

MERRIFIELD B; MICHEL A R; CLARKE J E. **Detection and prevention of urethane acylation during solid-phase peptide synthesis by anhydride methods.** *Journal Organic Chemistry*, v. 39, p. 660-668, 1974.

MERRIFIELD B. **Concept and early development of solid-phase peptide synthesis.** *Method Enzymological*, v. 289, p. 3-13, 1997.

MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA-E-SILVA, A. A. M. **The effect of serum on *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co- cultured with granulosa cells.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 28, n. 2, p. 213-218, 1995.

MITCHELL D J. et al. **Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers.** *Journal Peptide Research*. v. 56, n. 3, p. 318-325, 2000.

MURRAY R K. et al. **Bioquímica Ilustrada de Harper.** *Langer*, ed. 29, p. 519, 2014.

NELSON D L; COX M M. **Lenhinger Principles of biochemistry.** ed. 5, New York: W. H. Freeman, 2008.

PAVIA D L. et al. **Introdução à espectroscopia. Tradução da 4ª edição norte-americana.** *Cengage Learning*, São Paulo, 2010.

PELEKANOU V. et al. **The estrogen receptor alpha-derived peptide ER $\alpha$ 17p (P295-T311) exerts pro-apoptotic actions in breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*, independently from their ER $\alpha$  status.** *Molecular Oncology*. v. 5, n. 1, p. 36-47, 2011.

PENNINGTON M W; DUNN B M. **Methods in Molecular biology. Peptide syntheses protocols.** *Humana Press*, p. 91-169, 1994.

PEPTIDE THERAPEUTIC FOUNDATION – Sumary. Disponível em: <http://www.peptidetherapeutics.org>. Acesso em 05/01/2017.

PUJALS S. et al. **Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP selfassembly.** *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758, 264-279, 2006.

REICHERT J. **Development trend for peptides therapeutics.** *Peptide Therapeutic Foundation*. p. 1-10, 2010.

ROUX I L. et al. **Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* v. 90, p. 9120-9124, 1993.

RUEGG U T; RUDINGER J. **Reductive cleavage of cystine disulfides with tributylphosphine.** *Methods in Enzymology.* v. 47, p. 111–116, 1977.

RUIZ C M R. **Estudo da síntese convergente de peptídeos em fase sólida: abordagem clássica e uso de temperatura alta.** Dissertação: Instituto de química da Universidade de São Paulo, 2003.

RYSER H J; HANCOCK R. **Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture.** *Science.* v. 150, p. 501-503, 1965.

RYSER H J; SHENW C. **Conjugation of methotrexate to poly(L-lysine) increases drug transport and overcomes drug resistance in cultured cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* v. 75z, p. 3867-3870, 1978.

VEIGA R K A. et al. **Avaliação digital comparativa da expressão tecidual da proteína cerbB-2 em mulheres portadoras de doenças tumorais da mama.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* v. 45, n. 2, p. 131-137, 2009.

VIEIRA D S C. et al. **Carcinoma de Mama: novos conceitos na classificação.** *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* v. 30, n. 1, p. 42-47, 2008.

WANG S S. **Solid-phase synthesis of protected peptides via photolytic cleavage of alpha-methylphenacyl ester anchoring linkage.** *Journal American Chemistry,* v. 41, p. 3258-3261, 1976.

WIELAND T. **Peptides: Synthesis, Structures and Applications - The history of peptide chemistry.** *Bernd Gutte.* ed. Academic Press, Califórnia, USA. p. 1-38, 1995.