



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MATHEUS FERRONI SCHWARTZ

DESENHO RACIONAL DE NOVOS PEPTÍDEOS ANTIEPILÉPTICOS
BIOINSPIRADOS DA OCCIDENTALINA VISANDO A OTIMIZAÇÃO DO PERFIL
FARMACOCINÉTICO

Brasília – DF

2020

MATHEUS FERRONI SCHWARTZ

DESENHO RACIONAL DE NOVOS PEPTÍDEOS ANTIEPILÉPTICOS
BIOINSPIRADOS DA OCCIDENTALINA VISANDO A OTIMIZAÇÃO DO PERFIL
FARMACOCINÉTICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof.^a Dra. Márcia Renata Mortari

Brasília – DF

2020

MATHEUS FERRONI SCHWARTZ

DESENHO RACIONAL DE NOVOS PEPTÍDEOS ANTIEPILEPTICOS
BIOINSPIRADOS DA OCCIDENTALINA VISANDO A OTIMIZAÇÃO DO PERFIL
FARMACOCINÉTICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como
requisito à obtenção do título de Mestre em
Neurociências.

Aprovado em março de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Márcia Renata Mortari

Prof. Dr. Guilherme Dotto Brand

Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello

Prof.^a Dra. Jacqueline Coimbra Gonçalves Moser

*Este trabalho é dedicado a Carlos Alberto
Schwartz (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me inspirarem a seguir o mesmo caminho da ciência desde pequeno.

Aos meus amigos e amigas do laboratório de neurofarmacologia. Ao trio Gabriel, Henrique e Diogo, pelos vários intervalos para o café, cigarrinhos e ótimas conversas sempre muito maduras.

À Júlia, pelo carinho, ajuda e apoio constante ao longo desse processo.

Aos técnicos Danilo e Elias que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Ao Adolfo, pela paciência e disposição em me ensinar a usar o HPLC e o MALDI-TOF, e pelas discussões de química medicinal.

À minha orientadora Márcia, por acreditar na minha capacidade em realizar este projeto, e pelo apoio ao longo da realização dele.

Ao professor Luiz Romeiro, por me deixar mais interessado ainda pela área de química medicinal.

Aos meus amigos da vida toda, Pedro, Bernardo e Luísa, pelo apoio e amizade.

A todos os funcionários que mantêm o departamento e laboratórios limpos.

Ao Professor Doutor Osmino, pela disponibilidade constante em me ajudar com as cromatografias.

Aos vigias do estacionamento do IB, por lidarem com meus horários incomuns na madrugada.

Aos camundongos.

RESUMO

Schwartz, MF. **Desenho racional de novos peptídeos antiepilépticos bioinspirados da Occidentalina visando a otimização do perfil farmacocinético.** Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2020.

O desenvolvimento de novos peptídeos terapêuticos representa uma área em crescimento na indústria farmacêutica. A alta seletividade característica de peptídeos terapêuticos os torna candidatos interessantes a fármacos potentes e com baixa toxicidade associada. Contudo, peptídeos apresentam um perfil farmacocinético intrínseco precário na maioria das vezes, principalmente devido à alta suscetibilidade à degradação enzimática e baixa biodisponibilidade oral, resultando em valores de meia-vida baixos. Nas últimas décadas, o constante avanço na área de química medicinal possibilitou o desenvolvimento de estratégias já bem estabelecidas para a otimização do perfil farmacocinético de peptídeos terapêuticos. Pesquisas demonstraram que um peptídeo isolado da vespa *Polybia occidentalis*, denominado Occidentalina-1202, foi capaz de proteger roedores contra crises induzidas por ácido caínico. Até a elaboração desse trabalho, estudos farmacocinéticos do peptídeo Occidentalina não haviam sido realizados. Com base nisso, o objetivo desse trabalho foi desenhar um peptídeo análogo semi-cíclico da Occidentalina, denominado cOccidentalina[5-9], visando otimização do perfil farmacocinético, principalmente na proteção contra ação proteolítica. O perfil de degradação dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] foi avaliado por meio de um ensaio de estabilidade em soro. Para quantificação dos peptídeos em amostras contendo soro, foi utilizado um método padronizado de precipitação para extração das proteínas, seguido da análise e quantificação por cromatografia líquida reversa (HPLC) e espectrometria de massas (MS) para identificação dos metabólitos resultantes da degradação. Apesar do desenho visando otimização do perfil farmacocinético, a ciclização da região C-terminal por ligação dissulfeto entre os resíduos 5 e 9 do análogo da Occidentalina resultou em um perfil de estabilidade em soro inferior ao peptídeo original, além da perda significativa do efeito anticonvulsivante.

Palavras-chave: Peptídeos terapêuticos, química medicinal, farmacocinética, Occidentalina, estabilidade.

ABSTRACT

Schwartz, MF. **Medicinal chemistry efforts to optimize Occidentalina's half-life by development of the semi-cyclic analog cOccidentalina[5-9]**. Master dissertation – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2020.

There is an increased interest in peptides in pharmaceutical development. Given their attractive specificity profile, peptides represent an exceptional starting point for the development of new potent drugs with little to no side effects. However, peptides often have poor metabolic stability and low bioavailability profiles, leading to sub-optimal half-life values. Over the last decades, the development of new medicinal chemistry techniques enabled the optimization of therapeutic peptides by improving their pharmacokinetic profiles. Previous studies on the Occidentalina peptide, isolated from the social wasp *Polybia occidentalis* venom, showed its potent anticonvulsant effect in animal models of epilepsy. Prior to this work, the pharmacokinetic profile of the peptide has not been studied. On this work, a semi-cyclic Occidentalina analog was created, cOccidentalina[5-9], aimed at the optimization of the pharmacokinetic profile of the lead peptide, mainly through decreasing its susceptibility to proteolytic degradation. The stability in the serum of the peptides, Occidentalina and cOccidentalina[5-9], were evaluated. The quantitation of the peptides Occidentalina and cOccidentalina at the biological matrix was achieved by precipitation of the proteins of the samples by acetonitrile prior to liquid chromatography and mass spectrometry analysis and identification of the metabolites. The anticonvulsant properties of the analog were assessed by the kainic acid animal model of acute epilepsy. The semi-cyclisation of the lead peptide Occidentalina resulted in a decreased value of half-life and loss of the anticonvulsant effect.

Keywords: Therapeutic peptides, medicinal chemistry, stability.

Lista de abreviações

aa: aminoácido

ACN: acetonitrila

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

ADME: absorção, distribuição, metabolismo e excreção

AP: Anteroposterior

ASC: área sob a curva

CAGR: *Compound annual growth rate*

cDNA: DNA complementar

CPP: peptídeo penetrador de células

CYP: Citocromo P450

D-aa: D-aminoácido

DMSO: dimetilsulfóxido

DV: Dersoventral

GLP-1: peptídeo semelhante a glucagon 1

GPCR: Receptor acoplado à proteína G

HCCL: ácido α -cyano-4-hydroxycinnamico

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

LC/MS: Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas

LC: cromatografia líquida

LLE: extração em fase líquida

MALDI-TOF: Ionização e dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo

ML: Mesolateral

MRM: monitoramento de reações múltiplas

MS: espectrômetro de massas

NaCl: cloreto de sódio

PBS: solução fisiológica

PEG: polietilenoglicol

PPI: interação proteína-proteína

RMN: ressonância magnética nuclear

siRNA: ARN interferente pequeno

SPE: extração em fase sólida

TCA: ácido tricloroacético

TFA: ácido trifluoroacético

UPLC: cromatografia líquida de ultra performance

UV: ultravioleta

Lista de figuras

Figura 1. Implantação de cânula guia no ventrículo lateral direito.

Figura 2. Predição da estrutura terciária do peptídeo Occidentalina por meio do software PEPFOLD. Intérfice hidrofóbica constituída dos resíduos de triptofano, metionina, fenil e tirosina em contraste rosa.

Figura 3. Representação gráfica das frações obtidas após análise por cromatografia de quantidades injetadas conhecidas (eixo x), eixo y: absorbância (mAU).

Figura 4. Curva de calibração analítica da Occidentalina em doses conhecidas indicando relação linear entre quantidades injetadas conhecidas (eixo x) com os valores de AUC (eixo y).

Figura 5. Ensaio de estabilidade em soro (25%). Eixo y: porcentagem dos valor das ASCs no tempo 0 dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] intactos relativos aos valores nos tempos 6, 12 e 24. Eixo x: Tempos ensaio de estabilidade em soro (25%).

Figura 6. Comparação dos cromatogramas respectivos aos tempos 0 (em preto), tempo 6 (em vermelho), tempo 12 (em azul), e tempo 24 (em verde) do ensaio de estabilidade do peptídeo cOccidentalina[5-9] em soro (25%). Fração correspondente ao peptídeo cOccidentalina[5-9] indicada pela seta roxa. Fração correspondente ao fragmento de degradação CAFWC indicada pela seta azul.

Figura 7. Comparação dos cromatogramas respectivos aos tempos 0 (em preto), tempo 6 (em vermelho), tempo 12 (em azul), e tempo 24 (em verde) do ensaio de estabilidade do peptídeo Occidentalina em soro (25%). Fração correspondente ao peptídeo Occidentalina indicada pela seta roxa.

Figura 8. Comparação entre o espectrograma da análise por MALDI-TOF da fração cromatográfica correspondente ao fragmento de degradação CAFWC e o espectrograma da análise por MALDI-TOF do controle de matriz ionizante.

Figura 9. Comparação entre o espectrograma da análise por MALDI-TOF da fração cromatográfica correspondente ao fragmento de degradação CAFWC e o espectrograma da análise por MALDI-TOF do controle dos componentes do soro.

Figura 10. Sequenciamento pelo método LIFT da fração correspondente à massa monoisotópica 627, confirmando a sequência de aminoácidos CAFWC prevista como fragmento de degradação do peptídeo cOccidentalina[5-9].

Figura 11. Latência em segundos até morte dos animais do grupo controle negativo e grupo com tratamento por cOccidentalina[5-9].

Figura 12. Latência em segundos para a primeira crise epiléptica de classe 7 no modelo de ácido caínico. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$.

Figura 13. Comparação dos cromatogramas das amostras do ensaio de estabilidade em soro do peptídeo Occidentalina, analisadas pelo método de corrida em 25 minutos. Eixo y: valores ASCs. Eixo x: tempo de corrida. Em azul: os cromatogramas correspondentes às análises das amostras contendo Occidentalina em soro após diferentes tempos de incubação. Em vermelho: cromatograma correspondente à análise da amostra contendo apenas soro.

Lista de tabelas

Tabela 1. Classificação de crises epiléticas, segundo o índice de Racine (1971), modificado por Pinel & Rovner (1978) (modificado).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Peptídeos terapêuticos.....</i>	15
1.1.1 <i>Histórico do uso de peptídeos terapêuticos.....</i>	15
1.1.2 <i>Análise do mercado atual de peptídeos terapêuticos.....</i>	17
1.1.3 <i>Vantagens e desvantagens dos peptídeos terapêuticos.....</i>	19
1.1.4 <i>Estratégias de otimização do perfil ADME de peptídeos.....</i>	22
1.2 <i>O uso de D-aminoácidos como estratégia de aumentar a biodisponibilidade.....</i>	23
1.2.1 <i>Proteção dos terminais.....</i>	24
1.2.2 <i>Aminoácidos N-Me e alfa-Me.....</i>	24
1.2.3 <i>Azapeptídeos.....</i>	24
1.2.4 <i>Ciclização.....</i>	24
1.2.5 <i>CPPs.....</i>	26
1.2.6 <i>Lipidização, conjugação a PEG e encapsulamento em nanopartículas.....</i>	26
1.3 <i>O uso de peçonhas/venenos na descoberta de novos peptídeos.....</i>	27
1.4 <i>O Peptídeo Occidentalina como molde para novos peptídeos.....</i>	28
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 <i>Objetivos Gerais.....</i>	29
2.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	29
3 METODOLOGIA.....	30
3.1 <i>Estratégia para o Desenho do peptídeo cOccidentalina[5-9]</i>	30
3.2 <i>Ensaio de estabilidade em soro.....</i>	30
3.3 <i>Metodologia de quantificação dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] por cromatografia líquida de fase reversa.....</i>	32
3.4 <i>Elaboração da curva de calibração do método utilizado para quantificação do peptídeo Occidentalina e cOccidentalina[5-9] por cromatografia de fase reversa.....</i>	32
3.5 <i>Identificação dos metabólitos e análise qualitativa das amostras do ensaio de estabilidade em soro por espectrometria de massas.</i>	33
3.6 <i>Bioensaios.....</i>	33
3.6.1 <i>Sujeitos experimentais.....</i>	33
3.6.2 <i>Procedimento cirúrgico para a implantação da cânula-guia.....</i>	34
3.6.3 <i>Modelo agudo de indução de crises epilépticas por ácido caínico.....</i>	35

3.6.4 Análise do posicionamento da cânula.....	36
3.6.5 Avaliação comportamental das crises epiléticas.....	36
4 RESULTADOS.....	38
4.1 Estratégia para o Desenho do peptídeo cOccidentalina[5-9]	38
4.2 Elaboração da curva de calibração do método utilizado para quantificação por cromatografia de fase reversa.....	38
4.3 Ensaio de estabilidade em soro.....	39
4.4 Identificação dos metabólitos e análise qualitativa das amostras do ensaio de estabilidade em soro dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] por espectrometria de massas.....	41
4.5 Bioensaios.....	45
4.5.1 Análise da posição das cânulas guias.....	45
4.5.2 Modelo agudo de crises induzido por ácido caínico.....	45
4.5.2.1 Proteção contra crise máxima.....	45
4.5.2.2 Latência para primeira crise máxima.....	46
5 DISCUSSÃO.....	47
6 CONCLUSÃO.....	59
7.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	60
8 ANEXOS.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 Peptídeos terapêuticos

O uso de peptídeos como fármacos representa um pequeno nicho na indústria farmacêutica, dominada majoritariamente por fármacos pequenos e “biológicos”. Peptídeos, neste trabalho, foram definidos de forma arbitrária como moléculas compostas de 1 a 70 resíduos aminoácidos por ligações peptídicas, enquanto fármacos biológicos correspondem ao grupo de anticorpos recombinantes e proteínas, e fármacos pequenos correspondem ao restante de fármacos não proteicos com peso molecular menor ou igual a 500 Da.

Para melhor entendimento do potencial de peptídeos no desenvolvimento de novos fármacos, é interessante a realização de uma comparação com os outros grupos que competem pelo interesse da indústria farmacêutica. Enquanto os fármacos pequenos possuem um perfil farmacocinético mais desejado, os peptídeos apresentam um perfil inerente de ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) muitas vezes indesejável. Contudo, fármacos pequenos estão geralmente associados à toxicidade resultante de ligações inespecíficas, desvantagem incomum no uso de peptídeos. Já quando comparados aos anticorpos terapêuticos, os peptídeos perdem no quesito seletividade e potência, mas ganham na capacidade de cruzar membranas presente em alguns, podendo agir em alvos intracelulares, e no menor custo de produção. Dessa forma, acredita-se que os peptídeos se encontram no “meio termo” entre os dois gigantes da indústria farmacêutica, tornando-os uma alternativa interessante que abrangem vantagens presentes em pequenos fármacos e em fármacos biológicos (CRAIK *et al*, 2013).

1.1.1 Histórico do uso de peptídeos terapêuticos

Até o final do século 19 e começo do século 20, a existência de hormônios era desconhecida. Acreditava-se que a propagação da informação responsável pela execução de processos fisiológicos era realizada exclusivamente pela transmissão de impulsos elétricos pelo sistema nervoso. Em 1902, o grupo de Bayliss e Starling realizou um estudo que mostrou o papel de uma substância encontrada no jejuno, até então desconhecida, na estimulação da secreção de suco pancreático. Tal descoberta inédita evidenciou a capacidade de uma substância exercer um papel importante em

um processo biológico. A substância em questão foi denominada “secretina”, de secreção, e o termo “hormônio” atribuído a estas substâncias foi originado alguns anos depois. A determinação da sequência e o isolamento da secretina só foi possível após aproximadamente seis décadas da sua descoberta. Naquela época, os processos de elucidação da sequência dos resíduos de aminoácidos e isolamento de um novo peptídeo eram precedidos de décadas de estudos por vários grupos de pesquisa (T. WIELAND *et al*, 1991).

Também no começo do século 20, o termo “peptídeo” foi criado por Fischer e Forneau em conjunto com a realização e descrição da primeira síntese química de um peptídeo, o dipeptídeo glicilglicina. O trabalho desses pesquisadores representa um importante marco no estudo de peptídeos. Até então, acreditava-se impossível a síntese de moléculas complexas contendo mais de um resíduo de aminoácido. Tal estudo atraiu a atenção da comunidade científica para a importância das proteínas e peptídeos, e Fischer recebeu o prêmio Nobel de Química em 1902 (T. WIELAND *et al*, 1991).

A insulina é considerada por muitos a precursora dos peptídeos terapêuticos. O mérito atribuído à insulina é justificável, principalmente em virtude da dificuldade que o isolamento de um peptídeo com 51 resíduos representava naquela época. Em 1922, McLeod, Banting e Best conseguiram isolar o hormônio em sua forma sólida. Esse grande avanço científico só foi possível devido ao desenvolvimento de uma nova técnica de extração da insulina presente nas glândulas utilizando etanol acidificado. Em meios ácidos, as enzimas proteolíticas tripsina e quimiotripsina deixam de exercer ação hidrolítica necessária para a clivagem das ligações peptídicas, impedindo com que a insulina seja degradada e possibilitando o isolamento por precipitação. (JOHN *et al*, 2004).

Em 1923, apenas um ano após seu isolamento, a insulina tornou-se o primeiro peptídeo terapêutico comercialmente disponível e McLeod e Banting receberam o Prêmio Nobel em Medicina neste mesmo ano pelo êxito no isolamento e descoberta do potencial terapêutico do peptídeo. A estrutura primária da insulina só foi elucidada em 1955, por Sanger e colaboradores. O grupo de Sanger elaborou uma nova metodologia para separar a molécula, constituída de duas grandes cadeias interligadas por ligações de dissulfeto, em fragmentos menores, facilitando a análise dos fragmentos peptídicos pequenos resultantes da clivagem. Sanger recebeu o

Nobel de Química em 1958 pela sua contribuição na elucidação da estrutura de proteínas, principalmente a da insulina. Simultaneamente ao trabalho de Sanger, Vincent du Vigneaud e associados elucidaram a sequência de resíduos de aminoácidos e realizaram a síntese da vasopressina e da ocitocina, feito que resultou na concessão do Nobel de Química em 1955 (T. WIELAND *et al*, 1991).

Durante a segunda metade do século 20, as áreas da genômica e proteômica avançaram rapidamente. As técnicas de síntese tornaram-se factíveis para produção dos peptídeos em larga escala, o que resultou na introdução de outros peptídeos no mercado farmacêutico, além da insulina. Entre eles, vasopressina, ocitocina, ACTH, calcitonina, octreotido e leuprorrelina, os dois últimos peptídeos análogos da somatostatina e gonadorelina, respectivamente (LAU, 2018). Em 1982, a primeira insulina humana produzida a partir de técnicas de inserção de DNA recombinante em bactérias foi introduzida no mercado. Até então, o peptídeo terapêutico insulina era isolado do pâncreas de cães e bovinos (BEST *et al*, 1962).

Esse grande avanço representou o começo da era da biologia molecular aplicada ao desenvolvimento e síntese de novos peptídeos terapêuticos, caracterizada pela maior disponibilidade de técnicas de expressão de proteínas recombinantes, novas ferramentas analíticas e técnicas de purificação de proteínas aprimoradas. Além disso, o avanço na área da genômica possibilitou também a descoberta e elucidação da estrutura molecular de muitos receptores de peptídeos hormonais endógenos. Tudo isso levou a uma expansão significativa da indústria farmacêutica e na pesquisa de peptídeos, ambas em busca de novos peptídeos seletivos aos receptores recentemente identificados (LAU *et al*, 2018).

1.1.2 Análise do mercado atual de peptídeos terapêuticos

O rendimento do mercado farmacêutico de peptídeos equivale à uma pequena fração das vendas farmacêuticas globais. Em 2015, apenas 6% aproximadamente do lucro total da indústria farmacêutica correspondeu a vendas de fármacos peptídicos (<https://pharmaceuticalcommerce.com/business-and-finance/global-pharma-spending-will-hit-1-5-trillion-in-2023-says-igvia/>.) Apesar da disparidade significativa, a taxa de crescimento anual do mercado de peptídeos (CAGR) prevista até 2024 de 9,1% indica uma expansão promissora no número de vendas, valor duas vezes maior

que o CAGR do mercado farmacêutico geral, com previsão de 4%. (<https://www.businesswire.com/news/home/20190102005680/en/>). Atualmente, aproximadamente 100 peptídeos já foram aprovados para uso clínico em todo o mundo, (<https://www.fda.gov/drugs/regulatory-science-action/impact-story-developing-tools-evaluate-complex-drug-products-peptides>) e mais de 400 estão na etapa da fase clínica de desenvolvimento (LEE *et al*, 2019).

Inicialmente, a maioria dos peptídeos terapêuticos era desenvolvida visando atuação em receptores hormonais, agindo no desbalanceamento hormonal presente em doenças metabólicas. A utilização de peptídeos análogos a hormônios endógenos na terapia continua sendo uma das principais estratégias terapêuticas até os dias de hoje. Entre os principais peptídeos terapêuticos voltados para tratamento de doenças metabólicas, estão a insulina e seus análogos, com um mercado estimado de 28 bilhões de dólares no ano de 2018; Liraglutide (Victoza® e Saxenda®), agonista análogo do hormônio GLP-1 estimulante da secreção de insulina utilizado para tratamento de diabetes tipo 2 e obesidade; Octreotide (Sandostatin®), inibidor de insulina e glucagon, utilizado principalmente para tratamento de acromegalia e redução de sintomas gastrointestinais em quadros de síndrome carcinoide; Exenatide (Bydureon®), agonista do receptor GLP-1 utilizado no tratamento de diabetes; Lanreotide (Somatuline®), indicado para tratamento de acromegalia e alívio de sintomas relacionados a tumores neuroendócrinos.

Além da utilização tradicional de peptídeos baseados em hormônios naturais, novas estratégias têm sido abordadas no desenvolvimento de fármacos peptídicos. Entre elas, o desenho racional de peptídeos seletivos capazes de interagir com proteínas extracelulares e intracelulares específicas, o que ampliou expressivamente as possibilidades de alvos farmacológicos (BIRK *et al*, 2013). Receptores acoplados à proteína G (GPCRs), receptores de peptídeos natriuréticos e receptores de citocinas representam os principais alvos moleculares de maior interesse. Além desses, epítomos de antígenos microbianos, canais iônicos, e outras proteínas extra e intracelulares também são alvos explorados.

Durante a última década, a maior incidência de casos de câncer levou a um aumento no interesse da indústria farmacêutica na busca de novos fármacos quimioterápicos seletivos e eficientes. Entre as novas iniciativas, peptídeos têm sido extensamente investigados por apresentarem alta seletividade e consequentemente

poucos efeitos adversos na maioria das vezes. A utilização de peptídeos para reconhecimento de moléculas diferentemente expressas em tumores também têm sido explorada como ferramentas de diagnóstico (LI *et al.*, 2012; JONCOUR & LAAKKONEN, 2018). Entre os peptídeos utilizados para tratamento de câncer, leuprolide (Lupron®), goserelina (Zoladex®) e lanreotide se destacam pelo número de vendas (VLIEGHE *et al.*, 2010; GOODWIN *et al.*, 2012; ARROWSMITH, 2012; USMANI SS. *et al.*, 2017).

Hoje em dia, o grande interesse em peptídeos terapêuticos no uso como quimioterápicos tornou essa área uma das mais importantes, juntamente com a área de doenças metabólicas. Além dessas áreas principais, peptídeos também são utilizados para tratamento de distúrbios do sistema nervoso, doenças cardiovasculares, infecciosas e gastrointestinais, entre outras menos exploradas. Alguns exemplos de peptídeos nestas áreas são: Glatiramer (Copaxone®), utilizado para tratamento de esclerose múltipla; Nesiritide (Natrecor®), indicado para casos de insuficiência cardíaca congestiva; Daptomycin (Cubicin®), antimicrobiano; e Linaclotide (Linzess®), utilizado em casos de síndrome do cólon irritado com constipação (VLIEGHE *et al.*, 2010). O uso de peptídeos terapêuticos não está restrito ao tratamento de doenças, como pode ser evidenciado pelo peptídeo imunossupressor ciclosporina, utilizado em procedimentos de transplante de órgãos.

1.1.3 Vantagens e desvantagens dos peptídeos terapêuticos

Peptídeos endógenos atuam como mensageiros de diversas vias metabólicas do sistema endócrino, sinalizando uma série de processos fisiológicos importantes para a homeostase do organismo. Tal sinalização geralmente ocorre por meio da ativação de receptores extracelulares, que por sua vez regulam vários processos intracelulares como ativação de enzimas, transporte de íons, transcrição de ácidos nucleicos, modificações pós-translacionais de proteínas, culminando na transdução do sinal inicial em uma resposta final, como por exemplo a expressão de um gene específico (KRAUSS, 2006). A interação entre um peptídeo e seu respectivo receptor pode ser chamada de interação *PPI* (do inglês *Protein-Protein-Interaction*). As *PPI*'s geralmente ocorrem por meio de interfaces de interação entre duas superfícies grandes ($\sim 1,500\text{--}3,000 \text{ \AA}^2$) majoritariamente hidrofóbicas (WELLS; MCCLEDON,

2007). A interface de interações entre moléculas pequenas e proteínas é relativamente menor (~300–1,000 Å²), e representa um alvo desafiador para fármacos pequenos. A maior superfície de interação e a utilização de peptídeos análogos a peptídeos endógenos garantem ligações altamente seletivas e potentes, geralmente associadas a fármacos peptídicos (JONES; THORNTON, 1996; CONTE *et al.*, 1999; CHENG *et al.*, 2007).

Além disso, a maior seletividade de interação presente nos peptídeos terapêuticos resulta em baixa toxicidade. O mesmo não pode ser dito para fármacos pequenos, os quais podem apresentar toxicidade significativa devido à promiscuidade das interações e inibição das enzimas do citocromo p450 (CYP) pelos metabólitos resultantes do processo de biotransformação, possivelmente dificultando a degradação de outros fármacos ou do composto original (BAILLIE; RETTIE, 2011). No caso dos peptídeos terapêuticos, a maior facilidade de predição dos metabólitos resultantes dos processos de biotransformação, constituídos de fragmentos de resíduos de aminoácidos majoritariamente não tóxicos, pode ser considerada uma vantagem no processo de desenvolvimento de um novo fármaco (LAU; DUNN, 2018).

A maior desvantagem dos peptídeos terapêuticos está no perfil farmacocinético precário geralmente associado a esta classe de fármacos. Peptídeos não modificados são extremamente suscetíveis à degradação enzimática, apresentando valores baixos de meia-vida e conseqüentemente baixa biodisponibilidade. Tal suscetibilidade advém da existência de mais de 500 proteases e peptidases encontradas por todo o corpo capazes de degradar peptídeos endógenos. Como a maioria dos peptídeos endógenos funciona como hormônio, é importante que existam mecanismos de regulação e degradação destes peptídeos, geralmente metabolizados após exercerem seus respectivos efeitos biológicos. A degradação enzimática de peptídeos ocorre principalmente pela ação de proteases presentes no lúmen do trato gastrointestinal, como a tripsina, pepsina e quimotripsina, e por uma série de exopeptidases e endopeptidases presentes na circulação sanguínea, fígado e rins. As exopeptidases podem ser divididas em aminopeptidases, enzimas que atuam em resíduos de aminoácidos na região N-terminal, e carboxipeptidases, que atuam na região C-terminal. As peptidases diferem no grau de seletividade no reconhecimento dos substratos, enquanto algumas são altamente seletivas na clivagem de uma sequência específica de aminoácidos, outras são mais

promíscuas, atuando após reconhecimento de um único resíduo de aminoácido (ADESSI; SOTO, 2002; BROWNLEES; WILLIAMS, 1993).

Além da suscetibilidade a proteases, peptídeos apresentam baixa biodisponibilidade após administração oral e baixa permeabilidade a membranas biológicas. A maioria dos peptídeos terapêuticos apresenta menos de 5% de biodisponibilidade após administração oral em relação à administração intravenosa ou subcutânea, e mais de 75% desses peptídeos comercialmente disponíveis são administrados por vias parenterais (SMART *et al.*, 2014; FOSGERAU; HOFFMANN, 2014). A baixa biodisponibilidade oral ocorre devido à presença de proteases do trato-gastrointestinal e à baixa absorção intestinal. Na maioria dos casos, para que um composto tenha biodisponibilidade oral, ele deve apresentar uma série de parâmetros descritos como a regra dos 5 de Lipinski's (*Lipinski's rule of five*): massa molecular menor que 500 mw, número de aceptores de hidrogênio menor ou igual a 10, número de doadores de hidrogênio menor ou igual a 5, valor de Log P (medida da hidrofobicidade de um composto) menor que +5, e número de ligações rotacionáveis menor ou igual a 10 (extensão da regra de acordo com VEBER *et al.*, 2002; LIPINSKI, 2004). Segundo a regra dos 5, os peptídeos não obedecem a nenhum dos requisitos na maioria dos casos. A baixa biodisponibilidade oral presente em peptídeos pode ser considerada uma grande desvantagem quando comparados a fármacos pequenos, visto que a possibilidade de administração oral é mais desejada pela indústria farmacêutica e pelos pacientes.

Além disso, a baixa permeabilidade a membranas biológicas dos peptídeos pode impedir com que eles sejam capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, além de dificultar também a ação em alvos intracelulares. Os peptídeos capazes de cruzar a barreira hematoencefálica e a membrana celular são chamados de peptídeos penetradores de células, CPP (do inglês *cell penetrating peptides*), e serão abordados detalhadamente mais adiante.

Outro fator importante a ser considerado é a complexidade e o custo de produção. O custo de síntese de um peptídeo pode exceder de 10 a 100 vezes o valor da produção de um fármaco pequeno, devido à necessidade do uso em excesso de aminoácidos a serem acoplados e de grupos protetores a cada ciclo no processo de síntese em fase sólida ou em solução (VLIEGHE *et al.*, 2010; BRAY *et al.*, 2003).

Apesar do maior custo em relação a fármacos pequenos, peptídeos são uma alternativa mais barata e acessível quando comparados aos anticorpos terapêuticos.

1.1.4 Estratégias de otimização do perfil ADME de peptídeos

Nas últimas décadas, o constante avanço na área de química medicinal possibilitou o desenvolvimento de estratégias já bem estabelecidas para a otimização do perfil farmacocinético de peptídeos. O desenho racional de um peptídeo consiste na realização de modificações pontuais na sua estrutura levando em consideração a região farmacofórica essencial ao seu efeito biológico. O estabelecimento da região farmacofórica geralmente é obtido por meio de estudos de truncamento ou substituição de resíduos de aminoácidos por resíduos de Alanina (*Ala-scan*), determinando assim a sequência mínima de aminoácidos essencial para a ligação com o alvo (MORRISON; WEISS, 2001).

Além da determinação da sequência mínima, a elucidação da estrutura secundária e terciária do peptídeo e da interface de ligação dele com o alvo podem ajudar no estabelecimento da conformação em que o peptídeo apresenta atividade biológica. Em peptídeos com a conformação alfa-hélice, por exemplo, a interação com o alvo pode ocorrer por meio de uma única face da hélice, possibilitando modificações dos resíduos não críticos direcionadas a uma melhoria dos parâmetros farmacocinéticos. Estudos estruturais geralmente são realizados utilizando-se técnicas de RMN, cristalografia, dicroísmo circular e uma série de estudos *in silico*.

Anteriormente a qualquer modificação na sequência ou estrutura dos peptídeos, é comum a identificação dos resíduos mais suscetíveis à ação enzimática. Essa etapa pode ser realizada por meio de ferramentas *in silico* de predição dos sítios de clivagem por proteases, como por exemplo, PeptideCutter, PROSPER e CutDB. Estes softwares auxiliam na identificação não só das regiões mais suscetíveis à ação proteolítica, mas também providenciam uma previsão das enzimas atuantes na degradação do peptídeo de interesse. Além da análise prévia *in silico*, estudos de degradação em meios biológicos e subsequente análise dos fragmentos resultantes por cromatografia e espectrometria de massas (LC/MS) são rotineiramente realizados. Os ensaios de degradação em meio biológico utilizados para estudo de estabilidade

de peptídeos geralmente incluem a incubação em soro, plasma ou sangue, e em homogeneizados de fígado ou do órgão alvo de interesse.

Após a identificação dos metabólitos resultantes da proteólise, o desenho de um peptídeo análogo com modificações pontuais dos resíduos identificados como alvo da clivagem enzimática pode ser realizado. A alteração dos resíduos lábeis por aminoácidos não naturais, sintéticos, ou por aminoácidos menos suscetíveis à ação enzimática pode levar a um aumento significativo da meia-vida de um peptídeo. Para cada aminoácido natural existe um conjunto de aminoácidos não-naturais semelhantes resistentes à ação proteolítica (FREY *et al.*, 2008).

1.2 O uso de D-aminoácidos como estratégia de aumentar a biodisponibilidade

A substituição dos resíduos suscetíveis por seus respectivos enantiômeros (D-aminoácido, D-aa) pode levar a um aumento significativo da estabilidade biológica de um peptídeo. Aminoácidos não naturais na configuração D impedem, na maioria das vezes, com que as enzimas sejam capazes de reconhecê-los como substratos. D-aas são considerados uma das primeiras alternativas consideradas no processo de otimização, e com o auxílio de estudos conformacionais podem levar a um aumento significativo na meia-vida dos peptídeos, como pode ser evidenciado por uma série de estudos (CHEN *et al.*, 2013; WEINSTOCK *et al.*, 2012). Além de substituições pontuais, a estratégia da substituição de todos os aminoácidos do peptídeo por D-aas, resultando em um peptídeo retro-inverso, também pode ser utilizada (WEI X. *et al.*, 2014; TAYLOR *et al.*, 2010).

1.2.1 Proteção dos terminais

A ação enzimática nas regiões terminais pode ser reduzida pela substituição de resíduos mais suscetíveis à ação enzimática por aminoácidos mais resistentes. Os aminoácidos metionina, serina, alanina, treonina, valina e glicina são mais suscetíveis, enquanto, prolina, ácido glutâmico e serina são opções que conferem maior resistência à clivagem (WERLE *et al.*, 2006). Modificações por aminoácidos análogos não naturais na região terminal podem também conferir resistência proteolítica. Além disso, as estratégias de amidação do C-terminal e acetilação do N-terminal

geralmente conferem proteção contra carboxi e aminopeptidases, respectivamente, e são estratégias utilizadas com frequência.

1.2.2 Aminoácidos N-Me e alfa-Me

A adição de grupos metil na cadeia principal do peptídeo (*backbone*) pode ser incorporada na otimização, obstruindo a ligação de proteases. As principais estratégias de metilação incluem análogos de aminoácidos com um grupo metil no carbono alfa, alfa-Me-aa, e N-Me, aqueles em que o hidrogênio ligado ao nitrogênio da ligação peptídica é substituído por um grupo metil. Além da proteção contra proteases, N-Me's podem conferir maior permeabilidade a membranas biológicas a peptídeos cíclicos, por meio de grupos metil posicionados de forma a direcionar as ligações de hidrogênio intramoleculares para o interior da molécula, reduzindo assim o número de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio e aumentando a biodisponibilidade oral (WHITE *et al.*, 2011).

1.2.3 Azapeptídeos

Azapeptídeos (*Azapeptides*) são peptídeos modificados em que o carbono alfa da cadeia principal e o hidrogênio são substituídos por um nitrogênio, reduzindo a vulnerabilidade a proteases (GRAUER; KÖNIG, 2009). A substituição de um grupo com arranjo tetraédrico por um grupo piramidal trigonal pode levar a um aumento da flexibilidade da molécula do peptídeo. Em certas situações, como no caso de alguns peptídeos antimicrobianos em alfa-hélice, a flexibilidade do peptídeo é fundamental para seu efeito biológico (LIU *et al.*, 2013). O contrário também pode acontecer; uma maior flexibilidade pode levar à uma diminuição da afinidade ao receptor devido a uma maior penalidade entrópica da ligação, além de uma redução da permeabilidade a membranas (REZAI, 2006).

1.2.4 Ciclização

Seguindo a estratégia de restringir a flexibilidade conformacional, a ciclização de peptídeos garante proteção tanto contra exopeptidases como endopeptidases. As

proteases geralmente têm como requisito a conformação linear e estendida do *backbone* para reconhecimento (HENNINOT *et al.*, 2017). Além disso, nos casos em que a conformação estabelecida durante a interação com o alvo é conhecida, a ciclização pode ser utilizada para favorecer a interação restringindo a molécula na conformação assumida com melhor afinidade ao alvo, reduzindo assim a penalidade entrópica de ligação. A ciclização pode ser realizada entre cadeias laterais e o *backbone*, entre cadeias laterais, e ciclização *head-to-tail*, em que os terminais C- e N- são interligados. No caso da ciclização *head-to-tail*, a ligação dos terminais pode levar a uma variação significativa na conformação do peptídeo, e por esse motivo só é recomendada nos casos em que os terminais do peptídeo já são naturalmente próximos (SATOH *et al.*, 1996; ROZEK *et al.*, 2003).

A ciclização pela ligação entre cadeias laterais pode ser realizada por meio de pontes dissulfeto entre cisteínas, cistationinas ou variações análogas da cisteína. O processo da formação da ponte dissulfeto por ser realizado entre cisteínas presentes no peptídeo original, ou entre cisteínas inseridas (MUTTENTHALER *et al.*, 2010). No caso dos peptídeos que possuem resíduos de lisina e ácido glutâmico em posições favoráveis à ciclização, a ligação pode ser realizada pela formação de pontes *lactam* entre os resíduos em questão (AHN *et al.*, 2001). Outra estratégia interessante consiste na ciclização pela ligação por pontes thioether entre duas cisteínas, cisteína e serina, ou entre cisteína e resíduos não naturais (KLUSKENS *et al.*, 2009; RINK, *et al.*, 2010; PROKAI *et al.*, 1997).

Recentemente, a técnica de grampeamento (*stapling*) de peptídeos na conformação alfa-hélice por hidrocarbonetos tem se mostrado muito eficiente em garantir não só resistência a proteases, mas também permeabilidade a membrana celular. A fixação de um peptídeo pelo processo de *stapling* impede com que as enzimas tenham acesso às ligações peptídicas situadas na região interior da alfa-hélice, além de favorecer a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares, garantido assim maior permeabilidade a membranas biológicas. Essa ferramenta é especialmente interessante na otimização de peptídeos que naturalmente assumem uma conformação helicoidal na interação com o alvo, pois garante o estabelecimento consistente da conformação com maior afinidade (HUY N. HOANG *et al.*, 2015; BIRD *et al.*, 2015; WALENSKY; BIRD, 2015; DIDERICH *et al.*, 2016).

1.2.5 CPPs

Os CPPs são uma classe diversa de peptídeos que conseguem cruzar a membrana celular, capacidade ausente na maioria dos peptídeos. CPPs têm sido utilizados como vetores carreadores de moléculas incapazes de penetrar membranas, como por exemplo, nucleotídeos de siRNA (EGUCHI & DOWDY, 2009), peptídeos não-CPPs, e até moléculas pequenas (MÄE; LANGEL, 2006). Além da aplicabilidade na associação com outras moléculas, CPPs podem também apresentar atividade biológica própria (TAYLOR *et al.*, 2009). Apesar da grande diversidade na sequência de aminoácidos, os CPPs podem ser divididos em três classes principais: catiônicos, anfipáticos e hidrofóbicos. CPPs catiônicos apresentam um grande número de aa's com carga positiva, majoritariamente arginina. (TUNNEMANN *et al.*, 2007; FUTAKI *et al.*, 2001). A classe dos anfipáticos consiste principalmente de peptídeos em conformação alfa-hélice, em que os resíduos hidrofílicos e os hidrofóbicos são separados em diferentes fases da hélice (OEHLKE *et al.*, 1998). CPPs hidrofóbicos são menos comuns, e são caracterizados pela predominância de resíduos apolares (MILLETTI *et al.*, 2012).

1.2.6 Lipidização, conjugação a PEG e encapsulamento em nanopartículas

A conjugação de peptídeos a moléculas lipídicas pode levar a um aumento do tempo de meia-vida e facilitar a interação dos mesmos com a superfície da membrana celular (ERAK *et al.*, 2018). Além disso, a lipidação permite a ligação de peptídeos a moléculas de albumina, prolongando o tempo de circulação e diminuindo a eliminação renal (LEVY *et al.*, 2014). Peptídeos podem ser conjugados também a moléculas de polietilenoglicol (PEG), resultando em um conjugado peptídeo-PEG com um perfil farmacocinético mais apropriado para um fármaco (JEVŠEVAR *et al.*, 2010). O encapsulamento em nano e micropartículas pode conferir proteção contra degradação química e enzimática, além de possibilitar liberação controlada e estendida dos peptídeos encapsulados (DOMBU & BETBEDER, 2013; SILVA *et al.*, 2013). As estratégias de conjugação ou encapsulamento são opções interessantes porque permitem a utilização de peptídeos não modificados, preservando o efeito biológico inerente ao peptídeo original. O mesmo não vale para as estratégias de modificação do *backbone* ou cadeias laterais, em que a mudança de um único aa pode levar ao

rearranjo espacial de resíduos próximos, culminando em mudança conformacional significativa o suficiente a ponto do peptídeo perder afinidade ao alvo.

1.3 O uso de peçonhas/venenos na descoberta de novos peptídeos

A grande diversidade de espécies animais venenosas e/ou peçonhentas mostra como venenos ou peçonhas são ferramentas evolutivamente vantajosas. Apesar da enorme variedade na composição, a maioria dessas secreções é constituída de sais orgânicos (< 1 kDa), polipeptídeos (2-9 kDa), e proteínas de alto peso molecular (> 10 kDa). Nas peçonhas de artrópodes, até então estudados, peptídeos bioativos contendo pontes dissulfeto são predominantes, e geralmente atuam em alvos do sistema nervoso, paralisando a presa (OLIVERA *et al.*, 1995; SOLLID *et al.*, 2005). Em contrapartida, em vertebrados, principalmente em peçonhas de serpentes, existem uma predominância de proteínas grandes e enzimas, e geralmente agem nos sistemas neuromuscular e cardiovascular (FRY, 2005; YEOW & KINI, 2012).

Há milênios, venenos e toxinas são considerados importantes fontes de compostos terapêuticos. As proteínas e peptídeos bioativos presentes nesses coquetéis apresentam alta potência e especificidade aos seus alvos moleculares, o que pode ser explicado pela pressão seletiva constante entre animais venenosos e suas presas por milhares de anos, resultando em toxinas altamente eficientes. Além disso, estes compostos proteicos geralmente apresentam resistência a proteases, devido à estabilidade garantida pelas pontes dissulfeto e estruturas terciárias complexas. Considerando a relação predador-presa, é importante para o predador que os peptídeos bioativos presentes na peçonha consigam chegar em seus alvos moleculares sem serem degradados ou eliminados. Assim sendo, peptídeos e proteínas presentes nas peçonhas de animais podem ser considerados candidatos terapêuticos interessantes, por apresentarem alta potência, seletividade, e na maioria dos casos, alta estabilidade (FRY *et al.*, 2009; REID *et al.*, 2007; KING, 2011).

Na década de 70, o fármaco Captopril, baseado em peptídeos capazes de induzir hipotensão e bradicardia encontrados na peçonha de uma espécie de serpente brasileira, *Bothrops Jararaca*, foi desenvolvido e aprovado para uso clínico. Hoje em dia, a versão otimizada, Enalapril, é utilizada para tratamentos de pressão alta,

insuficiência cardíaca e nefropatia diabética (PENNINGTON *et al.*, 2018). Nas décadas de 70 e 80, a baixa quantidade de peçonha encontrada em invertebrados era um fator limitante na área da toxilogia, época em que as técnicas analíticas proteômicas ainda estavam em desenvolvimento inicial. Dessa forma, os primeiros fármacos derivados de animais eram extraídos de peçonhas de vertebrados, principalmente serpentes. O avanço nas tecnologias de bioinformática, espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear (RMN), e na área de transcriptoma através de bibliotecas de cDNA possibilitaram análises qualitativas e quantitativas dos compostos presentes nas peçonhas dos mais diversos organismos (A. HARVEY *et al.*, 2014; I. VETTER *et al.*, 2011). Os peptídeos terapêuticos Ziconotide (Prialt®), Bivalirudin (Anagiomax®) e Exenatide (Byetta®), são exemplos de fármacos derivados de peçonhas de animais aprovados para uso clínico.

1.4 O Peptídeo Occidentalina como molde para novos peptídeos

A Occidentalina (OcTx-1202) é um peptídeo com nove resíduos, EQYMVAFWM-NH₂, encontrado na peçonha da vespa social *Polybia occidentalis*. Em 2005, Mortari e colaboradores estudaram o efeito antiepiléptico do peptídeo, o qual foi capaz de proteger os camundongos contra crises convulsivas induzidas por ácido caínico e pentilenotetrazol após administração i.c.v nas doses 0.15, 1.5 e 3 ug por animal, além de aumentar o período de latência para o início da primeira crise. Supreendentemente, a dose máxima, 3 ug/animal, foi capaz de proteger 100% dos animais em ambos modelos por indução de crises. Além disso, o peptídeo também garantiu proteção após administração sistêmica pela via intraperitoneal avaliado pelo modelo de indução por ácido caínico, indicando que o peptídeo é capaz de cruzar a barreira hematoencefálica (Mortari, 2005). Desde então, uma série de análogos bioinspirados da Occidentalina foram desenhados e submetidos à avaliação do potencial terapêutico em modelos animais de epilepsia, Doença de Alzheimer e Doença de Parkinson (Campos, G. A, 2016), apresentando resultados promissores. Enquanto os perfis farmacodinâmicos do peptídeo Occidentalina e seus análogos já foram avaliados em estudos prévios do mesmo laboratório, estudos dos perfis farmacocinéticos não foram realizados até a elaboração deste projeto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um novo peptídeo e avaliar o perfil de estabilidade em soro do peptídeo natural Occidentalina e de seu análogo, assim como avaliar a atividade antiepiléptica do peptídeo a ser desenvolvido.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenho racional de um análogo do peptídeo Occidentalina visando otimização do perfil de estabilidade em soro e manutenção do efeito biológico.
- Padronização de um método para quantificação dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] por cromatografia líquida de fase reversa.
- Identificação dos metabólitos decorrentes da degradação enzimática dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] em soro por espectrometria de massas.

3. METODOLOGIA

3.1 Estratégia para o Desenho do peptídeo cOccidentalina[5-9]

Primeiramente, a suscetibilidade a proteases do peptídeo Occidentalina e os prováveis sítios de clivagem enzimática foram avaliados por meio dos softwares de predição PeptideCutter e PROSPER. O software de predição da estrutura secundária de peptídeos PEPFOLD foi utilizado no processo do desenho do análogo do peptídeo natural Occidentalina (MAUPETIT *et al.*, 2009; BEAUFAYS *et al.*, 2012).

Após as predições *in silico* iniciais, com base na sequência do peptídeo Occidentalina, EQYMVAFWM-NH₂, o análogo cOccidentalina[5-9] com modificações na sequência, englobando as seguintes substituições: pEQYMCAFWC (pE: ácido piroglutâmico; ligação dissulfeto entre as cisteínas; com ausência de amidação do C-terminal) foi desenhado, e sintetizado pela empresa Biointech Biotecnologia LTDA. A pureza do peptídeo (>95%) e a presença da ligação dissulfeto foram confirmadas por espectrometria de massas pelo equipamento MALDI-TOF Autoflex Speed no modo positivo refletivo. Para calibração externa, uma mistura de peptídeos (Peptide Calibration Standard IV, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) foi utilizado. O equipamento foi controlado por meio do software Flex Control (versão 3.4), e as análises foram realizadas por meio do software Flex Analysis (versão 3.4). A matriz de ionização utilizada foi uma solução ácida de a-cyano-4-hydroxycinnamic (HCCL).

3.2 Ensaio de estabilidade em soro.

A estabilidade biológica dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] foi avaliada após incubação à 37°C durante 24 horas, em soro diluído em salina (25%). Inicialmente, camundongos (n=10) foram anestesiados com solução de cloridrato de quetamina (150 mg/kg i.p) e cloridrato de xilazina (30 mg/kg) diluídas em solução fisiológica (PBS, pH 7,4). Em seguida, a máxima quantidade de sangue foi retirada por punção cardíaca de cada animal por meio de uma agulha de 0.80 x 25 mm acoplada a uma seringa de 1 mL, resultando em um total de aproximadamente 5 mL de sangue após coleta de todos os animais. Para obtenção do soro, o sangue foi distribuído em 5 microtubos de 1,5 mL sem anticoagulantes, e permaneceu em temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida, os microtubos contendo

sangue coagulado foram submetidos a centrifugação por 10 minutos a 1000 xg. Após centrifugação, o sobrenadante de cada microtubo foi coletado e transferido para um tubo de centrifugação de 15 mL, resultando em um total de aproximadamente 2 mL de soro. O ensaio foi dividido em quatro grupos:

- Grupo Occidentalina: 620 μ L de solução do peptídeo Occidentalina (40 μ g/mL) diluído em salina (NaCl 0,9%) com 20% de DMSO, e 200 μ L de soro, obtendo a concentração final de 50 μ g/mL do peptídeo na solução de 25% de soro em salina, em microtubo de 1,5 mL, realizado em triplicata.
- Grupo cOccidentalina[5-9]: 620 μ L de solução do peptídeo cOccidentalina[5-9] (40 μ g) diluído em salina (NaCl 0,9%) com 20% de DMSO, e 200 μ L de soro, obtendo concentração final de 50 μ g/mL do peptídeo na solução de 25% de soro em salina, em microtubo de 1,5 mL, realizado em triplicata.
- Grupo Controle Soro: 200 μ L de soro diluído em 620 μ L de salina (NaCl 0,9%), em microtubo de 1,5 mL, realizado em triplicata.
- Grupo Controle Occidentalina: 40 μ g do peptídeo Occidentalina diluído em 820 μ L de salina com 20% de DMSO, obtendo concentração final de 50 μ g/mL do peptídeo, em microtubo de 1,5 mL, realizado em triplicata.
- Grupo Controle cOccidentalina[5-9]: 40 μ g do peptídeo cOccidentalina[5-9] diluído em 820 μ L de salina com 20% de DMSO, obtendo concentração final de 50 μ g/mL do peptídeo, em microtubo de 1,5 mL, realizado em triplicata.

Para o ensaio de estabilidade, os microtubos de todos os grupos foram incubados em um termociclador sob agitação constante durante 24 horas a 37 °C. Em tempos pré-definidos de 0, 6, 12 e 24 horas, alíquotas de 200 μ L dos microtubos dos grupos Occidentalina, cOccidentalina[5-9] e Controle Soro, foram coletadas e submetidas ao processo de precipitação das proteínas por adição de 400 μ L de acetonitrila à 4 °C, submetidas em seguida a 30 s de agitação utilizando vórtex e por final, 10 min de centrifugação à 15000 xg a 4 °C. O sobrenadante resultante foi coletado e transferido para outro microtubo. Alíquotas de 2 μ L foram coletadas para

identificação dos metabólitos por espectrometria de massas (MS). Em seguida, o sobrenadante foi submetido ao processo de liofilização pelo equipamento SpeedVac, e armazenados no freezer a -20 °C até o procedimento de análise das amostras. Alíquotas de 200 µL também foram coletadas nos mesmos intervalos de tempo dos microtubos pertencentes aos grupos Controle Occidentalina e Controle cOccidentalina[5-9], e passaram pelo processo de liofilização e subsequente armazenamento a -20 °C até o procedimento de análise por HPLC.

3.3 Metodologia de quantificação dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] por cromatografia líquida de fase reversa

A coluna Synergi 4u Hydro-RP 80A (250 x 4,6 mm) de fase reversa foi utilizada para a análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). O método utilizado para as análises cromatográficas seguiu as seguintes condições cromatográficas: fase móvel A: H₂O 0,12% trifluoroacético (TFA), fase móvel B: acetonitrila 0,12% TFA; fluxo: 1 mL/min; gradiente: 0-100% da solução B em 50 minutos; absorvância analisada a 214 nm. As alíquotas do ensaio de estabilidade foram ressuspensas em 50 µL de 20% de solução B em solução A, submetidas a 20 segundos no vórtex, 20 segundos no ultrassom e 20 segundos na microcentrifuga, em seguida, injetadas no HPLC para análise. Os valores de Área Sob a Curva (ASC) correspondentes à Occidentalina e COccidentalina[5-9] foram utilizados para identificar a quantidade remanescente dos peptídeos intactos após os intervalos de tempo do ensaio de estabilidade em soro (de 0 a 24 horas), relativamente à intensidade do sinal das amostras do tempo inicial (tempo 0). Todas as frações foram coletadas para análise por MS.

3.4 Elaboração da curva de calibração do método utilizado para quantificação do peptídeo Occidentalina e cOccidentalina[5-9] por cromatografia de fase reversa.

Para elaboração da curva de calibração, concentrações conhecidas do peptídeo Occidentalina foram submetidas (volume de injeção: 50 µL) à análise por cromatografia de fase reversa seguindo as seguintes condições cromatográficas: fase

móvel A: H₂O 0,12% trifluoroacético (TFA), fase móvel B: acetonitrila 0,12% TFA; fluxo: 1 mL/min; gradiente: 0-100% da solução B em 30 minutos; absorvância analisada a 214 nm; 50 µL de 20% de solução B em solução A foram utilizados para ressuspender o peptídeo anteriormente à análise por cromatografia. A relação da área sob a curva (ASC) da fração correspondente ao peptídeo com a quantidade injetada no equipamento foi realizada em seis diferentes concentrações (1.25, 2.5, 5, 7.5, 10 µg em 50 µL) para elaboração da curva de calibração.

3.5 Identificação dos metabólitos e análise qualitativa das amostras do ensaio de estabilidade em soro por espectrometria de massas.

O material presente em um dos microtubos das triplicatas de todos os grupos do ensaio de estabilidade em soro foi utilizado para análise pelo espectrômetro de massas MALDI-TOF. As amostras foram ressuspensas em 20 µL de ACN/Água Deionizada (MilliQ) (50%) e plaqueadas em triplicata para análise (1 µL). A solução matriz de ionização, HCCL, serviu como controle correspondente às frações dos componentes da matriz. As frações eluídas durante as cromatografias realizadas para quantificação dos peptídeos foram liofilizadas por meio do equipamento SpeedVac, ressuspensas na mesma solução de ACN/Água Deionizada e analisadas também por meio do equipamento MALDI-TOF. Os espectros de massas das amostras contendo os peptídeos em soro nos tempos 6, 12 e 24 (Grupo Occidentalina e Grupo cOccidentalina[5-9]) foram comparados aos espectros das amostras contendo apenas soro (Grupo Controle Soro) e aos espectros das amostras contendo apenas matriz. As frações encontradas somente nos espectros correspondentes às amostras contendo os peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] em soro foram consideradas possíveis fragmentos decorrentes da degradação proteolítica e sequenciadas em seguida pelo método LIFT (MS/MS).

3.6 Bioensaios

3.6.1 Sujeitos experimentais

Para avaliar a manutenção do efeito antiepiléptico do peptídeo análogo cOccidentalina[5-9], camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) foram utilizados no

ensaio de modelo agudo de indução de crises epiléticas por ácido caínico. Para avaliar a estabilidade biológica dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9], camundongos Swiss machos foram utilizados. A manipulação dos sujeitos experimentais foi realizada de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (Lei 11.794/2008). O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas (CEUA/IB) da Universidade de Brasília – UnB e deferido, (Anexo 1).

Os camundongos utilizados pesando aproximadamente 20-30 g foram adquiridos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, mantidos em caixas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm – comprimento x largura x altura), acondicionados em estufas com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Durante todo o período de experimento foram oferecidas água e ração específica para camundongos *ad libitum*.

3.6.2 Procedimento cirúrgico para a implantação da cânula-guia

A avaliação do efeito antiepilético do peptídeo cOccidentalina[5-9] foi realizada por meio do modelo agudo com indução de crises por ácido caínico. Para implantação da cânula guia no ventrículo lateral cerebral direito os animais foram submetidos a um procedimento estereotáxico. Os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de quetamina (75 mg/kg i.p) e cloridrato de xilazina (15 mg/kg) diluídas em solução fisiológica (PBS). Em seguida, foram restringidos em um estereotáxico (Isight Equipamentos ®) e uma solução asséptica de iodopolividona 10% (Vic Pharma®) foi aplicada. Em seguida, uma solução de cloridrato de lidocaína com hemitartarato de norepinefrina (30 mg/mL com 0,04 mg/mL; Dentsply Pharmaceutical) foi aplicada por injeção local subcutânea na região do topo do crânio dos animais. Uma gota de salina foi aplicada nos olhos dos animais. O crânio foi exposto para implantação da cânula guia no ventrículo lateral, de acordo com as medidas estereotáxicas: AP: -0,2 mm; ML: -1,0 mm; DV: -2,3 mm, tendo como referência a linha do bregma de acordo com o atlas de Paxinos & Franklin, 2001. Um parafuso de aço inoxidável foi fixado no lado contralateral paralelo à cânula para facilitar aderência da resina acrílica (Dentbras ®) polimerizada com líquido acrílico

(Dentbras ®). Em seguida, a solução de acrílico foi aplicada de forma a proteger a área exposta do crânio e estabilizar a cânula durante o período de cicatrização. A cânula foi produzida à partir de um fragmento de 10 mm de agulhas hipodérmicas BD 0,70 x 25 (22G) e foi selada com um segmento de aço inoxidável para evitar entupimento (Figura 1). Após solidificação da solução de acrílico, foi administrada na região operada uma pomada tópica de sulfato de neomicina e bacitracina (5 mg/g e 250 uL/g; Medley) para proteger os animais contra infecções e auxiliar no processo de cicatrização. Por final, os animais ficaram em observação até retomada das funções motoras, e foram mantidos no biotério por 5 dias para recuperação do procedimento cirúrgico.



Figura 1. Implantação de cânula guia no ventrículo lateral direito.

3.6.3 Modelo agudo de indução de crises epilépticas por ácido caínico

Os animais receberam o peptídeo (3 $\mu\text{g}/\text{animal}$) por administração intracerebroventricular (i.c.v), por meio de uma bomba de infusão (BI-2008, AVS Projetos) conectada a uma microseringa (Gastight 10 μL , Modelo 1701 N SYR, Hamilton ®) na taxa de infusão de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Após 15 minutos da administração do peptídeo, os animais foram infundidos com ácido caínico via i.c.v (0,8 $\mu\text{g}/\text{animal}$, Sigma-Aldrich®) para indução das crises. Os animais do grupo controle negativo

receberam administração i.c.v de 1 μ L da solução utilizada como veículo para solubilização do peptídeo, 20% DMSO em solução fisiológica 0,9%. O monitoramento do comportamento dos animais foi realizado em uma arena com uma câmera diretamente acima durante 30 minutos. Os animais submetidos ao ensaio foram divididos em dois grupos independentes: grupo veículo (controle negativo), grupo em que foi administrado 1 μ L L a solução fisiológica com 20% de DMSO (n=7), e após 15 minutos foram infundidos com ácido caínico; e grupo cOccidentalina[5-9], grupo em que os animais receberam 1 uL da solução do peptídeo (3 μ g/animal) solubilizado em 20% DMSO em solução fisiológica 0,9%, e após 15 minutos receberam a administração do ácido caínico. Após realização do ensaio, os animais que não foram a óbito durante o procedimento foram eutanasiados com tiopental sódico (180 mg/Kg).

3.6.4 Análise do posicionamento da cânula

Após o ensaio de indução de crises por ácido caínico, os camundongos foram eutanasiados e seus ventrículos cerebrais foram infundidos via i.c.v com o corante azul de metileno, a fim de verificar o posicionamento da cânula. A distribuição do corante em ambos ventrículos laterais cerebrais, direito e esquerdo, indica posicionamento correto da cânula e, assim, o animal pode ser considerado nas análises estatísticas.

3.6.5 Avaliação comportamental das crises epilépticas

Para a avaliação comportamental das crises epilépticas após ensaio com ácido caínico, foi observada a influência do peptídeo na latência para o estabelecimento da primeira crise generalizada e a porcentagem de proteção contra as mesmas, além da proteção contra morte dos sujeitos experimentais. A análise foi realizada durante os primeiros 30 minutos de vídeo após transferência dos animais para a arena utilizada no ensaio. A latência até o primeiro evento de crise generalizada e da morte foram observados para cada animal. As análises foram realizadas de acordo com o índice de Racine (1971) modificado por Pinel & Rovner (1978) para o ácido caínico (*tabela 1*). Os dados de latência contra a crise máxima (classe 7) e até o óbito induzidas por ácido caínico foram submetidos ao teste de normalidade

Kolmogorov-Smirnov, tendo apresentando significância estatística, seguiu-se ao teste “t de student”, considerando-se valores de $p < 0,05$ como significantes.

Tabela 1. Classificação de crises epiléticas, segundo o índice de Racine (1971), modificado por Pinel & Rovner (1978) (modificado).

Classe	Comportamento do Camundongo
1 e 2	Movimentos orofaciais e mioclonia de cabeça
3	Mioclonia das patas anteriores
4 e 5	Elevação e queda
6	Todos os anteriores em sequência
7	Vocalizações, rolamentos e pulos violentos repetidos, além de um período de hipertonia

4. RESULTADOS

4.1 Estratégia para o Desenho do peptídeo cOccidentalina[5-9]

De acordo com análise pelos softwares PeptideCutter e PROSPER, as principais enzimas endógenas capazes de agir na Occidentalina são as enzimas pepsina, quimotripsina, Catepsina K e matriz metalopectidase-9. A principal região do peptídeo suscetível às enzimas não exclusivas ao trato-gastrointestinal foi identificada como a região entre a metionina e o triptofano (EQYMVAFW*M-NH₂). Segundo análise estrutural do peptídeo Occidentalina pelo software de predição PEPFOLD, os resíduos hidrofóbicos tirosina, triptofano e fenil encontram-se na mesma face, formando uma possível interface hidrofóbica (figura 2) de acordo com a maioria das conformações previstas.

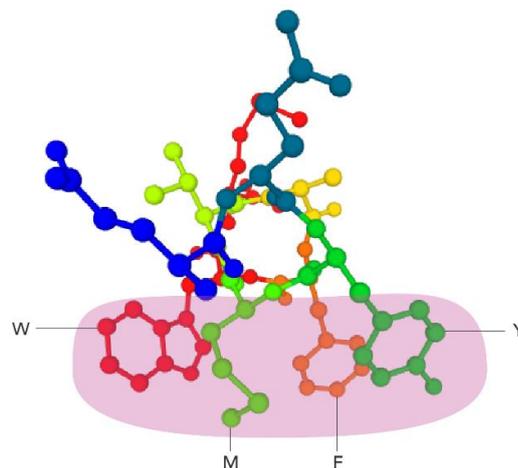


Figura 2 Predição da estrutura terciária do peptídeo Occidentalina por meio do software PEPFOLD. Interface hidrofóbica constituída dos resíduos de triptofano, metionina, fenil e tirosina em contraste rosa.

4.2 Elaboração da curva de calibração do método utilizado para quantificação por cromatografia de fase reversa.

Após a análise por cromatografia das amostras com quantidades definidas de Occidentalina, obteve-se um R² de 0,9976, indicando que o valor de ASC e quantidade injetada obedecem a uma relação linear satisfatória, relação necessária para a quantificação relativa por cromatografia realizada neste projeto.

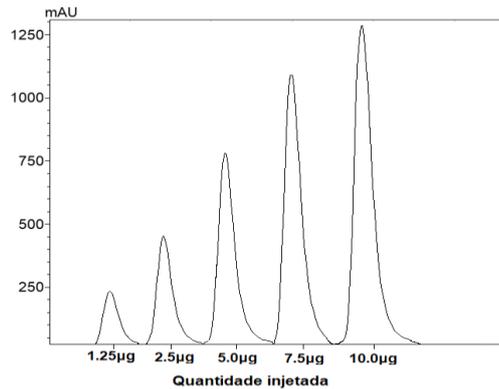


Figura 3. Representação gráfica das frações obtidas após análise por cromatografia de quantidades injetadas conhecidas (eixo x), eixo y: absorbância (mAU).

Curva de calibração - quantificação Occidentalina

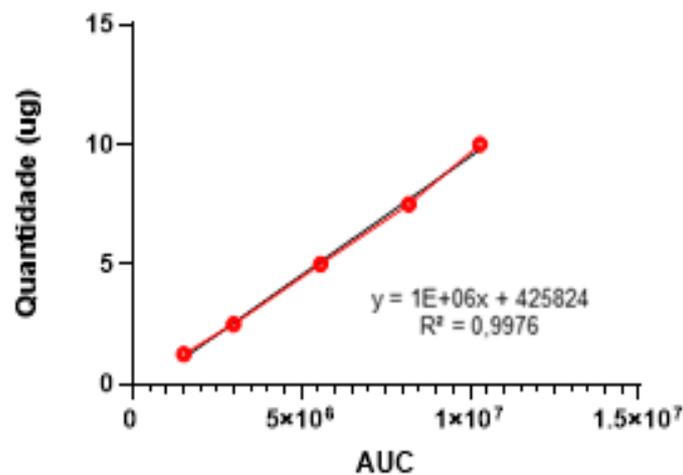


Figura 4. Curva de calibração analítica da Occidentalina em doses conhecidas indicando relação linear entre quantidades injetadas conhecidas (eixo x) com os valores de AUC (eixo y).

4.3 Ensaio de estabilidade em soro

Para avaliar a estabilidade em soro, os peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] foram incubados em soro diluído (25%) em salina durante 24 horas a 37°C. Alíquotas foram coletadas durante os tempos 0, 6, 12 e 24 e submetidas ao processo de precipitação por ACN e subsequente quantificação por cromatografia líquida de fase reversa. O peptídeo Occidentalina apresentou taxa de recuperação após extração pelo processo de precipitação por adição de acetonitrila de aproximadamente 45%, enquanto o peptídeo cOccidentalina[5-9] apresentou taxa de recuperação de aproximadamente 80%.

O peptídeo Occidentalina apresentou notável valor de meia-vida de depleção de aproximadamente 24 horas em soro diluído (25%), o equivalente ao valor de 6 horas em soro não diluído. O peptídeo cOccidentalina[5-9] apresentou meia-vida de aproximadamente 6 horas em soro diluído, o equivalente a 1,5 horas em soro. Após 24 horas, apenas aproximadamente 15% do peptídeo cOccidentalina[5-9] permaneceu intacto, enquanto 51% do peptídeo Occidentalina ainda pode ser identificado. Ambos peptídeos permaneceram estáveis na solução controle de salina durante todo o ensaio de acordo com a comparação entre os valores obtidos no tempo 0 e no tempo 24 (figuras 4, 5 e 6).

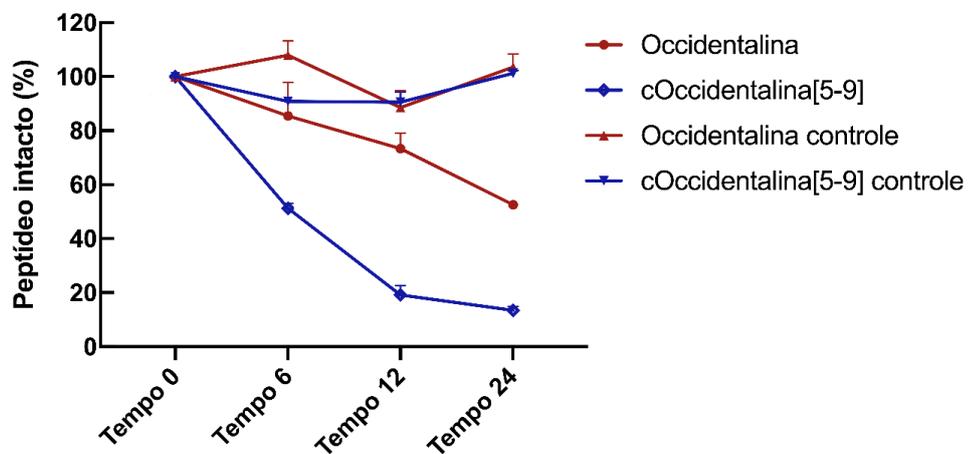


Figura 5. Ensaio de estabilidade em soro (25%). Eixo y: porcentagem dos valores das ASCs no tempo 0 dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] intactos relativos aos valores nos tempos 6, 12 e 24. Eixo x: Tempos ensaio de estabilidade em soro (25%).

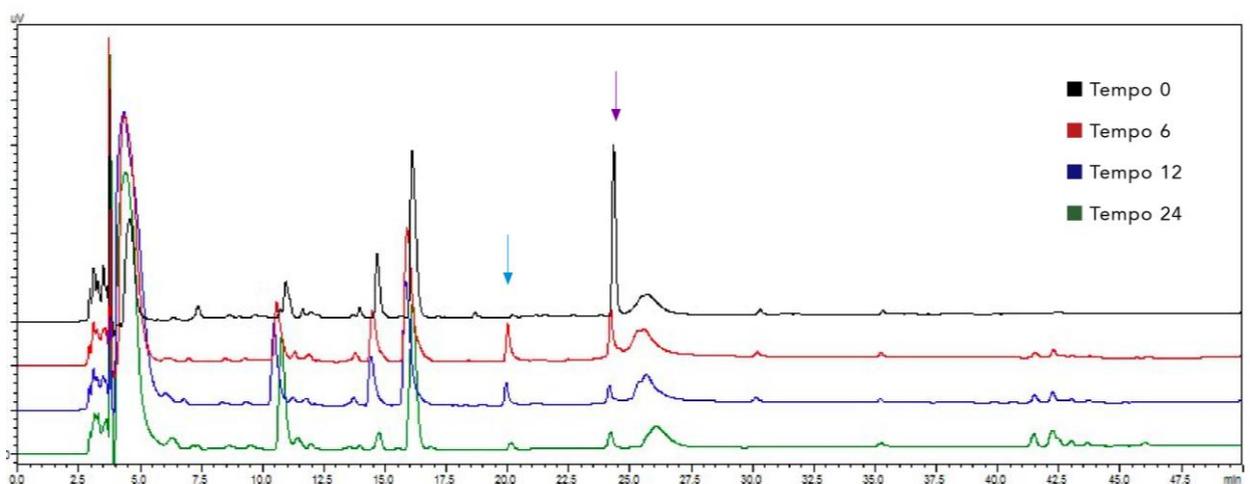


Figura 6. Comparação dos cromatogramas respectivos aos tempos 0 (em preto), tempo 6 (em vermelho), tempo 12 (em azul), e tempo 24 (em verde) do ensaio de estabilidade do peptídeo cOccidentalina[5-9] em soro (25%). Fração correspondente ao peptídeo

cOccidentalina[5-9] indicada pela seta roxa. Fração correspondente ao fragmento de degradação CAFWC indicada pela seta azul.

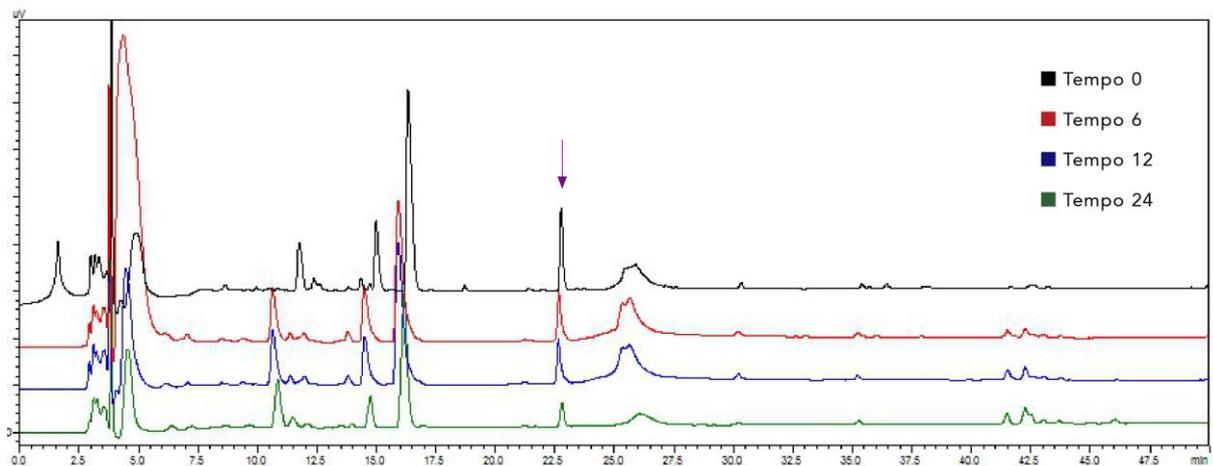


Figura 7. Comparação dos cromatogramas respectivos aos tempos 0 (em preto), tempo 6 (em vermelho), tempo 12 (em azul), e tempo 24 (em verde) do ensaio de estabilidade do peptídeo Occidentalina em soro (25%). Fração correspondente ao peptídeo Occidentalina indicada pela seta roxa.

4.4 Identificação dos metabólitos e análise qualitativa das amostras do ensaio de estabilidade em soro dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] por espectrometria de massas.

As eluições dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] somente nas frações consideradas nas suas respectivas quantificações pelo valor de ASC foram confirmadas por análise de cada fração cromatográfica pelo MALDI-TOF. Não foi possível identificar fragmentos/metabólitos da Occidentalina decorrentes da degradação enzimática.

O fragmento do peptídeo cOccidentalina[5-9] com massa isotópica de 627.135 Da correspondente à sequência de resíduos CAFWC foi identificado na análise por MALDI-TOF, após análise por comparação entre os espectrogramas correspondentes à amostra de soro e ao controle da matriz ionizante utilizada. O fragmento identificado estava presente somente nas amostras do ensaio de estabilidade do peptídeo cOccidentalina[5-9] em soro, como pode ser observado pela comparação entre as análises pelo MALDI-TOF (figuras 7 e 8). A composição da sequência identificada foi confirmada por análise pelo método LIFT (MS/MS) (figura 9).

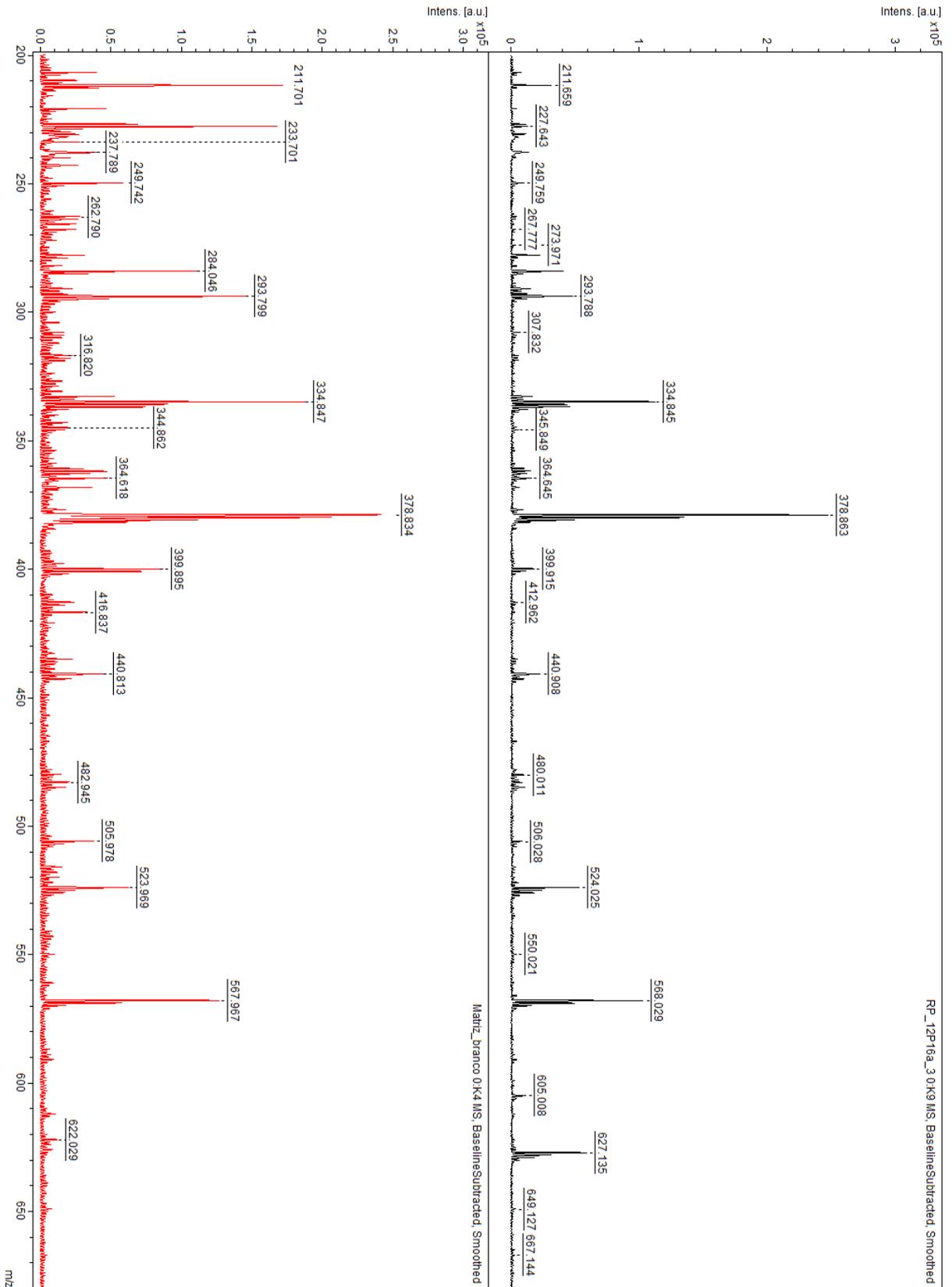


Figura 8. Comparação entre o espectrograma da análise por MALDI-TOF da fração cromatográfica correspondente ao fragmento de degradação CAFWC e o espectrograma da análise por MALDI-TOF do controle de matriz ionizante.

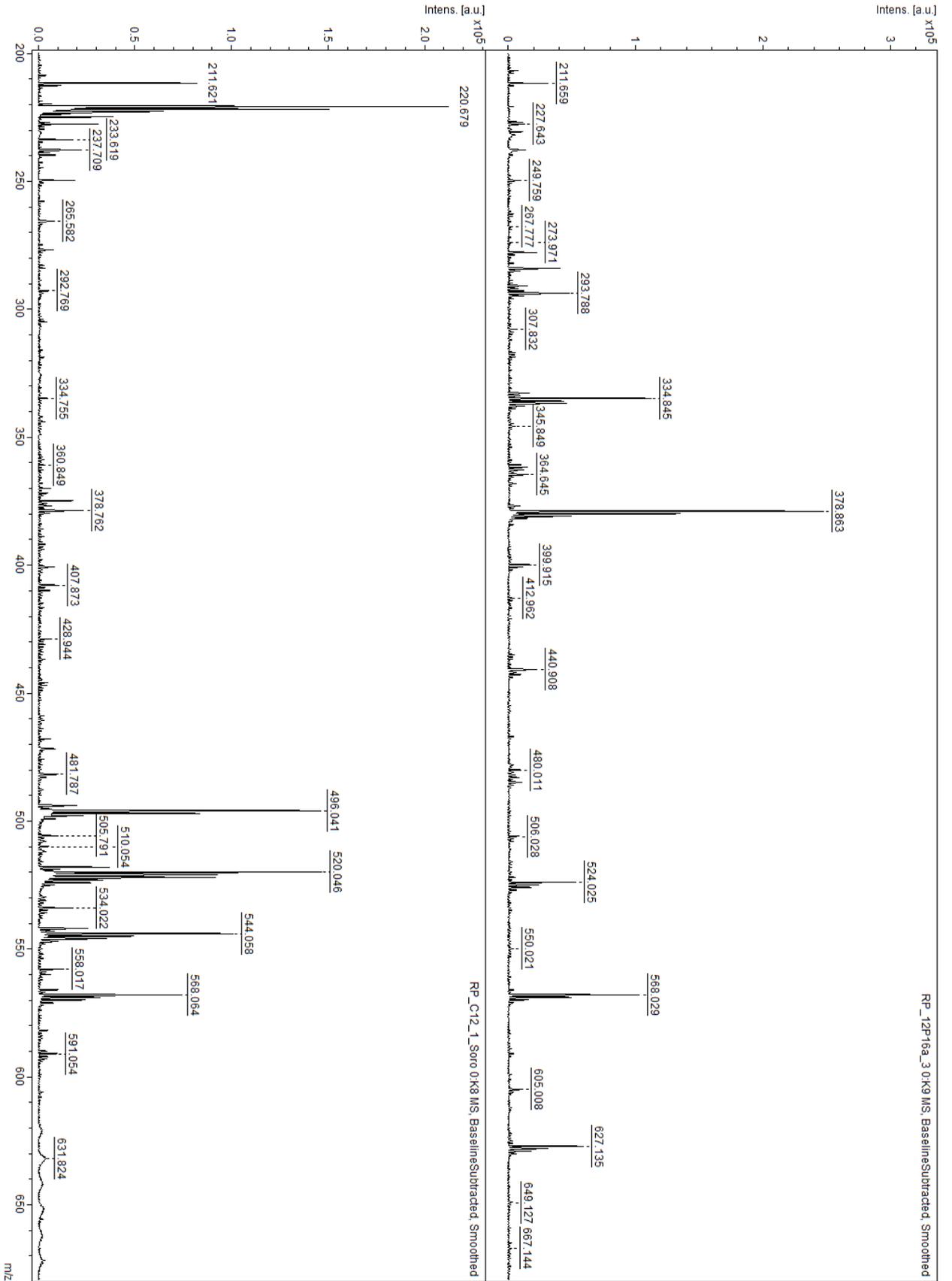


Figura 9. Comparação entre o espectrograma da análise por MALDI-TOF da fração cromatográfica correspondente ao fragmento de degradação CAFWC e o espectrograma da análise por MALDI-TOF do controle dos componentes do soro.

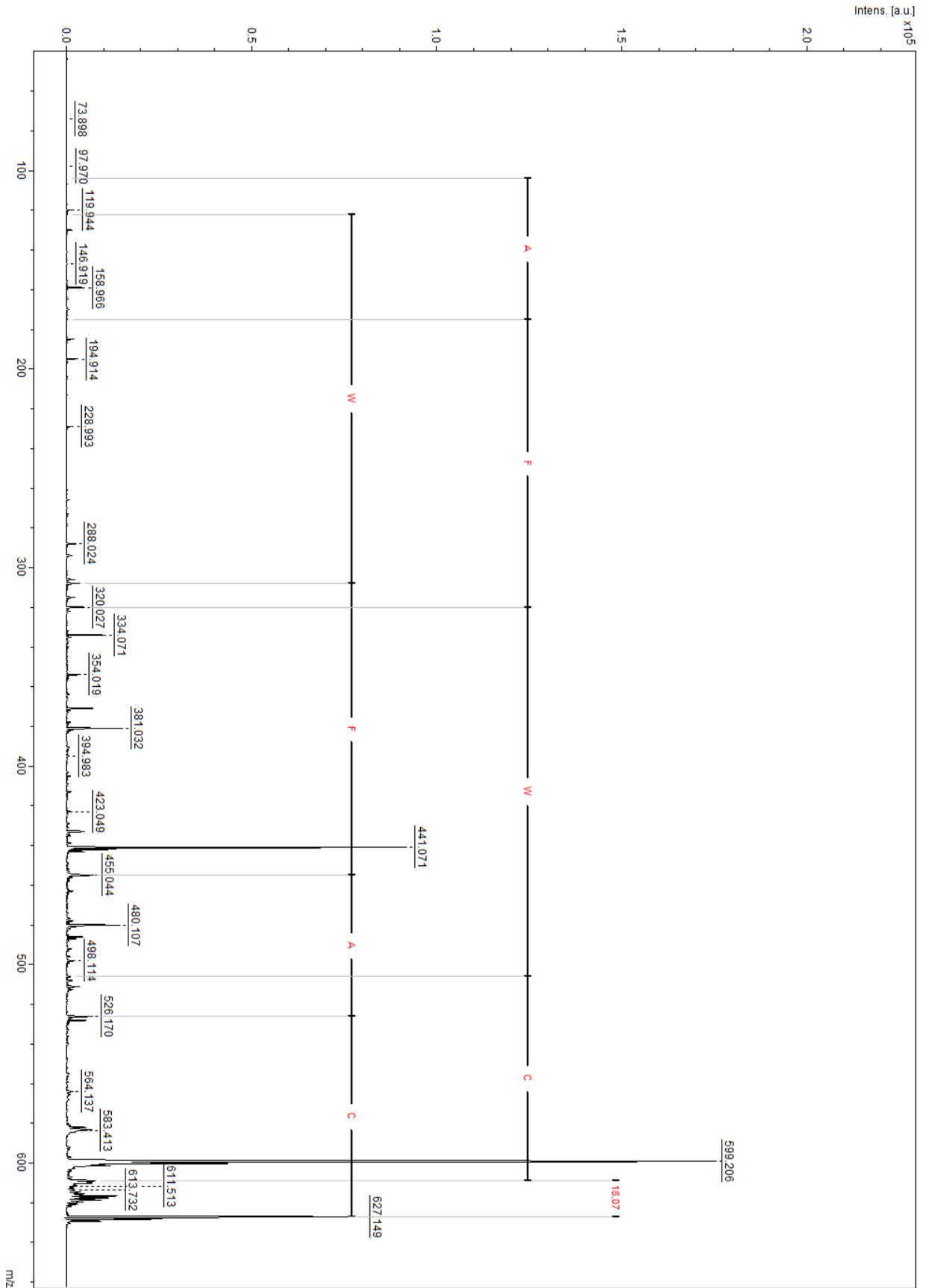


Figura 1. Sequenciamento pelo método LIFT da fração correspondente à massa monoisotópica 627, confirmando a sequência de aminoácidos CAFWC prevista como fragmento de degradação do peptídeo cOccidentalina[5-9].

4.5 Bioensaios

4.5.1 Análise da posição das cânulas guias

Apenas os resultados dos animais que apresentaram a cânula guia implantada corretamente no ventrículo lateral foram utilizados nas análises estatísticas (n=7).

4.5.2 Modelo agudo de crises induzido por ácido caínico

4.5.2.1 Proteção contra crise máxima

Os dados de latência contra a crise máxima (classe 7) induzidas por ácido caínico foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, tendo apresentando significância, seguiu-se ao teste “t de student”, considerando-se valores de $p < 0,05$ como significantes. As análises mostraram que o peptídeo cOccidentalina[5-9] injetado via i.c.v. (3 $\mu\text{g}/\text{animal}$) não resultou em uma diferença significativa de proteção contra a crise máxima em relação ao grupo veículo controle ($p=0,21$)

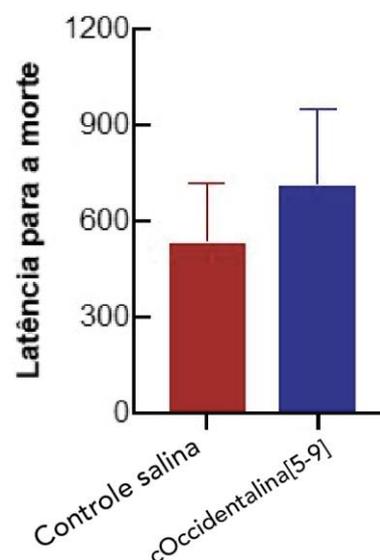


Figura 11. Latência em segundos até morte dos animais do grupo controle negativo e grupo com tratamento por cOccidentalina[5-9]. Teste t de student, $p=0,21$.

4.5.2.2 Latência para primeira crise máxima

Os valores de latência para o início das crises de classe 7 no modelo agudo de ácido caínico, foram submetidos ao teste "t de student", considerando-se $p < 0,05$. Não houve diferença significativa entre o grupo cOccidentalina[5-9] e o grupo controle veículo ($p = 0,57$).

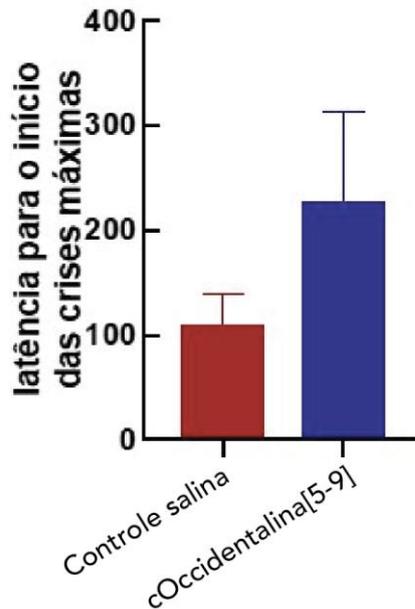


Figura 12. Latência em segundos para a primeira crise epiléptica de classe 7 no modelo de ácido caínico. Teste t de student, $p = 0,57$.

5. DISCUSSÃO

Entre as diversas doenças neurológicas, a Epilepsia se destaca pelo seu alto grau de incidência, afetando mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo (FAUGHT et al., 2012; GRAVITZ, 2014). A epilepsia tem sido definida como uma doença crônica do cérebro caracterizada pela predisposição em gerar crises espontâneas, imprevisíveis e recorrentes. As crises são decorrentes de descargas anormais de neurônios, e apresentam consequências sociais, neurobiológicas, cognitivas e fisiológicas para os pacientes (FISHER et al., 2005; FISHER et al., 2008). Clinicamente, um paciente é considerado epilético caso apresente ao menos uma das seguintes condições: a ocorrência de duas crises não provocadas com um período menor que 24 horas entre elas; uma crise sob uma condição de alta probabilidade de recorrência em um período de 10 anos, similar à probabilidade após duas crises não provocadas; e diagnóstico de uma síndrome epilética.

Os fármacos antiepiléticos atuais estão associados a efeitos adversos impactantes, como uma consequente deterioração cognitiva, entre outros efeitos mais graves, podendo afetar significante e negativamente a vida dos pacientes. Além disso, a maioria dos fármacos têm se mostrado ineficazes no tratamento em cerca de 40% dos pacientes (ENGEL et al., 2012). Dessa forma, a realização de novos estudos que busquem a disponibilização de novos fármacos mais eficientes no tratamento da epilepsia, além da otimização pré-clínica racional do perfil de ADME dos mesmos, representam importantes áreas de estudo e investimento. Peptídeos terapêuticos são uma alternativa interessante ao uso tradicional de moléculas pequenas no tratamento de doenças neurológicas, principalmente devido à alta seletividade geralmente presente e consequente baixa toxicidade. (BAIG et al., 2018; MORIMOTO et al., 2008).

O mecanismo de ação do peptídeo Occidentalina ainda não é conhecido. Sendo assim, a determinação da região farmacofórica é uma tarefa difícil. A falta de conhecimento acerca de quais resíduos e suas respectivas cadeias laterais são responsáveis pela interação com o alvo molecular opõe restrições no processo de desenho racional de peptídeos análogos. Nesses casos em que o mecanismo de ação ainda não foi elucidado, a estratégia de scanning representa uma alternativa interessante, a qual uma série de análogos com modificações em diferentes resíduos

é sintetizada e submetida a avaliações dos perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos (AHN et al., 2001). Por final, o análogo com o melhor perfil farmacológico é selecionado. Apesar de ser uma estratégia bastante abrangente, o alto custo de síntese de todos os análogos e realização dos ensaios representa um obstáculo em estágios iniciais do estudo de um peptídeo. Em contraponto, desenho de um análogo visando manter alta similaridade com o peptídeo original é uma estratégia menos dispendiosa e amplamente aplicada. Nos casos em que o objetivo é manter a afinidade ao alvo e otimizar o perfil farmacocinético, as substituições de resíduos podem ser inseridas visando a manutenção dos parâmetros físico-químicos dos resíduos originais, como por exemplo, a substituição de um resíduo apolar por outro também apolar.

No presente trabalho, a primeira etapa no processo do desenho de um análogo mais resistente a proteases foi a predição da ação proteolítica do peptídeo Occidentalina por meio dos softwares PeptideCutter e PROSPER. Segundo análise pelo PeptideCutter, as principais enzimas endógenas capazes de agir na Occidentalina são as enzimas pepsina e quimotripsina. Essas enzimas são encontradas principalmente no trato gastrointestinal, e por esse motivo, não foram consideradas no processo de desenho do análogo, o qual, como a maioria dos peptídeos terapêuticos, foi planejado visando administração parenteral. A análise pelo software PROSPER indicou suscetibilidade às enzimas Catepsina K e matrix metalloproteinase-9, ambas na posição entre a metionina e o triptofano (EQYMVAFW*M-NH₂).

Além da vulnerabilidade à ação proteolítica, à alta reatividade destes resíduos a espécies reativas de oxigênio os tornam sujeitos ao processo de oxidação. A oxidação de resíduos pode levar a uma redução na afinidade ao alvo de um peptídeo, principalmente devido a possíveis mudanças conformacionais, variações na hidrofobicidade e ponto isoelétrico, podendo levar também a uma maior suscetibilidade a proteases (LI, 1995; CLELAND et al., 1994). Em um estudo recente do mesmo laboratório (VARELA, 2019), a ação anticonvulsivante de um análogo bioinspirado da Occidentalina após substituições dos resíduos de metionina por norleucina foi avaliada. Após as substituições, o peptídeo não apresentou atividade biológica anticonvulsivante, indicando que os resíduos de metionina são importantes para a afinidade ao alvo, ou para a manutenção da conformação do peptídeo

necessária para a ligação. Sendo assim, o desenho de um análogo da Occidentalina com a substituição dos resíduos de metionina por resíduos não naturais com alta similaridade na conformação e parâmetros físico-químicos foi realizado, resultando em um análogo com resíduos de O-metil-L-homoserina (resíduos resultantes da substituição do sulfeto da metionina por um oxigênio). Contudo, o alto custo do processo de síntese deste análogo previsto por uma série de empresas foi considerado um revés irresolúvel, e por final, optou-se pela manutenção do resíduo de metionina na posição 3.

Segundo análise estrutural do peptídeo Occidentalina pelo software de predição PEPFOLD, os resíduos aromáticos tirosina, triptofano e fenil encontram-se na mesma face, formando uma interface hidrofóbica (*figura 2*). As interações hidrofóbicas são as mais comuns entre ligantes e seus respectivos alvos proteicos, e por esse motivo, optou-se pela preservação desta interface (FERREIRA DE FREITAS; SCHAPIRA, 2017). A substituição do resíduo de glutamato presente na região N-terminal por um resíduo de piroglutamato foi adotada no desenho do análogo. Tal substituição teve como base a maior atividade biológica do peptídeo Neurovespina análogo à Occidentalina, desenhado com essa mesma substituição (DOS ANJOS, 2017). Além disso, a inserção de um resíduo de piroglutamato na região N-terminal pode levar também a uma maior proteção contra aminopeptidases (GAZME et al., 2019).

A inserção de ligações de dissulfeto intra ou intermoleculares entre cadeias laterais é uma estratégia frequentemente utilizada, e geralmente resulta em análogos altamente estáveis a degradação proteolítica e resistentes a altas temperaturas. (CHEN, 2015; MUTTENTHALER, 2010; ROZEK et al., 2003; RINK et al., 2010; LEE et al., 2020; B. CARSTENS et al., 2012). O processo de ciclização ou semi-ciclização de um peptídeo interfere no reconhecimento pelas proteases e no acesso às ligações peptídicas no interior da molécula, além de garantir também maior estabilidade molecular. Por final, considerando as predições dos resíduos mais suscetíveis à ação enzimática in silico, os benefícios no perfil farmacodinâmico e cinético após substituição do resíduo de glutamato por piroglutamato, e a predição conformacional pelo software PEPFOLD, foi realizado o desenho do análogo semi-cíclico cOccidentalina[5-9] (pEQYMCAFWC) (pE: ácido piroglutâmico; ligação dissulfeto entre as cisteínas). A posição escolhida para as substituições por cisteínas e

subsequente ciclização foi baseada na proximidade dos resíduos nas posições 9 e 5 e na manutenção projetada da interface hidrofóbica dos resíduos aromáticos dispostos na mesma face da molécula após análise pelo PEPFOLD.

A quantificação de um peptídeo em amostras biológicas complexas geralmente é precedida por processos de preparo das amostras a serem analisadas. A etapa de preparação consiste na remoção de compostos que podem interferir na quantificação por cromatografia líquida (LC), espectrometria de massas (MS) ou LC-MS. Na quantificação por cromatografia em fase reversa, compostos presentes no material biológico podem eluir em tempos similares ao composto a ser quantificado, impossibilitando a quantificação pela ASC da fração de interesse. Além disso, dependendo do tipo de coluna utilizado, compostos com alta massa molecular podem acabar levando a uma obstrução dos poros da coluna ou da pré-coluna. No caso da utilização de MS para a quantificação, o sinal do peptídeo a ser quantificado pode ser suprimido pelo sinal da ionização dos outros compostos da amostra, como sais e proteínas presentes no material biológico. Sendo assim, a etapa de preparação das amostras anterior à quantificação é de extrema importância, e pode ser realizada de diversas formas, entre elas, por precipitação.

O preparo por precipitação das proteínas, também chamado de desproteinização, constitui na adição de solventes orgânicos na amostra biológica a ser analisada, seguido de centrifugação, o que resulta na formação de um precipitado contendo as proteínas da amostra, e um sobrenadante contendo moléculas pequenas e peptídeos, o qual pode ser extraído e submetido a análises por LC ou MS. O processo de precipitação é bastante utilizado devido ao baixo custo e disponibilidade dos reagentes e facilidade na execução do processo. Entre os vários solventes orgânicos, acetonitrila (ACN) (PROKAI-TATRAI et al., 2000; YAMAGUCHI et al., 2000) metanol (YANG et al., 1996; DETERS et al., 2002) , ácido tricloroacético (TCA) (NOTO et al., 2008; POWELL et al., 1992) e etanol (ENG et al., 2014; CHEN et al., 2013) são frequentemente utilizados. Apesar da praticidade do método, o processo de precipitação leva a uma perda da quantidade do peptídeo analito, podendo resultar em taxas de recuperação (recovery rate) do peptídeo baixas e dificultando a quantificação. Normalmente, a precipitação com vários solventes orgânicos é realizada, e aquele solvente que levou a uma maior taxa de recuperação do analito é adotado para os ensaios de quantificação.

Além do método de precipitação, métodos mais sofisticados de separação e isolamento podem ser utilizados, como por exemplo, utilizando anticorpos específicos ao peptídeo analito, geralmente acoplados em uma fase sólida (WOLF et al., 2001). A alta especificidade dos anticorpos permite taxas de recuperação e reprodutibilidade elevadas, porém, o processo dispendioso de geração dos anticorpos ou o custo envolvido são fatores a serem considerados. Outros métodos de preparação, como extração em fase sólida, SPE (do inglês solid-phase extraction) (HAJEE et al., 2001), filtração em gel (STEGEHUIS et al., 1990) e extração líquido-líquido, LLE (liquid-liquid extraction), também podem ser utilizados (GARTEIZ et al., 1998).

Para este projeto, optou-se pelo método de extração dos peptídeos por precipitação das proteínas após adição de solventes orgânicos, devido à maior praticidade do método e disponibilidade dos reagentes utilizados. O processo de precipitação das proteínas ocorre devido à acidificação do meio, o qual altera a solubilidade das mesmas na solução. Inicialmente, a recuperação do peptídeo Occidentalina em soro foi avaliada após o processo de precipitação por meio de soluções de solventes contendo o dobro do volume da amostra a ser analisada. As seguintes soluções foram avaliadas: metanol, TCA (10%), acetonitrila, etanol, e acetonitrila com 30% de metanol. Entre todas as soluções avaliadas, as soluções de acetonitrila e metanol foram as únicas que resultaram em um sobrenadante monofásico transparente. O sobrenadante resultante após adição de cada solução foi então submetido à quantificação por cromatografia seguindo os mesmos parâmetros descritos na seção de métodos. O solvente acetonitrila resultou em uma maior recuperação do peptídeo e em uma fração correspondente ao mesmo sem arraste frontal ou cauda posterior (*tailing*) (dados não mostrados) quando comparado com os outros solventes, e foi adotado para os ensaios de estabilidade em soro.

As estratégias de quantificação podem ser divididas em quantificações absolutas e quantificações relativas. A quantificação relativa equivale à comparação do sinal equivalente ao analito em diferentes estados, como por exemplo, a variação entre a intensidade do sinal de uma amostra contendo um peptídeo às 0 horas em material biológico e após degradação durante 24 horas, analisadas por cromatografia por detecção ultravioleta (UV). Quantificações absolutas geralmente requerem a utilização de marcadores (labelled-based quantification). Entre os principais marcadores, a marcação por reagentes que resultam na formação de isótopos

estáveis, como por exemplo iCAT (isotope-coded affinity tags) e ICPL (isotope coded protein label), após ligação às cisteínas e lisinas do peptídeo, respectivamente, permite quantificação precisa por espectrometria de massas. Além desses marcadores, outras estratégias de quantificação com alta precisão também podem ser realizadas, entre elas: iTRAQ (Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research), Silac (Use of Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture for Phosphotyrosine Protein Identification and Quantitation) Silam (Stable isotope labeling in mammals), utilizadas principalmente para a quantificação de proteínas (BARBOSA et al., 2012).

A quantificação por cromatografia de fase reversa, geralmente utilizando colunas do tipo C18, é bastante utilizada para a quantificação de peptídeos em ensaios de estabilidade biológica. A ASC correspondente à fração do peptídeo analito pode ser interpretada como a intensidade do sinal de absorção após emissão de raios UV, no caso de HPLCs e UPLCs com detectores UV, a qual está diretamente relacionada à quantidade do analito. No modo offline, as frações da cromatografia podem ser coletadas e analisadas em seguida em espectrômetros de massas, para análise qualitativa dos componentes, ou até mesmo quantitativa dependendo do espectrômetro utilizado. Já no modo online, as amostras são analisadas por sistemas LC-MS, com ambos equipamentos acoplados, geralmente com injetores do tipo electrospray (LAME et al., 2011). O modo online demanda menos trabalho manual e possibilita análise qualitativa mais abrangente, mas apresenta também limitações, como por exemplo, na composição da amostra, a qual deve ser compatível a ambos equipamentos (SEGER et al., 2012).

Para este projeto, o método de quantificação escolhido foi o de quantificação por cromatografia líquida realizada com uma coluna C18 e subsequente análise qualitativa das frações coletadas pelo espectrômetro de massas MALDI-TOF. A análise pelo MALDI-TOF foi somente qualitativa e teve como intuito a busca de fragmentos decorrentes da degradação proteolítica dos peptídeos Occidentalina e cOccidentalina[5-9] após incubação durante os tempos de 0, 6, 12 e 24 horas, e para verificar se os peptídeos estavam realmente eluindo somente na fração considerada na quantificação. Na maioria das vezes, análises quantitativas por espectrometria de massas dependem da injeção do volume total da amostra a ser analisada, geralmente realizadas em espectrômetros com injetores do tipo electrospray e análise posterior

pelo método de monitoramento de reações múltiplas (MRM) (LEE et al., 2020). A quantificação por espectrômetros MALDI pode ser realizada se o padrão de diluição e distribuição do peptídeo analito na solução final contendo a matriz ionizante é considerado (ALBALAT et al., 2013).

Inicialmente, a estabilidade biológica do peptídeo Occidentalina foi avaliada após incubação por 16 horas em soro diluído em 50% de salina (NaCl 0,9%), e durante o período de incubação, alíquotas nos tempos 0, 2, 4, 8 e 16 horas foram coletadas para quantificação. As condições cromatográficas iniciais utilizadas para quantificação diferiam no tempo de cada análise por cromatografia, realizadas em 25 minutos (0-100% de solução B em 25 minutos). A quantificação do peptídeo após a realização do ensaio nessas condições não foi possível, devido ao tempo de eluição do peptídeo ser similar a componentes do soro, resultando em frações sobrepostas após cromatografia (*figura 13*). A partir desses resultados, uma série de métodos cromatográficos, em diferentes tempos de análises, foram avaliados. Por final, a cromatografia por 50 minutos foi estabelecida por apresentar eluição dos peptídeos Occidentalina e análogo em tempos diferentes dos componentes do soro. Além disso, a diluição do soro em salina a 25% resultou em menor interferência ainda dos compostos da matriz biológica na análise por cromatografia e maior recuperação do peptídeo após a etapa de precipitação. O tempo total de incubação foi reajustado para 24 horas devido à maior diluição do soro, considerando a relação linear entre degradação e diluição geralmente presente nestes ensaios (POWELL et al., 1992).

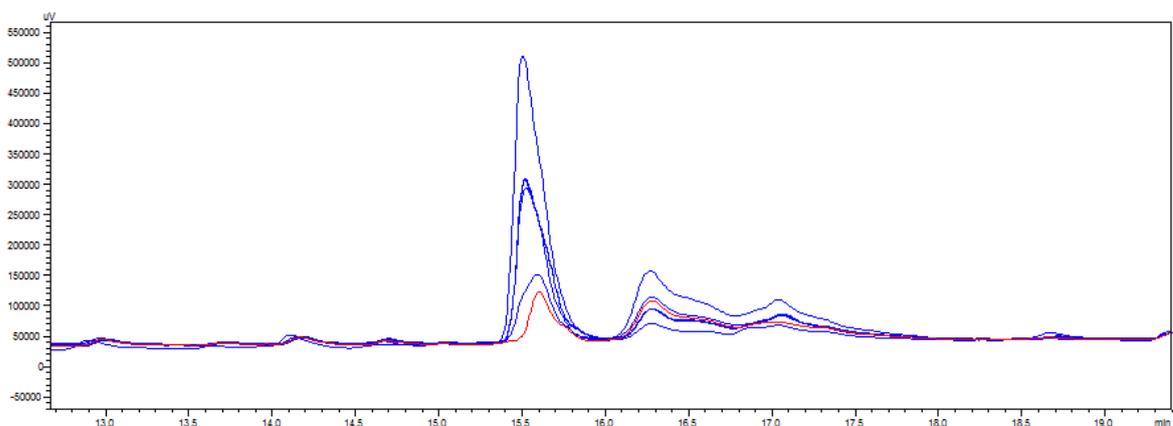


Figura 13. Comparação dos cromatogramas das amostras do ensaio de estabilidade em soro do peptídeo Occidentalina, analisadas pelo método de corrida em 25 minutos. Eixo y: valores ASCs. Eixo x: tempo de corrida. Em azul: os cromatogramas correspondentes às análises das amostras contendo Occidentalina em soro após diferentes tempos de incubação. Em vermelho: cromatograma correspondente à análise da amostra contendo apenas soro.

O método utilizado para quantificação adotado neste trabalho exige que os analitos estejam solúveis na solução de meio biológico. Por esse motivo, em conjunto com a análise da estabilidade em soro diluído, a quantificação dos peptídeos seguindo o mesmo procedimento em salina diluídos em 20% de DMSO foi realizada a fim de comprovar a solubilidade dos analitos. Estima-se que a solubilidade dos peptídeos analitos em salina é semelhante à solubilidade em soro diluído (25%) com auxílio de 20% DMSO. Os valores similares dos sinais (ASCs) após quantificação correspondentes ao tempo 24 e do tempo 0 de ambos peptídeos indica permanência do estado solúvel inicial durante o tempo total do ensaio. Além disso, a avaliação da estabilidade química de um composto-protótipo em solução é importante no processo de desenvolvimento de um fármaco.

A quantificação de um analito por cromatografia líquida ou sistemas LC/MS deve ser acompanhada por um processo de calibração, com o intuito de avaliar parâmetros como sensibilidade, reprodutibilidade, variabilidade e precisão dos sistemas metrológicos. A operação de calibração estabelece uma relação entre os valores indicados após a quantificação com medições padronizadas, obtendo relação empírica na forma de uma função analítica. A função analítica obtida pode ser utilizada então para calcular o valor da quantidade da substância a ser quantificada, a partir dos valores obtidos relacionados ao analito no sistema utilizado para análise. Além da elaboração de curvas de calibração, padrões internos (*internal standards*) também podem ser utilizados para a validação do método de quantificação de um analito. Isótopos marcados de analitos podem ser utilizados como padrões internos, geralmente resultando em relações precisas de sinal-quantidade devido à alta semelhança com o analito não marcado a ser quantificado. (WILBERT *et al.*, 2000; HUPERT *et al.*, 2018; CUADROS-RODR *et al.*, 2007; LASAOSA *et al.*, 2014).

Para este trabalho, a calibração e padronização do método foi realizada por meio da elaboração de uma curva de calibração, a qual apresentou uma relação linear entre a quantidade do peptídeo Occidentalina analisada e no sinal de absorbância indicado pelo valor de ASC da fração correspondente ao peptídeo após cromatografia. Para estudos futuros utilizando o mesmo método de quantificação, a realização do processo de calibração considerando o efeito da matriz biológica na sensibilidade, reprodutibilidade e variabilidade do método, além de estudos de adsorção dos peptídeos aos microtubos utilizados, e identificação dos limites mínimos de

quantificação (*lower limit of quantification*) podem ser interessantes para uma validação mais abrangente do método.

A etapa de avaliação dos parâmetros farmacocinéticos é fundamental no processo do desenvolvimento de um novo fármaco. Estudos *in vitro* de estabilidade em material biológico, geralmente em plasma ou soro, são frequentemente realizados durante os estágios iniciais da otimização de um composto-protótipo. (BOULANGER *et al.*, 1992; NOTO *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.*, 2008; Kluskens *et al.*, 2009; TAYLOR, *et al.*, 2010). Essa avaliação inicial é especialmente importante no desenvolvimento de fármacos propensos a valores baixos de meia-vida em meios biológicos, como por exemplo, no desenvolvimento de peptídeos terapêuticos, suscetíveis à degradação enzimática. Além de estudos *in vitro*, estudos *in vivo* e *in silico* podem ser realizados também para avaliação e predição, respectivamente, do perfil de ADME de peptídeos (MATHUR *et al.*, 2018; KLUSKENS *et al.*, 2009). Os dados obtidos após avaliação nestes experimentos iniciais podem ser utilizados na predição dos parâmetros farmacocinéticos em humanos por meio de modelos farmacocinéticos baseados na fisiologia (PBPK, do inglês *physiologically-based pharmacokinetic*) (ROWLAND *et al.*, 2011).

O peptídeo Occidentalina mostrou-se surpreendentemente estável em soro, o valor de meia vida equivalente a aproximadamente 6 horas do peptídeo obtido foi aproximadamente 4 vezes superior ao valor do peptídeo análogo cOccidentalina[5-9]. O valor de meia vida de 6 horas ou mais é incomum em peptídeos terapêuticos. Segundo análise comparativa utilizando o banco de dados de valores de meia-vida de peptídeos PEPLife, o peptídeo Occidentalina faz parte da parcela de 20% dos peptídeos que apresentam meia-vida igual ou superior a 6 horas (MATHUR *et al.*, 2016). Acredita-se que a baixa suscetibilidade relativa do peptídeo pode ser decorrente de dois fatores, a amidação do C-terminal e por ser um peptídeo derivado da peçonha da espécie de vespa *Polybia occidentalis*. Peptídeos encontrados em peçonhas de animais são resultado de milhões de anos de pressão seletiva entre presa-predador. Por esse motivo, peptídeos derivados de peçonhas e venenos geralmente apresentam alta estabilidade biológica intrínseca e potentes efeitos biológicos (KING *et al.*, 2011). A estratégia de amidação do C-terminal de um peptídeo garante proteção contra as carboxipeptidases, e por esse motivo, é amplamente

utilizada, cerca de 50% dos peptídeos terapêuticos apresentam essa modificação (RINK *et al.*, 2010).

Não foi possível identificar fragmentos/metabólitos da Occidentalina decorrentes da degradação enzimática. Acredita-se que tal inabilidade está relacionada com dois fatores principais: a baixa estabilidade dos fragmentos originados, rapidamente degradados e em decorrência disso ausentes nas análises nos tempos definidos, e na possível supressão do sinal no MALDI-TOF dos mesmos pela interferência dos componentes da matriz de ionização, pelos sinais dos sais e componentes proteicos presentes no soro, ou até mesmo pelo sinal do próprio peptídeo intacto.

Não foram observadas frações correspondentes aos fragmentos de degradação da Occidentalina nos cromatogramas de todos os tempos. A análise qualitativa por MS sem separação por cromatografia prévia é mais suscetível à supressões na ionização dos metabólitos pelos componentes de uma matriz biológica complexa. A realização da identificação de metabólitos no modo *offline* depende da coleta de todas as frações. Sendo assim, frações com baixa intensidade não coletadas, ou fragmentos de únicos resíduos impassíveis à incidência de luz UV na frequência de 214 nm, são perdidos durante a cromatografia.

O peptídeo cOccidentalina[5-9] apresentou valor de meia-vida de aproximadamente 90 minutos. A semi-ciclização do peptídeo análogo foi realizada com o intuito de otimizar o perfil de estabilidade da Occidentalina em soro. Contudo, o desenho do peptídeo cOccidentalina[5-9] foi realizado anteriormente à avaliação da meia-vida do peptídeo original, o qual apresentou um perfil de estabilidade inesperadamente satisfatório. A semi-ciclização da região C-terminal teve como um dos objetivos garantir proteção contra carboxipeptidases, e por esse motivo o desenho do peptídeo foi elaborado sem amidação. Considerando a maior estabilidade apresentada do peptídeo original, é possível que a ligação dissulfeto entre os resíduos nas posições P9 e P5 não tenha sido capaz de obstruir o acesso a exopeptidases devido à não amidação da região C-terminal. Além disso, é possível que a diferença de hidrofobicidade entre os peptídeos esteja relacionada com os perfis de degradação, devido à possível relação entre solubilidade e disponibilidade para proteólise.

O fragmento de degradação correspondente à sequência de resíduos CAFWC foi identificado na análise por MALDI-TOF. A fração cromatográfica indicada (seta azul) presente nos cromatogramas dos tempos 12 e 24 do ensaio de estabilidade da cOccidentalina[5-9] corresponde ao metabólito em questão (figura 6). O valor da massa monoisotópica de 627.135 Da encontrado após análise pelo MALDI-TOF indica a presença da ligação dissulfeto. Em contraste com os fragmentos não identificados de ambos peptídeos, acredita-se que esse fragmento apresentou estabilidade suficiente para a sua identificação na análise dos tempos do ensaio em soro. Além disso, o fragmento eluiu em uma única fração cromatográfica, em tempos distintos dos outros componentes da amostra, possibilitando análise por MALDI-TOF com menos interferências.

A maioria das estratégias de otimização da estabilidade biológica de peptídeos consiste na proteção das ligações peptídicas obstruindo o acesso das proteases na região do *backbone*. A conformação de um peptídeo está relacionada com a suscetibilidade às peptidases. Peptídeos lineares pequenos geralmente apresentam valores baixos de meia-vida, enquanto peptídeos que assumem conformações secundárias e terciárias menos flexíveis, mais estáveis, apresentam maior resistência à degradação. Assim sendo, é possível que a região correspondente aos resíduos pEQYM, provavelmente linear devido ao número baixo de resíduos, tenha sido rapidamente degradada pelas peptidases, enquanto a região cíclica do peptídeo, CAFWC, permaneceu estável durante o ensaio. Já o peptídeo Occidentalina, por outro lado, manteve a estrutura original intacta por mais tempo. É possível que as interações intramoleculares responsáveis pela estrutura secundária da Occidentalina estejam relacionadas com o perfil de baixa degradação do peptídeo. Estudos conformacionais por meio de técnicas de dicroísmo circular, NMR, cristalografia, entre outros, permitiriam melhor entendimento dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos de ambos peptídeos (CHEN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2019).

O peptídeo cOccidentalina[5-9] foi desenhado visando a manutenção da capacidade anticonvulsivante do peptídeo original Occidentalina. Para avaliação da atividade anticonvulsivante, o modelo agudo de indução por ácido caínico em camundongos foi utilizado. O modelo de indução de crises convulsivas por administração intracerebroventricular de ácido caínico é utilizado como modelo animal

de epilepsia devido à sua capacidade de reproduzir mudanças histopatológicas de neurodegeneração similares à aquelas presentes em pacientes com epilepsia do lobo temporal. O ácido caínico é um análogo cíclico do glutamato, e após administração induz uma resposta de despolarização exacerbada, eventualmente levando à citotoxicidade glutamatérgica e subsequente morte celular (LÉVESQUE *et al.*, 2013).

O peptídeo cOccidentalina[5-9], ao contrário do peptídeo Occidentalina (MORTARI, 2007), não foi capaz de proteger os animais contra as crises máximas. Além disso, o peptídeo mostrou-se incapaz de proteger os animais contra o processo de óbito provocado pela administração do ácido caínico e não foi capaz de interferir no período de latência até a primeira crise máxima, em contraste também com o peptídeo Occidentalina. Esses resultados indicam que o peptídeo cOccidentalina[5-9] perdeu a afinidade ao alvo e consequente efeito biológico do peptídeo original ou teve sua biotransformação acelerada e consequentemente menor biodisponibilidade. A diminuição do efeito biológico de peptídeos análogos após modificações inseridas na sequência de resíduos dos peptídeos originais ocorre com frequência, e geralmente está associada a mudanças conformacionais que levaram a perda de afinidade ao alvo de ligação (SATOH *et al.*, 1996; MUTTENTHALER *et al.*, 2010; PROKAI *et al.*, 1997). É possível que as substituições dos resíduos de valina e metionina (EQYMVAFWM-NH₂ – pEQYMCAFWC) por cisteínas interligadas por ligações dissulfeto levaram a mudança conformacional significativa não só na região C-terminal, mas em toda a estrutura do peptídeo. Este resultado não foi inesperado, já que o desenho do análogo foi realizado sem auxílio de análises conformacionais robustas do peptídeo original. Além disso, o alvo molecular do peptídeo Occidentalina ainda não foi elucidado, impossibilitando predições da região farmacofórica tendo como base a interface de interação ao mesmo. Apesar da perda do efeito biológico do peptídeo análogo, os resultados obtidos neste projeto contribuíram na elucidação dos resíduos importantes na afinidade ao alvo do peptídeo original Occidentalina e pode contribuir com o desenho de novos peptídeos no desenvolvimento de novos fármacos.

6. CONCLUSÕES

- A ciclização da região C-terminal por ligação dissulfeto entre os resíduos 5 e 9 do análogo da Occidentalina resultou em um perfil de estabilidade em soro inferior ao peptídeo original.
- A ciclização da região C-terminal por ligação dissulfeto entre os resíduos 5 e 9 do análogo da Occidentalina resultou em perda significativa do efeito anticonvulsivante do peptídeo original.
- O peptídeo Occidentalina apresentou meia-vida de aproximadamente 6 horas em soro, valor considerado alto quando comparado aos valores geralmente obtidos para peptídeos terapêuticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adessi, C., & Soto, C. (2002). Converting a Peptide into a Drug : Strategies to Improve Stability and Bioavailability, 963–978.

Ahn, J., Gitu, P. M., Medeiros, M., Swift, J. R., Trivedi, D., & Hraby, V. J. (2001). A New Approach to Search for the Bioactive Conformation of Glucagon : Positional Cyclization Scanning, 3109–3116.

Albalat, A., *et al* (2013). Improving peptide relative quantification in MALDI- TOF MS for biomarker assessment. doi: 10.1002/pmic.201300100

Arrowsmith, J. (2012). FROM THE ANALYST ' S COUCH A decade of change. Nature Reviews Drug Discovery, 11(January). <https://doi.org/10.1038/nrd3630>

B. Carstens, B., J. Clark, R., L. Daly, N., J. Harvey, P., Kaas, Q., & J. Craik, D. (2012). Engineering of Conotoxins for the Treatment of Pain. Current Pharmaceutical Design, 17(38), 4242–4253. <https://doi.org/10.2174/138161211798999401>

Baig, M. H., Ahmad, K., Saeed, M., Alharbi, A. M., Barreto, G. E., Ashraf, G. M., & Choi, I. (2018). Peptide based therapeutics and their use for the treatment of neurodegenerative and other diseases. Biomedicine and Pharmacotherapy, 103(March), 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.025>

Baillie TA, Rettie AE. (2011). Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra- and inter-species differences in drug metabolism. Drug Metab Pharmacokinet. 26(1):15-29. Epub 2010 Oct 22.

Barbosa, E. B., Vidotto, A., Polachini, G. M., Henrique, T., Marqui, A. B. T. De, & Tajara, E. H. (2012). Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. Revista Da Associação Médica Brasileira, 58(3), 366–375. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302012000300019>

Beaufays, J., Lins, L., Thomas, A., & Brasseur, R. (2012). In silico predictions of 3D structures of linear and cyclic peptides with natural and non-proteinogenic residues. *Journal of Peptide Science*, 18(1), 17–24. <https://doi.org/10.1002/psc.1410>

BEST, C. H. (1962). The history of insulin. *Diabetes*, 11(6), 495–503. <https://doi.org/10.3402/jchimp.v2i2.18701>.

Bird, G. H., Madani, N., Perry, A. F., Princiotta, A. M., Jeffrey, G., He, X., ... Walensky, L. D. (2015). Hydrocarbon double-stapling remedies the proteolytic instability of a lengthy peptide therapeutic. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002713107>

Birk, A. V., Liu, S., Soong, Y., Mills, W., Singh, P., Warren, J. D., ... Szeto, H. H. (2013). The Mitochondrial-Targeted Compound SS-31 Re-Energizes Ischemic Mitochondria by Interacting with Cardiolipin, 1250–1261. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012121216>

Boulanger, L., & Roughly, P. (1992). Catabolism of Rat Growth Hormone-Releasing Factor (1-29) Amide in Rat Serum and Liver, 13(15), 681–689.

Bray, B. L. (2003). Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(7), 587–593. <https://doi.org/10.1038/nrd1133>

Brownlee, J., & Williams, C. H. (1993). Peptidases , Peptides , and the Mammalian Blood-Brain Barrier.

CAMPOS, Gabriel Avohay Alves. Avaliação da ação antiparkinsoniana do peptídeo Neurovespina no modelo murino da Doença de Parkinson. 2016. 77 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

Chen, S., Gfeller, D., Buth, S. A., Michielin, O., Leiman, P. G., & Heinis, C. (2013). Improving binding affinity and stability of peptide ligands by substituting glycines with D-amino acids. *ChemBioChem*, 14(11), 1316–1322. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300228>

Chen, Y., Yang, C., Li, T., Zhang, M., Liu, Y., Gauthier, M. A., ... Wu, C. (2015). The Interplay of Disulfide Bonds, α -Helicity, and Hydrophobic Interactions Leads to Ultrahigh Proteolytic Stability of Peptides. *Biomacromolecules*, 16(8), 2347–2355.

<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00567>

Chen, Y., Yang, C., Li, T., Zhang, M., Liu, Y., Gauthier, M. A., ... Wu, C. (2015). The Interplay of Disulfide Bonds, α -Helicity, and Hydrophobic Interactions Leads to Ultrahigh Proteolytic Stability of Peptides. *Biomacromolecules*, 16(8), 2347–2355.

<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00567>

Cheng, A. C., Coleman, R. G., Smyth, K. T., Cao, Q., Souldard, P., Caffrey, D. R., ... Huang, E. S. (2007). Structure-based maximal affinity model predicts small-molecule druggability. *Nature Biotechnology*, 25(1), 71–75. <https://doi.org/10.1038/nbt1273>

Cleland, J. L., Powell, M. F., & Shire, S. J. (1994). The development of stable protein formulations: A close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation (Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems (1993) 10:4 (329-331)). *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 11(1), 60.

Conte, L. Lo, Chothia, C., & Janin, J. (1999). The atomic structure of protein-protein recognition sites. *Journal of Molecular Biology*, 285(5), 2177–2198.

<https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2439>

Craik, D. J., Fairlie, D. P., Liras, S., & Price, D. (2013). The Future of Peptide-based Drugs, 136–147. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12055>

Cuadros-rodr, L., Bagur-gonz, M. G., Mercedes, S., Gonz, A., & Antonio, M. G.

(2007). Principles of analytical calibration / quantification for the separation sciences, 1158, 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.030>

Deters, M., Kirchner, G., Resch, K., & Kaefer, V. (2002). Simultaneous quantification of sirolimus, everolimus, tacrolimus and cyclosporine by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40(3), 285–292.

<https://doi.org/10.1515/CCLM.2002.045>

Diderich, P., Bertoldo, D., Dessen, P., Khan, M. M., Pizzitola, I., Held, W., ... Heinis, C. (2016). Phage selection of chemically stabilized α -helical peptide. Institute of Chemical Sciences and Engineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Swiss Institute for Experim. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00963>

Dombu, C. Y., & Betbeder, D. (2013). Airway delivery of peptides and proteins using nanoparticles. *Biomaterials*, 34(2), 516–525. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.08.070>

Eguchi, A., & Dowdy, S. F. (2009). siRNA delivery using peptide transduction domains. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(7), 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.04.009>

Eng, H., Sharma, R., McDonald, T. S., Landis, M. S., Stevens, B. D., & Kalgutkar, A. S. (2014). Pharmacokinetics and metabolism studies on the glucagon-like Beagle dogs, 8254(9), 842–848. <https://doi.org/10.3109/00498254.2014.897011>

Engel, J., McDermott, M. P., Wiebe, S., Langfitt, J. T., Stern, J. M., Dewar, S., ... Kieburtz, K. (2012). Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: A randomized trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 307(9), 922–930. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.220>

Erak, M., Bellmann-sickert, K., Els-heindl, S., & Beck-sickinger, A. G. (2018). Bioorganic & Medicinal Chemistry Peptide chemistry toolbox – Transforming natural peptides into peptide therapeutics, 26, 2759–2765. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.01.012>

Faught, E., Richman, J., Martin, R., Funkhouser, E., Foushee, R., Kratt, P., ... Pisu, M. (2012). Incidence and prevalence of epilepsy among older US Medicare beneficiaries. *Neurology*, 78(7), 448–453. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182477edc>

Ferreira De Freitas, R., & Schapira, M. (2017). A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB. *MedChemComm*, 8(10), 1970–1981. <https://doi.org/10.1039/c7md00381a>

Fisher, R. S., & Leppik, I. (2008). Debate: When does a seizure imply epilepsy? *Epilepsia*, 49(SUPPL. 9), 7–12. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01921.x>

Fisher, R. S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470–472. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>

Fosgerau, K., & Hoffmann, T. (2014). Peptide therapeutics : current status and future directions §. *Drug Discovery Today*, 00(00), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>

Frey, V., Viaud, J., Subra, G., Cauquil, N., Guichou, J. F., Casara, P., ... Chavanieu, A. (2008). Structure-activity relationships of Bak derived peptides: Affinity and specificity modulations by amino acid replacement. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(5), 966–972. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.06.008>

Fry, B. G. (2005). From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. *Genome Research*, 15(3), 403–420. <https://doi.org/10.1101/gr.3228405>

Fry, B. G., Roelants, K., Champagne, D. E., Scheib, H., Tyndall, J. D. A., King, G. F., ... de la Vega, R. C. R. (2009). The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10(1), 483–511. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>

Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., & Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5836–5840. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007540200>

Garteiz, D. A., Madden, T., Beck, D. E., Huie, W. R., McManus, K. T., Abbruzzese, J. L., ... Newman, R. A. (1998). Quantitation of dolastatin-10 using HPLC/electrospray

ionization mass spectrometry: Application in a phase I clinical trial. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 41(4), 299–306.

<https://doi.org/10.1007/s002800050743>

Gazme, B., Boachie, R. T., Tsopmo, A., & Udenigwe, C. C. (2019). Occurrence, properties and biological significance of pyroglutamyl peptides derived from different food sources. *Food Science and Human Wellness*, 8(3), 268–274.

<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.05.002>

Global Peptide Therapeutics Market 2019-2023, Industry Analysis and Forecast, Technavio. Disponível em link:

<https://www.businesswire.com/news/home/20190102005680/en/>. Acesso em: 20 jun. 2019.

Global pharma spending will hit \$1.5 trillion in 2023, says IQVIA. Disponível em link:

<https://pharmaceuticalcommerce.com/business-and-finance/global-pharma-spending-will-hit-1-5-trillion-in-2023-says-iqvia/>. Acesso em: 20 jun. 2019.

Goodwin, D., Simerska, P., & Toth, I. (2012). Peptides As Therapeutics with Enhanced Bioactivity, 4451–4461.

Grauer, A., & König, B. (2009). Peptidomimetics - A versatile route to biologically active compounds. *European Journal of Organic Chemistry*, (30), 5099–5111.

<https://doi.org/10.1002/ejoc.200900599>

Gravitz, L. (2014). Shedding the shame. *Nature*, 511(7508), 4–5.

<https://doi.org/10.1038/511S10a>

Hajee, C. A. J., van Rhijn, H. J. A., Lasaroms, J. J. P., Keukens, H. J., & de Jong, J. (2001). Development and validation of a method for the determination of sub-additive levels of virginiamycin in compound animal feeds by liquid chromatography. *Analyst*, 126(8), 1332–1338. <https://doi.org/10.1039/b102931m>

Harvey, A. L. (2014). Toxicon Toxins and drug discovery. *Toxicon*, 92, 193–200.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.020>

Henninot, A., Collins, J. C., & Nuss, J. M. (2017). The Current State of Peptide Drug Discovery : Back to the Future ? <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00318>

Hoang, H. N., Song, K., Hill, T. A., Derksen, D. R., Edmonds, D. J., ... Fairlie, D. P. (2015). Short Hydrophobic Peptides with Cyclic Constraints Are Potent Glucagon-like Peptide - 1 Receptor (GLP-1R) Agonists, 1–6. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00166>

Hupert, M., Elfgen, A., Schartmann, E., Schemmert, S., Buscher, B., Kutzsche, J., ... Santiago-Schübel, B. (2018). Development and validation of an UHPLC-ESI-QTOF-MS method for quantification of the highly hydrophilic amyloid- β oligomer eliminating all-D-enantiomeric peptide RD2 in mouse plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1073(December 2017), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.009>

Impact Story: Developing the Tools to Evaluate Complex Drug Products: Peptides. Disponível em link: <https://www.fda.gov/drugs/regulatory-science-action/impact-story-developing-tools-evaluate-complex-drug-products-peptides>. Acesso em: 21 jun. 2019.

Jevševar, S., Kunstelj, M., & Porekar, V. G. (2010). PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnology Journal*, 5(1), 113–128. <https://doi.org/10.1002/biot.200900218>

John, H., Walden, M., Schäfer, S., Genz, S., & Forssmann, W. G. (2004). Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(4), 883–897. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2298-y>

Joncour, V. Le, & Laakkonen, P. (2018). Bioorganic & Medicinal Chemistry Seek & Destroy , use of targeting peptides for cancer detection and drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(10), 2797–2806. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.08.052>

Jones, S., & Thornton, J. M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(1), 13–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.13>

King, G. F. (2011). Venoms as a platform for human drugs :translating toxins into therapeutics, 1469–1484.

Kluskens, L. D., Nelemans, S. A., Rink, R., Vries, L. De, Meter-arkema, A., Wang, Y., ... Moll, G. N. (2009). Angiotensin- (1 – 7) with Thioether Bridge : An Angiotensin-, 328(3), 4–7. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.146431>.

Krauss, G., 2006. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, third ed. Wiley-VCH, Weinheim.

Lame, M. E., Chambers, E. E., & Blatnik, M. (2011). Quantitation of amyloid beta peptides A β 1-38, A β 1-40, and A β 1-42 in human cerebrospinal fluid by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Analytical Biochemistry, 419(2), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.08.010>

Lasaosa, M., Patel, P., Givler, S., De León, D. D., & Seeholzer, S. H. (2014). A liquid chromatography-mass spectrometry assay for quantification of Exendin[9-39] in human plasma. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 947–948, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.010>

Lau, J. L., & Dunn, M. K. (2018). Bioorganic & Medicinal Chemistry Therapeutic peptides : Historical perspectives , current development trends , and future directions. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 26(10), 2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>

Lee, A. C., Harris, J. L., Khanna, K. K., & Hong, J. (2019). A Comprehensive Review on Current Advances in Peptide Drug Development and Design, 1–21.

Lee, H. S., Postan, M., Song, A., Clark, R. J., Bathgate, R. A. D., Haugaard-kedström, L. M., & Rosengren, K. J. (2020). Development of Relaxin-3 Agonists and Antagonists Based on Grafted Disulfide-Stabilized Scaffolds, 8(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00087>

Lévesque, M., & Avoli, M. (2013). The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(10), 2887–2899.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.10.011>

Levy, O. E., Jodka, C. M., Ren, S. S., Mamedova, L., Sharma, A., Samant, M., ... Ghosh, S. S. (2014). Novel exenatide analogs with peptidic albumin binding domains: Potent anti-diabetic agents with extended duration of action. *PLoS ONE*, 9(2).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087704>

Li, S., Schoneich, C., & Borchardt, R. T. (1995). Chemical Instability of Protein P harm aceu t ica ls : Mechanisms of Oxidation and Strategies for Stabilization, 48, 490–500.

Li, Z. J., & Cho, C. H. (2012). Peptides as targeting probes against tumor vasculature for diagnosis and drug delivery, 10(Suppl 1), 1–9.

Lilian dos Anjos Carneiro. Atividade antiepiléptica e neuroprotetora do peptídeo neurovespina em um modelo crônico de Epilepsia do Lobo Temporal e avaliação da sua toxicidade aguda em camundongos Swiss. Dissertação de Doutorado. Área de concentração: Neurociências. UnB. (2017)

Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 337–341.

<https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>

Liu, L., Fang, Y., & Wu, J. (2013). Flexibility is a mechanical determinant of antimicrobial activity for amphipathic cationic α -helical antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(11), 2479–2486.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.017>

Mäe, M., & Langel, Ü. (2006). Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), 509–514.

<https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.04.004>

Mathur, D., Prakash, S., Anand, P., Kaur, H., Agrawal, P., Mehta, A., ... Raghava, G. P. S. (2016). PEPLife: A Repository of the Half-life of Peptides. *Scientific Reports*, 6(November), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep36617>

Mathur, D., Singh, S., Mehta, A., Agrawal, P., & Raghava, G. P. S. (2018). In silico approaches for predicting the half-life of natural and modified peptides in blood. *PLoS ONE*, 13(6), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196829>

Maupetit, J., Derreumaux, P., & Tuffery, P. (2009). PEP-FOLD: An online resource for de novo peptide structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 2), 498–503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp323>

Milletti, F. (2012). Cell-penetrating peptides : classes , origin , and current landscape. *Drug Discovery Today*, 17(15–16), 694–704. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002>

Miranda, L. P., Holder, J. R., Shi, L., Bennett, B., Aral, J., Gegg, C. V., ... Wild, K. (2008). Identification of Potent , Selective , and Metabolically Stable Peptide Antagonists to the Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) Receptor, 7889–7897.

Morimoto, B. H. (2018). Therapeutic peptides for CNS indications: Progress and challenges. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(10), 2859–2862. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.011>

Morrison, K. L., & Weiss, G. A. (2001). Combinatorial alanine-scanning. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(3), 302–307. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00206-4)

Mortari, M. R. Atividade neurobiológica e caracterização química da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis* (Hymenoptera, Vespidae): identificação de peptídeos antinociceptivos e anticonvulsivantes. Dissertação de Doutorado. Área de concentração: Psicobiologia. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. 2007.

Muttenthaler, M., Andersson, A., Araujo, A. D. De, Dekan, Z., Lewis, R. J., & Alewood, P. F. (2010). Modulating Oxytocin Activity and Plasma Stability by Disulfide Bond Engineering, 8585–8596. <https://doi.org/10.1021/jm100989w>

Noto, P. B., Abbadessa, G., Cassone, M., Mateo, G. D., Agelan, A., Wade, J. D., ... Jr, L. O. (2008). Alternative stabilities of a proline-rich antibacterial peptide in vitro and in vivo. 1249–1255. <https://doi.org/10.1110/ps.034330.108.of>

Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., ... Bienert, M. (1998). Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1414(1–2), 127–139. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(98\)00161-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(98)00161-8)

Olivera, B. M., Hillyard, D. R., Marsh, M., & Yoshikami, D. (1995). Combinatorial peptide libraries in drug design: lessons from venomous cone snails. *Trends in Biotechnology*, 13(10), 422–426. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)88996-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88996-9)

Pennington, M. W., Czerwinski, A., & Norton, R. S. (2018). Peptide therapeutics from venom: Current status and potential. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(10), 2738–2758. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.029>

Powell, M. F., Grey, H., & Coln, S. (1992). Peptide Stability in Drug Development: A Comparison of Peptide Reactivity in Different Biological Media. *PHARMACEUTICAL*, 81(8), 731–735.

Prokai-tatrai, K., Prokai, L., & Zharikova, A. D. (2000). Exploratory pharmacokinetics and brain distribution study of a neuropeptide FF antagonist by liquid chromatography / atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry †, 2418, 2412–2418.

Prokai, L., Kim, H., Medzihradzsky, K. F., Coy, D. H., Liapakis, G., Reisine, T., ... Goodman, M. (1997). Lanthionine - Somatostatin Analogs : Synthesis , Characterization , Biological Activity , and Enzymatic Stability Studies, 2623(96), 2241–2251.

Reid, P. F. (2007). Alpha-cobratoxin as a possible therapy for multiple sclerosis: A review of the literature leading to its development for this application. *Critical Reviews in Immunology*, 27(4), 291–302. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v27.i4.10>

Rezai, T., Bock, J. E., Zhou, M. V, Kalyanaraman, C., Lokey, R. S., & Jacobson, M. P. (2006). Conformational Flexibility, Internal Hydrogen Bonding , and Passive Membrane Permeability : Successful in Silico Prediction of the Relative Permeabilities of Cyclic Peptides, (15), 14073–14080.

Rink, R., Arkema-meter, A., Baudoin, I., Post, E., Kuipers, A., Nelemans, S. A., ... Moll, G. N. (2010). To protect peptide pharmaceuticals against peptidases. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61(2), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.010>

Rowland, M., Peck, C., & Tucker, G. (2011). Physiologically-Based Pharmacokinetics in Drug Development and Regulatory Science. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010510-100540>

Rozek, A., Powers, J. S., Friedrich, C. L., & Hancock, R. E. W. (2003). Structure-Based Design of an Indolicidin Peptide Analogue with Increased Protease, 14130–14138

Satoh, T., Li, S., Friedman, T. M., Wiaderkiewicz, R., Korngold, R., & Huang, Z. (1996). Synthetic Peptides Derived from the Fourth Domain of CD4 Antagonize CD4 Function and Inhibit T Cell Activation. *Biochemical and biophysical research communications* 224, 438–443.

Seger, C. (2012). Usage and limitations of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in clinical routine laboratories. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 162(21–22), 499–504. <https://doi.org/10.1007/s10354-012-0147-3>

Silva, A. L., Rosalia, R. A., Sazak, A., Carstens, M. G., Ossendorp, F., Oostendorp, J., & Jiskoot, W. (2013). Optimization of encapsulation of a synthetic long peptide in PLGA nanoparticles: Low-burst release is crucial for efficient CD8+ T cell activation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 83(3), 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.11.006>

Smart, A. L., Gaisford, S., & Basit, A. W. (2014). Oral peptide and protein delivery: Intestinal obstacles and commercial prospects. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(8), 1323–1335. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.917077>

Sollod, B. L., Wilson, D., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., Drinkwater, R., & King, G. F. (2005). Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides*, 26(1), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.07.016>

Stegehuis, D. S., Tjaden, U. R., & van der Greef, J. (1990). Bioanalysis of the peptide de-enkephalin- γ -endorphin. On-line sample pretreatment using membrane dialysis and solid-phase isolation. *Journal of Chromatography A*, 511(C), 137–145. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)93279-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93279-0)

T. Wieland; M. Bodanszky. *The world of peptides: a brief history of peptide chemistry*. Ed 1. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1991.

Taylor, B. N., Mehta, R. R., Yamada, T., Lekmine, F., Christov, K., Chakrabarty, A. M., ... Das Gupta, T. K. (2009). Noncationic peptides obtained from azurin preferentially enter cancer cells. *Cancer Research*, 69(2), 537–546. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2932>

Taylor, M., Moore, S., Mayes, J., Parkin, E., Beeg, M., Canovi, M., ... Allsop, D. (2010). Development of a Proteolytically Stable Retro-Inverso Peptide Inhibitor of β -Amyloid Oligomerization as a Potential Novel Treatment for Alzheimer ' s Disease †, 3261–3272. <https://doi.org/10.1021/bi100144m>

The Nobel Prize in Chemistry 1984. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2020. Tue. 4 Feb 2020. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1984/summary/>

Tunnemann, G., Ter-avetisyan, G., Martin, R. M., Stockl, M., Herrmann, A., Cardoso, C. (2007). Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *Journal of Peptide Science J. Pept. Sci.* 2008; 14: 469–476. DOI: 10.1002/psc.968.

Usmani SS, Bedi G, Samuel JS, Singh S, Kalra S, Kumar P, et al. (2017) THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. PLoS ONE 12(7) e0181748.

Varela, M., Quintanilha, T. (2019). Avaliação da atividade antiepiléptica de um novo peptídeo bioinspirado da Occidentalina-1202 isolado da peçonha da vespa social *Polybia occidentalis*. Dissertação de mestrado. Área de concentração: Neurociências. Ciências da Saúde, UnB. (2019).

Vetter, I., Davis, J. L., Rash, L. D., Anangi, R., Mobli, M., Alewood, P. F., ... King, G. F. (2011). Venomics: A new paradigm for natural products-based drug discovery. *Amino Acids*, 40(1), 15–28. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0516-4>

Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., & Khrestchatisky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today*, 15(1–2), 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.10.009>.

Walensky, L. D., & Bird, G. H. (2015). Hydrocarbon-Stapled Peptides: Principles, Practice, and Progress. *Med. Chem.* 2014, 57, 6275–6288. <https://doi.org/10.1021/jm4011675>

Wei, X., Zhan, C., Chen, X., Hou, J., Xie, C., & Lu, W. (2014). Retro-inverso isomer of angiopep-2: A stable d -peptide ligand inspires brain-targeted drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 11(10), 3261–3268. <https://doi.org/10.1021/mp500086e>

Weinstock, M. T., Francis, J. N., Redman, J. S., & Kay, M. S. (2012). Protease-resistant peptide design-empowering nature's fragile warriors against HIV. *Biopolymers*, 98(5), 431–442. <https://doi.org/10.1002/bip.22073>

Wells, J. A., & McClendon, C. L. (2007). Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature*, 450(7172), 1001–1009. <https://doi.org/10.1038/nature06526>

Werle, M. (2006). Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs Review Article, 351–367. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0289-3>

White, T. R., Renzelman, C. M., Rand, A. C., Rezai, T., McEwen, C. M., Gelev, V. M., ... Lokey, R. S. (2011). On-resin N-methylation of cyclic peptides for discovery of orally bioavailable scaffolds. *Nature Chemical Biology*, 7(11), 810–817.

<https://doi.org/10.1038/nchembio.664>

Wilbert, S. M., Engrissei, G., Yau, E. K., Grainger, D. J., Tatalick, L., & Axworthy, D. B. (2000). Quantitative Analysis of a Synthetic Peptide, NR58-3 . 14 . 3 , in Serum by LC-MS with Inclusion of a Diastereomer as Internal Standard 1, 21, 14–21.

<https://doi.org/10.1006/abio.1999.4437>).

Wolf, R., Rosche, F., Hoffmann, T., & Demuth, H. U. (2001). Immunoprecipitation and liquid chromatographic - Mass spectrometric determination of the peptide glucose-dependent insulintropic polypeptides GIP1-42 and GIP3-42 from human plasma samples: New sensitive method to analyze physiological concentrations of peptide hormones. *Journal of Chromatography A*, 926(1), 21–27.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00942-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00942-6)

Yamaguchi, K., Takashima, M., Uchimura, T., & Kobayashi, S. (2000). Development of a sensitive liquid chromatography- electrospray ionization mass spectrometry method for the measurement of KW-5139 in rat plasma, 81, 77–81.

Yang, C.-S., Chou, S.-T., Liu, L., Tsai, P.-J., & Kuo, J.-S. (1995). Effect of ageing on human plasma glutathione concentrations as determined by HPLC with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography B*, 674, 23–30.

Yeow, C., & Kini, R. M. (2012). Toxicon From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. *Toxicon*, 59(4), 497–506.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.03.017>

8. ANEXOS



Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 7 de novembro de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"DESENHO RACIONAL VISANDO A OTIMIZAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DE NOVOS PEPTÍDEOS ANTEPILEPTICOS BIOINSPIRADOS NA OCCIDENTALINA"**, Protocolo n.º 95/2019, sob responsabilidade da Professora Marcia Renata Mortari, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de *Mus musculus* (72 machos e fêmeas) e *Rattus norvegicus* (5 machos e fêmeas). A presente declaração é válida pelo período de **07/11/2019 a 17/04/2020**


 Dr. José Luiz Jivago de Paula Rêlo
 Coordenador da CEUA – UnB




Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.