



UNIVERSIDADE FERDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

MARIANA FERNANDES DE AVILA NETTO GUTERRES

BIOCONJUGAÇÃO DE AMILINA COM POLIETILENOGLICOL PARA FINS
TERAPÊUTICOS

RIO DE JANEIRO

2013

Mariana Fernandes de Avila Netto Guterres

BIOCONJUGAÇÃO DE AMILINA COM POLIETILENOGLICOL PARA FINS
TERAPÊUTICOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima

RIO DE JANEIRO

2013

G983b Guterres, Mariana Fernandes de Avila Netto.

Bioconjugação de amilina com polietilenoglicol para fins terapêuticos/
Mariana Fernandes de Avila Netto Guterres; orientador Luis Mauricio
Trambaioli da Rocha e Lima. – Rio de Janeiro : UFRJ, Faculdade de Farmácia,
2013.

105f. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal
do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Amilina. 2. Diabetes mellitus. 3. Peguilação. 4. Glicemia.
5. Polietilenoglicol. I. Lima, Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e. II. Título.

CDD 616.462

Mariana Fernandes de Avila Netto Guterres

BIOCONJUGAÇÃO DE AMILINA COM POLIETILENOGLICOL PARA FINS
TERAPÊUTICOS

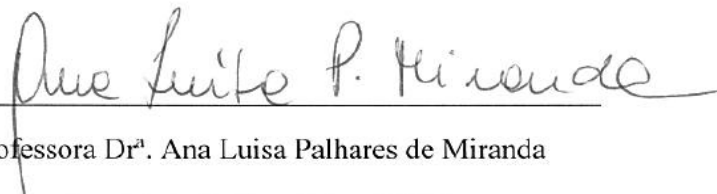
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 09 de agosto de 2013



Professor Dr. Luis Mauricio Trambaioli da Rocha e Lima

Faculdade de Farmácia – UFRJ



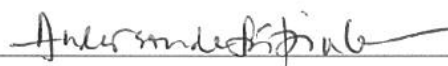
Professora Dr^a. Ana Luisa Palhares de Miranda

Faculdade de Farmácia – UFRJ



Professora Dr^a. Carolina Alvares da Cunha de Azeredo Braga

Polo Xerém – UFRJ



Professor Dr. Anderson de Sá Pinheiro

Instituto de Química – UFRJ

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luis Maurício pela orientação, ensinamentos, exemplo de trabalho, dedicação, servindo de modelo como professor e pesquisador. Sempre ajudou muito para a construção desse trabalho e sempre sendo muito compreensivo.

A banca de acompanhamento e de defesa de dissertação por aceitar o convite para avaliação desse trabalho.

Aos meus pais Luiz e Edneia, minha irmã Thamires, e meu namorado Marcelo, pelo incentivo, muita ajuda e compreensão. Vocês são essenciais na minha vida. Amo vocês!

Ao Luiz Henrique Guerreiro pelos ensinamentos.

A CAPES pelo apoio financeiro através de bolsa de estudos.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica pela ajuda e paciência.

Aos professores e convidados do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas que me ajudaram com conhecimentos e novas idéias durante o trabalho.

A todos que de alguma forma me ajudaram na realização desse trabalho. Muito obrigada!!

RESUMO

GUTERRES, Mariana Fernandes de Avila Netto. **Bioconjugação de amilina com polietilenoglicol para fins terapêuticos**. Rio de Janeiro. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A amilina é um polipeptídeo de 37 aminoácidos, descoberto em 1987, co-armazenado e co-secretado com a insulina pelas células beta do pâncreas. A amilina possui um papel muito importante na homeostase da glicose, além de outras importantes funções fisiológicas. Em indivíduos com Diabetes Mellitus, sua produção é diminuída ou mesmo ausente. Devido a algumas de suas características físico-químicas, a amilina humana nunca conseguiu ser utilizada para o tratamento do Diabetes. Assim foi desenvolvido o seu análogo, o Pramlintide, empregado atualmente para a terapêutica do Diabetes, mas o Pramlintide possui efeitos colaterais como náusea, vômito, anorexia e hipoglicemia, e mimetiza apenas as concentrações de amilina pós-prandiais, não as basais. No presente trabalho, derivatizamos quimicamente a amilina murina através de reações de peguilação com dois tipos de derivados de polietilenoglicol (PEG), com diferentes massas molares médias (1 kDa, 2 kDa e 5 kDa), um derivado aldeído e um succinimidil. Foram feitas reações em meios aquoso e orgânico, e produtos peguilados foram obtidos com curtos períodos de reação. Os produtos das reações foram separados por cromatografia de fase reversa e identificados por espectrometria de massa. A formação dos produtos monopeguilado e dipeguilado desejados ocorre através da conjugação do derivado de PEG com os dois grupos amino do resíduo da lisina, na posição 1 da sequência da amilina murina. A avaliação farmacológica da amilina monopeguilada e da amilina dipeguilada, produtos da reação entre a amilina murina e o metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato de massa molar média de 5 kDa (mPEG5kDa-SC), por administração subcutânea em camundongos revelou a sua eficácia na modulação da glicemia por tempo prolongado em comparação com a amilina não modificada. Coletivamente, esses dados demonstram o potencial do uso da reação de peguilação na síntese de novos bioconjugados de amilina com ação sustentada.

Palavras-chave: amilina, amilóide, IAPP, diabetes mellitus, peguilação, pramlintide, glicemia, polietilenoglicol.

ABSTRACT

GUTERRES, Mariana Fernandes de Avila Netto. **Bioconjugação de amilina com polietilenoglicol para fins terapêuticos**. Rio de Janeiro. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Amylin is a 37 amino acid polypeptide discovered in 1987, co-stored and co-secreted with insulin by pancreatic beta cells. The amylin presents a very important role in glucose homeostasis and other important physiological functions. In patients with diabetes mellitus, its production is diminished or even absent. Due to some of its physical and chemical characteristics, human amylin could never be used for the treatment of Diabetes. Thus, it was developed its analog Pramlintide, currently used for the treatment of Diabetes, but Pramlintide has side effects such as nausea, vomiting, anorexia and hypoglycemia and only mimics the postprandial amylin levels but not the basal amylin levels. In the present work, we sought to chemically derivatize murine amylin through PEGylation reactions with two types of polyethylene glycol (PEG) derivatives with different average molecular weights (1 kDa, 2 kDa and 5 kDa), an aldehyde derivative and a succinimidyl derivative. Reactions were performed in aqueous and organic medium, and pegylated products were obtained with short reaction times. The products of the reactions were separated by reverse-phase chromatography and identified by mass-spectrometry. The formation of the desired monoPEGylated and diPEGylated products occurs by the conjugation of the PEG derivative with two aminogroup of the lysine residue at position 1 of murine amylin sequence. The pharmacological evaluation of monoPEGylated and diPEGylated amylin, products of the reaction between murine amylin and methoxyl polyethylene glycol succinimidyl carbonate (MW 5 kDa), by subcutaneous administration in mice revealed their efficacy in modulating glucose levels for prolonged time compared to unmodified amylin. Collectively, these data demonstrate the potential use of pegylation reaction in the synthesis of new amylin bioconjugates with sustained action.

Keywords: Amylin; amyloid; IAPP; diabetes mellitus; PEGylation; Pramlintide; glycemia; polyethylene glycol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do Processamento da Pré-Pró-amilina humana para formar amilina madura.....	27
Figura 2: Sequências primárias de CGRP humano e amilina de diferentes espécies.....	29
Figura 3: Sequência primária do Pramlintide, análogo da amilina humana.....	38
Figura 4: Principais benefícios da peguilação.....	43
Figura 5: Estruturas químicas dos agentes metoxil polietilenoglicol propionaldeído e metoxil polietilenoglicol succinimidil.....	47
Figura 6: Esquema reacional entre metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato e amina primária.....	51
Figura 7: Esquema da reação de aminação redutiva usando PEG-propionaldeído.....	52
Figura 8: Cinética das reações de peguilação da amilina com os mPEG5kDa-SC, mPEG2kDa-SC e mPEG1kDa-SC.....	59
Figura 9: Cinética das reações de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald.....	60
Figura 10: Gel SDS-PAGE da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC.....	62
Figura 11: Gel SDS-PAGE da reação de peguilação da amilina com o mPEG2kDa-SC.....	63
Figura 12: Gel SDS-PAGE da reação de peguilação da amilina com o mPEG1kDa-SC.....	64
Figura 13: Gel SDS-PAGE da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald.....	65
Figura 14: Análise densitométrica do gel da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC.....	67
Figura 15: Análise densitométrica do gel da reação de peguilação da amilina com o mPEG2kDa-SC.....	69
Figura 16: Análise densitométrica do gel da reação de peguilação da amilina com o mPEG1kDa-SC.....	71
Figura 17: Análise densitométrica dos géis SDS-PAGE das reações de peguilação.....	73
Figura 18: Análise densitométrica do gel da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald.....	75
Figura 19: Purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC em DMSO.....	77
Figura 20: Purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald em NaH ₂ PO ₄ 0,1M (pH 5,0).....	78

Figura 21: Purificação da segunda reação realizada de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald em NaH ₂ PO ₄ 0,1M (pH 5,0).....	79
Figura 22: Gel SDS-PAGE 22,5% das amostras obtidas por purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC em DMSO.....	81
Figura 23: Gel SDS-PAGE 22,5% das amostras obtidas por purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald em NaH ₂ PO ₄ 0,1M - pH 5,0.....	82
Figura 24: Gel SDS-PAGE 22,5% das amostras obtidas por purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald em NaH ₂ PO ₄ 0,1M - pH 5,0.....	84
Figura 25: Caracterização por meio de MALDI-ToF-MS das amostras obtidas por purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC em DMSO.....	85
Figura 26: Caracterização por meio de MALDI-ToF-MS das amostras obtidas por purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald em NaH ₂ PO ₄ 0,1M - pH 5,0.....	86
Figura 27: Caracterização por meio de MALDI-ToF-MS das amostras obtidas por purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald em NaH ₂ PO ₄ 0,1M - pH 5,0.....	86
Figura 28: Caracterização por meio de MALDI-ToF-MS e digestão por tripsina da amilina dipeguilada.....	88
Figura 29: Quantificação de amilina murina livre.....	89
Figura 30: Avaliação farmacológica <i>in vivo</i> das amilinas peguiladas obtidas pela reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critério para o diagnóstico do Diabetes.....	20
Tabela 2: Algoritmo para o tratamento do Diabetes Tipo 2.....	22
Tabela 3: Opções farmacológicas para o tratamento do Diabetes Tipo 2.....	24
Tabela 4: Propriedades farmacocinéticas de insulinas e análogos.....	25
Tabela 5: Ações relatadas da amilina.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM	Diabetes Mellitus
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
ADA	American Diabetes Association
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
EASD	<i>European Association for the Study of Diabetes</i>
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
A1C	Hemoglobina Glicada
HbA1C	Hemoglobina Glicada
NGSP	<i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i>
DPP-4	<i>Dipeptidyl peptidase-4</i>
ADO	Antidiabético oral
NPH	<i>Neutral protamine Hagedorn</i>
NPL	<i>Neutral protamine lispro</i>
NPA	<i>Neutral protamine aspart</i>
TRH	Hormônio liberador do hormônio estimulador da tireóide
PAM	Monooxigenase peptidglicina alfa-amidada
IAPP	Polipeptídeo associado (ou amilóide) da ilhota
PC2	Pró-hormônio convertase 2
PC1/3	Pró-hormônio convertase 1 ou 3
CPE	Carboxipeptidase E
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
ApoE	apolipoproteína E
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina 2
IDE	<i>Insulin degrading enzyme</i>

RAMP	Proteína modificadora de atividade de receptor
C_{\max}	Concentração máxima
PEG	Polietilenoglicol
M_w	Massa molecular ponderado por massa
M_n	Massa molecular ponderado pelo número
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
EUA	Estados Unidos da América
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
kDa	kilodalton
M	molar
μM	micromolar
μg	micrograma
pH	Potencial hidrogeniônico
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
WWW	<i>World Wide Web</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 DIABETES MELLITUS.....	18
1.1.1 Definição e estatística	18
1.1.2 Classificação	18
1.1.3 Sintomas	19
1.1.4 Diagnóstico	19
1.1.5 Tratamento	21
1.2 AMILINA.....	26
1.2.1 Breve histórico	26
1.2.2 Gene e sequência da amilina	27
1.2.3 Secreção da amilina	29
1.2.4 Características físico-químicas da amilina	30
1.2.5 Depósitos amilóides	30
1.2.6 Metabolismo da amilina	31
1.2.7 Receptores da amilina	32
1.2.8 Efeitos fisiológicos da amilina	33
1.2.9 Associação com Diabetes Mellitus	36
1.2.10 Pramlintide	37
1.3 PEGUILAÇÃO.....	39
1.3.1 Definição	40

1.3.2 Polietilenoglicol.....	40
1.3.3 Efeitos da peguilação.....	42
1.3.4 Química da peguilação.....	44
1.3.5 Mercado farmacêutico de medicamentos peguilados.....	45
2 OBJETIVOS GERAIS.....	47
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 MATERIAIS.....	48
3.1.1 Reagentes e solvente.....	48
3.1.2 Equipamentos e outros materiais.....	48
3.2 MÉTODOS.....	49
3.2.1 Reações de derivados de polietilenoglicol com amilina murina.....	49
3.2.1.1 Reação do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 5 kDa (mPEG5kDa-SC) com amilina murina em DMSO.....	49
3.2.1.2 Reação do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 2 kDa (mPEG2kDa-SC) com amilina murina em DMSO.....	50
3.2.1.3 Reação do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 1 kDa (mPEG1kDa-SC) com amilina murina em DMSO.....	50
3.2.1.4 Reação do metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) com amilina murina em NaH ₂ PO ₄ 0,1M (pH 5,0).....	51
3.2.2 Análises das reações de peguilação por eletroforese.....	52

3.2.3	Análise cinética das reações de peguilação por quantificação de aminas remanescente por derivatização química com fluorescamina.....	53
3.2.4	Purificação dos produtos das reações de peguilação.....	53
3.2.4.1	Purificação dos produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 5 kDa (mPEG5kDa-SC) em DMSO.....	53
3.2.4.2	Purificação dos produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) em NaH ₂ PO ₄ 0,1M (pH 5,0).....	54
3.2.5	Análises de eletroforese das purificações das reações de peguilação.....	55
3.2.6	Análises por espectrometria de massas das amostras purificadas.....	55
3.2.7	Digestão por tripsina dos produtos peguilados	55
3.2.8	Dosagem das amilinas peguiladas pelo método de Bradford.....	56
3.2.9	Avaliação farmacológica das amilinas peguiladas.....	56
3.2.10	Análise estatística.....	57
4	RESULTADOS.....	58
4.1	ANÁLISE CINÉTICA DAS REAÇÕES DE PEGUILAÇÃO POR QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS REMANESCENTE POR DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA COM FLUORESCAMINA.....	58
4.2	ANÁLISES DAS REAÇÕES DE PEGUILAÇÃO POR ELETROFORESE.....	60
4.2.1.	Gel SDS-PAGE 22,5% da reação do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 5 kDa (mPEG5kDa-SC) com amilina murina em DMSO.....	61
4.2.2	Gel SDS-PAGE 22,5% da reação do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 2 kDa (mPEG2kDa-SC) com amilina murina em DMSO.....	62
4.2.3	Gel SDS-PAGE 22,5% da reação do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 1 kDa (mPEG1kDa-SC) com amilina murina em DMSO.....	63

4.2.4 Gel SDS-PAGE 22,5% da reação do metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) com amilina murina em NaH₂PO₄ 0,1M (pH 5,0)	64
4.3 ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DOS GÉIS SDS-PAGE 22,5%	65
4.3.1 Análise densitométrica do Gel SDS-PAGE 22,5% da reação de peguilação da amilina murina com o mPEG5kDa-SC	65
4.3.2 Análise densitométrica do Gel SDS-PAGE 22,5% da reação de peguilação da amilina com o mPEG2kDa-SC	68
4.3.3 Análise densitométrica do Gel SDS-PAGE 22,5% da reação de peguilação da amilina com o mPEG1kDa-SC	70
4.3.4 Comparação dos resultados das análises densitométricas dos Géis SDS-PAGE 22,5% das reações de peguilação da amilina com os mPEG5kDa-SC, mPEG2kDa-SC e mPEG1kDa-SC	72
4.3.5 Análise densitométrica do Gel SDS-PAGE 22,5% da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald	74
4.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE PEGUILAÇÃO COM HPLC DE FASE REVERSA	76
4.4.1 Purificação dos produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 5 kDa (mPEG5kDa-SC) em DMSO	76
4.4.2 Purificação dos produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) em NaH₂PO₄ 0,1M (pH 5,0) ..	77
4.5 ANÁLISES DE ELETROFORESE DAS PURIFICAÇÕES DAS REAÇÕES DE PEGUILAÇÃO	80
4.5.1 Gel SDS-PAGE 22,5% da purificação dos produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 5 kDa (mPEG5kDa-SC) em DMSO	80
4.5.2 Gel SDS-PAGE 22,5% da purificação dos produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) em NaH₂PO₄ 0,1M (pH 5,0)	81

4.6 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DAS AMOSTRAS PURIFICADAS.....	84
4.6.1 Análise dos produtos purificados da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 5 kDa (mPEG5kDa-SC) em DMSO.....	84
4.6.2 Análise dos produtos purificados da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) em NaH ₂ PO ₄ 0,1M (pH 5,0)..	85
4.7 DIGESTÃO POR TRIPSINA DOS PRODUTOS PEGUILADOS.....	87
4.8 DOSAGEM DAS AMILINAS PEGUILADAS PELO MÉTODO DE BRADFORD.....	88
4.9 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS AMILINAS PEGUILADAS.....	89
5 DISCUSSÃO.....	92
6 CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS.....	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

1.1.1 Definição e estatística

O Diabetes Mellitus (DM) caracteriza-se por um distúrbio metabólico em que ocorre o aumento dos níveis de glicemia devido à decorrência de deficiência da ação da insulina, ou da secreção de insulina, ou de ambos (BASTAKI, 2005). Segundo o Atlas da International Diabetes Federation (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2012), mais de 371 milhões de pessoas são portadoras de Diabetes Mellitus (DM) e 4,8 milhões de pessoas morreram devido o Diabetes no mundo em 2012. Já no Brasil existem 13.357.790 pessoas portadoras de Diabetes com idade entre 20 e 79 anos, e 129.226 pessoas com idade entre 20 e 79 anos morreram devido o Diabetes em 2012.

1.1.2 Classificação

A classificação do Diabetes inclui quatro classes clínicas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012):

- Diabetes Tipo 1 – em que o indivíduo apresenta deficiência de insulina, que pode chegar a ser uma deficiência absoluta, ocorrendo devido à destruição das células β ;
- Diabetes Tipo 2 – em que o indivíduo apresenta resistência à insulina e uma deficiência na secreção de insulina que é progressiva;
- Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) – tipo de Diabetes em que não é comum a presença de sintomas e é diagnosticado durante a gravidez. O indivíduo pode apresentar tanto resistência à insulina quanto deficiência na secreção de insulina;
- Outros tipos de Diabetes – ocorrem devido a causas diversas não mencionadas anteriormente, tais como, Diabetes causado por produtos químicos, medicamentos, pancreatite crônica, defeitos genéticos na ação da insulina e defeitos genéticos na função de células β .

1.1.3 Sintomas

Os sintomas são parecidos tanto no Diabetes Tipo 1 como no Tipo 2, variando em sua intensidade. No Diabetes Tipo 2, os sintomas não são rapidamente percebidos, pois aparecem gradativamente. Já no Tipo 1 os sintomas são mais típicos e desenvolvem-se mais rapidamente. Os sintomas são fadiga, cólicas, prisão de ventre, perda de peso, visão turva, candidíase, poliúria, polifagia, polidipsia. Complicações microvasculares e macrovasculares como doença vascular aterosclerótica, nefropatia, retinopatia e neuropatia têm grande tendência de ocorrer quando o indivíduo tem Diabetes por muitos anos. (BASTAKI, 2005; RODRIGUES e SILVA, 2001). O comprometimento aterosclerótico das artérias coronarianas, das cerebrais e dos membros inferiores apresenta-se comumente associado com hipertensão, hiperlipidemia e obesidade. A maior parte dos indivíduos com Diabetes Tipo 2 morrem devido a complicações cardiovasculares e falência renal (BASTAKI, 2005) (SCHEFFEL *et al.*, 2004).

1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico do Diabetes Mellitus é baseado na medida da glicemia. Os testes recomendados para o diagnóstico são o teste de glicose plasmática em jejum, o teste oral de tolerância à glicose, o teste aleatório de glicemia plasmática (glicemia ao acaso) e o teste de hemoglobina glicada (HbA1c ou A1C). No teste de glicose plasmática em jejum, a glicose é medida após pelo menos 8 horas de jejum, no teste aleatório de glicemia plasmática a medida da glicemia é realizada em qualquer hora do dia sem necessidade de jejum antes do exame, e no teste oral de tolerância a glicose a medida da glicose é realizada duas vezes, a primeira depois de pelo menos 8 horas de jejum, e a segunda após 2 horas da ingestão de 75 g de glicose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). O teste de hemoglobina glicada passou a ser utilizado em 2009, apenas para o diagnóstico do Diabetes Tipo 2 e de pré-Diabetes, por recomendação de um Comitê Internacional de Especialistas, compreendendo representantes da Associação Européia para o Estudo do Diabetes (*European Association for the Study of Diabetes – EASD*), Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association - ADA*), e da Federação

Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation - IDF*). O teste de hemoglobina glicada pode ser realizado a qualquer hora do dia, sem jejum prévio, e reflete a média dos níveis de glicose do indivíduo, relativo aos três meses anteriores à realização do teste. O teste deve ser realizado através de um método que é certificado pelo Programa Nacional de Normatização da hemoglobina glicada (NGSP) e padronizado ou rastreável para o Ensaio sobre controle e complicações do diabetes (*Diabetes Control and Complications Trial - DCCT*). A menos que um paciente apresente sintomas típicos de hiperglicemia, crise de hiperglicemia ou glicemia aleatória ≥ 200 mg/dL, os testes para o diagnóstico do Diabetes Mellitus devem ser repetidos para a confirmação do diagnóstico (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012a; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012b; “National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC)”, [s.d.]).

Os critérios diagnósticos do Diabetes Mellitus estão resumidos na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1: Critério para o diagnóstico do Diabetes.

A1C $\geq 6,5\%$
O teste deve ser realizado através de método rastreável ao método do DCCT e devidamente certificado pelo National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) (http://www.ngsp.org).*
OU
Glicemia de jejum: ≥ 126 mg/dl
O período de jejum deve ser definido como ausência de ingestão calórica por pelo menos 8 horas.*
OU
Glicemia 2 hs após sobrecarga com 75 g de glicose: ≥ 200 mg/dl
Em teste oral de tolerância à glicose. Esse teste deverá ser conduzido com a ingestão de uma sobrecarga de 75 g de glicose anidra, dissolvida em água, em todos os indivíduos com glicemia de jejum entre 100 mg/dL e 125 mg/dL.*
OU
Glicemia ao acaso ≥ 200 mg/dl
Em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia, ou em crise hiperglicêmica.
* Na ausência de hiperglicemia comprovada, os resultados devem ser confirmados com a repetição dos testes.

Adaptado de (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

1.1.5 Tratamento

O principal objetivo no tratamento do Diabetes Mellitus é aliviar os sintomas e garantir a vida do indivíduo diabético. O segundo objetivo é o controle dos níveis de glicemia para evitar riscos cardiovasculares e outros tipos de riscos desenvolvidos pelo longo tempo de duração da doença. Para alcançar esses objetivos, a base e a parte crítica do tratamento consiste de modificações do estilo de vida, incluindo a dieta, exercícios e perda de peso (QASEEM, 2012; INZUCCHI *et al.*, 2012; BASTAKI, 2005). A perda de peso melhora o controle da glicemia e outros fatores de riscos cardiovasculares. A dieta deve ser pobre em alimentos de alta energia como os ricos em açúcares e gordura saturada, e rica em alimentos ricos em fibras e com baixa taxa de gordura. É recomendado pelo menos 150 minutos de atividade física moderada por semana no tratamento do Diabetes Tipo 2 (INZUCCHI *et al.*, 2012). Estudos mostram que o aumento da atividade física possui um efeito protetor contra o desenvolvimento do Diabetes Tipo 2 e uma diminuição da incidência da doença a longo prazo. Indivíduos com Diabetes Tipo 2 com capacidade aeróbica moderada ou alta apresentam, a longo prazo, mortalidade 50 a 60% menor do que os indivíduos diabéticos com baixa capacidade cardiorrespiratória (BASTAKI, 2005).

O cuidado do Diabetes é baseado no estado clínico do paciente e na sua capacidade de participar do autocuidado (BASTAKI, 2005). A base do tratamento para os pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 1 é terapia de reposição de insulina e modificação da dieta. Os exercícios físicos são recomendados, mas com cautela devido a grande possibilidade de ocorrência de eventos hipoglicêmicos (DE ANGELIS *et al.*, 2006). Já no Diabetes Tipo 2, modificações de dieta e estilo de vida são considerados essenciais para o seu tratamento e gestão. Quando níveis controlados de glicemia sérica não são alcançados através de dieta, perda de peso e exercício, são utilizados também medicamentos orais, se mesmo com os medicamentos orais níveis glicêmicos controlados não foram alcançados utiliza-se também a insulina no tratamento (BASTAKI, 2005; INZUCCHI *et al.*, 2012). Hipoglicemiantes orais incluem sulfoniluréias, biguanidas, inibidores de alfa-glicosidase, tiazolidinediona entre outros. O principal objetivo destes fármacos é corrigir a resistência à insulina, o distúrbio metabólico, e a secreção de insulina inadequada (BASTAKI, 2005).

A Sociedade Brasileira de Diabetes desenvolveu uma proposta de algoritmo para o tratamento do Diabetes Tipo 2, que encontra-se na Tabela 2 abaixo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011):

Tabela 2: Algoritmo para o tratamento do Diabetes Tipo 2.

ETAPA 1: CONDUTA INICIAL CONFORME A CONDIÇÃO CLÍNICA ATUAL			
Manifestações leves	Manifestações moderadas	Manifestações severas	Hospitalização se glicemia >300 mg/dL.
↓	↓	↓	↓
<ul style="list-style-type: none"> Glicemia <200 mg/dL. + Sintomas leves ou ausentes. + Ausência de outras doenças agudas concomitantes. 	<ul style="list-style-type: none"> Qualquer glicemia entre 200 e 300 mg/dL. + Ausência de critérios para manifestação leve ou grave. 	<ul style="list-style-type: none"> Qualquer glicemia acima de 300 mg/dL. = ou = Perda significativa de peso. = ou = Sintomas graves e significantes. = ou = Presença de cetonúria. 	<p>Nas seguintes condições:</p> <ul style="list-style-type: none"> Cetoacidose diabética e estado hiperosmolar. = ou = Doença grave intercorrente ou comorbidade.
↓	↓	↓	↓
<p>Modificações de estilo de vida + metformina (500 mg/dia, intensificando até 2.000 mg/dia).</p> <p>Se não atingir A1C <7% em 4 a 6 semanas. →</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Considerar eventualmente o início do tratamento com terapia combinada com metformina + fármacos que atuam na glicemia pós-prandial (acarbose, glinidas ou gliptinas).</p>	<p>Modificações de estilo de vida + metformina (500 mg/dia, intensificando até 2.000 mg/dia) + outros antidiabéticos orais.</p> <p style="text-align: center;">CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO DE SEGUNDO ANTIDIABÉTICO ORAL</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p>Iniciar insulino terapia imediatamente.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Reavaliar condição clínica para eventual reintrodução de terapia oral após o controle adequado da glicemia.</p>	<p>Iniciar a terapia de acordo com as recomendações do algoritmo e conforme o controle glicêmico obtido após a alta.</p>

ETAPA 2: ADICIONAR OU MODIFICAR SEGUNDO AGENTE CONFORME NÍVEL DE HEMOGLOBINA GLICADA (A1C)		
7- 8,5%	8,5-10%	>10%
<ul style="list-style-type: none"> • Sulfonilureia. • Inibidores da DPP-4. • Pioglitazona. • Glinidas (predomínio de hiperglicemia pós-prandial). • Acarbose (predomínio de hiperglicemia pós-prandial). • Exenatida ou liraglutida (sobrepeso ou obesidade). 	<ul style="list-style-type: none"> • Sulfonilureia. • Inibidores da DPP-4. • Pioglitazona. • Insulina basal ao deitar. • Exenatida ou liraglutida (sobrepeso ou obesidade). 	<ul style="list-style-type: none"> • Insulinoterapia. • Insulina basal + insulina prandial. <p style="text-align: center;">Com ou sem:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Metformina. • Sulfonilureia. • Inibidores da DPP-4.
MONITORAÇÃO E AJUSTES NO TRATAMENTO APÓS 2 MESES COM DOSES MÁXIMAS EFETIVAS PARA ATINGIR AS METAS: A1C <7%, GLICEMIA DE JEJUM <100 mg/dL OU GLICEMIA PÓS-PRANDIAL (2 HORAS) <140 mg/dL		

ETAPA 3: ADICIONAR UM TERCEIRO AGENTE ORAL OU INTENSIFICAR O TRATAMENTO INSULÍNICO	
	
<p>Adicionar um terceiro antidiabético oral com diferente mecanismo de ação. Se em 2 meses não atingir as metas de A1C <7%, glicemia de jejum <100 mg/dL ou glicemia pós-prandial (2 horas) <140 mg/dL, iniciar insulinização. </p>	<p>Intensificar a insulinização até atingir as metas de A1C <7%, glicemia de jejum <100 mg/dL ou glicemia pós-prandial (2 horas) <140 mg/dL.</p>
<p>ORIENTAÇÕES E COMENTÁRIOS ADICIONAIS</p> <p>Como qualquer outra Diretriz, esse Algoritmo contém recomendações gerais sobre as opções terapêuticas mais indicadas para cada situação clínica. A escolha do melhor esquema terapêutico deverá ser feita com base no juízo médico, nas opções do paciente e nos custos de tratamento com os respectivos fármacos.</p>	
<p>ESQUEMA OPCIONAL PARA A TERAPIA INICIAL DA ETAPA 1 DESTA ALGORITMO</p> <p>Muito embora não haja consenso entre os especialistas, existem evidências clínicas que suportam uma abordagem farmacológica mais intensiva, caracterizada pela implementação de uma terapia medicamentosa dupla, tão logo seja confirmado o diagnóstico do diabetes. A metformina continuaria sendo o componente essencial da terapia dupla, juntamente com um segundo fármaco cuja escolha dependeria das condições médico-econômico-sociais de cada paciente.</p>	

Adaptado de SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011.

As principais características dos perfis terapêuticos dos fármacos utilizados no tratamento do Diabetes Tipo 2, encontram-se na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3: Opções farmacológicas para o tratamento do Diabetes Tipo 2.

FÁRMACO	PERFIL E MECANISMO DE AÇÃO
<ul style="list-style-type: none"> • Acarbose (Aglucose®). 	Retarda a absorção intestinal de glicose. Baixo potencial de redução da A1C (0,5 – 0,8%). Intolerância gastrointestinal. Eficácia associada ao uso pré-prandial para prevenção da hiperglicemia pós-prandial.
<ul style="list-style-type: none"> • Metformina (Glifage®, outros). 	Reduz primariamente a produção hepática de glicose e combate a resistência à insulina. Alto potencial de redução da A1C (2%). Intolerância gastrointestinal. Não causa hipoglicemia. Pode promover discreta perda de peso. Contraindicada na disfunção renal, hepática, pulmonar ou cardíaca, bem como no pré e no pós-operatório e em pacientes submetidos a exames de imagem com contraste.
<ul style="list-style-type: none"> • Pioglitazona (Actos®, Piotaz® e Pioglit®). 	Combate primariamente a resistência à insulina e reduz a produção hepática de glicose. Aumenta a sensibilidade do músculo, tecido gorduroso e fígado à insulina. Potencial intermediário de redução de A1C (0,5 – 1,4%). Pode promover retenção hídrica e ganho de peso, aumentando o risco de insuficiência cardíaca. Também pode aumentar o risco de fraturas. Promove redução do risco cardiovascular. A França e a Alemanha suspenderam preventivamente a comercialização da pioglitazona para avaliar a suspeita de um possível aumento de risco do câncer de bexiga. A FDA ainda não sugeriu ações preventivas mais drásticas.
<ul style="list-style-type: none"> • Sulfonilureias: <ul style="list-style-type: none"> - Glimepirida (Amaryl®). - Glibenclamida (Daonil®). - Clorpropamida (Diabinese®). - Gliclazida (Diamicron MR®). - Outros. 	Estimulam a produção endógena de insulina pelas células beta do pâncreas, com duração de ação de média a prolongada (8-24 horas). Úteis para o controle da glicemia de jejum e da glicemia de 24 horas. Alto potencial de redução de A1C (2%). Podem causar hipoglicemia. Clorpropamida e glibenclamida apresentam maior risco de hipoglicemia. Uma alegada ação deletéria em células beta humanas ainda não está estabelecida.
<ul style="list-style-type: none"> • Glinidas: <ul style="list-style-type: none"> - Repaglinida (Novonorm®, Prandin®, Posprand®). - Nateglinida (Starlix®). 	Estimulam a produção endógena de insulina pelas células beta do pâncreas, com duração rápida de ação (1-3 horas). Úteis para o controle da hiperglicemia pós-prandial. Potencial intermediário de redução de A1C (1,0 – 1,5%). Podem promover aumento de peso e hipoglicemia. A repaglinida é mais potente que a nateglinida.
<ul style="list-style-type: none"> • Incretinomiméticos e inibidores da DPP-4: <ul style="list-style-type: none"> - Exenatida (Byetta®). - Liraglutida (Victoza®). - Vildagliptina (Galvus®). - Sitagliptina (Januvia®). - Saxagliptina (Onglyza®). - Linagliptina (Trayenta®). 	Esta é uma nova classe terapêutica para o tratamento do diabetes, cujo mecanismo inclui o estímulo das células beta para aumentar a síntese de insulina e a ação nas células alfa do pâncreas reduzindo a produção de glucagon. O glucagon tem efeito de aumentar a glicemia. Potencial médio de redução da A1C (0,5 – 0,8%, dependendo do valor basal de A1C). Não causam hipoglicemia. Intolerância gastrointestinal. Os incretinomiméticos são injetáveis e os inibidores da DPP-4 são para uso oral.

Existem quatro tipos de apresentações comerciais de insulina no mercado brasileiro (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011):

- insulina humana em pré-mistura – apresenta a mistura de insulina humana de ação prolongada com insulina humana de ação rápida. Exemplo: 70% NPH/30% regular;
- insulina humana em monoterapia – apresenta apenas um tipo de insulina humana. Exemplo: NPH;
- análogo bifásico de insulina humana – apresenta um análogo de insulina humana de ação prolongada combinado com um análogo de insulina humana de ação ultra-rápida. Exemplo: 50% NPL/50% lispro;
- análogo de insulina humana em monoterapia – apresenta apenas um análogo de insulina humana. Exemplo: Glargina.

Um resumo das principais características dos perfis de ação das apresentações de insulina disponíveis encontra-se na Tabela 4 abaixo:

Tabela 4: Propriedades farmacocinéticas de insulinas e análogos.

INSULINA	INÍCIO DE AÇÃO	PICO DE AÇÃO	DURAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO
Longa duração			
Glargina (Lantus®)	2-4 hs	Não apresenta	20-24 hs
Detemir (Levemir®)	1-3 hs	6-8 hs	18-22 hs
Ação intermediária			
NPH	2-4 hs	4-10 hs	10-18hs
Ação rápida			
Regular	0,5-1 h	2-3 hs	5-8 hs
Ação ultrarrápida			
Asparte (Novorapid®)	5-15 min	0,5-2 hs	3-5 hs
Lispro (Humalog®)	5-15 min	0,5-2 hs	3-5 hs
Glulisina (Apidra®)	5-15 min	0,5-2 hs	3-5 hs
Pré-misturas			
70% NPH/30% regular	0,5-1 h	3-12 hs (duplo)	10-16 hs
75% NPL/25% lispro	5-15 min	1-4 hs (duplo)	10-16 hs
50% NPL/50% lispro	5-15 min	1-4 hs (duplo)	10-16 hs
70% NPA/30% asparte	5-15 min	1-4 hs (duplo)	10-16 hs
NPH = protamina neutra hagedorn; NPL = protamina neutra lispro; NPA = protamina neutra asparte			

Adaptado de SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011.

1.2 AMILINA

No passado sabia-se que as células β -pancreáticas secretavam no sangue a insulina, e quantidades pequenas de peptídeos relacionados ao precursor da insulina. Mas, estudos mostraram que mais proteínas e peptídeos são secretados por esta célula (NISHI e STEINER, 1990), tais como:

- prealbumina (transtiretina)
- endopeptidases 1 e 2
- proinsulina \rightarrow insulina, peptídeo C
- peptídeos relacionados aos hormônios da paratireóide
- proteínas secretórias 7B2
- proamilina \rightarrow amilina amidada, propeptídeos
- PAM (monooxigenase peptidilglicina alfa-amidada)
- carboxipeptidase H
- cromogranina A \rightarrow pancreastatina, betagranina
- (pro) catepsinas
- pró-TRH (TRH: hormônio liberador do hormônio estimulador da tireóide) \rightarrow TRH, propeptídeos

1.2.1 Breve histórico

Em 1900, Opie descreveu um material hialino dentro das ilhotas de Langerhans de pacientes diabéticos (OPIE, 1900a,apudYOUNG, 2005a). Esse material foi então identificado histologicamente por ser amilóide (AHRONHEIM, 1943apudYOUNG, 2005a) e alguns pesquisadores sugeriram conter insulina ou fragmentos de insulina no material (YOUNG, 2005apudPEARSE *et al.*, 1972). Em 1987, a sequência completa de um peptídeo com 37 aminoácidos, foi relatada por dois grupos de pesquisa distintos (COOPER *et al.*, 1987); (WESTERMARK *et al.*, 1987). Amilina foi o nome dado por Cooper *et al.* e IAPP (*islet associated (or amyloid) polypeptide*) foi o nome dado por Westermark *et al.*.

1.2.2 Gene e sequência da amilina

No cromossomo 12, reside como uma cópia única o gene da amilina humana (YOUNG, 2005). A ocorrência da codificação do pré-pró-hormônio (Pré-Pró-amilina) com 89 aminoácidos (Figura 1A) possui dois éxons como responsáveis (YOUNG, 2005). A clivagem do peptídeo sinal com 22 aminoácidos gera uma pró-forma com 67 aminoácidos (Figura 1B), que é processada no grânulo secretor de insulina e no Complexo de Golgi. A pró-forma possui peptídeos flanqueadores C-terminal e N-terminal que são clivados em sítio dibásicos pelas pró-hormônio convertases PC2 e PC1/3 (Figura 1B). A clivagem do C-terminal resulta em uma sequência terminal com três aminoácidos Gli-Lis-Arg. A carboxipeptidase E (CPE) remove os resíduos dibásicos no C-terminal, e o complexo mono-oxigenase de amidação de peptídeo (*peptidyl amidating mono-oxygenase complex* - PAM) é o responsável pela amidação no C-terminal usando a glicina como doadora de nitrogênio (CAO *et al.*, 2013). Na pós-tradução ocorre a amidação e a formação de uma ponte de dissulfeto entre os resíduos de cisteína nas posições 2 e 7 da sequência da amilina, formando assim a amilina madura, cuja sequência apresenta 37 aminoácidos (Figura 1C) (YOUNG, 2005).

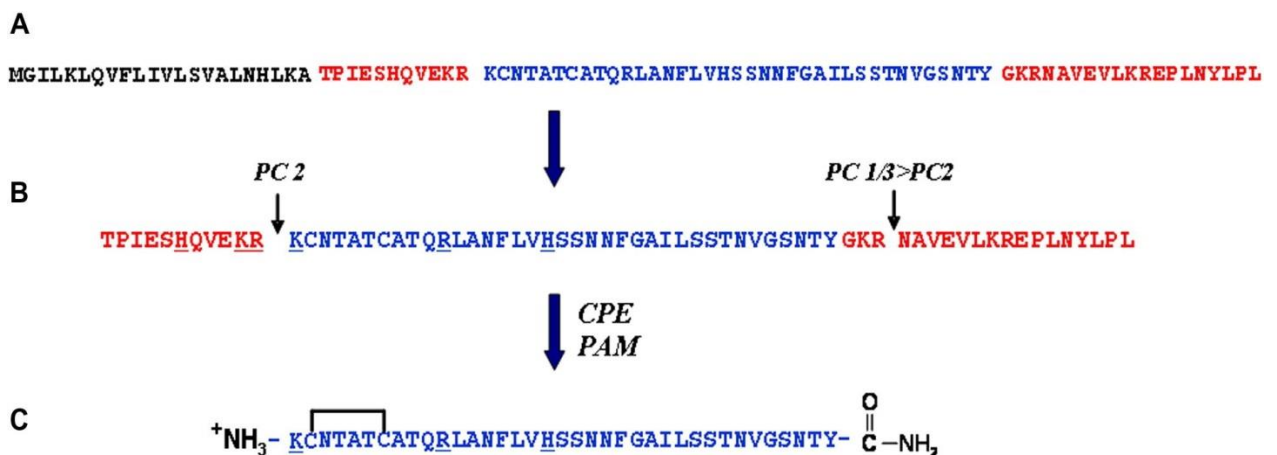


Figura 1: Esquema do Processamento da Pré-Pró-amilina humana para formar amilina madura. (A) Sequência primária da Pré-Pró-amilina humana, peptídeo com 89 resíduos. A sequência sinal com 22 resíduos é mostrado em preto, regiões flanqueadoras C-terminal e N-terminal da pró-forma da amilina são mostradas em vermelho, e a sequência madura em azul. (B) Sequência primária da pró-forma da amilina humana com 67 resíduos. A pró-forma é clivada pelas pró-hormônio convertases PC 1/3 e PC2 nos dois sítios dibásicos, indicados pelas setas. Através da ação de CPE/PAM ocorre a formação do C-terminal amidado da amilina. (C) Sequência da amilina humana madura com 37 resíduos. O peptídeo biologicamente ativo tem um C-terminal amidado e uma ponte dissulfeto entre Cis-2 e Cis-7 (adaptado de (CAO *et al.*, 2013).

A família dos peptídeos relacionados com a calcitonina é composta pela amilina, pela adrenomedulina, pelo peptídeo relacionado ao gene da alfa calcitonina e beta calcitonina (CGRP) e pela intermedina. Esses peptídeos possuem características estruturais importantes semelhantes, mas possuem sequências de aminoácidos diferentes (Figura 2). Uma característica em comum entre eles é que possuem um C-terminal amidado e uma ponte de dissulfeto intramolecular perto do N-terminal. O CGRP é o peptídeo da família que mais tem semelhança com a amilina, pois assim como a amilina apresenta ligação dissulfeto entre os resíduos dois e sete de sua sequência de aminoácido, possui sequência com 37 aminoácidos, possui um resíduo aromático amidado no C-terminal, e em seu estado monomérico apresenta tendência na formação de baixos níveis de estrutura helicoidal transitória sobre parte da sua sequência. Uma característica que é diferente entre a amilina e o CGRP, é que a amilina humana forma facilmente depósito amilóide *in vitro*, mas o CGRP não. Apesar de possuírem a mesma quantidade de aminoácidos em suas sequências, e certa semelhança, principalmente nas regiões N-terminal e C-terminal, a região em que mais são distintos ocorre entre os resíduos 20 e 29 de suas sequências. Foi a partir dessa distinção entre as suas sequências que surgiu a hipótese de que a sequência entre os resíduos 20 e 29 é a região determinante para tornar a amilina capaz de formar depósito amilóide. Dentre os seres vivos que possuem amilina, somente os seres humanos, primatas não-humanos, e os gatos formam depósitos amilóides na ilhota *in vivo*, os ratos e os camundongos não (CAO *et al.*, 2013). Comparando as sequências de 37 aminoácidos da amilina humana e da amilina murina, percebe-se que elas diferem entre si em seis posições, cinco dessas posições estão localizadas entre os resíduos 20 e 29 (Figura 2). A sequência da amilina murina apresenta três resíduos do aminoácido Prolina nas posições 25, 28 e 29 da sequência, já a sequência da amilina humana não apresenta nenhuma (Figura 2). A menor tendência na formação de depósito amilóide pela amilina murina é atribuída às substituições por prolina, visto que a presença de prolina é energeticamente desfavorável em uma folha beta e desfaz estruturas secundárias (CAO *et al.*, 2013). Além da sequência entre os resíduos 20 e 29, outros fatores, que não vão ser comentados aqui, são importantes para determinar a capacidade da amilina em formar depósito amilóide *in vitro* (CAO *et al.*, 2013). Apesar da não formação *in vivo*, foi demonstrado que a amilina murina pode formar agregados amilóides com a mesma natureza da amilina humana sob certas condições *in vitro* (MILTON e HARRIS, 2013).

	1	10	20	30	37
CGRP1 humano :	<u>ACD</u> TATCVT	HRLAG <u>LLSRS</u>	<u>GGVVKNNFVP</u>	TNVGS <u>KAF</u>	
CGRP2 humano :	<u>ACN</u> TATCVT	HRLAG <u>LLSRS</u>	<u>GGMVKSNEFP</u>	TNVGS <u>KAF</u>	
Humana :	KCNTATCAT	QRLANFLVHS	SNNFGAILSS	TNVGSNTY	
Macaco :	KCNTATCAT	QRLANFLVRS	SNNFGTILSS	TNVGS <u>DTY</u>	
Babuino :	<u>I</u> CNTATCAT	QRLANFLVRS	SNNFGTILSS	TNVGSNTY	
Suíno :	KCN <u>M</u> ATCAT	QHLANFL <u>DRS</u>	<u>RNNLGTIFSP</u>	T <u>K</u> VGSNTY	
Vaca :	K <u>C</u> G <u>T</u> AT <u>C</u> E <u>T</u>	QRLANFL <u>A</u> P <u>S</u>	<u>SNKLGAI</u> FSP	T <u>K</u> MGSNTY	
Gato :	KCNTATCAT	QRLANFL <u>I</u> RS	SNN <u>L</u> GAILSP	TNVGSNTY	
Cachorro :	KCNTATCAT	QRLANFLV <u>R</u> T	SNN <u>L</u> GAILSP	TNVGSNTY	
Rato :	KCNTATCAT	QRLANFLVRS	SNN <u>L</u> GPVLP	TNVGSNTY	
Camundongo :	KCNTATCAT	QRLANFLVRS	SNN <u>L</u> GPVLP	TNVGSNTY	
Porquinho-da-índia:	KCNTATCAT	QRL <u>T</u> NFLVRS	<u>SHNLGAALP</u>	T <u>D</u> VGSNTY	
Hamster :	KCNTATCAT	QRLANFLVHS	<u>NNNLGPVLS</u> P	TNVGSNTY	
Degu :	KCNTATCAT	QRL <u>T</u> NFLVRS	<u>SHNLGAALP</u>	T <u>K</u> VGSNTY	
Furão :	KCNTATCVT	QRLANFLVRS	SNNLGA <u>IL</u> LP	T <u>D</u> VGSNTY	
Coelho:	CNT <u>V</u> TCAT	QRLANFL <u>I</u> HS	SNNFGA <u>F</u> LPP	<u>S</u>	
Lebre :		T	QRLANFL <u>I</u> HS	SNNFGA <u>F</u> LPP	T

Figura 2: Sequências primárias do CGRP humano e da amilina de diferentes espécies. Os resíduos na cor azul são os resíduos que diferem da sequência da amilina humana. Para coelhos e lebres só sequências parciais estão disponíveis. As sequências maduras biologicamente ativas apresentam em comum uma ponte de dissulfeto entre Cis-2 e Cis-7 e um C-terminal amidado. (adaptado de (CAO *et al.*, 2013))

1.2.3 Secreção da amilina

A amilina é um hormônio co-secretado e co-armazenado com a insulina, pelas células β pancreáticas (KRUGER, GATCOMB e OWEN, 1999). Como a insulina e a amilina são co-armazenadas, a secreção de amilina é paralela à resposta da insulina à estímulos diversos. A amilina e a insulina são secretadas devido a uma variedade de estímulos, incluindo glicose. (KRUGER, GATCOMB e OWEN, 1999; YOUNG, 2005).

A concentração da amilina na circulação é de em torno de 2 a 20 picomolar, em condições de jejum e alimentação, respectivamente, a concentração depende das condições metabólicas do corpo e apresenta-se em níveis reduzidos ou completamente ausentes em indivíduos diabéticos (BUTLER *et al.*, 1990apudGUERREIRO *et al.*, 2013).

1.2.4 Características físico-químicas da amilina

A amilina humana, um peptídeo com massa molar média de aproximadamente 3,9 kDa, é pouquíssimo solúvel em meio aquoso (KONARKOWSKA *et al.*, 2006; CHANCE *et al.*, 1991; BALASUBRAMANIAM *et al.*, 1991; GHATEI *et al.*, 1990; BRETHERTON-WATT *et al.*, 1990; BRETHERTON-WATT *et al.*, 1992), forma depósitos amilóides *in vivo* e *in vitro*, tem concentração tissular relativamente baixa e forma fibras longas, estáveis e dispostas em padrão regular. A amilina humana tem a capacidade de induzir a apoptose em células β pancreáticas cultivadas. No entanto, alguns estudos mostraram que até mesmo a forma não fibrilar da amilina humana (resíduos 1 a 19 da amilina humana) é nociva para as células β do pâncreas. Este fragmento não fibrilar é capaz de causar a destruição da membrana em baixas concentrações (ADEGHATE, 2011). Por sua vez, amilina de rato é hidrosolúvel e apresenta-se bioativa (CHANCE *et al.*, 1991; BALASUBRAMANIAM *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 1991; YOUNG, WANG e COOPER, 1991; SHERIFF, FISCHER e BALASUBRAMANIAM, 1992; JAMES *et al.*, 1999). O C-terminal amidado e a ligação dissulfeto devem estar intactos a fim da amilina ou de seus análogos serem biologicamente ativos (ADEGHATE, 2011).

1.2.5 Depósitos amilóides

O termo Amilóide (do grego amulon = amilo = amido + eidos = semelhante) foi pela primeira vez utilizado por Virchow para nomear a substância causadora da amiloidose, que era semelhante ao amido (ANNES *et al.*, 1997).

Define-se amiloidose como um grupo heterogêneo de doenças que apresenta como característica a deposição extracelular, de forma localizada ou sistêmica, de material proteináceo (amilóide) composto de fibrilas. Esse material proteináceo apresenta características bem definidas, como (ANNES *et al.*, 1997):

- à luz polarizada, apresentação de birrefringência verde na coloração vermelho Congo;

- em microscopia, apresentação de aparência rósea homogênea em colorações tradicionais;
- estrutura fibrilar não ramificada;
- conformação laminar paralela; e
- alta insolubilidade.

A alta insolubilidade do material proteináceo contribui para o curso irreversível e progressivo da doença.

As substâncias amilóides compreendem: uma proteína com forma pentagonal, o componente amilóide P ou proteína AP, um componente fibrilar, e uma porção de carboidratos constituída por proteoglicanos e glicosaminoglicanos (ANNES *et al.*, 1997).

A ocorrência da amiloidose dá-se através da deposição, em diferentes tecidos alvos, de fibrilas amilóides, que são formadas através da conversão de proteínas precursoras solúveis em agregados insolúveis (ANNES *et al.*, 1997).

Conforme mencionado anteriormente, a amilina, forma depósitos amilóides *in vivo* e *in vitro*. *In vivo* são formados nas Ilhotas de Langerhans do pâncreas. Os depósitos amilóides das ilhotas contém uma variedade de componentes que são comuns a todas as formas de amiloidose: componente P amilóide sérico, apolipoproteína E (ApoE) e proteoglicanos de heparan sulfato estão presentes em adição as fibrilas proteicas; algumas destas moléculas pode desempenhar um papel na iniciação ou na estabilização dos depósitos. Nos depósitos amilóides das ilhotas o peptídeo solúvel compõe uma estrutura linear rígida com cada monômero mantido junto através de pontes de hidrogênio (CLARK e NILSSON, 2004).

1.2.6 Metabolismo da amilina

A enzima que degrada a amilina é a mesma que degrada insulina, glucagon, peptídeo beta amilóide, ACTH, peptídeo natriurético, IGF-II e a relaxina. Nomeada como IDE (*insulin degrading enzyme*), é uma metaloprotease de Zn^{2+} altamente conservada, encontrada em bactérias, fungos, plantas e animais (BENNETT, 2000; SHEN *et al.*, 2006). A cinética de eliminação da amilina e da insulina difere, com a amilina tendo um maior tempo de meia-vida (YOUNG, 2005). A afinidade da IDE é em torno de 4 vezes maior pela insulina do que pela

amilina, assim, a degradação da amilina é prejudicada nessa proporção (BENNETT, 2000). O acúmulo suficiente de amilina para causar a formação de amilóide das ilhotas pode ocorrer quando há um aumento da sua produção e diminuição relativa na sua degradação. A ausência da IDE em roedores provoca a intolerância à glicose e o acúmulo cerebral de beta amilóide, enquanto a atividade eficaz da IDE reduz o acúmulo de amilóide (BENNETT, 2000).

A amilina é eliminada pelo rim. O tempo de meia-vida da amilina murina em ratos é de cerca de 13 minutos (YOUNG *et al.*, 1996apudYOUNG, 2005a).

1.2.7 Receptores da amilina

A área postrema, uma estrutura medular localizada na base do quarto ventrículo cerebral, que atua no controle de funções autonômicas pelo sistema nervoso central (PRICE, HOYDA e FERGUSON, 2007), é o principal local presumido para grande parte das ações da amilina humana, onde encontram-se receptores ligados à membrana que são responsáveis pelas ações da amilina. Esses receptores são heterodímeros formados por proteínas modificadoras de atividade de receptor (RAMP) e pelo receptor de alfa calcitonina e beta calcitonina (CTR) (LUTZ, 2011). Como o CTR apresenta duas variantes de splicing, podem haver seis subtipos diferentes de receptores de amilina (CAO *et al.*, 2013). A amilina liga-se ao CTR com baixa afinidade, mas o CTR obtêm propriedades específicas com a amilina, isto é, a afinidade é significativamente aumentada, quando o CTR forma um complexo com uma das RAMP's, na mesma célula (CAO *et al.*, 2013; LUTZ, 2011), ocorre que a preferência do CTR deixa de ser pela calcitonina e passa a ser pela amilina. Essa alteração no CTR ocorre, pois a RAMP regula o transporte dos receptores nucleares para a superfície da célula e o seu estado de glicosilação (LUTZ, 2011). Mesmo com a relevância clínica e a importância fisiológica da amilina, não se sabe se os seus diferentes receptores são ativos no sistema nervoso central e nos tecidos periféricos. Também ainda não se sabe que subtipo de receptor liga-se ao pramlintide, o análogo de amilina que é comercializado (CAO *et al.*, 2013).

1.2.8 Efeitos fisiológicos da amilina

Devido as características da amilina humana de ligação a objetos de vidro, propensão para a auto-agregação, e por resultar em concentrações de peptídeo imprevisíveis e, muitas vezes desprezíveis em tampões biológicos, os estudos sobre as atividades biológicas da amilina foram difíceis até cerca de 1992. Só a partir de 1992, em que os grupos de pesquisa começaram a usar a amilina de rato, que não apresenta essas propriedades físico-químicas, é que começaram a entender o papel funcional da amilina (YOUNG, 2005a).

Em torno de 60 efeitos diferentes foram reportados em vários experimentos usando a amilina ou o pramlintide (análogo sintético da amilina) em várias espécies, dentre as ações mais potentes, que ocorrem em concentrações plasmáticas fisiológicas, inclui a inibição da ingestão de alimentos, da secreção de enzima digestiva e ácido, da secreção de glucagon e do esvaziamento gástrico (YOUNG, 2005a). Outros efeitos da amilina estão resumidos na Tabela 5 a seguir:

Tabela 5: Ações relatadas da amilina.

Ação	Referência
Inibição da síntese de glicogênio muscular	Leighton e Cooper, 1988
Ativação da glicogenólise muscular	Young et al., 1991c
Inibição da captação de glicose periférica	Molina et al., 1990 Young et al., 1990
Aumento da glicose no plasma	Young et al., 1991a
Aumento de lactato no plasma	Young et al., 1991a
Estimulação da produção de glicose endógena	Molina et al., 1990
Estimulação da liberação de glicose muscular	Young et al., 1993a
Aumento no conteúdo de glicogênio do fígado	Young et al., 1991d
Aumento no ciclo de cori	Young et al., 1991b
Inibição da secreção de insulina	Dégano et al., 1993
Inibição da secreção de glucagon estimulada por arginina	Geludin et al., 1997
Estimulação do metabolismo pancreático exócrino	Iwamoto et al., 1992
Inibição da secreção pancreática estimulada por CCK	Geludin et al., 1998
Melhora de pancreatite	Young et al., 2005
Inibição do esvaziamento gástrico	Young et al., 1995a
Redução da hiperglicemia pós-prandial	Kolterman et al., 1994
Inibição da secreção de ácido gástrico	Guidobono et al., 1994
Estimulação da secreção de gastrina	Funakoshi et al., 1992
Redução de gastrina antral	Makhlouf et al., 1996
Estimulação de somatostatina no fundo do estômago	Zaki et al., 2002
Inibição da secreção gástrica mediada por histamina	Zaki et al., 2002
Inibição da gastrite induzida por etanol	Jodka et al., 1997
Inibição da gastrite induzida por indometacina	Guidobono et al., 1997
Relaxamento do intestino	Mulder et al., 1997a
Redução de cálcio plasmático	MacIntyre, 1989
Redução de potássio plasmático	Young et al., 1996
Inibição dos osteoclastos	Alam et al., 1993
Inibição seletiva de reabsorção	Daquin et al., 2004
Estimulação dos osteoblastos	Romero et al., 1993

Ação	Referência
Estimulação da calciúria	Miles et al., 1994
Inibição central da ingestão de alimentos	Chance et al., 1991b
Redução da orexina e do MCH hipotalâmica	Barth et al., 2003
Inibição da liberação de dopamina hipotalâmica	Brunetti et al., 2002
Inibição periférica da ingestão de alimentos	Morley e Flood, 1991
Aumento da ingestão de água	Rauch et al., 1997
Inibição da ingestão de etanol	Wolfe et al., 2003
Redução na taxa gordura:proteína	Roth et al., 2004
Centralmente, o aumento da temperatura corporal	Chance et al., 1991 a
Modulação da aprendizagem / memória	Flood e Morley, 1992
Analgesia opióide excedente	Young, 1997
Centralmente, diminuição da locomoção	Bouali et al., 1995
Estimulação da secreção de renina	Young et al., 1994c
Estimulação da secreção de aldosterona	Nuttall et al., 1995
Aumento na reabsorção de sódio tubular	Harris et al., 1997
Aumento no volume de urina	Vine et al., 1998
Aumento na excreção de sódio urinário	Vine et al., 1998
Estimulação de vasodilatação cutânea	Brain et al., 1990
Estimulação de vasodilatação pulmonar	Dewitt et al., 1994
Estimulação da secreção traqueal	Wagner et al., 1995
Relaxamento do músculo liso das vias aéreas	Bhogal et al., 1994
Redução da pressão arterial	Young et al., 1993
Escoamento do humor aquoso	Alajuuma et al., 2003
Proliferação endotelial venosa umbilical	Datta et al., 1990
Estimulação do crescimento de cardiócitos	Bell et al., 1995
Aumento de receptores tiazídicos renal	Blakely et al., 1997
Estimulação do transporte de tirosina e triptofano no SNC	Balasubramaniam et al., 1991
Ação anti-inflamatória	Clementi et al., 1995
Amplificação de resposta de eosinófilos	Hom et al., 1995
Redução de frutossamina plasmática	Thompson et al., 1996
Redução de flutuações de glicose	Kovatchev et al., 2004

Ação	Referência
Aumento da contratilidade em cardiócitos	Bell e McDermott, 1995
Estimulação da contratilidade atrial	Piao et al., 2004
Inibição da secreção de peptídeo natriurético	Piao et al., 2004
Inibição da liberação de hormônio do crescimento	Netti et al., 1995
Apoptose em células nervosas em cultura	May et al., 1993
Apoptose de células β em culturas	Lorenzo et al., 1994
Efeito protetor nas ilhotas	Mulder et al., 1997b
Fator de crescimento no rim	Wookey et al., 1998
Inibição da secreção de grelina	Gedulin et al., 2004

Adaptado de YOUNG, 2005a.

1.2.9 Associação com Diabetes Mellitus

Conforme mencionado anteriormente, a amilina e a insulina são armazenadas pela mesma glândula secretora e suas secreções são paralelas entre si em resposta a estímulos, como, por exemplo, glicose. Assim, ocorre que em indivíduos com Diabetes Tipo 1, as concentrações plasmáticas de amilina são indetectáveis, pois não podem produzir amilina devido ao fato de que não apresentam células beta funcionais. E em indivíduos com Diabetes Tipo 2 tratados por meio de agentes antidiabéticos orais ou dieta, ou quando o tratamento exige adicionalmente reposição de insulina devido à danos nas células beta, há uma redução na capacidade de secreção de amilina em resposta à alimentação. Esses fatos demonstram que em indivíduos diabéticos a secreção da amilina e da insulina é alterada, e a intensidade da alteração vai depender do grau de disfunção das células beta. Com isso, pode-se dizer que o Diabetes é uma doença em que ocorre deficiência tanto de amilina como de insulina (KRUGER, GATCOMB e OWEN, 1999).

Como a amilina atua conjuntamente com a insulina e o glucagon na homeostase da glicose mantendo o controle preciso da concentração plasmática de glicose, a diminuição ou a ausência da amilina tem um profundo efeito sobre o controle geral da glicemia e pode ser o motivo que explica o fato de tantas pessoas tratadas só através da reposição da insulina, não

conseguirem alcançar níveis controlados de glicemia. O ideal seria que o tratamento do Diabetes fosse baseado tanto na reposição da insulina como da amilina (KRUGER, GATCOMB e OWEN, 1999).

Além da diminuição na sua produção em um indivíduo diabético, a amilina apresenta uma outra relação com o Diabetes, que se apresenta como uma das mais comuns características patológica do Diabetes tipo 2, a amilina forma depósitos amilóides nas ilhotas do pâncreas de indivíduos com Diabetes Tipo 2, e em mais de 90% dos diabéticos Tipo 2 são encontrados depósitos em pelo menos uma ilhota no post-mortem. A redução na função das ilhotas associado à necessidade de terapia de reposição de insulina em seres humanos tem sido apontado como a razão da alta porcentagem de ocorrências de achados de depósitos nas ilhotas no post mortem (CLARK e NILSSON, 2004). Um fato curioso, é que em solução, as fibrilas maduras de amilina humana não são citotóxicas para as células beta, assim o desenvolvimento do Diabetes Tipo 2 não é exclusivamente causado pela aparência física de fibrilas, mas sim que o processo de formação das fibrila pode ser citotóxico e pode levar a uma disfunção das ilhotas em Diabetes (PESARU, 2011). A disfunção do metabolismo das células beta e as alterações no ambiente das ilhotas que ocorrem no Diabetes são as causas mais prováveis da formação de fibrilas de amilina. Assim, os depósitos amilóides seriam uma característica patológica resultante da complicação do Diabetes (CLARK e NILSSON, 2004). Em indivíduos diabéticos Tipo 1, que apresentam níveis indetectáveis de insulina e de amilina, não há ocorrência da deposição de amilóide nas ilhotas do pâncreas, e essa não deposição acontece igualmente em indivíduos não diabéticos (CLARK e NILSSON, 2004). O fato de existirem possíveis agentes estabilizantes *in vivo*, ajudando a amilina humana a não formar fibrilas, em indivíduos não diabéticos, pode ser uma explicação para essa não ocorrência de deposição de amilóides. Um exemplo de inibidor natural da agregação da amilina e da formação de fibrilas é a insulina (PESARU, 2011).

1.2.10 Pramlintide

Devido à descoberta da importância da amilina na homeostase da glicose, suas várias outras funções fisiológicas, e sua deficiência em indivíduos diabéticos, pesquisadores têm tentado utilizar a amilina humana no tratamento do Diabetes e de outras doenças, mas devido

a algumas de suas características físico-químicas mencionadas anteriormente, até hoje isso não foi possível, da mesma forma como não foi possível a determinação de algumas de suas funções biológicas. Assim, na tentativa de usar as propriedades da amilina no tratamento do Diabetes, em 1988, Cooper fundou uma empresa Farmacêutica denominada ‘‘Amylin Pharmaceuticals’’ (www.amylin.com), onde o Amlintide, um peptídeo análogo à amilina, foi desenvolvido. Mas, como o Amlintide formava agregados amilóides *in vivo* da mesma forma que a amilina humana, não foi possível utilizar o mesmo como medicamento.

Novas tentativas de encontrar um análogo substituto para a amilina humana foram realizadas, e em 1997 foi desenvolvido o Pramlintide (nome comercial: Symlin®; www.symlin.com; Patente US 5998367) através de uma modificação no Amlintide, em que foram realizadas três substituições pontuais dos resíduos de aminoácidos nas posições 25, 28 e 29 por prolina (Figura 3). Essas substituições preveniram a formação de amilóides (USAN COUNCIL, 1997), promovendo estabilidade em solução e a atividade biológica continuou presente (YOUNG, 2005a), assim foi possível a aprovação do Pramlintide para comercialização pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em março de 2005 como medicamento para o tratamento do Diabetes Tipo 1 e 2 (ADEGHATE, 2011).

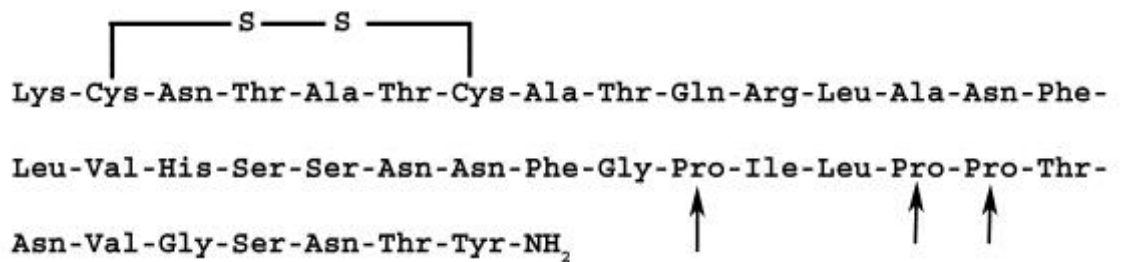


Figura 3: Sequência primária do Pramlintide, análogo da amilina humana. As setas indicam as posições 25, 28 e 29 em que os aminoácidos foram substituídos por prolina. Como pode ser notado, a ponte de dissulfeto está presente entre as posições 2 e 7. (adaptado de ADEGHATE, 2011).

O Pramlintide apresentou bons resultados, mostrando ações sinérgicas com a insulina. A administração de 30 µg por refeição de Pramlintide por via subcutânea reduziu significativamente os valores de hemoglobina glicada (A1c), a dose diária requerida de insulina e o peso corporal. Essa perda de peso corporal também mostrou-se possível em pacientes obesos com e sem diabetes, só que moderada. Testes realizados em um pequeno grupo de adolescentes com Diabetes Tipo 1, utilizando a co-administração de Pramlintide

com insulina reduziu significativamente a hiperglicemia pós - prandial, ocorrendo o mesmo com o nível de glucagon quando comparado com a monoterapia com a insulina (ADEGHATE, 2011).

Apesar do grande avanço surgido com o Pramlintide, efeitos colaterais como náusea, vômito e anorexia foram relatados na terapia com o mesmo, devido a uma possível excitação da área postrema na medula oblonga (ADEGHATE, 2011). Além disso, o uso de Pramlintide tem sido associado ao alto risco de hipoglicemia causada pela insulina, especialmente em pacientes diabéticos Tipo I (HOLLANDER *et al.*, 2004; WHITEHOUSE *et al.*, 2002; RATNER *et al.*, 2004; EDELMAN, 2008). A administração do Pramlintide é feita por via subcutânea, com biodisponibilidade de 30 a 40%, antes das refeições, as doses que variam de 30 a 120 μg e, independente da concentração, o C_{max} é alcançada com 20 minutos após a administração (EDELMAN, 2008), o tempo de meia-vida para o Pramlintide em humanos é de cerca de 20 a 45 minutos (YOUNG, 2005a). Assim, a administração do Pramlintide mimetiza apenas o nível de amilina pós-prandial, deixando o indivíduo diabético propenso a possíveis problemas causados por níveis basais alterados ou ausência de amilina. Diante disso, faz-se necessário o desenvolvimento de outras vias de administração, que retarde a liberação do fármaco e de novas terapêuticas permitindo um avanço no controle de patologias como Diabetes e obesidade.

1.3 PEGUILAÇÃO

Com a descoberta de novas proteínas e peptídeos, o melhor entendimento da ação dos mesmos *in vivo*, a melhoria na síntese e expressão de análogos de peptídeos e proteínas humanas, e o avanço na tecnologia de sistemas de liberação de polipeptídeos *in vivo*, nos últimos anos, tem ocorrido um aumento no uso de peptídeos e proteínas como estratégias terapêuticas (ROBERTS, BENTLEY e HARRIS, 2002). Mas apesar desse aumento, o uso de peptídeos e proteínas na terapêutica apresentam problemas típicos tais como, degradação proteolítica, rápida eliminação pelos rins, meia-vida de circulação curta, baixa solubilidade e imunogenicidade (DA SILVA FREITAS e ABRAHÃO-NETO, 2010; ROBERTS, BENTLEY e HARRIS, 2002). Devido a esses problemas, formas de melhorar as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas dos medicamentos a base de proteínas ou peptídeos

foram desenvolvidas, entre elas estão: conjugação de proteínas e peptídeos com polímeros naturais ou sintéticos, com proteínas do soro e com imunoglobulina; incorporação de proteínas e peptídeos em sistemas de liberação para a proteção e liberação controlada dos mesmos; e como forma de diminuir a clivagem proteolítica e a imunogenicidade, passou-se a manipular a sequência de aminoácidos (ROBERTS, BENTLEY e HARRIS, 2002).

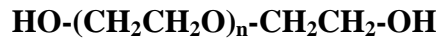
1.3.1 Definição

Pegulação é definida como um método de modificação de peptídeos, proteínas ou moléculas não peptídicas através da ligação de uma ou mais cadeias de polietilenoglicol (PEG), que tem sido usado como uma estratégia para melhorar as propriedades bioquímicas das proteínas e suas estabilidades físicas e térmicas (DA SILVA FREITAS e ABRAHÃO-NETO, 2010; VERONESE e PASUT, 2005). O uso da pegulação para modificar peptídeos e proteínas começou a receber atenção em 1977, quando Abuchowski *et al.* descobriram que a catalase de fígado bovino pegulada não apresentava-se antigênica e nem imunogênica, aumentou significativamente a meia-vida de circulação *in vivo* e continuou a apresentar atividade enzimática (WU, PENG e SHEK, 2010). O ocorrido caracterizou-se como um marco importante, pois naquela época não era possível modificar uma enzima extensivamente e ao mesmo tempo manter a sua atividade. Apenas modificações suaves com produtos de baixa massa molar eram realizadas, pois as proteínas eram consideradas muito delicadas. Atualmente, a pegulação apresenta-se como uma importante estratégia na liberação de fármacos, aumentando o potencial de proteínas e peptídeos como agentes terapêuticos (VERONESE e PASUT, 2005).

1.3.2 Polietilenoglicol

Na sua forma mais comum, o polietilenoglicol (PEG), apresenta-se como um poliéter de cadeia linear ou ramificada com terminal contendo grupos hidroxila, neutro e apresenta pouca reatividade, a menos que modificado com grupos funcionais (ROBERTS, BENTLEY e

HARRIS, 2002; FEE e VAN ALSTINE, 2006). O PEG apresenta a seguinte estrutura geral (ROBERTS, BENTLEY e HARRIS, 2002):



O PEG apresenta polidispersidade (M_w/M_n) entre 1,01, para PEGs com massa molar menor que 5 kDa, e 1,1 para os PEGs com massa molar maior que 50 kDa. É solúvel tanto em solventes orgânicos como em soluções aquosas, assim, pode ser usado para conjugação química com moléculas biológicas em condições fisiológicas. Em relação a sua toxicidade, sabe-se que, *in vivo*, a álcool desidrogenase degrada oligômeros com massa molar de PEG menor que 400 Da em metabólitos tóxicos, já quando possuem massa molar superior a 1000 Da, os PEGs não são tóxicos aos humanos (ROBERTS, BENTLEY e HARRIS, 2002).

O PEG possui cadeia principal muito flexível, e em solução, liga-se tipicamente com 2 a 3 moléculas de água por unidade de óxido de etileno. Devido a esses fatores, a molécula de PEG age como se fosse de 5 a 10 vezes tão grande quanto uma proteína solúvel com uma massa molar comparável. Essas características do PEG são consideradas como o motivo pelo qual o PEG consegue prevenir degradação por enzimas e células de mamíferos, precipitar proteínas e reduzir antigenicidade e imunogenicidade (ROBERTS, BENTLEY e HARRIS, 2002).

Mesmo possuindo massa molar elevada o PEG apresenta-se fracamente imunogênico. Nas administrações clínicas 'normais' de uma proteína peguilada, não existem relatos em que anticorpos anti-PEG tenham sido produzidos. A eliminação *in vivo* do PEG ocorre de forma rápida, sem mudança estrutural e é depende da massa molar do mesmo. Quando o PEG possui massa molar menor que cerca de 20 kDa o mesmo é eliminado pela urina, e quando possui massa molar mais elevada é eliminado mais lentamente pela urina e pelas fezes. (ROBERTS, BENTLEY e HARRIS, 2002).

Devido às características do PEG ele pode ser usado como catalisador de reações, e por ter sido aprovado para uso humano pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e por outras Autoridades Reguladoras, também pode ser usado como lubrificante ou veículo não tóxico e não imunogênico em formulações farmacêuticas, agente de entrega de fármacos, como biofármaco e como agente diagnóstico (FEE e VAN ALSTINE, 2006; CHENG *et al.*, 2012; VERONESE e PASUT, 2005). O polímero pode ser preparado com relativamente

controlada massa molar média e modificado com vários grupos funcionais (FEE e VAN ALSTINE, 2006).

1.3.3 Efeitos da peguilação

Os benefícios de se derivatizar uma molécula usando o método de peguilação são os seguintes (Figura 4) (CHENG *et al.*, 2012; FEE e VAN ALSTINE, 2006; DA SILVA FREITAS e ABRAHÃO-NETO, 2010; BAILON *et al.*, 2001; ROBERTS, BENTLEY e HARRIS, 2002):

- redução de imunogenicidade e antigenicidade;
- minimização de clivagem proteolítica e outros tipos de degradações;
- aumento da meia-vida plasmática;
- redução da toxicidade sistêmica;
- melhora da solubilidade;
- melhora da estabilidade térmica e física;
- redução da eliminação renal; e
- alteração da biodistribuição.

Através dos benefícios mencionados acima, melhora-se assim, a biodisponibilidade, estabilidade, segurança e eficácia de agentes terapêuticos, e diminui-se a sua frequência de administração, melhorando a adesão do paciente e a qualidade de vida. (CHENG *et al.*, 2012).

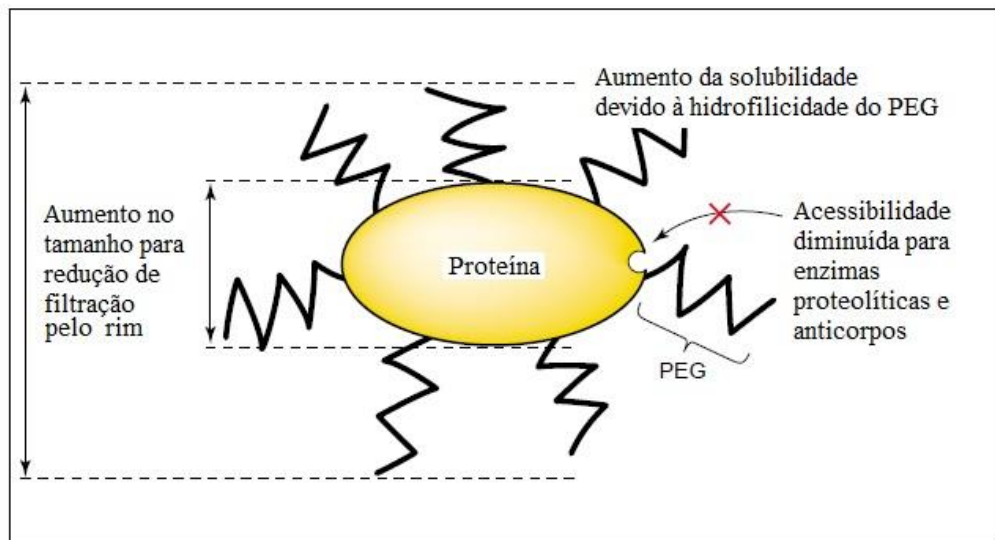


Figura 4: Principais benefícios da peguilação. A figura representa um conjugado proteína-PEG. O PEG protege a superfície da proteína de agentes de degradação por meio de impedimento estérico. Além disso, o PEG diminui a eliminação renal da proteína pelo aumento de tamanho e aumenta solubilidade da mesma (adaptado de (VERONESE e PASUT, 2005)).

Alguns exemplos práticos dos benefícios do uso de peguilação são (CHENG *et al.*, 2012):

- a redução significativa da cardiotoxicidade, mielossupressão, vômitos e alopecia com eficácia comparável da doxorubicina lipossomal peguilada (Doxil), à doxorubicina, para o tratamento clínico de carcinoma de ovário e de mama e de sarcoma de Kaposi;
- eficácia antitumoral melhorada e reduzida toxicidade sistêmica de diversas formulações de micelas poliméricas (paclitaxel (Genexol) e cisplatina);
- melhora da biocompatibilidade, redução da captação mediada por receptor pelo sistema retículo-endotelial, e influência nas propriedades de contraste de imagem com a peguilação de nanopartículas, tais como o óxido de ferro superparamagnético e agentes de contraste de ultra-som;
- prolongação da circulação e aumento da solubilidade em água de moléculas pequenas tais como camptotecina e paclitaxel com o uso da peguilação.

Apesar dos benefícios mencionados acima pode acontecer da ligação covalente do PEG à proteína levar a uma perda substancial da atividade biológica funcional da mesma, que pode ser devido à presença da porção de PEG perto ou no sítio ativo ou sítio regulador da

proteína. A perda de atividade biológica funcional é um problema grave principalmente para proteínas que atuam sobre substratos macromoleculares e para muitas proteínas que ligam receptor, como por exemplo, citocinas e quimiocinas. Para evitar essa perda de atividade, estratégias têm sido exploradas, tais como, o uso de peguilação que seja reversível, a peguilação de sítios específicos, e o uso de protetores no sítio de ligação com o receptor da proteína durante a reação de peguilação (DA SILVA FREITAS e ABRAHÃO-NETO, 2010).

Os fatores que contribuem e definem as propriedades que o PEG vai conferir à molécula a que está ligada são (ROBERTS, BENTLEY e HARRIS, 2002):

- o local na molécula em que vai ocorrer a peguilação;
- o número de cadeias de PEG que vão ligar-se à molécula,
- a química usada para ligar o PEG à molécula;
- a massa molar do PEG; e
- a estrutura das cadeias de PEG que vão ligar-se à molécula.

1.3.4 Química da peguilação

Para ocorrer uma reação de peguilação é necessário que o PEG utilizado seja reativo com algum grupo funcional presente na molécula que se deseja peguilar. Para que o PEG seja reativo é necessário preparar um derivado a partir da forma mais comum do PEG, que possua um grupo funcional em um ou em ambos os terminais do PEG. A escolha do grupo funcional vai depender do tipo de grupo reativo presente na molécula que se deseja peguilar. No caso da peguilação de uma proteína, os aminoácidos tipicamente presentes que são reativos incluem o ácido aspártico, ácido glutâmico, arginina, cisteína, histidina, lisina, serina, tirosina, treonina, o grupo amino N-terminal e ácido carboxílico C-terminal. Já no caso de glicoproteínas, grupos hidroxilas vicinais podem ser oxidados com periodato para formar dois grupamentos de formil reativos (ROBERTS, BENTLEY e HARRIS, 2002).

Um dos grupos-alvo mais comuns para acoplar-se ao PEG é o grupo amino de resíduos de lisina e de N-terminal, em que o acoplamento ocorre por meio de reação de alquilação ou acilação. As lisinas representam cerca de 10% dos aminoácidos de uma proteína típica, assim a maioria das proteínas, incluindo anticorpos possuem vários resíduos de lisina

de superfície disponíveis (FEE e VAN ALSTINE, 2006). Para reagir o PEG com outros sítios reativos podem ser usadas diversas reações químicas específicas ou métodos enzimáticos existentes (VERONESE e PASUT, 2005).

Existem dois tipos de derivados de PEG para a realização da reação de peguilação, o PEG de primeira geração caracterizado pelo uso de PEG linear com massa molar menor ou igual a 12 kDa, e o PEG de segunda geração. As reações com PEG de primeira geração podem resultar em formação de muitos subprodutos ou ligações fracas na conjugação com o PEG. Assim, o PEG de segunda geração foi projetado para evitar os problemas das reações com PEG de primeira geração, incluindo a restrição apenas ao uso de PEG de baixa massa molar, muita produção de impurezas reacionais de PEG, falta de seletividade nas modificações químicas e ligações instáveis entre o PEG e a molécula a ele acoplada (ROBERTS, BENTLEY e HARRIS, 2002).

1.3.5 Mercado farmacêutico de medicamentos peguilados

A adenosina-desaminase peguilada (Adagen®), utilizada para tratar a síndrome da imunodeficiência combinada severa, e a L-asparaginase peguilada (Oncaspar®) desenvolvidas pela Enzon, Inc., Piscataway, NJ, no início da década de 1990 foram os primeiros produtos modificados proteicos aprovados por Autoridades Reguladoras. Com a aprovação desses medicamentos todas as classes emergentes da terapêutica com polímeros começaram a ter credibilidade e muitas proteínas e outras substâncias têm sido peguiladas para uso como produtos farmacêuticos, catalisadores de reação e agentes de entrega de fármaco (PEGylated protein drugs, 2009; FEE e VAN ALSTINE, 2006). Após essas primeiras aprovações, houve o uso de peguilação na produção de medicamentos como Neulasta® (fator de estimulação de colônias de granulócitos) utilizado como um adjuvante para reparar os efeitos da neutropenia induzida por quimioterapia, e dos medicamentos PEG-Intron® e Pegasys® (interferons) usados para tratar a hepatite C. A aprovação por Autoridades Reguladoras dos medicamentos peguilados Macugen® (aptâmero) como um tratamento para degeneração macular relacionada com a idade, do Cimzia® (fragmento Fab' de um anticorpo contra o fator de necrose tumoral alfa (TNF α)) para o tratamento da doença de Crohn (PEGylated protein drugs, 2009), do Somavert® (antagonista do receptor da

hormônio do crescimento humano) para acromegalia, demonstra uma tendência para o uso de conjugados peguilados no tratamento de doenças crônicas. Outros medicamentos também foram aprovados como o PEG-eritropoietina (EPO) para anemia, e o PEG-hirudina para trombose (CHENG *et al.*, 2012). Estes novos medicamentos alcançaram maior conveniência ao paciente, significativos benefícios terapêuticos, e considerável sucesso econômico, mas, é importante mencionar também que, os mesmos não apresentam apenas vantagens terapêuticas e de formulação, apresentam também potencial para serem rentáveis e até mesmo reduzirem custos (PEGylated protein drugs, 2009).

Em virtude dos problemas mencionados acima, em relação ao Diabetes, sua correlação com a amilina, os métodos de tratamento existentes, os problemas relacionados ao uso da amilina e de seu análogo Pramlintide no tratamento do Diabetes, nosso grupo de pesquisa decidiu explorar novas possibilidades de tratamento utilizando a amilina e seus análogos. Para isso, no presente trabalho o Professor Luís Maurício Lima, eu e o doutorando Luiz Henrique Guerreiro, planejamos sintetizar bioconjugados de amilina murina, empregando o método de peguilação para a derivatização química de amilina murina, com o intuito de aumentar sua estabilidade, prolongar seu tempo de meia-vida e assim o período de ação, para tentar mimetizar níveis basais de amilina e possivelmente melhorar, assim o tratamento do Diabetes. A amilina murina foi escolhida, pois conforme mencionado anteriormente, a mesma é solúvel em meio aquoso, é bioativa, tem menor tendência na formação de agregados amilóides, e foi baseada na sequência da mesma que o análogo comercial da amilina humana, o Pramlintide, foi desenvolvido. Esclarece-se que todos os experimentos, excluindo-se as reações de derivatização com o derivado aldeído de polietilenoglicol, as análises por Espectrometria de Massas e a Digestão por tripsina dos produtos peguilados, foram feitos em uma parceria entre eu e o aluno de doutorado Luiz Henrique Guerreiro. O ensaio de Digestão por tripsina dos produtos peguilados foi realizado por Marcela da Silva Rosa e Daniela Lourenço (DIMAV-INMETRO). Já as análises de espectrometria de massas foram realizadas por Eduardo R. dos Santos (CEMBIO-IBCCF-UFRJ).

2 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral do presente trabalho é planejar, sintetizar, purificar e realizar avaliação química, físico-química e funcional de bioconjugados de amilina com polietilenoglicol.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- Modificar quimicamente a amilina murina por conjugação com metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato de massas molares médias de 5 kDa, 2 kDa e 1 kDa (Figura 5B);
- Modificar quimicamente a amilina murina por conjugação com metoxil polietilenoglicol propionaldeído de massa molar média de 5 kDa (Figura 5A);
- Purificar e caracterizar os produtos obtidos;
- Avaliar funcionalmente os produtos obtidos;
- Avaliar farmacologicamente os produtos obtidos.

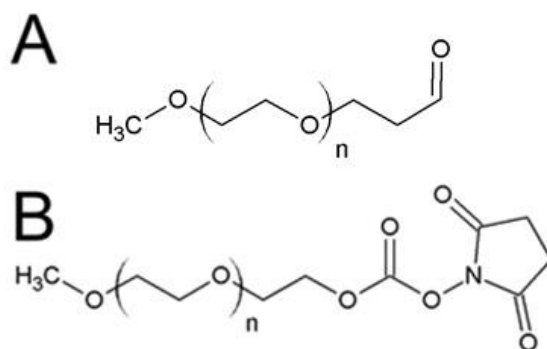


Figura 5: Estruturas químicas dos agentes metoxil polietilenoglicol propionaldeído e metoxil polietilenoglicol succinimidil. **A)** Representação química do metoxil polietilenoglicol propionaldeído. **B)** Representação química do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Reagentes e solventes

- Amilina murina (CAS 122384-88-7; massa molar de 3.920 Da). Fabricante GenScript, número de catálogo RP11280, lotes 55613-1, 40214-1 e 128567001040611LQ;
- Metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato de massas molares médias de 5 kDa (mPEG5kDa-SC), 2 kDa (mPEG2kDa-SC) e 1 kDa (mPEG1kDa-SC). Fabricante Nanocs (EUA);
- Metoxil polietilenoglicol propionaldeído de massa molar média de 5 kDa (mPEG5kDa-Ald). Fabricante Nanocs (EUA);
- Fluorescamina (CAS 38183-12-9). Fabricante Sigma-Aldrich (Brasil);
- DMSO. Fabricante Vetec (Brasil);
- Ciano borohidreto de sódio 95%. Fabricante Sigma-Aldrich (Brasil);
- Água destilada foi deionizada a menos que 1.0 μS e filtrada antes do uso através de uma membrana com poro de 0.22 μm em um sistema de purificação de água Milipore-Academic;
- Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico;
- Todos os tampões e soluções foram preparados imediatamente antes do uso.

3.1.2 Equipamentos e outros materiais

- Espectrofluorímetro Jasco, modelo FP-6300 (Jasco Inc, EUA);
- HPLC Jasco LC-2000 (Jasco Inc, EUA);
- Coluna cromatográfica Kromasil® C18 (250 x 10 mm, 5 μm de tamanho de partícula);
- Espectrômetro de massa Autoflex Speed (Bruker, EUA);
- Glicosímetro Accu-Chek® Active, Roche Diagnostics, Alemanha, Número de série GN08146937;
- Agulha padrão 29 gauge (BD™) para seringa.

- SpeedVac Christ® RVC 2-25 CD Plus;
- Leitor de placas Spectra MAX M5, Molecular Devices;
- Sistema de gel SDS PAGE Bio-RAD (EUA), modelo Mini Protean® 3 Cell, número de série 525BR 078403, acoplado a fonte de corrente contínua PWSys PW300;
- Centrífuga de eppendorf, Microd – Fisher Scientific;
- Balança AY220 Shimadzu;
- Agitador de tubos AP56 – Phoenix;
- pHmetro modelo PHS – 3B, Labmeter, modelo PH2.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Reações de derivados de polietilenoglicol com amilina murina

3.2.1.1 Reação do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 5 kDa (mPEG5kDa-SC) com amilina murina em DMSO

Uma mistura de 0,5 mg de amilina murina (50 µl de solução de amilina a 10mg/ml em DMSO) e 6,41 mg de mPEG5kDa-SC (25 µl de solução de 18,8 mg de PEG em 50 µl de DMSO) em 25 µl de DMSO, resultando em 100 µl de mistura reacional com a razão molar de 10 de PEG para 1 de milina, foi deixada em temperatura ambiente por 24 horas (Figura 6). Nos pontos de 1min, 30 min, 1 h, 2 h, 4h, 5h e 24h foram coletados 10 µl de mistura reacional em cada ponto e adicionado a 20 µl de tampão de amostra 4X concentrado (0,125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0,2M DTT, 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8) para ser usado em análise com SDS-PAGE e 2µl em cada ponto e adicionado a 200 µl de fluorescamina (5mg/ml em DMSO) para ser usado em análise com fluorescamina. Para finalizar a reação foi adicionado 20µl de solução de lisina 50mM.

3.2.1.2 Reação do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 2 kDa (PEG1-0002) com amilina murina em DMSO

Uma mistura de 0,5 mg de amilina murina (50 µl de solução de amilina a 10mg/ml em DMSO) e 2,56 mg de mPEG2kDa-SC (6,8 µl de solução de 18,8 mg de PEG em 50 µl de DMSO) em 43,2 µl de DMSO, resultando em 100 µl de mistura reacional com a razão molar de 10 de PEG para 1 de milina, foi deixada em temperatura ambiente por 24 horas (Figura 6). Nos pontos de 1min, 30 min, 1 h, 2 h, 4h, 6h e 24h foram coletados 10 µl de mistura reacional em cada ponto e adicionado a 20 µl de tampão de amostra 4X concentrado (0,125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0,2M DTT, 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8) para ser usado em análise com SDS-PAGE e 2µl em cada ponto e adicionado a 200 µl de fluorescamina (5mg/ml em DMSO) para ser usado em análise com fluorescamina. Para finalizar a reação foi adicionado 20µl de solução de lisina 50mM.

3.2.1.3 Reação do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 1 kDa (mPEG1kDa-SC) com amilina murina em DMSO

Uma mistura de 0,5 mg de amilina murina (50 µl de solução de amilina a 10mg/ml em DMSO) e 1,28 mg de mPEG1kDa-SC (3,4 µl de solução de 18,8 mg de PEG em 50 µl de DMSO) em 46,6 µl de DMSO, resultando em 100 µl de mistura reacional com a razão molar de 10 de PEG para 1 de milina, foi deixada em temperatura ambiente por 24 horas (Figura 6). Nos pontos de 1min, 30 min, 1 h, 2 h, 4h, 6h e 24h foram coletados 10 µl de mistura reacional em cada ponto e adicionado a 20 µl de tampão de amostra 4X concentrado (0,125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0,2M DTT, 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8) para ser usado em análise com SDS-PAGE e 2µl em cada ponto e adicionado a 200 µl de fluorescamina (5mg/ml em DMSO) para ser usado em análise com fluorescamina. Para finalizar a reação foi adicionado 20µl de solução de lisina 50mM.



Figura 6: Esquema reacional entre metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato e amina primária.

3.2.1.4 Reação do metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) com amilina murina em NaH_2PO_4 0,1M (pH 5,0)

À uma mistura de 1 mg de amilina murina (100 μl de solução de amilina a 10mg/ml em água) e 12,82 mg de mPEG5kDa-Ald (que foram pesados em balança analítica) em 96,2 μl de NaH_2PO_4 0,1M (pH 5,0) foi adicionado após 10 minutos de reação 3,84 μl de solução do redutor ciano borohidreto de sódio 1M, resultando em 200 μl de mistura reacional com a razão molar de 10 de PEG para 1 de milina. A mistura foi deixada reagindo a 4°C por 23 horas (Figura 7) e nos pontos de 1min, 30 min, 1 h, 2 h, 4h e 23h foram coletados 20 μl de mistura reacional em cada ponto e adicionado a 10 μl de tampão de amostra 4X concentrado (0,125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0,2M DTT, 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8) para serem usados em análise com SDS-PAGE e 2 μl em cada ponto e adicionado a 200 μl de fluorescamina (5mg/ml em DMSO) para serem usados em análise com fluorescamina. Para finalizar a reação foi adicionado 2 μ de metanol. A adição do redutor ciano só ocorreu após 10 minutos, para que a reação de condensação entre a amina e o PEG pudesse ocorrer, e formar a imina, que é reduzida posteriormente pelo redutor ciano borohidreto de sódio.

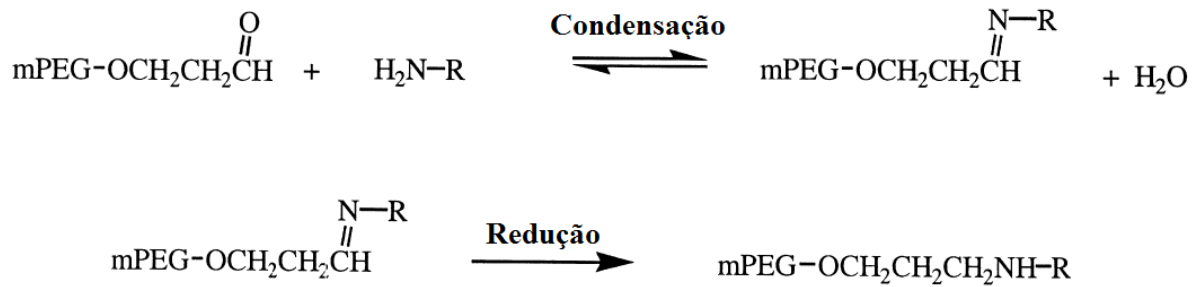


Figura 7: Esquema da reação de aminação redutiva usando PEG-propionaldeído. (adaptado de ROBERTS, BENTLEY E HARRIS, 2002)

3.2.2 Análises das reações de peguilação por eletroforese

As análises de eletroforese de todas as reações foram feitas em gel SDS-PAGE de 22,5% (LAEMMLI, 1970) em sistema de eletroforese Bio-RAD (EUA), modelo Mini Protean® 3 Cell, usando albumina de soro bovino (66 kDa), lisozima (14 kDa) e cadeia B da insulina (3,4 kDa) como marcadores de massa molar. As corridas foram realizadas em 30mA por gel. Os géis foram corados com solução corante (Coomassie brilliant blue 0,025%, ácido acético 7% e metanol 40%) *overnight*, e descorados primeiro, 30 min com a solução descorante i) metanol 40% e ácido acético 7% e depois descorados até o ponto desejado com a solução ii) 5% de metanol e 7% de ácido acético, e foram digitalizados. Alguns géis foram ainda corados com solução de iodo 0,025 M. Para corar com iodo, logo após descorar o gel do Coomassie, este foi colocado em uma solução de cloreto de bário 5% por 15 minutos, depois em água destilada por 30 minutos, em seguida em solução de iodo 0,025 M (0,05N) por 15 minutos. Após isso foi descorado com água e digitalizado. Após digitalizados os géis foram analisados por integração usando o programa ImageJ (SCHNEIDER, RASBAND e ELICEIRI, 2012) em modo transmitância da imagem invertida, e os picos sofreram ajuste de curva e integração usando o programa Fityk (WOJDYR, 2010), assumindo – se funções Gaussianas para cada pico.

3.2.3 Análise cinética das reações de peguilação por quantificação de aminas remanescente por derivatização química com fluorescamina

A cinética das reações de peguilação foi acompanhada por meio de derivatização das aminas primárias remanescentes na amilina com fluorescamina (4'-fenilespiro[2-benzofuran-3,2'-furan]-1,3'-diona) gerando um produto fluorescente (UDENFRIEND *et al.*, 1972). A análise foi feita coletando – se alíquotas de 2 µl em intervalos de tempo estabelecidos durante a realização de cada reação, e misturando a 200 µl de solução de fluorescamina (0,5 mg/ml em DMSO) e a 200 µl de tampão PBS (pH 7.4). As amostras foram então analisadas em um espectrofluorímetro Jasco modelo FP-6300 (Jasco Inc, EUA). Os parâmetros das análises foram os seguintes: o modo de medida foi emissão, comprimento de banda de excitação foi de 5nm, comprimento de banda de emissão foi de 5nm, resposta média, a sensibilidade alta, número de ciclo 1, excitação em 390 nm, emissão de 380 a 550 nm, resolução 0,5 nm e velocidade de varredura de 200 nm/min.

3.2.4 Purificação dos produtos das reações de peguilação

3.2.4.1 Purificação dos produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 5 kDa (mPEG5kDa-SC) em DMSO

Para realizar a purificação da reação com mPEG5kDa-SC, foi feita uma nova reação. Assim, uma mistura de 0,5 mg de amilina murina (50 µl de solução de amilina a 10mg/ml em DMSO) e 6,41 mg de mPEG5kDa-SC (25 µl de solução de 18,8 mg de PEG em 50 µl de DMSO) em 25 µl de DMSO, resultando em 100 µl de mistura reacional com a razão molar de 10 de PEG para 1 de amilina, foi deixada em temperatura ambiente por 4 horas. Para finalizar a reação foi adicionado 20 µl de solução de lisina 50mM em água. Depois, na solução de 120 µl da reação foi adicionado 100 µl de fase móvel (0,1% TFA em água). Essa solução foi então injetada no sistema cromatográfico Jasco LC-2000 (Jasco Inc, EUA) com coluna cromatográfica Kromasil® C18 (250 x 10 mm, 5 µm de tamanho de partícula). Os parâmetros cromatográficos utilizados foram: a fase móvel A foi 0,1% TFA em água, a fase móvel B foi 0,1% TFA em acetonitrila, vazão de 4 ml/min, pressão máxima de 30 Mpa, pressão mínima de

0 Mpa, gradiente linear de solvente B em solvente A de 40% a 100% de 5 a 20.05 minutos, absorvência em 220 nm. Depois de coletadas, as amostras foram concentradas em sistema SpeedVacChrist® RVC 2-25 CD Plus, foram suspensas em 200 µl de água mili-Q e foram unidas baseado em análise do cromatograma resultante da purificação, formando assim 4 conjuntos de amostras (Pools). Essas foram concentradas novamente no sistema SpeedVac e ressuspensas em 50 µl de água mili-Q.

3.2.4.2 Purificação dos produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) em NaH₂PO₄ 0,1M (pH 5,0)

Para realizar a purificação da reação com mPEG5kDa-Ald, foi feita uma nova reação. Assim, à uma mistura de 1 mg de amilina murina (100 µl de solução de amilina a 10mg/ml em água) e 12,82 mg de mPEG5kDa-Ald em 96,2 µl de NaH₂PO₄ 0,1M (pH 5,0) foi adicionado após 10 minutos de reação 3,84 µl de solução de ciano borohidreto de sódio 1M., e foi deixada reagindo a 4°C por 2 horas. Para finalizar a reação foi adicionado 4 µl de metanol. Depois, na solução de 204 µl da reação foi adicionado 50µl de fase móvel (0,1% TFA em água). Essa solução foi então injetada no sistema cromatográfico Jasco LC-2000 (Jasco Inc, EUA) com coluna cromatográfica Kromasil® C18 (250 x 10 mm, 5 µm de tamanho de partícula). Os parâmetros cromatográficos utilizados foram: a fase móvel A foi 0,1% TFA em água, a fase móvel B foi 0,1% TFA em acetonitrila, vazão de 4 ml/min, gradiente linear de solvente B em solvente A de 40% a 100% de 5 a 20 minutos, absorvência em 220 nm. Depois de coletadas, as amostras foram concentradas em sistema SpeedVac Christ® RVC 2-25 CD Plus, foram suspensas em 200 µl de água mili-Q e foram unidas baseado em análise do cromatograma resultante da purificação, formando assim 5 conjuntos de amostras (Pools). Essas foram concentradas novamente no sistema SpeedVac e ressuspensas em 50 µl de água mili-Q.

3.2.5 Análises de eletroforese das purificações das reações de peguilação

As análises de eletroforese de todas as purificações das reações foram feitas em gel SDS-PAGE de 22,5% (LAEMMLI, 1970) em sistema de eletroforese Bio-RAD (EUA), modelo Mini Protean® 3 Cell, usando albumina de soro bovino (66 kDa), lisozima (14 kDa) e cadeia B da insulina (3,4 kDa) como marcadores de massa molar e 10 µl de cada amostra purificada. As análises foram realizadas conforme descrito no item 3.2.2.

3.2.6 Análises por espectrometria de massas das amostras purificadas

Algumas amostras purificadas foram escolhidas a partir da análise dos cromatogramas de purificação e foi realizada análise de Espectrometria de Massa por Dessorção-Ionização a Laser em matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-ToF-MS). A espectrometria foi realizada em um espectrômetro Autoflex Speed (Bruker, EUA) em modo linear, positivo, usando-se ácido sinápico 10 mg/mL em ácido trifluoroacético 0.1 % como matriz. As amostras foram misturadas com volumes iguais de acetonitrila 50 % em água contendo ácido trifluoroacético 0.1 % e ácido sinápico 10 mg/mL. A análise de dados foi realizada com mMass (STROHALM *et al.*, 2008). As medidas de MALDI-ToF-MS foram realizadas no CENBIO-UFRJ.

3.2.7 Digestão por tripsina dos produtos peguilados

O produto amilina dipeguilada sofreu digestão por tripsina (Promega, Brasil) de acordo com protocolo do fabricante. Em resumo, a amilina dipeguilada foi incubada com tripsina (1:100, p/p), durante uma noite, a 37 °C, em NH₄HCO₃ a 50 mM, pH 8.5, e o produto de digestão foi liofilizado e submetido a análise de espectrometria de massa MALDI-TOF, conforme descrito acima. Esses ensaios foram realizados pela equipe técnica do Laboratório de Biotecnologia do INMETRO/Xerém.

3.2.8 Dosagem das amilinas peguiladas pelo método de Bradford

O método escolhido para a quantificação das amostras de amilina peguilada purificadas resultantes da reação de amilina murina com mPEG5kDa-SC foi o método de Bradford (BRADFORD, 1976), pois é um método muito utilizado na quantificação de proteínas e peptídeos. 10 µl de cada amostra purificada foi adicionado em poços com 200 µl de reagente de Bradford (100 mg de Coomassie brilliant blue G-250, 50 ml de etanol 95%, 100 ml de ácido fosfórico 85%, água miliQ q.s.p. 1L) de uma placa com 96 poços e as amostras foram analisadas em um leitor de placas Spectra MAX M5 (Molecular Devices), em um comprimento de onda de 595 nm. Amostras com diferentes concentrações de amilina murina livre foram usadas para fazer a curva de calibração e obter a linearidade do método. A especificidade desta metodologia foi verificada analisando – se amostras de mPEG5kDa-SC inativado com lisina.

3.2.9 Avaliação farmacológica das amilinas peguiladas

A avaliação farmacológica foi realizada como descrito em GUERREIRO *et al.*, 2012 e PANAGIOTIDIS *et al.*, 1992. Camundongos machos suíços (23 g ± 2 g) foram divididos em 4 grupos: controle (n = 3), amilina não modificada (n = 3), produto monopeguilado da reação com mPEG5kDa-SC (n = 3), produto dipeguilado da reação com mPEG5kDa-SC (n = 3). Os animais foram alojados em uma sala de temperatura controlada de 22 ± 2 °C, com ciclo luz-escuro de 12 h e tiveram livre acesso à água e ração, a qual foi suspensa 4 h antes do início do experimento. O grupo controle recebeu 100 µL de salina (0,9% NaCl), o grupo amilina não modificada recebeu 5 µg de amilina murina não modificada em salina q.s.p. 100 µL, e os grupos amilinas peguiladas receberam cada 5 µg da amilina peguilada que se queria avaliar em salina q.s.p. 100 µL, que foram injetados por via subcutânea, usando uma agulha padrão 29 gauge (BD™). As concentrações de glicose foram monitoradas seguindo as recomendações do Mouse Metabolic Phenotyping Center (MMPC) Consortium do National Institutes of Health (NIH) (AYALA *et al.*, 2010). Amostras de sangue foram coletadas da ponta da cauda dos camundongos a partir de 1 hora após a administração da substância a ser analisada e em intervalos repetidos, e os níveis de glicose foram medidos através de um

glicosímetro (Accu-Chek® Active, Roche Diagnostics, Germany; Serial No GN08146937). Este protocolo foi aprovado pela comissão de bioética em experimentação e cuidado animal do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - UFRJ.

3.2.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o teste de t de *student* usando o programa SigmaStat implementada no programa SigmaPlot 11 (Systat Software Inc). A significância das diferenças nas avaliações farmacológicas foi calculada e valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE CINÉTICA DAS REAÇÕES DE PEGUILAÇÃO POR QUANTIFICAÇÃO DE AMINAS REMANESCENTES POR DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA COM FLUORESCAMINA

Para conseguir conjugar o polietilenoglicol na amilina, o objetivo foi que o PEG escolhido reagisse com o grupo amino localizado na lisina (primeiro resíduo de aminoácido da amilina – FIGURA 2). Assim, a técnica utilizada para acompanhar a cinética da reação foi a derivatização com fluorescamina, pelo acompanhamento do decaimento da fluorescamina fluorescente, cuja concentração é proporcional à quantidade de grupos amino reativos remanescentes na amilina. A fluorescamina reage com as amins primárias remanescentes de peptídeos gerando produtos fluorescentes, que são assim detectados por espectralfluorimetria.

Comparando as reações realizadas em meio orgânico (DMSO) com as derivatizações de PEG com mesmo grupo funcional succinimidil carbonato, mas com massas molares diferentes, pode ser notado pela Figura 8 que as reações de peguilação da amilina com os mPEG5kDa-SC (massa molar média de 5kDa) e mPEG2kDa-SC (massa molar média de 2kDa) mostraram evolução similar, com cerca de 60% dos grupos amino derivatizáveis por fluorescamina sendo consumidos dentro de 2 horas de reação, e apresentaram uma etapa de reação lenta, em que foram consumidos cerca de 95% dentro de 24 horas. Já na reação de peguilação da amilina com o mPEG1kDa-SC (massa molar média de 1kDa) houve uma menor evolução no consumo dos grupos amino derivatizáveis por fluorescamina, como pode ser notado pela disponibilidade de grupos aminos não reagidos.

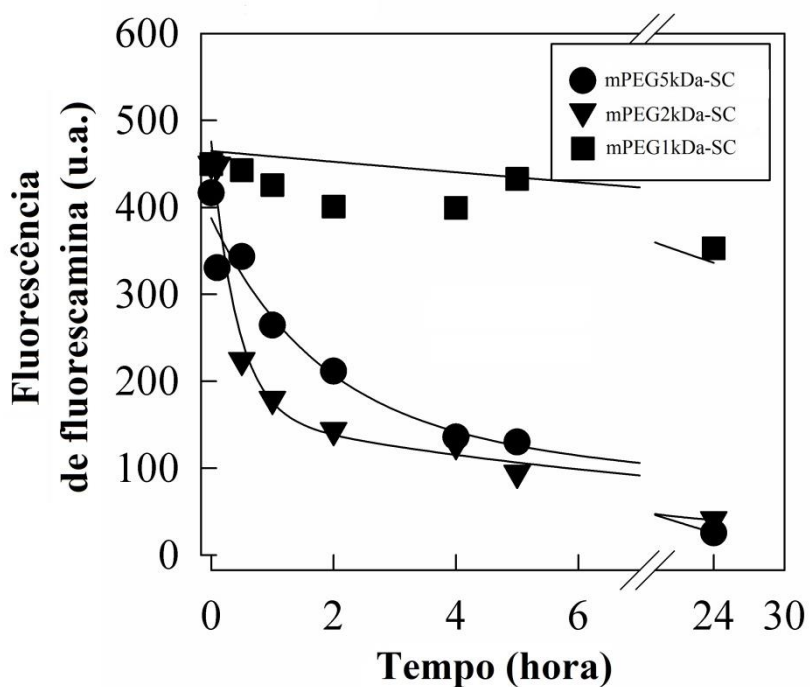


Figura 8: Cinética das reações de peguilação da amilina com os mPEG5kDa-SC, mPEG2kDa-SC e mPEG1kDa-SC. Reações realizadas em DMSO a 25 °C, na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). A cinética foi acompanhada pelo decaimento do produto fluorescente originado pela reação da fluorescamina com grupos amino da amilina. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

Em relação a reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald (massa molar média de 5kDa) pode ser notado pela Figura 9 que também houve uma evolução lenta no consumo dos grupos amino derivatizáveis por fluorescamina, como pode ser notado pela disponibilidade de grupos aminos não reagidos mesmo em 24 horas de reação.

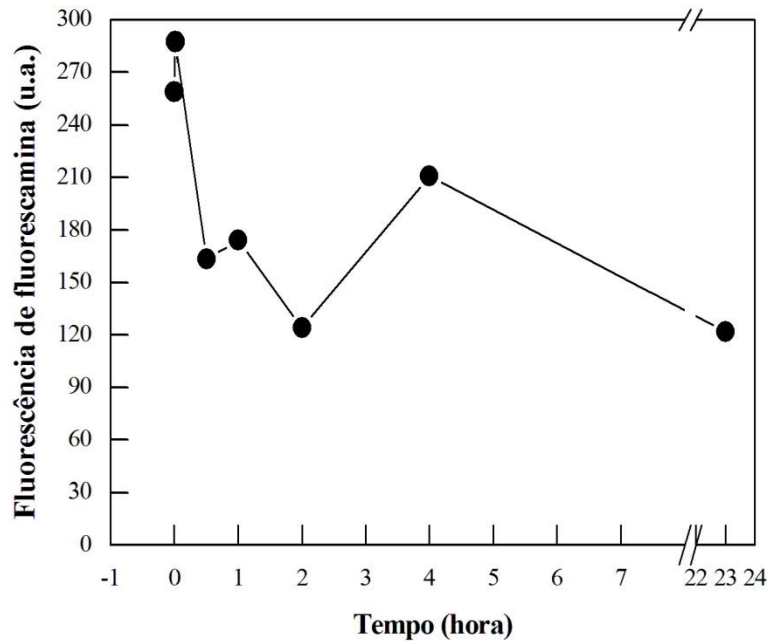


Figura 9: Cinética das reações de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald. Reação realizada em meio aquoso (NaH_2PO_4 0,1M - pH 5,0) a 4°C , na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). A cinética foi acompanhada pelo decaimento do produto fluorescente originado pela reação da fluorescamina com grupos amino da amilina. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.2 ANÁLISES DAS REAÇÕES DE PEGUILAÇÃO POR ELETROFORESE

Todas as reações foram acompanhadas por análise de eletrofore, pois é uma técnica que permite a análise da quantidade de substâncias contidas em uma amostra. A eletroforese em gel SDS-PAGE é uma técnica de separação de moléculas, em um gel de poliacrilamida, em que ocorre a migração das moléculas pela malha do gel através da aplicação de uma diferença de potencial. As moléculas migram de acordo com o seu tamanho, sendo as moléculas com tamanhos menores as que migram mais rápido pelo gel (LAEMMLI, 1970).

4.2.1. Gel SDS-PAGE 22,5% da reação do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 5 kDa (mPEG5kDa-SC) com amilina murina em DMSO

A reação de peguilação da amilina murina com o mPEG5kDa-SC (massa molar média de 5kDa) em meio reacional orgânico (DMSO) foi analisada por eletroforese, usando gel de SDS-PAGE 22,5%. O gel (Figura 10) revela além da amilina livre, pelo menos 4 bandas distintas de produtos de amilina peguilada. Dentro de apenas 1 minuto, três bandas de produtos principais são observadas e dentro de 1 hora a maior parte da amilina foi peguilada. Com o aumento do período de reação até 24 horas, mais um produto com massa molar maior começou a aparecer na reação. De fato, a peguilação de um peptídeo que possui vários sítios reativos pode resultar em uma grande variedade de isômeros de posição, incluindo derivatização dos dois grupos amino da lisina e grupos hidroxila presentes na amilina murina (BAILON E BERTHOLD, 1998). Observação: No ponto de coleta de 24 horas abaixo da banda 1, não é outra banda, mas apenas um arraste.

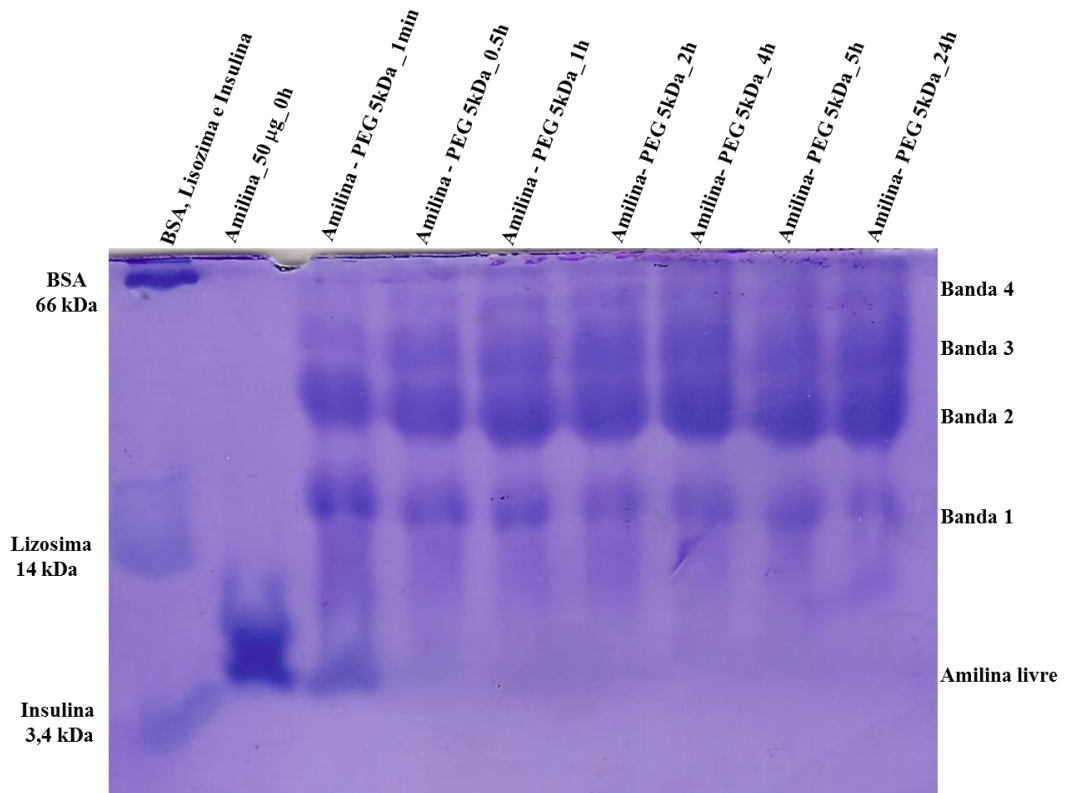


Figura 10: Gel SDS-PAGE da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC. Reação realizada em meio orgânico (DMSO) a 25°C, na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). O gel foi corado com azul de Coomassie. Padrões de massa molar utilizados: albumina bovina (BSA - 66 kDa), lisozima (14 kDa) e cadeia b da insulina (3,4 kDa). Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.2.2 Gel SDS-PAGE 22,5% da reação do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 2 kDa (mPEG2kDa-SC) com amilina murina em DMSO

A reação de peguilação da amilina com o mPEG2kDa-SC (massa molar média de 2kDa) em meio reacional orgânico (DMSO) foi analisada por eletroforese, usando gel de SDS-PAGE 22,5%. O gel (Figura 11) não revela várias bandas como o gel da reação com PEG de massa molar média de 5kDa. Neste caso, só revela uma banda em cada ponto de tempo em que as alíquotas da reação foram coletadas, que aparenta ser de amilina livre, pelo fato de diminuir de intensidade com o passar do tempo de reação. Aparentando que dentro de 4 horas a maior parte da amilina foi peguilada.

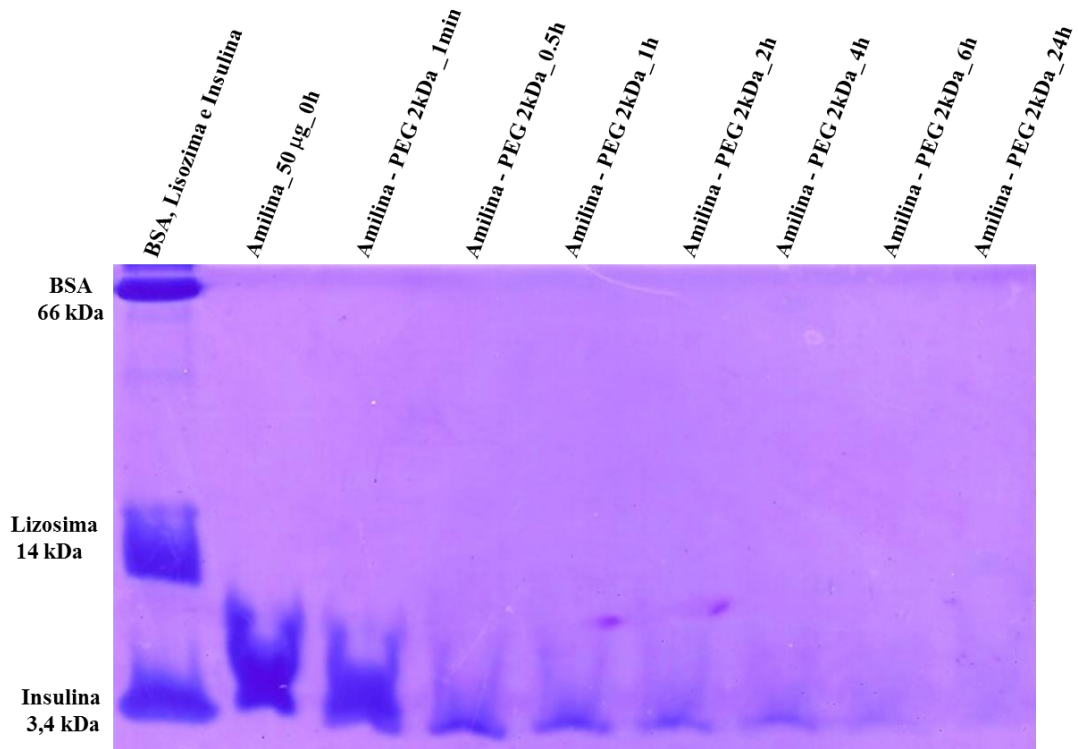


Figura 11: Gel SDS-PAGE da reação de peguilação da amilina com o mPEG2kDa-SC. Reação realizada em meio orgânico (DMSO) a 25°C, na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). O gel foi corado com azul de Coomassie. Padrões de massa molar utilizados: albumina bovina (BSA - 66 kDa), lisozima (14 kDa) e cadeia b da insulina (3,4 kDa). Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.2.3 Gel SDS-PAGE 22,5% da reação do metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 1 kDa (mPEG1kDa-SC) com amilina murina em DMSO

A reação de peguilação da amilina com o mPEG1kDa-SC (massa molar média de 1kDa) em meio reacional orgânico (DMSO) foi analisada por eletroforese, usando gel de SDS-PAGE 22,5%. O gel (Figura 12) não revela várias bandas como o gel da reação com PEG de massa molar média de 5 kDa. Neste caso, só revela uma banda em cada ponto de tempo em que as alíquotas da reação foram coletadas. Mesmo com 24 horas de duração da reação, a banda não diminuiu de intensidade com o passar do tempo de reação, o que aparenta que mesmo dentro de 24 horas de reação a maior parte da amilina não foi peguilada.

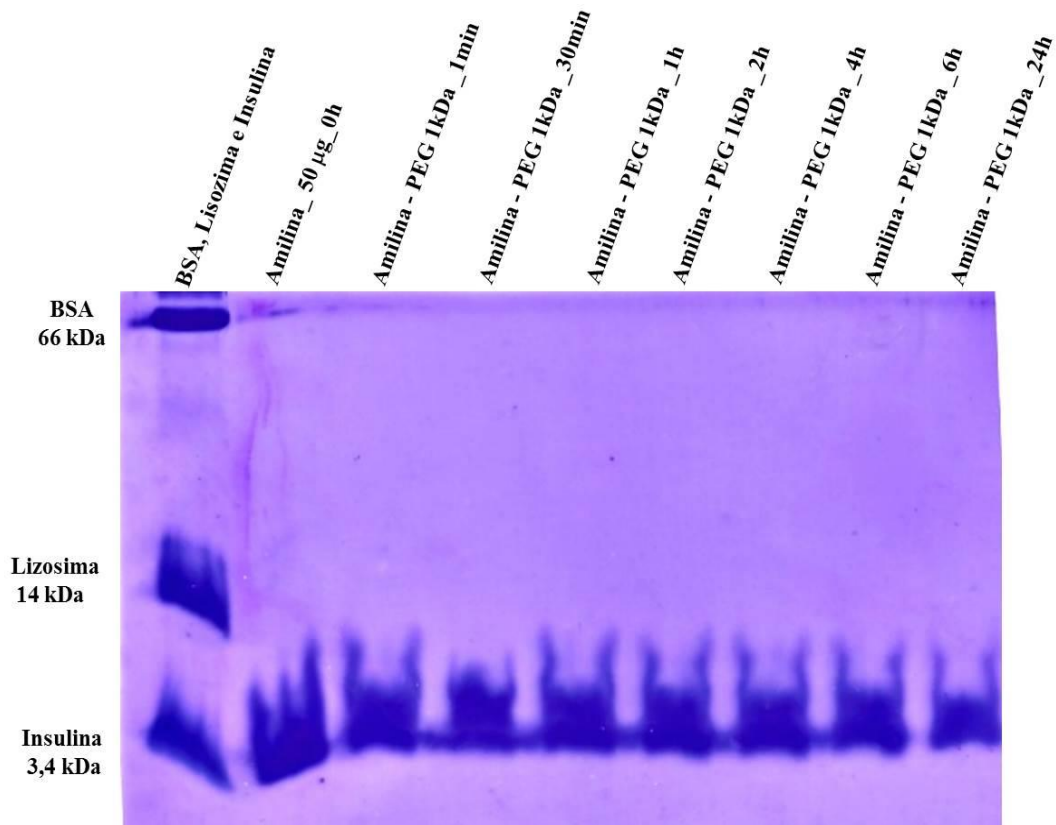


Figura 12: Gel SDS-PAGE da reação de peguilação da amilina com o mPEG1kDa-SC. Reação realizada em meio orgânico (DMSO) a 25°C, na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). Padrões de massa molar utilizados: albumina bovina (BSA - 66 kDa), lisozima (14 kDa) e cadeia b da insulina (3,4 kDa). Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.2.4 Gel SDS-PAGE 22,5% da reação do metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) com amilina murina em NaH_2PO_4 0,1M (pH 5,0)

A reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald (massa molar média de 5kDa) em meio reacional aquoso (NaH_2PO_4 0,1M - pH 5,0) foi analisada por eletroforese, usando gel de SDS-PAGE 22,5%. O gel (Figura 13) revela além da amilina livre, pelo menos 4 bandas distintas de produtos de amilina peguilada. Na alíquota em que a reação foi parada com 1 minuto de duração, só aparece a banda referente à amilina. Nota-se que bandas referentes ao PEG não aparecem no gel. Em 30 minutos são observadas as bandas de produtos principais, isso ocorre após a adição do redutor cianoborohidreto de sódio em 10 minutos de reação. A adição do redutor ciano só ocorreu após 10 minutos, para que a reação de condensação entre a amina e o PEG pudesse ocorrer, e formar a imina, que é reduzida

posteriormente pelo redutor ciano borohidreto de sódio. Com o aumento do período de reação, mais produtos com massas molares maiores começam aparecer na reação.

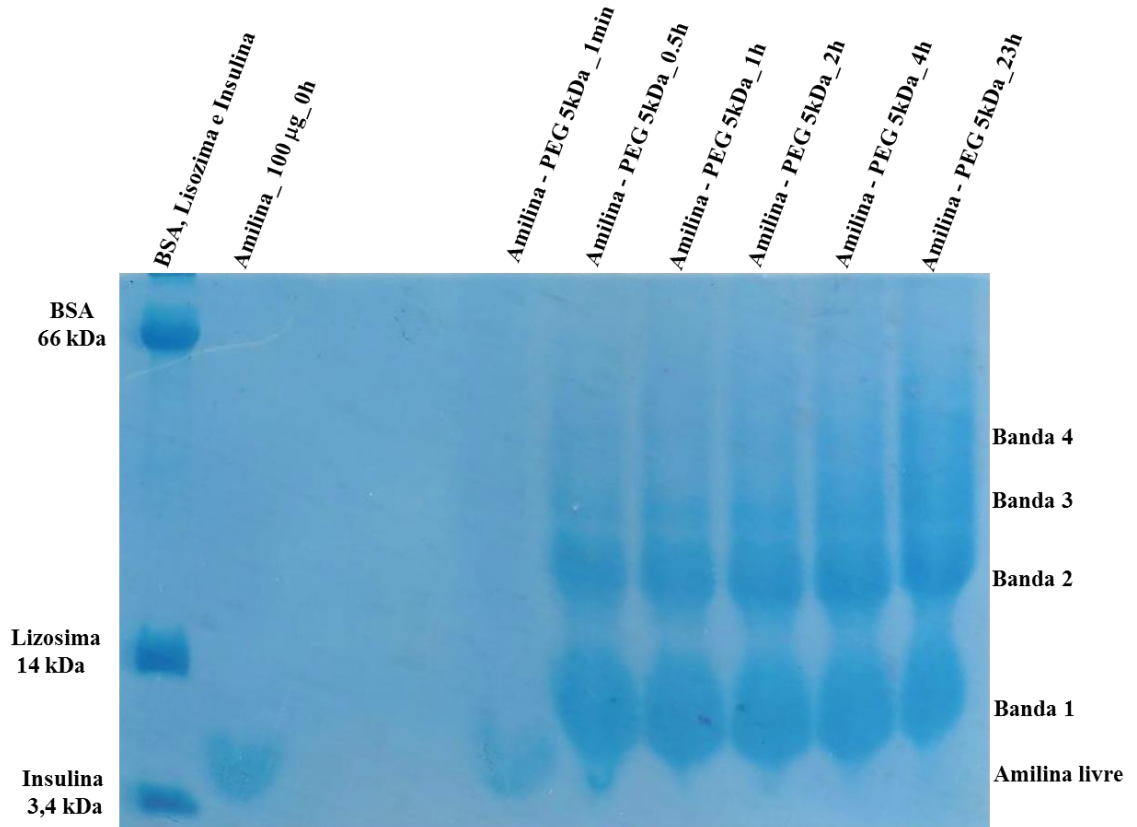


Figura 13: Gel SDS-PAGE da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald. Reação realizada em meio aquoso (NaH_2PO_4 0,1M - pH 5,0) a 4°C, na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). O gel foi corado com azul de Coomassie. Padrões de massas molares utilizados: albumina bovina (BSA - 66 kDa), lisozima (14 kDa) e cadeia b da insulina (3,4 kDa). Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.3 ANÁLISE DENSITOMÉTRICA DOS GÉIS SDS-PAGE 22,5%

4.3.1 Análise densitométrica do Gel SDS-PAGE 22,5% da reação de peguilação da amilina murina com o mPEG5kDa-SC

O gel SDS-PAGE da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC (massa molar média de 5kDa) em meio reacional orgânico (DMSO) foi analisado por densitometria, obtendo-se assim, uma análise detalhada da reação de peguilação. Pode ser visto na Figura

14A, uma banda referente a amilina murina livre, e mais quatro bandas adicionais. Uma avaliação da cinética da reação através dos resultados da análise densitométrica do gel mostra que com apenas 1 minuto de reação três produtos reacionais já são formados, a partir de 30 minutos a banda de um quarto produto começa a aparecer, e com mais tempo de duração de reação mais bandas de produtos começam a aparecer, o que reforça a existência de duas etapas de reação, uma lenta e uma mais rápida, conforme demonstrado pela análise com fluorescamina (Figura 8). Esses dados sugerem que o derivado succinimidil de PEG pode estar reagindo com as duas amins da lisina na fase rápida, e na fase lenta com outros sítios reativos (grupos nucleofílicos), tais como grupos hidroxila de serina, tirosina e treonina presentes na amilina murina.

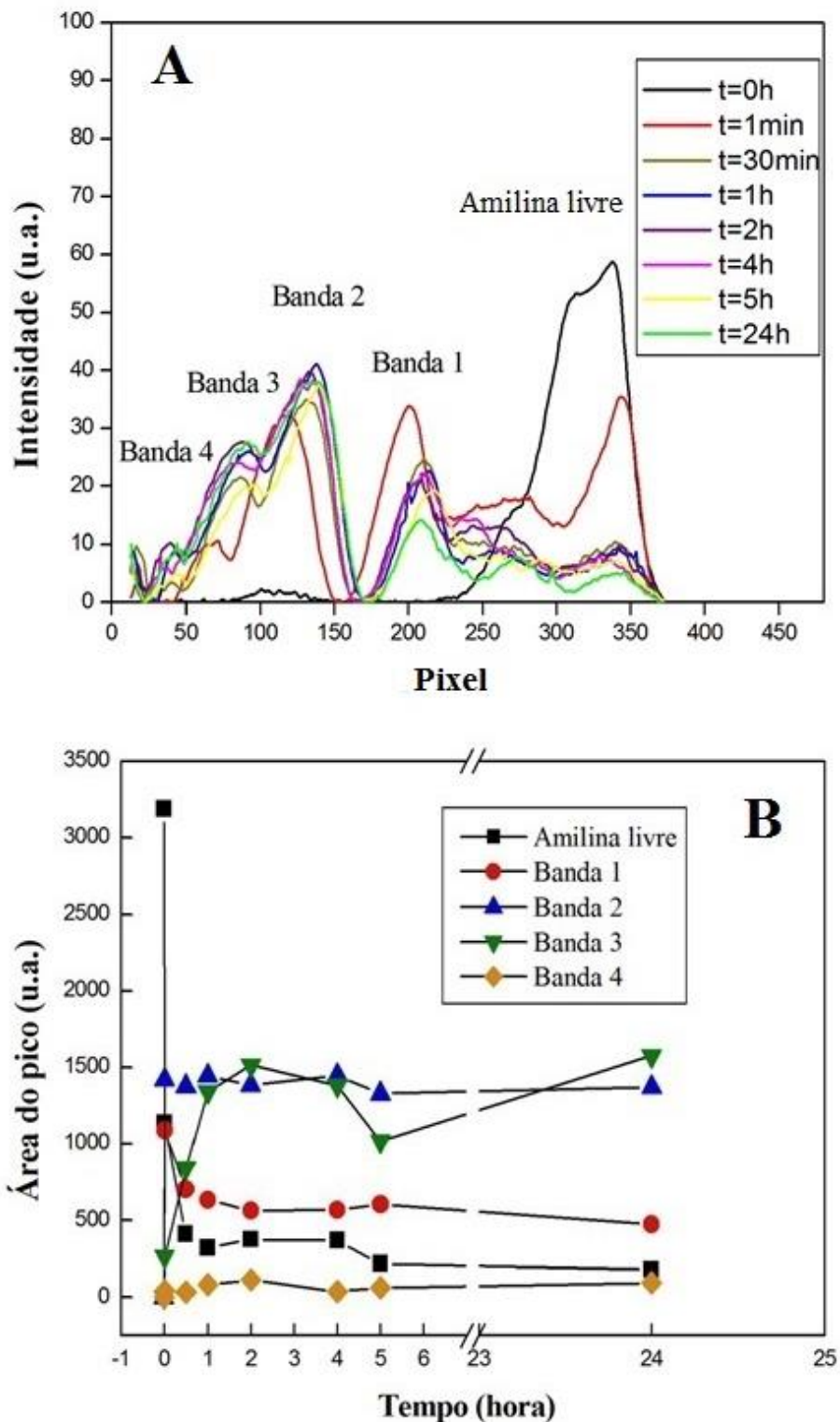


Figura 14: Análise densitométrica do gel da reação de pegulação da amilina com o mPEG5kDa-SC. Reação realizada em meio orgânico (DMSO) a 25°C, na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). Foi feito um gel SDS-PAGE 22,5 % após interrupção em vários tempos de reação (Figura 10) que foi corado com azul de Coomassie. **A)** Análise densitométrica do gel digitalizado. Integração feita no programa ImageJ e fit feito no programa FityK. **B)** A cinética da reação, como resultado da área integrada da banda. Os picos foram integrados e a área relativa foi representada graficamente como uma função do tempo. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.3.2 Análise densitométrica do Gel SDS-PAGE 22,5% da reação de peguilação da amilina com o mPEG2kDa-SC

O gel SDS-PAGE da reação de peguilação da amilina com o mPEG2kDa-SC (massa molar média de 2kDa) em meio reacional orgânico (DMSO) foi analisado por densitometria, obtendo-se assim, uma análise detalhada da reação de peguilação. Pode ser visto na Figura 15A, apenas uma banda que provavelmente refere-se a amilina murina livre, conforme o gel SDS-PAGE (Figura 11). Uma avaliação da cinética da reação através dos resultados da análise densitométrica do gel mostra que com 6 horas de duração de reação, a maior parte da amilina murina é peguilada (Figura 15B). Resultados esses coerentes com os resultados da análise com fluorescamina (Figura 8).

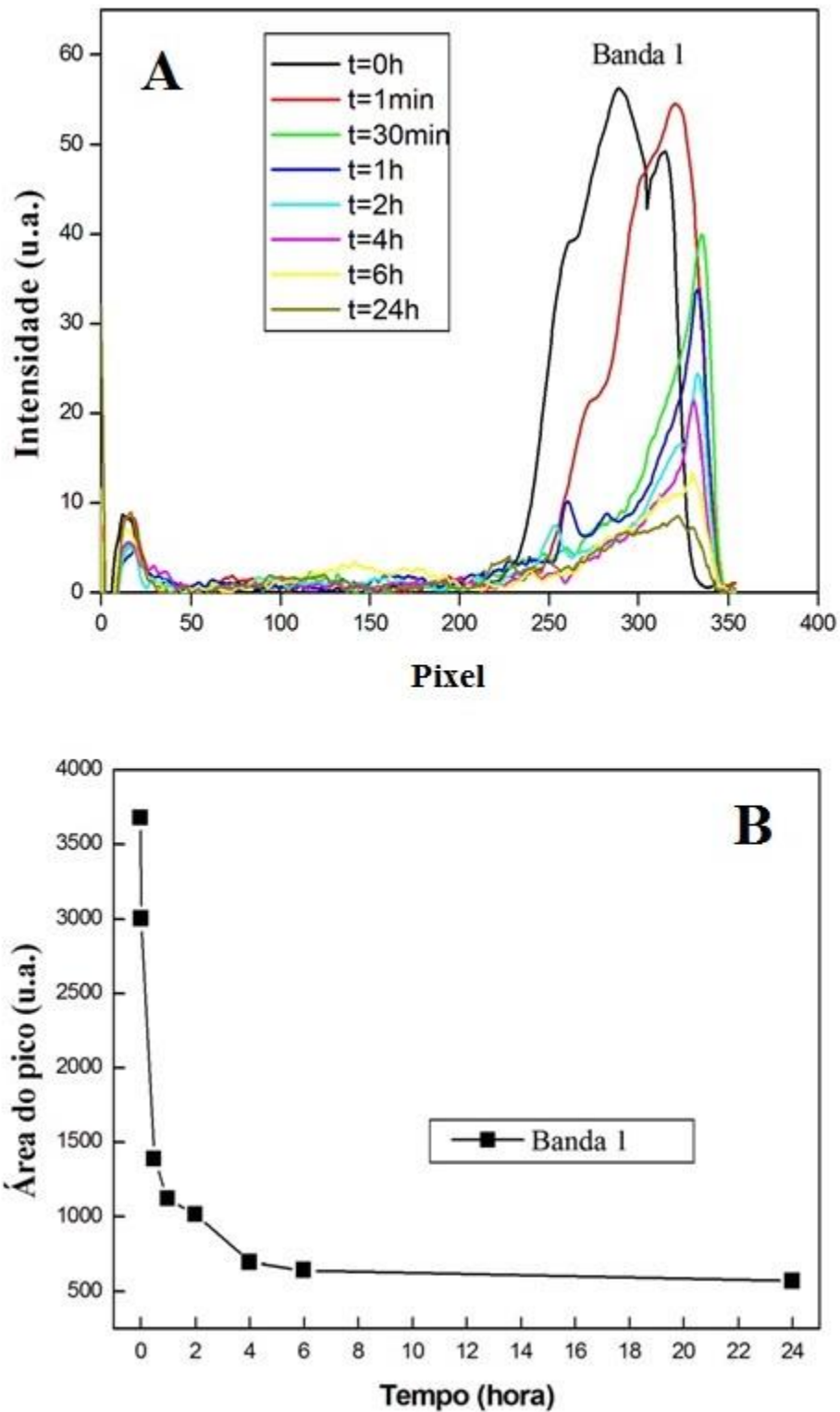


Figura 15: Análise densitométrica do gel da reação de pegulação da amilina com o mPEG2kDa-SC. Reação realizada em meio orgânico (DMSO) a 25°C, na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). Foi feito um gel SDS-PAGE 22,5 % após interrupção em vários tempos de reação (Figura 11) que foi corado com azul de Coomassie. **A)** Análise densitométrica do gel digitalizado. Integração feita no programa ImageJ e fit feito no programa FityK. **B)** A cinética da reação, como resultado da área integrada da banda. Os picos foram integrados e a área relativa foi representada graficamente como uma função do tempo. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.3.3 Análise densitométrica do Gel SDS-PAGE 22,5% da reação de peguilação da amilina com o mPEG1kDa-SC

O gel SDS-PAGE da reação de peguilação da amilina com o mPEG1kDa-SC (massa molar média de 1kDa) em meio reacional orgânico (DMSO) foi analisado por densitometria, obtendo-se assim, uma análise detalhada da reação de peguilação. Pode ser visto na Figura 16A, apenas uma banda que provavelmente refere-se a amilina murina livre, conforme o gel SDS-PAGE (Figura 12). Uma avaliação da cinética da reação através dos resultados da análise densitométrica do gel mostra que mesmo com 24 horas de duração de reação, a maior parte da amilina murina não foi peguilada (Figura 16B). Resultados esses coerentes com os resultados da análise com fluorescamina (Figura 8).

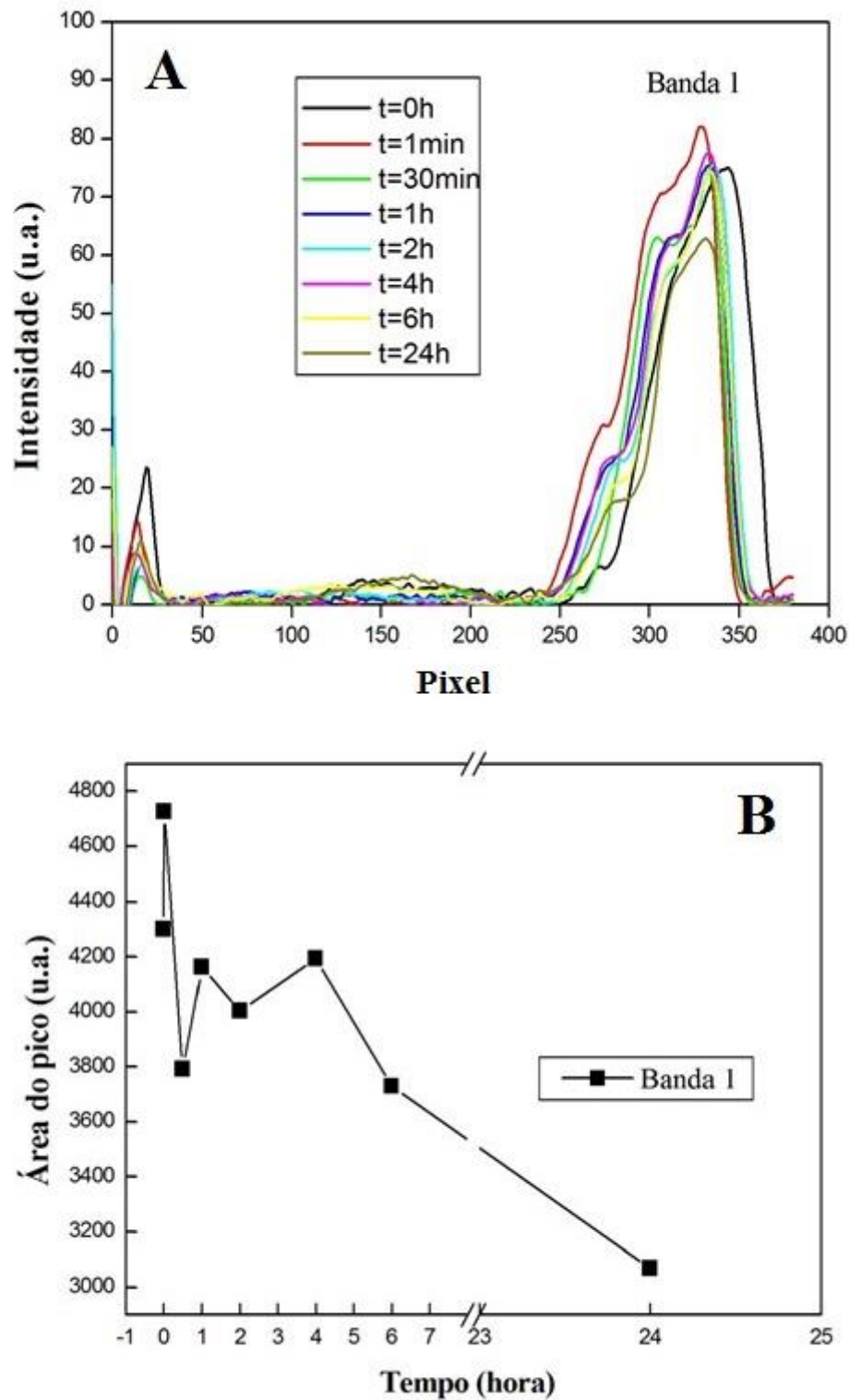


Figura 16: Análise densitométrica do gel da reação de peguilação da amilina com o mPEG1kDa-SC. Reação realizada em meio orgânico (DMSO) a 25°C, na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). Foi feito um gel SDS-PAGE 22,5 % após interrupção em vários tempos de reação (Figura 8) que foi corado com azul de Coomassie. **A)** Análise densitométrica do gel digitalizado. Integração feita no programa ImageJ e fit feito no programa FityK. **B)** A cinética da reação, como resultado da área integrada da banda. Os picos foram integrados e a área relativa foi representada graficamente como uma função do tempo. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.3.4 Comparação dos resultados das análises densitométricas dos Géis SDS-PAGE 22,5% das reações de peguilação da amilina com os mPEG5kDa-SC, mPEG2kDa-SC e mPEG1kDa-SC

Os resultados das análises de densitometria dos géis SDS-PAGE das reações de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC (massa molar média de 5kDa), mPEG2kDa-SC (massa molar média de 2kDa) e mPEG1kDa-SC (massa molar média de 1kDa) em meio reacional orgânico (DMSO) foram comparados. Como pode ser visto na Figura 13A, as reações entre a amilina murina livre e o mPEG5kDa-SC, e amilina murina livre e o mPEG2kDa-SC são mais rápidas, e a reação entre a amilina livre e o mPEG1kDa-SC ocorre em uma menor extensão. A análise quantitativa do decaimento da amilina murina livre revela que a cinética de reação é fortemente dependente da massa molar do derivado de polietilenoglicol (Figura 17B), em um intervalo de quatro ordens de magnitude, para o derivado de polietilenoglicol com massa molar média de 5 kDa (mPEG5kDa-SC) ao derivado de polietilenoglicol com massa molar média de 1 kDa (mPEG1kDa-SC). Como pode ser notado na Figura 17A, a maior parte da amilina murina é peguilada com mPEG5kDa-SC dentro de 1 hora de reação, em uma escala de tempo similar a observada no decaimento da quantidade de grupos amino disponíveis (Figura 8), o que indica que a peguilação ocorre principalmente através da derivatização dos dois grupos amino da lisina 1 da amilina murina.

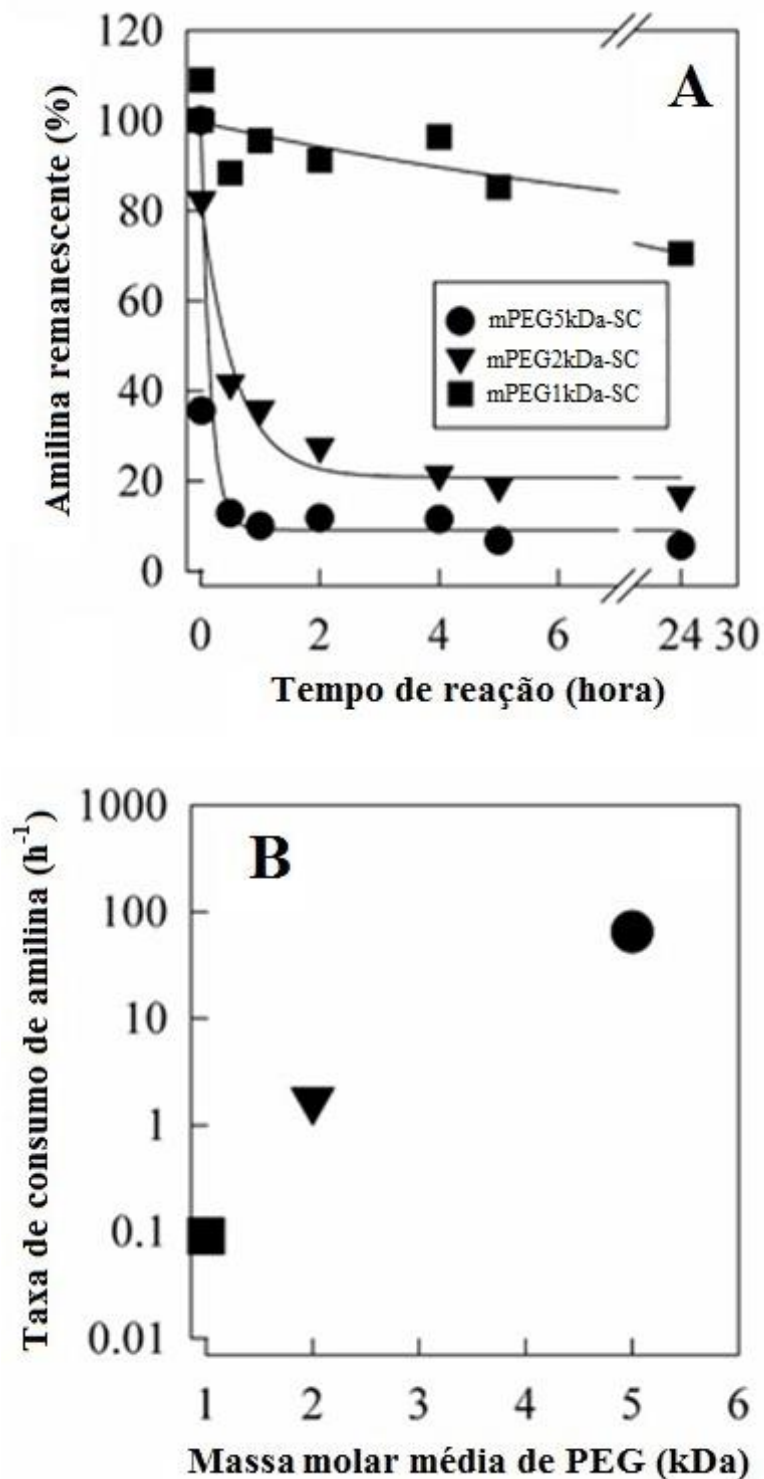


Figura 17: Análise densitométrica dos géis SDS-PAGE das reações de peguilação. Reações realizadas a 25°C, na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). **A)** Análise densitométrica dos géis das reações de peguilação da amilina murina com os mPEG5kDa-SC (●), mPEG2kDa-SC (▼) e mPEG1kDa-SC (■) com ImageJ e ajuste de curva e integração dos picos com FityK. **B)** Os dados do consumo de amilina (Figura 17A) foram ajustados com uma função da taxa de decaimento exponencial simples e constante da taxa de cinética do desaparecimento da amilina murina livre como uma função da massa molar média do derivado de polietilenoglicol. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.3.5 Análise densitométrica do Gel SDS-PAGE 22,5% da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald

O gel SDS-PAGE da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald (massa molar média de 5kDa) em meio reacional aquoso (NaH_2PO_4 0,1M - pH 5,0) foi analisado por densitometria, obtendo-se assim, uma análise detalhada da reação de peguilação. Pode ser visto na Figura 18A, uma banda referente a amilina murina livre, e mais quatro bandas adicionais. Uma avaliação da cinética da reação através dos resultados da análise densitométrica do gel mostra que, em 30 minutos de reação, após a adição do reagente redutor cianoborohidreto de sódio à mistura reacional em 10 minutos de reação, quatro produtos reacionais já são formados, e em até 23 horas de reação uma banda de um quinto produto começa a aparecer. Na Figura 18B, nota-se que grande parte da amilina reage com 1 hora de duração da reação. Esses dados sugerem que o derivado propionaldeído de PEG pode estar reagindo com as duas amins da lisina e também com outros sítios reativos (grupos nucleofílicos), tais como grupos hidroxila de serina, tirosina e treonina presentes na amilina murina.

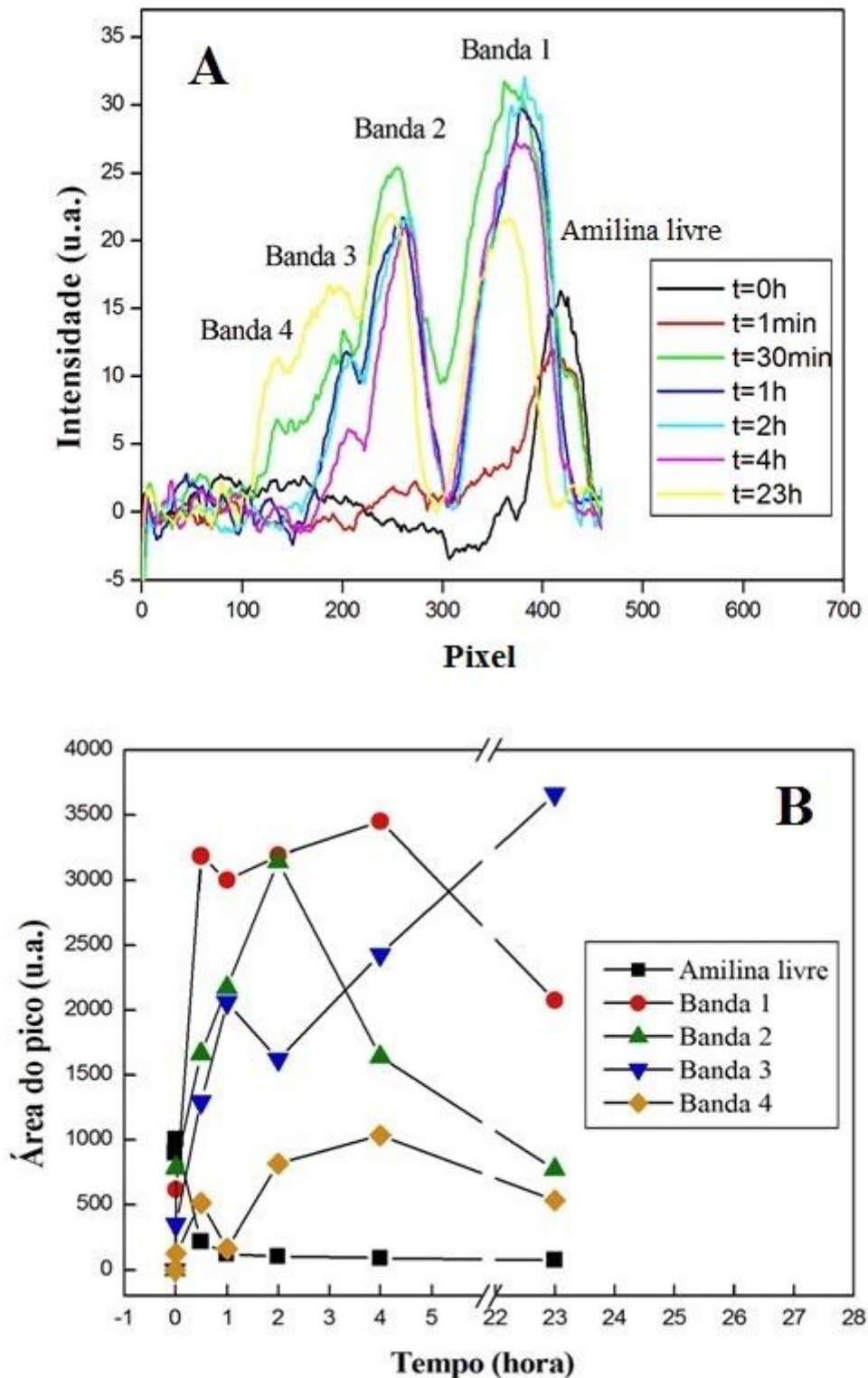


Figura 18: Análise densitométrica do gel da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald. Reação realizada em meio aquoso (NaH_2PO_4 0,1M - pH 5,0) a 4°C , na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). Foi feito um gel SDS-PAGE 22,5 % após interrupção em vários tempos de reação (Figura 13) que foi corado com azul de Coomassie. **A)** Análise densitométrica do gel digitalizado. Integração feita no programa ImageJ e fit feito no programa FityK. **B)** A cinética da reação, como resultado da área integrada da banda. Os picos foram integrados e a área relativa foi representada graficamente como uma função do tempo. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE PEGUILAÇÃO COM HPLC DE FASE REVERSA

4.4.1 Purificação dos produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 5 kDa (mPEG5kDa-SC) em DMSO

Após reação de 4 horas de duração ser interrompida com lisina, os produtos da reação de amilina murina com o mPEG5kDa-SC foram purificados em um sistema cromatográfico Jasco LC-2000 (Jasco Inc, EUA) com coluna cromatográfica C18. Obtiveram-se quatro picos principais (Figura 19), em que os picos tiveram os tempos de eluição de aproximadamente 8,5 minutos, 10,1 minutos, 10,5 minutos e 11,3 minutos. Assim, no intuito de separar essas amostras, foram coletadas as seguintes Pools (conjuntos de amostras):

- Pool 1 – coletado entre 7,7 a 9,0 minutos
- Pool 2 – coletado entre 9,6 a 10,3 minutos
- Pool 3 – coletado entre 10,3 a 10,8 minutos
- Pool 4 – coletado entre 10,8 a 12,1 minutos

Esclarece-se que a obtenção de Pools foi realizada da seguinte maneira: Durante a purificação da reação no sistema cromatográfico Jasco LC-2000 (Jasco Inc, EUA) com coluna cromatográfica C18, foram coletadas, manualmente, amostras de aproximadamente 1 ml. Essas amostras foram unidas em Pools, e concentradas em um SpeedVac. A união dessas amostras foi baseada no cromatograma obtido da purificação no sistema cromatográfico, tentando sempre juntar em um mesmo Pool, todas as amostras com tempo de eluição dentro do tempo de eluição de um dos picos que apareceram no cromatograma. A união das amostras baseada no tempo de eluição de cada pico foi realizada para tentar obter os produtos mais puros quanto fosse possível.

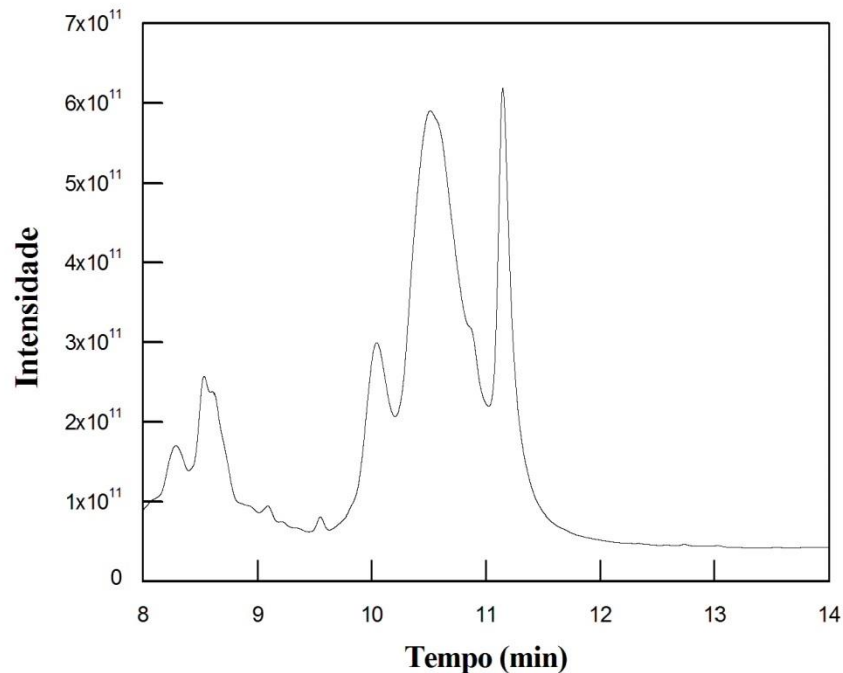


Figura 19: Purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC em DMSO. A purificação foi realizada por HPLC de fase reversa com coluna C18. Foram coletadas alíquotas de aproximadamente 1ml, em que posteriormente foram feitos Pools. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.4.2 Purificação dos produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) em NaH_2PO_4 0,1M (pH 5,0)

Após reação de 2 horas de duração ser interrompida com metanol, os produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) foram purificados em um sistema cromatográfico Jasco LC-2000 (Jasco Inc, EUA) com coluna cromatográfica C18. Obtiveram-se quatro picos principais bem resolvidos (Figura 20), em que os picos tiveram os tempos de eluição de aproximadamente 8,3 minutos, 10,0 minutos, 11,0 minutos e 12,8 minutos. Assim, no intuito de separar essas amostras, estas foram coletadas e unidas nos seguintes pool's:

- Pool 1 – coletado entre 8,0 a 9,0 minutos
- Pool 2 – coletado entre 9,3 a 10,1 minutos
- Pool 3 – coletado entre 10,5 a 11,1 minutos

- Pool 4 – coletado entre 11,4 a 12,2 minutos
- Pool 5 – coletado entre 12,5 a 13,5 minutos

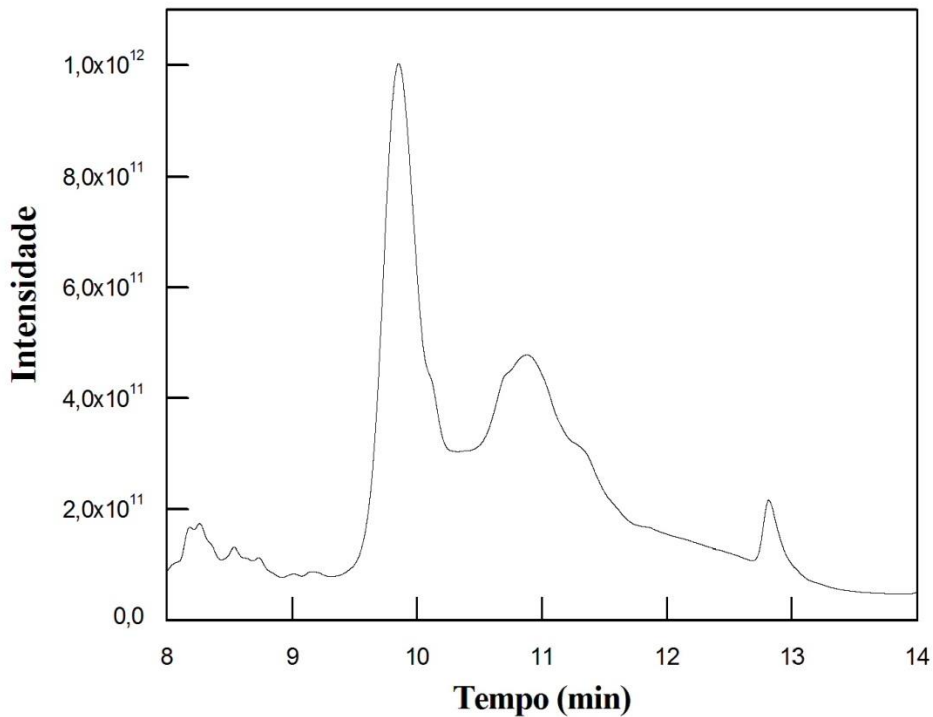


Figura 20: Purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald em NaH_2PO_4 0,1M (pH 5,0). A purificação foi realizada por HPLC de fase reversa com coluna C18. Foram coletadas alíquotas de aproximadamente 1 ml, em que posteriormente foram feitos Pools. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

Para a melhor visualização dos produtos peguilados contidos nos Pool's coletados na purificação, utilizou-se a técnica de eletroforese por SDS-PAGE, utilizando-se uma etapa adicional de coração do Gel com corante de iodo. Assim, uma segunda reação com mPEG5kDa-Ald e amilina murina foi realizada e purificada, nas mesmas condições da primeira reação realizada (descrita acima). Obtiveram-se quatro picos principais bem resolvidos (Figura 21), que tiveram os tempos de eluição de aproximadamente 8,4 minutos, 10,4 minutos, 11,6 minutos e 13,0 minutos. Assim, no intuito de separar essas amostras, estas foram coletadas e unidas nos seguintes pool's:

- Pool 1 – coletado entre 8,0 a 8,8 minutos

- Pool 2 – coletado entre 9,8 a 10,5 minutos
- Pool 3 – coletado entre 10,5 a 10,9 minutos
- Pool 4 – coletado entre 10,9 a 11,4 minutos
- Pool 5 – coletado entre 11,4 a 11,8 minutos
- Pool 6 – coletado entre 11,8 a 12,5 minutos
- Pool 7 – coletado entre 12,8 a 13,8 minutos

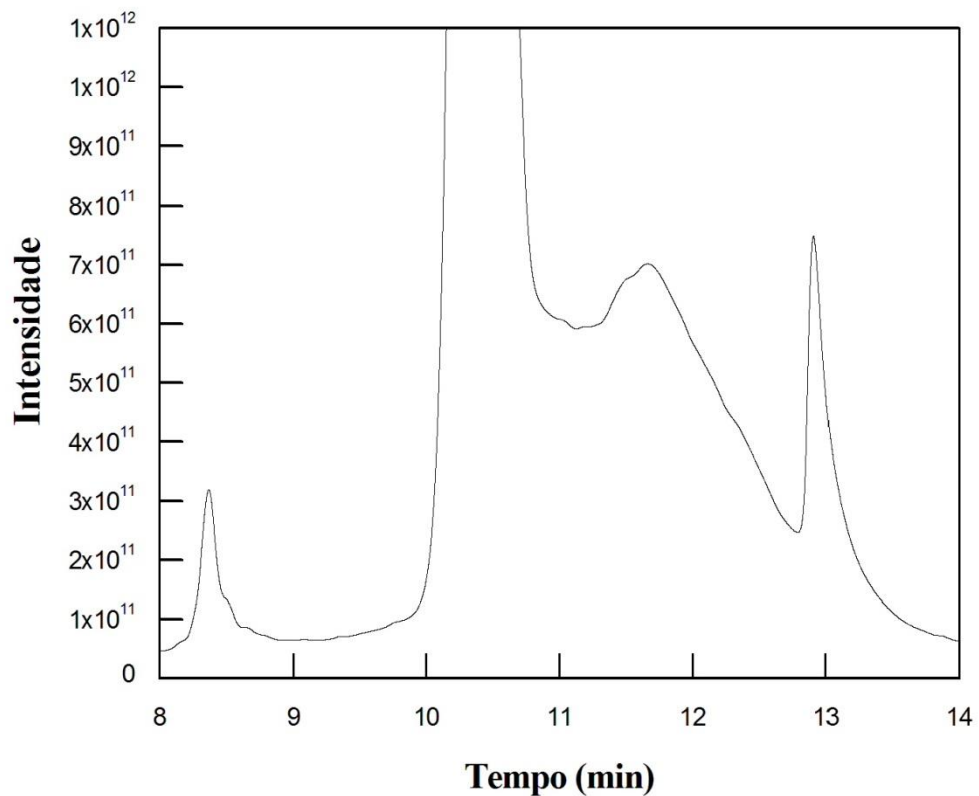


Figura 21: Purificação da segunda reação realizada de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald em NaH_2PO_4 0,1M (pH 5,0). A purificação foi realizada por HPLC de fase reversa com coluna C18. Foram coletadas alíquotas de aproximadamente 1 ml, em que posteriormente foram feitos Pools. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.5 ANÁLISES DE ELETROFORESE DAS PURIFICAÇÕES DAS REAÇÕES DE PEGUILAÇÃO

4.5.1 Gel SDS-PAGE 22,5% da purificação dos produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 5 kDa (mPEG5kDa-SC) em DMSO

As amostras obtidas através da purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC (massa molar média de 5kDa) em meio reacional orgânico (DMSO) foram analisadas por eletroforese, usando gel de SDS-PAGE 22,5%. Como pode ser notado pela Figura 22, observa-se uma única banda muito fraca em posição semelhante ao padrão de amilina livre no Pool 1, devendo assim o Pool 1 conter amilina livre que não reagiu na reação. O Pool 2 apresenta uma banda única com intensidade muito fraca, quase não possível de ser vista. O Pool 3 apresenta uma banda que aparenta estar pura, e o Pool 4 também apresenta uma banda, em posição semelhante à banda do padrão da reação mPEG5kDa-SC_amilina (alíquota retirada no fim da reação para servir como um padrão da reação no gel). A purificação aparenta assim, ter sido bem sucedida, separando bem os produtos peguilados.

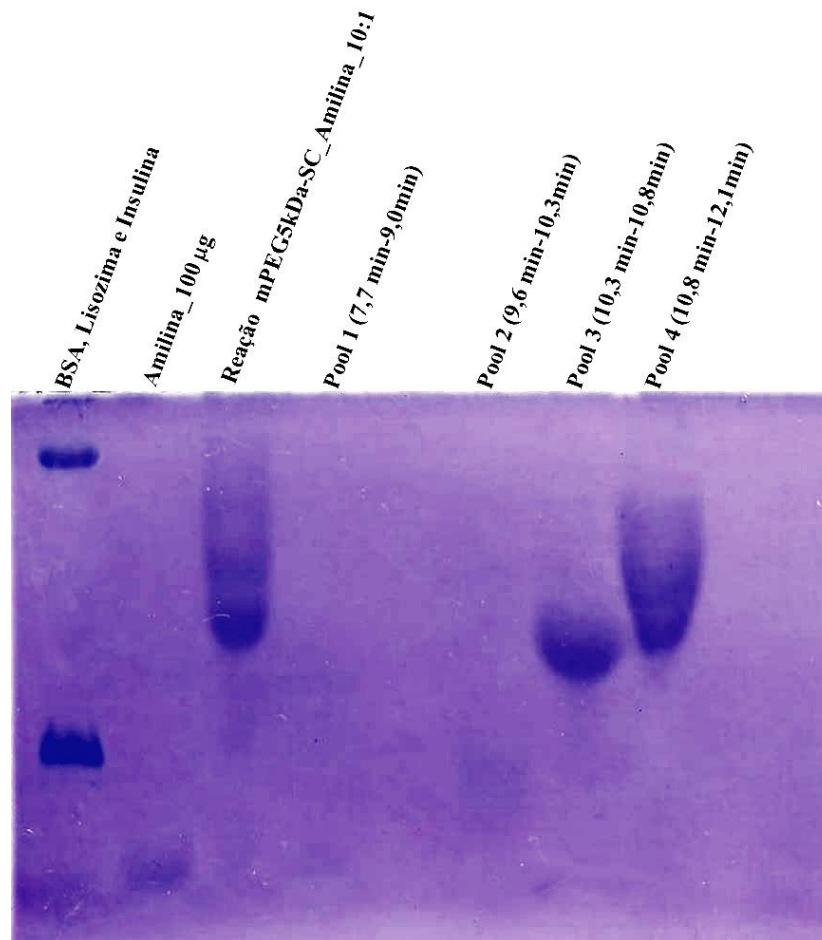


Figura 22: Gel SDS-PAGE 22,5% das amostras obtidas por purificação da reação de pegulação da amilina com o mPEG5kDa-SC (5kDa) em DMSO. A purificação foi realizada por HPLC de fase reversa com coluna C18. O gel foi corado com azul de Coomassie. Padrões de peso molecular utilizados: albumina bovina (BSA - 66 kDa), lisozima (14 kDa) e cadeia b da insulina (3.4 kDa). Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.5.2 Gel SDS-PAGE 22,5% da purificação dos produtos da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) em NaH_2PO_4 0,1M (pH 5,0)

As amostras obtidas através da primeira purificação (item 4.4.2) da reação de pegulação da amilina com o mPEG5kDa-Ald (massa molar média de 5kDa) em meio reacional aquoso (NaH_2PO_4 0,1M - pH 5,0) foram analisadas por eletroforese, usando gel de SDS-PAGE 22,5%, corado com azul de Coomassie. Como pode ser notado pela Figura 23, não se observou bandas no Pool 1. O Pool 2 apresenta uma banda, em posição semelhante à primeira banda de baixo para cima do padrão da reação mPEG5kDa-Ald_amilina, que

aparenta estar bem pura. O Pool 3 apresenta uma banda com fraca intensidade, em posição semelhante à primeira banda de baixo para cima do padrão da reação mPEG5kDa-Ald_amilina, uma segunda banda, em posição semelhante à segunda banda de baixo para cima do padrão da reação mPEG5kDa-Ald_amilina e mais três bandas de produtos reacionais, o que demonstra uma mistura de produtos no Pool 3. O Pool 4 apresenta 3 bandas de produtos, e o Pool 5 apresenta 1 banda de produto.

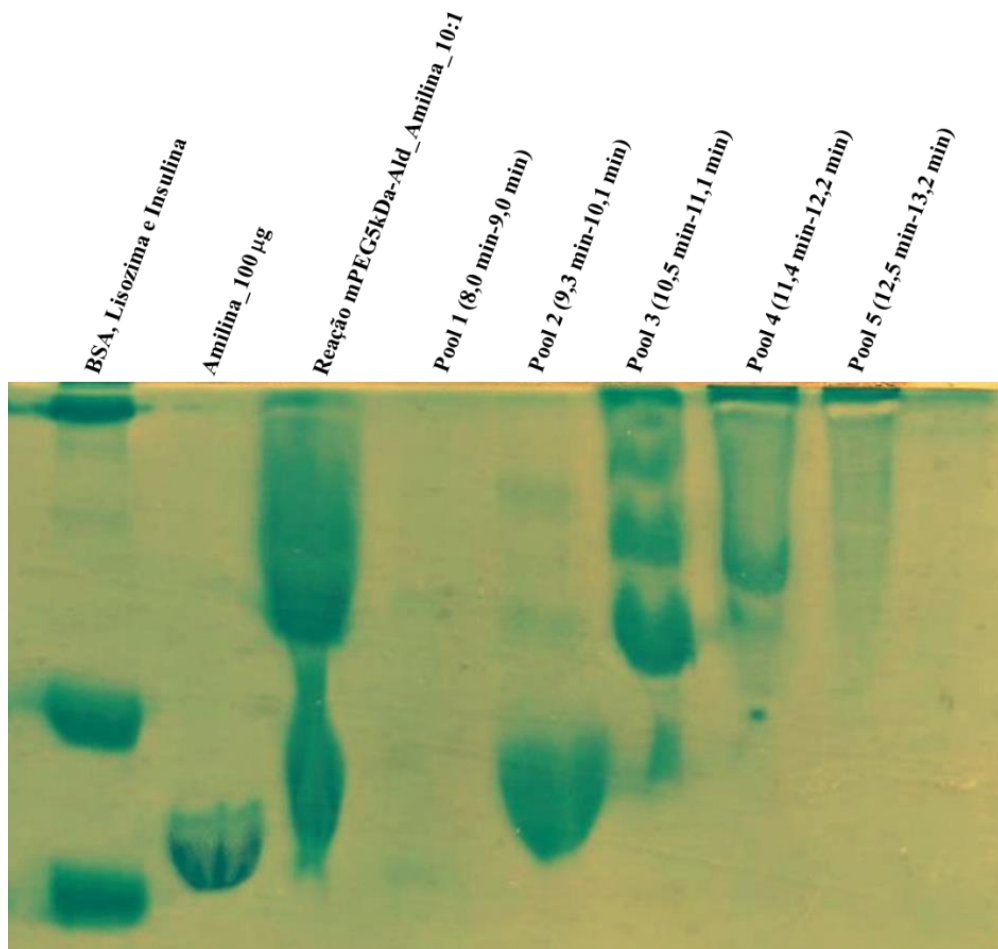


Figura 23: Gel SDS-PAGE 22,5% das amostras obtidas por purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald em NaH_2PO_4 0,1M - pH 5,0. A purificação foi realizada por HPLC de fase reversa com coluna C18. Padrões de massa molar utilizados: albumina bovina (BSA - 66 kDa), lisozima (14 kDa) e cadeia b da insulina (3.4 kDa). Imagem de gel corado com azul de Coomassie. Os tempos de eluição em que as amostras foram coletadas estão indicados nas legendas na parte superior da figura. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

Para a melhor visualização dos produtos peguilados nos Pool's analisados por SDS-PAGE, uma segunda reação com mPEG5kDa-Ald e amilina murina foi realizada e purificada,

nas mesmas condições da primeira reação realizada (descrita acima), e o gel obtido foi corado também com solução de iodo 0,025M, que cora grupamentos de polietilenoglicol, deixando – os marrom. O gel A (Figura 24A) foi corado com azul de Coomassie e o gel B (Figura 24B) é o mesmo gel que o A, só que corado também com solução de iodo 0,025M. Na Figura 24A, observa – se uma única banda muito fraca em posição semelhante ao padrão de amilina livre no Pool 1, devendo assim o Pool 1 conter amilina livre que não reagiu na reação. O Pool 2 apresenta uma banda, que aparenta estar bem pura, apresentando assim, provavelmente, um primeiro produto reacional. O Pool 3 apresenta três bandas, indicando conter mais dois produtos reacionais diferentes. Os Pool's 4 e 5 apresentam pelo menos 4 bandas, e pelo menos dois outros produtos reacionais diferentes. Já nos Pool's 6 e 7, não é possível distinguir as bandas. Na Figura 24B, observa – se uma única banda muito fraca em posição semelhante ao padrão de amilina livre no Pool 1, ambas não foram coradas de marrom, indicando ausência de grupamento de polietilenoglicol. O Pool 2 apresenta uma banda na cor marrom, o que indica presença de grupamento de polietilenoglicol, e aparenta estar bem pura. Os Pool's 3, 4 e 5 apresentam bandas marrons diversas, conforme mencionado anteriormente, indicando conterem produtos com grupamento de polietilenoglicol, os produtos reacionais peguilados. Os Pool's 6 e 7, não é ainda possível distinguir possíveis bandas.

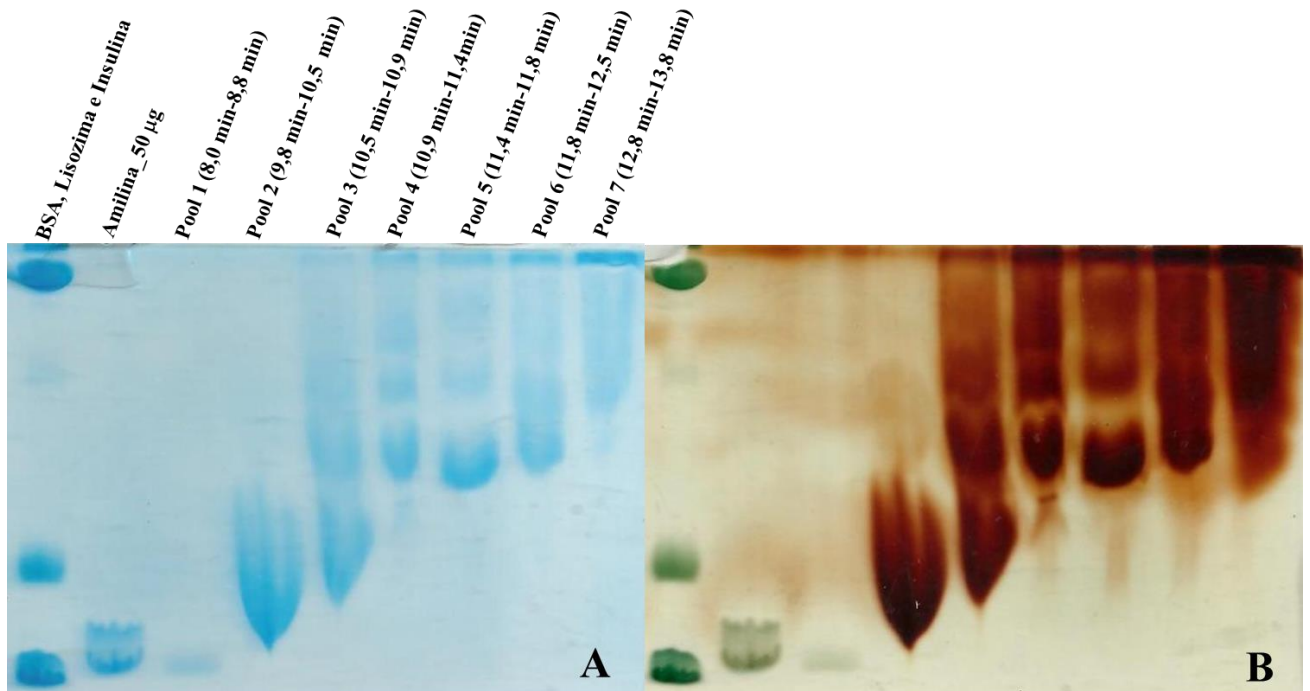


Figura 24: Gel SDS-PAGE 22,5% das amostras obtidas por purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald em NaH_2PO_4 0,1M - pH 5,0. A purificação foi realizada por HPLC de fase reversa com coluna C18. Padrões de massa molar utilizados: albumina bovina (BSA - 66 kDa), lisozima (14 kDa) e cadeia b da insulina (3.4 kDa). **A)** Imagem de gel corado com azul de Coomassie. **B)** imagem do mesmo gel que **A**, mas corado também com solução de iodo 0,025M. Os tempos de eluição em que as amostras foram coletadas estão indicados nas legendas na parte superior da figura. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.6 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DAS AMOSTRAS PURIFICADAS

4.6.1 Análise dos produtos purificados da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato 5 kDa (mPEG5kDa-SC) em DMSO

A partir dos resultados do gel SDS-PAGE das amostras purificadas, escolheram – se as amostras que pareciam mais puras e estas foram analisadas por Espectrometria de Massa por Dessorção-Ionização a Laser em matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-ToF-MS). O Pool 2 que eluiu de 9,6 a 10,3 minutos corresponde ao produto monopeguilado (Figura 25B, m/z máximo = 9,200). Já o Pool 3 que eluiu de 10,3 a 10,8 minutos corresponde ao produto dipeguilado (Figura 25C, m/z máximo = 14,100).

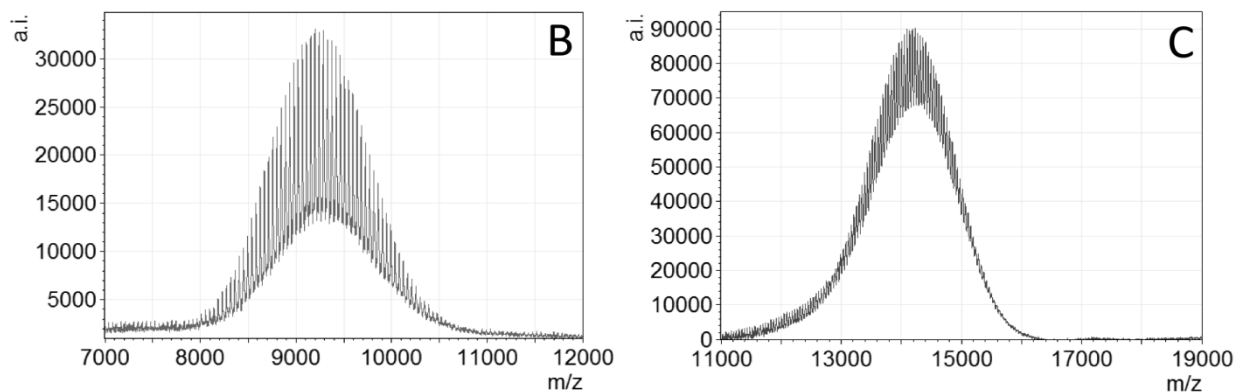


Figura 25: Caracterização por meio de MALDI-ToF-MS das amostras obtidas por purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC em DMSO. Reação realizada a 25°C, na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). A purificação foi realizada por HPLC de fase reversa com coluna C18. **B)** amilina monopeguilada (tempo de eluição de 9,6 a 10,3 minutos, m/z máximo = 9,200) e **C)** amilina dipeguilada (tempo de eluição de 10,3 a 10,8 minutos; m/z máximo = 14,100). Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.6.2 Análise dos produtos purificados da reação de amilina murina com metoxil polietilenoglicol propionaldeído 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) em NaH₂PO₄ 0,1M (pH 5,0)

A partir dos resultados do gel SDS-PAGE das amostras purificadas, escolheram – se algumas amostras e estas foram analisadas por Espectrometria de Massa por Dessorção-Ionização a Laser em matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-ToF-MS). O Pool 2 que eluiu de 9,3 a 10,1 minutos corresponde ao produto monopeguilado (Figura 26; m/z máximo = 9,087). Já o Pool 3 que eluiu de 10,5 a 11,1 minutos corresponde ao produto dipeguilado (Figura 27; m/z máximo = 14,294) em maior quantidade e outros subprodutos reacionais. Como pode ser notado, não foi possível separar o produto dipeguilado de outros subprodutos reacionais, com o método de purificação utilizado, só o produto monopeguilado foi purificado. Na Figura 26, os picos pequenos são apenas ruídos.

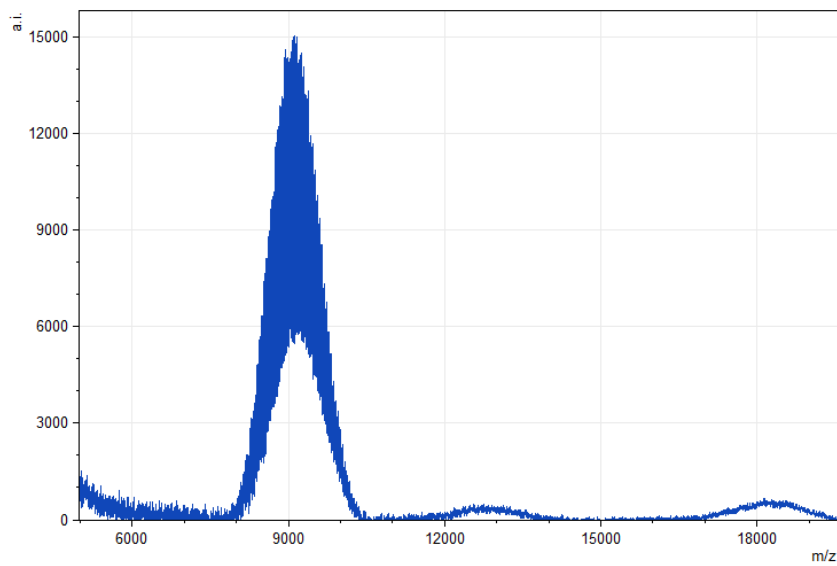


Figura 26: Caracterização por meio de MALDI-ToF-MS das amostras obtidas por purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald em NaH_2PO_4 0,1M - pH 5,0. Reação realizada a 4°C , na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). A purificação foi realizada por HPLC de fase reversa com coluna C18. Caracterização da amostra contendo o produto amilina monopeguilada (tempo de eluição de 9,3 a 10,1 minutos; m/z máximo = 9,087). Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

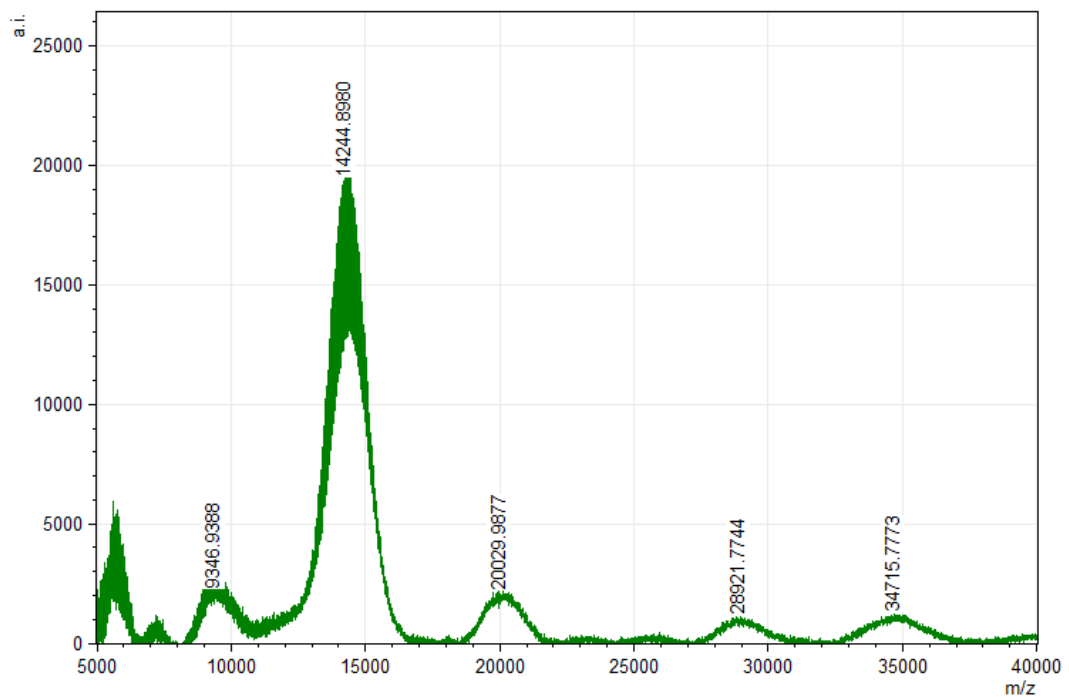


Figura 27: Caracterização por meio de MALDI-ToF-MS das amostras obtidas por purificação da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-Ald em NaH_2PO_4 0,1M - pH 5,0. Reação realizada a 4°C , na razão molar de 10:1 (PEG:amilina). A purificação foi realizada por HPLC de fase reversa com coluna C18. Caracterização da amostra (tempo de eluição de 10,5 a 11,1 minutos) contendo o produto amilina dipeguilada (m/z máximo = 14,244) em maior quantidade e outros subprodutos reacionais. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.7 DIGESTÃO POR TRIPSINA DOS PRODUTOS PEGUILADOS

Para confirmar o sítio de conjugação dos derivados de polietilenoglicol na amilina murina, o produto dipeguilado (produto da reação entre mPEG5kDa-SC e amilina murina) foi submetido a digestão por tripsina, que cliva ligações peptídicas no lado carboxila da arginina (Arg¹¹ e Arg¹⁸, no caso da amilina murina). O mPEG5kDa-SC possui uma distribuição de massa com máximo em cerca de 5,3 kDa, como pode ser visto na análise por Espectrometria de Massa por Dessorção-Ionização do mPEG5kDa-SC livre, na Figura 28A. Já na Figura 28B, o produto de digestão por tripsina da amilina dipeguilada mostra uma distribuição com máximo em cerca de 11,7 kDa. Considerando que 2 moléculas de mPEG5kDa-SC teria uma distribuição de massa de 10,6 kDa, o fragmento que suporta as duas cadeias de mPEG5kDa-SC deveria ter 1,1 kDa de distribuição de massa, massa essa similar a massa do seguimento peptídico 1-11 da amilina, que possui 1,2 kDa. Levando também em consideração os resultados da análise por espectrofluorimetria na disponibilidade de amina primária na amilina quando sofre conjugação com PEG (Figura 8), podemos concluir que tanto o produto monopeguilado como o produto dipeguilado são resultado da conjugação do PEG com o grupo amina do resíduo de lisina, na posição 1 da sequência da amilina murina (Figura 2).

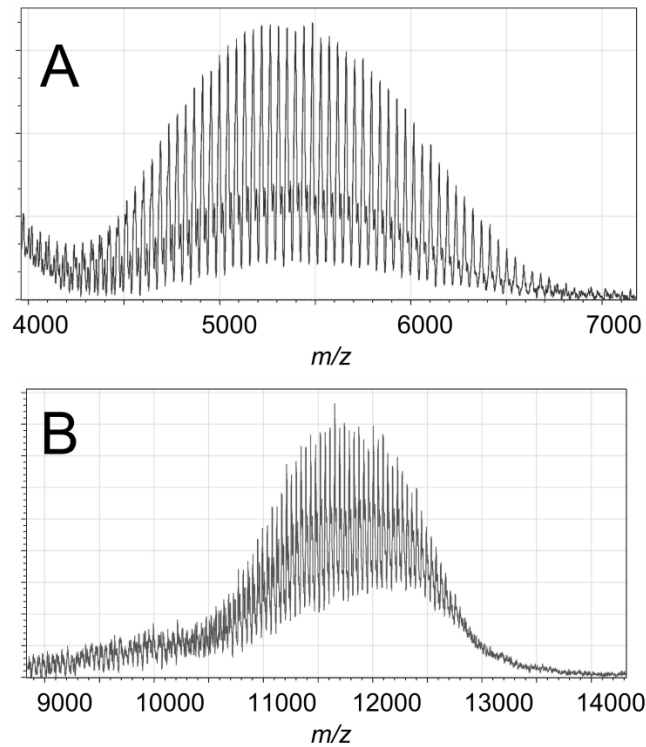


Figura 28: Caracterização por meio de MALDI-ToF-MS e digestão por tripsina da amilina dipeguilada. Amilina dipeguilada resultante da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC em DMSO. O produto de digestão da amilina dipeguilada por tripsina foi caracterizado por meio de MALDI-ToF-MS. **A)** espectro de massas de mPEG5kDa-SC livre e **B)** espectro de massas do produto de digestão de amilina dipeguilada. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.8 DOSAGEM DAS AMILINAS PEGUILADAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

Soluções de amilina murina livre com diferentes concentrações foram usadas para o estabelecimento de uma curva de calibração para quantificação com o método de Bradford (Figura 29). Para avaliar a especificidade do método, foram feitas leituras de soluções de mPEG5kDa-SC inativado com lisina, sendo que nenhuma das soluções resultou em um sinal significativo de absorvância a 595 nm. Como pode ser notado no gráfico da Figura 29, o método apresentou linearidade aceitável, com $R^2 = 0,9892$, com a quantidade de amilina variando de 0,5 μg a 20 μg nas amostras testadas. A equação obtida com a regressão linear foi:

$$y = 0,0047x + 0,0048$$

em que: y = absorvância a 595 nm, em u.a.

x = massa de amilina livre em μg

As amostras purificadas, produtos da reação entre a amilina murina e o mPEG5kDa-SC, foram quantificadas e resultaram em 71,5 μg de proteína no Pool 2 e 39,25 μg de proteína no Pool 3, o que corresponde ao rendimento de 14,3% de amilina monopeguilada e de 7,85% de amilina dipeguilada. Já a amostra purificada contendo o produto monopeguilado da reação entre a amilina murina e o mPEG5kDa-Ald, foi quantificada e resultou em 42,5 μg de proteína, o que corresponde ao rendimento de 4,25% de amilina monopeguilada.

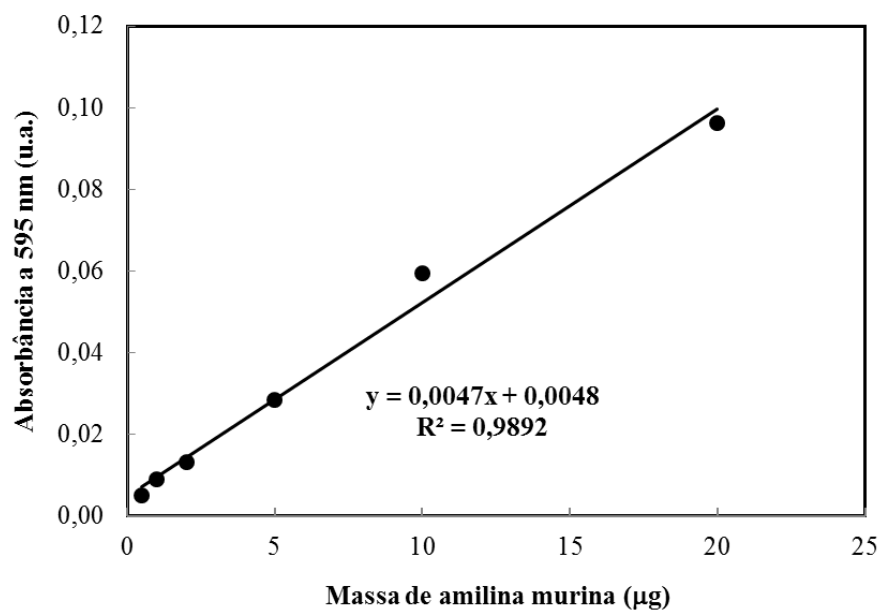


Figura 29: Quantificação de amilina murina livre. A quantificação da amilina murina livre através do método de Bradford apresentou boa linearidade na faixa de massa de amilina testada. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

4.9 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS AMILINAS PEGUILADAS

Os produtos monopeguilado e dipeguilado purificados obtidos das reações de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC (massa molar média de 5kDa) em meio reacional orgânico (DMSO) foram avaliados em relação as suas atividades biológica *in vivo*,

através do monitoramento do potencial desses produtos para reduzir a glicemia em camundongos (Figura 30). O tratamento com amilina não modificada resultou em uma acentuada redução da glicemia, com o valor máximo de efeito em 2 horas após a sua administração subcutânea, e 5 horas após sua administração subcutânea os valores da glicemia tornaram-se semelhantes aos valores de glicemia do grupo controle (Figura 30). Esse resultado está de acordo com os trabalhos de GUERREIRO *et al.*, 2012, GUERREIRO *et al.*, 2013 e YOUNG *et al.*, 1996. Os produtos monopeguilado e dipeguilado purificados obtidos da reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC em DMSO apresentaram uma redução da glicemia com o valor máximo de efeito em 2 horas após a sua administração subcutânea, que foi sustentada até 5 horas, e 24 horas após sua administração subcutânea os valores da glicemia tornaram-se semelhantes aos valores de glicemia do grupo controle. Adicionalmente ao prolongamento do efeito na redução da glicemia, os produtos peguilados também causaram maior redução nos valores de glicemia, comparados aos valores de redução obtidos pelo grupo controle e o grupo da amilina não modificada. Sendo que, o produto dipeguilado apresentou-se mais efetivo que o produto monopeguilado, visto que reduziu mais significativamente os valores da glicemia que o produto monopeguilado. Os resultados mostram que a amilina conjugada, tanto a monopeguilada quanto a dipeguilada, são ainda biologicamente ativas e que as suas cinéticas de absorção aparentes são semelhantes à da amilina não modificada, tal como indicado pelo efeito equivalente sobre a depressão da glicemia. Além disso, ambos os produtos amilina monopeguilada e dipeguilada foram capazes de manter a sua atividade por um período de tempo *in vivo*, compatível com o esperado prolongamento da meia-vida de produtos peguilados (ABUCHOWSKI *et al.*, 1977; HARRIS e CHESS, 2003)

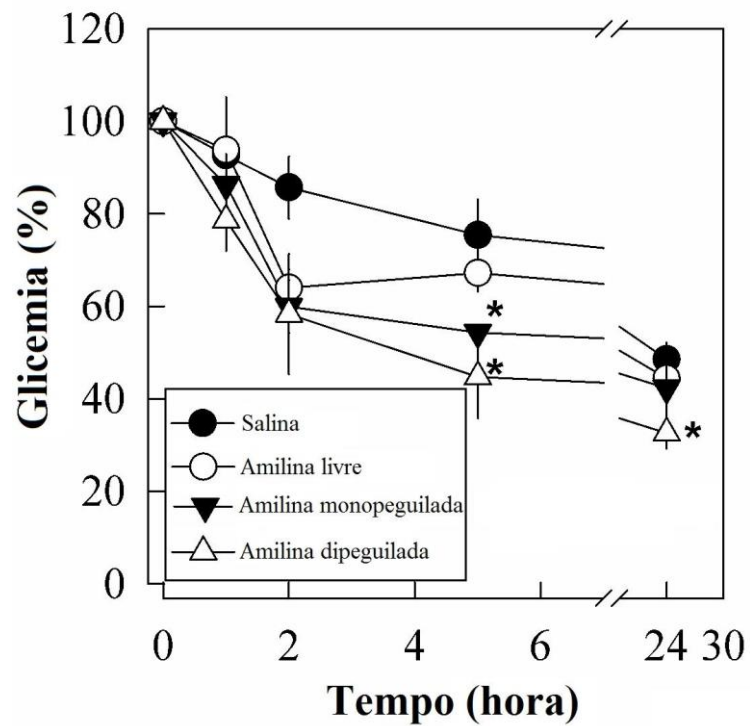


Figura 30: Avaliação farmacológica *in vivo* das amilinas peguiladas obtidas pela reação de peguilação da amilina com o mPEG5kDa-SC. Os experimentos foram realizados com camundongos normais, em jejum por 4 horas e conscientes. Os pontos são médias e as barras são desvios padrões, respectivamente (n=3). (●) grupo controle salina, (○) grupo amilina livre, (▼) grupo amilina monopeguilada e (▽) grupo amilina dipeguilada. * $p < 0.05$ (teste de t não pareado) comparado com grupo controle salina. Detalhes na seção de Materiais e Métodos.

5 DISCUSSÃO

A amilina é um hormônio com papel importante na homeostase de glicose e lactato e na regulação da secreção de insulina e glucagon, ela apresenta nível sérico tipicamente na faixa de 2 a 20 picomolar, em condições de jejum e alimentação, respectivamente. É pouco solúvel em meio aquoso, e forma depósitos amilóides *in vivo* e *in vitro*. Devido ao seu importante papel na homeostase da glicose e por ter sua produção diminuída ou ausente em indivíduos diabéticos, o uso da amilina tem sido visto como um potencial tratamento para o Diabetes Mellitus. Mas, por apresentar a característica de ser pouco solúvel em meio aquoso e formar depósitos amilóides *in vivo* e *in vitro* facilmente, não se consegue usá-la para o tratamento do Diabetes. Assim, um análogo da amilina para o tratamento do Diabetes foi desenvolvido, o Pramlintide.

O Pramlintide possui 3 substituições pontuais de aminoácidos nas posições 25, 28 e 29 por prolina, o que preveniu a formação de depósitos amilóides, mas apresenta efeitos colaterais como náusea, vômito, anorexia e hipoglicemia. Além disso, a administração do Pramlintide no paciente é realizada através de injeções subcutâneas antes das refeições, mimetizando só o nível de amilina pós-prandial, não mimetizando assim, os níveis basais de amilina.

Diante desse cenário, das várias maneiras existentes para se modificar proteínas terapêuticas, e do fato da amilina murina não ser propensa a formação de amilóides *in vivo* e apresentar bioatividade, o presente trabalho teve como principal objetivo modificar quimicamente a amilina murina por meio de reação de peguilação, um tipo de reação química com o uso do polietilenoglicol (PEG), que tem a capacidade de alterar propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de proteínas terapêuticas, amplamente utilizada na produção de vários medicamentos comercializados atualmente, e tendo seu uso aprovado em humanos pelo FDA e outros Órgãos Reguladores, tendo como um dos objetivos tentar aumentar o tempo de meia-vida de circulação da amilina.

A proposta foi escolher derivados de polietilenoglicol capazes de reagir com os dois grupos amina contidos no único resíduo de aminoácido lisina da amilina murina (Figura 2). Tendo em vista que, a lisina não tem interação com parceiros moleculares da amilina, tais como insulina e amilina (GILEAD, WOLFENSON E GAZIT, 2006), a enzima que degrada a

insulina (IDE) (GUO *et al.*, 2010; SHEN *et al.*, 2006), entre outras respostas fisiológicas (WANG *et al.*, 1993; YOUNG, 2005), esse resíduo passa a ser de potencial interesse para conjugação química. Além disso, o metabolismo renal da amilina resulta em des-Lisina¹-amilina, que possui atividade biológica equivalente a amilina não modificada (Pedido de Patente US 2004/0038900 A1).

Assim, os derivados de PEG escolhidos foram o metoxil polietilenoglicol succinimidil carbonato de massas molares médias de 5 kDa (mPEG5kDa-SC), 2 kDa (mPEG2kDa-SC) e 1 kDa (mPEG1kDa-SC) (Figura 5B), e o metoxil polietilenoglicol propionaldeído de massa molar média de 5 kDa (mPEG5kDa-Ald) (Figura 5A). Todos derivados de PEG, com especificidade por grupos amina, segundo a literatura (ROBERTS, BENTLEY e HARRIS, 2002).

Os protocolos utilizados foram adaptados de trabalhos da literatura (KINSTLER *et al.*, 1996; MARK, 2011; MAZZAGLIA *et al.*, 2010; ROBERTS, BENTLEY E HARRIS, 2002). Como a maioria dos trabalhos da literatura usavam meio aquoso para fazer reações de peguilação, testamos meio aquoso, mas por ser mais fácil usar meio orgânico, testamos também meio com DMSO, um solvente em que tanto o PEG quanto a amilina murina são solúveis, e nosso grupo de pesquisa já possuía protocolos de trabalho com a amilina murina e DMSO bem estabelecidos.

De acordo com a literatura (MARK, 2011) as melhores proporções entre o polietilenoglicol e o peptídeo/proteína a serem utilizados em meio aquoso seria de 2 a 3 partes de PEG para 1 parte de peptídeo a até 100 partes de PEG para 1 parte de peptídeo dependendo da situação. Testamos algumas proporções (não mostrados) e decidimos usar a proporção de 10 partes de PEG para 1 parte de peptídeo, devido a maior eficiência da reação demonstrado por resultados de análises por eletroforese (não mostrado).

Foram obtidos resultados satisfatórios em ambos meios reacionais testados, ambas reações ocorreram em poucas horas (não mostrado). As reações foram monitoradas por SDS-PAGE 22,5% e por derivatização química de amina primária com fluorescamina. Comparando todas as reações realizadas, pelos resultados da derivatização com fluorescamina, as reações com mPEG5kDa-SC e mPEG2kDa-SC obtiveram as melhores evoluções reacionais, com maiores quantidades de amilina reagindo em torno de 24 horas de reação (Figura 8).

Os resultados das análises por eletroforese foram bem satisfatórios para os PEG's com massa molar média de 5kDa (Figura 10), mas não foi satisfatório para os PEG's com massa molar média de 2kDa (Figura 11) e 1kDa (Figura 12), tendo em vista que o gel SDS-PAGE 22,5% não foi capaz de mostrar as bandas de produtos peguilados, só sendo possível confirmar que as reações dos mesmos realmente ocorreram por meio da derivatização por fluorescamina (Figura 8).

A reação com o mPEG5kDa-SC de massa molar média de 5kDa teve os seus produtos monopeguilado e dipeguilado satisfatoriamente purificados, visto os resultados da Espectrometria de massas, usando – se cromatografia em fase reversa convencional com gradiente linear (Figura 25). Já na purificação da reação com o mPEG5kDa-Ald de massa molar média de 5kDa, só conseguiu-se purificar o produto monopeguilado (Figura 26), usando-se o mesmo método de purificação. Todas as purificações foram feitas com o mesmo gradiente de solventes. Em todas as purificações os produtos peguilados tiveram tempo de eluição em torno de 9 a 14 minutos e foram observados em torno de 3 picos principais bem resolvidos. O tempo de reação, das reações realizadas para serem purificadas, foi menor baseado nos resultados de cinética e dos géis de eletroforese.

Os resultados das análises por eletroforese das purificações foram bem satisfatórios, pois conseguiu mostrar bem quando os produtos obtidos estavam puros ou misturados, mesmo sendo observadas algumas bandas com intensidade muito baixa. Alguns géis foram corados também com solução de iodo 0,025M para melhor visualização das bandas, já que o Coomassie não cora muito bem a amilina e não cora PEG. Com a coloração do gel com solução de iodo 0,025M, pode-se diferenciar as bandas de produtos peguilados das bandas de substâncias não peguiladas, isto porque o iodo reage com o grupamento de polietilenoglicol, corando-o e não reage com a parte proteica (NA *et al.*, 2004). Os grupamentos de PEG formam um complexo com iodeto de bário, resultando na cor marrom das bandas de substâncias peguiladas. Já as não peguiladas, não são coradas. Evidenciando assim, por exemplo, que o Pool 1 no gel de purificação das Figuras 24B contém amilina livre que não reagiu e as bandas referentes a reação mPEG5kDa-Ald_amilina e aos outros Pools possuem produtos peguilados.

Os resultados da análise de Espectrometria de Massa por Dessorção-Ionização a Laser em matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-ToF-MS) mostraram que realmente as amilinas peguiladas, produtos da reação entre a amilina murina e o mPEG5kDa-SC (Figura

25), e o produto monopeguilado, obtido com a reação entre a amilina murina e o mPEG5kDa-Ald (Figura 26), foram bem purificados e que amilinas mono e dipeguiladas foram obtidas. As amostras escolhidas para análise no massas foram escolhidas com base na análise dos cromatogramas das purificações.

Apesar da fraca interação entre a amilina e o corante azul de Coomassie, o método de Bradford, usado para a quantificação (Figura 29) dos produtos peguilados obtidos, foi de grande valia, visto que seus resultados não sofreram interferência dos derivados de polietilenoglicol. Mas é necessário testar novos métodos de quantificação, em que seja possível obter melhores valores de R^2 , isto é mais próximo de 1, o que daria maior confiança nos resultados das quantificações dos produtos peguilados.

As amostras purificadas, produtos da reação entre a amilina murina e o mPEG5kDa-SC, foram quantificadas e resultaram em rendimento de 14,3% de amilina monopeguilada e de 7,85% de amilina dipeguilada. Já a amostra purificada contendo o produto monopeguilado da reação entre a amilina murina e o mPEG5kDa-Ald, foi quantificada e resultou em rendimento de 4,25% de amilina monopeguilada. O baixo rendimento ocorreu em vista da reatividade dos derivados succinimidil e propionaldeído de PEG por outros grupos funcionais, conforme já mencionado anteriormente, gerando assim pelo menos quatro tipos de produtos reacionais nas reações realizadas com PEG de massa molar média de 5 kDa. A existência desses subprodutos foi confirmada pelos resultados da Espectrometria de Massa por Dessorção-Ionização a Laser em matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-ToF-MS), pelos géis SDS-PAGE obtidos, e pelas análises densitométricas dos géis SDS-PAGE.

Com a boa coerência demonstrada pelos resultados dos géis SDS-PAGE das purificações realizadas e os resultados obtidos pela Espectrometria de Massa por Dessorção-Ionização a Laser em matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-ToF-MS), pôde-se demonstrar que a análise com os géis SDS-PAGE é uma ótima ferramenta para monitorar o progresso da reação de peguilação.

Os receptores da amilina são heterodímeros formados por proteínas modificadoras de atividade de receptor (RAMP) e pelo receptor de alfa calcitonina e beta calcitonina (CTR) (LUTZ, 2011). Como o CTR apresenta duas variantes de splicing, podem existir seis subtipos diferentes de receptores de amilina (CAO *et al.*, 2013). Para analisar se a peguilação da amilina, influenciava na interação da mesma com seus receptores, foram feitas análises de interação entre a RAMP1, a amilina livre, os produtos peguilados obtidos, e o PEG livre, pelo

aluno de doutorado Bruno Melo-Ferreira (não mostrado). Os resultados mostraram que a modificação química da amilina murina com o polietilenoglicol não limitou a interação entre o hormônio e seu co-receptor, e o PEG não apresentou qualquer interação com a RAMP1 (GUTERRES *et al.*, 2013).

Os produtos monopeguilado e dipeguilado purificados obtidos da reação de peguilação da amilina murina com o mPEG5kDa-SC (massa molar média de 5kDa) em meio reacional orgânico (DMSO), foram avaliados em relação as suas atividades biológica *in vivo*, e apresentaram efetividade em reduzir a glicemia em camundongos, em até aproximadamente 5 horas após a administração dos produtos nos camundongos, enquanto o efeito da amilina não modificada na redução da glicemia foi de menor duração. Também em relação ao Pramlintide, que apresenta tempo de meia-vida em humanos de cerca de 20 a 45 minutos (YOUNG, 2005a) e em ratos de cerca de 11,5 a 13,8 minutos (YOUNG *et al.*, 1996) os produtos monopeguilado e dipeguilado obtidos apresentaram maior tempo de ação na redução a glicemia, apresentando assim melhores resultados. Estes dados indicam o efeito da peguilação na redução da meia-vida de circulação da amilina, o que resulta na regulação estendida sobre a homeostase da glicose. Adicionalmente ao prolongamento do efeito na redução da glicemia, os produtos peguilados também causaram maior redução nos valores de glicemia, comparados aos valores de redução obtidos pelo grupo controle e o grupo da amilina não modificada. Sendo que, o produto dipeguilado apresentou-se mais efetivo que o produto monopeguilado, visto que reduziu mais significativamente os valores da glicemia que o produto monopeguilado.

Outras melhorias podem ser realizadas utilizando - se moléculas de PEG com cadeias mais longas, ou pela peguilação de amilina nos sítios reativos adicionais disponíveis, tais como os radicais hidroxilas presentes na Ser, Thr ou resíduos de Tyr. A peguilação de amilina com derivados de maior massa molar (ABUCHOWSKI *et al.*, 1977; HARRIS e CHESS, 2003) podem também ser uma estratégia para aumentar a persistência da atividade biológica da amilina, proporcionando um efeito mais prolongado na glicemia, além do observado aqui usando-se derivado de PEG com massa molar média de 5kDa. Uma investigação mais aprofundada da farmacocinética será necessária para compreender este processo. Os produtos peguilados resultantes da reação com mPEG5kDa-Ald ainda não foram avaliados farmacologicamente, sendo este um dos nossos passos futuros.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitiram concluir que as modificações químicas na amilina murina com PEG's de diferentes tamanhos e diferentes tipos de derivatizações de PEG foram realizadas com sucesso. Os produtos desejados foram obtidos e caracterizados, todos os testes de caracterização apresentaram importantes contribuições e resultados, e a análise por eletroforese demonstrou ser uma ferramenta muito boa para o monitoramento do progresso das reações de peguilação. A partir dos resultados pode-se verificar que a massa molar do derivado de PEG influencia na cinética da reação, e que o derivado succinimidil de PEG reage preferencialmente com os dois grupos amino da lisina 1 da amilina murina. Apesar de grande parte de trabalhos encontrados na literatura realizarem reações de peguilação em meio aquoso, os resultados demonstrados por esse trabalho mostraram que a reação de peguilação também pode ser satisfatoriamente realizada em solventes orgânicos. Os rendimentos das reações de peguilação foram de 14,3% de amilina monopeguilada e de 7,85% de amilina dipeguilada, produtos da reação entre a amilina murina e o mPEG5kDa-SC, e de 4,25% de amilina monopeguilada, produto da reação entre a amilina murina e o mPEG5kDa-Ald, e se mostraram relativamente baixos, dentre um dos motivos, provavelmente devido a baixa seletividade dos derivados de PEG utilizados. A derivatização química da amilina murina por meio de reação com polietilenoglicol realmente foi capaz de prolongar o tempo de meia-vida do polipeptídeo e este teve mantida sua atividade biológica e seu perfil de absorção. A peguilação da amilina possui eficácia para a redução da glicemia em camundongos por tempo prolongado em comparação com amilina não modificada, apresentando potencial para novos medicamentos para o tratamento do Diabetes Mellitus. Como perspectivas futuras serão realizados outros experimentos com o intuito de otimizar as condições das reações de conjugação com PEG como: teste com outros derivados de PEG, com maior seletividade, para diminuir a formação de subprodutos e aumentar o rendimento, testes com PEG de maiores massas molares, para tentar prolongar o tempo de meia-vida dos bioconjugados de amilina, testes com outros tipos de solventes na busca por melhores rendimentos, busca por metodologias alternativas de purificação para a melhora do rendimento e para a purificação da amilina dipeguilada, produto da reação entre a amilina murina e o mPEG5kDa-Ald, que não conseguiu-se purificar, etc. A partir dos resultados contidos no presente trabalho e de todos os resultados obtidos no mestrado, conseguiu-se publicar dois trabalhos (em anexo), e depositar um pedido de patente (em anexo).

REFERÊNCIAS

- ABUCHOWSKI, A. et al. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. **The Journal of biological chemistry**, v. 252, n. 11, p. 3578–3581, 10 jun. 1977.
- ABUCHOWSKI, A. et al. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. **The Journal of biological chemistry**, v. 252, n. 11, p. 3578–3581, 10 jun. 1977.
- ADEGHATE, E. Amylin Analogues in the Treatment of Diabetes Mellitus: Medicinal Chemistry and Structural Basis of its Function. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, n. 1, p. 78–81, 9 set. 2011.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes--2013. **Diabetes Care**, v. 36, n. Supplement_1, p. S11–S66, 20 dez. 2012.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 36, n. Supplement_1, p. S67–S74, 20 dez. 2012.
- ANNES, M. et al. Amiloidose. v. 1, n. 5, p. 07–13, 1997.
- AYALA, J. E. et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. **Disease Models & Mechanisms**, v. 3, n. 9-10, p. 525–534, 16 ago. 2010.
- BAILON, P. et al. Rational Design of a Potent, Long-Lasting Form of Interferon: A 40 kDa Branched Polyethylene Glycol-Conjugated Interferon α -2a for the Treatment of Hepatitis C. **Bioconjugate Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 195–202, mar. 2001.
- BAILON, P.; BERTHOLD, W. Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 8, p. 352–356, nov. 1998.
- BALASUBRAMANIAM, A. et al. Syntheses, structures and anorectic effects of human and rat amylin. **Peptides**, v. 12, n. 5, p. 919–924, out. 1991.
- BASTAKI, S. Diabetes mellitus and its treatment. v. 13, p. 111–134, 2005.
- BENNETT, R. G. Degradation of Amylin by Insulin-degrading Enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 36621–36625, 5 set. 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRETHERTON-WATT, D. et al. Failure to establish islet amyloid polypeptide (amylin) as a circulating beta cell inhibiting hormone in man. **Diabetologia**, v. 33, n. 2, p. 115–117, fev. 1990.
- BRETHERTON-WATT, D. et al. Very high concentrations of islet amyloid polypeptide are necessary to alter the insulin response to intravenous glucose in man. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 74, n. 5, p. 1032–1035, maio 1992.

- BUTLER, P. C. et al. Effects of meal ingestion on plasma amylin concentration in NIDDM and nondiabetic humans. **Diabetes**, v. 39, n. 6, p. 752–756, jun. 1990.
- CAO, P. et al. Islet amyloid: From fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1106–1118, abr. 2013.
- CHANCE, W. T. et al. Anorexia following the intrahypothalamic administration of amylin. **Brain Research**, v. 539, n. 2, p. 352–354, jan. 1991.
- CHENG, T.-L. et al. Analytical Measurement of PEGylated Molecules. **Bioconjugate Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 881–899, 16 maio 2012.
- CLARK, A.; NILSSON, M. R. Islet amyloid: a complication of islet dysfunction or an aetiological factor in Type 2 diabetes? **Diabetologia**, v. 47, n. 2, p. 157–169, 1 fev. 2004.
- COOPER, G. J. et al. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 23, p. 8628–8632, dez. 1987.
- DA SILVA FREITAS, D.; ABRAHÃO-NETO, J. Biochemical and biophysical characterization of lysozyme modified by PEGylation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 392, n. 1-2, p. 111–117, 15 jun. 2010.
- DE ANGELIS, K. et al. Efeitos fisiológicos do treinamento físico em pacientes portadores de diabetes tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1005–1013, dez. 2006.
- EDELMAN, S. V. Optimizing Diabetes Treatment Using an Amylin Analogue. **The Diabetes Educator**, v. 34, n. 1 suppl, p. 4S–10S, 1 jan. 2008.
- FEE, C. J.; VAN ALSTINE, J. M. PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 3, p. 924–939, fev. 2006.
- GHATEI, M. A. et al. Amylin and amylin-amide lack an acute effect on blood glucose and insulin. **The Journal of endocrinology**, v. 124, n. 2, p. R9–11, fev. 1990.
- GILEAD, S.; WOLFENSON, H.; GAZIT, E. Molecular mapping of the recognition interface between the islet amyloid polypeptide and insulin. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, v. 45, n. 39, p. 6476–6480, 6 out. 2006.
- GUERREIRO, L. H. et al. Polymeric particles for the controlled release of human amylin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 94, p. 101–106, jun. 2012.
- GUERREIRO, L. H. et al. Amylin induces hypoglycemia in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 1, p. 349–354, 1 mar. 2013.
- GUO, Q. et al. Molecular basis for the recognition and cleavages of IGF-II, TGF-alpha, and amylin by human insulin-degrading enzyme. **Journal of molecular biology**, v. 395, n. 2, p. 430–443, 15 jan. 2010.
- GUTERRES, M. F. et al. Amylin Conjugation with Methoxyl Polyethyleneglycol. **Protein and peptide letters**, 9 jul. 2013.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 3, p. 214–221, mar. 2003.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 3, p. 214–221, mar. 2003.

HOLLANDER, P. et al. Effect of Pramlintide on Weight in Overweight and Obese Insulin-Treated Type 2 Diabetes Patients**. **Obesity**, v. 12, n. 4, p. 661–668, abr. 2004.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF diabetes atlas update 2012**, 2012. Disponível em: <http://www.idf.org/sites/default/files/5E_IDFAtlasPoster_2012_EN.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2013

INZUCCHI, S. E. et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. Position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). **Diabetologia**, v. 55, n. 6, p. 1577–1596, 20 abr. 2012.

JAMES, J. H. et al. Stimulation of both aerobic glycolysis and Na(+)-K(+)-ATPase activity in skeletal muscle by epinephrine or amylin. **The American journal of physiology**, v. 277, n. 1 Pt 1, p. E176–186, jul. 1999.

KINSTLER, O. B. et al. Characterization and stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF. **Pharmaceutical research**, v. 13, n. 7, p. 996–1002, jul. 1996.

KONARKOWSKA, B. et al. The aggregation potential of human amylin determines its cytotoxicity towards islet β -cells. **FEBS Journal**, v. 273, n. 15, p. 3614–3624, ago. 2006.

KRUGER, D. F.; GATCOMB, P. M.; OWEN, S. K. Clinical Implications of Amylin and Amylin Deficiency. **The Diabetes Educator**, v. 25, n. 3, p. 389–397, 1 maio 1999.

KRUGER, D. F.; GATCOMB, P. M.; OWEN, S. K. Clinical Implications of Amylin and Amylin Deficiency. **The Diabetes Educator**, v. 25, n. 3, p. 389–397, 1 maio 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LUTZ, T. A. Control of energy homeostasis by amylin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 12, p. 1947–1965, 23 dez. 2011.

MARK, S. S. **Bioconjugation protocols strategies and methods**. New York: Humana : Springer, 2011.

MAZZAGLIA, A. et al. Aggregation Properties of the Peptide Fragments Derived from the 17-29 Region of the Human and Rat IAPP: A Comparative Study with Two PEG-Conjugated Variants of the Human Sequence. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 2, p. 705–713, 21 jan. 2010.

MILTON, N. G. N.; HARRIS, J. R. Fibril formation and toxicity of the non-amyloidogenic rat amylin peptide. **Micron**, v. 44, p. 246–253, jan. 2013.

NA, D. H. et al. Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoresis of polyethylene glycolylated interferon alpha. **Electrophoresis**, v. 25, n. 3, p. 476–479, fev. 2004.

National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC). , [s.d.]. Disponível em: <<http://diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/diagnosis/#3>>. Acesso em: 6 out. 2013

NISHI, M.; STEINER, D. F. Cloning of Complementary DNAs Encoding Islet Amyloid Polypeptide, Insulin, and Glucagon Precursors from a New World Rodent, the Degu, *Octodon degus*. **Molecular Endocrinology**, v. 4, n. 8, p. 1192–1198, 1 ago. 1990.

PANAGIOTIDIS, G. et al. Homologous islet amyloid polypeptide: effects on plasma levels of glucagon, insulin and glucose in the mouse. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 18, n. 3, p. 167–171, dez. 1992.

PEGylated protein drugs: basic science and clinical applications. Basel ; Boston: Birkhäuser, 2009.

PESARU, R. R. **Insulin Based Inhibitors of Human Islet Amyloid Polypeptide (hIAPP) and Their Effect on Aggregation of hIAPP in the Treatment of Type II Diabetes**. Master's Theses and Doctoral Dissertations.—Michigan: Eastern Michigan University, 2011.

PRICE, C. J.; HOYDA, T. D.; FERGUSON, A. V. The Area Postrema: A Brain Monitor and Integrator of Systemic Autonomic State. **The Neuroscientist**, v. 14, n. 2, p. 182–194, 26 nov. 2007.

QASEEM, A. Oral Pharmacologic Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Practice Guideline From the American College of Physicians. **Annals of Internal Medicine**, v. 156, n. 3, p. 218, 7 fev. 2012.

RATNER, R. E. et al. Amylin replacement with pramlintide as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycaemic and weight control in Type 1 diabetes mellitus: a 1-year, randomized controlled trial. **Diabetic Medicine**, v. 21, n. 11, p. 1204–1212, nov. 2004.

ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 4, p. 459–476, jun. 2002.

RODRIGUES, T. M. B.; SILVA, I. N. Estatura final de pacientes com diabetes mellitus do tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 1, fev. 2001.

SCHEFFEL, R. S. et al. Prevalência de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes melito do tipo 2 em atendimento ambulatorial. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 3, p. 263–267, set. 2004.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jun. 2012.

SHEN, Y. et al. Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 870–874, 19 out. 2006.

SHERIFF, S.; FISCHER, J. E.; BALASUBRAMANIAM, A. Amylin inhibits insulin-stimulated glucose uptake in C2C12 muscle cell line through a cholera-toxin-sensitive mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1136, n. 2, p. 219–222, ago. 1992.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus; Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes** Sociedade Brasileira de Diabetes, , 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Algoritmo para o tratamento do diabetes tipo 2**, 3 jul. 2011.

STROHALM, M. et al. mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 6, p. 905–908, 30 mar. 2008.

UDENFRIEND, S. et al. Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. **Science (New York, N.Y.)**, v. 178, n. 4063, p. 871–872, 24 nov. 1972.

VERONESE, F. M.; PASUT, G. PEGylation, successful approach to drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 21, p. 1451–1458, nov. 2005.

WANG, M. W. et al. Amylin is more potent and more effective than glucagon in raising plasma glucose concentration in fasted, anesthetized rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 181, n. 3, p. 1288–1293, 31 dez. 1991.

WANG, Z. L. et al. Influence of islet amyloid polypeptide and the 8-37 fragment of islet amyloid polypeptide on insulin release from perfused rat islets. **Diabetes**, v. 42, n. 2, p. 330–335, fev. 1993.

WESTERMARK, P. et al. Islet amyloid in type 2 human diabetes mellitus and adult diabetic cats contains a novel putative polypeptide hormone. **The American journal of pathology**, v. 127, n. 3, p. 414–417, jun. 1987.

WHITEHOUSE, F. et al. A Randomized Study and Open-Label Extension Evaluating the Long-Term Efficacy of Pramlintide as an Adjunct to Insulin Therapy in Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, n. 4, p. 724–730, 1 abr. 2002.

WOJDYR, M. Fityk : a general-purpose peak fitting program. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 5, p. 1126–1128, 10 set. 2010.

WU, J. J.; PENG, H. T.; SHEK, P. N. Terminal-specific PEGylation of polypeptides in a dilute solution. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, n. 6, p. 3269–3273, 15 dez. 2010.

YOUNG, A. **Amylin: physiology and pharmacology**. Amsterdam; Boston: Elsevier/AP, 2005.

YOUNG, A. Receptor pharmacology. **Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 52, p. 47–65, 2005.

YOUNG, A. A. et al. Preclinical pharmacology of pramlintide in the rat: Comparisons with human and rat amylin. **Drug Development Research**, v. 37, n. 4, p. 231–248, abr. 1996.

YOUNG, A. A.; WANG, M.-W.; COOPER, G. J. S. Amylin injection causes elevated plasma lactate and glucose in the rat. **FEBS Letters**, v. 291, n. 1, p. 101–104, out. 1991.

ANEXO1 – Pedido de patente

< Uso exclusivo do INPI >



Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 01
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**

- 1.1 Nome: UIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
 1.2 Qualificação: AUTARQUIA FEDERAL
 1.3 CNPJ/CPF: 33663683/0001-16
 1.4 Endereço Completo: Av. Pedro Calmon, 550-Reitoria, 2ºand. Cidade Universitária
 1.5 CEP: 21941-901
 1.6 Telefone: 21 3733-1793 1.7 Fax: 21 2598-1838
 1.8 E-mail: agenciadeinovacao@inovacao.ufrj.br

 continua em folha anexa

2. **Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**

BIOCONJUGADOS NÃO AGLOMERANTES DE AMILINOMIMÉTICOS COM POLIETILENOGLICOL,
 USO DE BIOCONJUGADOS NÃO AGLOMERANTES DE AMILINOMIMÉTICOS COM
 POLIETILENOGLICOL, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE BAIXA TOXICIDADE, ADJUVANTE
 PARA A PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DAS DOENÇAS, MEDICAMENTO, MÉTODO DE

 continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão:** do pedido Nº **Data de Depósito:**

5. **Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

 continua em folha anexa

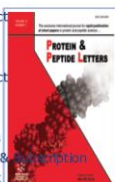
ANEXO2 – Artigo publicado

09/10/13

Amylin Conjugation with Methoxyl Polyethyleneglycol | BenthamScience


[Login](#) [Register](#) [Shopping cart](#)

Home
Browse
Journals
By Title
By Subject
eBooks
By Title
By Subject
Search
Contact
About Us
Ordering &
Feedback



Protein & Peptide Letters

ISSN (Print): 0929-8665
ISSN (Online): 1875-5305
VOLUME: 20
ISSUE: 11
DOI: 10.2174/09298665113209990067 **Price:** \$58

[Back](#) [Mark Item](#) [Add to Cart](#)

Amylin Conjugation with Methoxyl Polyethyleneglycol

Author(s): Mariana F. A. N. Guterres, Luiz Henrique Guerreiro, Bruno Melo-Ferreira, Luíza C. S. Erthal and Luís Maurício T. R. Lima
Pages 1264-1271 (8)

Abstract:

We modified amylin chemically by conjugating methoxyl polyethyleneglycol succinimidyl carbonate (mPEGSC) of varying molecular weights (1 kDa, 2 kDa and 5 kDa). The reaction occurred within a few minutes, resulting in at least four distinct PEGylated products. The reaction products were separated by reversed-phase chromatography and identified by mass-spectrometry. The monoPEGylated and diPEGylated amylin products were generated rapidly through conjugation to the two amino groups of the N-terminal lysine residue. Both PEGylated amylin products bound to the receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1). Pharmacological evaluation by subcutaneous administration in mice of monoPEGylated and diPEGylated amylin obtained with mPEG-SC 5 kDa revealed that both compounds modulated glycemia for longer times than unmodified amylin. Collectively, these data demonstrate the potential of bioconjugation with mPEG for the design of amylin therapeutics with sustained action.

Keywords:

Amylin, diabetes, glycemia, islet associated polypeptide, PEGylation.

Affiliation:

Laboratory for Pharmaceutical Biotechnology – pbitech – School of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro – UFRJ, Av Carlos Chagas Filho 373, CCS, Bss34, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, 21941-902, Brazil.

Copyright © 2013 Bentham Science Publishers. All Rights Reserved. Terms & Conditions

← → www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23855659

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

PubMed.gov PubMed Search Help

US National Library of Medicine
National Institutes of Health

PubMed is open, however it is being maintained with minimal staffing due to the lapse in government funding. Information will be updated to the extent possible, and the agency will attempt to respond to urgent operational inquiries. For updates regarding government operating status see [USA.gov](#).

Display Settings: Abstract Send to: [BenthamScience](#) [Full-Text Article](#)

Protein Pept Lett. 2013 Nov;20(11):1264-71.

Amylin conjugation with methoxyl polyethyleneglycol.

Guterres MF, Guerreiro LH, Melo-Ferreira B, Erthal LC, Lima LM
Laboratory for Pharmaceutical Biotechnology – pbitech – School of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro – UFRJ, Av Carlos Chagas Filho 373, CCS, Bss34, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, 21941-902, Brazil. LML@UFRJ.BR

Abstract
We modified amylin chemically by conjugating methoxyl polyethyleneglycol succinimidyl carbonate (mPEGSC) of varying molecular weights (1 kDa, 2 kDa and 5 kDa). The reaction occurred within a few minutes, resulting in at least four distinct PEGylated products. The reaction products were separated by reversed-phase chromatography and identified by mass-spectrometry. The monoPEGylated and diPEGylated amylin products were generated rapidly through conjugation to the two amino groups of the N-terminal lysine residue. Both PEGylated amylin products bound to the receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1). Pharmacological evaluation by subcutaneous administration in mice of monoPEGylated and diPEGylated amylin obtained with mPEG-SC 5 kDa revealed that both compounds modulated glycemia for longer times than unmodified amylin. Collectively, these data demonstrate the potential of bioconjugation with mPEG for the design of amylin therapeutics with sustained action.

PMID: 23855659 [PubMed - in process]

LinkOut - more resources

Save items
Add to Favorites

Related citations in PubMed
Preparation and Characterization of PEGylated Amylin. [AAPS PharmSciTech. 2013]
Characterization of amylin and calcitonin receptor binding in the mouse alpha [Endocrinology. 1997]
An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin [Endocrinology. 1999]
Review Receptor pharmacology. [Adv Pharmacol. 2005]
Review Functional relevance of G-protein-coupled receptor (GPCR) [Biochem Soc Trans. 2009]

ANEXO3 – Artigo publicado

The screenshot shows the PubMed website interface. At the top, there is a search bar with 'PubMed' selected and a search button. Below the search bar, there is a notification about PubMed's operational status. The main content area displays the article title 'Preparation and Characterization of PEGylated Amylin' by Guerreiro L.H., Guterres M.F., Melo-Ferreira B., Erthal L.C., da Silva Rosa M., Lourenço D., Tinoco P., and Lima L.M. The abstract text is visible, starting with 'Amylin is a pancreatic hormone that plays important roles in overall metabolism and in glucose homeostasis...'. On the right side, there are options to 'Save items', 'Add to Favorites', and 'Related citations in PubMed'. The bottom of the screenshot shows the 'LinkOut - more resources' section.

AAPS PharmSciTech, Vol. 14, No. 3, September 2013 (© 2013)
DOI: 10.1208/s12249-013-9987-4

Research Article

Preparation and Characterization of PEGylated Amylin

Luiz Henrique Guerreiro,¹ Mariana F. A. N. Guterres,¹ Bruno Melo-Ferreira,¹ Luiza C. S. Erthal,¹ Marcela da Silva Rosa,² Daniela Lourenço,² Priscilla Tinoco,¹ and Luís Maurício T. R. Lima^{1,2,3,4}

Received 10 December 2012; accepted 28 May 2013; published online 2 July 2013

Abstract. Amylin is a pancreatic hormone that plays important roles in overall metabolism and in glucose homeostasis. The therapeutic restoration of postprandial and basal amylin levels is highly desirable for patients with diabetes who need to avoid glucose excursions. Protein conjugation with polyethylene glycol (PEG) has long been known to be a convenient approach for extending the biological effects of biopharmaceuticals. We have investigated the reactivity of amylin with methoxy polyethylene glycol succinimidyl carbonate and methoxy polyethylene glycol succinimidyl propionate, which have an average molecular weight of 5 kDa. The reaction, which was conducted in both aqueous and organic (dimethyl sulfoxide) solvents, occurred within a few minutes and resulted in at least four detectable products with distinct kinetic phases. These results suggest a kinetic selectivity for PEGylation by succinimidyl derivatives; these derivatives exhibit enhanced reactivity with primary amine groups, as indicated by an evaluation of the remaining amino groups using fluorescamine. The analysis of tryptic fragments from mono- and diPEGylated amylin revealed that conjugation occurred within the 1-11 amino acid region, most likely at the two amine groups of Lys¹. The reaction products were efficiently separated by C-18 reversed phase chromatography. Binding assays confirmed the ability of mono- and diPEGylated amylin to interact with the amylin co-receptor receptor activity-modifying protein 2. Subcutaneous administration in mice revealed the effectiveness of monoPEG-amylin and diPEG-amylin in reducing glycemia; both compounds exhibited prolonged action compared to unmodified amylin. These features suggest the potential use of PEGylated amylin to restore basal amylin levels.

KEY WORDS: amylin; diabetes; islet-associated polypeptide; PEGylation; receptor activity-modifying protein.