



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUIZ HENRIQUE GUERREIRO ROSADO

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE
AMILINOMIMÉTICOS E BIOCONJUGADOS PARA FINS
TERAPÊUTICOS

RIO DE JANEIRO

2013

LUIZ HENRIQUE GUERREIRO ROSADO

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE
AMILINOMIMÉTICOS E BIOCONJUGADOS PARA FINS
TERAPÊUTICOS**

Tese de doutorado 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 Doutor em Ciências.

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

RIO DE JANEIRO

2013

R788p

Rosado, Luiz Henrique Guerreiro.

Planejamento, síntese e avaliação funcional de amilnomiméticos e bioconjugados para fins terapêuticos/ Luiz Henrique Guerreiro Rosado; orientador Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima. - Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2013.

xviii,139f. : il.; 30 cm.

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

Inclui bibliografia.

1. Amilina. 2. Peguilação. 3. Diabetes Mellitus. 4. Bioconjugação. 5. Biotecnologia farmacêutica. I. Lima, Luís Maurício Trambaioli da Rocha e.

CDD 616.462

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE
AMILINOMIMÉTICOS E BIOCONJUGADOS PARA FINS TERAPÊUTICOS**

LUIZ HENRIQUE GUERREIRO ROSADO

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Avaliado por:

Orientador:

Professor Dr. Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Revisora:

Professora Dra. Cláudia Pinto Figueiredo
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Banca examinadora:

Professora Dra. Patricia Zancan
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Professor Dr. José Carlos Costa da Silva Pinto
Coordenação dos Programas de Pós-graduação em Engenharia - UFRJ

Professora. Dra. Carmen Cabanelas Pazos de Moura
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Rio de Janeiro

2013

*Dedico este trabalho à minha mãe,
esposa e irmãs, por terem feito
de mim o homem que sou.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente ajudaram na elaboração desta tese:

Aos professores, alunos e amigos da Faculdade de Farmácia da UFRJ pelo apoio e valiosos conselhos que me foram dados nestes anos;

Ao professor Luís Maurício por ter confiado a mim este trabalho e estar sempre disponível para discutir resultados e dar sugestões, que foram sempre decisivas para este trabalho;

À minha esposa Priscilla pela paciência, incentivo, compreensão e ajuda em diversos experimentos aqui expostos;

À mestranda Mariana Guterrez pela ajuda com os infundáveis géis;

À Dr^a. Daniella M. Mizurini por colaborar com as cirurgias em ratos anestesiados;

Aos colegas do CNRMN pela paciência e auxílio com o *speed vac*;

Ao CEMBio pelos serviços tão bem atendidos;

Às doutoras Marcela da Silva Rosa e Daniela Lourenço do DIMAV por realizarem a digestão dos produtos peguilados de amilina;

Ao doutorando Bruno Melo e à aluna de iniciação científica Luiza pelas incontáveis ajudas, socorros e por possibilitar os ensaios de ligação de amilina aos seus receptores;

Ao professor Mauro Sola-Penna e ao Dr. Daniel da Silva pela substancial colaboração com os ensaios farmacológicos;

Ao doutorando Nailton Jr. pelo auxílio na revisão deste manuscrito;

À banca de acompanhamento, prof^{as}. Ana Luisa e Yraima pelas sugestões e críticas sempre tão bem pontuadas;

À Fundação de Apoio à Escola Técnica e Hygeia Pesquisa e Desenvolvimento S.A., locais nos quais trabalho, e, que gentilmente aceitaram e incentivaram minha busca por aperfeiçoamento profissional e

Aos órgãos de fomento científico e Ministério da Educação por possibilitarem este e muitos outros trabalhos em nosso país.

RESUMO

O Diabetes Mellitus é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar de grande repertório de produtos para controle glicêmico, ainda há lacunas farmacológicas e farmacocinéticas a serem preenchidas. A amilina é um hormônio pancreático secretado pelas células beta e possui diversos efeitos benéficos ao controle glicêmico, todavia, este hormônio peptídico apresenta diversos desafios para seu uso na forma de medicamento. O presente trabalho teve por objetivo o aperfeiçoamento de um modelo farmacológico capaz de discernir intensidade e tempo de efeito para ser utilizado nas avaliações de protótipos a amilnomiméticos, incluindo fragmentos da sequência de amilina humana e formas derivatizadas com polietilenoglicol de amilina murina. O modelo farmacológico proposto se mostrou reprodutível independentemente de analista, local de trabalho ou demais pequenas modificações que foram impostas a estes afim de se avaliar sua robustez. Assim, observou-se que a amilina é capaz de induzir, tanto em camundongos sadios quanto diabéticos, um efeito hipoglicemiante por um período de 1-4 horas após sua administração. Os peptídeos contendo fragmentos da sequência de amilina não apresentaram efeito hipoglicemiante, tendo os peptídeos com sequências K₁CNTATCATQ₁₀, Q₁₀RLANFL₁₆ e S₂₈STNVGSNTY₃₇ sido hiperglicemiante em doses elevadas, indicando que a amilina necessita de sua forma completa para ligação e promoção de seus efeitos fisiológicos. A amilina murina foi peguilada utilizando reagentes contendo o grupamento succinimidil, os quais reagem preferencialmente com aminas primárias como as presentes na lisina *N*-terminal do peptídeo estudado. Esta estratégia se mostrou satisfatória para prolongar o efeito hipoglicemiante da amilina em mais de duas vezes o tempo da amilina na forma livre.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a disease that affects millions of people around the world. Despite the large repertoire of products for glycemic control available so far, there are still pharmacological and pharmacokinetic gaps to be filled. Amylin is a hormone secreted by pancreatic beta cells and has several beneficial effects on glycemic control, however, this hormone has many challenges to its use as medicine. The present work aimed at the development of a pharmacological model able to discern the intensity and duration of effect to be used in evaluations of amylinmimetic prototypes, including fragments of human amylin and derivatized form with polyethylene glycol murine amylin (amylin pegylated). The pharmacological model proposed showed reproducible regardless analyst, workplace or other small changes that were imposed on them in order to assess its robustness. Thus, it was observed that amylin is able to induce, both in healthy as diabetic mice, hypoglycemic effect for a period of up to 1-4 hours after administration. The peptide fragments containing the sequence of amylin had no hypoglycemic effect, and peptides with sequences K₁CNTATCATQ₁₀, Q₁₀RLANFL₁₆ and S₂₈STNVGSNTY₃₇ been hyperglycaemic in high doses, indicating that amylin requires its complete form for binding and promoting their physiological effects. Amylin murine was pegylated using succinimidyl group containing agents, which react preferentially with primary amines such as lysine present in the *N*-terminal of the peptide under study. This strategy proved satisfactory to extend the hypoglycemic effect of amylin more than twice the periode of the free murine amylin.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Cronologia das principais descobertas no estudo do Diabetes Mellitus.....	5
Tabela 2 – Classificação do DM segundo a Associação Americana de Diabetes.....	7
Tabela 3 – Principais fatores de risco para o surgimento do DM (MOTTA, 2009).....	11
Tabela 4 – Percentual de indivíduos que referem diagnóstico médico de diabetes, no conjunto da população adulta (≥ 18 anos) das capitais dos estados brasileiros e Distrito Federal, por sexo, segundo idade e anos de escolaridade. Vigitel, 2011.....	14
Tabela 5 – Medicamentos vendidos através do programa Farmácia Popular para tratamento do DM (fonte Ministério da Saúde).....	15
Tabela 6 – Regiões da sequência da amilina com potencial amiloidogênico.....	21
Tabela 7 – Densitometria normalizada do gel contendo a cinética reacional entre amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em PBS pH 7,4, t.a.....	90
Tabela 8 – Densitometria normalizada do gel contendo a cinética reacional entre amilina murina e mPEG propionato (1:10) em PBS pH 7,4, t.a.....	91
Tabela 9 – Densitometria normalizada do gel contendo a cinética reacional entre amilina murina e mPEG carbonato (1:2) em DMSO a t.a.....	98
Tabela 10 – Densitometria normalizada do gel contendo a cinética reacional entre amilina murina e mPEG carbonato (1:5) em DMSO a t.a.....	98
Tabela 11 – Densitometria normalizada do gel contendo a cinética reacional entre amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em DMSO a t.a.....	99
Tabela 12 – Composição dos eluatos e seus tempos de retenção:.....	104
Tabela 13 – Possíveis produtos da digestão de amilina murina por tripsina.....	109
Tabela 14 – Análise picos referentes às massas moleculares dos mPEGs, produtos peguilados e fragmentos trípticos.....	110
Tabela 15 – Alinhamento das sequências de antagonista de amilina com esta.....	122

Índice de Figuras

Figura 1 – Prevalência de casos de DM no mundo.....	12
Figura 2 – Perfil de distribuição etária dos casos diagnosticados de DM de acordo com o desenvolvimento socioeconômico.....	13
Figura 3 – Prevalências de DM segundo local e sexo no Brasil.....	14
Figura 4 – Histologia do pâncreas.....	18
Figura 5 – Fibra amilóides de amilina humana visualizadas por MET.....	21
Figura 6 – Sequências de aminoácidos da amilina humana, amilina de rato/camundongo (murina) e pramlintide.....	33
Figura 7 – Produtos peguilados, já comercializados ou em fase de pesquisa clínica.....	40
Figura 8 – Síntese de polietilenoglicol.....	41
Figura 9 – PEG diclorotriazina e sua reação com aminas primárias de proteínas.....	43
Figura 10 – PEGs alquilantes e seus produtos.....	44
Figura 11 – PEG succinimidil carbonato e seu produto.....	44
Figura 12 – PEG benzotriazol carbonato e seu produto.....	45
Figura 13 – Reações entre PEG p-nitrofenil carbonato, acima, e PEG triclorofenil, abaixo.....	46
Figura 14 – PEG succinimidil succinato e seu produto.....	46
Figura 15 – Formação de PEG aldeído in situ.....	47
Figura 16 – PEGs para ligação à cisteínas.....	49
Figura 17 – Reação entre fluorescamina e aminas de proteínas.....	60

Figura 18 – Gradiente utilizado para purificar amilina peguilada por cromatografia de fase reversa.....	65
Figura 19 – Efeito da amilina murina sobre a glicemia de camundongos saudáveis, alimentados e não anestesiados.....	70
Figura 20 – Efeito da amilina murina sobre a glicemia de camundongos normoglicêmicos, não anestesiados e sem alimentação durante o experimento.....	71
Figura 21 – Efeito da amilina murina sobre a glicemia de camundongos em jejum de 4h e após administração i.p. de 2g/Kg de glicose.....	72
Figura 22 – Efeito da amilina murina sobre a glicemia de camundongos não diabéticos, não anestesiados e em jejum de 4h.....	73
Figura 23 – Avaliação da reprodutibilidade e resistência do modelo experimental adotado para avaliar os efeitos da amilina sobre a glicemia de camundongos e jejum.....	74
Figura 24 – Efeito da amilina humana sobre a glicemia de camundongos e MET da amostra injetada.....	75
Figura 25 – Dose-resposta da amilina murina sobre a glicemia.....	76
Figura 26 – Efeito da administração de amilina murina sobre os níveis de insulina e glucagon de camundongos em jejum 4h.....	77
Figura 27 – Efeito da amilina sobre a glicemia de camundongos diabéticos (DMTI-STZ).....	78
Figura 28 – MET de fibras amiloides formadas pelos peptídeos hAMY9-19 A e B e hAMY28-37 C e D. Os peptídeos foram dissolvidos a 1,0 mg/mL em solução de NaCl 0,9%.....	80
Figura 29 – Efeito do peptídeo hAMY1-10 sobre a glicemia de camundongos em jejum 4h.....	81
Figura 30 – Efeito do peptídeo hAMY10-16 sobre a glicemia de camundongos em jejum 4h.....	82
Figura 31 – Efeito do peptídeo hAMY9-19 sobre a glicemia de camundongos em jejum 4h.....	83
Figura 32 – Efeito do peptídeo hAMY28-37 sobre a glicemia de camundongos em jejum 4h.....	84
Figura 33 – Efeito sobre a glicemia de camundongos em jejum 4h dos peptídeos derivados da sequência de amilina humana.....	85
Figura 34 – Cinética reacional da peguilação de amilina murina acompanhada por fluorescência de fluorescamina.....	87
Figura 35 – Cinética da reação entre amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em PBS pH 7,4, t.a.....	89
Figura 36 – Cinética da reação entre amilina murina e mPEG propionato (1:10) em PBS pH 7,4, T.A.....	91
Figura 37 – Cinética da reação entre amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em PBS pH 7,4, T.A.....	92
Figura 38 – Espectro de massas do meio reacional após 1 minuto de experimento contendo amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em PBS pH 7,4 a t.a.....	93
Figura 39 – Espectro de massas do meio reacional após 20 horas de experimento contendo amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em PBS pH 7,4 a t.a.....	93
Figura 40 – Amilina murina monopeguilada, picos em destaque.....	94
Figura 41 – Cinética da reação de peguilação de amilina murina acompanhada por fluorescência de fluorescamina.....	95
Figura 42 – Cinética da reação entre amilina murina e mPEG carbonato em DMSO e com diferentes razões estequiométricas entre amilina e mPEG.....	97
Figura 43 – Tentativas de purificação de amilina peguilada por SEC.....	101
Figura 44 – Cromatograma de Amilina Murina, massa injetada de 50 µg, utilizando coluna de fase reversa e monitorado a 220 nm.....	102
Figura 45 – Purificação da reação amilina:mPEG carbonato.....	103
Figura 46 – Purificação da reação amilina:mPEG propionato.....	104
Figura 47 – Purificação da reação amilina:mPEG carbonato, condições otimizadas.....	106
Figura 48 – Análise do eluato contendo formas peguiladas de amilina murina.....	107
Figura 49 – Análise da estrutura primária da amilina murina e identificação de aminoácidos com cadeias laterais possivelmente reativas com mPEG-succinimidil.....	108

Figura 50 – Ligação da amilina e seus derivado com RAMP2.....	112
Figura 51 – Efeito sobre a glicemia de camundongos em jejum das forma peguiladas de amilina.	113
Figura 52 – Fibras amiloides de peptídeos derivados da amilina.....	120

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- a.C. – Antes de Cristo
- A β – *Amyloid Beta Peptide* (Peptido Beta Amiloido)
- ADA – American Diabetes Association (Associação Americana de Diabestes)
- anti-GAD-65 e 67 – Anticorpo contra ácido glutâmico descarboxilase-65 e -67
- anti-HSP-65 – Anticorpo contra proteína de choque térmico 65
- anti-insulina – Anticorpo contra insulina
- CCS – Centro de Ciências de Saúde
- CEMBio – Centro de Espectrometria de Massas do Instituto de Biofísica Carlos Chagas
- CGRPs - *Calcitonin Gen-Related Peptides* (Peptidos Relacionadas com o Gene da Calcitonina)
- CNRMN – Centro Nacional de Ressonância Magentica Nuclear
- C_{máx} – Concentração Máxima
- DAP – *Diabetes Associated Peptide* (Peptido Associado ao Diabetes)
- d.C.– Depois de Cristo
- DM – Diabetes Mellitus
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DMTI-STZ ou DMI-STZ – Diabetes Mellitus induzida por Streptozotocina
- DMTI – Diabetes Mellitus Tipo I
- DMTII – Diabetes Mellitus Tipo II

- EIA – *Enzymatic Immuneassay* (ensaio imunoenzimático)
- GLP1 – *Glucagon-like Peptide-1* (Peptídeo Semelhante ao Glucagon Tipo 1)
- HbA1c – Hemoglobina A1 glicada
- IAP – *Insulinome Amyloid Peptide* (Peptídeo Amilóide de Insulinoma)
- IAPP – *Istet Amyloid Polypeptide* (Polipeptídeo Amiloide das Ilhotas)
- IDE – *Insulin Degrating Enzyme* (Enzima Degradadora de Insulina)
- *i.p.* – Intraperitonal
- hIAPP – *Human Islet Amyloid Polipeptide* (Polipeptídeo Amiloide das Ilhotas humano)
- MALDI-TOF-MS – *Matrix-assisted Laser Desorption and Ionization, Time of Flight, Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas com Ionização e Dessorção a Laser Assitida por Matriz e com Tempo de Voo)
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- Mn – *Number Average Molecular Weight* (Número Médio do Peso Molecular)
- mPEG – Metoxipolietilenoglicol
- mPEG-NHS – Metoxipolietilenoglicol succinimidil
- MODY – *Maturity Onset Diabetes of the Young*
- Mw – *Weight Average Molecular Weight* (Média Ponderada do Peso Molecular)
- NP – *Natriuretc Peptide* (Peptídeo Natriurético)
- PC2 e PC3 – Proteína Cinase 2 e 3
- PEG – Polietilenoglicol
- PEG-NHS – Polietilenoglicol succinimidil

- RAMP – *Receptor Activity-Modifying Proteins* (Proteínas Modificadoras da Atividade dos Receptores)
 - rIAPP – *Rat Islet Amyloid Polipeptide* (Polipeptídeo Amiloide das Ilhotas de Rato = Amilina de Rato/Murina)
 - RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
 - *s.c.* – Subcutânea
 - SEC – *Size-Exclusion Chromatography* (Cromatografia por Exclusão de Tamanho)
 - SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)
 - SDS-PAGE – *SDS Polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS)
 - t.a. – Temperatura Ambiente
 - U.A. – Unidade Arbitrária
 - UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro
 - VIGITEL – Vigilância de Fatores de Riscos e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
 - WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde, OMS)
-

Sumário

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 – Introdução.....	1
1.1 – Diabetes Mellitus - DM.....	2
1.1.2 – Classificação do Diabetes Mellitus.....	6
1.1.2.1 – Diabetes Mellitus tipo I (DMTI).....	9
1.1.3 – Epidemiologia e implicações sócio-econômicas do DM.....	11
1.1.4 – Métodos de tratamento.....	16
1.2 – Amilina.....	18
1.2.1 – Amilina, e sua relação com o DM.....	20
1.4.2 – Amilina e seus efeitos fisiológicos.....	22
1.4.3 – Uso terapêutico da Amilina.....	32
1.3 – O Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da FF-UFRJ e a Amilina.....	35
1.4 – Peguilação de proteínas e peptídeos de interesse terapêutico.....	36
1.4.1 – PEGs e estratégias de ligação à proteínas e peptídeos.....	40
2 – Objetivos.....	50
2.1 – Preâmbulo.....	51
2.2 – Objetivos específicos.....	51
3 – Material e Métodos.....	52
3.1 – Reagentes e equipamentos.....	53
3.2 – Avaliação dos efeitos da Amilina sobre a glicemia.....	54
3.2.1 – Modelo I: Ratos anestesiados.....	54
3.2.2 – Modelo II: Camundongos não-diabéticos em jejum.....	55
3.2.3 – Modelo III: Camundongos diabéticos.....	56
3.2.4 – Dosagem de Insulina e Glucagon por ensaio imunoenzimático.....	57
3.3 – Conjugação de Amilina murina com PEGs.....	58
3.3.1 – Reações em meio aquoso.....	58
3.3.2 – Reações em solvente aprótico.....	59
3.4 – Acompanhamento das reações de peguilação.....	60
3.4.1 – Quantificação de amins livres por fluorescamina.....	60
3.4.2 – Avaliação semi-quantitativa por eletroforese em gel de acrilamida.....	61
3.5 – Purificação dos produtos das derivatizações.....	63
3.5.1 – Cromatografia de exclusão de tamanho.....	63
3.5.2 – Cromatografia de partição por fase reversa.....	64
3.6 – Quantificação dos produtos peguilados pelo método de Bradford.....	65
3.7 – Caracterização dos produtos da bioconjugação por espectrometria de massas.....	66
3.8 – Identificação dos sítios de ligação.....	66
3.9 – Ligação com receptor fisiológico.....	67
3.10 – Análise estatística.....	67
4 – Resultados.....	68
4.1 – Avaliação dos efeitos da Amilina sobre a glicemia.....	69
4.2 – Peptídeos truncados da sequência de Amilina Humana.....	79
4.3 – Peguilação.....	86
4.3.1 – Caracterização da reação.....	86
4.3.2 – Purificação.....	100
4.3.3 – Identificação dos sítios de ligação.....	107
4.3.4 – Interação com receptor fisiológico.....	110
4.3.5 – Perfil farmacológico.....	112
5 – Discussão.....	114

5.1 – O modelo farmacológico.....	115
5.2 – Efeitos farmacológicos dos peptídeos truncados da sequência de amilina humana.....	118
5.3 – Peguilação de Amilina Murina.....	124
6 – Conclusão.....	127
7 – Referências.....	129

1 – Introdução

1.1 – Diabetes Mellitus - DM

O diabetes tem sido um tema de interesse para os sábios desde o início da história humana. Em verdade, aproximadamente 3500 anos atrás durante a primeira grande dinastia egípcia, foi feito o primeiro registro desta doença e de terapias para seu tratamento. Tais registros fazem parte de um compêndio de pergaminhos que foram descobertos e traduzidos pelo arqueólogo alemão Georg Ebers em 1862 d.C. Os chamados papiros de Ebers datam de 1530 a.C. e são considerados os primeiros textos médicos da história havendo relatos sobre disfunções relacionadas com a poliúria e os tratamentos para estas disfunções incluem o uso de água do rio *Bird*, sabugueiro, fibras da planta *asit*, leite fresco, flor de pepino, e ainda, aplicações retais de azeite, mel, cerveja doce, sal marinho e sementes de *wonderfruit* (SANDERS, 2002). Descrições semelhantes às contidas nos papiros de Ebers também podem ser encontradas nos papiros de Hearst, os quais datam de 1479 a.C. Em um estudo recente de antropologia forense foi observado um esqueleto de 2055–1650 a.C. achado no Egito, o qual apresenta características que indicam uma condição de diabetes mellitus tipo II sendo esta a evidência mais antiga da existência do DM (DUPRAS et al., 2010).

Na Grécia antiga, Hipócrates (469-399 a.C.) em sua obra *Corpus hippocraticum* escreveu que seria um mau sinal quando “a urina é passada pouco tempo depois de beber” além de fazer outras referências ao termo “urina aquosa”. Hipócrates também utilizou um termo que pode se traduzido como “fazer muita água”. Mais tarde, Aristóteles (384-322 a.C.) em sua obra *Das Partes dos Animais* utilizou este mesmo termo para se referir a desordens que levariam a “fazer água excessivamente”. O termo diabetes passou a ser empregado após os estudos de Aretaeus (81-138 d.C.), que descreveu a doença como sendo “*uma fusão de*

carne presente na urina com um incessante fluxo desta como se estivesse vindo da abertura de um aqueduto.” (GEMMILL, 1972), sendo tal termo uma derivação da palavra grega *diabētēs* que significa passar por ou sifão. Galeno (129-199 d.C.) utilizou os termos “diarréia urinária” e “doença da sede” para descrever dois casos de pacientes que consultou tendo na época associado a doença e problemas renais.

As primeiras descrições de glicosúria vêm dos séculos V e VI quando os médicos hindus Susruta, Charaka e Vaghabata perceberam que os pacientes com poliúria apresentavam também uma urina adocicada tendo estes médicos chamado esta doença de “Madhumeha”, foi também nesse trabalho a primeira associação entre diabetes e hereditariedade, obesidade, sedentarismo e alimentação. No século XI o médico árabe Ibne Sina relacionou duas complicações com o diabetes, sendo estas a gangrena e o colapso das funções sexuais. No mesmo período outro médico árabe, Musa Bin Maimoon, estudou vinte casos de diabetes e concluiu que os mesmos haviam sido causados pela ingestão de água do rio Nilo (ALI, HAMID et al., 2006).

No século XVI o médico suíço Von Hohenheim (Paracelsus) demonstrou que a evaporação da urina dos pacientes diabéticos levava à formação de um pó branco. Na ocasião Paracelsus considerou esta substância como sendo um sal e atribuiu a causa do diabetes à deposição de sais nos rins. No século XVIII Thomas Willi e Matthew Dobson, em estudos independentes, estabeleceram que o diagnóstico para o diabetes seria dado pela presença de açúcar no sangue, sendo que Willi propôs que este açúcar presente na urina teria origem primeiramente no sangue não sendo por tanto o diabetes uma doença originada nos rins mais

sim uma desordem sanguínea (ALI, HAMID et al., 2006; SANDERS, 2002). Em 1869 H.D.Noyes, observou que os pacientes com diabetes também apresentavam retinopatias, chamadas por Noyes de “retinites”. Em 1877 Etienne Lancereaux (1829-1910) relacionou o diabetes com lesões no pâncreas e Apollinaire Bauchardat (1806-1886) testou com sucesso um tratamento baseado na restrição da ingestão de carboidratos associada a exercícios.

A descrição histológica do pâncreas feita por Paul Langerhans em 1869, e, duas décadas depois, a indução de DM em cães feita por Minkowski e von Mering em 1889 possibilitaram o surgimento da primeira terapia para DM, a qual empregou o uso de extratos de pâncreas em humanos realizado por Gurg Zuelzer no início do século XX. Mais tarde, os aperfeiçoamentos dos extratos de pâncreas desenvolvidos por Nicolas Paulesco, Frederick Banting e Charles Best no começo de século XX rendeu a estes o prêmio Nobel de Medicina. A purificação de insulina a partir de extratos de pâncreas de animais como porcos e bovinos foi de grande utilidade até o início da produção em larga escala de insulina recombinante humana pela Genentech em 1982.

A tabela 1 resume os principais eventos relacionados ao histórico do DM (CARRASCO et al., 2001; M; GREG, 2003; PIRES; CHACRA, 2008).

Tabela 1 – Cronologia das principais descobertas no estudo do Diabetes Mellitus.

Data	Eventos
1530 a.C. e 1479 a.C.	Papiros de Ebers, e papiros de Hearst → primeiros relatos e poliúria
1000 a.C. ao século VI	Hipócrates e Aristóteles → proposição de hipóteses para a poliúria; Aretaeus da Capadocia → primeira descrição detalhada da doença e surgimento do termo diabetes relacionado a esta desordem e Susruta, Charaka e Vaghbata → primeiros diagnósticos clínicos.
Séculos X ao XV.	Controle eclesiástico sobre o conhecimento no mundo ocidental. Uso de laxantes passa a ser difundido entre os médicos como forma de tratamento.
XVII	Thomas Willis → adicionou o termo “mellitus” (do Latin mel/adocicado) em referencia ao sabor adocicado a urina de parte dos pacientes com diabetes.
XVIII	Matthew Dobson → confirmação de que há excesso de açúcar no sangue e na urina dos pacientes com diabetes. Thomas Cawley → descoberta da relação entre problemas no pâncreas e diabetes.
XIX	Claude Bernard → hipotetização de que o glicogênio é estocado no fígado e secretado com açúcar no sangue, com atribuição de uma superprodução de glicose hepática como causa da disfunção; Joseph von Mering e Oscar Minkowski → observaram que a remoção cirúrgica do pâncreas causava diabetes em cães antes sadíos; Gustave-Edouard Laguesse → postularam que uma pancreatite levaria à destruição das ilhotas seria a causadora da doença e passaram a adotar o termo ilhotas de Langerhans; Moses Barron → também associou a destruição das ilhotas como causa da doença e propôs que estas secretariam substâncias que poderiam ser usadas no tratamento.
1910 d.C.	Edward Albert Sharpey-Schafer e Jean de Meyer → nomearam a substância presente na ilhotas de insulina
1923 d.C.	Frederick Banting e John Macleod → receberam o prêmio Nobel pela produção de insulina e uso desta no tratamento de DM
1936 d.C.	Harold Percival Himsworth → primeira distinção entre os tipos de DMI e DMII
1977 d.C.	Herbert Boyer → desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e produção heteróloga de insulina em bactérias.

Milênios se passaram desde as escritas egípcias e esse antigo mal não só permanece sem uma cura definitiva como também tem atingido um número cada vez maior de pessoas sendo o responsável por 5% dos óbitos em todo o mundo (ROGLIC et al., 2005). O conhecimento acerca dos mecanismos bioquímicos e fisiopatológicos do DM possibilitou a criação de diversos medicamentos que prolongam e melhoram a qualidade de vida dos pacientes com DM, contudo nenhum destes medicamentos é capaz de mimetizar um órgão tão complexo quanto o pâncreas.

1.1.2 – Classificação do Diabetes Mellitus

Segundo a *World Health Organization* (WHO) e a *American Diabetes Association* (ADA), o Diabetes Mellitus (DM) é um grupo de doenças crônicas que ocorrem quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando há uma resistência à ação deste hormônio, e em alguns casos são observados produção e ação deficientes da insulina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). A insulina é um hormônio peptídico secretado pelas células β das ilhotas pancreáticas e tem efeitos sobre a regulação da concentração de glicose plasmática (glicemia), sua ausência ou ação deficiente incorrem no quadro clínico conhecido como hiperglicemia. Dentre os sintomas clínicos mais relevantes do DM destacam-se (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009):

- | | |
|--|--|
| 1. Sede intensa; | 8. Nefropatia diabética; |
| 2. Poliúria; | 9. Neuropatias com risco de úlceras nos pés, amputação, etc; |
| 3. Glicosúria; | 10. Juntas de Charcot; |
| 4. Fadiga muscular sem causa aparente; | 11. Disfunções sexuais; |
| 5. Dificuldade de cicatrização periférica; | 12. Risco aumentado para doenças cardiovasculares. |
| 6. Cetoacidose; | |
| 7. Retinopatia diabética; | |

Infelizmente, em muitos casos os pacientes só procuram ajuda médica quando há agravamento da doença, visto que os primeiros sintomas são muitas vezes imperceptíveis. Assim, frequentemente o diagnóstico é realizado muito tempo após do início da doença (HANDELSMAN et al., 2011; MOTTA, 2009).

Os casos de DM podem ser divididos em quatro grupos e em dezenas de subgrupos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013) conforme apresentado na tabela abaixo:

Tabela 2 – Classificação do DM segundo a Associação Americana de Diabetes

I. Diabetes tipo 1 (Destruição das células Beta, geralmente levando à deficiência absoluta de insulina)

A. imunomediada (observa-se a presença de anti-GAD, anti-TFAI2 e/ou anti-TFAI2βetc.)

B. Idiopática (os anticorpos supracitados não são encontrados)

II. Diabetes tipo 2 (pode variar de resistência à insulina com a deficiência de insulina a uma defeito predominantemente secretório, com resistência à insulina)

III. Outros tipos específicos

A. Defeitos genéticos na função das células Beta

- | | |
|---|----------------------------------|
| 1. Cromossomo 12, HNF-1α (MODY3) | 5. Cromossomo 17, HNF-1α (MODY5) |
| 2. Cromossomo 7, glicoquinase (MODY2) | 6. Cromossomo 2, NeuroD1 (MODY6) |
| 3. Cromossomo 20, HNF-4α (MODY1) | 7. DNA mitocondrial |
| 4. Cromossomo 13, o fator promotor da insulina-1 (IPF-1; MODY4) | 8. Outros |

B. Defeitos genéticos na ação da insulina

- | | |
|-------------------------------------|--------------------------|
| 1. Resistência à insulina do tipo A | 4. Diabetes Lipoatrófica |
| 2. Leprechaunismo | 5. Outros |
| 3. Síndrome Rabson-Mendenhall | |

C. Doenças do pâncreas exócrino

- | | |
|-----------------------------|----------------------------------|
| 1. Pancreatite | 5. Hemocromatose |
| 2. Trauma / pancreatectomia | 6. Pancreatopatia Fibrocalculosa |
| 3. Neoplasia | 7. Outros |
| 4. Fibrose cística | |

D. Endocrinopatias

- | | |
|------------------------|---------------------|
| 1. Acromegalia | 5. Hipertireoidismo |
| 2. Síndrome de Cushing | 6. Somatostatina |
| 3. Glucagonoma | 7. Aldosteronoma |
| 4. Feocromocitoma | 8. Outros |

E. Químicoinduzida

- | | |
|---------------------------|-----------------------------|
| 1. Vacor (raticida) | 7. Agonistas β-adrenérgicos |
| 2. Pentamidina | 8. Tiazídicos |
| 3. O ácido nicotínico | 9. Dilantin (fenitoína) |
| 4. Glicocorticóides | 10. α-Interferon |
| 5. Hormônios tireoidianos | 11. Outros |
| 6. Diazóxido | |

F. Infecções

1. Rubéola congênita
2. Citomegalovírus
3. Outros

G. Formas incomuns de diabetes imunomediada

1. Síndrome de "Stiff-man"
2. Anticorpos anti-receptor de insulina
3. Outros

H. Outras síndromes genéticas algumas vezes associadas com diabetes

- | | |
|----------------------------|------------------------------|
| 1. Síndrome de Down | 7. Laurence-Moon-Biedl |
| 2. Síndrome de Klinefelter | 8. Distrofia miotônica |
| 3. Síndrome de Turner | 9. Porfíria |
| 4. Síndrome de Wolfram | 10. Síndrome de Prader-Willi |
| 5. Ataxia de Friedreich | 11. Outros |
| 6. Doença de Huntington | |

IV. Diabetes gestacional (ocorre durante a gravidez e pode ou não persistir ao término desta, sendo também um fator de risco para o desenvolvimento de DMII).

Pelo exposto anteriormente, conclui-se que o DM é um grupo de doenças multifatoriais, e, por conseguinte existem diversos componentes além da predisposição

genética que podem levar ao surgimento desta condição. A combinação de certos fatores aumenta o risco de se desenvolver DM, dentre estes destacam-se: alguns tipos de infecções virais, dieta hiperglicídica, sedentarismo, obesidade, uso incorreto de medicamentos diabetogênicos (esteróides anabolizantes, glicocorticóide e estrogênios anticoncepcionais) e exposição a determinados agentes químicos como os citados anteriormente (ver classificação do DM). Todavia, vale ressaltar que, embora existam inúmeros subtipos de DM, os tipos I e II correspondem juntos a mais de 95% dos casos diagnosticados. Sendo a incidência do tipo II correspondente a 90-95% dos casos (WILD et al., 2004).

A terapia de reposição hormonal com amilina ou seus análogos pode ser usada como complementação no tratamento dos pacientes com Diabetes Mellitus tipo I (DMTI) e tipo II (DMTII). Sendo assim, estes dois grupos são descritos a seguir.

1.1.2.1 – Diabetes Mellitus tipo I (DMTI)

Esta forma do Diabetes ocorre devido a uma disfunção auto-imune que leva à destruição das células beta pancreáticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). A denominação diabetes juvenil era usada porque a maioria dos pacientes diagnosticados apresentavam os sintomas na infância e adolescência, contudo tal denominação é imprecisa pois esta doença pode surgir em qualquer idade. Os principais sintomas usados para o diagnóstico inicial são: poliúria, sede intensa, perda de peso e cansaço. O diagnóstico laboratorial da DMTI imunomediada se dá por imunoenaios realizados para se verificar anticorpos que identifiquem um processo auto-imune contra as células beta, estes anticorpos são: anti-insulina, anti-ácido glutâmico descarboxilase-65 e -67 (anti-GAD-65 e 67), anti-proteína de choque térmico 65 (anti-HSP-65), anti-tirosina fosfatase AI2 e anti-tirosina fosfatase AI2 β (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013; GOMES et al., 2012). Esta resposta auto-imune culmina com a falência na produção de insulina e por isso os pacientes com DMTI têm, obrigatoriamente, que repor este hormônio através da administração de insulina exógena (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009).

1.1.2.2 – Diabetes Mellitus tipo II (DMTII)

Esta forma de diabetes, que corresponde a 90-95% dos casos diagnosticados (DANAIEI et al., 2011; WILD et al., 2004), era denominado diabetes não insulino-dependente e abrange os indivíduos que têm resistência à insulina e normalmente têm relativa (não absoluta) deficiência de insulina. É caracterizado pela resistência periférica e hepática à ação da insulina, sendo que, por vezes este, hormônio está presente em níveis normais sem que haja efeito hipoglicemiante. Outra importante característica do DMTII é o estado de

intolerância à glicose, que corresponde a resistência à insulina levando a um aumento na secreção de desta seguido pela falência das células beta. Portanto, no paciente com DMTII, podem ser observados níveis elevados de insulina juntamente com hiperglicemia (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

Uma característica importante desta doença reside no fato de que nem sempre a reposição hormonal é necessária. Em verdade, muitas vezes em seus estágios iniciais esta desordem pode ser tratada apenas pela reeducação alimentar em combinação com exercícios aeróbicos. Há, provavelmente, muitas causas diferentes desta forma de diabetes, embora a etiologia específica não seja conhecida, a destruição auto-imune de células β não está presente e os pacientes não apresentam as outras causas de diabetes que os enquadrem nos demais grupos anteriormente citados. A maioria dos pacientes com esta forma de diabetes são obesos e já foi relatado que a obesidade em si provoca algum grau de resistência à insulina. Mesmo os pacientes que não são obesos por critérios tradicionais de peso (índice de massa corpórea < 27) podem apresentar predisposição ao DMTII quando apresentarem gordura corporal distribuída predominantemente na região abdominal (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009). Quadros de cetoacidose raramente são observados neste tipo de diabetes, embora alguns fatores como estresse e infecções possam desencadeá-los. Esta forma de diabetes, frequentemente, não é diagnosticada em seu estado inicial, porque a hiperglicemia se desenvolve gradualmente e, em fases anteriores, muitas vezes não é grave o suficiente para que o paciente apresente algum dos sintomas clássicos do diabetes. No entanto, esses pacientes têm um risco aumentado de desenvolver complicações micro e macrovasculares devido à hiperglicemia persistente (WORLD HEALTH ORGANIZATION,

2008).

Os principais fatores de risco para o surgimento do DMTII são resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Principais fatores de risco para o surgimento do DM (MOTTA, 2009)

Idade \geq 45 anos
Histórico familiar de DM (pais, filhos e irmão)
Excesso de peso (IMC \geq 27 kg/m ²) ou acúmulo de gordura visceral
Sedentarismo
HDL-C baixo (< 35 mg/dL) e/ou triglicérides elevados (> 250 mg/dL)
Hipertensão arterial (> 140/90 mmHg)
Doença coronariana
DM gestacional prévio
Macrossomia ou histórico de abortos de repetição ou mortalidade perinatal

Apesar de sua grande importância na patogênese do DMTII, a insulina não é o único hormônio envolvido nesta doença. Neste aspecto, outros hormônios (glucagon, GLP1, amilina, etc.) têm sido associados a esta desordem. A amilina tem um papel de destaque na patogênese do DMTII, pois a maioria dos pacientes acometidos apresentam depósitos amilóides, constituídos principalmente por amilina, em seus pâncreas (COOPER et al., 1987; WESTERMARK et al., 1987). Fica evidente, portanto, que o controle glicêmico é um processo altamente complexo e que a reposição com insulina exógena pode não ser suficiente para assegurar a saúde dos pacientes com DM uma vez que este não é o único hormônio alterado (LUSH et al., 2007; RIDDLE et al., 2007).

1.1.3 – Epidemiologia e implicações sócio-econômicas do DM

O DM é responsável por 5% das mortes relatadas em todo o mundo, tendo em 2005 uma mortalidade de 1,1 milhões de pessoas (ROGLIC et al., 2005; WILD et al., 2004;

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). A Organização Mundial de Saúde considera que a incidência de casos de DM tenha atingido um nível tão elevado que estima uma pandemia até 2030, com um crescimento de 171 milhões de casos em 2000 para 366 milhões em 2030 (WILD et al., 2004). A maior prevalência deste grupo de doenças reside nos países pobres e em desenvolvimento, 80% dos casos, (Fig. 1).

A distribuição etária também varia de acordo com o nível de desenvolvimento sendo nos países em desenvolvimento o grupo de maior risco é formado por adultos com idades entre 45 e 64 anos, enquanto que nos países ricos o grupo de maior prevalência corresponde aos idosos (Fig. 2).

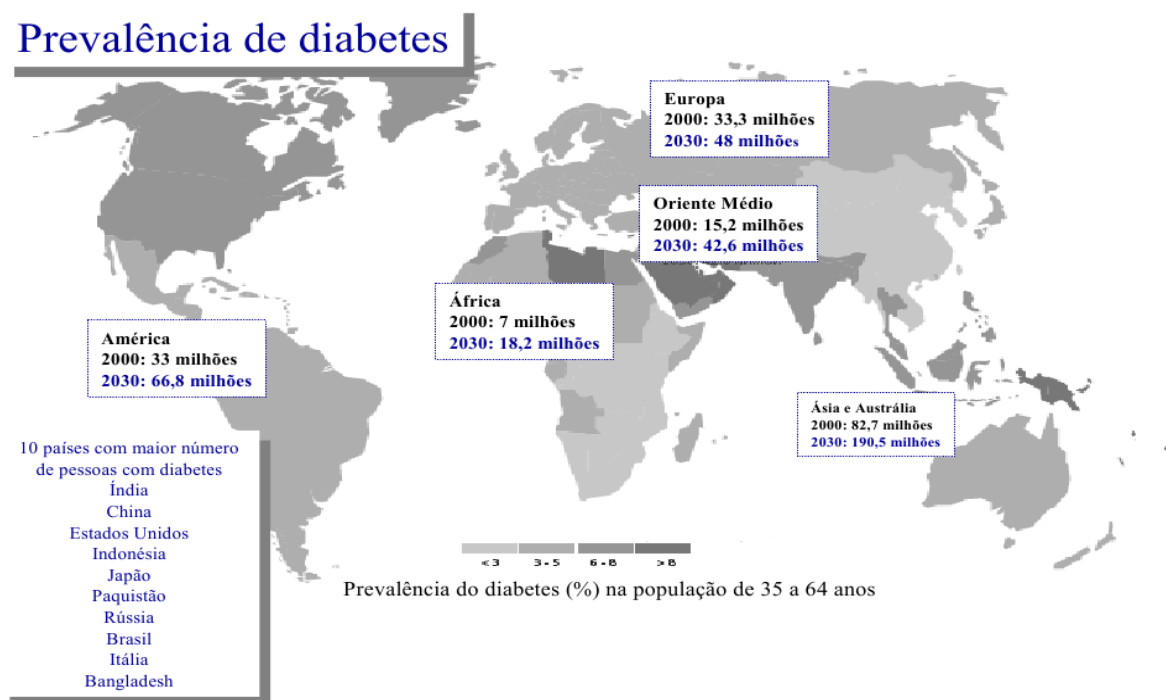


Figura 1 – Prevalência de casos de DM no mundo.

Em destaque os 10 países com maior incidência desta doença, sendo o Brasil o oitavo país nesta lista (WILD et al., 2004).

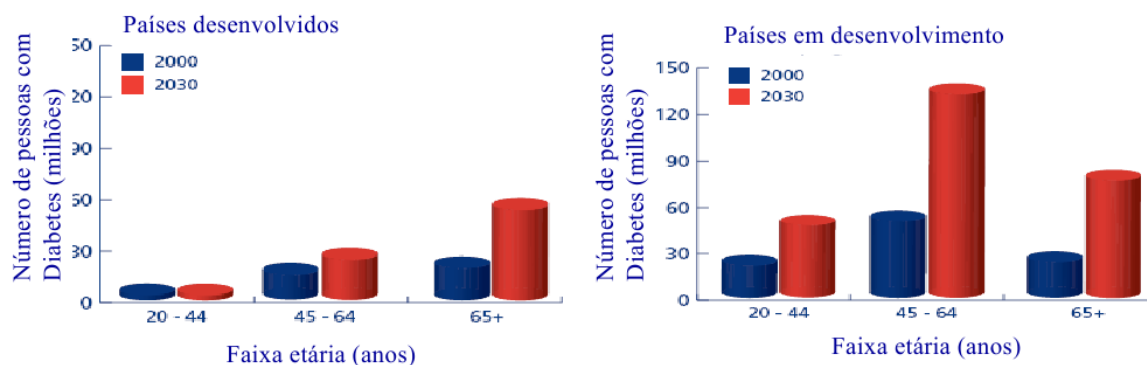


Figura 2 – Perfil de distribuição etária dos casos diagnosticados de DM de acordo com o desenvolvimento socioeconômico.

Observa-se nos países desenvolvidos, esquerda, há um menor número de casos de DM e estes são mais frequentes na população idosa. Nos países em desenvolvimento, direita, vê-se uma maior incidência de casos de DM sendo que estes atingem principalmente a população com idades entre 45 e 64 anos (WILD et al., 2004).

No Brasil há uma prevalência de 5,2% de portadores de DM na população adulta, variando de 2% a 7% em homens nas capitais e 4% a 9% em mulheres (Fig. 3). O relatório de VIGITEL também aponta para o fato que a incidência de DM é maior na população de menor nível de escolaridade (tabela 4). Este quadro sócio-econômico resulta elevados gastos com a aquisição e distribuição de medicamentos pelo ministério da saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, BRASIL, 2011).

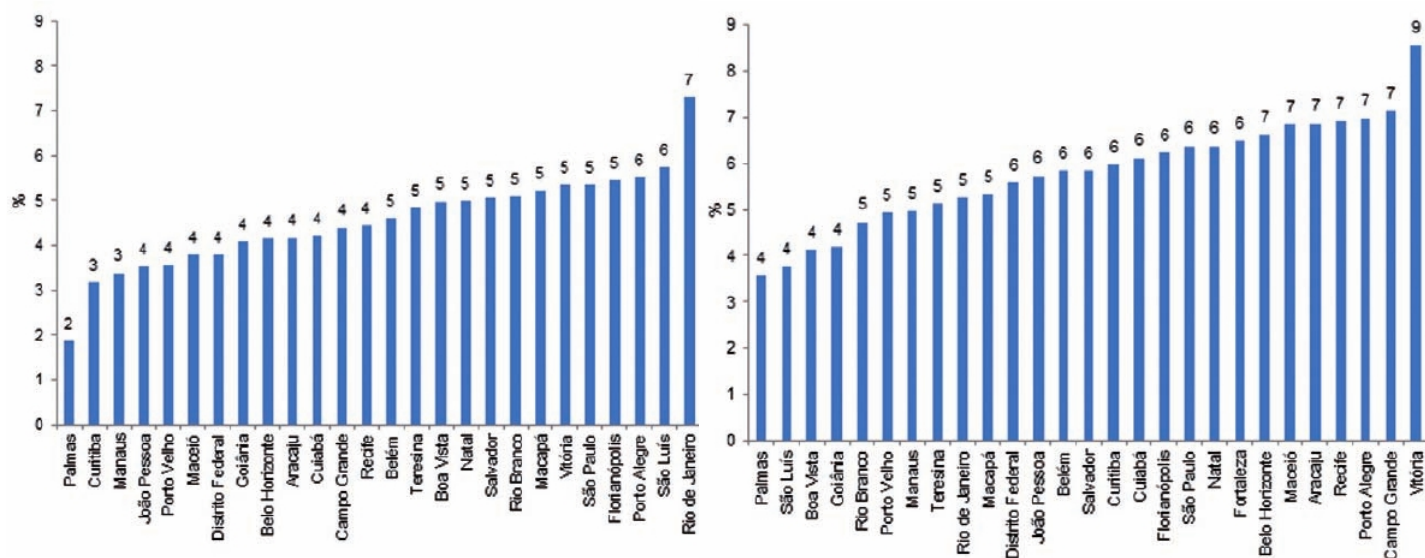


Figura 3 – Prevalências de DM segundo local e sexo no Brasil.

Percentual de homens (≥ 18 anos) a esquerda e Percentual de mulheres (≥ 18 anos) a direita que referem diagnóstico médico de diabetes, segundo as capitais dos estados brasileiros e Distrito Federal. Vigitel, 2011.

Tabela 4 – Percentual de indivíduos que referem diagnóstico médico de diabetes, no conjunto da população adulta (≥ 18 anos) das capitais dos estados brasileiros e Distrito Federal, por sexo, segundo idade e anos de escolaridade. Vigitel, 2011.

Variáveis	Sexo					
	Total		Masculino		Feminino	
	%	IC95%	%	IC95%	%	IC95%
Idade (anos)						
18 a 24	0,6	0,2 - 1,1	0,5	0,0 - 1,2	0,7	0,2 - 1,3
25 a 34	1,1	0,5 - 1,7	1,3	0,1 - 2,4	1,0	0,6 - 1,4
35 a 44	3,4	2,6 - 4,2	2,4	1,6 - 3,3	4,2	2,9 - 5,5
45 a 54	8,9	7,8 - 10,1	9,7	7,8 - 11,5	8,3	6,9 - 9,8
55 a 64	15,2	13,5 - 17,0	14,6	12,0 - 17,1	15,8	13,5 - 18,1
65 e mais	21,6	19,7 - 23,5	23,0	19,4 - 26,6	20,7	18,5 - 22,8
Anos de escolaridade						
0 a 8	7,5	6,9 - 8,2	6,4	5,3 - 7,4	8,6	7,6 - 9,5
9 a 11	3,3	2,9 - 3,6	3,3	2,7 - 3,8	3,3	2,7 - 3,8
12 e mais	3,7	3,1 - 4,3	5,0	4,0 - 6,0	2,6	2,0 - 3,1
Total	5,6	5,2 - 6,0	5,2	4,6 - 5,8	6,0	5,5 - 6,5

Segundo a ADA (2013) o total estimado para os gastos com DM nos Estados Unidos foi de US\$ 245 milhões em 2012, sendo estes divididos em US\$ 176 milhões com custos diretos (diagnóstico, medicamentos, internações, consultas, etc.) e 69 milhões relacionados com os

custos indiretos (perda de produtividade, ausências do pacientes em seus respectivos empregos, etc.), sendo que, em média o americano portador de DM gasta aproximadamente US\$ 7.900,00 por ano com o tratamentos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

No Brasil, um estudo de 2011 relatou os custos anuais envolvendo DMTII são de US\$ 2.108,00, em média, por paciente. Os custos diretos representam 63,3% do total gasto (US\$ 2.108,00), toda via, em pacientes com complicação micro e macrovasculares o valor anual aumenta para US\$ 3.199,00/paciente/ano. Ainda, o estudo relatou que, em média, o gasto com medicamentos representa 48% de todo o custo relacionado ao tratamento do DMTII (BAHIA et al., 2011).

Diante deste cenário, alguns medicamentos para o tratamento do DM já fazem parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME (em 2008 foram adquiridas 960 mil ampolas de insulina regular e mais de 11 milhões de ampolas de insulina NPH), sendo o Ministério da Saúde Brasileiro o principal comprador mundial de insulina. Outros medicamentos podem ser comprados pelos pacientes através do programa Farmácia Popular (Tabela 5).

Tabela 5 – Medicamentos vendidos através do programa Farmácia Popular para tratamento do DM (fonte MINISTÉRIO DA SAÚDE).

PRINCÍPIO ATIVO	Quantitativo de Medicamentos Vendidos por comprimidos ou frascos-ampolas		
	2006	2007	2008
CLORIDRATO DE METFORMINA	28.165.567	109.389.678	118.558.548
GLIBENCLAMIDA	6.884.703	31.302.050	38.281.493
INSULINA HUMANA (mL)	1.776.762	5.868.302	5.582.147
TOTAL	36.827.032	146.560.030	162.422.188

1.1.4 – Métodos de tratamento

A *World Health Organization* (2008) preconiza a adoção de uma vida saudável (dieta balanceada e no mínimo 30 minutos de exercícios aeróbicos quatro vezes por semana) como medida profilática para DM e distúrbios cardiovasculares. O tratamento não farmacológico, a exemplo das medidas profiláticas, tem como base a dieta hipoglicídica e a atividade física. Todavia, em grande parte das vezes a intervenção farmacológica é necessária sendo a reposição com insulina exógena para controle da glicemia indispensável para os pacientes com DMTI e para a maior parte dos pacientes diabéticos tipo II (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009; GOODMAN; GILMAN, 2006; HANDELSMAN et al., 2011). Embora a reposição com insulina exógena consiga normalizar a glicemia e reduzir os risco de complicações a longo prazo, sua utilização está associada a um risco elevado de episódios de hipoglicemia, ganho de peso e lipodistrofia, que está diretamente ligada ao aumento dos níveis lipídêmicos e pressão sanguínea (GOODMAN; GILMAN, 2006).

Existe uma grande variedade de substâncias cujo emprego farmacológico objetiva a redução da taxa glicêmica, sendo estes chamados de agentes hipoglicemiantes orais ou antidiabéticos orais. Estes agentes são especialmente importantes para o diabético tipo II e quando utilizados em conjunto com dietas hipocalóricas constituem a base medicamentosa para o tratamento desta doença em seu estágio inicial. Dentre os antidiabéticos orais destacam-se o cloridrato de metformina e a glibenclamida (GOODMAN; GILMAN, 2006; LÜLLMANN et al., 2008). A metformina possui efeito hipoglicemiante através da redução da liberação de glicose hepática, mas apresenta efeitos adversos como anorexia, náuseas,

diarreia e acidose láctica. A glibenclamida, um derivado das sulfoniluréias, age inibindo os canais de potássio das células β causando a despolarização de suas membranas o que resulta em uma maior liberação de insulina. O principal efeito adverso observado em pacientes que fazem uso deste fármaco são episódios de hipoglicemia, outro problema, reside no fato que muitos pacientes não respondem à este fármaco e outros deixam de responder após usá-lo por algum tempo (GOODMAN; GILMAN, 2006; LÜLLMANN *et al.*, 2008).

A existência de antidiabéticos orais não exclui a necessidade do uso de insulina, pois tais medicamentos são ineficazes em pacientes com DMTI, em pacientes com DM gestacional (pois muitos deles são teratogênicos) e por vezes há necessidade do uso desses combinados com insulina em pacientes com DMTII. O tratamento convencional com insulina consiste na administração subcutânea de insulina exógena geralmente em diversas aplicações diárias. Dentre as alternativas terapêuticas atuais para a insulino terapia, somente os transplantes de pâncreas ou de ilhotas pancreáticas são capazes de recompor o padrão fisiológico de secreção de insulina e tornar o portador de DMTI independente das aplicações diárias, no entanto, tais métodos ainda não estão completamente estabelecidos e muitos pacientes apresentam rejeição ao tratamento (BERNEY *et al.*, 2001; COOPER; CASU, 2009; GRUESSNER; SUTHERLAND; GRUESSNER, 2010; PAPAS; SUSZYNSKI; COLTON, 2009).

1.2 – Amilina

Muito antes dos pioneiros trabalhos de Cooper e Westermarck em 1987, Opie, no início do século XX, em uma necrópsia de uma senhora que havia morrido em decorrência das complicações do DM, descreveu a histologia de pâncreas desta paciente com DM. Tendo sido observada a presença de um material hialino (de aspecto cartilaginoso) ao redor dos capilares da amostra extraída do pâncreas de uma paciente com DMTII (Fig. 4)(OPIE, 1901). Com o passar dos anos observou-se que este material hialino era comumente encontrado em pacientes com DMTII (CLARK et al., 1987).

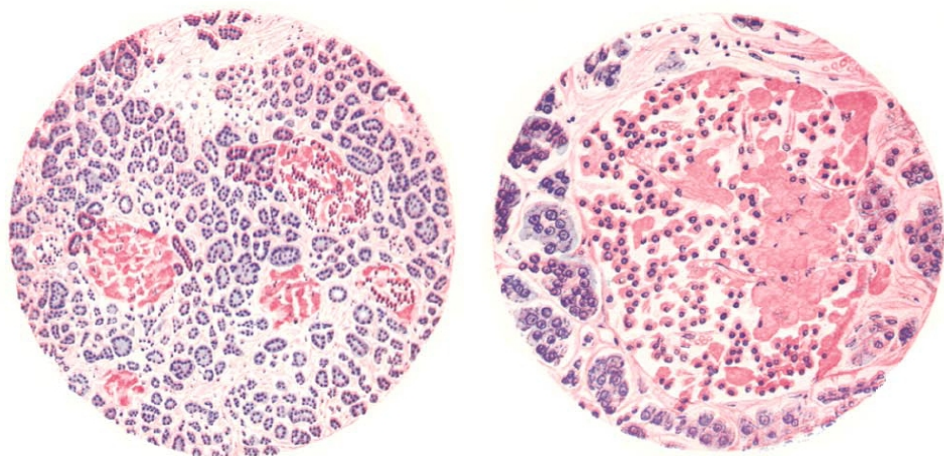


Figura 4 – Histologia do pâncreas.

A esquerda material de paciente saudável e a direita tecido pancreático de paciente com DMTII apresentando o material hialino (rosa) ao redor dos capilares (retirado de OPIE 1901).

O mistério quanto a composição do material descrito por Opie no início do século XX só foi solucionado muitas décadas depois quando foi percebido que o principal constituinte desses depósitos hialinos era um material de origem proteica e o isolamento e sequenciamento completo desta proteína foi realizado por dois grupos de pesquisa em paralelo. O grupo de pesquisa liderado por Westermarck (1986), usando o material extraído de insulinomas

humanos, relatou a sequência parcial de um peptídeo que eles designaram peptídeo amilóide de insulinoma - IAP. Alguns meses depois, Cooper e colaboradores (1987) relataram a sequência completa de 37 aminoácidos deste peptídeo também a partir do material amiloide extraído de homogeneizados de pâncreas de pacientes com DMTII (COOPER et al., 1987; WESTERMARK et al., 1986). Cooper e colaboradores inicialmente chamaram sua descoberta de peptídeo associado ao diabetes-DAP, mas em suas publicações posteriores eles passaram a adotar a nomenclatura de amilina (COOPER et al., 1988). Atualmente, os termos IAP e DAP estão em desuso enquanto que amilina e IAPP (Polipeptídeo Amiloide das Ilhotas) são usados como sinônimos. Todavia, a designação de amilina, que é o termo mais utilizado, refere-se não somente à sequência de 37 aminoácidos mas, também especifica que o peptídeo deve ter a subunidade C-terminal amidada, uma ponte dissulfeto nos resíduos das cisteínas nas posições 2 e 7 e dotada de atividade biológica (ROBERTS et al., 1989; YOUNG, 2005). Assim, para este trabalho o termo amilina será usado em detrimento ao termo IAPP por se tratar, o primeiro, de uma denominação mais específica e sendo este o objeto de estudo desta tese.

1.2.1 – Amilina, e sua relação com o DM

O gene da amilina está presente tanto em mamíferos quanto em aves, tendo sua localização no cromossomo 12 em humanos. Tal gene, na realidade, possui dois exons com a sequência para o pré-pró-hormônio com 89 aminoácidos. Assim, a amilina propriamente dita é obtida após a clivagem pelas enzimas PC2 e PC3, sofrer amidação no C-terminal e ter suas cisteínas unidas em uma ponte dissulfeto. Esta possui também uma grande homologia com o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), sendo ambos dotados de 37 aminoácidos, uma ponte dissulfeto nas mesmas regiões e são amidados no C-terminal (YOUNG, 2005).

Uma das características mais evidente da amilina reside na sua capacidade em formar fibras amiloides sob condições fisiológicas/patológicas (Fig. 5), o que lhe confere um papel de destaque na patogênese do DMTII, pois mais de 90% dos pacientes com DMTII apresentam depósitos amiloides em seus pâncreas (CLARK et al., 1987). Ademais, são relatados casos de DMTII em outras espécies de mamíferos que expressam amilinas com propensão à formação de estruturas amiloides (YOUNG, 2005). Assim, foi descrito que espécies de primatas (humanos, chimpanzés, etc.) e felídeos (gatos, leões, tigres, etc.) expressam amilinas que agregam, e nestes são relatados casos de DMTII (YOUNG, 2005), enquanto que em roedores e em canídeos não foram relatados depósitos amiloides de amilina e, portanto não são observados casos de DMTII. Diversos trabalhos têm demonstrado que fragmentos isolados da sequência da amilina humana têm potencial amiloidogênico conforme a Tabela 6.

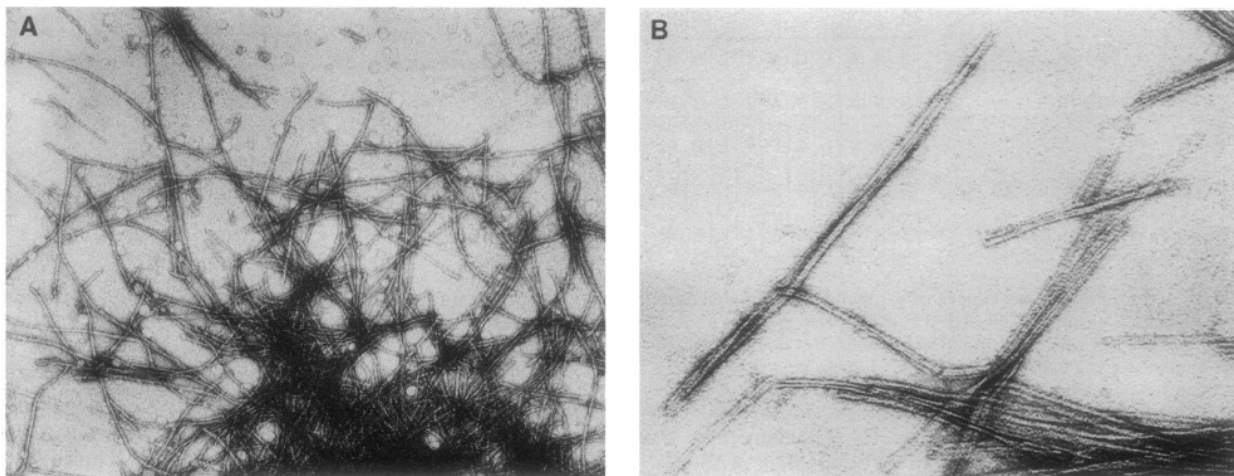


Figura 5 – Fibra amilóides de amilina humana visualizadas por MET.
A aumento de 60.000x e B aumento de 150.000x (WESTERMARK et al., 1990).

Tabela 6 – Regiões da sequência da amilina com potencial amiloidogênico.

Região amiloidogênica	Referência
8-20	JAIKARAN et al., 2001
20-29	WESTERMARK et al., 1990
22-27	TENIDIS et al., 2000
22-29	AZRIEL, 2001
25-29	GLENNER; DAVID EANES; WILEY, 1988
30-37	NILSSON; RALEIGH, 1999

A comparação das sequências de aminoácidos entre espécies e ensaios *in vitro* revelaram que a região 20-29, e para alguns autores a porção 25-29, é crucial para a formação destas fibras amiloides no peptídeo inteiro. Interessantemente, cachorros e gatos apresentam as mesmas sequências na região 20-37 e, no entanto, apenas gatos apresentam depósitos amiloides no pâncreas. Sendo assim, fica evidente que outros fatores, além da sequência primária da amilina, são importantes para que esta se agregue *in vivo*.

1.4.2 – Amilina e seus efeitos fisiológicos

Há um grande número de trabalhos publicados descrevendo os efeitos da amilina e/ou sequências análogas sendo muitos destes efeitos relacionada à glicemia, por isso, a amilina é considerada o terceiro hormônio pancreático ativo na homeostase de glicose (LORENZO et al., 1994). A seguir são apresentados alguns efeitos, em ordem cronológica das descobertas, atribuídos à amilina:

- Inibição da síntese de glicogênio muscular (LEIGHTON; COOPER, 1988) → Utilizando modelo *ex vivo* (explantes de músculos soleus de ratos) houve diminuição da síntese de glicogênio tanto basal quanto estimulada por insulina quando o sistema foi tratado com amilina humana ou CGRP-1 de rato;
- Redução cálcio plasmático (DATTA et al., 1989) → O trabalho mostrou que a administração de amilina em ratos levava a uma redução da calcemia e também mostrou, usando culturas primárias de osteoclastos murinos, que o peptídeo inibia a atividade destes tipos celulares;
- Estímulo da produção endógena de glicose e inibição da captação de glicose periférica (MOLINA et al., 1990) → Por meio de ensaios com ratos anestesiados, infundidos com insulina e amilina e administração de α e β bloqueadores, o estudo mostrou que a amilina inibia a ação da insulina em quase 50%;
- Estímulo de vasodilatação cutânea e redução da pressão arterial (BRAIN et al., 1990) → Observou-se que doses entre 30 e 300 pMol de amilina humana por animal provocaram aumento de circulação periférica em coelhos e também houve aumento na formação de edema induzidos por bradiquinina. Além disso, foi observada redução na

pressão arterial do animais que receberam 10 nMol do hormônio por via endovenosa;

- Aumento no conteúdo de glicogênio hepático (YOUNG et al., 1991) → Ratos foram tratados com streptozotocina (modelo animal de DM TI). Em seguida, os animais receberam insulina e diferentes doses de amilina por cinco dias (de 10 a 100 µg/dia/animal com ~300g), sendo observado que a amilina foi capaz de restabelecer os níveis de glicogênio hepático, os quais estão reduzido nos animais diabéticos tratados apenas com insulina;
- Aumento de lactato plasmático e glicemia (YOUNG; WANG; COOPER, 1991) → Ratos (~340g/animal) em jejum, anestesiados com halotano, receberam 25,5 nMol de amilina murina. Observou-se aumentos na laticemia (efeito máximo em ½ hora) e glicemia (efeito máximo após 1h de ensaio). O estudo também mostrou que a amilina possui efeito hipotensivo;
- Inibição periférica da ingestão de alimentos (MORLEY; FLOOD, 1991) → Através da pesagem da ração consumida por camundongos (28 a 30g) constatou-se, tanto em animais sadios quanto em animais do DM TI-STZ, que a amilina (doses de 1 a 50 µg *i.p./animal*) reduz o consumo da comida. Tendo este feito permanecido mesmo quando os animais receberam insulina s.c. (sabidamente um indutor de apetite);
- Inibição, via SNC, da ingestão de alimentos, aumento do metabolismo de dopamina e serotonina e aumento dos níveis de triptofano no cérebro (CHANCE et al., 1991) → Através da administração de 2 µg de amilina por via intra-hipotalâmica foi demonstrada a redução da ingestão de alimentos por parte dos ratos submetidos ao procedimento. Também realizou-se a dosagem de dopamina e seu metabólito (ácido 3,4-dihidroxifenilacético), serotonina e triptofano em três regiões do cérebro

(hipotálamo, corpo estriado, núcleo accumbens). E, por fim, utilizando radioimunoensaio, detectou-se amilina endógena presente no cérebro de ratos (5 nMol/g) com maior concentração no hipotálamo (25 nMol/g);

- Estímulo da secreção de gastrina (FUNAKOSHI et al., 1992) → Neste estudo também foi mostrada a capacidade da amilina de estimular o pâncreas exócrino, tendo sido observados aumentos na produção de suco pancreático, bem como na produção de bicarbonato e proteínas presentes neste. O modelo utilizado foi o de ratos adultos, os quais foram canulados para a retirada das secreções pancreáticas e biliares, além de sangue. A gastrina plasmática teve seus níveis monitorados durante a infusão de amilina murina em ratos não anestesiados, tendo sido notado aumento nas concentrações de gastrina quando amilina foi administrada (10nMol/Kg/h). Ainda, o efeito da amilina sobre a gastrina foi inibido na presença de omeprazol e atropina;
- Estímulo do metabolismo exócrino do pâncreas (IWAMOTO et al., 1992) → Utilizando ácinos isolados do pâncreas de camundongos, observaram que amilina era capaz de estimular a captação de 2-deoxi-D-glicose marcada com ^3H ;
- Indução do transporte de tirosina e triptofano para o SNC (CHANCE et al., 1992) → Injeções intra-hipotalâmicas (2 μg /rato) de amilina murina aumentaram os níveis de tirosina e triptofano após a administração de 50 mg/Kg desses aminoácido;
- Modulação da aprendizagem / memória (FLOOD; MORLEY, 1992) → A capacidade de retenção de novas informações foi testada em camundongos utilizando *T-maze* (labirinto, com comida como recompensa e forte sinal sonoro mais choque como estímulo negativo). No trabalho, testou-se diferentes protocolos de *T-maze*. Ainda, a administrações de amilina tanto por via intracerebroventricular quanto por via

intraperitoneal, tendo sido constatadas diferentes respostas de aprendizagem conforme a via de administração indicando mais de um possível mecanismos para a ação desse hormônio na aprendizagem;

- Redução da glicemia e secreção de glucagon (PANAGIOTIDIS et al., 1992) → Usando camundongos fêmeas (25 a 30 g) o estudo acompanhou o efeito da administração de 5 nMol/Kg de amilina murina por via endovenosa em animais recém alimentados. Contrariamente ao que foi relatado por Young (1991), neste trabalho a amilina apresentou ação hipoglicemiante;
- Apoptose em células nervosas em cultura (MAY; BOGGS; FUSON, 1993) → Culturas primárias de hipocampo de embriões de ratos receberam 50 μ M de amilina humana e amilina murina. Tendo sido observado apoptose nas células que receberam a sequência humana, indicando que a forma amiloide de amilina é citotóxica semelhantemente ao peptídeo beta amiloide (A β);
- Inibição da secreção de insulina (DÉGANO et al., 1993) → Usando pâncreas isolados de ratos o estudo demonstrou que em concentrações de 75 pM a 75 nM a amilina foi capaz de inibir a secreção de insulina induzida por glicose;
- Inibição dos osteoclastos (ALAM et al., 1993) → A inibição da remodelagem óssea foi notada *in vitro* utilizando cultura primárias de osteoclastos de ratos, o quais tiveram sua motilidade reduzida na presença de 250 nM de amilina;
- Apoptose em culturas de células β (LORENZO et al., 1994) → Utilizando culturas primárias de células β humanas e murinas, constatou-se que a amilina humana (20 μ M) e A β causaram morte celular por mecanismos de apoptose;

- Estímulo da calciúria (MILES et al., 1994) → O trabalho utilizou cachorros adultos (~28Kg), os quais receberam amilina murina (50 pMol/Kg/min) durante 90 minutos, tendo havido redução discreta na calcemia e aumento moderado na eliminação de cálcio na urina dos cães;
- Estímulo de vasodilatação pulmonar (DEWITT et al., 1994) → O estudo avaliou os efeitos da amilina (0,1 a 0,3 nMol por animal) de CGRP em gatos, tendo sido mostrado que ambos levam à vasodilatação e conseqüente diminuição da pressão arterial pulmonar. Também foi observado efeito hipotensivo generalizado após a administração de amilina;
- Inibição da secreção de ácido gástrico (GUIDOBONO et al., 1994) → Amilina murina foi administrada por via s.c. (2 a 160 µg/Kg) ou intracerebroventricular (1,5 a 5 µg/Kg) em ratos (200 a 250 g/animal). Após isso, os conteúdos estomacais dos animais foram analisados através de titulações ácido-base com hidróxido de sódio;
- Relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas (BHOGAL et al., 1994) → Usando modelo *ex vivo* (traqueias de cobaias) demonstrou-se que tanto amilina murina quanto CGRP causam relaxamento da musculatura traqueal, sendo o efeito da amilina inibido pela adição de fosforamidon, leupeptina, bestatina, e outros inibidores de proteases;
- Indução da secreção traqueal (WAGNER et al., 1995) → Por meio de técnicas de imunohistoquímica, foi comprovada a presença de amilina nos tecidos da via respiratória inferior e, em seguida, demonstrou-se que a adição de amilina (1 µMol) é capaz de induzir a produção de muco em explantes de traqueias de ratos. E ainda, essa resposta foi inibida na presença de somatostatina;
- Ação anti-inflamatória (CLEMENTI et al., 1995) → Tanto amilina quanto CGRP

apresentaram efeitos anti-inflamatórios nos modelos de edema de orelha (10 µg de amilina humana por orelha) e peritonite (10 a 100 µg/Kg) em ratos;

- Aumento da contratilidade, e outro parâmetros tróficos em cardiomiócitos (BELL et al., 1995) → A adição de amilina à culturas primárias de cardiomiócitos de ratos adultos revelou que esta era capaz de aumentar o conteúdo de RNA, contratilidade e massa média dessas células utilizando concentrações de até 10 nM de amilina;
- Estímulo da secreção de aldosterona (NUTTALL; BRYAN; MOYSES, 1995) → A administração de amilina humana provocou o aumento da atividade de renina e níveis de aldosterona plasmática em voluntários;
- Inibição da liberação de hormônio de crescimento (NETTI et al., 1995) → A amilina, quando administrada por via intracerebroventricular em doses de 25ng a 5 µg por rato, foi capaz de inibir a liberação de GH, todavia, quando administrada por via intracarótida não foi observado efeito sobre os níveis de GH;
- Inibição do esvaziamento gástrico (YOUNG et al., 1995) → Tanto ratos saudáveis quanto ratos diabéticos foram colocados em jejum e posteriormente receberam 1,5 mL de gel de metil celulose com corante (vermelho de fenol) por gavagem, e 20 minutos após o tratamento os animais foram mortos e os conteúdos de seus estômagos quantificados por espectrofotometria. Observou-se que os animais tratados com amilina murina por via s.c., em doses de 0,1 a 100 µg por animal, possuíam maior maior quantidade do corante em seus estômagos quando comparados aos animais que não receberam o peptídeo. Os níveis plasmáticos de amilina também foram quantificados e observou-se concentrações plasmáticas máximas do hormônio 10 minutos após sua aplicação s.c. e 1h após a administração de 10 µg de amilina os níveis iniciais já

havia retornado ao estado basal;

- Redução da hiperglicemia pós-prandial (KOLTERMAN et al., 1995) → O efeito do AC 137 (análogo da amilina, posteriormente designado por pramlintide) foi testado em humanos com DM TI tendo sido observado, na dose usada (infusão venosa com 150 µg/h por 2 horas de amilina mais a dose usual de insulina para cada paciente), redução na glicemia dos voluntários após refeição e, no entanto, não foram observados efeitos quando no lugar da refeição o aumento da glicemia foi induzido por glicose i.v. 300 mg/Kg, indicando que a amilina atua na absorção da glicose do trato digestório para a corrente sanguínea. Interessantemente, estes dados estão em desacordo com os de Young (1991), os quais reportaram efeito hiperglicemiante para a amilina;
- Redução de potássio plasmático (YOUNG et al., 1996) → Em estudo pré-clínico foi mostrado que 100 µg de Pramlintide provoca queda de ~0,4mM na calemia de ratos após 1h da administração do medicamento. O estudo também relatou que não houve alterações nas pressões parciais sanguíneas de CO₂ e O₂.
- Redução de insulina, lactato, peptídeo-C e hemoglobina glicada (THOMPSON et al., 1997) → Em estudo clínico foi demonstrado, em paciente com DM TI, que o uso de pramlintide juntamente com insulina reduziu os níveis de glicose, peptídeo-C, insulina, HbA_{1C} e lactato após teste com a refeição comercial Sustacal®. Em pacientes com DM TII, que faziam uso de antidiabéticos orais também foram observadas reduções nos níveis de peptídeo-C, insulina e lactato, contudo, não foram verificadas alterações nas glicemias destes pacientes após a ingestão desta refeição padronizada. O estudo também revelou que os níveis de amilina humana se mantiveram constantes nos pacientes ao longo dos ensaios, sendo este de 11,5 ± 1,5

pM em ambos os grupos de pacientes. Por fim, náuseas e vômitos foram os principais efeitos adversos relatados no estudo;

- Aumento de receptores tiazídicos renal e redução da calciúria (BLAKELY; VAUGHN; FANESTIL, 1997) → Foi constatado que a amilina murina, injetada por via s.c. em ratos, induz o aumento dos receptores tiazídicos e diminui a calciúria, o que conflita com o trabalho de Miles (1994);
- Aumento na reabsorção de sódio tubular (HARRIS et al., 1997) → Empregando ratos anestesiados, amilina marcada com ^{125}I e técnicas de imagem por radiografia verificou-se que o peptídeo ligava-se aos túbulos proximais renais e, por meio da técnica de *split-drop*, demonstrou-se a presença de amilina aumentava a reabsorção de sódio nesta região;
- Inibição da gastrite induzida por etanol ou indometacina (GUIDOBONO et al., 1997) → Lesões gástricas foram induzidas em ratos e estas foram prevenidas quando doses de amilina (de 0,22 a 2,2 $\mu\text{g}/\text{animal}$ com até 200g) foram administradas por via intracerebroventriculas. Todavia, quando administrada por via s.c., em doses de até 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, a amilina não apresentou este efeito protetor;
- Inibição da secreção de glucagon estimulada por arginina (GEDULIN; RINK; YOUNG, 1997) → Utilizando ratos anestesiados, o grupo mostrou que amilina murina (em doses de 1,2 a 120 $\text{nMol}/\text{Kg}/\text{min}$) não altera os níveis de insulina, glicemia ou pressão arterial, mas reduz as concentrações plasmáticas de glucagon. Esta informação se opõe a trabalho anteriores como os de Young (1991), Kolterman (1995), Dégano (1993) e Brain (1990);
- Aumento da natriurese (VINE et al., 1998) → Ratos adultos foram anestesiados

foram infundidos com amilina (até concentrações plasmáticas de 52 pM e 193 pM), tendo sido observado aumento de diurese com elevação de excreção de sódio, cálcio e potássio;

- Fator de crescimento no rim (WOOKEY et al., 1998) → Por meio de hibridização *in situ* demonstrou-se a expressão de amilina em rins de ratos nos períodos embrionários (E17) e neonatais (PN3). Sendo também observada, por imuno-histoquímica, durante o período e alongamento tubular. E por fim, o uso de AC512 (um antagonista de amilina) foi capaz de inibir cultura primárias de células renais embrionárias indicando que a amilina atua como fator trófico durante o desenvolvimento renal;
- Inibição da liberação de dopamina hipotalâmica (BRUNETTI et al., 2002) → Através da dosagem de dopamina, noradrenalina e serotonina, marcadas com trítio e aplicados em ratos adultos, foi observado que a amilina promove mudanças apenas nos níveis de dopamina, o que contradiz os achados de Chance (1991);
- Inibição da secreção gástrica de histamina (ZAKI, 2002) → Usando estômagos isolados de camundongos o grupo relatou que a adição de amilina estimula a liberação de somatostatina e inibi a secreção de histamina realizada pelo fundo gástrico;
- Escoamento do humor aquoso (ALAJUUMA; OKSALA; UUSITALO, 2003) → Através da marcação com ¹²⁵I foi observado que amilina (murina, humana e felina em concentrações de 1 a 1000 nM) ligava a regiões dos olhos de diferentes espécies (macacos, cobaias e gatos). Tal ligação ocorreu em diversas regiões do olhos (musculatura ciliar, processo ciliar, iris e conjuntiva) sendo estas relacionadas ao fluxo de humor aquoso;
- Redução na taxa de esvaziamento gástrico e inibição da secreção de glucagon

- (KLEPPINGER; VIVIAN, 2003) → Em uma revisão de vários estudos clínicos os autores reportam diversos efeitos, tais como: redução da ingestão de alimento, redução dos níveis de hemoglobina glicada, redução da secreção de glucagon, redução na glicemia, redução das doses de insulina, etc;
- Estímulo da contração atrial e inibição da secreção de peptídeo natriurético (PIAO et al., 2004) → Utilizando sistema *ex vivo* (átrios obtidos de corações de ratos), o estudo revelou que tanto em animais normoglicêmicos quanto em animais DMTI-STZ a amilina (0,1 a 0,3 μM) é capaz de aumentar a contratilidade atrial e secreção do peptídeo natriurético, sendo estes efeitos abolidos nos sistemas previamente tratados com antagonista de amilina (peptídeo contendo a sequência de 8 a 37 da amilina murina e amidado no C-terminal). O antagonista de amilina, isoladamente, também se mostrou capaz de estimular a liberação do peptídeo natriurético. Cabe ainda ressaltar que a resposta à amilina está atenuada nos animais diabéticos;
 - Inibidor seletivo da reabsorção óssea (DACQUIN et al., 2004) → A análise por raios-X e da histologia de camundongos com deficiência parcial na expressão de amilina revelou quadros de osteoporose precoce com reduções de até 50 % na densidade óssea desses animais. Interessantemente, os níveis plasmáticos de cálcio, insulina, fosfato e glicose, além das concentrações de cálcio e fosfato na urina não estavam alterados nestes animais deficientes. E ainda, em culturas primárias, os precursores mononucleados dos osteoclastos não se fundiram dando origem aos osteoclastos polinucleares maduros nos camundongos com deficiência de amilina;
 - Redução de flutuações de glicose (KOVATCHEV; CREAM; MCCALL, 2008) → Em estudo de duplo-cego com pacientes de DMTI foi constatado que além da redução da

glicemia pós-prandial o uso de pramlintide (fármaco análogo da amilina) reduzia tanto os quadros de hiper quanto de hipoglicemia, e ainda, houve redução nos níveis de hemoglobina glicada nos pacientes que fizeram uso deste fármaco juntamente com insulino terapia.

Dado o grande número de ações atribuídas a amilina fica evidente que a mesma pode ser considerada como um hormônio neuroendócrino com um amplo espectro de atuação. Todavia, seu uso terapêutico no tratamento do DM tem por princípio seus efeitos diretos e indiretos sobre a glicemia, conforme será descrito mais adiante.

1.4.3 – Uso terapêutico da Amilina

Sendo a amilina um hormônio com ação sobre a glicemia, seu emprego com fins terapêuticos foi proposto juntamente com a sua descoberta. Todavia, o uso da amilina como biofármaco foi dificultado devido a sua baixa solubilidade e tendência a formar agregados amiloides em meios aquosos. O amlintide, um análogo sintético da amilina, foi o primeiro protótipo a ser produzido. Contudo, o amlintide também formava agregados amiloides, assim como a amilina e por tanto era impróprio para aplicações terapêuticas (“USAN council. List No.392. New names. Amlintide”, 1997). Diversos análogos de amilina foram produzidos e testados até que se concluísse que as substituições por prolinas nas posições 25, 28 e 29 são determinantes para a estabilidade de peptídeo (YOUNG et al., 1996).

O melhor entendimento acerca da estabilidade da amilina e seus análogos possibilitou que se chegasse à seqüência de aminoácidos que constitui o biofármaco pramlintide (Fig. 6)

(KOLTERMAN et al., 1995), o qual foi originalmente denominado por AC137 (YOUNG et al., 1996). Os estudos clínicos mostraram que nos grupos de pacientes que fizeram uso do pramlintide (administrado juntamente com insulina) houve um melhor controle glicêmico (evidenciado pela redução nos níveis de hemoglobina A glicada - HbA_{1c}) e estes pacientes também apresentaram menor ganho de peso, quando comparados com o grupo que recebeu apenas insulina (HAYDEN; TYAGI, 2001). Os testes clínicos também revelaram que o pramlintide, em combinação com insulina, foi capaz de reduzir a glicemia pós-prandial pela menor ingestão de alimentos (efeito anorexígeno via SNC), pela redução na taxa de esvaziamento gástrico e inibição da secreção de glucagon (KLEPPINGER; VIVIAN, 2003). Em resumo, os principais resultados encontrados foram: perda de peso e apetite (ARONNE et al., 2007; HOLLANDER et al., 2004), melhor controle glicêmico (HAYDEN; TYAGI, 2001) e diminuição das doses de insulina necessárias a manutenção adequada da glicemia (HOLLANDER et al., 2004; LUSH et al., 2007; RIDDLE et al., 2007; THOMPSON et al., 1997; YOUNG, 2005).

Figura 6 – Sequências de aminoácidos da amilina humana, amilina de rato/camundongo (murina) e pramlintide.

A inexistência de formulações capazes de evitar a agregação da amilina criou a necessidade de se desenvolver um biofármaco mais estável (pramlintide). Todavia, o pramlintide é um análogo da amilina humana, com quatro aminoácidos diferentes, dos quais três são prolinas (aminoácidos que sabidamente induzem a formação de estruturas secundárias

randômicas). Assim, é possível supor que o pramlintide pode apresentar significativas diferenças em respostas metabólicas e imunológicas comparado à amilina endógena e, portanto diversos efeitos adversos. Embora a literatura careça de informações quanto aos efeitos adversos em longo prazo (SINGH-FRANCO; ROBLES; GAZZE, 2007; YOUNG, 2005), efeitos adversos como náusea, episódios de vômito e anorexia têm sido frequentemente associados, a terapia com pramlintide (HOLLANDER et al., 2004; LUSH et al., 2007; SINGH-FRANCO; ROBLES; GAZZE, 2007), que pode estar associada às mutações pontuais na sequência nativa de amilina.

Outra questão a ser considerada quando avaliada a terapia com pramlintide é a taxa de liberação e biodisponibilidade do fármaco. A utilização de pramlintide tem sido associada ao risco de hipoglicemia causada pela insulina, especialmente em pacientes DMTI (EDELMAN, 2006; WHITEHOUSE et al., 2002). Sendo o pramlintide um peptídeo, sua administração através de injeções subcutâneas é necessária a fim de se evitar a degradação no trato digestório. A biodisponibilidade das injeções subcutâneas de pramlintide é de 30 a 40% (comparada a biodisponibilidade de aplicações intravenosas) e as posologias usualmente empregadas são de 30 a 120 µg antes das refeições. A concentração plasmática máxima, $C_{m\acute{a}x}$, ocorre aproximadamente 20 minutos após a administração subcutânea (EDELMAN, 2008). A baixa disponibilidade aliada à alta incidência de eventos hipoglicêmicos oriundos da necessidade de uma administração cuidadosa para evitar variações na dosagem, apontam para a necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos, que prolongue a ação deste fármaco ou de outro amilinomimético.

1.3 – O Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da FF-UFRJ e a Amilina

A linha de pesquisas sobre amilina começou em 2008 no Lab.Biotec.Farm e, inicialmente, o foco dos estudos era a encapsulação de amilina humana em matrizes poliméricas (policaprolactona, ácido poli-láctico-glicólico). A ideia central do projeto seria a de que uma vez encapsulada em uma matriz sólida e amilina humana não formaria fibras amiloides e, por conseguinte, esta formulação seria capaz de manter a atividade biológica dessa sequência de amilina que, até então, não havia sido formulada na forma de medicamento devido a sua instabilidade em meio aquoso.

As tentativas de encapsulação do peptídeo foram bem sucedidas e os resultados *in vitro* revelaram que a amilina estava sendo lentamente liberada do sistema polimérico em alguns dias, houve então a necessidade de se avaliar este novo protótipo de medicamento em um sistema biológico. Embora a literatura reporte mais de uma dezena de modelos para se avaliar os efeitos da amilina, a seleção do modelo farmacológico para esse estudo não foi trivial, isso porque muitos das metodologias descritas não são adequados para o estudo proposto (capaz de responder de forma diferenciada a uma formulação de liberação sustentada, de modo que fosse possível correlacionar efeito farmacológico com os dados *in vitro*). Assim, dentre os modelos *in vivo* disponíveis na literatura buscou-se trabalhar com o mais simples disponível (avaliação da glicemia periférica), toda via, dados conflitantes da literatura (conforme apresentados na seção anterior) tornaram mandatório um estudo mais aprofundado do modelo farmacológico usado para avaliar os efeitos da amilina sobre a glicemia. Assim, em 2012 o grupo publicou seu primeiro trabalho relacionado ao desenvolvimento de novas terapias utilizando amilina (GUERREIRO et al., 2012)

1.4 – Peguilação de proteínas e peptídeos de interesse terapêutico

Estima-se que a venda de biomedicamentos, em sua maioria constituídos por proteínas terapêuticas, tenha sido de 33 bilhões de dólares em 2004 e com crescimento para 99 bilhões em 2009 o que correspondeu a 16,5 % de todo o faturamento da indústria farmacêutica em 2009 (WALSH, 2010). De fato, os biomedicamentos têm-se mostrado *blockbusters* da indústria farmacêutica, sendo que mesmo a Insulina (primeiro biofármaco) ainda apresenta um faturamento estimado de U\$ 7,9 bilhões em 2007 (PARMAR, 2006; PAVLOU; REICHERT, 2004). Conforme exposto anteriormente, o Brasil é o maior comprador de insulina e também um grande mercado para os demais biomedicamentos.

Proteínas e peptídeos tem sido largamente utilizados pela indústria farmacêutica para o tratamento das mais diversas doenças, contudo estas biomacromoléculas apresentam peculiaridades que as distinguem dos fármacos convencionalmente utilizados na terapêutica.

Segundo Aulton:

“É evidente que as proteínas de uso terapêutico oferecem desafios especiais ao formulador farmacêutico. Essas moléculas são grandes, de estrutura delicada e apresentam numerosos grupos funcionais” (AULTON, 2006)

Atualmente existem estratégias consagradas para se prolongar a vida útil dos biomedicamentos na prateleira utilizando abordagens como liofilização ou uso de estabilizantes visando a preservação da integridade dessas moléculas. Todavia, a instabilidade desses fármacos não é um problema que diz respeito somente ao tempo de vida nas

prateleiras, visto que *in vivo* são diversos os processos que podem levar a uma rápida perda de efeito. Dentre os principais mecanismos que levam a redução do tempo de atividade dos biofármacos estão (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2012):

- Reconhecimento pelo sistema reticuloendotelial
- Depuração plasmática através da filtração glomerular
- Clivagem proteolítica por endopeptidases em diversos tecidos do organismo
- Reconhecimento e opsonização pelo sistema imunofagocitário

Visando otimizar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas desses peptídeos e proteínas tem-se investido em diversas abordagens como por exemplo a modificação das sequências de aminoácidos, incluindo a introdução de aminoácidos não naturais que podem impedir a ação de diversas proteases (WERLE; BERNKOP-SCHNÜRCH, 2006), derivatização com imunoglobulinas ou outras proteínas plasmáticas visando uma camuflagem contra o sistema imunológico e também reduzindo a filtração glomerular e consequente depuração (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008), dentre outras estratégias. Nesse sentido o uso de moléculas de polietilenoglicóis como agentes derivatizantes tem se mostrado uma valiosa ferramenta na produção de novos biomedicamentos (FONTANA et al., 2008).

O marco inicial dessa abordagem se deu em 1977 quando Abuchowski e colaboradores conseguiram ligar polietilenoglicóis de massas entre 1900 Da e 5000 Da a moléculas de albumina de soro bovino e, a seguir, injetaram os produtos das reações em coelhos observando que havia baixa resposta imunológica nos coelhos que receberam

albumina peguilada em comparação com aqueles que receberam albumina livre (ABRAHAM ABUCHOWSKI et al., 1977). Nesse mesmo ano este grupo de pesquisadores conseguiu realizar a peguilação da enzima catalase com a preservação da sua atividade catalítica o que pode ser considerado como uma quebra de paradigma, visto que até essa data as proteínas eram vistas como estruturas muito exigentes, que mesmo pequenas alterações levariam a perda de atividade biológica (ABUCHOWSKI et al., 1977). Atualmente o número de biofármacos peguilados é cada vez mais expressivo havendo diversos produtos com essa tecnologia chegando ao mercado.

Dentre as vantagens dos biofármacos peguilados sobre os mesmos na forma livre, não peguilada, podem-se destacar:

- **Maior tempo de meia-vida plasmática** e consequente aumento de duração dos efeitos farmacológicos devido a fenômenos como:
 - **Redução da depuração renal** → graças ao aumento nos raios hidrodinâmicos das moléculas peguiladas, o que dificulta sua filtração glomerular (CHENG et al., 1999);
 - **Redução da captação e degradação pelo sistema retículo endotelial-SRE** → o SRE não reconhece as moléculas de PEG e, por isso, essas acabam atuando como camuflagem encobrindo o peptídeo de interesse para esse sistema (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008);
 - **Redução da degradação de proteases inespecíficas** presentes em diversos tecidos → as moléculas de PEG podem gerar impedimentos estéricos impossibilitando a ligação dos substratos (ligações peptídicas) ao sítio catalítico

das proteases (CALCETI et al., 2004; HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008).

- **Redução da imunogenicidade** → devido ao grande grau de liberdade das moléculas de PEG, o sistema imunológico apresenta dificuldades em reconhecer este como antígeno e formar anticorpos contra os mesmos. Cabendo aqui ressaltar que, experimentalmente foram gerados anticorpos contra PEG em camundongos desafiados utilizando protocolo para esse fim, mas nos estudos clínicos não foram observados pacientes com resposta imunológicas contra os PEG utilizados nos medicamentos peguilados (ABRAHAM ABUCHOWSKI et al., 1977; SCHELLEKENS; HENNINK; BRINKS, 2013).
- **Aumento da estabilidade química** → devido a sua natureza anfipática os PEGs aumentam a solubilidade dos biofármacos e conseqüentemente podem evitar sua precipitação, cristalização ou até mesmos sua agregação (SHECHTER et al., 2008).

Devido a essas melhorias, o produtos peguilados tem tido uma atenção especial no cenário biotecnológico com um rápido aumento do desenvolvimento e comercialização de proteínas terapêuticas peguiladas (Fig. 7). No entanto, a produção de novos biofármacos peguilados não se mostra como uma tarefa trivial, tendo em vista que a peguilação pode modificar drasticamente muitas das características que são necessárias para a manutenção da atividade biológica destes biofármacos. Assim, para o planejamento de novos produtos peguilados deve-se traçar estratégias de peguilação que levem em consideração fatores como: números de PEGs que se pretende ligar ao peptídeo, tamanho das cadeias de PEG, escolha entre PEGs lineares ou ramificados, sítios de ligação para o PEGs (de modo a não comprometer as subunidades responsáveis pelo reconhecimento molecular), etc.

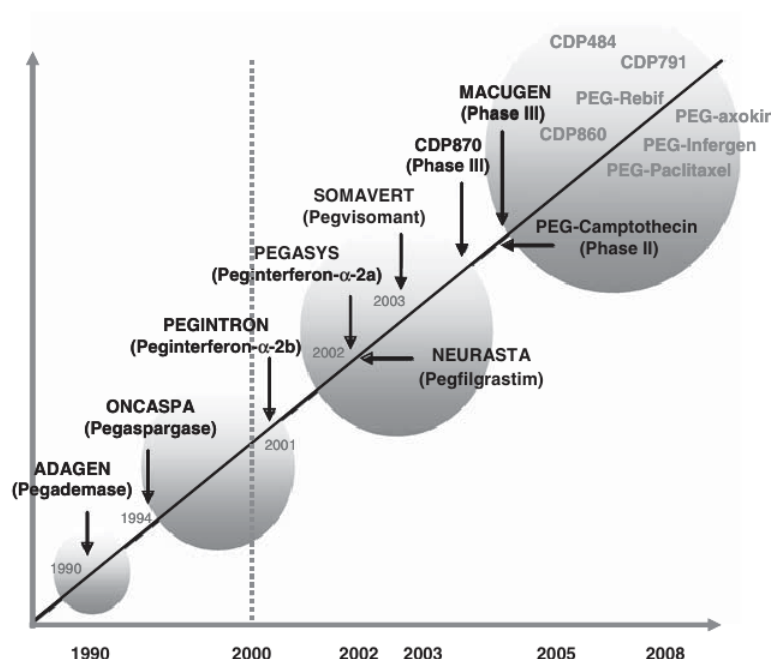


Figura 7 – Produtos peguilados, já comercializados ou em fase de pesquisa clínica.

Desde a primeira proteína peguilada, Pegademase (Adagen) em 1990 seguida por um rápido crescimento no setor de produtos farmacêuticos peguilados simbolizado pelos círculos na figura. Em 2004, havia um total de 26 produtos peguilados aprovados pelo FDA (GAD, 2007)

1.4.1 – PEGs e estratégias de ligação à proteínas e peptídeos

Os polietilenoglicóis, ou simplesmente PEGs, são polímeros sintéticos cuja unidade formadora, óxido de etileno, é acrescentada à cadeia em formação através de uma polimerização iniciada com abertura aniônica de anel epóxido. O PEG mais empregado tem como inicializador da cadeia metóxido de sódio e o produto gerado é chamado de metoxipolietilenoglicol – mPEG. O tratamento do óxido de etileno com metóxido de sódio (na presença de uma pequena quantidade de metanol) resulta na formação de um poliéter (Fig. 8). Sendo este um exemplo de polimerização iônica, na qual a cadeia de polímero continua crescendo até que o metanol presente no meio reacional protone o grupo alcóxila na ponta da cadeia. Vale ressaltar que o comprimento médio do polímero pode ser controlado pela

quantidade de metanol presente no meio (SOLOMONS; FRYHLE, 2005).

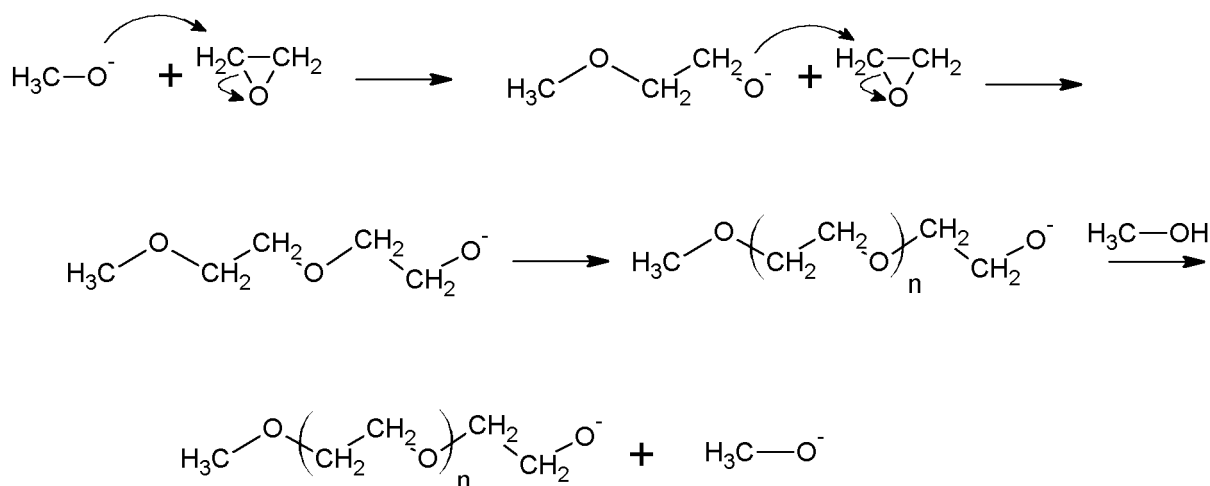


Figura 8 – Síntese de polietilenoglicol.

Ataque nucleofílico da alcoxila ao óxido de etileno e abertura do anel epóxido com formação de nova alcoxila na extremidade da cadeia em crescimento com a reação sendo interrompida após a reação do polímero com metanol (SOLOMONS; FRYHLE, 2005).

Embora sua unidade monomérica, etilenoglicol, e formas de baixo peso molecular sejam tóxicas, as formas polimerizada, com pesos moleculares superiores a 1000 Da. são consideradas atóxicas e, por isso, tem seu uso aprovado pelo FDA desde a década de 70 para as mais variadas formas farmacêuticas e cosméticas, sendo comumente encontrados em: xaropes, cremes, pomadas, supositórios e preparações parenterais (WORKING PETER K. et al., 1997).

A denominação PEG seguida por um numeral arábico indica o peso molecular médio do referido PEG, assim o termo PEG 1000 é utilizado para um polietilenoglicol com massa molecular média de 1000 Da. Esta distinção é importante pois muitas das propriedades dos PEG estão atreladas as suas massas moleculares, sendo por exemplos o PEG 80 um líquido de baixa viscosidade, o PEG 400 um líquido com viscosidade moderada, enquanto que o PEG

5000 é sólido a temperatura ambiente (WORKING PETER K. et al., 1997).

Além da baixa toxicidade, outra vantagem da utilização dos PEGs para bioconjugações de fármacos está o fato de que esses polímeros apresentam baixa polidispersão (M_w/M_n menor que 1,01 para PEGs com até 5KDa e até 1,1 para PEGs com mais de 50 Kda), o que possibilita a formação de produtos peguilados homogêneos (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2012).

Existem diversas formas de se ligar moléculas de PEG à proteínas e peptídeos, sendo as principais estratégias voltadas para a ligação do PEG funcionalizado (contendo grupamento reativo em pelo menos uma das extremidades do polímero) com de grupamentos tais como aminas, tiois e ácidos carboxílicos presentes nos aminoácidos. A primeira geração de PEG utilizados como derivatizantes era voltada para a ligação com amina primárias, presentes no *N*-terminal e em lisinas, sendo a seguir destacados alguns desses PEG funcionalizados e seus produtos de reação.

I – PEGs de primeira geração (reagem preferencialmente com aminas primárias)

- PEG diclorotriazina → Este derivatizante pode reagir com diferente grupamentos nucleófilos (e.g. hidroxilas presentes em serinas e tirosinas, tiois presentes em cisteínas e principalmente com as aminas presentes no *N*-terminal e na cadeia lateral de lisinas) (ABUCHOWSKI et al., 1977, 1977). Durante a reação, a liberação de um cloreto como grupo abandonador, mas podem ocorrer reações cruzadas porque o cloreto remanescente no grupamento clorotriazina é, embora pouco, reativo

podendo-se gerar produtos com duas proteínas ligadas a um mesmo PEG, ou uma mesma proteína ligada por dois pontos distintos no mesmo PEG. Essas ligações cruzadas costumam levar à drásticas reduções de atividades biológicas, sendo uma estratégia possível para se evitar essas ligações o uso de PEGs ramificados, nos quais duas moléculas de PEGs estão funcionalizadas com um grupamento clorotriazina conforme apresentado na figura 9 (ASHIHARA et al., 1978);

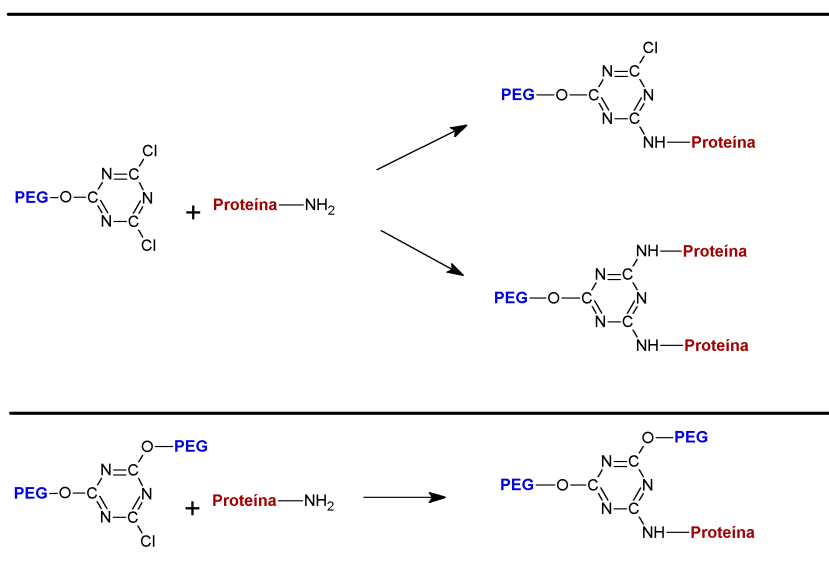


Figura 9 – PEG diclorotriazina e sua reação com aminas primárias de proteínas.

Acima reação com derivatizante linear, sendo observada a formação tanto do produto de interesse (com uma molécula de proteína) quanto o produto da reação cruzada com o segundo cloro da diclorotriazina. Abaixo e reação com PEG ramificado gerando apenas o produto de interesse (ABUCHOWSKI et al., 1977; ASHIHARA et al., 1978; ZALIPSKY, 1995).

- PEGs alquilantes → Neste grupo estão os PEGs aldeídos que reagem com aminas formando bases de Schiff, que depois são reduzidas a aminas secundárias com cianoborohidreto de sódio, tendo como principal desvantagem a sua instabilidade devido a condensação aldólica, a qual leva a dimerização dos PEG aldeídos e consequente perda de reatividade. Também fazem parte deste grupo os PEGs tresilados (GAIS; RUPPERT, 1995), os quais são mais seletivos para aminas, mas

podem gerar produtos secundários contendo grupamento sulfamato, que é facilmente degradado, reduzindo a estabilidade do produto peguilado. E, por fim, os PEGs epóxidos que também reagem primariamente com aminas, mas que apresentam reatividade moderada para grupamentos hidroxilas, o que dificulta seu emprego (Fig. 10) (VERONESE; PASUT, 2005);

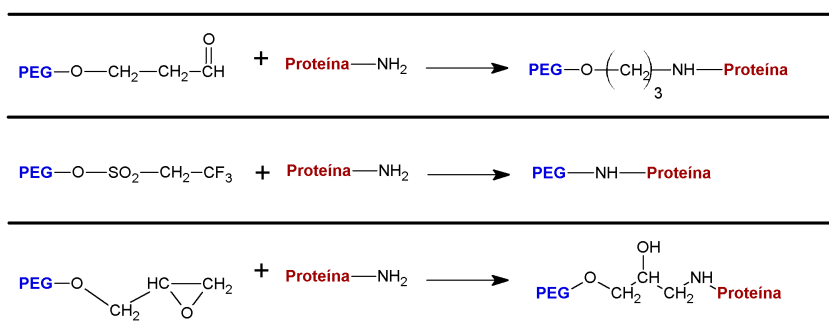


Figura 10 – PEGs alquilantes e seus produtos.

Reações com aminas primárias de proteínas, sendo: reação com PEG aldeído, PEG tresilado e PEG epóxido, respectivamente (GAIS; RUPPERT, 1995; VERONESE; PASUT, 2005).

- PEG succinimidil carbonato, PEG-SC → Reagem preferencialmente com a amina ε de lisinas formando uma ligação de carbamato, sendo estes os PEGs mais empregados dentre os PEGs acilantes, tendo sido mostrado que este apresenta uma meia-vida de 20,4 minutos (a 25°C em soluções aquosas), e que este pode fazer ligações com histidinas formando imidazolcarbamatos, os quais são rapidamente hidrolisados (MIRON; WILCHEK, 1993; ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2012; ZALIPSKY; SELTZER; MENON-RUDOLPH, 1992)(Fig. 11);

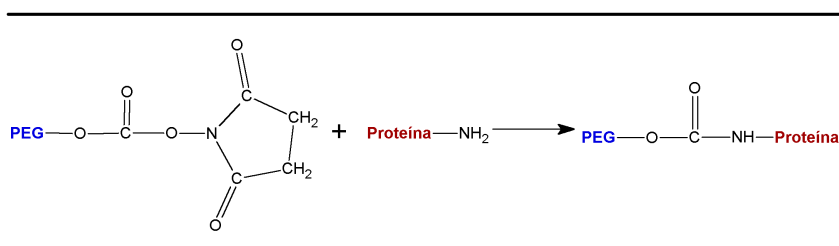


Figura 11 – PEG succinimidil carbonato e seu produto

Reação com amina primária de uma proteína (MIRON; WILCHEK, 1993; ROBERTS; BENTLEY; HARRIS,

2012; ZALIPSKY; SELTZER; MENON-RUDOLPH, 1992).

- PEG benzotriazol carbonato, PEG-BTC → A exemplo do PEG succinimidil carbonato, também reagem preferencialmente com a amina ε de lisinas formando uma ligação de carbamato. Tendo o reagente uma meia-vida de aproximadamente 13,5 minutos. Este reagente se comporta de forma semelhante ao PEG succinimidil carbonato e também pode reagir com histidinas (DOLENCE et al., 1994)(Fig. 12);

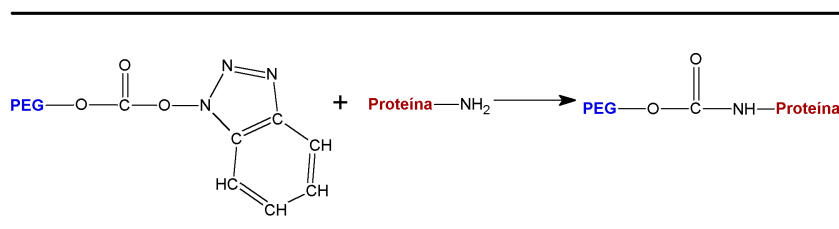


Figura 12 – PEG benzotriazol carbonato e seu produto.

Reação com amina primária de uma proteína (DOLENCE et al., 1994).

- PEG p-nitrofenil carbonato, PEG-pNPC → Menos reativo que PEG-SC e PEG-BTC este reagente apresenta uma cinética mais branda o que possibilita seu emprego em reações seletivas (por exemplo, quando se deseja peguilar aminas mais expostas na superfície de proteínas sem que ocorram peguilações dos demais grupos nucleofílicos de proteínas) (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2012; VERONESE et al., 1985)(Fig. 13);
- PEG triclorofenil carbonato, PEG-TCP → Apresenta reatividade semelhante ao PEG-pNPC, sendo que ambos apresentam como vantagem a liberação de fenolato com o decorrer da reação, o que facilita o acompanhamento desta tendo-se em vista que o fenolato é facilmente dosado por colorimetria (BEAUCHAMP et al., 1983;

ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2012) (Fig.13);

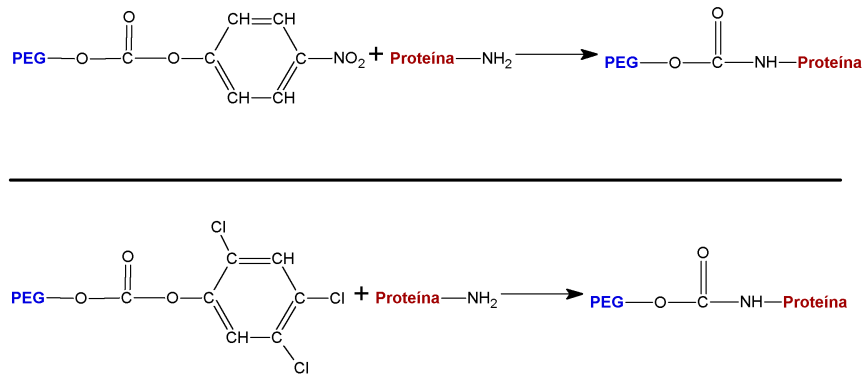


Figura 13 – Reações entre PEG *p*-nitrofenil carbonato, acima, e PEG triclorofenil, abaixo.
 Reações com aminas primárias de proteínas (BEAUCHAMP et al., 1983; ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2012; VERONESE et al., 1985).

- PEG succinimidil succinato, PEG-SS → É obtido a partir da reação entre PEG e anidrido succínico seguida pela ativação do ácido carboxílico com succinimidil éster (Fig. 14). A presença de um éster no produto peguilado torna este muito suscetível à hidrólises com a liberação da proteína ligada a um grupamento succinato o que pode elevar a imunogenicidade da mesma (ABUCHOWSKI et al., 1984; CARTER; MEYERHOFF, 1985).

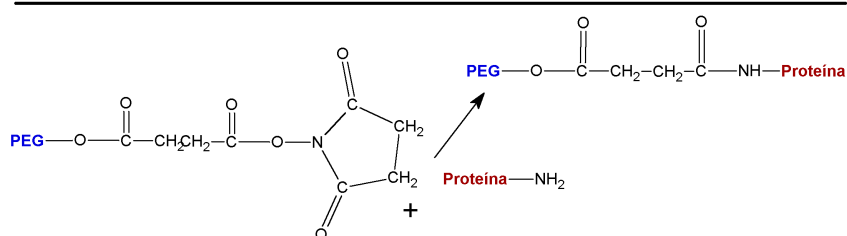


Figura 14 – PEG succinimidil succinato e seu produto.
 Reação com amina primária de uma proteína (ABUCHOWSKI et al., 1984; CARTER; MEYERHOFF, 1985).

II – PEGs de segunda geração

- PEGs aldeídos de segunda geração → dada a instabilidade dos PEG aldeídos de primeira geração buscou-se derivatizantes mais estáveis como o PEG propionaldeído que reage seletivamente com amina de *N*-terminais em pH levemente ácido (~5,0). Outra estratégia para se contornar a instabilidade desses reagentes foi o uso da forma acetal com a produção da forma aldeídica *in situ* por hidrólise ácida do acetal (BENTLEY; HARRIS, 1999; EDWARDS, 1999; KINSTLER et al., 1996) (Fig. 15);

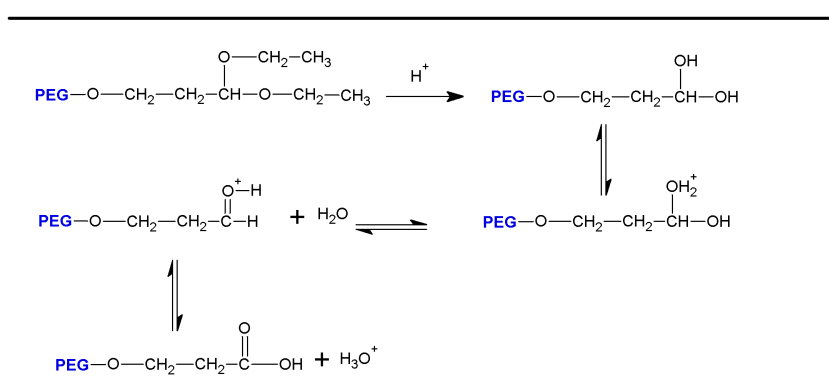


Figura 15 – Formação de PEG aldeído *in situ*.

Essa estratégia evita a polimerização do derivatizante e melhora a seletividade para aminas (BENTLEY; HARRIS, 1999; EDWARDS, 1999; KINSTLER et al., 1996).

- PEGs acilantes de segunda geração → as primeiras gerações deste não possuíam ligações degradáveis em suas estruturas como as presentes no PEG-SS, e, ainda, os ésteres de succinimidil possuíam tempos de meia-vida em soluções aquosas menores que 1 minuto. Esta elevada reatividade dificulta seu uso de forma seletiva. A adição de grupamentos espaçadores entre mPEG e succinimidil foi proposta por Harris (1997) e, como resultado, o derivatizante com grupamento espaçador ácido butanoico tem

meia-vida de 23 minutos (solução aquosa pH 8 a 25°C), enquanto que seu análogo com ácido propanoico possui meia-vida de 16,5 minutos nas mesmas condições. A redução da velocidade de hidrólise, sem comprometimento com a cinética de ligação à aminas, nos PEGs acilantes de segunda geração possibilitou maior seletividade para esses agente peguilantes (HARRIS; KOZLOWSKI, 1997);

- PEGs para modificação de cisteínas → a ligação dos grupamentos tiois das cisteínas livres oferece a vantagem de que este grupamento está em menor abundância na maioria das proteínas e, por isso, a reação seletiva para este gera produtos com baixo índice de peguilações, o que permite a manutenção da atividade biológica dos derivados peguilados. Destacam-se netas categoria: PEG-maleimida (PEG-MAL), PEG-vinilsulfona (PEG-VS), PEG-iodoacetamida (PEG-IA) e PEG-ortopiridil dissulfeto (PEG-OPSS) (Fig. 16). O PEG-VS e PEG-IA reagem lentamente com tiois em condições alcalinas. Por outro lado, o PEG-MAL é mais reativo mesmo em condições levemente ácidas (pH 6-7), mas este reagente pode sofrer hidrólise levando à perda de sua reatividade. Por fim, o PEG-OPSS apresenta reatividade em uma ampla faixa de pH (3 a 10) gerando produtos estáveis (exceto sob condições redutoras) (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2012; VERONESE; PASUT, 2005)

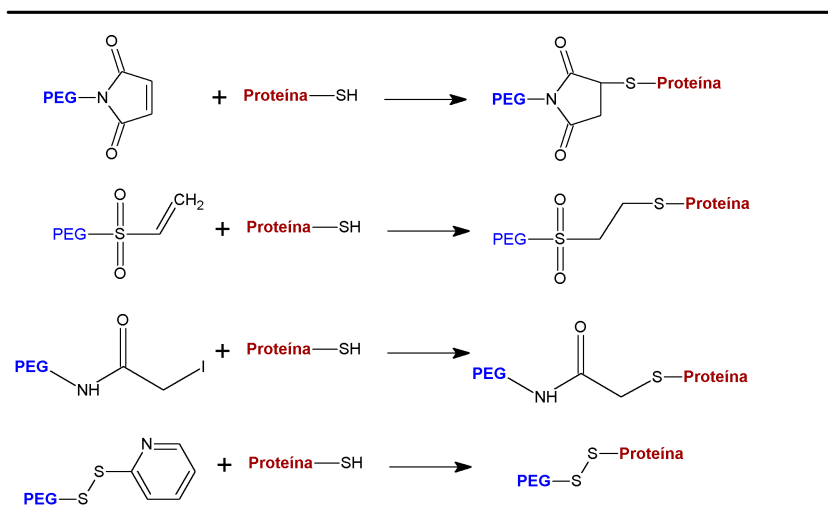


Figura 16 – PEGs para ligação à cisteínas.

PEG-maleimida (PEG-MAL), PEG-vinilsulfona (PEG-VS), PEG-iodoacetamida (PEG-IA) e PEG-ortopiridil dissulfeto (PEG-OPSS) respectivamente (ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2012; VERONESE; PASUT, 2005).

Além das estratégias apresentadas, existem muitas outras formas de PEGs utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos. A possibilidade de utilização de PEGs bifuncionalizados, por exemplo, permite o endereçamento de nanopartículas para liberação de fármacos em determinados locais do organismo de forma direcionada (XIA et al., 2012). Neste trabalho foram utilizados mPEGs acilantes (mPEG succinimidil propionato e mPEG succinimidil carbonato) por serem derivatizantes bem estabelecidos na literatura, seletivos para grupamentos aminas e possibilitarem reações em condições brandas, sendo os resultados discutidos mais a frente.

2 – Objetivos

2.1 – Preâmbulo

O desenvolvimento de novas tecnologias na área das ciências farmacêuticas exige um desenho experimental criterioso que deve englobar não apenas o produto, mas também todas as etapas de desenvolvimento deste e dos critérios de aceitação para o mesmo. Portanto, a presente tese teve como objetivo primordial o desenvolvimento de novos compostos amilnomiméticos que apresentassem atividade hipoglicemiante, e, para tanto, os objetivos específicos descritos abaixo foram propostos

2.2 – Objetivos específicos

Afim de se tornar possível a execução deste trabalho o mesmo foi subdividido em três etapas experimentais contendo cada uma seus respectivos objetivos específicos:

- Desenvolvimento do modelo farmacológico
 - Estabelecer espécie animal de trabalho
 - Estabelecer tipos de análises e metodologias para coleta de informações
 - Estabelecer condições experimentais com maior reprodutibilidade
- Identificação da subunidade da sequência primária da amilina responsável pelo efeito farmacológico
 - Sugerir sequências com base nas informações da literatura
 - Avaliar efeito de cada sequência em diferentes concentrações
 - Avaliar propriedades físico-químicas das sequências estudadas
- Peguilação
 - Definir condições para reação
 - Caracterizar cinética reacional
 - Purificar produtos peguilados
 - Identificar sítios de peguilação
 - Avaliar efeito farmacológico dos produtos peguilados

3 – Material e Métodos

3.1 – Reagentes e equipamentos

- **Acetonitrila** → Fabricante: TEDIA COMPANY FNC (código de catálogo AS1122-001), lote 12012032;
- **Ácido trifluoracético** → Fabricante: VETEC (código de catálogo 1265), lote 0806524;
- **Amilina murina** (CAS 122384-88-7), amidada no C-terminal e com ponte dissulfeto entre Cys2-Cys7 → Fabricante: GenScript (código de catálogo RP11280), lotes 55613-1, 40214-1 e 128567001040611LQ;
- **Azul de Comassie G250** → Fabricante: VETEC (código de catálogo 407), lote 0803179;
- **Colunas** → TSKgel G3000SW XL (7,5mm x 30 cm x 5 µm, Tosho Bioscience LLC, código de catálogo P6573-04PNM) e Kromasil (10mm x 250mm x 5 µm, Kromasil LLC, código de catálogo 100-5-C18);
- **Cromatógrafo** → Fabricante: Jasco (Bomba PU-20895 Plus, Módulo de Controle LC-NETII/ACD e Detector UV-2075 Plus);
- **Dimetilsulfóxido** → Fabricante: VETEC (código de catálogo 347), lote 1007431;
- **EIA para dosagem de glucagon** → Fabricante: USCN (código de catálogo E91266MU), lote 111121677;
- **EIA para dosagem de insulina** → Fabricante: Millipore (código de catálogo EZRMI-13K), lote 3956482;
- **Fluorescamina** → Fabricante: Sigma-Aldrich Brazil (código de catálogo F9015-250MG), lote 069K4025;
- **Fluorímetros** → Fabricante: Jasco (modelo JFP6300) Spectramax (modelo M5);

- **Glicosímetros** → Accu-ChekR Active, Roche Diagnostics, números de série GC02476995 e GN08146937;
- **Halotano** → Fabricante: Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Lote: 11021110;
- **mPEG-NHS carbonato** → Fabricante: Nanocs (USA), lote PEG1-0001;
- **mPEG-NHS propionato** → Fabricante: Nanocs (USA), lote PEG5-0101;
- **Peptídeos análogos à amilina humana** → Fabricante: GenScript, lote 940310, sequências: hAMY1-10 → K₁CNTATCATQ₁₀ (com ponte dissulfeto Cys2-Cys7), hAMY9-19 → T₉QRLANFLVHS₁₉, hAMY10-16 → Q₁₀RLANFL₁₆ e hAMY28-37 → S₂₈STNVFSNTY₃₇ (amidado no C-terminal).

3.2 – Avaliação dos efeitos da Amilina sobre a glicemia

Conforme exposto na introdução deste trabalho, existe uma ampla gama de estudos que demonstram os mais diversos efeitos para a amilina. Dentre tantos efeitos, a modulação na glicemia parece um dos mais interessantes do ponto de vista farmacoterapêutico, uma vez que a homeostase da glicose sanguínea esta comprometida em uma das doenças de maior prevalência mundial, o Diabetes Mellitus. Assim, para a busca de novos amilinomiméticos faz-se necessários uma metodologia, reproduzível e capaz de indicar seus efeitos *in vivo* sobre este importante parâmetro bioquímico.

3.2.1 – Modelo I: Ratos anestesiados

Para este ensaio a metodologia empregada foi adaptada de (WANG et al., 1992) e será brevemente descrita a seguir:

Ratos adultos Wistar machos pesando $300\text{g} \pm 20\text{g}$ foram colocados em jejum 4h antes do início dos experimentos. Após anestesiados com halotano e colocados em decúbito dorsal (em plataforma aquecida), prendendo-se as patas e cabeça dos animais. O procedimento cirúrgico iniciou-se com a diérese e avulsão da pele do tórax na região da parede ântero-lateral direita ao pescoço para a localização da artéria carótida direita. Procedeu-se então, a dissecação desta, sendo, a seguir, colocados fios de algodão com nós frouxos (para que não houvesse obstrução do fluxo sanguíneo) na artéria dissecada e fez a introdução da cânula (6 cm x 1,6 mm de diâmetro interno e rinsada com solução de 50 U/mL heparina) na artéria carótida direita para as posteriores retiradas de sangue. Após duas horas do início da anestesia, fez-se a aplicação de amilina murina ou salina por via subcutânea. A cada intervalo de tempo foram retirados 100 μL de sangue arterial para as medidas (este experimento foi realizado sob a supervisão da Dra Daniella de Moraes Mizurini e aprovado pela comissão de bioética em experimentação animal do CCS sob o código FARMACIA05/2012).

3.2.2 – Modelo II: Camundongos não-diabéticos em jejum

Camundongos suíços machos com quatro a seis semanas de idade ($25\text{ g} \pm 3\text{ g}$) foram divididos em grupos controle ($n = 4$) e grupos teste ($n = 4$ por concentração/condição testada). Os animais ficaram alojados em salas com temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12:12 h. Água e comida eram disponíveis *ad libitum*, tendo a comida sido suspensa 4 h antes dos experimentos realizados em jejum. A exceção determinados ensaios testados (ver resultados) os animais foram mantidos em jejum durante os experimentos e à temperatura constante. Os grupos controle receberam 100 μL de solução salina (0,9% NaCl) ou tampão fosfato - PBS (8,1 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4)

como descrito nas legendas das figura, e os demais grupos (grupos testes) receberam 100 µL solução contendo de amilina murina em diferentes dosagens, peptídeos contendo fragmentos da sequência da amilina humana, amilina humana *wildtype* ou formas peguiladas de amilina murina, sendo todos estes diluídos em salina ou tampão fosfato em diferentes concentrações conforme indicado nos resultados expostos mais a frente. As soluções foram administradas por via subcutânea utilizando seringas hipodérmicas com agulhas 29 gauge. As concentrações de glicose foram monitoradas por meio de sangue total da ponta da cauda usando glicosímetros pré-calibrados (Accu-ChekR Active, Roche Diagnostics, Germany; n°s de série GC02476995 e GN08146937) antes da injeção e em intervalos repetidos após a administração por até 20 h. Este protocolo está de acordo com as recomendações do Mouse Metabolic Phenotipagem Consortium Center (MMPC) do National Institutes of Health (NIH) para a experimentação animal e para avaliar os efeitos de compostos metabólicos na homeostase da glicose (AYALA et al., 2010), e seguiu os princípios de cuidados com animais de laboratório (NIH publicação 85-23, revisado em 1985). Esta metodologia foi desenvolvida em parceria com o Dr. Daniel da Silva e aprovada pela comissão de bioética em experimentação animal do Centro de Ciências da Saúde (CCS) – UFRJ também sob o código FARMACIA05/2012.

3.2.3 – Modelo III: Camundongos diabéticos

Camundongos suíços machos com 4 a 6 semanas com 25 ± 3 g, foram divididos em dois grandes grupos: Controle (receberam salina) e Diabético (tratados com STZ). Os animais ficaram alojados em uma sala de temperatura controlada, com ciclo luz-escuro de 12 h e tiveram livre acesso à água e ração. O DMTI foi induzido pela administração i.p. de

estreptozotocina (STZ, 200 mg/kg) dissolvida em tampão citrato fresco (100 mM, pH 4,5). O grupo Controle recebeu apenas o veículo (0,1 mL de salina). Cinco dias após a administração de STZ, foi coletado o sangue da cauda dos camundongos, e os níveis de glicose medidos. Considerou-se diabéticos os animais que apresentaram glicemia superior a 300 mg/dL (SILVA et al., 2010; WU; HUAN, 2008; YOUNG et al., 1991). No sexto dia após a indução do DMTI por STZ, os animais ficaram em jejum 4 h antes do início dos experimentos e decorrido este período os animais foram separados em diferentes grupos (n = 4 por grupo) aleatoriamente e a glicemia destes foi determinada no tempo zero, e então 100 µL de cada amostra foi injetado por via subcutânea em cada animal. A partir deste momento, a concentração de glicose no sangue foi monitorada nos tempos: 15, 30, 60, 120, 360, 1440 e 2880 minutos. Este ensaio foi conduzido pelo Dr. Daniel da Silva e aprovado pela comissão de bioética em experimentação animal do Centro de Ciências da Saúde (CCS) – UFRJ também sob o código FARMACIA05/2012.

3.2.4 – Dosagem de Insulina e Glucagon por ensaio imunoenzimático

Para verificar se a administração de amilina exógena altera os níveis de insulina ou glucagon avaliou-se os níveis plasmáticos destes dois hormônios utilizando-se kits comerciais conforme descrito a seguir.

Camundongos suíços machos com 4 a 6 semanas, pesando $25g \pm 3g$ ficaram mantidos em uma sala de temperatura controlada, com ciclo luz-escuro de 12 h e tiveram livre acesso à água e ração, a qual foi suspensa 4 h antes do início dos experimentos. Como a dosagem destes hormônios requer um maior volume de sangue para as análises optou-se por fazer a

coleta através decapitação dos animais utilizando-se guilhotina, o que possibilitou a obtenção de até 1 mL de sangue por animal. As amostras foram imediatamente centrifugadas (2500 rpm, 4°C por 10min) para a separação do soro, que, foi utilizado na dosagem de insulina e glucagon por EIA segundo manual dos kits. Este protocolo foi aprovado pela comissão de bioética em experimentação animal do Centro de Ciências da Saúde (CCS) – UFRJ também sob o código FARMACIA05/2012.

3.3 – Conjugação de Amilina murina com PEGs

A bioconjugação de proteínas e peptídeos de interesse terapêutico visa principalmente o aumento do tempo de meia vida destes e consequente aumento na duração de seus efeitos. A conjugação com moléculas de polietilenoglicol é uma estratégia bem estabelecida e, para este fim, foram empregadas duas metodologias que são descritas abaixo:

3.3.1 – Reações em meio aquoso

A reação entre mPEG ativado (eletrófilo) e nucleófilos como aminas de proteínas envolve uma adição nucleofílica, na qual o mPEG eletrofílico reage com os elétrons livres das aminas primárias com a liberação do grupamento succinimidil como grupo abandonador. Assim, o pH para tal reação deve ser neutro ou preferencialmente alcalino afim de se evitar a protonação das aminas, tendo em vista que são seus elétrons não ligantes que lhes conferem sua reatividade nestes sistemas. As reações em meio aquoso foram realizadas em diferentes condições visando a otimização das mesmas e escolha da condição mais adequada para um bom rendimento. Diferentes condições reacionais (pH, temperatura e estequiometria) foram avaliadas afim de se otimizar a reação.

3.3.2 – Reações em solvente aprótico

Sabendo-se que a condição primordial para a reação seria a não protonação das aminas decidiu-se investigar se a reação seria possível em um solvente aprótico. Neste sentido, o DMSO pareceu uma escolha adequada por ser aprótico, e capaz de solubilizar bem amilina (tanto murina quanto humana) e mPEG. Assim, procedeu-se conforme descrito abaixo.

Amilina murina foi dissolvida em DMSO a uma concentração de 10 mg/mL e diferentes massas de mPEG-NHS carbonato ou propionato foram pesadas e imediatamente dissolvidas em DMSO. De acordo com a relação estequiométrica desejada amilina e mPEG foram misturados (por exemplo: 6,4 mg de mPEG dissolvido em 50 μ L de DMSO com 50 μ L de amilina murina a 10mg/mL no mesmo solvente para uma razão de 10:1, mPEG:amilina). A reação foi conduzida a temperatura ambiente ou a 37°C e a cada intervalo de tempo foram retiradas aliquotas para os ensaios de SDS-PAGE e fluorescamina.

Após a análise da cinética reacional e constatação de que em 4h de reação a maior parte a amilina havia sido peguilada fez novas reações para purificações seguindo o protocolo descrito acima. Contudo, não foram retiradas alíquotas para gel e fluorescamina tendo a reação sido parada com excesso de 2 vezes em reação a concentração inicial de mPEG com lisina e posteriormente o material foi purificado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC).

3.4 – Acompanhamento das reações de peguilação

O decorrer das reações de peguilação foram avaliados por três metodologias: quantificação de amins livres por fluorescamina, avaliação das massas dos produtos por eletroforese de proteínas e espectrometria de massas.

3.4.1 – Quantificação de amins livres por fluorescamina

As reações de peguilação empregadas neste trabalho são descritas na literatura como seletivas para amins primárias (FONTANA et al., 2008; ROBERTS; BENTLEY; HARRIS, 2012; VERONESE, 2001; VERONESE; PASUT, 2005), assim, um método capaz de dosar amins primárias em diferentes tipos de soluções (tampões neutros ou alcalinos ou ainda em solventes orgânicos como DMSO) foi utilizado para a monitorização das cinéticas das peguilações. O método de quantificação adotado se baseia na derivatização das amins primárias de peptídeos com fluorescamina (4'-fenilspiro[2-benzofuran-3,2'-furan]-1,3'-diona, CAS nº 38183-12-9) gerando um produto fluorescente (Fig. 17)(UDENFRIEND et al., 1972).

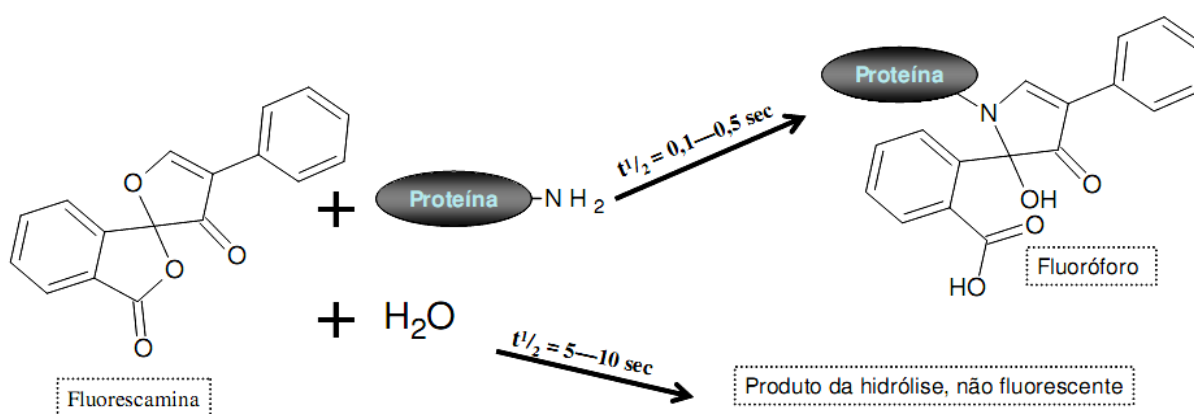


Figura 17 – Reação entre fluorescamina e amins de proteínas.

Esquema para reação entre fluorescaminae amins primárias de proteínas (*N*-terminal ou de cadeias laterais) gerando compostos fluorescentes. O excesso de fluorescamina é hidrolisado resultando em um produto não fluorescente (adaptado de UDENFRIEND *et al.*, 1972).

A cada intervalo de tempo 2 μL do meio reacional (contendo amilina e mPEG) foram diluídos em 198 μL de PBS pH 7,4 e imediatamente misturados com 200 μL do derivatizante (0,05 mg/ml de fluorescamina em DMSO) e, após homogeneizar, analisados em um fluorímetro (Jasco FP6300) com os seguintes parâmetros: modo espectro de emissão, fenda de excitação com 5 nm, fenda de emissão com 5 nm, resposta média, sensibilidade alta, velocidade e aquisição dos dados igual a 200 nm/min, resolução igual a 0,5 nm, excitação em 390 nm e emissão de 380 a 550 nm. As curvas de calibração de amilina murina em PBS pH 7,4 e em DMSO foram realizadas para se verificar a linearidade do método (equação originada da regressão linear e seu coeficiente de correlação linear). A especificidade desta metodologia foi verificada usando amostras contendo apenas mPEG-NHS (tanto propionato quanto carbonato) dissolvidos em DMSO ou em PBS sem adição de amilina. Não havendo sido detectado sinal significativo na ausência do peptídeo.

3.4.2 – Avaliação semi-quantitativa por eletroforese em gel de acrilamida

A eletroforese de proteínas fornece várias informações a respeito de uma amostra, como estimativa de massa molecular, impurezas e produtos de degradação, uma vez que a peguilação tem como uma de suas principais características a alteração no raio hidrodinâmico de seus produtos esta técnica torna possível a visualização da cinética reacional pelo surgimento de novas bandas de maior peso molecular com o decorrer do tempo. A intensidade relativa de cada banda também fornece uma informação semi-quantitativa tornando possível fazer inferências quanto ao perfil de cada reação acompanhada por tal método.

Para o acompanhamento das cinéticas reacionais, a cada intervalo de tempo, 10 μL do meio reacional foram retirados e misturados com 10 μL de tampão de amostra (0.125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0.02% azul de bromofenol, pH 6.8) (JEFFREY; JEFFREY, 1997; WALKER, 1996). A presença de tris-HCl garante que a reação seja interrompida quando misturada com o tampão de amostra. Observamos em experimentos anteriores que essa quantidade elevada de peptídeo, 5-10 μL de meio contendo 5 mg/mL de amilina, ou seja, 25-50 μg de amilina por poço, era necessária para a detecção na coloração por comassie e posterior coloração de bário/iodo. Padrões com pesos moleculares conhecidos foram empregados como referência, sendo estes: albumina de soro fetal bovino (~66 KDa), lisozima (~14 KDa), insulina (3,4 KDa) e amilina murina (3,9 KDa). Sendo assim, possível distinguir entre amostras não peguiladas, monopeguiladas, dipeguiladas e polipeguiladas (as amostras com múltiplas peguilações não eram visualizadas com clareza).

O suporte utilizado na eletroforese foi o gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) também chamado de lauril sulfato de sódio. Para que fosse possível tanto a visualização da amilina livre quanto de suas formas peguiladas optou-se pelo gel de poliacrilamida a 22,5%, tendo os ensaios sido realizadas com corrente constante igual a 35 mA. Após as corridas os géis foram fixados com solução (0,2% (v/v) glutaraldeído, 30% (v/v) etanol, 0,2 M acetato de sódio) por 30 minutos a 37°C e corados com solução de azul de comassie (0,025% azul de Coomassie G250, 40% (v/v) metanol, 7% (v/v) ácido acético) *overnight* (~16 h) à temperatura ambiente com agitação. A seguir, os géis foram descorados com solução de ácido acético a 5% , quando as bandas de proteínas se tornaram

visível (com contraste adequado) os mesmos foram digitalizados para posterior análise de densitometria utilizando os programas ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012) e FityK (WOJDYR, 2010).

Para confirmação da ligação de mPEG à amilina nos geis, após terem sido descorados com ácido acético, os mesmos foram incubados com solução cloreto de bário a 5% por 5 minutos. A seguir, a solução de bário foi descartada e os geis lavados sucessivas vezes com água purificada. Por fim, o utilizou-se solução de lugol (1% iodo, 2% iodeto de potássio) para revelar a presença de PEGs nas bandas de proteínas reveladas anteriormente pelo azul de comassie (LI et al., 2012; TIWARI et al., 2011).

3.5 – Purificação dos produtos das derivatizações

Dentre as principais estratégias para purificação de produtos peguilados destacam-se os métodos cromatográficos, incluídos neste: cromatografia por exclusão de tamanho e cromatografia por fase reversa (FEE, 2009). Ambos os métodos foram testados neste trabalho e os mesmos são descritos a seguir.

3.5.1 – Cromatografia de exclusão de tamanho

A amilina apresenta massa molecular de aproximadamente 3,9 KDa, enquanto que os mPEGs utilizados nestes trabalho possuem massa de ~5 KDa, assim a ligação de apenas uma molécula de derivatizante no peptídeo irá mudar drasticamente seu raio hidrodinâmico e, desta forma, a separação com base nesta propriedade por cromatografia de exclusão de tamanho oferece uma alternativa prática para a purificação de produtos peguilados. Para

tanto, a amilina murina foi dissolvida em PBS a uma concentração de 10 mg/mL (estoque), e adicionou-se um volume igual de PBS contendo mPEG-NHS (propionato ou carbonato) para um excesso molar de mPEG 10: 1 (PEG:amilina). A reação foi então interrompida com excesso de L-lisina (2 mol L-Lys adicionado para cada 1 mol mPEG), e injetada em sistema cromatográfico LC-2000 HPLC Jasco utilizando coluna TSKgel, com fase móvel constituída por PBS, em modo isocrático, fluxo de 1 mL/min e detector de UV em 220 ou 280 nm.

3.5.2 – Cromatografia de partição por fase reversa

Amilina foi dissolvida em DMSO ou PBS (concentração final de 10 mg/mL), e adicionou-se um volume igual de DMSO contendo mPEG-NHS (propionato ou carbonato) para um excesso molar de mPEG 10: 1 (PEG:amilina). A reação foi então interrompida com excesso de L-lisina (2 mol L-Lys adicionado para cada 1 mol mPEG), diluída 1vol: 1vol com a fase móvel A (TFA a 0,1% em água) e injetada em sistema cromatográfico LC-2000 HPLC Jasco utilizando Kromasil® C18, fluxo de 4 mL/min com um gradiente de acetonitrila (conforme Fig,18), e monitorizada por a 220 nm. As amostras foram reunidas como indicado, liofilizadas e dissolvidas em água para uso imediato. O teor de proteínas foi avaliada pelo ensaio de Bradford (Bradford, 1976).

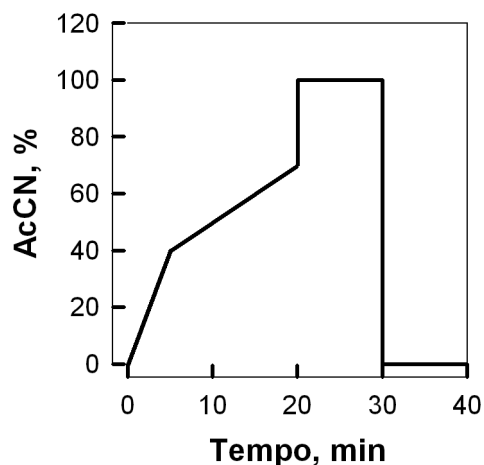


Figura 18 – Gradiente utilizado para purificar amilina peguilada por cromatografia de fase reversa. A corrida é iniciada na ausência de acetonitrila, que passa a 40% após 5 minutos, e para 70% aos vinte minutos da corrida. Em seguida, faz-se a lavagem do sistema com 100% de acetonitrila (20 a 30 minutos) e, por fim, equilibra-se a coluna novamente com fase móvel sem acetonitrila por mais 10 minutos.

3.6 – Quantificação dos produtos peguilados pelo método de Bradford

Após a purificação a análise das frações por espectrofotometria de massas e gel SDS-PAGE de 22,5% separou-se as amostras com pureza para amilina monopeguilada e amilina dipeguilada e estas foram quantificadas pelo método de Bradford modificado (BRADFORD, 1976), o qual é largamente utilizado na quantificação de peptídeos e proteínas. Para a quantificação da amilina, 20 µL de cada fração cromatográfica foi misturado com 198 µL do reagente de Bradford (100 mg de azul de coomassie G-250, 50 mL de etanol 95 %, 100 mL de H₃PO₄ 85 % e água ultrapura q.s.p. 1 L) e as absorbâncias em 595 nm das mesmas foram aferidas em um espectrofotômetro multiplacas (Spectramax). As curvas de calibração de amilina murina foram realizadas para se verificar a linearidade do método (equação originada da regressão linear e seu coeficiente de correlação linear). A especificidade desta metodologia foi verificada usando amostras contendo apenas mPEG-NHS (tanto propionato quanto carbonato) dissolvidos em DMSO ou em PBS sem adição de amilina. Não havendo

sido detectado sinal significante na ausência do peptídeo.

3.7 – Caracterização dos produtos da bioconjugação por espectrometria de massas

Tanto amostras de meio reacional (amilina, mPEGs e DMSO) quanto frações purificadas por cromatografia foram analisadas por MALDI-ToF-MS em espectrómetro Autoflex (Bruker, EUA) do CEMBio. Os espectros foram obtidos no modo positivo, linear, e depois analisados utilizando o programa mMass (STROHALM et al., 2008).

3.8 – Identificação dos sítios de ligação

Um total de 10 µL de cada reação foi aplicado em gel de 22,5%. Após coloração com comassie, as bandas foram removidas do gel descorados com bicarbonato de amônio 25 mM em acetonitrila a 50% durante 20 h à temperatura ambiente. Reduziu-se as ligações dissulfeto do peptídeo com 10 mM de ditioneitol em 25 mM de bicarbonato de amônio durante 1 hora a 56°C e, em seguida, tratado com iodoacetamida 55 mM em 25 mM de bicarbonato de amônio, durante 45 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. A solução foi removida, as fatias de gel lavadas com bicarbonato de amônio 25 mM em acetonitrila a 50% durante 10 minutos e depois desidratadas com acetonitrila pura durante 5 minutos. A acetonitrila foi removida e as fatias de gel reidratadas em bicarbonato de amônio 25 mM, contendo 100 ng de tripsina. A digestão foi deixada durante 18 horas a 37 ° C e peptídeos trípticos extraídos duas vezes usando ultrassons durante 15 minutos em solução TFA 5% em acetonitrila a 50%. As amostras foram então enviadas ao CEMBio para análise por MALDI-TOF-MS.

3.9 – Ligação com receptor fisiológico

O domínio extracelular da RAMP2 (proteína modificadora da atividade de receptores) foi expresso em bactérias, BL21DE3pLys, transformadas, purificado, enovelado e marcada com fluoresceína. A interação com amilina murina e suas formas peguiladas foi realizado conforme descrito a seguir. Para o ensaio de ligação isotérmica, RAMP2-FITC (50 nM) foi incubado com diferentes concentrações dos compostos analisados (amilina murina, amilina monopeguilada, amilina dipeguilada, e mPEG). Primeiro, realizou o ensaio de ligação RAMP2-amilina monitorando-se a anisotropia de fluorescência, sendo observada grande mudança no rendimento quântico da fluoresceína na presença dos ligantes, o que limitou a utilização dos dados de anisotropia de fluorescência levando a necessidade de correções matemática para alterações no rendimento quântico e tempos de vida de fluorescência (LAKOWICZ, 1999). Em vez disso, a mudança da fluorescência de fluoresceína é uma consequência direta da interação RAMP2-FITC:ligante, e, assim, os resultados do ensaio de ligação isotérmica podem ser diretamente deduzidos a partir da dependência das alterações de fluorescência sobre a concentração de ligante (LAKOWICZ, 1999). Estes ensaios foram realizados pelo aluno de doutorado Bruno Melo e pelo professor Luís Maurício Lima.

3.10 – Análise estatística

O teste t pareado foi utilizado para comparar as diferenças na resposta farmacológica. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos, tendo as análises sido realizadas utilizando o suplemento SigmaStat do software SigmaPlot 11 (Systat Software Inc), pela comparação entre médias, tamanhos e desvios padrão de cada hora (ponto analisado) entre grupo controle e grupos teste considerando dados com mesmo tamanho e variância.

4 – Resultados

4.1 – Avaliação dos efeitos da Amilina sobre a glicemia

Dentre os modelos mais utilizados para o estudo dos efeitos da amilina sobre a glicemia, o aquele que utiliza ratos anestesiados é um dos mais empregados (MOLINA et al., 1990; YOUNG, 2005; YOUNG; WANG; COOPER, 1991). Toda via, esta metodologia apresenta alguns inconvenientes que tornaram seu uso inadequado para este trabalho. Em primeiro lugar, a necessidade de utilização de anestésicos gerais gasosos torna a metodologia bastante demorada, necessitando-se de no mínimo 1h de anestesia para a estabilização e início do experimento, e comumente, tem-se dificuldades para se alcançar a dose necessária de anestésico sem que ocorra parada respiratória e consequente morte. Este modelo também se mostrou inapropriado para ensaios de longa duração, pois os animais não resistiram ao procedimento, tendo apenas dois animais dos cinco testados resistido a mais de duas horas de experimento. Assim, embora tenha ocorrido um aumento na glicemia do animal que recebeu amilina em relação ao animal controle não foi possível dar continuidade a este tipo de ensaio.

Afim de obter o modelo simples, reprodutível e compatível com os estudos que serão apresentados mais a frente, avaliou-se os efeitos glicêmicos da amilina em camundongos não anestesiados e normoglicêmicos. Para este fim, empregou-se quatro modelos distintos, sendo eles:

1. Animais com alimentação normal antes e durante o experimento,
2. Animais com alimentação suspensa durante o experimento,
3. Animais em jejum de 4h e que receberam 2 g/Kg de glicose *i.p.*,
4. Animais em jejum de 4h antes do início e durante o experimento.

Os resultados deste ensaios serão apresentados a seguir:

Inicialmente foram avaliados os efeitos da amilina em animais alimentados, um vez que um dos efeitos propostos para amilina seria o de reduzir o peristaltismo gástrico e ingestão de alimentos (CHANCE et al., 1991, p. 199; MORLEY; FLOOD, 1991; REIDELBERGER; KELSEY; HEIMANN, 2002; YOUNG et al., 1995). Seria de se esperar que os animais se alimentassem com menor frequência e, possivelmente, apresentassem níveis mais baixos de glicose no sangue. No entanto, foi observado que não havia diferenças relevantes em relação aos níveis glicêmicos entre o grupo controle e o grupo teste. Os resultados deste ensaio são apresentados abaixo na figura 19.

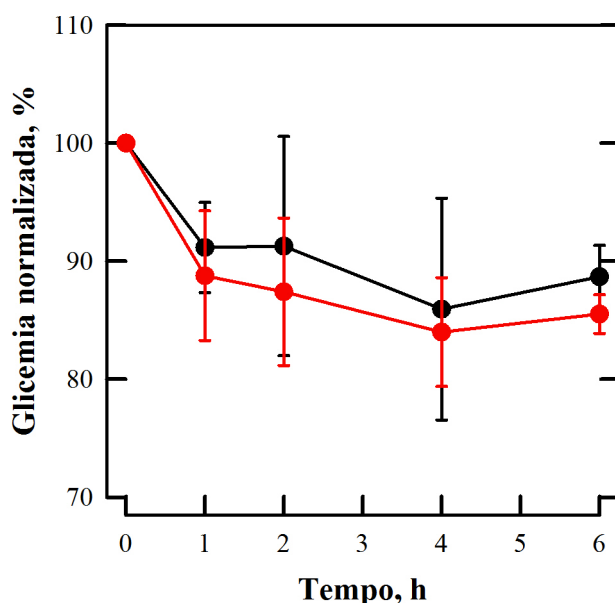


Figura 19 – Efeito da amilina murina sobre a glicemia de camundongos saudios, alimentados e não anestesiados.

Os animais foram divididos em dois grupos, tendo o grupo controle (n=4, -●-) recebido 100 μ L de salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea e o grupo teste (n=4, -●-) 100 μ L de solução contendo 1 μ g de amilina murina em salina por animal (aproximadamente 40 μ g/Kg).

Avaliou-se também a glicemia de camundongos que tiveram a alimentação suspensa apenas durante o experimento, não sendo, novamente, observadas diferenças entre o grupo

controle, que recebeu salina por via subcutânea, e o grupo teste, no qual foram administrados 40 µg/Kg de amilina murina por via subcutânea (Fig. 20).

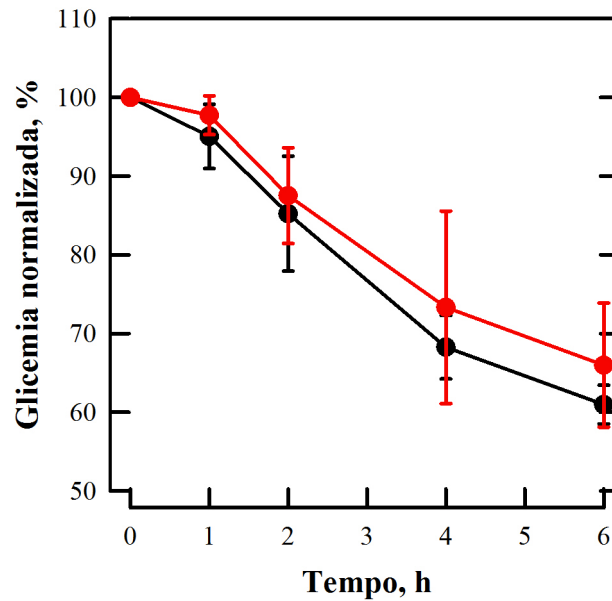


Figura 20 – Efeito da amilina murina sobre a glicemia de camundongos normoglicêmicos, não anestesiados e sem alimentação durante o experimento.

Os animais foram divididos em dois grupos, tendo o grupo controle (n=4, -●-) recebido 100 µL de salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea e o grupo teste (n=4, -●-) 100 µL de solução contendo 1 µg de amilina murina em salina por animal (aproximadamente 40 µg/Kg).

O modelo experimental seguinte empregou animais em jejum de 4h que receberam 2g/Kg de glicose por via intraperitoneal imediatamente antes serem aplicadas salina, no grupo teste, ou amilina por via subcutânea. A figura 21 apresenta o resultado deste experimento, indicando que não houve diferenças relevantes entre o grupo controle e o grupo teste.

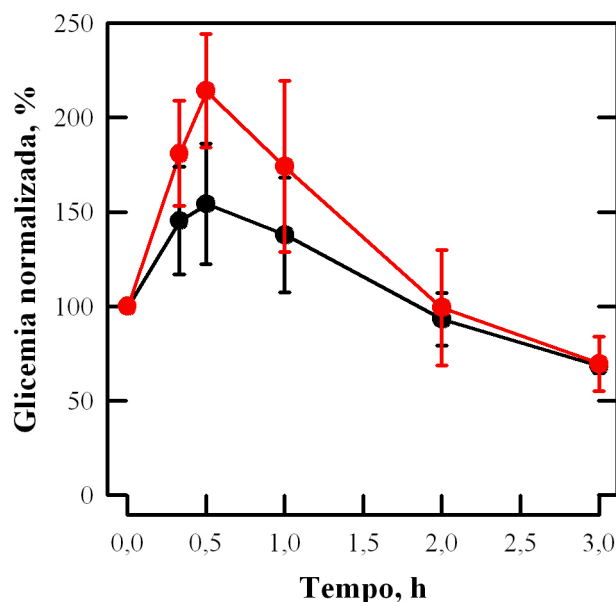


Figura 21 – Efeito da amilina murina sobre a glicemia de camundongos em jejum de 4h e após administração *i.p.* de 2g/Kg de glicose.

Os animais foram divididos em dois grupos, tendo o grupo controle (n=4, -●-) recebido 100 μ L de salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea e o grupo teste (n=4, -●-) 100 μ L de solução contendo 1 μ g de amilina murina em salina por animal (aproximadamente 40 μ g/Kg).

Uma vez que as metodologias anteriores não foram capazes de indicar um efeito da amilina sobre a glicemia de camundongos buscou-se trabalhar com animais em jejum, afim de se minimizar as possíveis variações decorrentes da alimentação ou introdução de glicose exógena. Estes animais tiveram a alimentação suspensa 4h antes da administração subcutânea de 100 μ L de veículo ou amilina, e as alterações na glicemia monitorados a cada intervalo pelo sangue retirado da ponta da cauda dos animais. A figura 22 indica que os níveis de glicose no sangue total do grupo teste diminuíram mais do que os do grupo controle, que recebeu somente veículo, tendo esta redução relativa sido transitória com a convergência para os níveis do grupo controle após 4h de experimento.

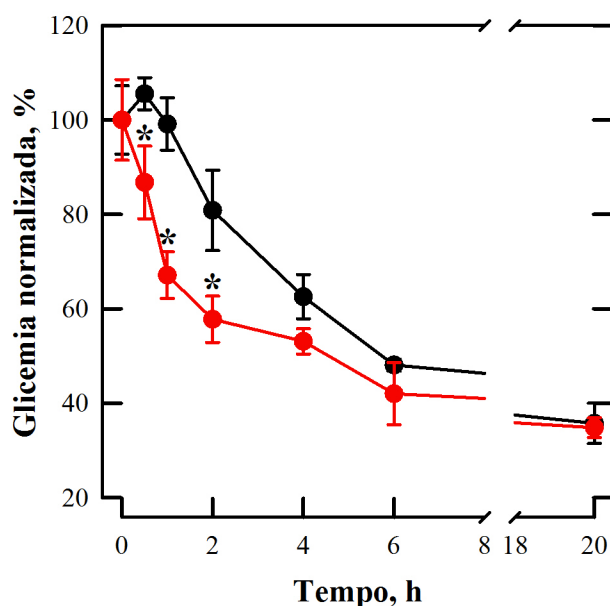


Figura 22 – Efeito da amilina murina sobre a glicemia de camundongos não diabéticos, não anestesiados e em jejum de 4h.

Os animais foram colocados em jejum 4h antes do início do experimento e mantidos assim durante o ensaio. O grupo controle (n=4, -●-) recebeu 100 µL de salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea e o grupo teste (n=4, -●-) 100 µL de solução contendo 1 µg de amilina murina em salina por animal (aproximadamente 40 µg/Kg ou 10 nMol/Kg). $p < 0,05$.

A reprodutibilidade e resistência de modelo também foram testadas repetindo-se o ensaio anterior com pequenas alterações (temperatura da sala de experimentação, analista, glicosímetro, origem dos animais e emprego de tampão fosfato salino como veículo no lugar de salina). A figura 23 mostra o percentual das médias dos valores glicêmicos do grupos tratado com amilina murina em relação ao grupo controle (que recebeu salina ou tampão fosfato salino). A comparação entre os diferentes ensaios mostra que embora possam diferir em valores absolutos a queda relativa da glicemia dos animais tratados com amilina em relação ao grupo controle é reprodutível independentemente das pequenas modificações que foram impostas ao modelo experimental aqui apresentado.

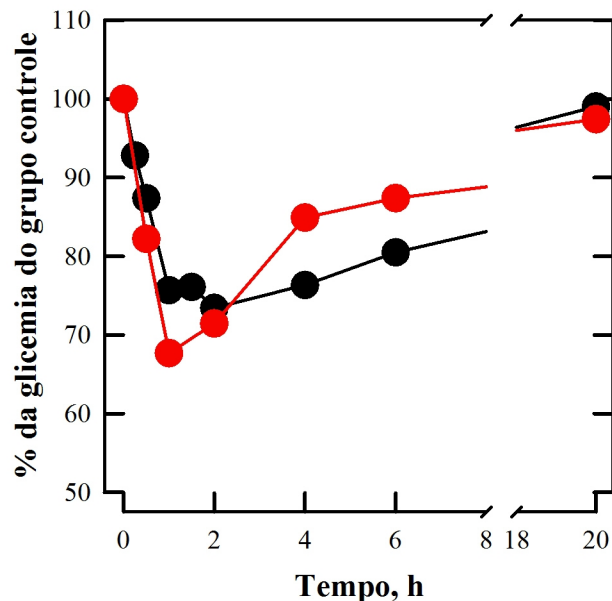


Figura 23 – Avaliação da reprodutibilidade e resistência do modelo experimental adotado para avaliar os efeitos da amilina sobre a glicemia de camundongos e jejum.

Valores de médias relativos aos respectivos grupos controle para cada ensaio. (-●-) ensaio realizado no laboratório de biotecnologia farmacêutica FF-UFRJ a 19°C e utilizando tampão fosfato salino pH 7,4 como veículo ou 100 µL de solução contendo 1 µg de amilina murina por animal (aproximadamente 40 µg/Kg), (-●-) ensaio realizado no laboratório de enzimologia e controle do metabolismo FF-UFRJ a 22°C e utilizando salina como veículo.

A figura anterior também revela que os grupos tratados com o peptídeo apresentaram comportamento bifásico, no qual a queda máxima da glicose no sangue ocorreu aproximadamente 1-2 horas após a administração de amilina, seguido por uma recuperação progressiva dos valores da glicemia aos níveis normais. Estes resultados foram reprodutíveis, independentemente da temperatura ambiente (19 ou 22°C), veículo no qual o peptídeo foi diluído (0,9% NaCl salina ou tampão PBS), analista, equipamento, lote de amilina ou a fonte (biotério) dos camundongos.

É importante salientar que embora a literatura reporte que amilina murina, amilina humana e pramlintide sejam equipotentes em relação aos seus efeitos sobre as concentrações plasmáticas de glicose (YOUNG, 2005), isto não foi observado no modelo adotado, pois a

administração de amilina humana dissolvida em salina não resultou em alterações significativas (teste t com $p > 0,1$ em todos os pontos observados) na glicemia dos animais (Fig. 24). Fato que pode ser explicado devido a natureza amiloidogênica da amilina humana, a qual forma agregados amiloides em soluções aquosas (EVERS et al., 2009; WESTERMARK et al., 1990), tornando sua biodisponibilidade praticamente nula, uma vez que as fibras amiloides injetadas por via subcutânea não serão capazes de se difundir para a corrente sanguínea permanecendo no local de aplicação.

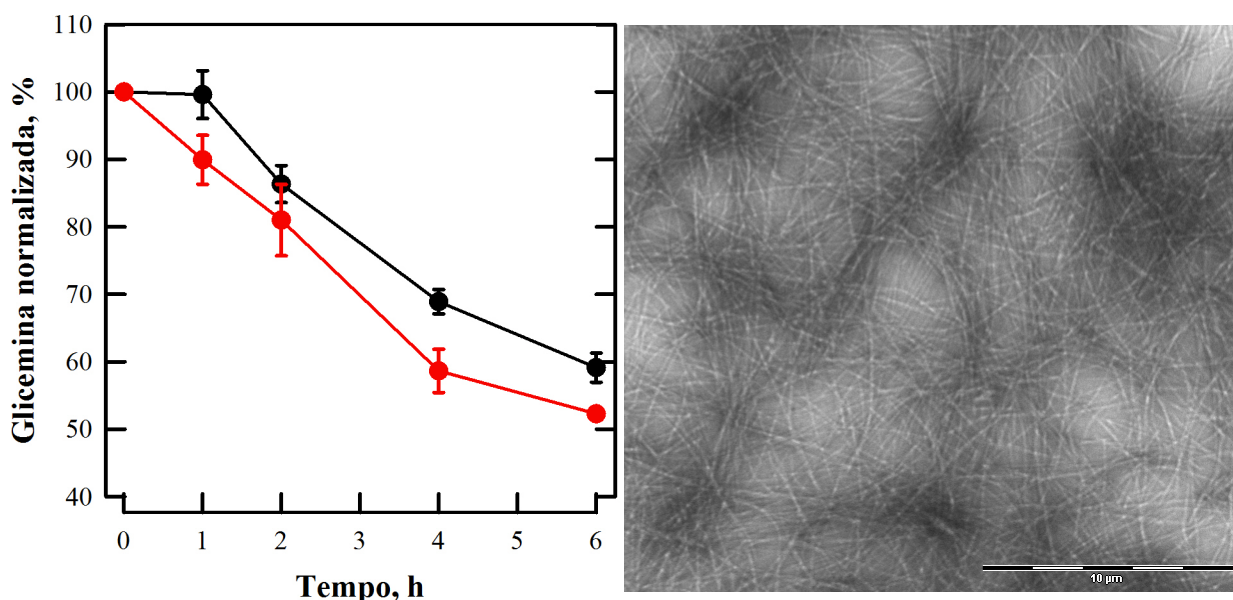


Figura 24 – Efeito da amilina humana sobre a glicemia de camundongos e MET da amostra injetada.

Os animais foram colocados em jejum 4h antes do início do experimento e mantidos assim durante o ensaio. O grupo controle (-●-) recebeu 100 µL de salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea e o grupo teste (n=4, -●-) 100 µL de solução contendo 1 µg de amilina murina em salina por animal (aproximadamente 40 µg/Kg). No painel da direita a microscopia eletrônica de transmissão evidenciando as fibras amiloides formadas por amilina humana em salina.

A amilina humana após ser dissolvida em salina (NaCl 0,9%) foi enviada para análise por microscopia eletrônica de transmissão. Tendo sido observado grande quantidade de fibras amiloides na amostra conforme apresentado na figura 25.

Os efeitos de várias doses com diferentes concentrações de amilina sobre a glicemia também foram investigados (Fig.25). Em doses muito baixas (0,01 µg / camundongo) não houve efeito observável em relação ao controle. Doses mais altas levaram a uma diminuição progressiva nos valores da glicemia, atingindo um nível máximo de aproximadamente 80% em relação aos animais controle. Em resumo, uma capacidade pequena, mas sensível de diminuir os valores da glicemia foi observada com doses de 0,1 a cerca de 50 µg de peptídeo por animal.

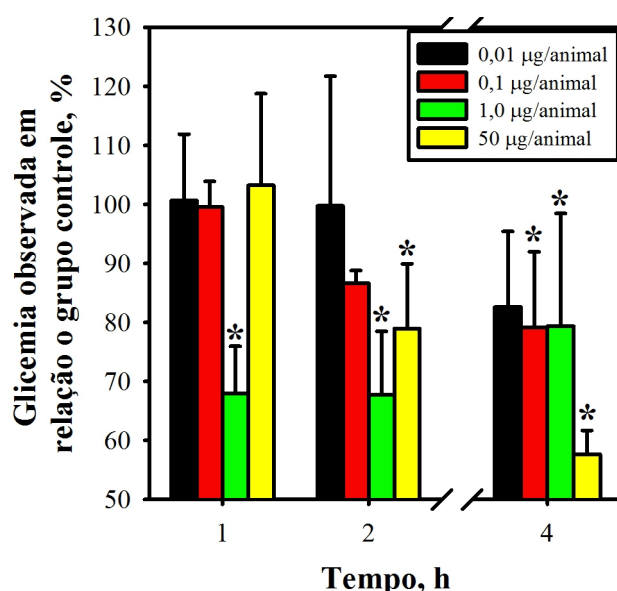


Figura 25 – Dose-resposta da amilina murina sobre a glicemia.

Os animais foram colocados em jejum 4h antes do início do experimento e mantidos assim durante o ensaio. O grupo controle recebeu 100 µL de salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea e cada grupo teste (n=4) 100 µL de solução contendo diferentes concentrações de amilina murina em salina. * → p < 0,05.

Segundo Young (2005) o efeito da amilina sobre as concentrações plasmáticas de glicose está relacionado com a capacidade de modular outros hormônios como insulina e glucagon. Para avaliar tal efeito realizou-se a dosagem de insulina e glucagon utilizando kits comerciais imunoenzimáticos, EIA, para a detecção deste hormônios. A avaliação dos níveis de glucagon e insulina indica que a amilina não é capaz de alterá-los conforme apresentado na

figura 26.

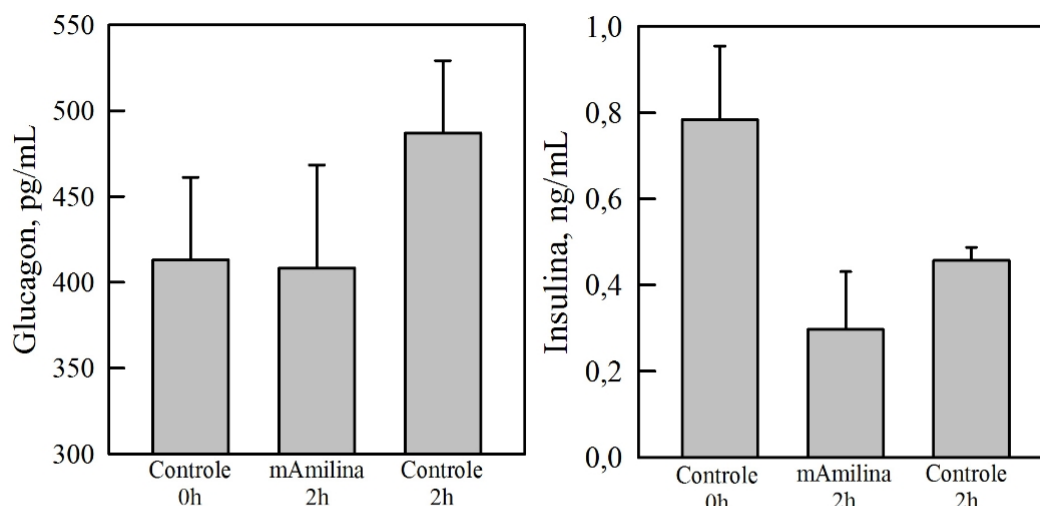


Figura 26 – Efeito da administração de amilina murina sobre os níveis de insulina e glucagon de camundongos em jejum 4h.

O grupo controle recebeu 100 μ L de salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea e o grupo teste (n=4) 100 μ L de solução contendo 1 μ g amilina murina em salina. Os animais foram decapitados usando guilhotina e o sangue destes foi coletado e centrifugado para que os soros fossem então analisados segundo as instruções de cada kit de EIA.

Os efeitos da amilina murina sobre a glicemia de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (OGAWA et al., 1990; SILVA et al., 2010; WU; HUAN, 2008) também foram avaliados afim de se determinar se o efeito sobre a glicemia observado nos experimentos anteriores seria inerente a este peptídeo ou se o mesmo depende de insulina ou glucagon para ocorrer.

Os animais (agora camundongos DMTI-STZ) tiveram sua alimentação retirada 4h antes da administração s.c. de amilina e a glicemia monitorada utilizando glicosímetro portátil. A administração de amilina murina resultou em uma redução da glicose sanguínea no prazo de até 4 horas, seguido por uma recuperação gradual da glicemia ao nível semelhante do grupo de controle (Fig. 27).

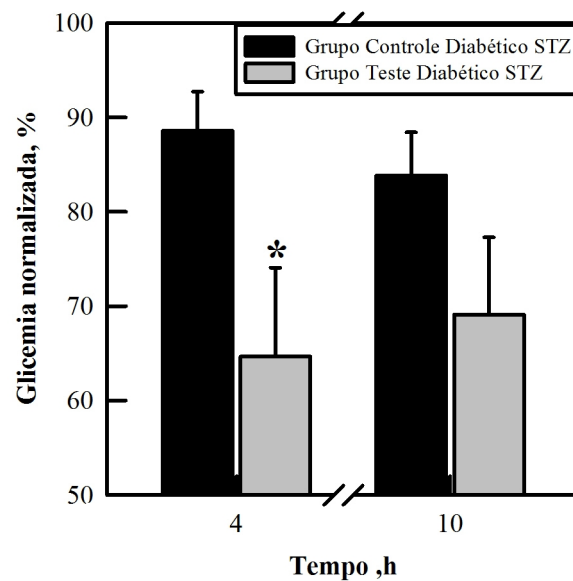


Figura 27 – Efeito a amilina sobre a glicemia de camundongos diabéticos (DMTI-STZ).

O diabetes tipo I foi induzido pela aplicação de streptozotocina *i.p.* Após a constatação do DM os animais foram colocados em jejum e grupo controle (n=4) recebeu 100 µL de salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea e o grupo teste (n=4) 100 µL de solução contendo 1 µg de amilina murina em salina por animal (aproximadamente 40 µg/Kg), * $p = 0,046$.

4.2 – Peptídeos truncados da sequência de Amilina Humana

Conforme já apresentado na introdução desta tese, o uso terapêutico da amilina humana é dificultado devido à sua natureza amiloidogênica. Assim, a utilização de peptídeos truncados (contendo fragmentos da sequência de amilina humana) poderiam servir como estratégia para o desenvolvimento de um possível fármaco amilinomimético. Para estabelecer a porção da sequência da amilina humana responsável pelo efeito hipoglicemiante, observado em nosso modelo de estudo, utilizamos peptídeos contendo partes da sequência da amilina humana. Os peptídeos foram inicialmente dissolvidos em salina, imediatamente diluídos em diferentes concentrações e aplicados nos animais. Todavia, observou-se que alguns destes peptídeos apresentavam propensão a agregar formando fibras amilóides (Fig. 28). No entanto, quando estes eram previamente dissolvidos em DMSO e posteriormente diluídos em salina não houve indícios de formações amiloides, mesmo após dias de incubação em estufa à 37°C.

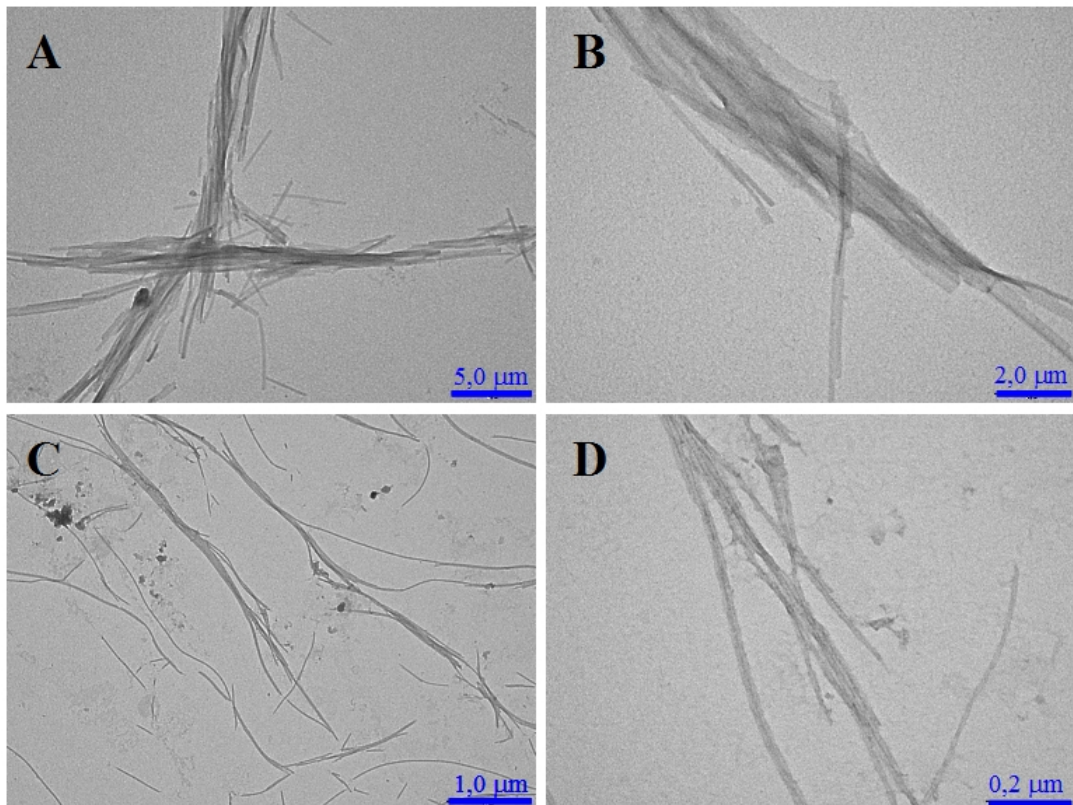


Figura 28 – MET de fibras amiloides formadas pelos peptídeos hAMY9-19 A e B e hAMY28-37 C e D. Os peptídeos foram dissolvidos a 1,0 mg/mL em solução de NaCl 0,9%.

Os testes utilizando doses de até 10 μg por animal revelaram efeitos discretos e com comportamento não dose-dependente. Assim, para o peptídeo hAMY1-10, foi observado um pequeno aumento na glicemia dos camundongos que receberam 10 μg deste peptídeo por via subcutânea (Fig. 29), mas a análise estatística não apresentou significância.

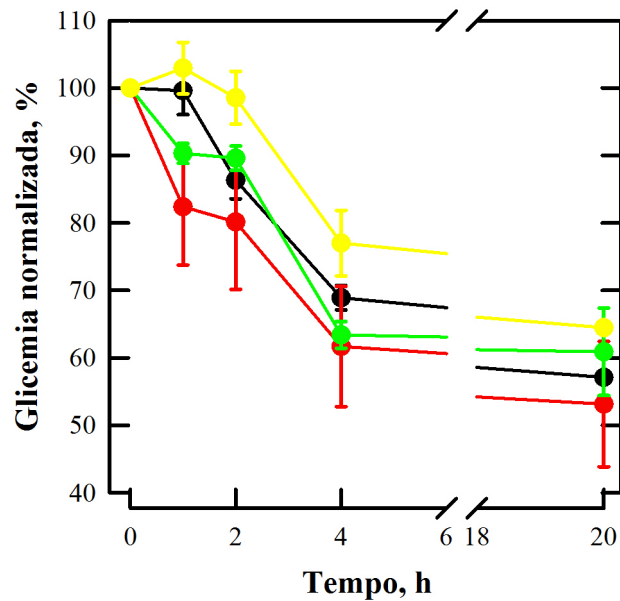


Figura 29 – Efeito do peptídeo hAMY1-10 sobre a glicemia de camundongos em jejum 4h. Os animais foram colocados em jejum 4h antes do início do experimento e mantidos assim durante o ensaio. O esquema de cores indica: grupo controle (-●-) 100 µL de salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea, o grupo teste 1 (-●-) 0,1 µg/animal, o grupo teste 2 (-●-) 1,0 µg/animal e o grupo teste 3 (-●-) 10,0 µg/animal.

O peptídeo hAMY10-16 também não apresentou diferenças significativas nas doses testadas (0,1 µg, 1,0 µg e 10 µg por animal) (Fig. 30). Embora, o grupo que recebeu 1,0 µg de peptídeo por animal tenha apresentado um queda expressiva em sua glicemia na primeira hora do experimento, a análise estatística destes dados não se apresentou como significativa com o valor de p igual a 0,087.

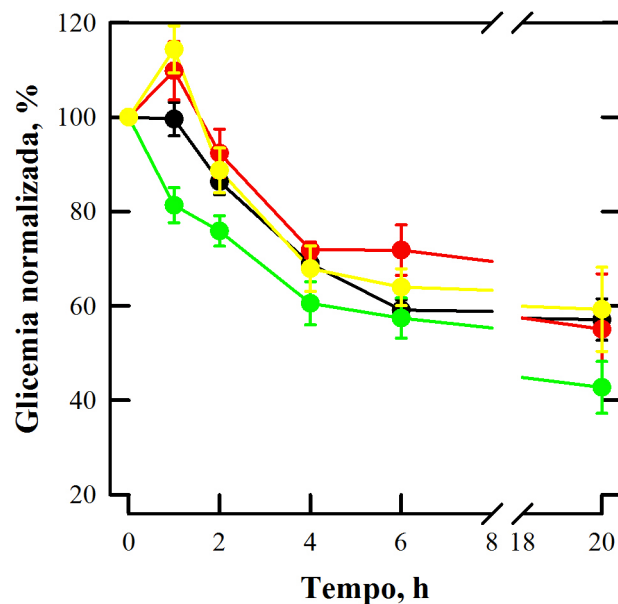


Figura 30 – Efeito do peptídeo hAMY10-16 sobre a glicemia de camundongos em jejum 4h.

Os animais foram colocados em jejum 4h antes do início do experimento e mantidos assim durante o ensaio. O esquema de cores indica: grupo controle (-●-) 100 μ L de salina (NaCl 0,9%) por via subcutânea, o grupo teste 1 (-●-) 0,1 μ g/animal, o grupo teste 2 (-●-) 1,0 μ g/animal e o grupo teste 3 (-●-) 10,0 μ g/animal.

O próximo peptídeo apresentou grande propensão a formar fibras amiloides e teve de ser previamente dissolvido em DMSO (10 mg/mL), para ser posteriormente dissolvidos em salina e administrado nos animais. A glicemia dos camundongos que receberam o peptídeo hAMY9-19 teve uma pequena redução em relação ao grupo controle (Fig. 31), mas que não apresentou significância estatística.

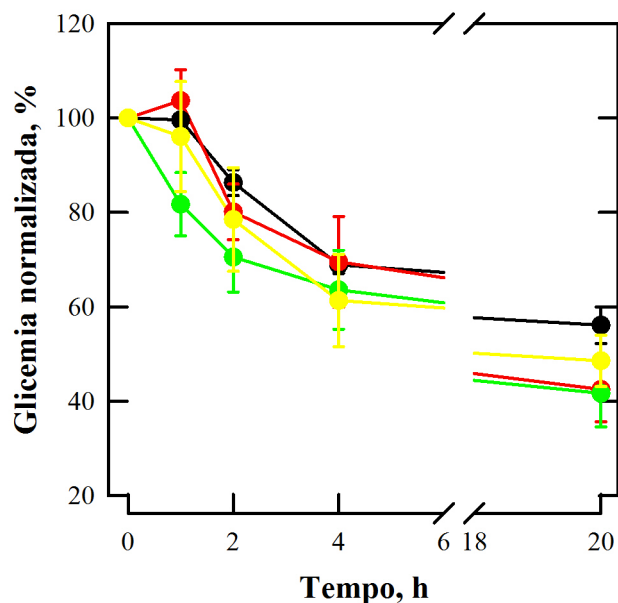


Figura 31 – Efeito do peptídeo hAMY9-19 sobre a glicemia de camundongos em jejum 4h. Os animais foram colocados em jejum 4h antes do início do experimento e mantidos assim durante o ensaio. O esquema de cores indica: grupo controle (-●-) 100 µL de salina (NaCl 0,9% e DMSO 1%) por via subcutânea, o grupo teste 1 (-●-) 0,1 µg/animal, o grupo teste 2 (-●-) 1,0 µg/animal e o grupo teste 3 (-●-) 10,0 µg/animal.

O peptídeo com a porção final da sequência da amilina humana, hAMY28-37, a exemplo do peptídeo hAMY9-19, também agrega em soluções aquosas, e por isso, este foi previamente dissolvido em DMSO para posterior diluição em salina e utilização. Esta estratégia (dissolver os peptídeos em DMSO antes da diluição em salina) evitou a formação de agregados amiloides, mesmo após decorridos dias da diluição em salina (soluções analisadas utilizando tioflavina-T).

A avaliação da glicemia dos animais revelou que o peptídeo hAMY28-37 foi, assim como os demais peptídeos avaliados, incapaz de induzir mudanças significativas na glicemia de camundongos em jejum na faixa de dosagem testada (0,1 a 10 µg/animal) (Fig. 32).

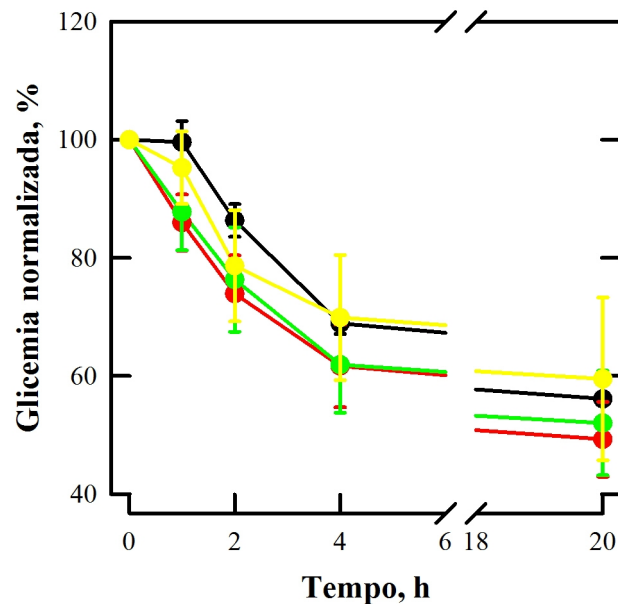


Figura 32 – Efeito do peptídeo hAMY28-37 sobre a glicemia de camundongos em jejum 4h. Os animais foram colocados em jejum 4h antes do início do experimento e mantidos assim durante o ensaio. O esquema de cores indica: grupo controle (-●-) 100 μ L de salina (NaCl 0,9% e DMSO 1%) por via subcutânea, o grupo teste 1 (-●-) 0,1 μ g/animal, o grupo teste 2 (-●-) 1,0 μ g/animal e o grupo teste 3 (-●-) 10,0 μ g/animal.

Por fim, todos os peptídeos foram testados em um mesmo experimento utilizando-se uma dose de 50 μ g por animal para cada peptídeo (que foram previamente dissolvidos em DMSO a uma concentração de 10mg/mL), tendo os peptídeos hAMY1-10, hAMY10-16 e hAMY28-37 apresentado efeito hiperglicêmico em relação ao grupo controle (que recebeu 100 μ L de salina contendo 5% de DMSO por via subcutânea) (Fig. 33).

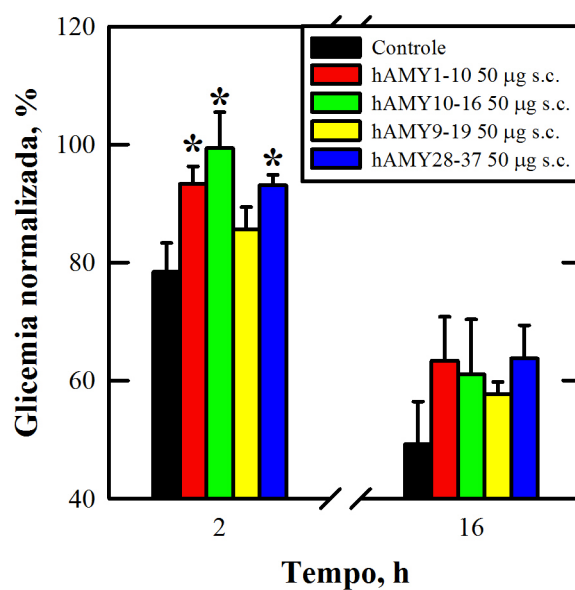


Figura 33 – Efeito sobre a glicemia de camundongos em jejum 4h dos peptídeos derivados da sequência de amilina humana.

Os animais foram colocados em jejum 4h antes do início do experimento e mantidos assim durante o ensaio. O grupo controle (n = 4) recebeu 100 µL de salina (NaCl 0,9% e 5% DMSO) por via subcutânea e os demais grupos (n = 4 por grupo) receberam 50 µg/animal (aproximadamente 2 mg/Kg). * → $p < 0,05$.

4.3 – Peguilação

4.3.1 – Caracterização da reação

Tanto a amilina murina quanto humana apresentam em sua sequência apenas duas aminas primárias, ambas no primeiro aminoácido (Lys-1), sendo uma no carbono α do *N*-terminal e a outra ligada ao carbono ϵ deste mesmo aminoácido. Objetivando uma derivatização seletiva para essas duas aminas, dois agentes foram utilizados para a produção de amilina peguilada, metoxipolietilenoglicol succinimil propionato com massa molecular de ~5 KDa (mPEG propionato) e metoxipolietilenoglicol succinimidil carbonato também com ~5 KDa (mPEG carbonato), ambos são reportados como seletivos para adições nucleofílicas com aminas primárias podendo também reagirem em menor quantidade com grupamentos hidroxilas como as presentes em serinas e treoninas (BANKS; PAQUETTE, 1995; MILLER et al., 1994; MILLER; KUROSKY, 1993). Uma vez que ambos os mPEGs testados apresentam os mesmos mecanismos de reação (adições nucleofílicas com formação de amidas) optamos por realizar a caracterização da cinética de peguilação da amilina utilizando o mPEG carbonato, no qual o carbono eletrofílico esta ligado à três oxigênios e, portanto, seria o composto mais reativo dentre os dois testados.

As reações entre amilina murina e mPEG carbonato foram inicialmente realizadas em meio aquoso tamponado com PBS em diferentes pH, temperatura e estequiometria. O acompanhamento das cinéticas destas reações foi realizado empregando-se a detecção de aminas livres pela sonda fluorescente fluorescamina. Assim, após a solubilização de amilina e mPEG carbonato em PBS, estes foram misturados e a cada intervalo de tempo (1 min, 10

min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 24 h) 2 μL do meio reacional foi retirado e misturado com 200 μL de solução de 0,05% fluorescamina em DMSO. Como esta sonda fluorescente reage com aminas primárias a uma velocidade muito rápida, não houve a necessidade de interromper a reação com reagente adicionais. O excesso de fluorescamina foi então convertido a um composto não fluorescente pela adição de 198 μL de PBS a cada amostra.

A figura 34 apresenta o perfil das cinéticas das reações entre amilina murina e mPEG carbonato em PBS sob diferentes condições (pH, temperatura e estequiometria), tendo sido observado que a concentração de aminas primárias decaía com o passar do tempo atingindo um platô após menos de duas horas de reação. Todavia, independentemente das condições testadas foi observado que a reação consumia apenas 40 % das aminas presentes no início da reação indicando que mesmo com excesso de mPEG e variações de temperatura e pH o perfil da reações praticamente não se altera.

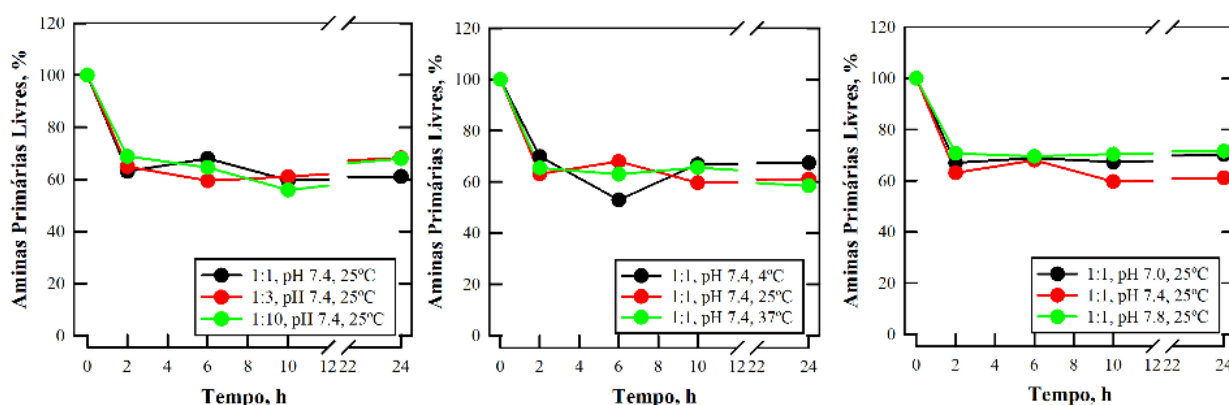


Figura 34 – Cinética reacional da peguilação de amilina murina acompanhada por fluorescência de fluorescamina.

Painel a esquerda – Reações feitas com diferentes estequiometrias entre amilina murina e mPEG carbonato (1:1, 1:3 e 1:10 de excesso de PEG). Painel no centro - Reações realizadas nas temperaturas de 4°C, 25 °C e 37°C e Painel a direita - Reações ocorridas em tampões fosfatos salinos com pH iguais a 7,0, 7,4 e 7,8.

Uma vez que existe mais de um sítio de ligação para os mPEGs, houve a necessidade de se trabalhar com técnicas que diferenciasssem amilinas derivatizadas com uma ou duas moléculas de metoxipolietilenoglicol. O primeiro método empregado com esse objetivo neste trabalho foi o de eletroforese utilizando gel de poliacrilamida em condições desnaturantes – SDS-PAGE. Para este ensaio, após o preparo do meio reacional foram retiradas alíquotas de 10 μ L da reação e imediatamente misturadas com 10 μ L tampão de amostra para cada tempo de reação avaliado. Este método também não requer a introdução de reagentes adicionais para a interrupção das reações, uma vez que, o tampão de amostra usado é rico em Tris-Cl (tampão aminado).

Foi possível avaliar que a reação de peguilação de amilina murina em PBS apresenta uma cinética muito rápida, com a conversão da maior parte de amilina livre em amilina peguilada diferentemente do perfil apresentado pela cinética acompanhada por fluorescamina. A avaliação do gel (Fig 35) também revela que existem no mínimo quatro espécies de amilina derivatizada com mPEG carbonato, sugerindo portanto que esta reação ocorre em outros sítios além das aminas presentes na sequência primária da amilina murina.

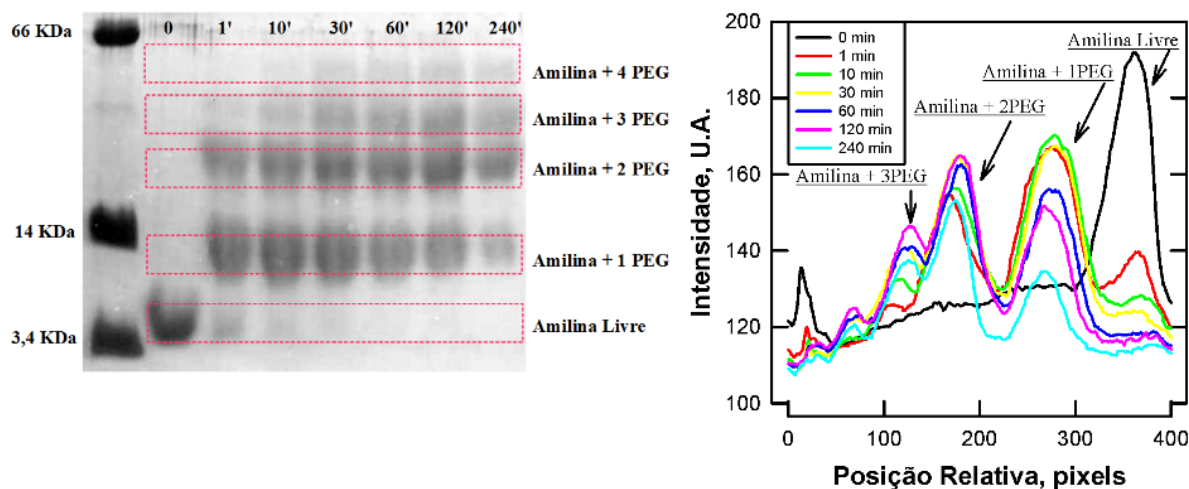


Figura 35 – Cinética da reação entre amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em PBS pH 7,4, t.a.. A esquerda é apresentado o gel de poliacrilamida a 22,5% corado por comassie azul e contendo amostras de diferentes tempos de reação. À direita o resultado da análise densitométrica do gel utilizando os programas ImageJ e FityK.

Uma análise mais apurada desta reação é possível através dos valores normalizados para a intensidade de cada banda em cada poço do gel apresentado. Observa-se então, que a quantidade de amilina livre decai a aproximadamente 6% do valor inicial com apenas 10 minutos de reação, enquanto que valores de amilina monopeguilada e dipeguilada atingem valores próximos aos seus máximos com apenas um minuto de reação. Vê-se também que as espécies com três e quatro derivatizações aumentam mais tardiamente se comparadas com os derivados mono e dipeguilados (Tabela 7).

Tabela 7 – Densitometria normalizada do gel contendo a cinética reacional entre amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em PBS pH 7,4, t.a.

Tempo	Amilina Livre	Amilina + 1 PEG	Amilina + 2 PEG	Amilina + 3 PEG	Amilina + 4 PEG
0 min	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
1 min	12,3 %	54,5 %	29,7 %	3,5 %	0 %
10 min	6,0 %	60,4 %	28,9 %	4,7 %	0 %
30 min	4,0 %	57,5 %	29,7 %	5,3 %	3,5 %
60 min	5,9 %	50,5 %	28,2 %	9,0 %	6,4 %
120 min	5,8 %	47,7 %	32,2 %	9,8 %	4,5 %
240 min	5,1 %	38,1 %	36,1	10,7 %	10,0 %

A reação entre amilina murina e metoxipolietilenoglicol succinimidil propionato em tampão fosfato salino, pH 7,4, e a uma razão molar de 1:10, amilina : PEG, também foi monitorada utilizando-se gel de poliacrilamida a 22,5%.

A análise dos resultados desta reação indica que a mesma obedece a uma cinética muito semelhante a apresentada pela reação entre amilina murina e mPEG carbonato, conforme indicado na figura 36 e tabela 8, com o declínio de amilina livre ocorrendo de forma intensa nos primeiros minutos de reação e com a formação principalmente das formas mono e dipeguiladas.

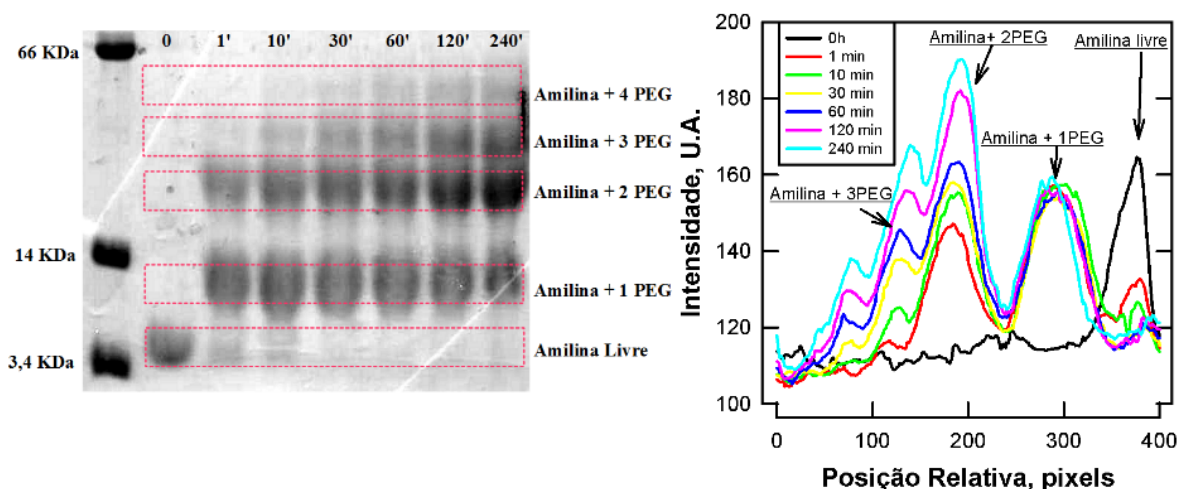


Figura 36 – Cinética da reação entre amilina murina e mPEG propionato (1:10) em PBS pH 7,4, T.A. A esquerda é apresentado o gel de poliacrilamida a 22,5% corado por comassie azul e contendo amostras de diferentes tempos de reação. Na esquerda o resultado da análise densitométrica do gel utilizando os programas ImageJ e FityK.

Tabela 8 – Densitometria normalizada do gel contendo a cinética reacional entre amilina murina e mPEG propionato (1:10) em PBS pH 7,4, t.a.

Tempo	Amilina Livre	Amilina + 1 PEG	Amilina + 2 PEG	Amilina + 3 PEG	Amilina + 4 PEG
0 min	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
1 min	10,0 %	47,3 %	38,4 %	4,3 %	0 %
10 min	5,4 %	52,1 %	38,8 %	3,7 %	0 %
30 min	5,2 %	55,6 %	27,7 %	7,7 %	3,9 %
60 min	6,3 %	53,8 %	25,1 %	8,4 %	6,5 %
120 min	4,6 %	50,9 %	28,5 %	8,4 %	7,6 %
240 min	4,4 %	40,5 %	34,6 %	9,1 %	11,4 %

A coloração utilizada nos géis anteriormente apresentados foi a de azul de comassie G-250, que apresenta afinidade seletiva por proteínas e peptídeos, não sendo capaz de diferenciar um peptídeo derivatizado com mPEG de outro livre (a diferenciação foi feita com base no padrão de corrida no gel). Para ser confirmada a derivatização com mPEG, um gel contendo a cinética de reação entre amilina e mPEG carbonato foi submetido à dupla

coloração, sendo inicialmente corado com comassie, descorado e posteriormente corado com uma metodologia que emprega cloreto de bário e iodo resultando na coloração de moléculas de polietilenoglicol em tons de castanho avermelhado. A figura 37 revela que a reação entre amilina e mPEG carbonato segue uma cinética que leva, primariamente, à formação de compostos polipequilados após 20h do início do experimento.

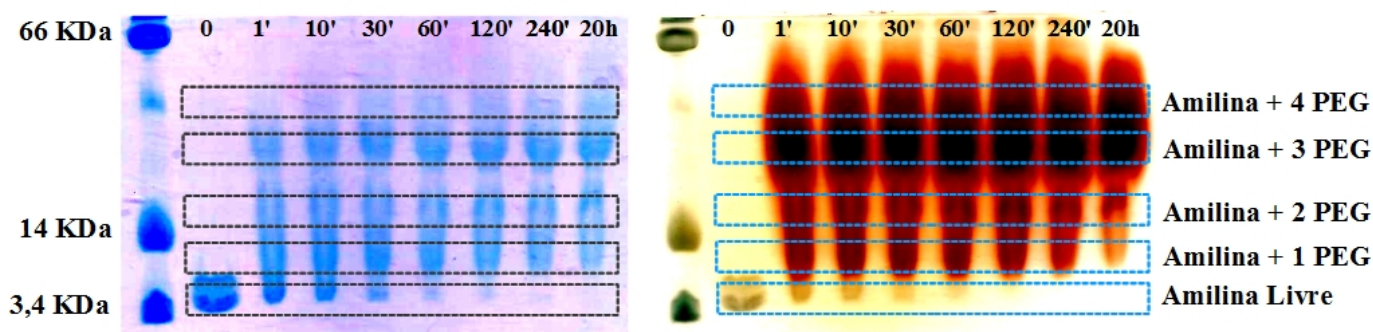


Figura 37 – Cinética da reação entre amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em PBS pH 7,4, T.A.
 À esquerda é apresentado o gel de poliacrilamida a 22,5% corado por comassie azul e contendo amostras de diferentes tempos de reação. À direita o mesmo gel foi recorado com bário/iodeto evidenciando a presença de derivados peguilados nos diferentes tempos de reação.

A reação entre amilina murina e mPEG carbonato também foi monitorada por espectrometria de massas utilizando dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI) acoplada a aparelho que separa os íons por tempo de voo (TOF). Este sistema é especialmente útil para a análise de espécies de elevado peso molecular, possibilitando a detecção do íon molecular diretamente. Todavia, a informação obtida através desta abordagem tem carácter meramente qualitativo não sendo possível correlacionar a intensidade de sinais nos fragmentogramas com a abundância de compostos na amostra de origem. Para este ensaio, foram retiradas alíquotas de meio de reação contendo amilina e mPEG carbonato e a reação foi imediatamente interrompida com solução contendo o aminoácido *L*-lisina a um

excesso de 10 vezes em relação à concentração inicial de mPEG. As amostra de diferentes tempos de reação foram então enviadas para análise e os resultados são apresentados a seguir:

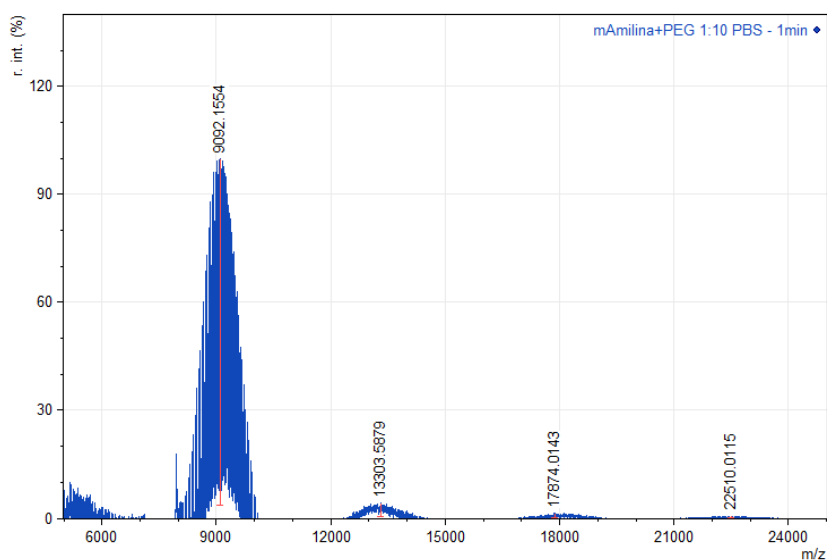


Figura 38 – Espectro de massas do meio reacional após 1 minuto de experimento contendo amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em PBS pH 7,4 a t.a.

O espectro da reação após 1 minuto indica a presença das quatro formas de amilina peguilada (amilina monopeguilada, dipeguilada, tripeguilada e tetrapeguilada).

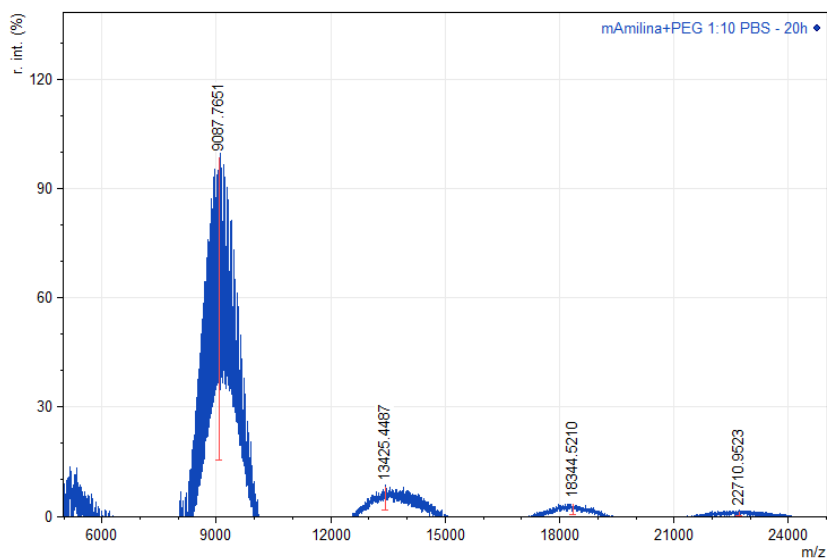


Figura 39 – Espectro de massas do meio reacional após 20 horas de experimento contendo amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em PBS pH 7,4 a t.a.

O espectro da reação após 20 horas também indica a presença das quatro formas de amilina peguilada sugerindo que não são formadas outras espécies peguiladas mesmo após horas de reação.

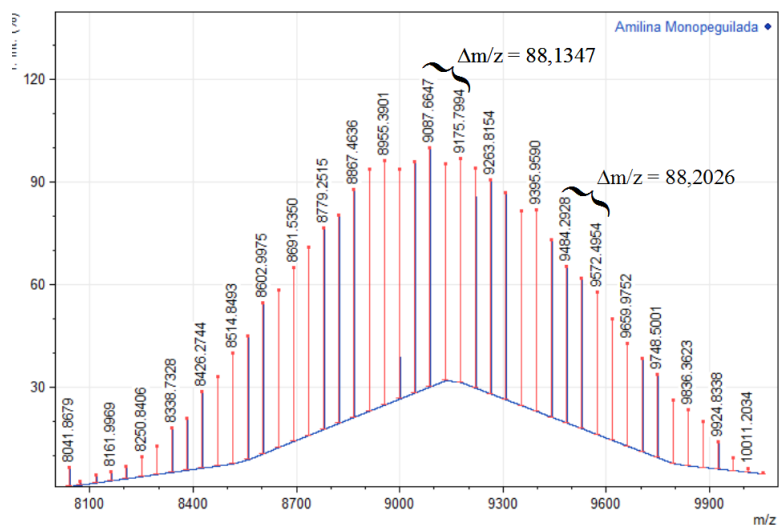


Figura 40 – Amilina murina monopeguilada, picos em destaque.

Espectro de massas do meio reacional após 1 minuto de experimento contendo amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em PBS pH 7,4 a t.a., com destaque para o pico razão massa/carga média de 9087,7651.

A análise mais apurada do pico de m/z aproximadamente igual a 9 KDa, amilina monopeguilada, revela um padrão de dispersão contento picos com variação de 44 Da de massa/carga, sendo esta coerente com a unidade de polimerização do polietilenoglicol ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}- = 44,03 \text{ Da}$) e portanto esperada para o derivado peguilado da amilina. Na figura 40 são destacadas duas diferenças de m/z com valores de 88 Da, para enfatizar esse padrão de repetição, mas é importante notar que entre os picos usados para calcular essas diferenças existem picos que o programa não assinalou no gráfico em questão, e que correspondem justamente ao valor de massas intermediárias, ou seja, $\Delta m/z$ de aproximadamente 44 Da.

Buscando-se otimizar as condições reacionais optou-se por realizar os ensaios em solvente aprótico, evitando-se assim a protonação da aminas do peptídeo e potencializando a capacidade dos mPEGs utilizados uma vez que a retirada de água do sistema evita a reação

mPEG e água, a qual, leva à inativação dos derivatizantes. Novamente, a derivatização com a sonda fluorescente fluorescamina foi utilizada para se avaliar o consumo de amins livres ao longo do ensaio. Nestas condições, foi observado um rápido decréscimo na concentração de amins livres nas primeiras 4h de reação (Fig. 41) alcançando um máximo com 24 h de ensaio, onde observou-se que mais de 95% das amins havia sido derivatizada na presença de mPEG carbonato e aproximadamente 85% deste grupamento reagiu quando em presença de mPEG propionato. Estes dados sugerem que em DMSO as forma ativas de mPEG são preservadas por intervalos de tempos maiores que em solvente aquoso, possibilitando desta forma uma reação mais eficiente para a derivatização de amina livres.

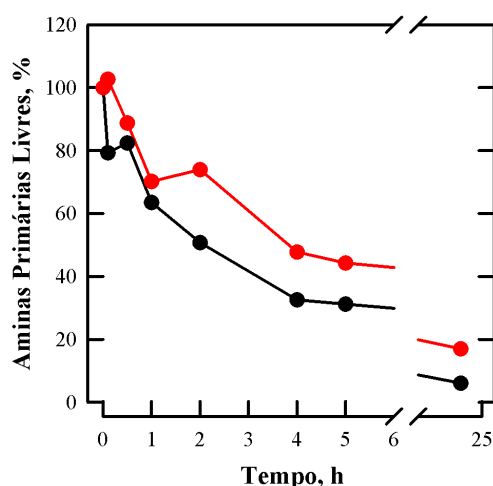


Figura 41 – Cinética da reação de peguilação de amilina murina acompanhada por fluorescência de fluorescamina.

As reações foram conduzidas em DMSO com estequiometria de 1:10, amilina:mPEG a temperatura ambiente. Reação de amilina com mPEG carbonato (-●-) e reação de amilina com mPEG propionato (-●-).

A cinética reacional também foi monitorada utilizando-se gel de poliacrilamida a 22,5% em condições desnaturantes (contendo SDS), o que possibilitou acompanhar não apenas o decaimento de amins livres, como o observado no ensaio com fluorescamina, mas sim, o surgimento de formas mono, di, tri e polipeguiladas de amilina murina através do

surgimento de bandas de maior peso molecular.

Para melhor caracterização da cinética reacional entre amilina murina e mPEG carbonato em DMSO três condições foram escolhidas:

- Reação A: com 1:2 de amilina para mPEG a temperatura ambiente;
- Reação B: com 1:5 de amilina para mPEG a temperatura ambiente e
- Reação C: com 1:10 de amilina para mPEG a temperatura ambiente.

Ao contrário das condições utilizadas para as reações em PBS, no sistema contendo DMSO não há motivos para se avaliar o efeito de pH sobre a formação dos produtos reacionais por se tratar de um solvente polar aprótico. Cabe aqui destacar que, a diminuição da temperatura também não é aplicável e este sistema, uma vez que os mPEGs empregados não possuem a solubilidade adequada em DMSO em temperaturas abaixo de 19°C. Além disso, este solvente tem ponto de fusão relativamente elevado, impossibilitando assim reações em temperaturas entre 4°C e 8°C (temperatura média das geladeiras convencionais). Assim, após solubilizados em DMSO amilina murina e mPEG carbonato, em diferentes razões, foram misturados e a cada intervalo de tempo 10 µL de cada meio reacional foi retirado e imediatamente misturado com 10 µL de tampão de amostra para gel, que contém glicina e tampão tris-Cl, interrompendo assim a reação. A figura 42 representa os geis das reações em DMSO, sendo possível observar que a uma razão de 1:2 grande parte a amilina murina permanece sem reagir mesmo após 4 horas de ensaio. Observa-se também que em todas as

condições avaliadas houve a formação das formas mono e dipeguladas já nos primeiros minutos de reação, e as formas polipeguladas são vistas principalmente na reação com excesso de 9 vezes de mPEG, conforme seria esperado.

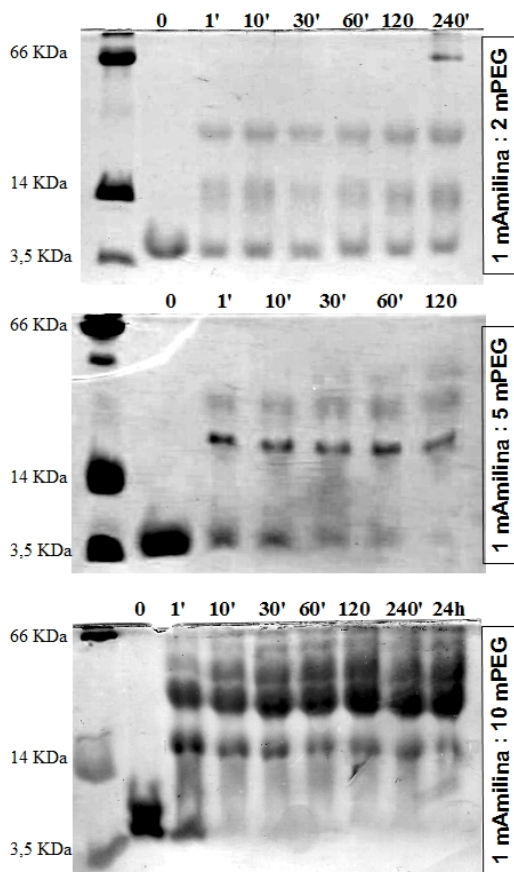


Figura 42 – Cinética da reação entre amilina murina e mPEG carbonato em DMSO e com diferentes razões estequiométricas entre amilina e mPEG.

Uma análise mais minuciosa destas cinéticas pode ser feita pela avaliação da densitometria dos géis anteriormente apresentados. Para tanto, as imagens obtidas foram analisadas utilizando a ferramenta de análise de géis no programa ImageJ, e a seguir, os gráficos oriundos deste programa foram integrados utilizando o programa FityK e, por fim, os valores para cada pico e em cada intervalo de tempo foram normalizados e são apresentados a seguir:

Tabela 9 – Densitometria normalizada do gel contendo a cinética reacional entre amilina murina e mPEG carbonato (1:2) em DMSO a t.a.

Tempo	Amilina Livre	Amilina + 1 PEG	Amilina + 2 PEG	Amilina + 3 PEG	Amilina + 4 PEG
0 min	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
1 min	41,7 %	32,0 %	26,4 %	0 %	0 %
10 min	35,0 %	27,8 %	37,2 %	0 %	0 %
30 min	33,9 %	33,5 %	32,6 %	0 %	0 %
60 min	38,2 %	31,0 %	30,8 %	0 %	0 %
120 min	25,7 %	43,6 %	30,6 %	0 %	0 %
240 min	19,2 %	36,3 %	30,6 %	0 %	13,9 %

A densitometria do gel de poliacrilamida contendo a reação A (Tabela 9) indica que ao final de 4 horas de experimento aproximadamente 20% de amilina não havia sido derivatizada e a formação de amilina mono e dipeguiladas ocorre ainda no primeiro minuto. Interessantemente, um pico de elevada massa molecular surgiu após quatro horas de ensaio indicando que a reação mesmo a baixas razões estequiométricas também é capaz de gerar derivados polipeguilados.

Tabela 10 – Densitometria normalizada do gel contendo a cinética reacional entre amilina murina e mPEG carbonato (1:5) em DMSO a t.a.

Tempo	Amilina Livre	Amilina + 1 PEG	Amilina + 2 PEG	Amilina + 3 PEG	Amilina + 4 PEG
0 min	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
1 min	50,0 %	30,3 %	19,7 %	0 %	0 %
10 min	38,0 %	28,5 %	33,5 %	0 %	0 %
30 min	25,9 %	33,1 %	40,9 %	0 %	0 %
60 min	19,2 %	40,7 %	40,1 %	0 %	0 %
120 min	13,3 %	36,1%	38,1 %	12,5 %	0 %

O perfil da reação B (Tabela 10) revela algumas diferenças em relação a reação anteriormente discutida com a diminuição da concentração de amilina livre ocorrendo de forma abrupta no primeiro minuto de reação, mas que depois segue uma cinética mais lenta até 13,3% com duas horas de experimento. A formação de amilina dipeguilada parece ocorrer de forma mais controlada quando comparada às reações A e C. Por fim, uma banda de mais alto peso molecular foi observada após 2 horas de reação sugerindo que a derivatização com mPEG carbonato em DMSO pode ocorrer em sítios de ligação diferentes de aminas primárias.

Tabela 11 – Densitometria normalizada do gel contendo a cinética reacional entre amilina murina e mPEG carbonato (1:10) em DMSO a t.a.

Tempo	Amilina Livre	Amilina + 1 PEG	Amilina + 2 PEG	Amilina + 3 PEG	Amilina + 4 PEG
0 min	100 %	0 %	0 %	0 %	0 %
1 min	30,2 %	28,5 %	35,4 %	5,8 %	0 %
10 min	15,9 %	27,3 %	42,7 %	9,7 %	4,3 %
30 min	16,6 %	28,1 %	45,6 %	4,8 %	4,9 %
60 min	11,1 %	29,6 %	43,5 %	9,5 %	6,4 %
120 min	12,4 %	29,0 %	45,2 %	9,9 %	3,5 %
240 min	10,9 %	32,4 %	46,8 %	4,9 %	4,9 %
1440 min	11,9 %	22,7 %	48,7 %	10,5 %	6,2 %

Conforme esperado, a cinética da derivatização de amilina com mPEG carbonato em excesso de 9 vezes (tabela 11) indica que o surgimento de forma com 3 ou mais peguilações ocorre tardiamente e necessita de excesso de reagente derivatizante, o que indica e predileção

deste por determinados sítios de ligação.

4.3.2 – Purificação

A peguilação envolve a ligação de formas reativas de polietilenoglicóis à proteínas gerando novos produtos com características distintas dos reagentes dos quais foram originados. Dentre as modificações mais importantes estão: o aumento do peso molecular e mudanças na lipo/hidrofilicidade. Para este trabalho foram utilizados mPEGs com peso molecular médio de 5 KDa e um peptídeo de aproximadamente 4 KDa, tendo, portanto, os produtos massas moleculares médias de aproximadamente 9 KDa, 14 KDa, 19 KDa e 24 KDa.

A primeira tentativa de purificação das formas peguiladas de amilina murina se deu por cromatografia de exclusão de tamanho visando assim a separação com base nos raios hidrodinâmicos dos compostos gerados. Para este ensaio, uma reação de amilina:mPEG 1:10 foi realizada em PBS a temperatura ambiente e após 4 horas esta foi interrompida com excesso de *L*-lisina. A reação foi realizada inicialmente em PBS, porque a coluna utilizada (TSK Gel 3000XL) teve como fase móvel PBS com pH igual a 7,4 e, desta forma, a realização do ensaio apenas em tampão fosfato salino minimizaria possíveis interferências causadas pelo DMSO como meio reacional. Optou-se também por realizar o ensaio com excesso de derivatizante, objetivando-se produtos com todas as formas de peguilação afim de se verificar se o método era capaz de separar de forma eficiente todos os produtos de reação.

Infelizmente o uso de cromatografia por exclusão de tamanho, utilizando a coluna TSK gel, se mostrou ineficiente para os fins propostos neste trabalho conforme é possível observar na figura 43. Não foi possível uma separação satisfatória das formas peguiladas de amilina murina por SEC utilizando o protocolo proposto. Outras tentativas foram realizadas, alterando-se parâmetros como fluxo e fase móvel, sendo igualmente ineficazes para esta abordagem.

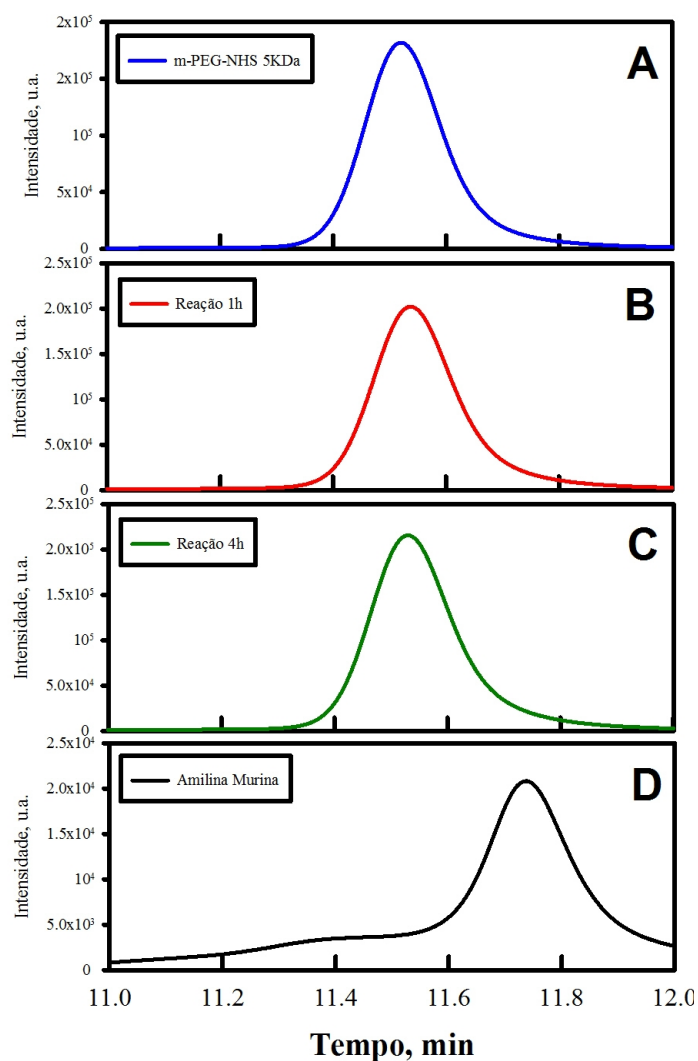


Figura 43 – Tentativas de purificação de amilina peguilada por SEC.

Cromatograma de amostras contendo amilina murina e mPEG-NHS carbonato em diferente tempos de reação, separadas por cromatografia de exclusão de tamanho utilizando coluna TSK-Gel G3000SW e monitoradas a 280

nm.

Além das mudanças nos raios hidrodinâmicos a peguilação também leva a alterações na lipo/hidrofilicidade da proteínas derivadas e, sendo assim, a cromatografia de fase reversa pareceu um método indicado para a separação das substâncias geradas. Para este fim, reações de amilina murina com mPEG-NHS (propionato e carbonato) em DMSO a uma razão de 1:10, amilina:PEG, foram interrompidas após 4h com excesso de *L*-lisina e em seguida analisadas utilizando-se colunas de fase reversa como C8, C12 e C18. Tendo as duas primeiras colunas se mostrado inadequadas para a separação, passou-se a utilizar uma coluna C18 semi-preparativa para fazer a purificação dos produtos.

Utilizando gradiente crescente de acetonitrila foi possível separar espécies monopeguiladas e dipeguiladas de amilina murina produzidas tanto com mPEG carbonato quanto com mPEG propionato. A figura 44 mostra uma corrida cromatográfica com amostra de amilina murina dissolvida em DMSO a 5,0 mg/mL usando uma coluna de fase reversa C18 semi-preparativa e sendo possível observar um pico com tempo de retenção em torno de 8 minutos.

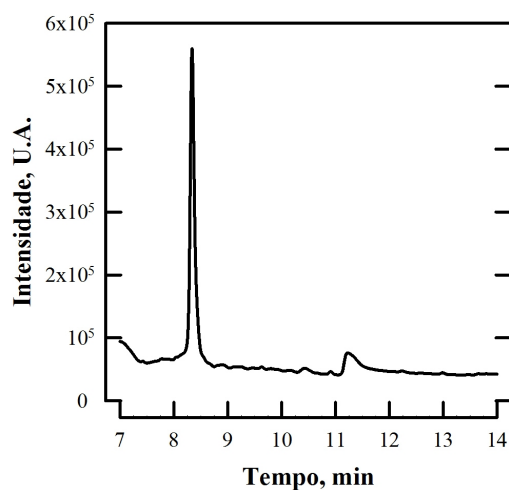


Figura 44 – Cromatograma de Amilina Murina, massa injetada de 50 µg, utilizando coluna de fase reversa e monitorado a 220 nm.

As figuras 45 e 46 apresentam os resultados das corridas cromatográficas realizadas afim de se purificar formas derivatizadas de amilina, tendo os picos indicados em cada figura sido coletados e posteriormente analisados por espectrometria de massas.

O material coletado durante as corridas cromatográficas foi, a seguir, secado usando um aparelho de *speed vac* por 24 horas, e, então, as amostras foram ressuspendidas em 50 µL de água purificada, e após isso, cada fração das corridas foi aplicada em um sistema de eletroforese com gel de poliacrilamida a 22,5% contendo SDS. Após a coloração com comassie e bário/iodeto as amostras foram enviadas para o CEMBio para análise por espectrometria de massas.

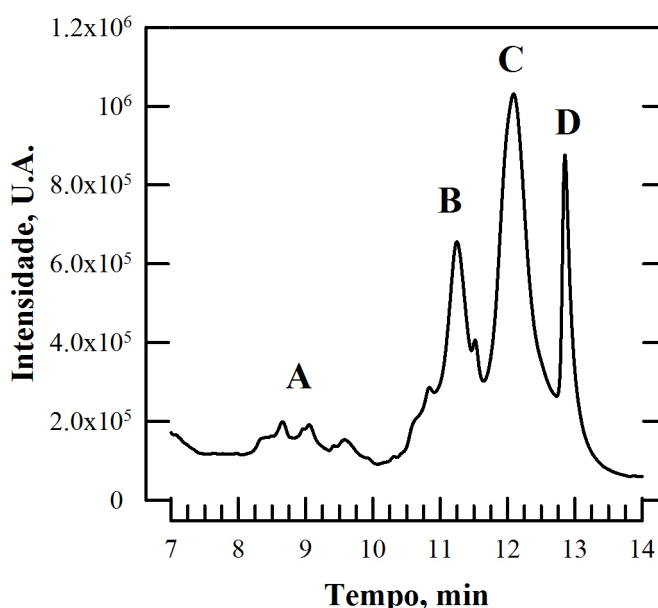


Figura 45 – Purificação da reação amilina:mPEG carbonato

Cromatograma reação entre amilina murina e mPEG-NHS carbonato (1:10) em DMSO por 4h. Separação realizada utilizando coluna de fase reversa C18, gradiente de acetonitrila e monitorada a 220 nm.

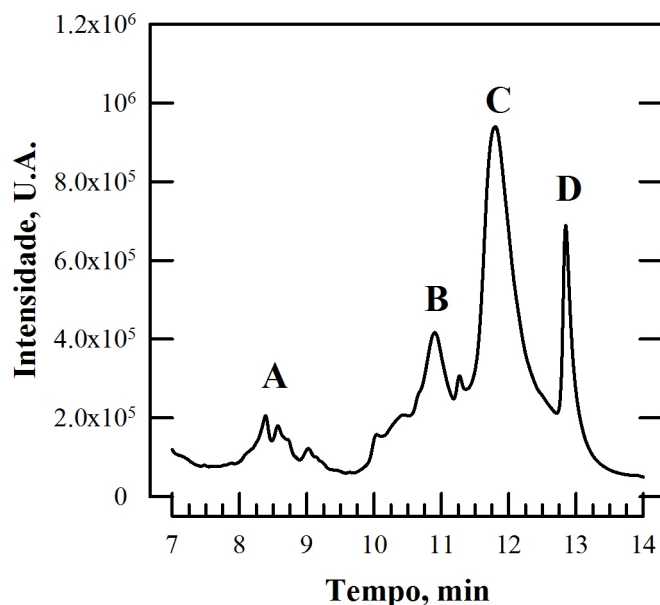


Figura 46 – Purificação da reação amilina:mPEG propionato.

Cromatograma reação entre amilina murina e mPEG-NHS propionato (1:10) em DMSO por 4h. Separação realizada utilizando coluna de fase reversa C18, gradiente de acetonitrila e monitorada a 220 nm.

A avaliação dos resultados mostra perfil muito semelhantes de cromatogramas para ambas as reações, sendo estes apresentados na tabela abaixo.

Tabela 12 – Composição dos eluatos e seus tempos de retenção:

Identificação do Pico no Cromatograma	Tempo de Retenção Reação mPEG-NHS Carbonato	Tempo de Retenção Reação mPEG-NHS Propionato	Principal Constituinte
A	~8' a 9'30"	~8' a 9'	Amilina Livre
B	~10'20" a 11'20"	~10' a 11'	Amilina Monopeguilada
C	~11'30" a 12'30"	~11'30" a 12'30"	Amilina Dipeguilada
D	~12'50" a 13'20"	~12'40" a 13'20"	Mistura de Amilinas Polipeguiladas

O resultado das purificações de ambas a reações indica que a peguilação modifica o

coeficiente de partição da amilina levando a produtos mais lipofílicos, uma vez que o aumento no número de peguilações leva a maiores tempos de retenção, ou seja, produtos com maior afinidade à fase estacionária. Todavia, tais mudanças não são suficientemente significativas a ponto de permitirem picos com resolução apropriada para uma purificação plena, sendo os produtos com mais de duas peguilações eluídos todos ao mesmo tempo.

Como a reação com mPEG carbonato produziu uma maior quantidade de espécies mono e dipeguiladas, comparando as áreas dos picos B e C de ambas as reações, este modelo foi escolhido para uma melhor caracterização conforme é apresentado a seguir.

Afim de se otimizar a produção de formas mono e dipeguiladas uma reação entre amilina murina e mPEG carbonato em DMSO com excesso de 1:10 do derivatizante, foi conduzida por 10 minutos. A seguir, a reação foi interrompida com lisina e em seguida purificada por cromatografia de fase reversa (Fig; 47). A purificação desta reação revelou uma maior quantidade de amilina livre e dos produtos mono e dipeguilados em comparação com a purificação realizada após 4h de reação, o que está de acordo com os estudos anteriormente apresentados.

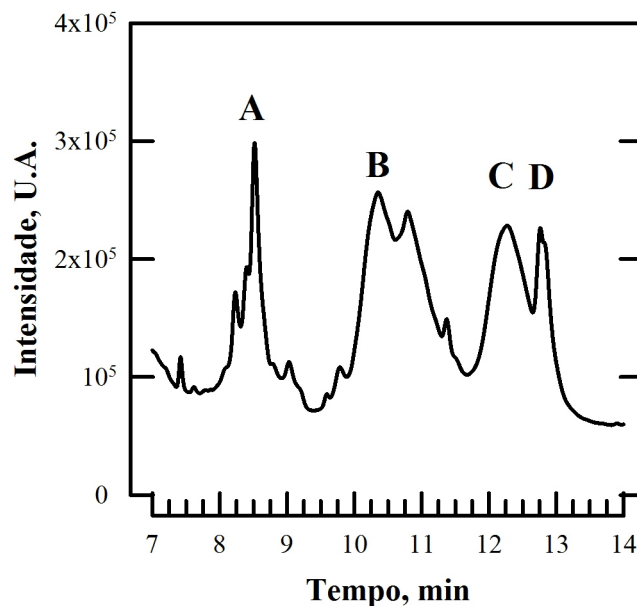


Figura 47 – Purificação da reação amilina:mPEG carbonato, condições otimizadas.

Cromatograma da reação entre amilina murina e mPEG-NHS carbonato (1:10) em DMSO por 10 minutos. Separação realizada utilizando coluna de fase reversa C18, gradiente de acetonitrila e monitorada a 220 nm.

As análises das frações que eluíram desta purificação foram realizadas separadamente por MALDI-TOF-MS revelando, conforme esperado, um aumento nas massas conforme ocorre aumento nos tempos de eluição. Na figura 48 nota-se a presença das formas monopeguiladas de amilina (íon molecular e seu respectivo dímero) na fração de 10 minutos, na amostra com tempo de eluição de aproximadamente 12 minutos estão presentes a forma monopeguilada e a forma dipeguilada (íon molecular e seu respectivo dímero) e, por fim, na amostra com tempo de 12'40" observa-se uma mistura contendo amilina dipeguilada e tripeguilada. Conclui-se, portanto, que os produtos mono e dipeguilados podem ser purificados pelo método proposto, com a ressalva que o produto dipeguilado apresenta-se contaminado com a forma monopeguilada.

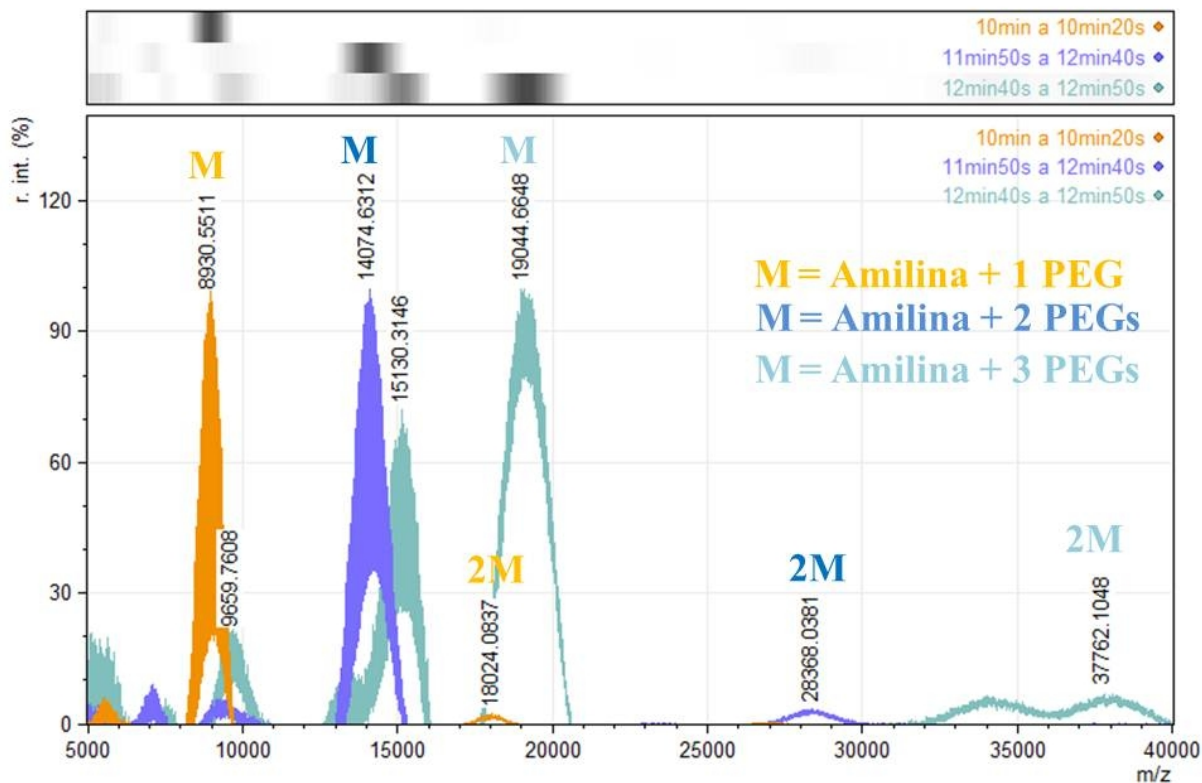


Figura 48 – Análise do eluatos contendo formas peguiladas de amilina murina.

Espectros de massas obtidos por MALDI-TOF de frações purificadas da reação entre amilina murina e mPEG-NHS carbonato.

4.3.3 – Identificação dos sítios de ligação

A identificação dos possíveis sítios de ligação entre amilina e mPEG-NHS foi inicialmente realizada pela análise da estrutura primária do peptídeo visando a identificação de aminoácidos com cadeias laterais contendo grupamentos potencialmente doadores de elétrons (Fig. 49).

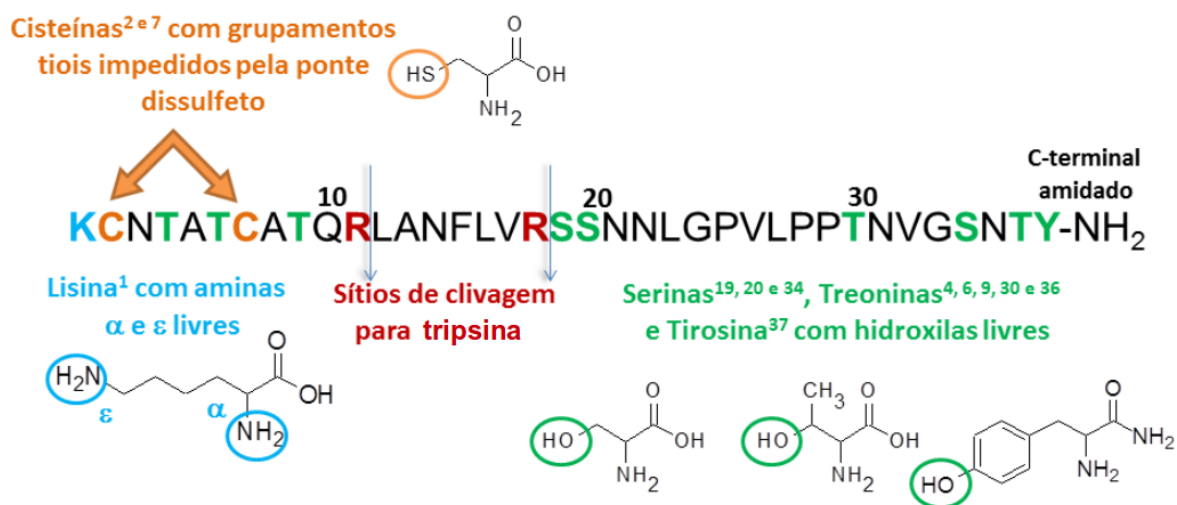


Figura 49 – Análise da estrutura primária da amilina murina e identificação de aminoácidos com cadeias laterais possivelmente reativas com mPEG-succinimidil.

A análise da sequência da amilina murina revela que esta apresenta 13 grupamentos potencialmente nucleófilos, sendo estes: duas aminas primárias na lisina 1, dois tiois nas cisteínas 2 e 7, três hidroxilas nas serinas 19, 20 e 34, cinco hidroxilas nas treoninas 4, 6, 9, 30 e 36 e, por fim, uma hidroxila na tirosina 37. Porém, a ponte dissulfeto presente neste peptídeo impossibilita a participação das cisteínas neste tipo de reação, restando apenas aminas e hidroxilas para reagirem com os mPEG-NHSs.

Uma vez que apenas as formas mono e dipeguiladas foram satisfatoriamente purificadas, a identificação dos locais de ligação para estes dois produtos se deu através da clivagem proteolítica por tripsina conforme descrito a seguir. Após um ensaio de eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida a 22,5% as bandas contendo amilina monopeguilada e dipeguilada foram recortadas do gel, e, então, cada amostra foi submetida à digestão com tripsina seguida por uma posterior análise por espectrometria de massas para a identificação dos fragmentos resultantes da digestão com esta protease.

Com base na análise da estrutura primária da amilina murina vê-se que este peptídeo possui apenas dois pontos para a ação da tripsina, sendo eles as arginina 11 e 18. Assim, os possíveis produtos desta digestão são apresentados na tabela 13.

Tabela 13 – Possíveis produtos da digestão de amilina murina por tripsina

Sequência	Posição	Massa Molecular
KCNTATCATQRL ANFLVR SSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂	12-18	832
KCNTATCATQR LANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂	1-11	1.196
KCNTATCATQRLANFLVR SSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH₂	19-37	1,931
KCNTATCATQR LANFLVRSSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂	1-18	2.010
KCNTATCATQRL ANFLVR SSNNLGPVLPPTNVGSNTY-NH ₂	12-37	2,745

Conforme já mostrado, os agentes derivatizantes (mPEG-NHS) são misturas de moléculas de polietilenoglicol com diferentes tamanhos de cadeias, o que resulta em uma distribuição de massas/carga nos fragmentogramas. Para melhor estimar o peso molecular dos derivatizantes utilizados neste trabalho, estes foram submetidos à análise de MALDI-TOF-MS e os resultados são apresentados na tabela 13. No entanto, os valores devem ser corrigidos considerando que para a análise os mPEGs foram neutralizados com lisina (146 Da), o que deve ser levado em consideração para o cálculo do peso destes. Assim, tem-se o Mn e Mw iguais a 5289 Da e 5335 Da para o mPEG-carbonato, e 5297 Da e 5336 Da para o mPEG-propionato, respectivamente. Estes valores estão em boa concordância com o valor estimado para o mPEG conjugado com base nas diferenças de massas entre os peptídeos trípticos di e monopeguilados, de Mn de 5178 e Mw de 5195. Na tabela 14 são apresentados os achados resultantes da digestão de amilina monopeguilada e dipeguilada.

Tabela 14 – Análise picos referentes às massas moleculares dos mPEGs, produtos peguilados e fragmentos tripticos.

Amostra	Mn	Mw	Pd
mPEG-NHS carbonato	5.435	5.481	1,008
mPEG-NHS propionato	5.443	5.482	1,007
Amilina murina monopeguilada (trips.)	6.435	6.448	1,002
Amilina murina dipeguilada (trips.)	11.613	11.643	1,002
Massa estimada mPEG conjugado	11.613-6.435 = 5.178	11.643-6.448 = 5.195	
Massa estimada do peptído resultante da digestão por tripsina	6.435-5.178 = 1.257	6.448-5.195 = 1.253	

Usando outra abordagem para o problema, considerando (5435-146) = 5289 como o Mw do mPEG , também pode-se estimar o tamanho do peptídeo obtido da digestão de amilina peguilada com tripsina da seguinte forma:

$$\mathbf{Mn}_{\text{(fragmento de amilina monopeguilada)}} - \mathbf{Mn}_{\text{mPEG}} = \mathbf{Mn}_{\text{(fragmento Amilina)}} = \mathbf{6435} - \mathbf{5289} = \mathbf{1146 \text{ Da}}$$

Ambas as massas de fragmentos calculadas (1.257 Da e 1146 Da) são condizentes com o fragmento 1 a 11 (Mw = 1.196 Da) da sequência de amilina murina, que inclui a Lys1 e sua duas aminas primárias e três treoninas com suas hidroxilas.

4.3.4 – Interação com receptor fisiológico

A manutenção da capacidade de se ligar em seu receptor e desempenhar sua função fisiológica/farmacológica é fundamental para o sucesso de estratégias de derivatização como as utilizadas neste trabalho. A amilina é um hormônio peptídico que exerce seu efeito através da ligação com receptores de membranas como os Proteínas Modificadoras da Atividade de

Receptores (*receptor activity-modifying proteins* - RAMP), uma família de proteínas composta de três proteínas transmembrana, as quais participam na intermediação de receptores acoplados à proteína G (GPCR) (YOUNG, 2005).

O domínio extracelular da RAMP2 foi produzido, purificado e marcado com fluoresceína, sendo então utilizado nos ensaios de ligação à amilina murina, amilina monopeguilada e dipeguilada. A utilização de anisotropia de fluorescência se mostrou inadequada para esse ensaio, uma vez que, a adição dos ligantes levou a uma queda expressiva no rendimento quântico da sonda utilizada. No entanto, foi possível correlacionar a mudança no sinal de fluorescência na presença dos ligantes em função da concentração destes. A figura 50 indica mudanças ocorridas na faixa de concentração de nanomolar, atingindo a saturação em cerca de 3 μM para amilina livre e 20 μM tanto para amilina monopeguilada quanto para amilina dipeguilada. Para descartar um efeito direto do derivatizante sobre RAMP2, foi realizado um ensaio de controle com a mPEG-NHS carbonato conjugado com *L*-lisina, não sendo observadas interações significativas na mesma faixa de concentração do ensaio com as formas peguiladas de amilina. A análise dos dados permitiu estimar um $C_{50\%}$, ou seja, uma concentração que resulta em uma transição de 50%, de $0,27 \pm 0,07 \mu\text{M}$ para amilina livre, e $11,21 \pm 1,8 \mu\text{M}$ para amilina monopeguilada e $12,49 \pm 4,9 \mu\text{M}$ para amilina dipeguilada.

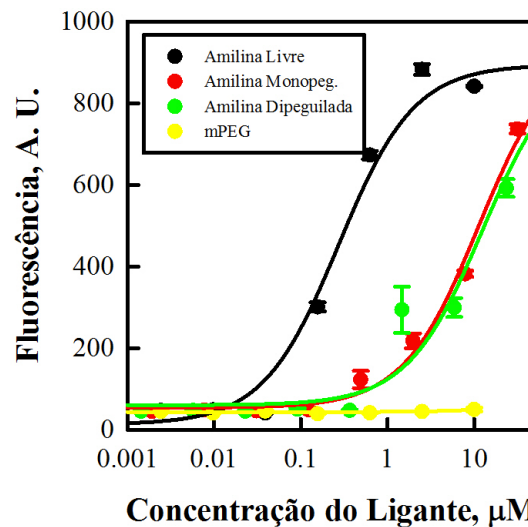


Figura 50 – Ligação da amilina e seus derivados com RAMP2.

A fluorescência de RAMP2 marcada com fluoresceína (excitação a 485 nm e emissão a 520 nm) foi monitorada na presença de diferentes concentrações dos ligantes em tampão fosfato pH 7,0.

4.3.5 – Perfil farmacológico

Após a purificação, secagem, caracterização e quantificação, os produtos monopeguilados e dipeguilados de amilina murina tanto com mPEG propionato quanto com carbonato foram testados *in vivo*. Para tanto, camundongos suíços com quatro a seis semanas pesando aproximadamente 25 g foram colocados em jejum de quatro horas e durante todo o ensaio. Após a separação de cada grupo, os animais receberam, por via subcutânea, veículo, amilina ou amilina peguilada e a cada intervalo de tempo o sangue da ponta da cauda dos animais foi retirado para a quantificação da glicose sanguínea usando um glicosímetro portátil. Os resultados deste ensaio são apresentados na figura 51 na qual é possível notar que não houve prejuízo na intensidade do efeito dos produtos peguilados.

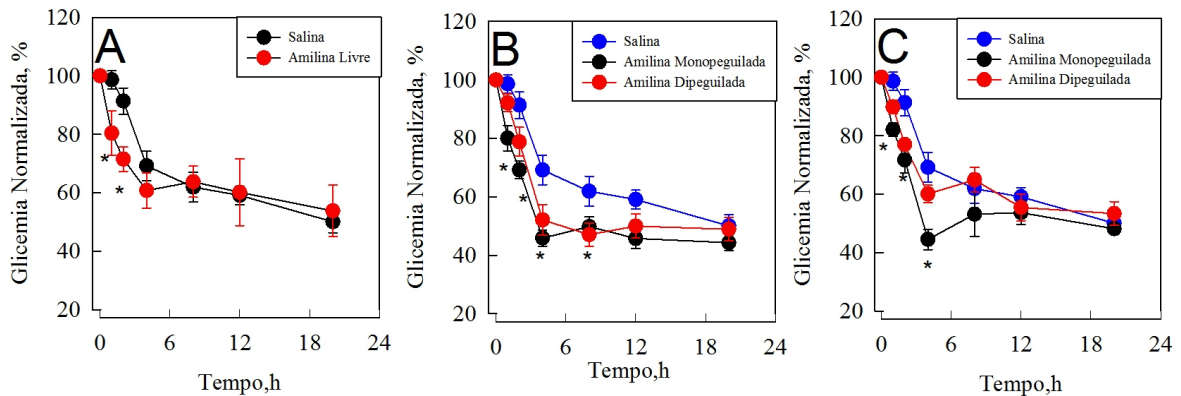


Figura 51 – Efeito sobre a glicemia de camundongos em jejum das forma peguiladas de amilina.

A – Comparação entre glicemias do grupo controle, que recebeu **Salina** (100 μ L de 0,9 % NaCl por via subcutânea) x grupo **Amilina Livre** (5 μ g por animal, \sim 50 nMol/Kg, de amilina murina em salina). **B** – Comparação entre grupo controle x grupos que receberam os produtos da reação entre amilina murina e mPEG-NHS carbonato (50 nMol/Kg de amilina monopeguilada ou amilina dipeguilada em salina). **C** – Comparação entre grupo controle x grupos que receberam os produtos da reação entre amilina murina e mPEG-NHS propionato (50 nMol/Kg de amilina monopeguilada ou amilina dipeguilada em salina). * \rightarrow Tete t $p < 0,05$.

A amilina murina, conforme já mencionado em outros ensaios deste trabalho, mostrou um efeito discreto e transitório na glicemia de animais em jejum, tendo a glicemia destes voltando a níveis semelhantes ao grupo que recebeu apenas salina após 4 horas do início do experimento. Após a purificação das reações entre amilina e os mPEG-NHSs quatro produtos foram obtidos, sendo estes: amilina monopeguilada e amilina dipeguilada a partir da reação com mPEG-NHS carbonato; amilina monopeguilada e amilina dipeguilada a partir da reação com mPEG-NHS propionato. Os três primeiros apresentaram atividade mais duradoura, quando comparados com o grupo que recebeu amilina livre, enquanto que o último (amilina dipeguilada do reagente com propionato) apresentou perda de atividade. Ressalta-se ainda que os derivados da reação com carbonato apresentaram reduções significativa na glicemia dos camundongos por um período de 8 h, tendo o efeito máximo sido observado com 4 h de ensaio.

5 – Discussão

5.1 – O modelo farmacológico

A fisiologia e farmacologia relacionadas às ações da amilina têm sido estudadas intensamente por diferentes grupos de pesquisas desde a sua descoberta. Em nossos estudos observamos que a amilina é capaz de induzir hipoglicemia no modelo animal proposto, mesmo quando foram impostas a estas modificações tais como: mudanças de analista, veículo, temperatura ambiente, e estado dos animais (sadios x DMTI-STZ). Embora existam diversos modelos para a avaliação dos efeitos da amilina, conforme apresentado na introdução desta tese, até o presente momento não havia sido proposto um sistema simples, robusto e reprodutível com o aqui apresentado.

Os efeitos hipoglicêmicos observados ocorreram ao longo de um intervalo de concentrações de 0,1 a 50 µg/animal, o que corresponde a doses de 4 a 2000 µg/Kg. A posologia utilizada para o pramlintide (fármaco semelhante à amilina murina) é de 30 a 120 µg 15 minutos antes de cada refeição, ou seja, considerando um adulto de 70 Kg, a dose usual seria de 0,4 a 1,7 µg/Kg, que pode justificar a ausência de relatos de hipoglicemia causada pelo uso de amilina isoladamente. No entanto, o uso desta juntamente com insulina provoca sinergia no efeito hipoglicemiante. Cabe ainda ressaltar, que nenhum dos estudos clínicos realizados até a presente data avaliou os efeitos do pramlintide em voluntários em jejum.

A amilina murina foi escolhida para o desenvolvimento deste modelo devido a sua baixa propensão a agregar e facilidade de obtenção (o pramlintide é um biofármaco não comercializado no Brasil e sua importação é dificultada por questões regulatórias). No entanto, embora a utilização de amilina humana em solução salina tenha se mostrado incapaz

de induzir hipoglicemia, o uso desta a partir de um sistema de liberação sustentada contendo nanopartículas poliméricas (GUERREIRO et al., 2012), foi bem sucedido em reduzir os níveis de glicose sanguínea dos animais. Ainda, a ausência de mudanças nos níveis de insulina e glucagon aliados aos dados utilizando animais DMTI-STZ indicam que, no modelo farmacológico proposto, a ação da amilina não depende dos demais hormônios pancreáticos.

Finalmente, nossos achados não contradizem os efeitos hiperglicêmicos relatados anteriormente. Embora, deva-se fazer a ressalva de que os anestésicos utilizados, sabidamente, interferem em parâmetros sanguíneos tais como: pressão arterial, glicemia e concentração de eletrólitos (BITO; EAKINS, 1969; ZUURBIER et al., 2008). Ainda, segundo Ayala (2010):

“Therefore, assessment of glucose metabolism in anesthetized mice yields results that are not physiological. Because there are procedural means to minimize stress other than anesthesia, tests of glucose metabolism should not be performed in anesthetized mice and should instead be performed in conscious mice.”(AYALA et al., 2010)

Diante disto, o modelo aqui apresentado se mostra como o mais adequado para a avaliação da farmacologia da amilina, no que tange aos seus efeitos sobre a glicemia. E a aplicação deste para triagem de novos amilnomiméticos, ou sistemas de liberação para estes, tem se mostrado como uma ferramenta valiosa no desenvolvimento de possíveis novas terapias para o tratamento do DM. Destaca-se ainda, que, ao contrário de insulinas, não há ensaio farmacológico, nem tão pouco farmacopeico, disponível para se avaliar a potencia dos diferentes lotes de pramlintide, sendo esta, uma possível aplicação do modelo farmacológico desenvolvido neste trabalho.

Outras formas de avaliação biológica dos efeitos da amilina estão sendo desenvolvidas no laboratório de biotecnologia farmacêutica. O emprego de culturas de linhagens celulares responsivas, está sendo avaliado pelo grupo em diversos sistemas celulares tais como: RIN, PCCL3, culturas de adipócitos, C2C12, etc. No entanto, a parametrização correta para esses ensaios tem se mostrado um desafio. O emprego desses sistemas é, sem dúvida, uma meta a ser atingida para os próximos trabalhos do grupo, tendo-se sempre em mente os princípios de bioética seguindo a filosofia dos 3Rs. Porém, dada a ampla gama de efeitos propostos para amilina, possivelmente, os ensaios *in vivo* não possam ser completamente abolidos, e por tal motivo, tem-se trabalhado em modelos mais completos de análises e possibilitem a monitorização de diversos parâmetros tais como: hemoglobina glicada, lipidogramas, concentrações de eletrólitos, ingestão de ração, etc.

5.2 – Efeitos farmacológicos dos peptídeos truncados da sequência de amilina humana

A amilina humana diverge da amilina murina por 5 aminoácidos, dentre os quais 3 são prolinas. Esta diferença torna a forma humana propensa a agregar gerando fibras amiloides, e, conseqüentemente, sua utilização como biofármaco limitada. Estratégias para a estabilização desta em meios aquosos tais como: o uso de pequenas moléculas capazes de inibir a agregação (EVERS et al., 2009; MISHRA et al., 2009), emprego de tensoativos (PATIL et al., 2009) e aprisionamento desta em matrizes sólidas para liberação sustentada (GUERREIRO et al., 2012) tem sido empregadas. Outra possível abordagem para esse problema seria o emprego de fragmentos da sequência da amilina humana, o quais, possivelmente, seriam dotados de atividade biológica, mas sem a propensão a agregar da sequência completa do hormônio.

Foram desenhados quatro peptídeos contendo fragmentos da sequência de amilina humana. O peptídeo K₁CNTATCATQ₁₀ representa a região inicial do hormônio, e de acordo com a literatura a subunidade K₁CNTATCA₈ foi relatada com atividade sobre células ósseas, tendo sido demonstrado que animais tratados por 4 semanas com esse peptídeo (93 nMol/Kg/dia) tiveram um aumento de mais de 30% na massa óssea (avaliou-se parâmetros como volume trabecular, índice de mineralização e contagem de osteoblastos). Os ossos desses animais também ficaram mais resistentes a fraturas (CORNISH et al., 2000). Interessantemente, o peptídeo sem a ponte dissulfeto entre Cys2-Cys7 torna este um antagonista, indicando que não apenas a estrutura primária desses compostos é importante para seus efeitos com também suas respectivas conformações (CORNISH et al., 1998).

Infelizmente, em seu estudo Cornish (2000) relatou que o peptídeo K₁CNTATCA₈ não produzia alterações no metabolismo de carboidratos, mas o autor não descreve como esse dado foi obtido. A administração *s.c.* de hAMY1-10 (K₁CNTATCATQ₁₀) utilizando o modelo farmacológico desenvolvido na presente tese mostrou que, em doses elevadas, a porção inicial da amilina produz efeito hiperglicemiante.

Os peptídeos hAMY9-19 (T₉QRLANFLVHS₁₉) e hAMY10-16 (Q₁₀RLANFL₁₆) possuem a parte central da sequência da amilina humana, e o fragmento hAMY28-37 (S₂₈STNVFSNTY₃₇) na região final do hormônio. A essas sequências são atribuídas a propensão a formação de agregados amiloides da amilina humana, conforme apresentado na tabela 6 da Introdução, as porções como 8-20 e 30-37, dentre outras, agregam formando fibras amiloides. A figura 56 mostra fibras amiloides desses peptídeos, no entanto, a obtenção de tais fibras foi condicionada às condições experimentais intensas (como o uso dos peptídeos em elevadas concentrações, 100 µg/ml, e com dias de incubação, por exemplo). Apesar de suas características amiloidogênicas, tais peptídeos merecem um estudo farmacológico tendo em vista que os mesmos são responsáveis pela interação da amilina com diversas biomoléculas, podendo, portanto, apresentarem atividades farmacológicas.

A parte central da amilina têm sido relacionada à capacidade da amilina de interagir com diversos ligantes conforme será melhor detalhado a seguir. Mazor (2002) construiu uma biblioteca de peptídeos contendo fragmentos da sequência da amilina humana e identificou a região C₇ATQRLANFLVRSSN₂₁ como sendo a responsável para a formação de homodímeros de amilina humana, tendo o peptídeo hAMY11-20 apresentado a maior afinidade pela amilina

humana dentre os fragmentos testados (MAZOR et al., 2002).

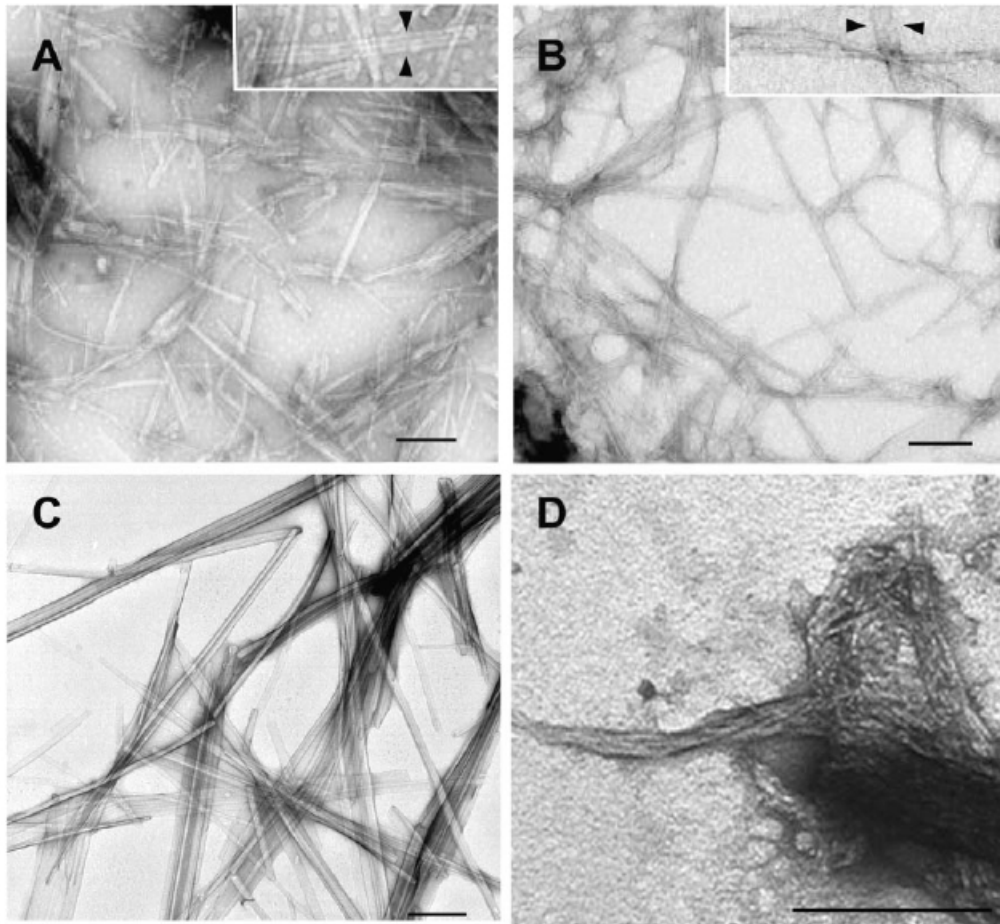


Figura 52 – Fibras amiloides de peptídeos derivados da amilina

MET dos fragmentos amilina. (A) fibras formadas pelo resíduo hAMY8-20.(B) fibras comparáveis foram observadas também com o peptídeo mAMY8-20 (sequência da amilina murina). (c) Fibras do fragmento hAMY18-29.(D) Fibras do domínio C-terminal, hAMY30-37. Barras de escala representam 200 nm (JAIKARAN et al., 2001).

A formação de homodímeros de amilina a partir de sua parte central é sugerida por alguns autores como sendo a chave para o mecanismo de agregação deste peptídeo, todavia, essa região é responsável pela interação com insulina formando heterodímeros (GILEAD; WOLFENSON; GAZIT, 2006; WILTZIUS et al., 2009). Além dessa interação, esta região da amilina também é responsável pelo seu reconhecimento pela IDE (Insulin-degrading enzyme),

uma metaloprotease responsável pela clivagem de amilina, insulina e peptídeo beta amiloide (SHEN et al., 2006). Dada sua importância bioquímica, as partes centrais da amilina humana foram avaliadas afim de se verificar suas ações sobre a glicemia *in vivo*. Como resultado observou-se, que o peptídeo hAMY10-16 apresentou efeito hiperglicemiante, enquanto o peptídeo hAMY9-19 não alterou os níveis glicêmicos nos animais tratados. Uma possível hipótese para este dado conflitante seja a de que o peptídeo hAMY9-19 tenha agregado ao ser injetado nos camundongos, e, assim como a amilina humana, não tenha sido capaz de gerar efeitos nas condições experimentais testadas. Esta hipótese está de acordo com os dados de agregação encontrados neste trabalho, nos quais demonstrou-se que tanto os peptídeos hAMY9-19 quanto o hAMY28-37 formavam fibras amiloides quando dissolvidos em salina. Todavia, a formação de tais fibras pelo hAMY28-37 levou semanas enquanto que a precipitação do hAMY9-19 foi instantânea, o que justificaria a ausência de atividade apenas deste peptídeo. Por fim, foi visto que a amidação no C-terminal a amilina é importante para seu efeito da amilina sobre o glicogênio hepático (ROBERTS et al., 1989), indicando que esta parte da amilina (hAMY28-37) poderia possuir um potencial efeito sobre a glicemia, mas, novamente, observou-se uma ação oposta a do peptídeo completo.

Alguns antagonistas para amilina são conhecidos, e, estes em sua maioria apresentam homologia com a sequência da amilina. O que condiz com o fato destes serem capazes de ocuparem os receptores de amilina sem provocarem efeito e impedirem a ligação da amilina. Dentre tais antagonistas destacam-se:

- CGRP(8-37) e amilina(8-37) → os quais contêm as sequências destes peptídeos sem os 8 primeiros aminoácidos (HETTIARACHCHI et al., 1997; WANG et al., 1991);

presente em alguns dos antagonista. Estas informações são um forte indício de que os peptídeos hAMY10-16 e hAMY28-37 provocam hiperglicemia via um mecanismos de antagonismos da amilina endógena presente nos animais analisados. No entanto, a hipótese destes serem agonistas de efeito inverso não pode ser refutada com base nos dados aqui apresentados. E, para esse fim, outros ensaios estão sendo planejados pelo grupo do laboratório de biotecnologia farmacêutica FF-UFRJ para um melhor entendimento dos efeitos destes.

Finalmente, estes dados sugerem que o efeito hipoglicemiante da amilina necessita de múltiplos domínios desse peptídeo para ocorrerem. E, portanto, a continuidade pela busca de novos biofármacos amilinomiméticos se deu através da bioconjugação de amilina murina com polietilenoglicol.

5.3 – Peguilação de Amilina Murina

O Diabetes Mellitus é uma doença multifatorial que vem assolando a humanidade desde o seu nascimento. Os dois últimos séculos propiciaram o surgimento de novas tecnologias, as quais possibilitaram uma melhor sobrevida daqueles acometidos por tal doença. Todavia, apesar de diversificada, a terapêutica do tratamento do DM ainda carece de medicamentos capazes de repor, mesmo que parcialmente, todos os parâmetros fisiológicos afetados no decorrer do quadro clínico dessa enfermidade.

A amilina é um hormônio peptídico produzido pelas células beta do pâncreas e co-secretado com insulina em resposta a variações na glicemia. Existe um número considerável de estudos relatando os mais diversos efeitos fisio/farmacológicos para a amilina, todavia, sua principal função parece estar relacionada com a homeostase do metabolismo de carboidratos. Ainda, a amilina tem sido relacionada a patogênese de DMTII e sua reposição é aconselhada em muitos casos de DM. O uso de análogos de amilina, ou simplesmente amilinomiméticos, tem se mostrado vantajoso (KOVATCHEV; CREAN; MCCALL, 2008). Todavia, o único medicamento disponível comercialmente, Symlin® contendo pramlintide® como princípio ativo, tem de ser administrado por via subcutânea a cada refeição realizada pelo paciente devido a uma farmacocinética na qual a fármaco apresenta tempo de meia-vida de pouco mais de 10 minutos. Assim, a necessidade de múltiplas aplicações de insulina e pramlintide impactam negativamente na qualidade de vida dos pacientes que fazem uso destes.

Nosso grupo de pesquisas tem procurado estender o efeito da amilina. Inicialmente a

amilina humana foi formulada em um sistema de liberação sustentada (Guerreiro, et. al. 2012) e constatou-se que tal sistema promovia o aumento da duração dos efeitos da amilina. Outra estratégia para prolongar o tempo de meia-vida de biofármacos como a amilina consiste na ligação de polietilenoglicóis a estes.

A amilina murina foi ligada à moléculas de polietilenoglicol com peso molecular de ~5 KDa, em reações com rendimento satisfatório e facilmente purificadas com apenas uma etapa, empregando-se cromatografia de fase-reversa. A cinética das reações foi acompanhada por geis de acrilamida e quantificações usando fluorescamina, sendo constatado que era possível a realização destas tanto em PBS quanto em solvente orgânico, o que abre a possibilidade de se derivatizar proteínas hidrofóbicas como a amilina humana e demais proteínas amiloidogênicas. Foi possível a obtenção de formas mono e dipeguiladas de amilina murina e estas apresentaram atividade farmacológica, indicando que a ligação destes PEGs ao *N*-terminal da amilina não interfere em sua capacidade de ligação à RAMP e na sua principal atividade biológica (modulação da glicemia). Essa abordagem abre um novo campo de pesquisas, possibilitando a otimização de fármacos como o pramlintide, ou mesmo, a utilização terapêutica a forma nativa da amilina humana.

Dentre as perspectivas para esta linha de pesquisas estão: a caracterização estrutural das formas peguiladas da amilina murina por RMN, a avaliação do uso crônico desses compostos em modelos animais de DM, a busca por melhores agentes de conjugação (como PEGs de mais elevado peso molecular ou PEGs ramificados que possam estender ainda mais a ação do hormônio), a caracterização da farmacocinética das amilinas peguiladas, a

estabilização da forma nativa de amilina humana através da peguilação desta, o estudo de estabilidade das formas peguiladas de amilinas e o aperfeiçoamento de formas farmacêuticas para diferentes vias de administração. Neste sentido, é importante destacar que, muitos destas indagações já estão sendo pesquisadas por outros membros do laboratório de biotecnologia farmacêutica da FF-UFRJ, tendo já sido realizadas análises preliminares de RNM da amilina murina monopeguilada e a produção e purificação de amilina humana peguilada também já fazem parte do *Know how* de conhecimentos do grupo. Ainda, o perfil farmacocinético das formas peguiladas de amilina murina está sendo avaliado através da marcação desta com ¹²⁵I e, futuramente, pelo emprego de técnicas de imunoenaios como *western-blot*.

6 – Conclusão

Este trabalho foi racionalizado em três etapas. Na primeira, buscou-se um modelo farmacológico para a avaliação da amilina sobre a glicemia, e, como resultado, o protocolo experimental proposto se mostrou adequado à proposta de trabalho do grupo. Tal modelo, além de simples e reprodutível, é capaz de discernir entre amilina murina, amilina humana agregada, peptídeos truncados da amilina humana e formas peguiladas de amilina murina. Sendo a distinção por intensidade e duração dos efeitos sobre a glicemia de camundongos em jejum de 4h. A simplificação molecular da amilina por meio da utilização de fragmentos da sequência desta compreendeu a segunda etapa de estudos realizados durante esta tese. Os dados *in vivo*, em associação com as informações da literatura, indicaram que a amilina necessita de toda a sua sequência de aminoácidos para desempenhar seus efeitos sobre o metabolismo de carboidratos e, portanto, os fragmentos da sequência de amilina humana não são candidatos em potencial para biofármacos amilinomiméticos. Por fim, a terceira parte desta tese foi constituída pela derivatização com formas reativas de polietilenoglicóis da amilina murina. Foi possível a realização destas derivatizações tanto em meio aquoso quanto em solvente orgânico, sendo possível a obtenção de rendimentos de aproximadamente 40% para as formas monopeguiladas de amilina e 30 % para as dipeguiladas. Esta abordagem possibilitou a manutenção da capacidade ligação à RAMP (um de seus receptores fisiológicos) e de reduzir a glicemia com o aumento na duração deste efeito nos produtos peguilados.

7 – Referências

ABRAHAM ABUCHOWSKI 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. 3576–3581, 1977.

ABUCHOWSKI et al. Cancer therapy with chemically modified enzymes. I. Antitumor properties of polyethylene glycol-asparaginase conjugates. **Cancer biochemistry biophysics**, v. 7, n. 2, p. 175–186, jun. 1984.

ABUCHOWSKI, A. et al. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 11, p. 3582–3586, 1977.

ABUCHOWSKI, A. et al. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 11, p. 3578–3581, 6 out. 1977.

ALAJUUMA, P.; OKSALA, O.; UUSITALO, H. Amylin Competes for Binding Sites of CGRP in the Chamber Angle and Uvea of Monkey, Cat, and Pig Eye. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, n. 6, p. 555–567, dez. 2003.

ALAM, A. S. et al. Amylin inhibits bone resorption by a direct effect on the motility of rat osteoclasts. **Experimental physiology**, v. 78, n. 2, p. 183–196, mar. 1993.

ALI, HAMID et al. Diabetes Mellitus from Antiquity to Present Scenario and Contribution of Greco-Arab Physicians. p. 46,50, 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 32, n. Supplement_1, p. S62–S67, 1 jan. 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes--2009. **Diabetes Care**, v. 32, n. Supplement_1, p. S13–S61, 1 jan. 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, p. S67–S74, 2013.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2012. **Diabetes Care**, v. 36, n. 4, p. 1033–1046, 6 mar. 2013.

ARONNE, L. et al. Progressive Reduction in Body Weight after Treatment with the Amylin Analog Pramlintide in Obese Subjects: A Phase 2, Randomized, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 8, p. 2977–2983, 1 ago. 2007.

ASHIHARA, Y. et al. Modification of E. coli L-asparaginase with polyethylene glycol: Disappearance of binding ability to anti-asparaginase serum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 83, n. 2, p. 385–391, 28 jul. 1978.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Porto Alegre: ArtMed, 2006.

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, 9 jan. 2010.

AZRIEL, R. Analysis of the Minimal Amyloid-forming Fragment of the Islet Amyloid Polypeptide. AN EXPERIMENTAL SUPPORT FOR THE KEY ROLE OF THE PHENYLALANINE RESIDUE IN AMYLOID FORMATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 34156–34161, 9 jul. 2001.

- BAHIA, L. R. et al. The Costs of Type 2 Diabetes Mellitus Outpatient Care in the Brazilian Public Health System. **Value in Health**, v. 14, n. 5, p. S137–S140, jul. 2011.
- BANKS, P. R.; PAQUETTE, D. M. Comparison of Three Common Amine Reactive Fluorescent Probes Used for Conjugation to Biomolecules by Capillary Zone Electrophoresis. **Bioconjugate Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 447–458, 1 jul. 1995.
- BEAUCHAMP, C. O. et al. A new procedure for the synthesis of polyethylene glycol-protein adducts; Effects on function, receptor recognition, and clearance of superoxide dismutase, lactoferrin, and α 2-macroglobulin. **Analytical Biochemistry**, v. 131, n. 1, p. 25–33, maio 1983.
- BELL, D. et al. Hypertrophic effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and amylin on adult mammalian ventricular cardiomyocytes. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 27, n. 11, p. 2433–2443, nov. 1995.
- BENTLEY; HARRIS. **Poly(ethylene glycol) aldehyde hydrates and related polymers and applications in modifying amines**, 1999.
- BERNEY, T. et al. Transplantation of islets of Langerhans: new developments. **Swiss medical weekly**, v. 131, n. 47-48, p. 671–680, 22 dez. 2001.
- BHOGAL, R. et al. The effects of IAPP and CGRP on guinea pig tracheal smooth muscle in vitro. **Peptides**, v. 15, n. 7, p. 1243–1247, 1994.
- BITO, L. Z.; EAKINS, K. E. The Effect of General Anesthesia on the Chemical Composition of Blood Plasma of Normal Rabbits. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 169, n. 2, p. 277–286, 10 jan. 1969.
- BLAKELY, P.; VAUGHN, D. A.; FANESTIL, D. D. Amylin, calcitonin gene-related peptide, and adrenomedullin: effects on thiazide receptor and calcium. **The American journal of physiology**, v. 272, n. 3 Pt 2, p. F410–415, mar. 1997.
- BRAIN, S. D. et al. The demonstration of vasodilator activity of pancreatic amylin amide in the rabbit. **The American Journal of Pathology**, v. 136, n. 3, p. 487–490, mar. 1990.
- BRUNETTI, L. et al. Effects of ghrelin and amylin on dopamine, norepinephrine and serotonin release in the hypothalamus. **European Journal of Pharmacology**, v. 454, n. 2–3, p. 189–192, 15 nov. 2002.
- CALCETI, P. et al. Development and in vivo evaluation of an oral insulin–PEG delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 4, p. 315–323, jul. 2004.
- CARRASCO, M. et al. Historia de la terapéutica antidiabética: del papiro de Ebers al Ukpds; History of the therapeutic antidiabetic: of the Ebers papyrus to the Ukpds, Diabetes 2001; Diabetes 2001. p. 345–380, 2001.
- CARTER, M. C.; MEYERHOFF, M. E. Instability of succinyl ester linkages in O²'-monosuccinyl cyclic AMP-protein conjugates at neutral pH. **Journal of immunological methods**, v. 81, n. 2, p. 245–257, 2 ago. 1985.
- CHANCE, W. T. et al. Anorexia following the intrahypothalamic administration of amylin. **Brain Research**, v. 539, n. 2, p. 352–354, 25 jan. 1991.
- CHANCE, W. T. et al. Amylin increases transport of tyrosine and tryptophan into the brain. **Brain Research**, v. 593, n. 1, p. 20–24, 9 out. 1992.

- CHENG, T.-L. et al. Accelerated Clearance of Polyethylene Glycol-Modified Proteins by Anti-Polyethylene Glycol IgM. **Bioconjugate Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 520–528, 1 maio 1999.
- CLARK, A. et al. ISLET AMYLOID FORMED FROM DIABETES-ASSOCIATED PEPTIDE MAY BE PATHOGENIC IN TYPE-2 DIABETES. **The Lancet**, v. 330, n. 8553, p. 231–234, 1 ago. 1987.
- CLEMENTI, G. et al. Anti-inflammatory activity of amylin and CGRP in different experimental models of inflammation. **Life sciences**, v. 57, n. 14, p. PL193–197, 1995.
- COOPER, D. K. C.; CASU, A. Chapter 4: Pre-clinical efficacy and complication data required to justify a clinical trial. **Xenotransplantation**, v. 16, n. 4, p. 229–238, 2009.
- 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**, v. 84, n. 23, p. 8628, 1987.
- 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**, v. 84, n. 23, p. 8628–8632, 1987.
- COOPER, G. J. et al. Amylin found in amyloid deposits in human type 2 diabetes mellitus may be a hormone that regulates glycogen metabolism in skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 20, p. 7763–7766, 10 jan. 1988.
- COPPOCK, H. et al. Rat-2 fibroblasts express specific adrenomedullin receptors, but not calcitonin-gene-related-peptide receptors, which mediate increased intracellular cAMP and inhibit mitogen-activated protein kinase activity. **Biochem. J**, v. 338, p. 15–22, 1999.
- CORNISH, J. et al. Dissociation of the effects of amylin on osteoblast proliferation and bone resorption. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 274, n. 5, p. E827–E833, 1998.
- CORNISH, J. et al. Systemic administration of a novel octapeptide, amylin-(1–8), increases bone volume in male mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 279, n. 4, p. E730–E735, 2000.
- DACQUIN, R. et al. Amylin inhibits bone resorption while the calcitonin receptor controls bone formation in vivo. **The Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 4, p. 509–514, 16 fev. 2004.
- DANAEI, G. et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. p. 31–40, jul. 2011.
- DATTA, H. K. et al. In vivo and in vitro effects of amylin and amylin-amide on calcium metabolism in the rat and rabbit. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 162, n. 2, p. 876–881, 31 jul. 1989.
- DÉGANO, P. et al. Amylin inhibits glucose-induced insulin secretion in a dose-dependent manner. Study in the perfused rat pancreas. **Regulatory peptides**, v. 43, n. 1, p. 91–96, 1993.
- DEWITT, B. J. et al. Comparison of responses to adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide in the pulmonary vascular bed of the cat. **European journal of pharmacology**, v. 257, n. 3, p. 303–306, 23 maio 1994.
- DOLENCE, E. K. et al. **Electrophilic polyethylene oxides for the modification of polysaccharides, polypeptides (proteins) and surfaces**, 1994.
- DUPRAS, T. L. et al. Pathological skeletal remains from ancient Egypt: the earliest case of diabetes mellitus?

Practical Diabetes International, v. 27, n. 8, p. 358–363a, 2010.

EDELMAN, S. V. Amylin Replacement Therapy in Patients With Type 1 Diabetes. **The Diabetes Educator**, v. 32, n. Supplement 3, p. 119S–127S, 1 maio 2006.

EDELMAN, S. V. Does addition of pramlintide to basal insulin improve glycemic control in type 2 diabetes mellitus? **Nature Reviews Endocrinology**, v. 4, n. 4, p. 194–195, abr. 2008.

EDWARDS, C. PEGylated recombinant human soluble tumour necrosis factor receptor type I (r-Hu-sTNF-RI): novel high affinity TNF receptor designed for chronic inflammatory diseases. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 58, n. Suppl 1, p. I73–I81, nov. 1999.

EVERS, F. et al. Elucidating the Mechanism of Lipid Membrane-Induced IAPP Fibrillogenesis and Its Inhibition by the Red Wine Compound Resveratrol: A Synchrotron X-ray Reflectivity Study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 27, p. 9516–9521, 15 jul. 2009.

FEE, C. J. Protein conjugates purification and characterization. In: VERONESE, F. M. (Ed.). **PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications**. Milestones in Drug Therapy. [s.l.] Birkhäuser Basel, 2009. p. 113–125.

FLOOD, J. F.; MORLEY, J. E. Differential effects of amylin on memory processing using peripheral and central routes of administration. **Peptides**, v. 13, n. 3, p. 577–580, maio 1992.

FONTANA, A. et al. Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 1, p. 13–28, jan. 2008.

FUNAKOSHI, A. et al. Stimulatory effects of islet amyloid polypeptide (amylin) on exocrine pancreas and gastrin release in conscious rats. **Regulatory peptides**, v. 38, n. 2, p. 135–143, 19 mar. 1992.

GAD, S. **Handbook Of Pharmaceutical Biotechnology**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

GAIS, H.-J.; RUPPERT, S. Modification and immobilization of proteins with polyethylene glycol tresylates and polysaccharide tresylates: Evidence suggesting a revision of the coupling mechanism and the structure of the polymer-polymer linkage. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 22, p. 3837–3838, 29 maio 1995.

GEDULIN, B. R.; RINK, T. J.; YOUNG, A. A. Dose-response for glucagonostatic effect of amylin in rats. **Metabolism**, v. 46, n. 1, p. 67–70, 1997.

GEMMILL, C. L. The Greek concept of diabetes. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 48, n. 8, p. 1033, 1972.

GILEAD, S.; WOLFENSON, H.; GAZIT, E. Molecular Mapping of the Recognition Interface between the Islet Amyloid Polypeptide and Insulin. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 39, p. 6476–6480, 6 out. 2006.

GLENNER, G. G.; DAVID EANES, E.; WILEY, C. A. Amyloid fibrils formed from a segment of the pancreatic islet amyloid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 155, n. 2, p. 608–614, 15 set. 1988.

GOODMAN, (PRIMEIRO); GILMAN. Insulina, agentes hipoglicemiantes orais e farmacologia do pâncreas endócrino. In: **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11^a. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Internacional do Brasil, 2006. p. 1459–1488.

GRUESSNER, A. C.; SUTHERLAND, D. E. R.; GRUESSNER, R. W. G. Pancreas transplantation in the United States: a review. **Current opinion in organ transplantation**, v. 15, n. 1, p. 93–101, fev. 2010.

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.

GUIDOBONO, F. et al. Amylin given by central and peripheral routes inhibits acid gastric secretion. **Peptides**, v. 15, n. 4, p. 699–702, 1994.

GUIDOBONO, F. et al. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, n. 4, p. 581–586, fev. 1997.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. **Pharmacokinetic Consequences of Pegylation**. research-article. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/10717540600814402>>. Acesso em: 7 ago. 2013.

HANDELSMAN, Y. et al. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan. **Endocrine Practice**, v. 17, p. 1–53, 2011.

HARRIS, J. M.; KOZLOWSKI, A. **Poly(ethylene glycol) and related polymers monosubstituted with propionic or butanoic acids and functional derivatives thereof for biotechnical applications**, 1997.

HARRIS, P. J. et al. Amylin stimulates proximal tubular sodium transport and cell proliferation in the rat kidney. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 272, n. 1, p. F13–F21, 1 jan. 1997.

HAYDEN, M. R.; TYAGI, S. C. A" is for amylin and amyloid in type 2 diabetes mellitus. **Jop**, v. 2, n. 4, p. 124–139, 2001.

HAY, D. L. et al. Pharmacological Discrimination of Calcitonin Receptor: Receptor Activity-Modifying Protein Complexes. **Molecular Pharmacology**, v. 67, n. 5, p. 1655–1665, 5 jan. 2005.

HAYNES, J. M.; HODGSON, W. C.; COOPER, M. E. Rat amylin mediates a pressor response in the anaesthetised rat: implications for the association between hypertension and diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 40, n. 3, p. 256–261, 1997.

HETTIARACHCHI, M. et al. Rat amylin-(8-37) enhances insulin action and alters lipid metabolism in normal and insulin-resistant rats. **The American journal of physiology**, v. 273, n. 5 Pt 1, p. E859–867, nov. 1997.

HOLLANDER, P. et al. Effect of pramlintide on weight in overweight and obese insulin-treated type 2 diabetes patients. **Obesity research**, v. 12, n. 4, p. 661–668, abr. 2004.

IWAMOTO, Y. et al. Effect of islet amyloid polypeptide (IAPP/amylin) on 2-deoxyglucose uptake in mouse pancreatic acini. **Diabetes research and clinical practice**, v. 15, n. 1, p. 71–75, 1992.

JAIKARAN, E. T. A. . et al. Identification of a novel human islet amyloid polypeptide β -sheet domain and factors influencing fibrillogenesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, n. 3, p. 515–525, 4 maio 2001.

JEFFREY, G. A.; JEFFREY, G. A. **An introduction to hydrogen bonding**. [s.l.] Oxford University Press New York, 1997. v. 12

KINSTLER, O. B. et al. Characterization and Stability of N-terminally PEGylated rhG-CSF. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 7, p. 996–1002, 1 jul. 1996.

KLEPPINGER, E. L.; VIVIAN, E. M. Pramlintide for the Treatment of Diabetes Mellitus. **The Annals of**

Pharmacotherapy, v. 37, n. 7, p. 1082–1089, jul. 2003.

KOLTERMAN, O. G. et al. Reduction of postprandial hyperglycemia in subjects with IDDM by intravenous infusion of AC137, a human amylin analogue. **Diabetes Care**, v. 18, n. 8, p. 1179–1182, 1995.

KOVATCHEV, B. P.; CREAN, J.; MCCALL, A. Pramlintide Reduces the Risks Associated with Glucose Variability in Type 1 Diabetes. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 10, n. 5, p. 391–396, out. 2008.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Boston, MA: Springer US, 1999.

LEIGHTON, B.; COOPER, G. J. S. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. **Nature**, v. 335, n. 6191, p. 632–635, 13 out. 1988.

LI, Y. P. et al. Effects of PEGylation on the Lowry method for the content determination of trichosanthin. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 38, p. 2724–2728, 2012.

LORENZO, A. et al. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. **Nature**, v. 368, n. 6473, p. 756–760, 21 abr. 1994.

LUSH, C. W. et al. Pramlintide as an Adjunct to Basal Insulin: Effects on Glycemic Control and Weight in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **Insulin**, v. 2, n. 4, p. 166–172, 2007.

MAY, P. C.; BOGGS, L. N.; FUSON, K. S. Neurotoxicity of human amylin in rat primary hippocampal cultures: similarity to Alzheimer's disease amyloid-beta neurotoxicity. **Journal of neurochemistry**, v. 61, n. 6, p. 2330–2333, dez. 1993.

MAZOR, Y. et al. Identification and Characterization of a Novel Molecular-recognition and Self-assembly Domain within the Islet Amyloid Polypeptide. **Journal of Molecular Biology**, v. 322, n. 5, p. 1013–1024, out. 2002.

MILES, P. D. et al. Islet amyloid polypeptide (amylin) increases the renal excretion of calcium in the conscious dog. **Calcified tissue international**, v. 55, n. 4, p. 269–273, out. 1994.

MILLER, B. T. et al. Identification and Characterization of O-Biotinylated Hydroxy Amino Acid Residues in Peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 219, n. 2, p. 240–248, jun. 1994.

MILLER, B. T.; KUROSKY, A. Elevated Intrinsic Reactivity of Seryl Hydroxyl Groups within the Linear Peptide Triads His-Xaa-Ser or Ser-Xaa-His. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 196, n. 1, p. 461–467, 15 out. 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, BRASIL. **Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico**. da Saúde: G. Estatística e Informação em Saúde. Brasília, Brasil: Ministério da Saúde, 2011.

MIRON, T.; WILCHEK, M. A simplified method for the preparation of succinimidyl carbonate polyethylene glycol for coupling to proteins. **Bioconjugate Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 568–569, 1 nov. 1993.

MISHRA, R. et al. Inhibiting Islet Amyloid Polypeptide Fibril Formation by the Red Wine Compound Resveratrol. **ChemBioChem**, v. 10, n. 3, p. 445–449, 13 fev. 2009.

M, K. K.; GREG, R. A history of diabetes: from antiquity to discovering insulin. p. 1091–1095, 2003.

MOLINA, J. M. et al. Induction of insulin resistance in vivo by amylin and calcitonin gene-related peptide.

Diabetes, v. 39, n. 2, p. 260–265, fev. 1990.

MORLEY, J. E.; FLOOD, J. F. Amylin decreases food intake in mice. **Peptides**, v. 12, n. 4, p. 865–869, 1991.

MOTTA, V. **Bioquímica Clínica para o Laboratório - Princípios e Interpretações**. 5ª. ed. Rio de Janeiro: MEDBOOK - Editora Científica Ltda., 2009.

NETTI, C. et al. Inhibitory effect of amylin on growth hormone responsiveness to growth-hormone-releasing hormone in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 62, n. 3, p. 313–318, set. 1995.

NILSSON, M. R.; RALEIGH, D. P. Analysis of amylin cleavage products provides new insights into the amyloidogenic region of human amylin1. **Journal of molecular biology**, v. 294, n. 5, p. 1375–1385, 1999.

NUTTALL, A.; BRYAN, G. L.; MOYSES, C. Administration of human amylin increases plasma renin activity and plasma aldosterone in man. **American Journal of Hypertension**, v. 8, n. 4, p. 108A, 1995.

OGAWA, A. et al. Amylin secretion from the rat pancreas and its selective loss after streptozotocin treatment. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 3, p. 973, 1990.

OPIE, E. L. THE RELATION OF DIABETES MELLITUS TO LESIONS OF THE PANCREAS. HYALINE DEGENERATION OF THE ISLANDS OF LANGERHANS. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 5, n. 5, p. 527–540, 25 mar. 1901.

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.

PAPAS, K. K.; SUSZYNSKI, T. M.; COLTON, C. K. Islet Assessment for Transplantation. **Current opinion in organ transplantation**, v. 14, n. 6, p. 674–682, dez. 2009.

PARMAR, H. C. **Biopharmaceuticals market overview**. ArticleStandard. Disponível em: <<http://www.pharmtech.com/pharmtech/spotlight/article/detail/310779>>. Acesso em: 23 jul. 2013.

PATIL, S. M. et al. Dynamic α -Helix Structure of Micelle-bound Human Amylin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 11982–11991, 5 jan. 2009.

PAVLOU, A. K.; REICHERT, J. M. Recombinant protein therapeutics—success rates, market trends and values to 2010. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1513–1519, dez. 2004.

PIAO, F. L. et al. Amylin-induced suppression of ANP secretion through receptors for CGRP1 and salmon calcitonin. **Regulatory Peptides**, v. 117, n. 3, p. 159–166, 15 mar. 2004.

PIRES, A. C.; CHACRA, A. R. Insulin therapy for type 1 diabetes mellitus: past and present. p. 268–278, mar. 2008.

REIDELBERGER, R. D.; KELSEY, L.; HEIMANN, D. Effects of amylin-related peptides on food intake, meal patterns, and gastric emptying in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 5, p. R1395–R1404, 2002.

RIDDLE, M. et al. Pramlintide improved glycemic control and reduced weight in patients with type 2 diabetes using basal insulin. **Diabetes Care**, v. 30, n. 11, p. 2794–2799, 2007.

ROBERTS, A. N. et al. Molecular and functional characterization of amylin, a peptide associated with type 2 diabetes mellitus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86,

n. 24, p. 9662–9666, dez. 1989.

ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, set. 2012.

ROGLIC, G. et al. The Burden of Mortality Attributable to Diabetes Realistic estimates for the year 2000. **Diabetes care**, v. 28, n. 9, p. 2130–2135, 2005.

SANDERS, L. J. From Thebes to Toronto and the 21st century: an incredible journey. **Diabetes Spectrum**, v. 15, n. 1, p. 56–60, 2002.

SHELLEKENS, H.; HENNINK, W. E.; BRINKS, V. The Immunogenicity of Polyethylene Glycol: Facts and Fiction. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 7, p. 1729–1734, 1 jul. 2013.

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, jul. 2012.

SHECHTER, Y. et al. Reversible pegylation of insulin facilitates its prolonged action in vivo. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 1, p. 19–28, set. 2008.

SHEN, Y. et al. Structures of human insulin-degrading enzyme reveal a new substrate recognition mechanism. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 870–874, 11 out. 2006.

SILVA, D. D. et al. Metformin reverses hexokinase and 6-phosphofructo-1-kinase inhibition in skeletal muscle, liver and adipose tissues from streptozotocin-induced diabetic mouse. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 496, n. 1, p. 53–60, abr. 2010.

SINGH-FRANCO, D.; ROBLES, G.; GAZZE, D. Pramlintide acetate injection for the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Clinical therapeutics**, v. 29, n. 4, p. 535–562, 2007.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 8ª. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. v. I

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, 2008.

TENIDIS, K. et al. Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties. **Journal of Molecular Biology**, v. 295, n. 4, p. 1055–1071, 28 jan. 2000.

THOMPSON, R. G. et al. Pramlintide: a human amylin analogue reduced postprandial plasma glucose, insulin, and C-peptide concentrations in patients with type 2 diabetes. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 14, n. 7, p. 547–555, jul. 1997.

TIWARI, K. et al. Comparison of polyacrylamide GEL staining procedures for detection of PEGylated granulocyte colony stimulating factor and its positional isoforms. **INTERNATIONALE PHARMACEUTICA S CIENCIA**, v. V1, Issue 4, 2011.

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

USAN council. List No.392. New names. Amlintide. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 61, n. 4, p. 500, abr. 1997.

- VERONESE, F. M. et al. Surface modification of proteins. Activation of monomethoxy-polyethylene glycols by phenylchloroformates and modification of ribonuclease and superoxide dismutase. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 141–152, abr. 1985.
- VERONESE, F. M. Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. **Biomaterials**, v. 22, n. 5, p. 405–417, 1 mar. 2001.
- VERONESE, F. M.; PASUT, G. PEGylation, successful approach to drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 21, p. 1451–1458, 1 nov. 2005.
- VINE, W. et al. Effects of Rat Amylin on Renal Function in the Rat. **Hormone and Metabolic Research**, v. 30, n. 08, p. 518–522, 1998.
- WAGNER, U. et al. Amylin immunoreactivity in the rat trachea and characterization of the interaction of amylin and somatostatin on airway mucus secretion. **Research in experimental medicine. Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie**, v. 195, n. 5, p. 289–296, 1995.
- WALKER, J. M. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: **The protein protocols handbook**. [s.l.] Springer, 1996. p. 55–61.
- WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 917–924, set. 2010.
- WANG, M. W. et al. Induction of acute hyperglycemia, hyperlactemia and hypocalcemia in fed and fasted BALB/c mice by intravenous amylin injection. **Endocrine research**, v. 18, n. 4, p. 321–332, 1992.
- WANG, M.-W. et al. 8–37h-CGRP antagonizes actions of amylin on carbohydrate metabolism in vitro and in vivo. **FEBS Letters**, v. 291, n. 2, p. 195–198, 21 out. 1991.
- WERLE, M.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. **Amino Acids**, v. 30, n. 4, p. 351–367, 20 abr. 2006.
- WESTERMARK, P. et al. A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 140, n. 3, p. 827–831, 14 nov. 1986.
- WESTERMARK, P. et al. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 11, p. 3881–3885, 1987.
- WESTERMARK, P. et al. Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 13, p. 5036–5040, jul. 1990.
- 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, 2002.
- WILD, S. et al. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2000 and 2030. **Diabetes care**, v. 27, p. 4–14, 2004.
- WILTZIUS, J. J. W. et al. Atomic structures of IAPP (amylin) fusions suggest a mechanism for fibrillation and the role of insulin in the process. **Protein Science**, v. 18, n. 7, p. 1521–1530, jul. 2009.
- WOJDYR, M. Fityk : a general-purpose peak fitting program. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 5,

p. 1126–1128, 10 set. 2010.

WOOKEY, P. J. et al. Amylin as a growth factor during fetal and postnatal development of the rat kidney. **Kidney International**, v. 53, n. 1, p. 25–30, jan. 1998.

WORKING PETER K. et al. Safety of Poly(ethylene glycol) and Poly(ethylene glycol) Derivatives. In: **Poly(ethylene glycol)**. ACS Symposium Series. [s.l.] American Chemical Society, 1997. v. 680p. 45–57.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia**. [s.l.] World Health Organization, 2008.

WU, K. K.; HUAN, Y. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. In: ENNA, S. J. et al. (Eds.). **Current Protocols in Pharmacology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008.

XIA, H. et al. Penetratin-functionalized PEG-PLA nanoparticles for brain drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 2012.

YOUNG, A. **Amylin: Physiology And Pharmacology**. [s.l.] Gulf Professional Publishing, 2005.

YOUNG, A. A. et al. Daily amylin replacement reverses hepatic glycogen depletion in insulin-treated streptozotocin diabetic rats. **FEBS letters**, v. 287, n. 1, p. 203–205, 1991.

YOUNG, A. A. et al. Daily amylin replacement reverses hepatic glycogen depletion in insulin-treated streptozotocin diabetic rats. **FEBS letters**, v. 287, n. 1, p. 203–205, 1991.

YOUNG, A. A. et al. Gastric emptying is accelerated in diabetic BB rats and is slowed by subcutaneous injections of amylin. **Diabetologia**, v. 38, n. 6, p. 642–648, jun. 1995.

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, 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, 7 out. 1991.

ZAKI, M. Amylin, released from the gastric fundus, stimulates somatostatin and thus inhibits histamine and acid secretion in mice. **Gastroenterology**, v. 123, n. 1, p. 247–255, jul. 2002.

ZALIPSKY, S. Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 16, n. 2–3, p. 157–182, set. 1995.

ZALIPSKY, S.; SELTZER, R.; MENON-RUDOLPH, S. Evaluation of a new reagent for covalent attachment of polyethylene glycol to proteins. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 100–114, 1992.

ZUURBIER, C. J. et al. Anesthesia's Effects on Plasma Glucose and Insulin and Cardiac Hexokinase at Similar Hemodynamics and Without Major Surgical Stress in Fed Rats. **Anesthesia & Analgesia**, v. 106, n. 1, p. 135–142, 1 jan. 2008.