

Avanço no estudo de peptídios

Trabalho de grupo brasileiro é reconhecido internacionalmente

Três pesquisadores brasileiros ganharam destaque mundial num setor estratégico da bioquímica de hoje: desenvolveram técnicas para analisar com mais eficiência a estrutura molecular de proteínas e peptídios (compostos de aminoácidos formados sinteticamente ou por hidrólise de proteínas). Suas descobertas, iniciadas na década de 80, foram relatadas na edição de 29 de maio último da prestigiada revista *Chemical & Engineering News* (páginas 54-59), da American Chemical Society.

O trabalho de Clóvis Nakaie, chefe do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), Shirley Schreier, do Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo (USP), e Antônio Cechelli de Mattos Paiva, professor de Biofísica da Unifesp, facilita o estudo da conformação molecular de proteínas e peptídios, bem como da interação desses compostos entre si e com membranas celulares. Os resultados têm muitas aplicações, entre elas a possível criação de drogas terapêuticas.

O objetivo era aperfeiçoar o método que usa marcadores de *spin* (direção do eixo de rotação do elétron). Inseridos numa molécula, esses marcadores (*spin labels*) permi-

tem obter dados sobre a conformação dela e suas interações, por meio da técnica de espectroscopia por ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

É um estudo difícil, demorado e caro, sobretudo pela complexidade dos peptídios, que são formados por uma cadeia de aminoácidos. Cada aminoácido tem uma cadeia lateral

de das cadeias laterais, dificultando a obtenção de dados precisos.

Novo marcador - A grande contribuição do grupo foi usar um marcador de *spin* que pode ser ligado à cadeia principal. O marcador é o TOAC (ácido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil-4-amino-4-carboxílico), única molécula conhecida que é ao mesmo

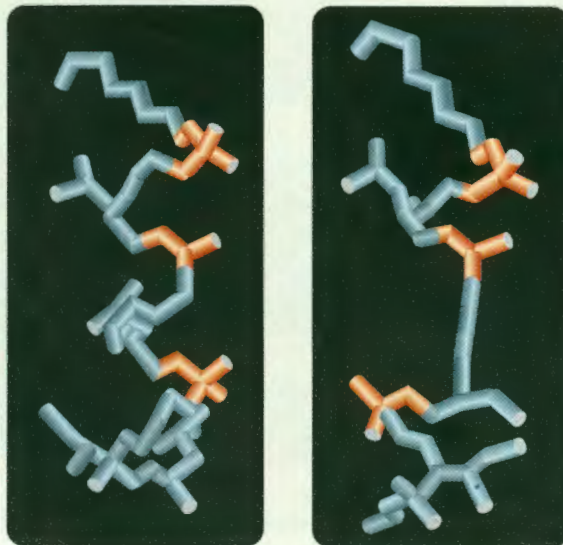
tempo um aminoácido e um radical livre bem estável. Como aminoácido, pode ser introduzido em peptídios, proteínas e outras macromoléculas, e o fato de conter um radical nitróxido permite que funcione como marcador de *spin*.

Sendo um composto paramagnético (por ter um elétron desemparelhado), o TOAC permite a espectroscopia de RPE para estudar as propriedades estruturais e dinâmicas do marcador isolado e da molécula à qual está acoplado, bem como os efeitos de alterações do meio onde está a molécula.

Com espectros de RPE se pode, por exemplo, observar alterações conformacionais quando um composto se liga a uma membrana biológica ou modelo. Assim, a ligação de um marcador de *spin* permite obter dados sobre o grau e a natureza da movimentação, da conformação e da estruturação da molécula ou do sistema investigado.

Desafio superado - O TOAC tem a vantagem de ser aminoácido e a desvantagem de ser radical livre – portanto, passível de degradação química, conforme o meio em que esteja. Esse era o grande desafio quando se

O Toac faz a diferença



Por meio da espectroscopia por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) usando Toac, tornam-se claras as diferenças entre as duas formas do peptídeo tricogina: a da esquerda é mais desordenada e apresenta mais estruturas em forma de hélice que a da direita. As moléculas de Toac, usadas como marcadores, estão em laranja e o peptídeo em cinza.

Fonte: Glenn Milhauser e Claudio Toniolo/*Chemical & Engineering News* n.78

(r), que fica pendente da cadeia principal do peptídeo.

O método convencional por RPE era ligar numa cadeia r algum marcador, para obter um sinal no aparelho. Mas, dessa forma, o marcador ficava longe da cadeia principal, objeto maior do estudo, e as informações eram mascaradas pela alta mobilida-

pensou em ligá-lo a cadeias peptídicas pela metodologia de síntese e química de peptídeos, já dominada pelo grupo.

Paiva, especialista em química de peptídeos, e Shirley, em cujo laboratório se usa muito a técnica RPE, discutiram o problema, com a participação do então pós-graduando Nakaie. Das discussões, e de resultados iniciais promissores, surgiu a técnica que permitiu incorporar o TOAC à cadeia peptídica e estudar as propriedades conformacionais do peptídeo, desenvolvida em 1980 na tese de doutoramento de Nakaie.

O avanço de Nakaie consistiu em encontrar uma seqüência de procedimentos (ou protocolos) de pesquisa química, que permitiu ligar o TOAC à ponta de um peptídeo. Devido à sua estrutura química e à rigidez de sua ligação à cadeia peptídica, esse marcador fornece dados mais precisos sobre a conformação do peptídeo do que os obtidos com os *spin labels* usados até então, em geral ligados só a cadeias laterais dos aminoácidos.

Molécula especial - Paiva salienta: “Desenvolvemos a síntese e a aplicação de uma molécula especial que se incorpora ao peptídeo de maneira bem estreita, íntima. Dali para a frente, poderíamos lidar com seqüências peptídicas cuja dinâmica estaria sendo fielmente reportada por um eficiente marcador”.

“Até então”, diz a pesquisadora Shirley, “ninguém tinha comprovado a possibilidade de marcação peptídica com um aminoácido paramagnético como o TOAC. Além do mais, mostramos também que o espectro de RPE do TOAC ou do TOAC-peptídeo era afetado pelo pH (índice de acidez), resultante da ionização do grupamento amínico desse marcador de *spin*. Esse resultado deixava em aberto, portanto, a possibilidade intrigante de que esse marcador ou o peptídeo marcado poderiam funcionar como sensores de pH do local onde se encontrassem.”

Depois do doutoramento, Nakaie prosseguiu nessa linha e tem sido responsável pelos principais avanços no desenvolvimento de estratégias de síntese, marcação e uso de peptídeos marcados com TOAC e derivados nos últimos anos.



MIGUEL BOYVAN

pós-graduação Reinaldo Marchetto – hoje docente do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista em Araraquara – resolveram o problema: combinaram etapas de dois métodos de síntese peptídica, introduziram um tratamento alcalino ao final da síntese e obtiveram assim o primeiro peptídeo marcado com TOAC numa posição interna da seqüência (TOAC7-angiotensina II).

Estava vencida a última barreira ao uso de TOAC com um aminoácido qualquer e abria-se a possibilidade de colocá-lo em qualquer posição na cadeia, o que ampliava enormemente sua potencialidade de uso.

“Então, mandamos o trabalho a uma importante revista de Química (*Journal of Ame-*

Aparelho de RPE captando os sinais emitidos pelo marcador de spin: molécula desvendada

Estratégia incomum - “Vencido o primeiro desafio”, diz Nakaie, “existia um outro, e mais complexo: sendo o TOAC um aminoácido, deveria idealmente ser possível sua inserção também em posições internas de seqüências peptídicas e não só na ponta. Entretanto, por problemas de instabilidade química no protocolo de síntese empregado, isso não foi viável na época. Na estratégia de síntese necessária para a introdução do marcador no meio da cadeia ocorria uma decomposição irreversível do grupo nitroxídeo do TOAC, inviabilizando a obtenção dos espectros de RPE.”

Só na década seguinte (em 1993), com os avanços na química de peptídeos, Nakaie e seu estudante de

rican Chemical Society). O artigo foi aceito como uma comunicação para publicação rápida, evidenciando o reconhecimento de sua importância”, comenta Shirley.

Nakaie prosseguiu as pesquisas, com recursos da FAPESP, para melhorar a síntese de peptídeos em resinas e verificar, com o TOAC, como essas resinas se comportam em diferentes situações. A marcação pelo TOAC permite acompanhar bem a síntese, que é um trabalho muito caro. O acompanhamento permite, por exemplo, mudar o meio solvente, escolhendo fases em que o sinal do marcador indica maior mobilidade (ou solvatação) do composto, o que melhora os resultados.

Nakaie explica: “Há solventes em que o grão da resina fica ‘empacota-

do' e outros em que o grão se 'solta' mais, as cadeias ficam mais livres e a reação vai mais veloz, com mais rendimento". Com a mobilidade maior, a síntese de peptídios fica mais barata. Esses resultados mais recentes foram tema de uma publicação em 1999.

Relevância biológica - Proteínas e peptídios têm grande importância fisiológica. O estudo de suas interações com outros peptídios, proteínas, carboidratos, oligonucleotídeos, anticorpos e variados componentes da membrana celular pode dar informações essenciais, em nível molecular, para entender como hormônios, enzimas e outros compostos agem. Isso pode permitir a criação de novas drogas terapêuticas.

Shirley Schreier, Antônio Paiva e Clóvis Nakaie: esforço conjunto de duas décadas ganha destaque



Também se intensificam estudos para relacionar conformação e função biológica de peptídios biologicamente ativos, como os hormônios envolvidos em processos de manutenção da vida ou que influem na causa de doenças. Shirley salienta: "A função fisiológica de um composto é consequência de sua estrutura, por isso é que esses estudos são importantes".

É nesse contexto que se salienta a investigação dos pesquisadores, reconhecida no artigo da *Chemical & Engineering News*, que os descreve como iniciadores de uma linha de investigação também seguida nos últimos 20 anos por outros – em especial os grupos liderados por Claudio Tonio, da Universidade de Roma (Itália),

e por G.L. Millhauser, da Universidade da Califórnia (EUA).

Repercussão - Além de atrair pesquisadores americanos e europeus, o trabalho do grupo, pioneiro na simplificação e no barateamento da síntese de peptídios, repercutiu no setor privado: a Toronto Research Chemicals, do Canadá, investiu em marcadores de spin e iniciou a produção de TOAC.

Os pesquisadores só lamentam não ter patenteado a técnica em

a Proteínas G: Receptores de Peptídios Vasoativos

Investimento: R\$ 331.886,26 e US\$ 130.840,00

• CLÓVIS RYUICHI NAKAIE, formou-se em Ciências Farmacêuticas (1974) e fez doutorado em Bioquímica (1980) na Escola Paulista de Medicina, atual Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Desde 1978 é professor na Unifesp, onde chefia o Departamento de Biofísica. Projeto: *Síntese e Estudos Físico-Quí-*

1993, quando publicaram a descoberta no *Journal of American Chemical Society*. "Na época não se falava em patente por aqui. Era uma coisa que nem passava por nossa cabeça", revela Nakaie. Nos últimos anos a situação mudou e ele obteve patentes ligadas a etapas recentes do trabalho. •

PERFIS:

• ANTÔNIO CEHELLI DE MATTOS PAIVA formou-se médico pela Escola Paulista de Medicina (1952), onde foi professor titular de Biofísica (1966-1998). Também foi titular de Bioquímica no Instituto de Química da USP (1980-1984). Projeto: *Relações entre Estrutura e Atividade de Receptores Acoplados*

micos de Copolímeros de Estireno como Matrizes de Síntese Peptídica e de Cromatografias Líquidas em Coluna
Investimento: R\$ 65.858,45 e US\$ 107.779,00

• SHIRLEY SCHREIER graduou-se em Química pela USP (1962), onde também tornou-se professora (1965), doutora (1969) e titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química (1990). Foi pesquisadora visitante em vários centros do exterior, notadamente no National Research Council do Canadá, nos anos 70. Projeto: *Anestésicos Locais: Síntese, Propriedades Estruturais e Físico-Químicas e Interação com Membranas Modelo e Biológicas*
Investimento: R\$ 206.415,79 e US\$ 259.048,91