

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Instituto de Química - Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Mestrado

**Estudo do peptídeo lítico Hecate e sua conjugação com Ácido
Gálico: Atividade contra o carcinoma cervical humano, mecanismo
de ação e toxicidade**

Paulo Ricardo da Silva Sanches

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

2016

**Estudo do peptídeo lítico Hecate e sua conjugação com Ácido
Gálico: Atividade contra o carcinoma cervical humano, mecanismo
de ação e toxicidade**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da UNESP de Araraquara como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia

Araraquara

2016

PAULO RICARDO DA SILVA SANCHES

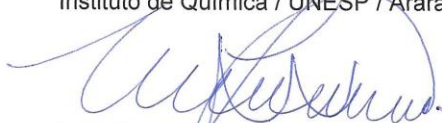
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 11 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Drª. Thatyane Morimoto Nobre-Pavinatto
Instituto de Física / USP / São Carlos - SP



Profª. Drª. Karen Cristiane Martinez de Moraes
Instituto de Biociências / UNESP / Rio Claro - SP

Dados Curriculares

Paulo Ricardo da Silva Sanches

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Paulo Ricardo da Silva Sanches
Filiação Valdir Aguiar Sanches e Aparecida Perpétua da Silva Sanches
Nascimento 26/02/1990 - Palestina/SP - Brasil

Formação acadêmica/titulação

- 2015 - atual** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
Título: Estudo do peptídeo lítico Hecate e sua conjugação com Ácido Gálico: Atividade contra o carcinoma cervical humano, mecanismo de ação e toxicidade.
Orientador: Eduardo Maffud Cilli
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2009 - 2014** Graduação em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2011 - 2012** Aperfeiçoamento em Pesquisa em Química Medicinal e Química Biológica.
Institut Pasteur Korea, IP-Korea, Seongnam, Coréia do Sul
Título: Studies of Small Size Molecules - Structure, activity and relationship of compounds against plasmodium, HCV Virus and HIV Virus.
Orientador: Rita Song
Bolsista do(a): UNESP
- 2012 - 2012** Aperfeiçoamento em Pesquisa em Doenças Neurodegenerativas.
Institut Pasteur Korea, IP-Korea, Seongnam, Coréia do Sul
Título: Neurodegeneratives diseases
Orientador: Regis Grailhe
Bolsista do(a): AREX

Formação complementar

2015 - 2015	Curso de curta duração em Treinamento Thomson Reuters. (Carga horária: 3h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
2011 - 2011	Extensão universitária em Curso de Verão em Biofísica Molecular 2011. (Carga horária: 38h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
2010 - 2010	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. . (Carga horária: 60h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
2009 - 2009	Biofísica Celular. . (Carga horária: 45h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
2009 - 2009	Curso de curta duração em Das Crônicas a Animação 3D. (Carga horária: 16h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
2009 - 2009	Curso de curta duração em Análise e Tratamento de Águas. (Carga horária: 20h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Vínculo institucional

2015 - Atual	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluno de Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Integral
2009 - 2014	Vínculo: Aluno de Graduação , Enquadramento funcional: Aluno de Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Projetos

2015 - Atual	Estudo do peptídeo lítico Hecate e sua conjugação com Ácido Gálico: Atividade contra o carcinoma cervical humano, mecanismo de ação e toxicidade
---------------------	--

Descrição: A síntese de peptídeos em fase sólida mostra-se como uma grande ferramenta para a modelagem de macromoléculas biológicas, sendo algumas de interesse quimioterápico. Desde que foi descrita pela primeira vez a técnica tem possibilitado a síntese de peptídeos e o estudo aprofundado dessas moléculas. Peptídeos líticos apresentam-se como novas moléculas promissoras contra neoplasias, sendo seu mecanismo de ação ainda obscuro. O Câncer é uma doença causada por fatores que provocam o desenvolvimento anormal de células do organismo. Estas células tendem a ser agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores. O câncer cervical é um dos mais comuns, afetando principalmente regiões pouco desenvolvidas, sendo que infecções pelo vírus HPV, tabagismo, falta de higiene pessoal e relações sexuais sem o uso de preservativos são as principais causas da doença. Este trabalho descreve a síntese, purificação e caracterização do peptídeo lítico Hecate (FALALKALKKALKKLKKALKKAL) e seu conjugado ácido gálico - Hecate (AG - FALALKALKKALKKLKKALKKAL). Os resultados mostraram que o peptídeo apresenta alta potencialidade contra o câncer cervical, mas o acoplamento do ácido gálico na sua posição amino terminal, além de diminuir a potencialidade contra o câncer, aumenta sua atividade hemolítica. Estas diferenças estão diretamente relacionadas com a diferença de carga dos dois compostos, a diferente composição lipídica das células e com a estrutura secundária dos compostos.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Paulo Ricardo da Silva Sanches; Eduardo M. Cilli (Responsável)

2010 - 2012	Uso de peptídeos sintéticos no estudo da DHODH e do peptídeo de fusão do vírus da Dengue
--------------------	--

Descrição: Desde o seu desenvolvimento, a SPFS tem promovido um grande avanço no estudo de peptídeos e proteínas. Neste projeto, esta metodologia será empregada no estudo de duas proteínas. A DHODH é uma enzima importante na via metabólica de biossíntese de nucleotídeos. O entendimento do modo de ação detalhado desta enzima e a sua inibição podem promover a interrupção da síntese de pirimidinas, levando à morte do parasito. Os objetivos deste projeto podem ser divididos em duas partes: 1) o estudo das regiões relacionadas à formação do homodímero ou envolvidas com o "loop catalítico" da TcDHODH (*T. cruzi*); e 2) o estudo do mecanismo de ação da região N-terminal da HsDHODH (humana). A segunda parte do projeto está relacionada ao estudo do modo de ação do peptídeo de fusão da dengue. A infecção do vírus da dengue depende da sua fusão com a membrana do hospedeiro. Este processo é intermediado pelo peptídeo de fusão que está localizado no domínio II da "glicoproteína E" entre os resíduos 98 a 112. O objetivo deste projeto tem por finalidade avaliar as diferenças entre as posições 88 a 123 dos quatro sorotipos da dengue. Nesta região está contido o peptídeo de fusão, bem como as regiões que o franqueiam, e que mostraram ser importantes na interação com a membrana. Em ambos os estudos serão realizadas as sínteses, avaliações estruturais e dinâmicas destes diferentes peptídeos. As técnicas utilizadas serão a síntese peptídica em fase sólida (SPFS), fluorescência, RPE, CD, RMN e estudos com miméticos de membrana. O desenvolvimento do projeto pode propiciar a obtenção de dados para entender em detalhes o modo de ação e permitir o desenvolvimento de inibidores.

Situação: Concluído **Natureza:** Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (2);

Integrantes: Paulo Ricardo da Silva Sanches; Eduardo Maffud Cilli (Responsável); Graziely Ferreira Cespedes; Eduardo Festozo Vicenti

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2010 - 2013

Síntese de compostos contendo ácido gálico ligado a aminoácidos e peptídeos:
interação com miméticos de membrana e atividade biológica

Descrição: O ácido gálico e seus derivados mostram grande potencialidade biológica, apresentando eficiência como agentes antimicrobianos, antioxidantes, antidiabéticos entre outros. Por conta dessa potencialidade, derivados sintéticos deste composto são de interesse biológico. Neste trabalho, propomos a síntese de moléculas contendo o ácido gálico acoplado a aminoácidos e peptídeos. Este estudo permitirá avaliar a interação ácido gálico - membrana, pois os aminoácidos a serem utilizados possuem cromóforos e fluoróforos em sua cadeia lateral. O ácido gálico aparentemente atua em receptores existentes na membrana, por isso o peptídeo STII 11-30 será acoplado a este ácido; uma vez que a sequência se acopla a membrana podendo haver uma potencialização dos efeitos do ácido gálico. Técnicas como a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS), que consiste no crescimento resíduo a resíduo da cadeia peptídica, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de fluorescência serão utilizadas. Testes para verificar atividade antimalárica e antioxidante das moléculas obtidas também serão realizados. Em suma, o

objetivo desse trabalho é estudar a viabilidade de síntese e a atividade biológica das moléculas Gálico-W; Gálico-Y e Gálico-SLTFQVWDKVLEELGKVSRL

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Paulo Ricardo da Silva Sanches; Eduardo Maffud Cilli (Responsável)

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2014 - 2015 Curso Unificado do Câmpus de Araraquara (CUCA)

Descrição: Professor da disciplina de química

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Paulo Ricardo da Silva Sanches; Eduardo M. Cilli (Responsável).

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem, Lê Bem

Espanhol Compreende Bem , Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem

Prêmios e títulos

2015 SBBq Award for best poster presented during SBBq and IUBMB congress. SBBq and IUBMB.

2013 Best Abstract at the III International Symposium on Drug Discovery. "Topoisomerases Inhibitors Peptides Derived from Escherichia coli Toxin PARE, UNESP.

2013 Melhor Comunicação Oral na Área de Biofísica com o trabalho "Design, síntese, avaliação biofísica e farmacológica de novos conjugados peptídicos contra o câncer de mama", AUGM.

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. BERNEGOSI, JÉSSICA, CALIXTO, GIOVANA, **SANCHES, PAULO**, FONTANA, CARLA, CILLI, EDUARDO, GARRIDO, SAULO, CHORILLI, MARLUS. Peptide KSL-W-Loaded Mucoadhesive Liquid Crystalline Vehicle as an Alternative Treatment for Multispecies Oral Biofilm. *Molecules* (Basel. Online), v.21, p.3 - , 2016.
2. **SANCHES, P. R. S.**, CARNEIRO, B. M., BATISTA, M. N., BRAGA, A. C. S., LORENZON, E. N., RAHAL, P., CILLI, E. M. A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical cancer, and toxicity. *Amino Acids* (Wien. Internet). , v.47, p.1433 - 1443, 2015.
3. ROCHA, CAMILA A., **SANCHES, PAULO R. S.**, MARCHETTO, REINALDO, ZOTTIS, ADERSON The Octahydroindene Carboxyl Substructure from Dihydrobetulinic Acid is Essential to Inhibit Topoisomerase IB from *Leishmania donovani*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Impresso). , p.1-8 - , 2015.
4. MASIAS, E., **SANCHES, P. R. S.**, DUPUY, F. G., ACUNA, L., BELLOMIO, A., Cilli, E.M., SAAVEDRA, L., MINAHK, C. 28-mer Fragment Derived from Enterocin CRL35 Displays an Unexpected Bactericidal Effect on *Listeria* Cells. *Protein and Peptide Letters*. , v.22, p.482 - 488, 2015.
5. LORENZÓN, E. N., **SANCHES, P. R. S.**, NOGUEIRA, L. G., BAUAB, T. M., CILLI, E. M. Dimerization of aurein 1.2: effects in structure, antimicrobial activity and aggregation of *Cândida albicans* cells. *Amino Acids* (Wien. Internet). , v.-, p.- - 1528, 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **SANCHES, P. R. S.**, FERREIRA, J., VALENTE, V., SOARES, C. P., ROCHA, C. A., CILLI, E. M. STRUCTURE, ACTIVITY AND RELATIONSHIP OF NEW PEPTIDE CONJUGATES AGAINST BREAST CANCER In: III International Symposium on drug Discovery, 2013, Araraquara. **III International Symposium on Drug Discovery**.2013.
2. ROCHA, C. A., **SANCHES, P. R. S.**, GARCIA, A., CAIRES, A., ZOTTIS, A., ABREU, E. M., MARCHETTO, R. Topoisomerases Inhibitors Peptides Derived for *Escherichia coli* Toxin PARE In: III International Symposium on drug Discovery, 2013, Araraquara. **III International Symposium on Drug Discovery**. 2013.

3. LIMA, E. C., **SANCHES, P. R. S.**, CILLI, E. M., Graminha, M.A.S. Study of Leishmania chagasi Lc06 gene: pH influence on ELISA tests for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. In: Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/ XXXIX Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease, 2012, Caxambu. **Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/ XXXIX Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease.** 2012.

4. LIMA, E. C., CILLI, E. M., Zacarias,R.M., **SANCHES, P. R. S.**, Graminha,M.A.S. New Antigens Search for Canine VisceralLeishmaniasis to Improvement of Serodiagnosis: Study of LC06 Gene In: XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/XXXVIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Di, 2011, Foz do Iguaçu. **XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/XXXVIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease.**2011.

5. **SANCHES, P. R. S.**, ALTEI, W. F., Andricopulo,A.D., CILLI, E. M.;CILLI, E;Cilli, Eduardo M. Síntese de Compostos Contendo Ácido Gálico Ligado a Aminoácidos e Peptídeos: Interação com Miméticos de Membrana e Atividade Biológica In: 34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis. **34 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.** , 2011.

6. Graziely Ferreira Cespedes, Eduardo Festozo Vicenti, Esteban Nicolás Lorenzón, **SANCHES, P. R. S.**, Cilli, E.M.Synthesis and Interaction with Model Membrane of Different Dengue Virus Fusion Peptides In: XL ANNUAL MEETING OF SBBQ, 2011, Foz do Iguaçu. **XL ANNUAL MEETING OF SBBQ.** , 2011.

7. **SANCHES, P. R. S.**, Graziely Ferreira Cespedes, Eduardo Festozo Vicenti, Esteban Nicolás Lorenzón, CILLI, E. M.;CILLI, E;Cilli, Eduardo M."Synthesys,Characterization, Membrane Mimetic Interaction and Antifungal Activity of Stycholisin II (11-30) Containing Gallic" In: 3rd International Workshop on Spectroscopy for Biology, 2010, Maresias. **3rd International Workshop on Spectroscopy for Biology.** , 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **SANCHES, P. R. S.**, CILLI, E. M.;CILLI, E;Cilli, Eduardo M.Síntese,Caracterização e Estudos Biofísicos de Compostos Contendo Ácido Gálico Ligado a Aminoácidos e Peptídeos In: CIC - Congresso de Iniciação Científica, 2010, Marília. **XII CIC - UNESP.**2010.

2. REZENDE, A. A., Cilli, E.M., JANE, R. D., LEOPOLDO, M. F., **SANCHES, P. R. S.**, CRUSCA JUNIOR, E.SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E INTERAÇÃO COM MEMBRANAS DE UM DÍMERO DA REGIÃO N-TERMINAL DA ESTICOLISINA II. In: CIC-Congresso de Iniciação Científica, 2009, São José do Rio Preto.**Congresso de Iniciação Científica da UNESP.** , 2009. p.9486 – 9489.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **SANCHES, P. R. S., ROCHA, C. A., CILLI, E. M. Design of New Conjugated Peptides Using Electrical Characteristics of Breast Cancer Cell Membrane**, 2013. (Comunicação, Apresentação de Trabalho).
2. **SANCHES, P. R. S., FERREIRA, J., VALENTE, V., SOARES, C. P., ROCHA, C. A., Cilli, E.M. Design, síntese, avaliação biofísica e farmacológica de novos conjugados peptídicos contra o câncer de mama**, 2013. (Comunicação, Apresentação de Trabalho).
3. **SANCHES, P. R. S. Phage Display and Peptide Libraries: New approach for Peptide Drug Discovery'**, 2013. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho).
4. **REZENDE, A. A., CILLI, E. M.; CILLI, E.; Cilli, Eduardo M., JANE, R. D., LEOPOLDO, M. F., SANCHES, P. R. S., CRUSCA JUNIOR, E. SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E INTERAÇÃO COM MEMBRANAS DE UM DÍMERO DA REGIÃO N-TERMINAL DA ESTICOLISINA II.**, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. **SANCHES, PAULO R. S., GRAMINHA, M. A. S., CISTIA, M. L.** Participação em banca de Evelin Costa Lima. **Identificação e caracterização de novos antígenos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina: estudo do gene Lc06**, 2015. (Farmácia e Bioquímica) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Agradecimentos

Com todo carinho e com os melhores sentimentos escrevo esta parte deste documento que é tão importante, fruto de um caminho nada fácil, mas que foi possível graças ao apoio dos “gigantes” que fazem parte da minha vida. Meu caminho tem sido traçado baseado nos ensinamentos, apoio e exemplo de todos.

Agradeço em primeiro lugar a Deus por guiar minhas decisões, por me fazer aprender a ser forte e ao mesmo tempo sensível ao mundo, por mostrar os melhores e corretos caminhos.

Aos meus Pais, Valdir e Aparecida, pelo apoio durante a vida e pelo alicerce em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Eduardo Cilli, pelos ensinamentos de uma longa jornada. Posso dizer que nesse período de Iniciação e Mestrado sua presença como orientador, amigo e pai científico foi gratificante e inspiradora. Obrigado por ser este orientador/educador fascinante.

A minha amiga Mariana Batista pelo companheirismo e pela ajuda nos testes biológicos.

A minha amiga e companheira de laboratório Camila Aguiar Rocha, pelas conversas, apoio e ensinamentos científicos e de vida.

Ao Dr. Bruno Carneiro pela paciência, ensinamentos e prontidão.

Aos meus amigos de laboratório pela convivência e momentos alegres.

A Prof. Paula Rahal e aos amigos do Laboratório de Estudos Genômicos da UNESP de S.J. do Rio Preto pelo acolhimento.

Ao Dr. Lee do Instituto Pasteur pelo companheirismo e ótimos momentos que passei na Coréia do Sul.

Ao Dr. Régis Grailhe pelo acolhimento no laboratório de doenças Neurodegenerativas do Instituto Pasteur.

Aos meus amigos de longa e curta data, que fizeram e fazem toda diferença no dia-a-dia.

Aos servidores e funcionários do Instituto de Química Wennia, Célia, Cintia, Albertinho, Vinícius, Gustavo, Dirton, Diogo, Cidinha, Fátima pela convivência e paciência.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir e chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; por que descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.” - Cora Coralina.

Sumário

Introdução	20
Câncer cervical	21
Crescimento Tecidual e Terapias Antineoplásicas	24
Peptídeos líticos e sua ação na membrana plasmática	26
Mecanismos de Morte Celular	29
Mecanismos de Resistência de Células Tumorais	30
Bioconjugados	31
Justificativa	32
Objetivos	33
Objetivo Geral	33
Objetivos Específicos	33
Materiais e Métodos	34
Síntese	34
Cultura Celular	35
Viabilidade Celular	35
Morfologia Celular	36
Ensaio de Morte Celular por Necrose	36
Ensaio Hemolítico	36
Ensaio de Proteção Osmótica	37
Interação com Micelas	37
Dicroísmo Circular	38
Permeabilização de Vesículas	39
Análise Estatística	40
Resultados e Discussão	41
Síntese	41
Ensaaios Biológicos	42
Viabilidade Celular	42
Ensaaios de Toxicidade	45
Ensaio de Proteção Osmótica	48
Morfologia Celular	49
Ensaio de morte celular por necrose	52
Ensaaios Biofísicos	57

Interação com Micelas	57
Dicroísmo Circular	60
Permeabilização de vesículas	62
Conclusões.....	67

Lista de Figuras

Figura 1- Esquema simplificado da estrutura do HPV. A) Capsídeo viral B) Corte evidenciando o material genético do vírus.	23
Figura 2- Esquema simplificado de infecção das células basais pelo HPV. a) infecção e estabelecimento do DNA viral com multicópias do material nuclear b) manutenção do DNA viral em estado vegetativo e amplificação do DNA viral, produção e liberação de vírions e c) expansão das células contendo DNA viral e formação de neoplasia.....	23
Figura 3- Progressão da infecção celular pelo vírus HPV e formação de neoplasia. ...	24
Figura 4- Estrutura molecular do ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico.....	27
Figura 5- Mecanismo de ação dos peptídeos catiônicos a) Barrel Stave b) Carpet Like c) Poro Toroidal.	29
Figura 6- Mecanismos de morte celular evidenciando os processos de iniciação, desenvolvimento e finalização.....	31
Figura 7- Mecanismos de resistências desenvolvidos por células tumorais que levam à diminuição da resposta aos tratamentos existentes.....	32
Figura 8-Surfactantes usados na formação das micelas (a e b). Estrutura de uma micela (c).....	39
Figura 9- Síntese dos compostos Hecate e AG-Hecate pela técnica de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.	43
Figura 10- Comparação entre a atividade antitumoral dos compostos em células de câncer cervical humano da linhagem HeLa após tratamento com diferentes concentrações dos compostos (a) peptídeo Hecate (b) Ácido Gálico (c) AG - Hecate. *p > 0,05 vs Hecate **p < 0,05 vs Hecate ***p < 0,01 vs Hecate.	45
Figura 11- Comparação entre a atividade citotóxica dos compostos em células de queratinócitos não tumorais humanos da linhagem HaCat após tratamento com diferentes concentrações dos compostos (a) peptídeo Hecate (b) Ácido Gálico (c) AG - Hecate. *p > 0,05 vs Hecate **p < 0,05 vs Hecate ***p < 0,01 vs Hecate.....	47
Figura 12- Atividade Hemolítica dos compostos Hecate, Ácido Gálico e AG - Hecate.	48

Figura 13- Efeito dos protetores osmóticos na atividade hemolítica dos compostos Hecate (—★—), AG-Hecate (—■—) e Ácido gálico (—▲—), concentração de 0,1 mg.mL ⁻¹ .	49
Figura 14- Imagens das células após tratamentos com os compostos. Células das linhagens HeLa e HaCat foram expostas a concentrações de 0-0,0125 mg.mL ⁻¹ dos compostos Hecate (a) e AG - Hecate (b). As imagens mostradas foram tiradas após 24 h de incubação.	51
Figura 15- Quantificação de células necróticas após tratamento com os compostos para a linhagem HeLa. (a) peptídeo Hecate, (b) AG - Hecate.	53
Figura 16- Esquema do mecanismo de morte celular dependente da concentração do peptídeo Hecate.	54
Figura 17- Quantificação de células necróticas após tratamento com os compostos para a linhagem HaCat. (a) peptídeo Hecate, (b) AG - Hecate.	55
Figura 18- Espectros de fluorescência relacionando a intensidade de fluorescência pelo comprimento de onda de máxima emissão a) Hecate b) AG-Hecate.	58
Figura 19- Espectros de fluorescência relacionando a intensidade de fluorescência pelo comprimento de onda de máxima emissão a) Hecate b) AG-Hecate.	59
Figura 20- Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo Hecate em presença do surfactante a)SDS e b)LPC.	61
Figura 21- Espectros de Dicroísmo Circular do conjugado AG-Hecate em presença do surfactante a)SDS e b)LPC.	61
Figura 22- Porcentagem de permeabilização de vesículas contendo fluoróforo do peptídeo Hecate. Composição: POPC:POPS.	63
Figura 23- Porcentagem de permeabilização de vesículas contendo fluoróforo do composto ácido gálico. Composição: POPC:POPS.	63
Figura 24- Porcentagem de permeabilização de vesículas contendo fluoróforo do conjugado AG-Hecate. Composição: POPC:POPS.	64
Figura 25- Porcentagem de permeabilização de vesículas contendo fluoróforo do peptídeo Hecate. Composição: POPC:Colesterol.	65
Figura 26- Porcentagem de permeabilização de vesículas contendo fluoróforo para o composto ácido gálico. Composição: POPC:Colesterol.	66
Figura 27- Porcentagem de permeabilização de vesículas contendo fluoróforo para o composto AG-Hecate. Composição: POPC:Colesterol.	67

Lista de Tabelas

Tabela 1- Dados obtidos a partir da síntese e caracterização dos compostos	43
Tabela 2- Resultado de interação dos compostos com SDS.	57
Tabela 3- Resultado de interação dos compostos com LPC.....	59

Resumo

A síntese de peptídeos em fase sólida mostra-se como uma importante ferramenta para a modelagem de macromoléculas biológicas, sendo algumas de interesse quimioterápico. Desde que foi descrita pela primeira vez, esta técnica tem possibilitado a síntese de inúmeros peptídeos e o estudo aprofundado dessas moléculas. Peptídeos líticos apresentam-se como novas moléculas promissoras contra neoplasias, sendo seu mecanismo de ação ainda obscuro. O câncer é uma doença causada por fatores que provocam o desenvolvimento anormal de células do organismo. Estas células tendem a ser agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores. O câncer cervical é um dos mais comuns, afetando principalmente regiões pouco desenvolvidas. Infecções pelo vírus HPV, tabagismo, falta de higiene pessoal e relações sexuais sem o uso de preservativos são as principais causas pelo aparecimento da doença. O HPV é um vírus não envelopado, de dupla fita de DNA circular e que promove infecção em células basais em divisão do epitélio. Este trabalho descreve a síntese, purificação e caracterização do peptídeo lítico Hecate (FALALKALKKALKKKLKKALKKAL) e do conjugado ácido gálico-Hecate (AG-FALALKALKKALKKKLKKALKKAL). Estas moléculas foram utilizadas na busca de novas terapias contra o câncer cervical causado por infecção viral e no entendimento de seu modo de ação. Os resultados mostraram que o peptídeo apresenta alta potencialidade contra o câncer cervical, mas o acoplamento do ácido gálico na sua posição amino terminal, além de diminuir a potencialidade contra o câncer, aumentou sua atividade hemolítica. Estas diferenças estão diretamente relacionadas com a diferença de carga dos dois compostos, a diferente composição lipídica das células e a estrutura secundária dos compostos.

Palavras-Chave: Câncer cervical, peptídeos líticos, bioconjugados, Hecate, ácido gálico, mecanismo de ação.

Abstract

The solid phase peptide synthesis is shown as an important tool for modeling of biological macromolecules, and some chemotherapeutic interest. Since it was first described this technique has made possible the synthesis of numerous peptides and careful study of these molecules. Lytic peptides are presented as promising new molecules against cancer, and the action mechanism is still unclear. Cancer is a disease caused by factors that cause abnormal development of the body's cells. These cells tend to be aggressive and uncontrollable, causing tumor formation. Cervical cancer is the most common, affecting mainly underdeveloped regions. Infection by the HPV virus, smoking, lack of personal hygiene and sex without protection are the main causes for the appearance of the disease. The HPV virus is a non-enveloped virus with circular double-stranded DNA and promotes infection in the dividing basal cells of the epithelium. This work describes the synthesis, purification and characterization of the lytic peptide Hecate (FALALKALKKKALKKLKKALKKAL) and conjugate gallic acid-Hecate (GA-FALALKALKKKALKKLKKALKKAL). These molecules were used in the search for new therapies against cervical cancer caused by viral infection and understanding of their mode of action. The results showed that the peptide has a high potential against cervical cancer, but the coupling of gallic acid in its amino terminal position reduces the potential of peptide for cancer and increases his hemolytic activity. These differences are directly related to the charge difference of the two compounds, the different lipid composition of cells and the secondary structure of the compounds.

Introdução

As células normais de todo organismo vivo coexistem em perfeita harmonia citológica, histológica e funcional, orientadas no sentido da manutenção da vida. De acordo com suas características morfológicas, funcionais e de especificidade, as células estão agrupadas em tecidos, os quais formam os órgãos que constituem um sistema (Lodish et al, 2004).

Restrições à divisão celular (mitose) são impostas por estímulos reguladores que agem sobre a superfície celular, os quais podem resultar tanto do contato com as demais células como da redução na produção ou disponibilidade de fatores de crescimento e hormônios (Riley et al, 2009; Lee et al, 2015). Em algumas ocasiões, no entanto, ocorre uma ruptura dos mecanismos reguladores da multiplicação celular e, sem que seja necessário, uma célula começa a crescer e dividir-se desordenadamente e com um metabolismo superior ao normal. Desta célula podem-se resultar clones de células descendentes e herdeiros dessa propensão ao crescimento anômalo e insensíveis aos mecanismos reguladores normais, o que resulta na formação de tumores ou neoplasias (Lach et al, 2013).

Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas, ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Outras características que diferenciam os tipos de câncer são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos (invasivo) ou distantes (metástase – Futakuchi et al, 2016).

Cancros chamados de malignos são cânceres que já se encontram em estágio avançado e apresentam elevado nível de metástase - formação de uma nova lesão tumoral a partir de outra, mas sem continuidade entre as duas (Crafton and Salani, 2016). Isto implica que as células neoplásicas se desprendam do tumor primário, caminhando através do organismo por uma via de disseminação, geralmente a corrente sanguínea, sendo levadas para um local distante, onde formam uma nova colônia. Pacientes neste estágio de doença apresentam baixa sobrevida, sendo os métodos existentes para o tratamento da doença ainda ineficazes para o controle da proliferação. Cancros benignos são isentos de metástases, mas ainda causam lesões bruscas no funcionamento do organismo. Em

alguns casos há vascularização do tumor, dificultando ainda mais o tratamento (Crafton and Salani, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das doenças que mais provocam mortes no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. No Brasil, em 2014, mais de 200.000 pessoas morreram devido às complicações provenientes de neoplasias, sendo os cânceres de próstata, traqueia, estômago, colo retal e esôfago os mais incidentes em homens. Câncer de mama, traqueia, colo retal, cervical e estômago são os mais comuns em mulheres.

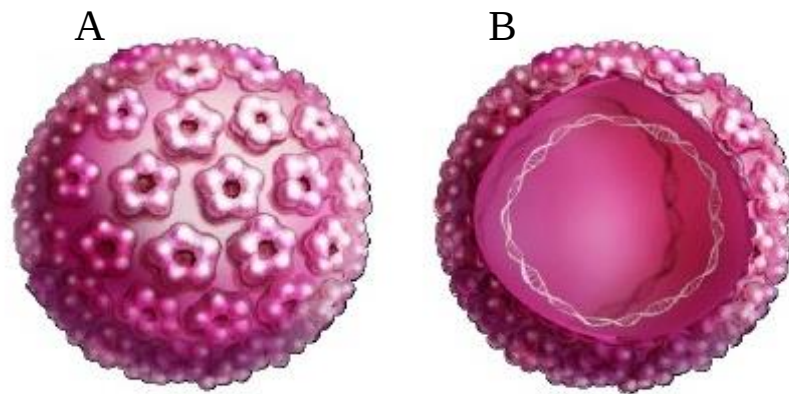
O câncer cervical é um dos mais comuns no mundo, afetando principalmente regiões pouco desenvolvidas (Ferlay et al, 2010). Papiloma Vírus Humano (HPV), deficiência na higiene genital, fatores culturais, relações sexuais sem proteção, além do tabagismo são algumas das causas e fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença (Kumar and Bhasker 2014).

Câncer cervical

Mundialmente, cerca de meio milhão de novos casos de câncer cervical são diagnosticados por ano, sendo que quase metade destes casos são fatais (Thaxton e Waxman, 2015). É bem estabelecido que a maior causa desta enfermidade é o Papiloma Vírus Humano (HPV, sigla em inglês para Human Papillomavirus), sendo que 99,7% das neoplasias cervicais apresentam o vírus, incluindo os cânceres escamosos e adenocarcinomas. Além do câncer cervical, o HPV está relacionado com outras neoplasias, sendo responsável por cerca de 80% dos casos de câncer anal, 43% dos cânceres de vulva, 50% dos cânceres de pênis, 70% dos cânceres de vagina e 56% dos cânceres de orofaringe (Thaxton; Waxman, 2015).

O Papiloma Vírus Humano é um vírus de DNA circular (figura 1) e apresenta mais de 120 diferentes subtipos, sendo o HPV-16 e o HPV-18 os mais associados com o câncer cervical (Mouallif et al, 2014).

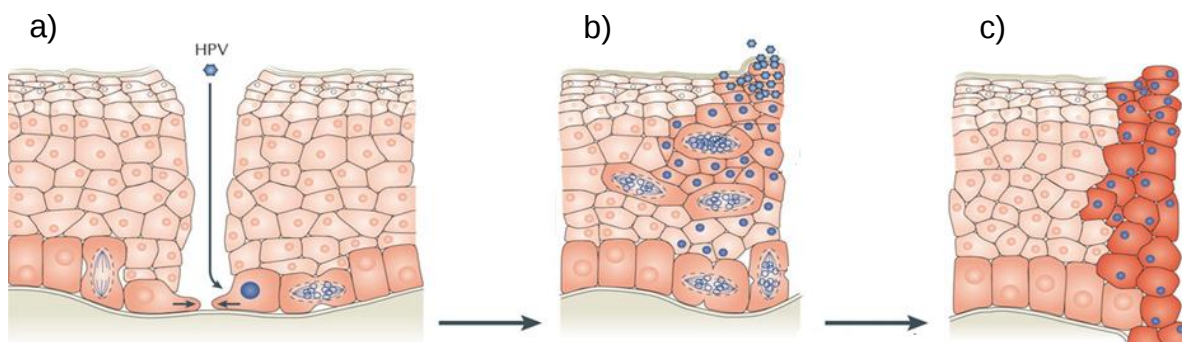
Figura 1- Esquema simplificado da estrutura do HPV. A) Capsídeo viral B) Corte evidenciando o material genético do vírus.



Fonte: Burd EM. Clin. Microbiol. Rev. 2003.

O ciclo replicativo do HPV está diretamente ligado à diferenciação das células epiteliais do hospedeiro. Este ciclo complexo inclui: a) infecção e estabelecimento do DNA viral com múltiplas cópias do material nuclear, que ocorre apenas em células basais em divisão do epitélio; b) manutenção do DNA viral em estado vegetativo e amplificação do DNA viral, produção e liberação de vírions, que ocorre em células epiteliais diferenciadas; c) expansão das células contendo DNA viral e formação de neoplasia (Pyeon et al, 2009).

Figura 2- Esquema simplificado de infecção das células basais pelo HPV: a) infecção e estabelecimento do DNA viral com múltiplas cópias do material nuclear; b) manutenção do DNA viral em estado vegetativo e amplificação do DNA viral, produção e liberação de vírions; c) expansão das células contendo DNA viral e formação de neoplasia.

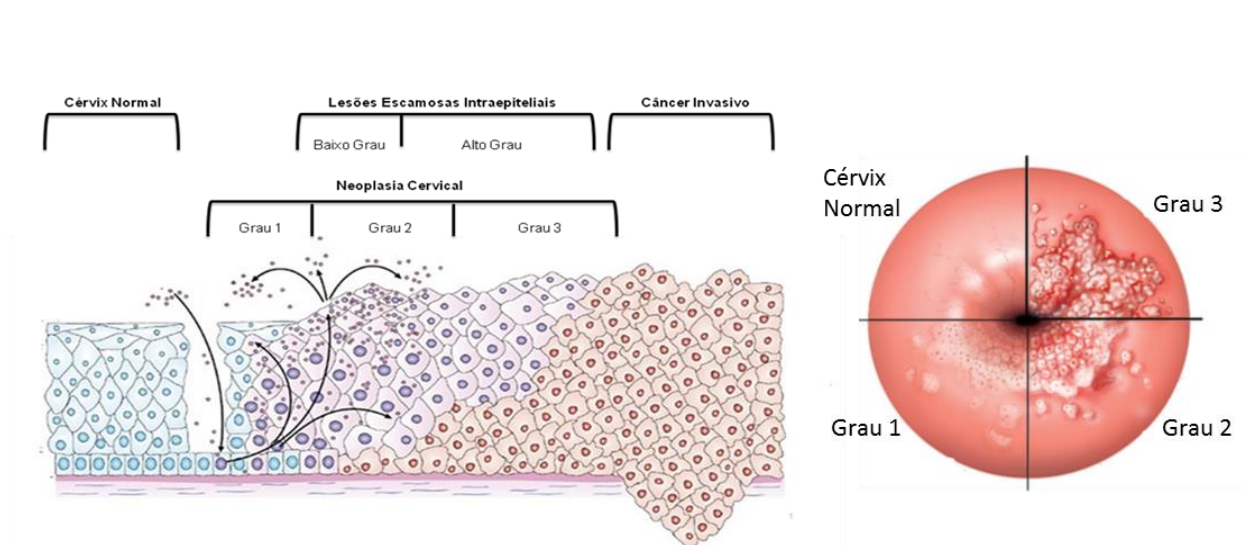


Fonte: WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nature Reviews Cancer (Adaptada).

A progressão das células contendo DNA viral (infecção persistente) leva a formação de lesões epiteliais com escamação da parede do cólo do útero (associado à liberação de partículas virais) e neoplasia cervical em diferentes graus (Grau 1, 2 e 3) até o desenvolvimento de câncer invasivo (Figura 3 - Woodman et al, 2007).

Os dados procedentes de ensaios clínicos de duas vacinas contra HPV disponíveis – uma bivalente frente aos tipos de HPV 16 e 18 e outra tetravalente, frente aos sorotipos 6, 11, 16 e 18 – demonstram que estas vacinas são seguras, imunogênicas e altamente eficazes na prevenção, não só da infecção persistente pelos tipos incluídos nas vacinas, mas também na prevenção de lesões precursoras de carcinoma invasivo de colo uterino (Piqué e José, 2008). No entanto, uma vez diagnosticado o câncer de cólo de útero, tratamentos contra as células tumorais devem ser adotados.

Figura 3- Progressão da infecção celular pelo vírus HPV e formação de neoplasia. A figura mostra lesões escamosas intraepiteliais de baixo e alto grau, bem como os diferentes graus de neoplasia cervical. O grau 1 está envolvido com o estágio inicial de replicação viral, o grau 2 envolve a formação de vírions e liberação de partículas virais e o grau 3 envolve a proliferação e invasão das células tumorais.



Fonte: WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. Nature Reviews Cancer (Adaptada).

Crescimento Tecidual e Terapias Antineoplásicas

Células não tumorais e tumorais possuem uma cinética de divisão de acordo com seu volume tecidual (Kolokotroni et al, 2016). Quando os volumes teciduais são menores as células se dividem mais rapidamente e, mais lentamente se esses volumes são maiores. Assim, quanto menor o tumor, maior sua fração proliferativa, portanto mais sensível aos medicamentos (quimioterapia) e às radiações ionizantes (radioterapia).

Drogas quimioterápicas eliminam células cancerígenas por meio de diversos mecanismos, entre eles o rompimento da membrana plasmática ou rompimento de organelas celulares, clivagem/alquilação de DNA, inibição de topoisomerases, bloqueio de vias metabólicas entre outros, que são eventualmente traduzidas em sinais necróticos, apoptóticos, piroptóticos, oncóticos e autofágicos (White, Fong and Singh, 2016).

A radioterapia consiste no uso de radiações ionizantes que provocam a morte das células (Arenas et al, 2016). Tecidos normais que apresentam alta fração de crescimento são os que mais sofrem a ação da quimio e radioterapias, concentrando-se nesses os efeitos colaterais dessas terapias e causando distúrbios fisiológicos que provocam náuseas e vômito, além de imunodeficiências, alopecia, anemia, lesões hepáticas, etc.

A maior parte dos agentes terapêuticos em uso é, em geral, não específica para células afetadas. Desta forma, uma distribuição sistêmica via corrente sanguínea destas moléculas em diversos órgãos do corpo, além de reduzir a potencialidade do tratamento, causa efeitos indesejáveis (Vilar et al, 2012). Devido a esta baixa especificidade dos tratamentos e os consequentes efeitos colaterais, bem como o desenvolvimento de mecanismos de resistência pelas células tumorais, a busca por moléculas alvo específicas e com potencialidade contra tumores é de grande importância para a saúde humana.

Apesar do grande esforço para a obtenção de novos agentes antitumorais, muito dos medicamentos estão apresentando declínio em sua potencialidade, sendo a eficácia do tratamento diretamente afetada (Law, 2015). Uma das causas, é que as células alvo desenvolvem mecanismos que aumentam o metabolismo das drogas por meio da expressão de proteínas específicas. Isto tem se tornado uma preocupação para os órgãos de saúde mundiais. Desta forma, o estudo de novos

compostos que auxiliem no tratamento da doença é de grande importância para a saúde humana (Chung et al, 2015; Rong et al, 2016). Em muitos casos, a combinação de várias técnicas e/ou conhecimentos permite a elaboração de compostos sintéticos com mais de uma função. Estes novos compostos, comparados aos seus precursores, devem ser mais potentes, menos tóxicos, apresentarem maior especificidade de ligação (alvo específico) e serem mais estáveis. Para estas modificações moleculares, conhecimentos interdisciplinares como biologia celular, química, genética, física e outros saberes são utilizados a fim de “modelar” uma droga mais potente.

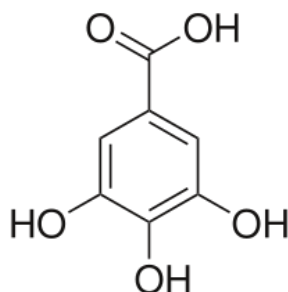
A química medicinal é um dos ramos da química que se preocupa com o desenvolvimento de novas moléculas a partir de modificações específicas em moléculas já existentes (Lombardino et al, 2004). Hoje, este ramo da química está diretamente relacionado com o processo de descoberta de novas drogas fazendo parte de grupos interdisciplinares de pesquisa e proporcionando uma ferramenta poderosa no processo de síntese de novos análogos com potencial biológico.

A síntese de peptídeos em fase sólida mostra-se como uma grande ferramenta para a modelagem de macromoléculas biológicas, sendo algumas de interesse quimioterápico. Desde que foi descrita pela primeira vez em 1964, pelo bioquímico norte americano Robert Bruce Merrifield (Merrifield et al, 1964, Atherton et al, 1989, Alberício et al, 2000), a técnica tem possibilitado a síntese de milhares de peptídeos e o estudo aprofundado dessas moléculas. Os peptídeos desempenham uma gama de funções no organismo dos seres vivos, podendo ser alvos de estudos para arquitetura de novas drogas. Em publicação pela Revista Nature Neuroscience, em julho de 2012, Justin M. Nussbaum e colaboradores mostraram que peptídeos desempenham função primordial na formação de placas mielóides responsáveis pela doença de Alzheimer (Nussbaum et al, 2012). Peptídeos não naturais também se mostraram importantes. O Hecate, um análogo da Melitina, é um peptídeo sintético composto por 23 aminoácidos (FALALKALKKALKKLKKALKKAL) que possui grande incidência de Lisina (aminoácido carregado positivamente), Alanina e Leucina (aminoácidos alifáticos apolares). A posição destes aminoácidos na sequência primária da cadeia confere a esta molécula grande tendência na formação de hélices anfipáticas, descritas como

estruturas importantes para a atividade biológica de peptídeos catiônicos (Hansel et al, 2007; Gawronska et al, 2002; Leuschner et al, 2003).

Pequenas moléculas de origem natural também são estudadas por apresentarem potencial biológico considerável. O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico, $C_7H_6O_5$, figura 4), por exemplo, é uma molécula de grande interesse. Huei-Mei Chen e colaboradores (Chen et al, 2009) descreveram a potencialidade deste composto em inibir o crescimento de células tumorais na próstata. Linhagens celulares como DU-145, PC-3 e LNCaP foram utilizadas nesta avaliação. A partir de ensaios de proliferação in vitro (utilizando como indicador de vitalidade o composto XTT), os cientistas mostraram que o ácido possui baixas concentrações inibitórias (DU-145: $15,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$; PC-3: $16,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e LNCaP: $20,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$), indicando alta potencialidade. Em outro estudo, esta molécula apresentou atividade contra os cânceres de pulmão, colón, estômago e cervical (Verma et al, 2013).

Figura 4- Estrutura molecular do ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico).



Peptídeos líticos e sua ação na membrana plasmática

Peptídeos líticos catiônicos são constituídos normalmente por 12 a 50 resíduos de aminoácidos e têm como características a anfipaticidade e a carga líquida positiva (Chen et al, 2012; Barua et al, 2010). Este caráter catiônico ocorre devido a presença de resíduos de aminoácidos básicos como arginina, lisina e histidina. Muitos modelos mostram que esse caráter é determinante para a atração inicial à superfície das membranas das células, principalmente as de câncer, que são mais negativas que as normais devido ao acúmulo de fosfatidilserina e ácido

siálico em suas membranas (Papo et al, 2003, Bechineer et al, 2006, Gaspar et al, 2012).

Muitos estudos foram realizados com peptídeos líticos catiônicos a fim de elucidar seus mecanismos de ação e entender o papel da estrutura destas moléculas em sua atividade biológica (Fuentes et al, 2011). Indiscutivelmente, a grande maioria destas moléculas interage eletrostaticamente com a superfície negativa da membrana plasmática da célula alvo (Fjell et al, 2012). A estrutura secundária destas moléculas é, em grande parte, induzida pelos lipídeos da bicamada, sendo que os peptídeos normalmente não estão estruturados em solução aquosa. Possíveis alterações na estrutura da membrana plasmática como formação de poro, alteração na curvatura, modificações eletrostáticas e perturbações localizadas provocam o desequilíbrio da estrutura da membrana causando a morte da célula. Os diferentes mecanismos de ação serão detalhados posteriormente (figura 5).

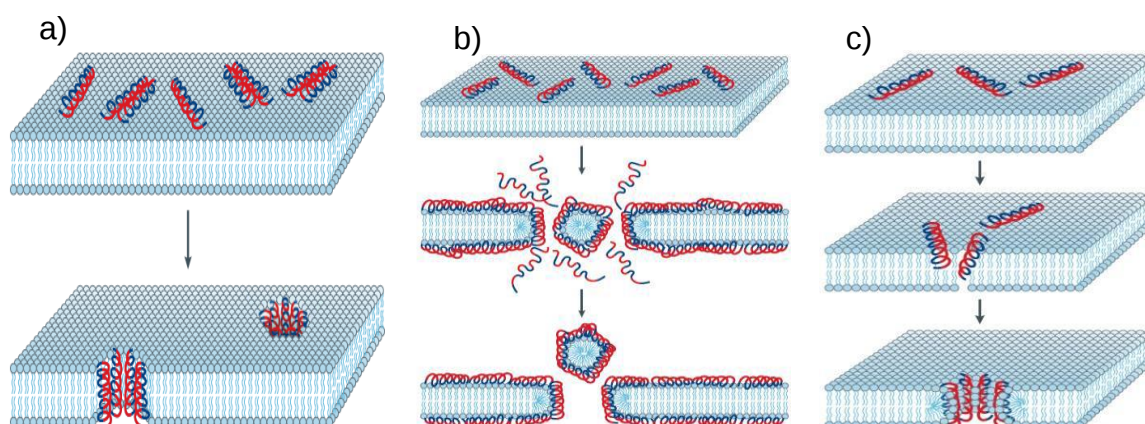
Sabe-se que a atividade de peptídeos catiônicos é consequência de uma combinação de fatores físico-químicos e estruturais (Boman, 2003), como tamanho, composição residual, carga líquida, estrutura secundária, hidrofobicidade e anfipaticidade. Segundo Yechiel Shai (1999), a permeabilidade de peptídeos líticos em membranas negativas e zwitteriônicas (eritrócitos) é crescente de acordo com a carga líquida da molécula, ou seja, quanto maior a carga positiva de peptídeos líticos maior será sua atividade e toxicidade (Shai, 1999). A seletividade destas moléculas a alguns tipos de células é explicada pela diferença de cargas da membrana alvo e, também, pelo caráter anfipático das hélices presentes em sua estrutura secundária. Desta forma, não apenas a carga está envolvida na seletividade, mas também a estrutura secundária da molécula.

Baseado nestas características, três mecanismos básicos de ação foram propostos para explicar os passos envolvidos no processo de permeação da membrana plasmática de bactérias e, possivelmente, de células cancerígenas. Estes mecanismos são importantes para caracterizar o modo de ação destas moléculas e entender sua atividade, seletividade e toxicidade, podendo ajudar no design de novos peptídeos e, também, de novos conjugados.

O modelo conhecido como “barrel-stave” descreve a formação de poros ou canais intramembranares na forma de barril (figura 5a). Neste modelo, a face

hidrofóbica do peptídeo interage com a cadeia hidrofóbica dos fosfolipídios da membrana e a superfície hidrofílica permanece com a face voltada para o interior, formando um poro orientado perpendicularmente à cadeia hidrocarbonada dos fosfolipídios. O estágio crucial deste mecanismo é o "recrutamento" de monômeros para formação e aumento no tamanho do poro. Energeticamente o processo de formação de poro seria inviável para apenas uma estrutura em alfa hélice do monômero, a junção de unidades peptídicas estruturadas similarmente facilita a formação de canais, rompendo o potencial transmembranal da célula e levando-a a morte (Shai, 1999). O mecanismo denominado "carpet-like" (figura 5b) propõe a permeabilização da membrana similar a ação de surfactantes. Assim, a partir de uma determinada concentração de peptídeos na superfície da membrana (sugerindo a forma de carpete) ocorre a formação de agregados micelares, iniciando o processo de permeabilização. No terceiro modelo proposto, os peptídeos promovem a formação de poros por meio de um mecanismo nomeado como "poro toroidal" (figura 5c). Este modelo propõe que os peptídeos permaneçam associados com as cabeças dos fosfolipídios, induzindo uma curvatura na bicamada lipídica, formando o poro. Este modelo difere do "barrel-stave", pois além dos peptídeos, as cabeças polares dos lipídios constituem o interior polar do poro formado (Castro, 2009).

Figura 5- Mecanismo de ação dos peptídeos catiônicos a) Barrel Stave b) Carpet Like c) Poro Toroidal.



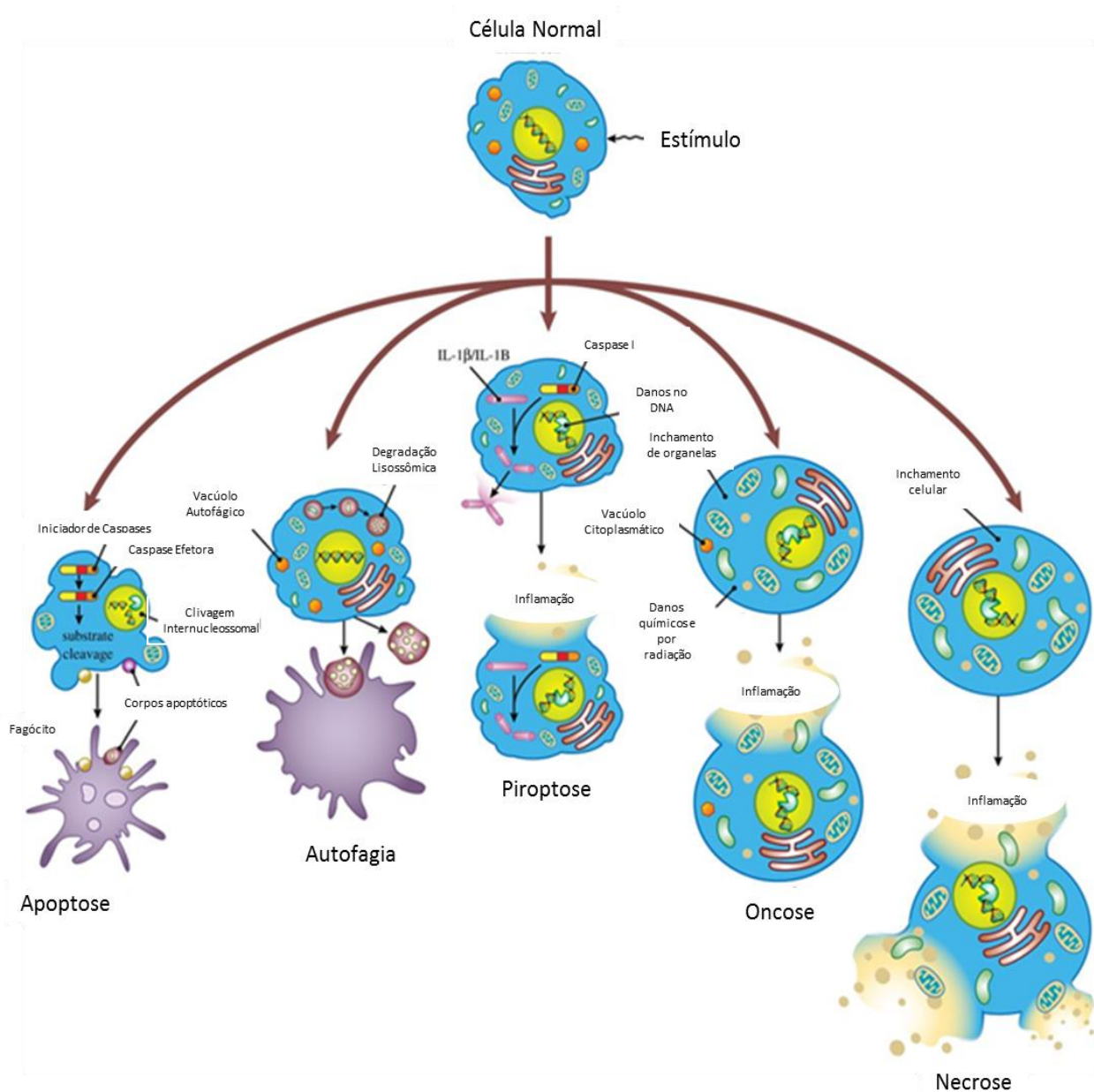
Fonte: Brogden, 2005.

Mecanismos de Morte Celular

O processo de morte celular é crucial para a manutenção de diversos eventos celulares como a morfogênese e a eliminação de células velhas (Arakawa et al, 2015). Desta forma, os tecidos mantem-se em perfeita organização e em constante processo de renovação celular. Dentre os processos de morte celular podem-se destacar a apoptose, necrose, autofagia, piroptose e oncoses, sendo a apoptose e necrose os mais comuns. Estes mecanismos diferenciam-se, principalmente, por suas bases moleculares de iniciação e desenvolvimento do processo, como ativação de caspases e interleucinas até mudanças morfológicas como formação de vacúolos citoplasmáticos, corpos apoptóticos, inchaço celular, etc (Zhang et al, 2015; Lozyand and Karantza, 2012; Kuo et al, 2011-Figura 6).

A necrose caracteriza-se como um processo incontrolável, atingindo vastas regiões da célula, causando danos na membrana plasmática e inchamento das organelas celulares com consequente extravasamento do material intracelular (Zhang et al, 2015). Por outro lado, a apoptose apresenta-se como um processo que atinge regiões individuais da célula e é caracterizada pela ativação de cisteíno-aspartato proteases (caspases) em uma reação em cadeia (cascata de caspases). Este mecanismo leva à diminuição do núcleo devido à condensação do material genético (formação de núcleos picnóticos) e diminuição do volume celular (Lozyand and Karantza, 2012). Esse processo de morte programada pode ser classificada de acordo com seu modo de iniciação em apoptose extrínseca, intrínseca e mitocondrial. A apoptose extrínseca é iniciada por fatores externos à célula (fármacos, hormônios, radiação, etc.), enquanto a intrínseca é iniciada por estímulos oriundos do interior da própria célula. A apoptose mitocondrial é caracterizada pela liberação de citocromos no citoplasma provenientes do interior da mitocôndria, consequência de danos causados na membrana desta organela (Kuo et al, 2011).

Figura 6- Mecanismos de morte celular evidenciando os processos de iniciação, desenvolvimento e finalização.



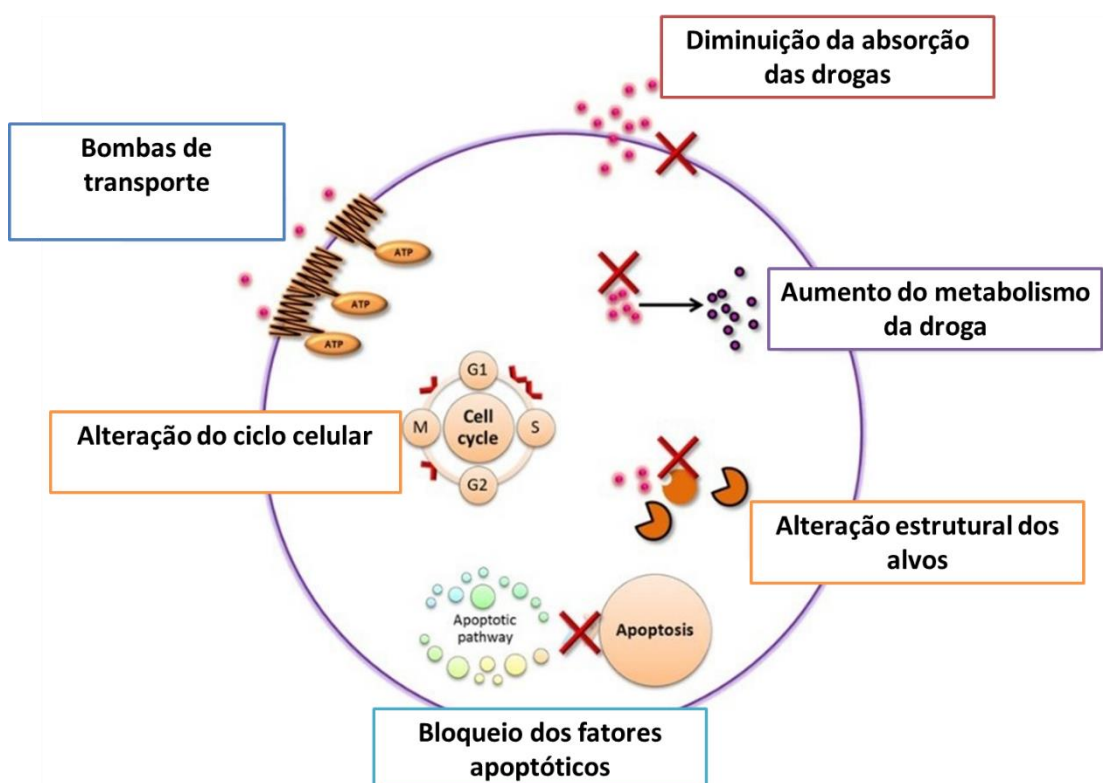
Fonte: Carl D. Bortner and John A. Cidlowski Phil. Trans. R. Soc. B, 2014 (Adaptada).

Mecanismos de Resistência de Células Tumorais

Apesar dos avanços no desenvolvimento de terapias para o tratamento de neoplasias, alguns tipos de tumores apresentam diminuição na resposta ao tratamento (Chai et al, 2010). Este decréscimo de eficiência é atribuído aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células tumorais que podem fazer

com que os medicamentos percam sua eficiência por meio de mudanças na estrutura molecular da droga, mudança na conformação dos alvos, diminuição da permeabilidade da membrana plasmática, diminuição da concentração da droga no interior da célula, alteração do ciclo celular e bloqueio de fatores apoptóticos (Figura 7).

Figura 7- Mecanismos de resistências desenvolvidos por células tumorais que levam à diminuição da resposta aos tratamentos existentes.



Fonte: Chai *et al.* *Chinese Medicine*, 2010 (Adaptada)

Bioconjugados

Bioconjugação é a estratégia química que consiste na junção de duas ou mais moléculas bioativas por meio de ligações químicas covalentes, dando origem a um novo composto (Lutz et al, 2008; Kopeck 2013). Os recentes avanços na compreensão de biomoléculas permitiram a sua aplicação em diversos campos da ciência como medicina, biomedicina, diagnóstico, planejamento de fármacos

materiais, etc. Biomoléculas sinteticamente modificadas podem apresentar funções importantes como rastreamento e localização de eventos celulares, elucidação de função enzimática, biomarcação, “drug delivery”, entre outros (Lutz et al, 2008; Francis et al, 2010). As estratégias mais comuns para obtenção destas estruturas são o acoplamento de uma molécula pequena como a biotina ou um corante fluorescente com uma proteína ou peptídeo. Outras moléculas menos comuns utilizadas em bioconjugação são oligossacarídeos, ácidos nucleicos, polímeros sintéticos como polietileno-glicol (PEG ou óxido de polietileno) e nanotubos de carbono. Conjugados anticorpo-droga, como Brentuximab Vedotin® e Gemtuzumab Ozogamicin® são exemplos de fármacos provenientes de bioconjugados aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) para produção e comercialização nos Estados Unidos.

Justificativa

Apesar dos avanços no tratamento de neoplasias, muitas drogas utilizadas atualmente para impedir a proliferação de células tumorais estão apresentando declínio em sua potencialidade devido aos diversos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas mesmas. Estes mecanismos, no entanto, estão localizados exclusivamente no interior da célula e limitam-se apenas à drogas que possuem sua ação em rotas metabólicas e organelas celulares. Sendo assim, o uso de peptídeos líticos para o tratamento de tumores mostra-se como uma alternativa promissora pois estes compostos interagem com os lipídeos da membrana plasmática contornando os mecanismos de resistência. Neste projeto foi sintetizado um novo composto baseado no peptídeo lítico Hecate e na molécula de origem natural ácido gálico a partir do acoplamento deste na região amino terminal do peptídeo. A estratégia de bioconjugação foi utilizada com intuito de melhoramento da atividade do peptídeo que teve sua potencialidade avaliada em células de carcinoma cervical humano. Os peptídeos líticos podem interagir com células neoplásicas por forças eletrostáticas e promover a morte celular, em alguns casos, de modo específico. O ácido gálico possui atividade citotóxica descrita na literatura. Desta forma, a avaliação deste conjugado poderia produzir um composto com maior atividade que os dois compostos individualmente e com maior seletividade. Somado a isto,

informações quanto a relação estrutura e atividade dos peptídeos líticos em células saudáveis e tumorais foram obtidas, buscando entender o mecanismo de ação destes compostos frente a membrana celular e os mecanismos de morte ocasionados pelos mesmos.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da conjugação do Ácido Gálico com o peptídeo lítico Hecate, comparando a atividade destes compostos (individualmente ou conjugados) em células de carcinoma cervical humano, queratinócitos não tumorais e hemácias. Somado a isto, as estruturas secundárias serão obtidas, buscando a elucidação do mecanismo de ação do peptídeo lítico e do conjugado em células tumorais e não tumorais.

Objetivos Específicos

Sintetizar, purificar e caracterizar o peptídeo lítico Hecate (FALALKALKKALKKLKKALKKAL-CONH₂) e seu conjugado Ácido Gálico-Hecate (AG-FALALKALKKALKKLKKALKKAL-CONH₂; AG-Hecate) por meio das técnicas de síntese de peptídeos em fase sólida, cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas, respectivamente.

Avaliar a atividade biológica dos compostos frente à células tumorais, queratinócitos não tumorais e hemácias, avaliando a potencialidade e toxicidade dos sintéticos.

Avaliar a relação entre estrutura secundária e função biológica dos compostos.

Propor um mecanismo de ação para os peptídeos líticos baseado nos mecanismos descritos para os peptídeos catiônicos.

Materiais e Métodos

Síntese

O composto Ácido gálico foi adquirido da empresa Sigma Aldrich. Todos os aminoácidos, bem como os ativadores DIC e HOBt, foram adquiridos das empresas Nova Biochem Corp, Synpep e/ou Advanced Chem Tech. Os solventes DMF e DCM foram adquiridos da empresa LabSynth; e NMP (N-metilpirrolidona) oriundo da empresa Acros Organics (USA).

Os peptídeos utilizados neste estudo foram obtidos manualmente pelo método de SPFS por meio da estratégia Fmoc. O protocolo de síntese química consiste de passos cíclicos de desproteção e acoplamento, intercalados por lavagens, para eliminação do excesso de reagentes utilizados e subprodutos obtidos. O acoplamento foi realizado pela ativação dos grupos carboxila do Fmoc-aminoácido acoplante com N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC)/N-Hidroxibenzotriazol (HOBt), durante duas horas de agitação e utilizando como solvente uma mistura com 20% de dimetilformamida (DMF) em diclorometano (DCM). Nesta etapa, um excesso de Fmoc-aminoácidos e agentes acoplantes de 2 vezes em relação ao número de sítios reativos existentes na resina foi utilizado. A desproteção do grupo amino após acoplamento, ou seja, a retirada do grupo Fmoc base-lábil foi realizada por meio da reação com uma solução 20% 4-metil-piperidina em DMF durante 20 minutos. Entre cada passo foram efetuadas lavagens subsequentes com os solventes orgânicos DMF e DCM. A resina utilizada foi a Rink amida, própria da química Fmoc/tBu para a obtenção de peptídeo com a extremidade C-terminal amidada. Os aminoácidos utilizados durante a síntese foram: Fmoc-Ala, -Leu e -Lys(Boc) e Trp(Boc). Esse último foi adicionado na extremidade N-terminal da cadeia do peptídeo Hecate para os estudos de fluorescência. O ácido gálico foi acoplado à cadeia peptídica como se fosse um aminoácido por meio do grupo ácido carboxílico existente na molécula. O sucesso de cada etapa de acoplamento/desproteção foi monitorado empregando-se o teste de ninidrina (KAISER et al., 1970). A clivagem foi realizada com 95% de ácido trifluoroacético (TFA); 2,5% de Triisopropilsilano (TIS) e 2,5% de água (v:v:v) durante duas horas, seguido de precipitação com éter gelado e extração com solvente A (solução de TFA 0,045% em água). Após liofilização, os compostos foram

purificados em um HPLC com coluna em fase reversa C₁₈ (25 x 2,12 cm) utilizando gradiente linear de 35 a 65% de Solvente B (solução de TFA 0,036% em água) durante 120 minutos. Após purificação as frações foram analisadas em um HPLC analítico em coluna de fase reversa C₁₈ (25 x 0,46 cm) utilizando um método gradiente linear de 5 - 95% de solvente B em 30 min e fluxo de 1 mL.min⁻¹. O comprimento de onda de detecção foi de 220 nm, comprimento de onda de absorção das ligações peptídicas (amida). A obtenção dos produtos foi confirmada por meio de espectrometria de massas em modo eletrospray com carregamento positivo. Apenas frações com pureza acima de 95% foram utilizadas nos experimentos.

Cultura Celular

Células de carcinoma cervical humano (HeLa) e queratinócitos não tumorais imortalizados (HaCat) foram mantidos em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1x de aminoácidos não essenciais, 100 U.mL⁻¹ de penicilina e 100 µg.mL⁻¹ de estreptomicina em garrafas de culturas plásticas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

Viabilidade Celular

As linhagens celulares HeLa e HaCat (5x10³ células/poço) foram adicionadas em placas de 96-poços e incubadas por 24 h antes do tratamento com os compostos. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram substituídos por 100 µL de meio de cultura DEMEM suplementado com peptídeos em concentrações de 0,100 mg.mL⁻¹ – 0,003125 mg.mL⁻¹. Os efeitos dos compostos nas células foram determinados após 1 h, 24 h e 48 h de incubação. Após o tempo determinado, os sobrenadantes foram removidos e 100,0 µL de uma solução de “Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolil” (MTT) foi adicionada em cada poço e a placa incubada durante 30 min a 37°C. Após incubação com MTT os cristais formados foram solubilizados com 100 µL de DMSO (Dimetil sulfóxido) e a absorbância da solução foi medida a 570 nm (Batista et al 2014).

Morfologia Celular

Micrografias foram obtidas por meio de um microscópio invertido Zeiss AxioVert A1. As células foram fotografadas após 0 h, 1 h, 24 h e 48 h de incubação com os compostos em placas de 96-poços.

Ensaio de Morte Celular por Necrose

O mesmo processo de incubação das células com os compostos foi realizado contando apenas o tempo de 24 h de incubação. Após este período o meio foi removido de cada poço e as células lavadas 3x com PBS. Em seguida, foram adicionados 30 μ L de Iodeto de propídeo (PI). Após 10 min foi retirado o PI e os poços lavados com PBS. Subsequente foram adicionados 30 μ L de “4,6-diamidino-2-fenil-indol” (DAPI) com repouso de 10 min, seguido de lavagem com PBS. Para fixar as células foi utilizado paraformaldeído 10% durante 12 min. As imagens foram obtidas em 20 diferentes campos por meio de um microscópio de fluorescência Zeiss AxioVert A1. As células necróticas marcadas em vermelho foram quantificadas por contagem direta.

Ensaio Hemolítico

1 mL de sangue fresco foi transferido para um tubo de 2 mL completando-se o volume do tubo com tampão PBS. Centrifugou-se a solução a 500 g por 5 min. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e o processo repetido mais duas vezes. Os eritrócitos foram diluídos 25x em tampão PBS, constituindo assim a solução de eritrócitos que foi utilizada no teste.

Os compostos foram diluídos em série em tampão PBS e alocados em tubos de 2 mL. Foram feitos seis pontos de diluição iniciando de uma solução de 0,1 mg.mL⁻¹ a 0,003125 mg.mL⁻¹. O controle negativo (0% de hemólise) foi preparado adicionando-se 100 μ L de PBS em um tubo de 2 mL e o controle positivo (100% de hemólise) foi preparado adicionando em 100 μ L de uma solução de triton 1% em outro tubo. Aos tubos contendo os compostos diluídos e aos controles foram adicionados 100 μ L de solução de eritrócitos. Os tubos foram incubados a 37°C

durante 1 h. Após este período, as soluções foram centrifugadas a 500 g durante 5 min. 100 µL do sobrenadante foram transferidos para cada poço em uma placa de 96 poços transparente. As análises foram realizadas em duplicata e lidas em um leitor de placas em um comprimento de onda de 540 nm.

A porcentagem de hemólise foi calculada utilizando a relação:

$$\text{Porcentagem de Hemólise (\% Hemólise)} = \frac{(\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. PBS})}{(\text{Abs. Triton} - \text{Abs. PBS})}$$

Ensaio de Proteção Osmótica

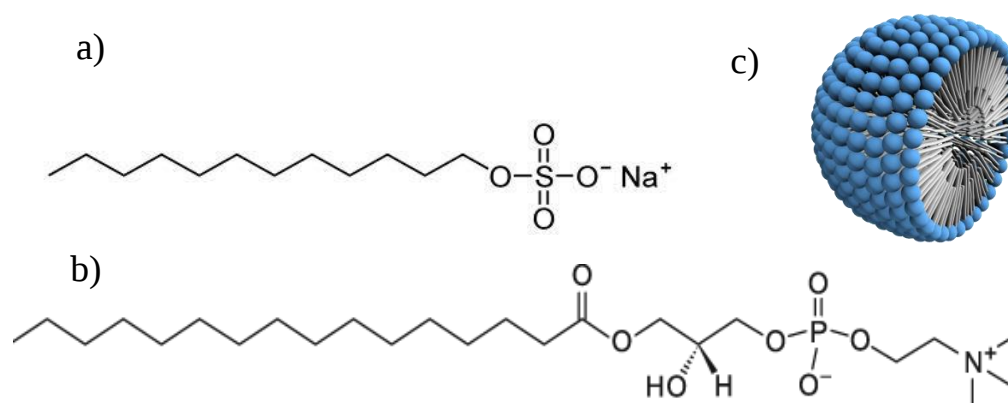
Visando determinar o mecanismo de ação envolvido na ação dos compostos sobre a membrana dos eritrócitos foi realizado o teste de proteção osmótica utilizando o protocolo descrito por Zaragoza et al. (2010) com as correspondentes modificações. Uma solução de hemácias (preparada da mesma forma que para o teste de atividade hemolítica) contendo 30 mmol.L⁻¹ de diferentes protetores osmóticos foi colocada em contato com os compostos estudados e a porcentagem de hemólise em presença dos diferentes protetores osmóticos foi determinada (da mesma forma que para o teste de atividade hemolítica). Os seguintes protetores foram utilizados: PEG200 (diâmetro médio ≈0,9 nm); PEG300 (≈1,2 nm); PEG400 (≈1,4 nm); PEG900 (≈1,7 nm); PEG1500 (≈2,4 nm); PEG2000 (≈2,7 nm); PEG3000 (≈3,0 nm). O teste foi realizado em triplicata. Este ensaio utiliza moléculas de diâmetro hidrodinâmico conhecido que podem, dependendo do tamanho entrar ou não nas hemácias através dos poros formados pelos peptídeos. Moléculas com tamanho maior que o poro formado promovem a inibição da ação hemolítica, já que a pressão osmótica fica balanceada. Caso não haja proteção em nenhum dos protetores utilizados, o mecanismo de "carpet like" pode estar relacionado com o mecanismo predominante.

Interação com Micelas

Análises utilizando miméticos de membranas foram realizadas por meio da titulação dos compostos com o detergente aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS - figura 8a) e o detergente zwitteriônico 1-palmitoil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina

(LPC- figura 8b) adquirido da Avanti Polar Lipids. Estas moléculas formam micelas (figura 8c) em contato com a água, que são estruturas macromoleculares que mimetizam o ambiente de uma membrana biológica. Para estes estudos o peptídeo Hecate foi marcado com uma sonda fluorescente (aminoácido triptofano) e o composto AG-Hecate teve como fluorescente a própria molécula de ácido gálico. O parâmetro utilizado para analisar a interação dos compostos com os miméticos foi o comprimento de onda máxima de emissão ($\lambda_{\text{máx}}$). Nestes estudos, soluções estoque dos detergentes foram preparadas (SDS 200 mmol.L⁻¹ e LPC 100 mmol.L⁻¹) e armazenadas sob refrigeração. As concentrações utilizadas durante a titulação variaram de 0 a 25 mmol.L⁻¹ para o detergente SDS e 0 a 5 mmol.L⁻¹ para o LPC. O comprimento de onda de excitação foi de 295 nm para o Hecate contendo o triptofano e de 260 nm para o AG-Hecate.

Figura 8- Surfactantes usados na formação das micelas (a e b). Estrutura de uma micela (c).



Dicroísmo Circular

Os espectros de CD foram adquiridos em um espectropolarímetro Jasco J-815, em celas de 1,0 mm de caminho óptico com 6 varreduras por espectro com tempo de integração de 3 s por ponto. Para todos os experimentos a leitura foi feita a cada 0,5 nm. Neste estudo foram preparadas soluções estoques dos diferentes compostos em água, para posterior diluição a 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão PBS. As soluções dos compostos foram tituladas com detergente SDS e LPC, em concentrações de 0 a 25 mmol.L⁻¹ e 0 a 5 mmol.L⁻¹, respectivamente. O cálculo da

helipticidade molar $[\Theta]$, utilizado para converter os dados coletados inicialmente em *milidegree*, foi feito utilizando a seguinte fórmula (Casallanovo et al,2006):

$$[\Theta] = \frac{\text{valor (em milidegree)}}{10 \times l \times [\text{peptídeo}] \times \text{n}^\circ \text{ de aa}}$$

Onde no numerador é inserido o valor obtido em *milidegree* pelo equipamento, l é o caminho óptico utilizado na cubeta (0,1 cm), $[\text{peptídeo}]$ é a concentração de peptídeo usada no experimento em mol.L^{-1} e $\text{n}^\circ \text{ de aa}$ é a quantidade de resíduos de aminoácidos presentes na molécula.

A helipticidade foi calculada usando a fórmula $\text{máx}[\theta]_{222} = -40.000 \times [(1 - 2,5/n)] + (100 \times T)$, onde n é o número de resíduos de aminoácidos e T indica a temperatura em $^\circ\text{C}$. A porcentagem de alfa-hélices foi obtida por meio da equação $100 \times [\theta]_{222}/\text{máx}[\theta]_{222}$ (Jamabshi et al. 2014).

Permeabilização de Vesículas

Filmes lipídicos contendo POPC:Coolesterol (9:1) e POPC:POPS (9:1) foram preparados em uma concentração de 15 mmol.L^{-1} . Após solubilização dos lipídeos em solução de clorofórmio/metanol (4:1;v:v) a solução foi exposta a um fluxo de nitrogênio gasoso para evaporação do líquido e formação do filme lipídico. Após secagem sob vácuo, para completa eliminação de solventes, adicionou-se solução contendo o fluoróforo carboxifluoresceína (CF-50 mmol.L^{-1}). A mistura foi aquecida a 60°C , sonicada e agitada em períodos iguais de 10 min durante uma hora para a formação das vesículas encapsuladas com CF. Após este período a mistura foi submetida à um extrusor obtido da Avanti Polar Lipids para obtenção de vesículas unilamelares. A solução obtida foi posteriormente aplicada em uma coluna de exclusão molecular com resina Sephadex G20 para separação da CF não encapsulada. A ação dos compostos sobre estas vesículas foi acompanhada pela liberação do fluoróforo em um espectrofluorímetro Cary Eclipse VARIAN, com comprimentos de onda ajustados em 492 nm e 517 nm, para a excitação e emissão, respectivamente.

Análise Estatística

Os gráficos de viabilidade celular e hemólise foram obtidos a partir de três eventos independentes. As análises estatísticas foram realizados por one-way ANOVA with Tukey's post test usando o Software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os demais testes foram realizados em triplicata e analisados utilizando o software Origin ProLab 8. As análises estatísticas foram realizadas considerando o desvio padrão.

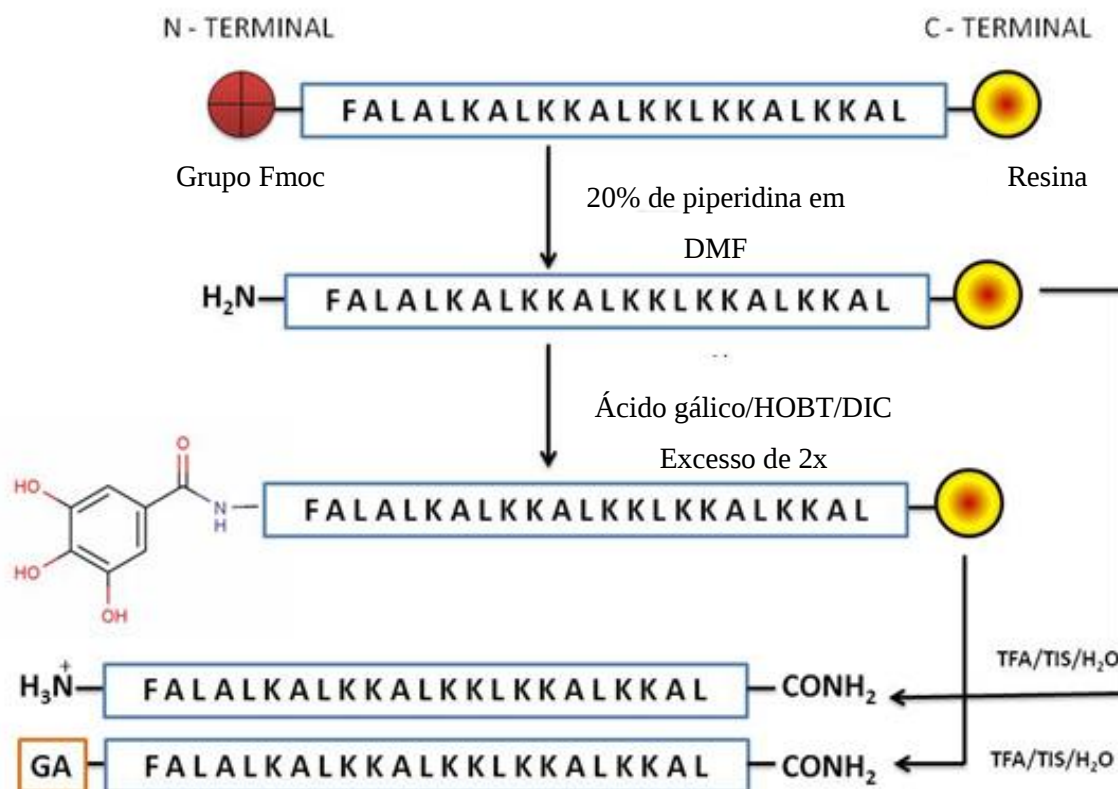
Resultados e Discussão

A bioconjugação é uma estratégia moderna para a síntese de novos compostos com potencial biológico (Golubeva et al 2012; Hirata and Nokihara 2014; Lebedyeva et al 2014). Neste trabalho foram sintetizadas e avaliadas duas moléculas: 1) peptídeo lítico Hecate e 2) o conjugado Ácido Gálico - Hecate (AG-Hecate). O composto Ácido gálico também teve sua atividade avaliada.

Síntese

O peptídeo Hecate foi sintetizado em uma escala de 0,7 mmol. Ao final da síntese 0,16 mmol deste material foi clivado para obtenção do peptídeo livre. A quantidade correspondente a 0,16 mmol de peptidil-resina foi retirada para síntese do composto Ácido Gálico – Hecate. O material remanescente (0,38 mmol) foi guardado em frasco de cintilação vedado e sob refrigeração. As etapas finais utilizadas na obtenção dos dois peptídeos estão descritas na figura 9.

Figura 9- Síntese dos compostos Hecate e AG-Hecate pela técnica de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.



Fonte: Próprio autor.

Utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), os compostos foram submetidos à purificação com intuito de separar os contaminantes do material sintetizado. Os peptídeos Hecate e AG-Hecate foram obtidos com 99% e 96% de pureza, respectivamente. Os dados de síntese e caracterização estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1- Dados obtidos da síntese e caracterização dos compostos Hecate e AG-Hecate.

Composto	Rendimento (%)	Tempo de Retenção (min) ^a	Massa (Da)	
			Observada ^b	Calculada
Hecate	68,3	17,6	2535,6	2536,4
*AG – Hecate	61,8	22,1	2688,0	2688,4

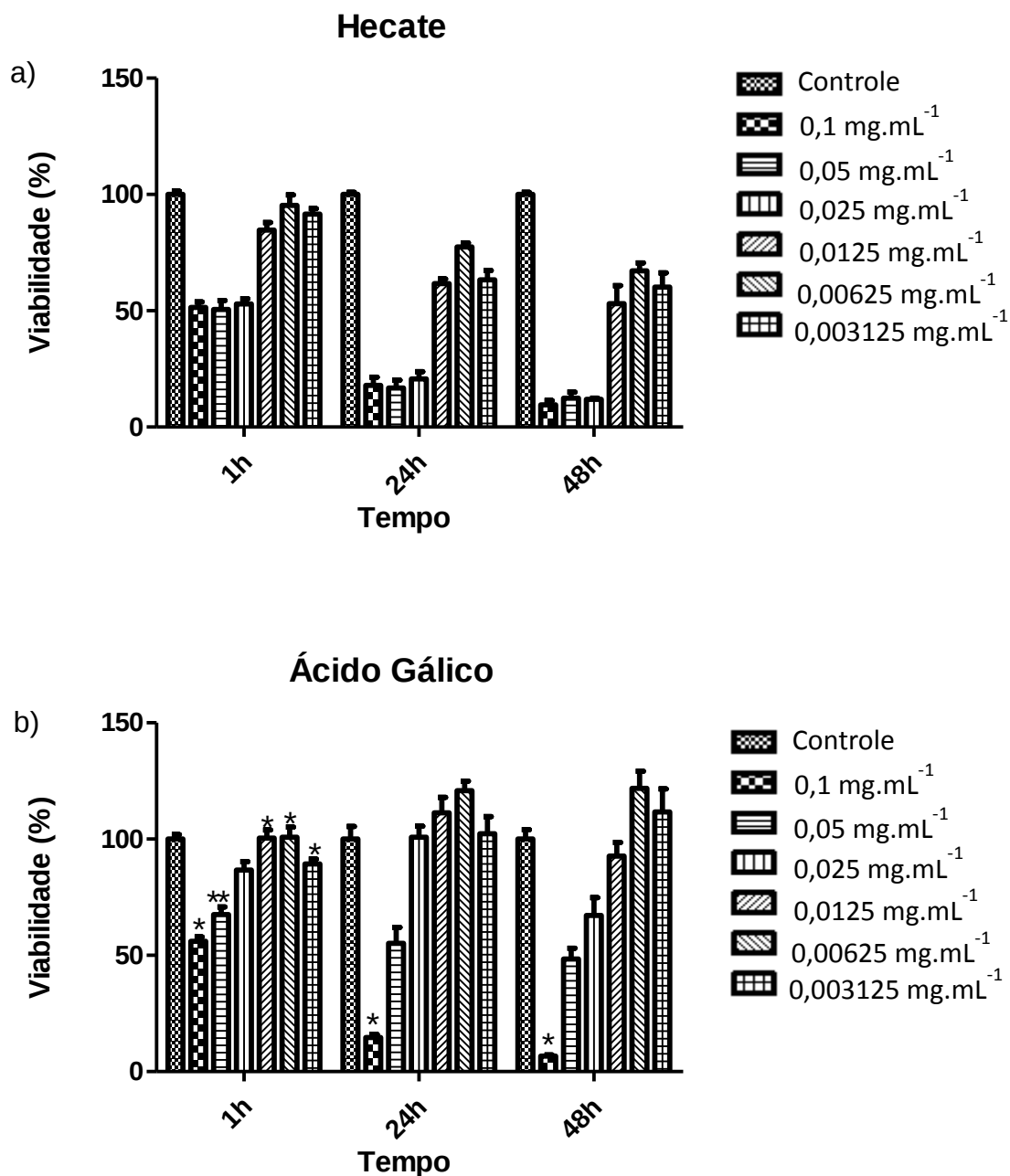
- a- Determinado por CLAE em fase reversa.
 - b- Observado por meio de espectrometria de massas.
- *AG - Ácido Gálico

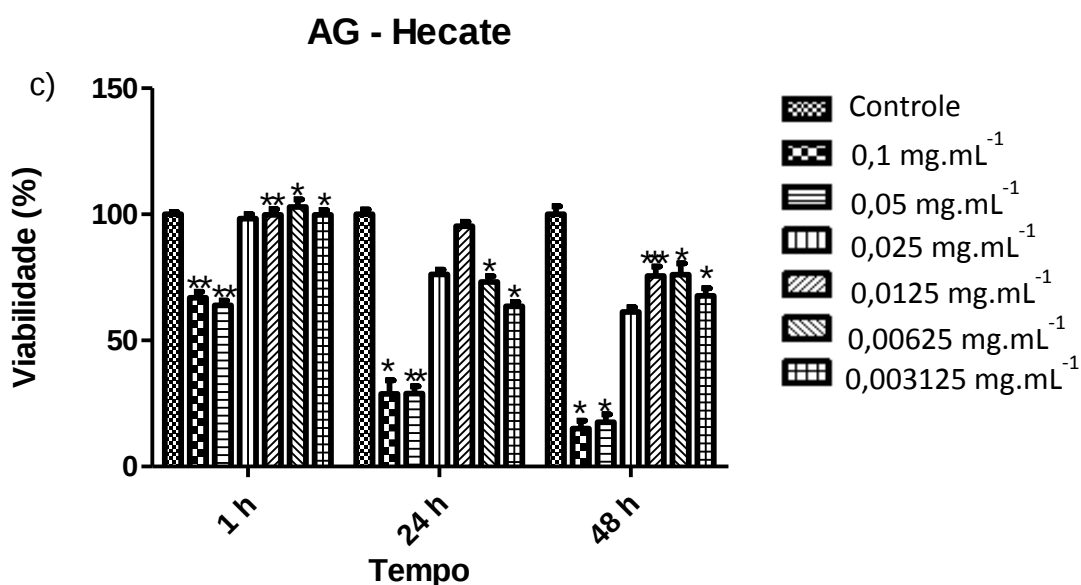
Ensaio Biológico

Viabilidade Celular

O ácido gálico, o Hecate e o conjugado AG-Hecate tiveram suas atividades avaliadas contra células de câncer cervical (HeLa) e células não tumorais de queratinócitos (HaCat). O peptídeo lítico Hecate reduziu a viabilidade celular das células tumorais a 50% depois de 1 h de incubação (figura 10a) nas concentrações de 0,1; 0,05 e 0,025 mg.mL⁻¹. Após 24 h e 48 h, o peptídeo continuou agindo e reduziu a viabilidade celular para cerca de 30% e 20%, respectivamente. O tempo de incubação de 1 h foi utilizado pois imediatamente após colocados os compostos em contato com as células estas apresentavam mudanças em sua morfologia. Sendo assim, o teste de viabilidade neste tempo mostrou que houve morte celular já na primeira hora. A atividade do ácido gálico nas células tumorais mostrou-se eficiente nas concentrações mais altas (0,1 e 0,05 mg.mL⁻¹), não agindo sobre as células em concentrações inferiores (figura 10b). Os dados obtidos também mostraram que a conjugação do ácido gálico ao peptídeo diminuiu a atividade, principalmente na concentração de 0,025 mg.mL⁻¹ (figura 10c).

Figura 10- Comparação entre a atividade antitumoral dos compostos em células de câncer cervical humano da linhagem HeLa após tratamento com diferentes concentrações do (a) peptídeo Hecate (b) Ácido Gálico (c) AG - Hecate. *p > 0,05 vs Hecate **p < 0,05 vs Hecate ***p < 0,01 vs Hecate.





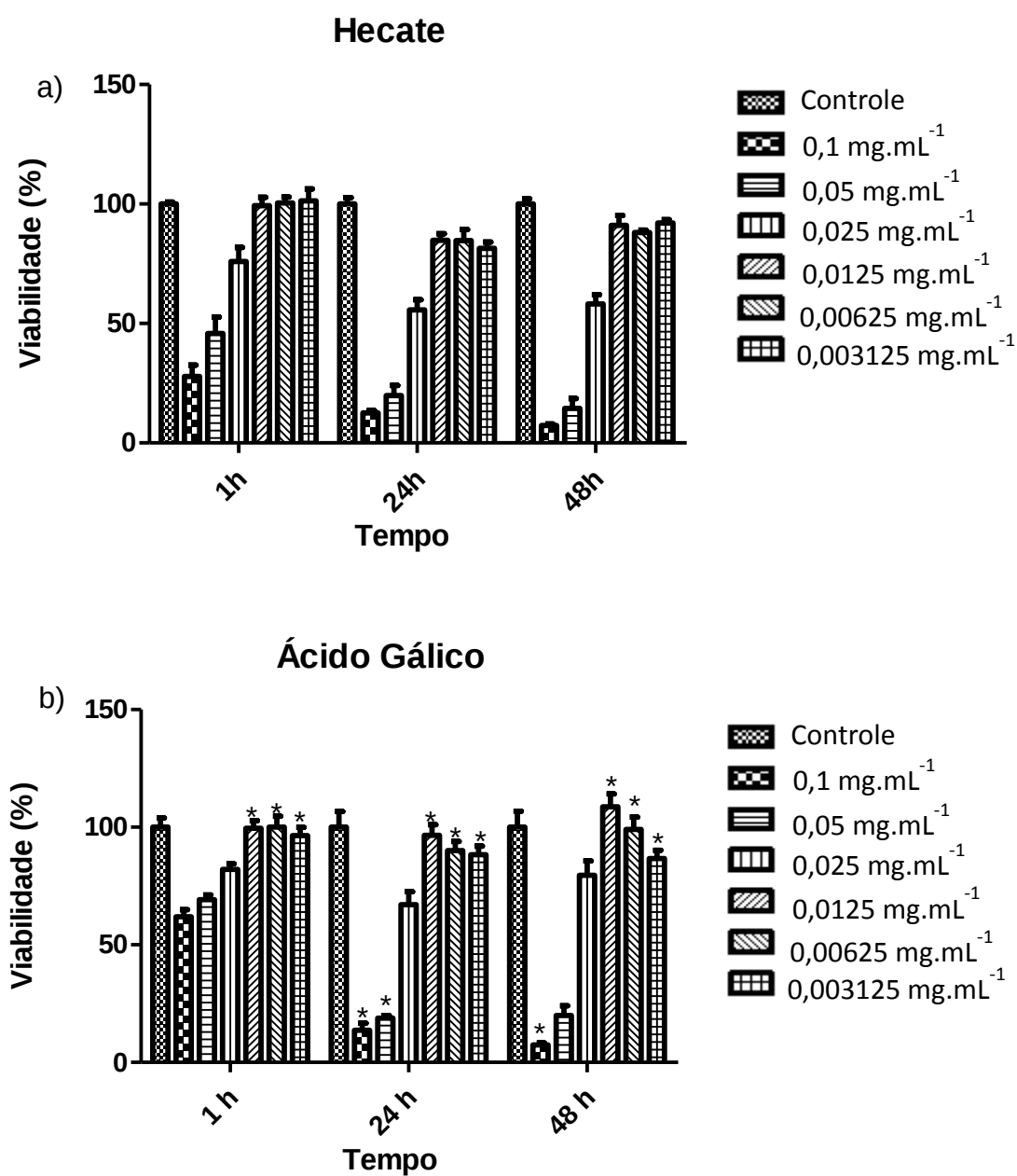
Ensaio de Toxicidade

Para avaliar a toxicidade dos compostos, ensaios de viabilidade celular em queratinócitos não tumorais (HaCat) utilizando a metodologia de redução de sal de MTT e ensaio hemolítico em eritrócitos humanos foram realizados. Os ensaios de viabilidade celular em HaCat (figura 11) mostraram que o peptídeo Hecate apresenta menor ação sobre as células na concentração de 0,025 mg.mL⁻¹ quando comparado com a mesma concentração na linhagem de carcinoma cervical. Após 24 e 48 h de incubação resultados similares foram obtidos para as concentrações de 0,1 e 0,05 mg.mL⁻¹ (figura 11a). Da mesma forma que nas células tumorais, o conjugado AG-Hecate apresentou menor atividade em células não tumorais (figura 11c). Estes resultados mostram que a incorporação do ácido gálico à região amino terminal do peptídeo diminui a atividade do peptídeo em células tumorais e células não tumorais.

Na concentração de 0,025 mg.mL⁻¹ o peptídeo livre apresentou cerca de 15% de hemólise (figura 12), indicando que nesta concentração, além de alta atividade contra células da linhagem HeLa de câncer cervical, o composto apresentou baixa toxicidade em células de queratinócitos não tumorais (HaCat) e também, baixa atividade hemolítica, elucidando uma provável concentração segura para administração em seres vivos. As demais concentrações apresentaram hemólise menor que 50%. Quando se analisa o conjugado AG-Hecate, evidencia-se alta

atividade hemolítica, apresentando valores superiores ou iguais a 50% de hemólise até a concentração de 0,025 mg.mL⁻¹.

Figura 11- Comparação entre a atividade citotóxica dos compostos em células de queratinócitos não tumorais humanos da linhagem HaCat após tratamento com diferentes concentrações dos compostos (a) peptídeo Hecate (b) Ácido Gálico (c) AG - Hecate. *p > 0,05 vs Hecate **p < 0,05 vs Hecate ***p < 0,01 vs Hecate.



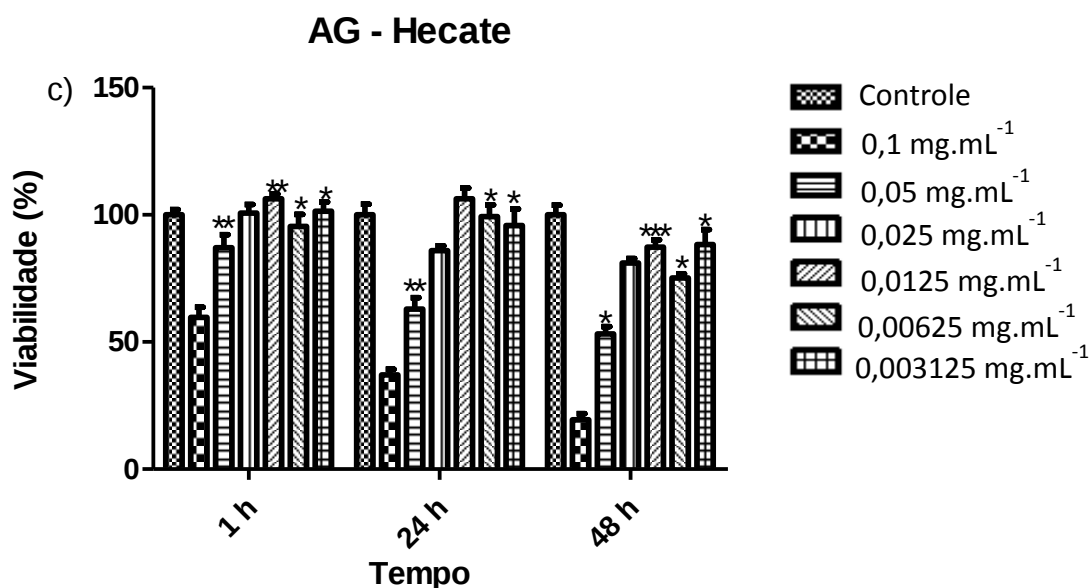
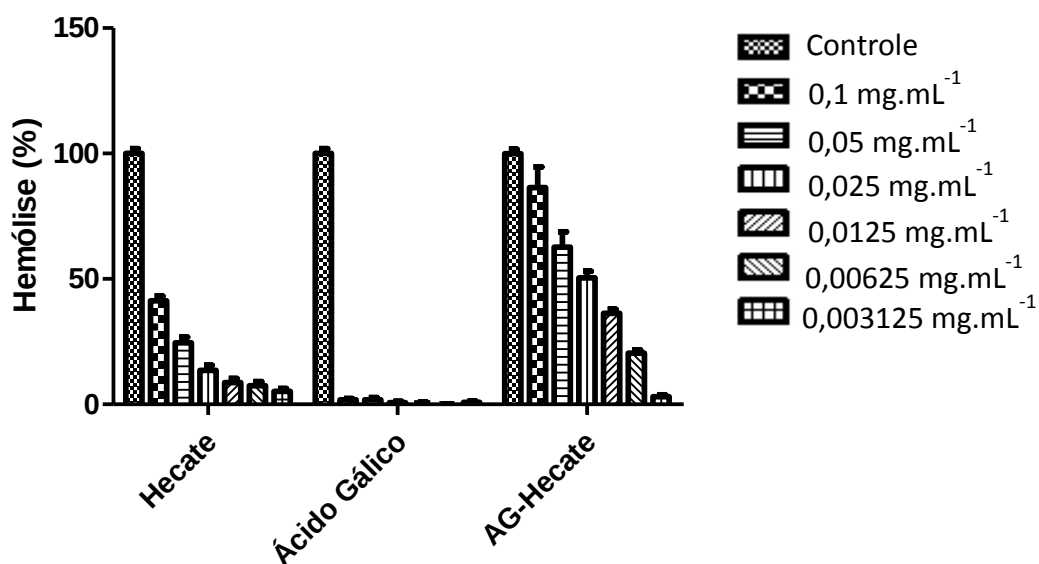


Figura 12- Atividade Hemolítica dos compostos Hecate, Ácido Gálico e AG - Hecate.



Os resultados de hemólise mostraram que o ácido gálico não apresenta atividade hemolítica nas concentrações testadas. Desta forma, o composto AG-

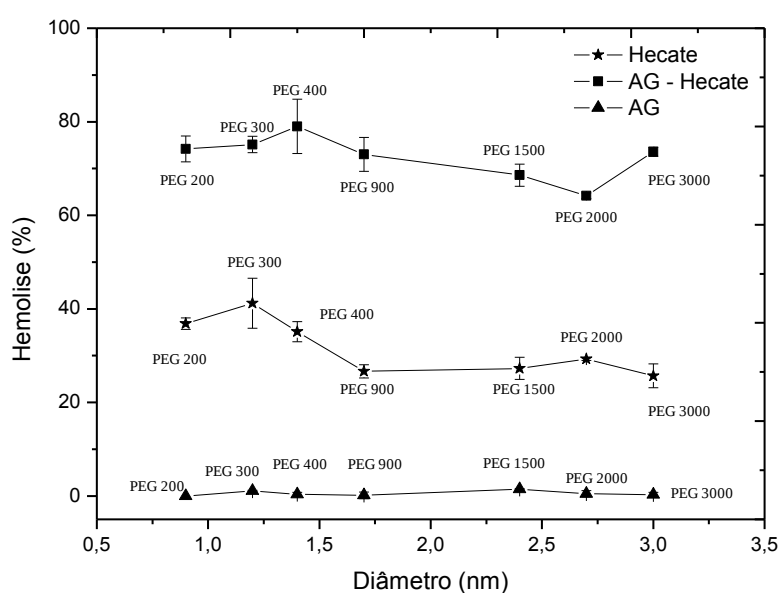
Hecate apresentou a maior atividade hemolítica dos três compostos avaliados. Esta diferença de atividade pode ser explicada pela diferente composição lipídica entre as membranas das células tumorais, não tumorais e eritrócitos. Enquanto os eritrócitos contêm em sua maioria fosfolipídios dipolares (zwitteriônico) na face externa, as células tumorais apresentam maior quantidade de fosfatidilserina (negativo) (Riedl et al, 2011; Riedl et al, 2015). Somado a isto, modificações na região N-terminal também mostraram mudanças na atividade biológica de outros peptídeos (Cilli et al, 2007). A modificação na carga desta região também mudou a seletividade do peptídeo Hylina a1 contra bactérias gram negativas (Crusca et al, 2009).

Ensaio de Proteção Osmótica

Buscando avaliar o mecanismo de ação dos compostos, ensaios de proteção osmótica utilizando polietileno glicol (PEG) de variados diâmetros foram realizados na concentração de 0,1 mg.mL⁻¹.

Figura 13- Efeito dos protetores osmóticos na atividade hemolítica dos compostos Hecate

(—★—), AG-Hecate (—■—) e Ácido gálico (—▲—), concentração de 0,1 mg.mL⁻¹.



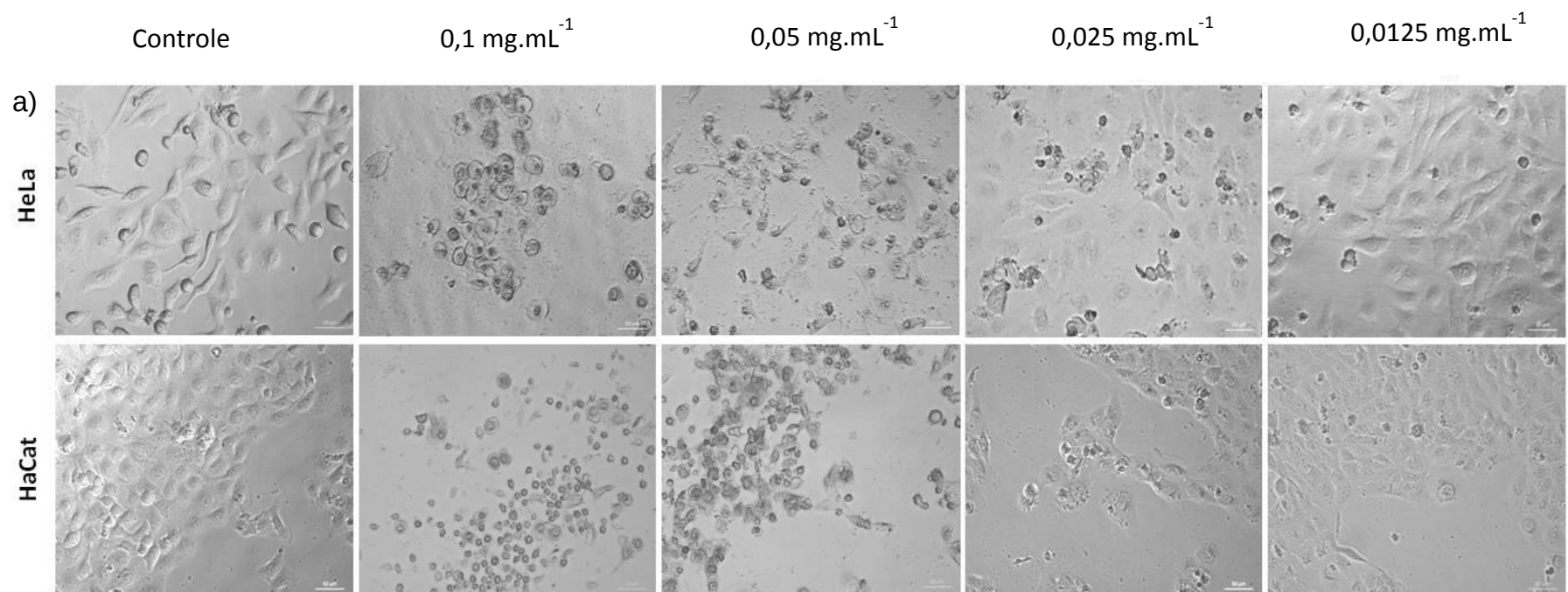
Por meio da análise dos resultados podemos destacar um comportamento diferente do peptídeo e de seu conjugado (figura 13). O conjugado AG-Hecate apresentou proteção osmótica em PEGs de massa molar acima de 2000 g.mol⁻¹, enquanto o peptídeo livre apresentou proteção a partir do PEG 900 (≈1,2 nm). No entanto, nenhum dos peptídeos apresentou uma diminuição acentuada de hemólise com a adição dos protetores. Podemos inferir que, tanto o peptídeo Hecate quanto o AG-Hecate, apresentam um comportamento que não seja somente de formação de poros na membrana dos eritrócitos. No entanto, poros transientes poderiam estar sendo formados. Isso pode ser evidenciado pela diminuição da hemólise em PEGs com diâmetro entre 1,4 e 2,7 nm para o conjugado e de 1,2 e 1,7 nm para o peptídeo Hecate. A ausência de uma proteção acentuada e a ocorrência da liberação de hemoglobina mesmo com a adição dos PEGs, nos induz a acreditar sobre a existência do mecanismo de “carpet like” em ambos os compostos.

Morfologia Celular

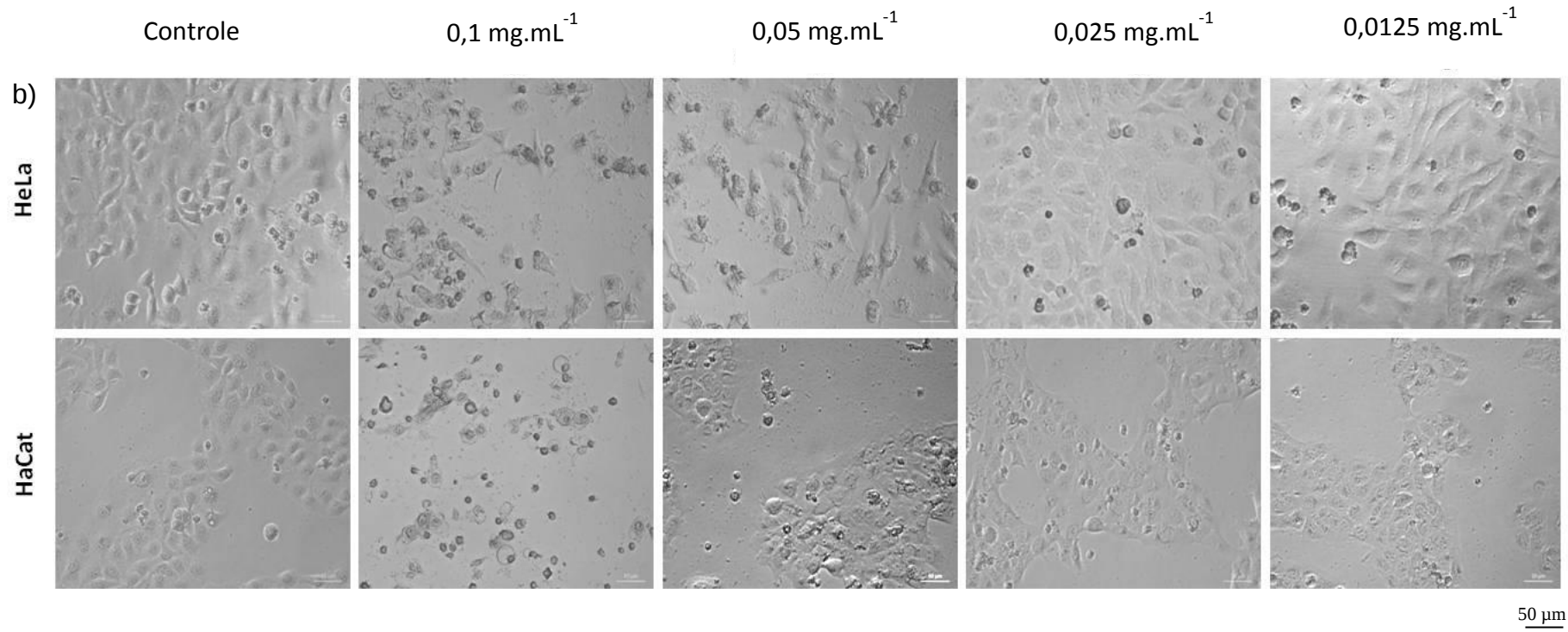
Objetivando-se obter informações sobre o mecanismo de ação dos compostos sintetizados na membrana plasmática, estudos de morfologia celular das células HeLa e HaCat foram realizados após incubação com diferentes concentrações dos compostos (0,1-0,0125 mg.mL⁻¹). As células expostas às moléculas mostraram mudanças morfológicas logo após o tratamento permanecendo após 24 h de incubação (figura 14).

Analizando as imagens e os testes de viabilidade celular com MTT, nota-se que, para o peptídeo livre Hecate, na concentração de 0,025 mg.mL⁻¹ não há mudanças morfológicas bruscas nas células como nas concentrações de 0,1 e 0,05 mg.mL⁻¹. No entanto, a viabilidade celular é a mesma para estas concentrações. Estes resultados nos levam a crer que, em concentrações abaixo de 0,1 mg.mL⁻¹, principalmente em 0,025 mg.mL⁻¹, o peptídeo induza a morte celular por mais de um mecanismo.

Figura 14- Imagens das células após tratamentos com os compostos. Células das linhagens HeLa e HaCat foram expostas a concentrações de 0-0,0125 mg.mL⁻¹ dos compostos Hecate (a) e AG - Hecate (b). As imagens mostradas foram tiradas após 24 h de incubação.



50 μ m

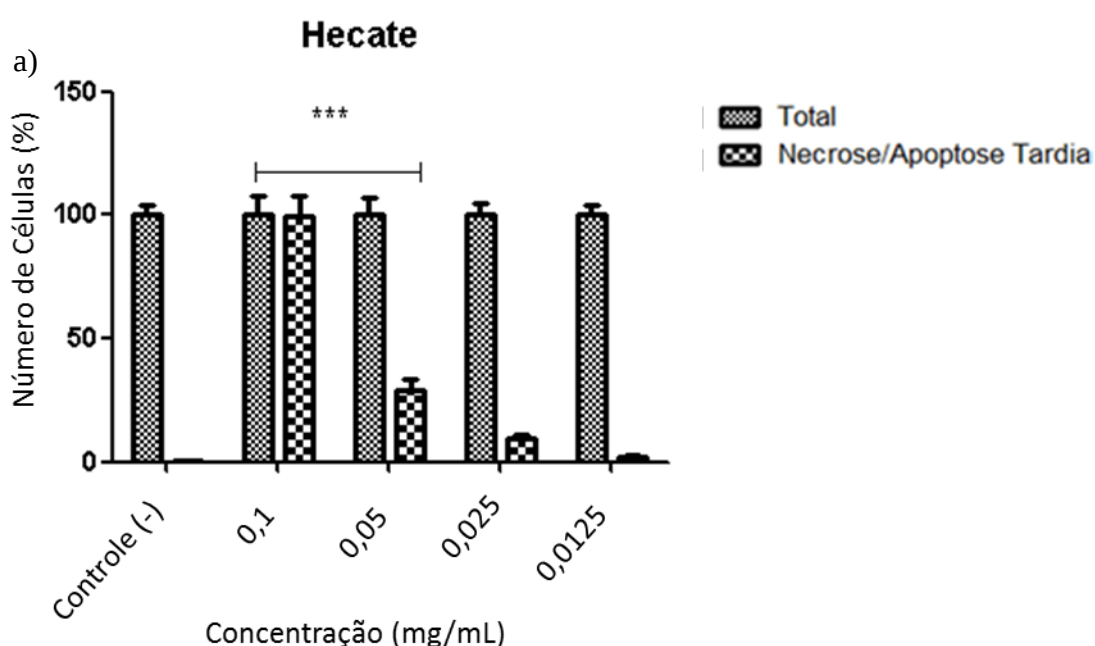


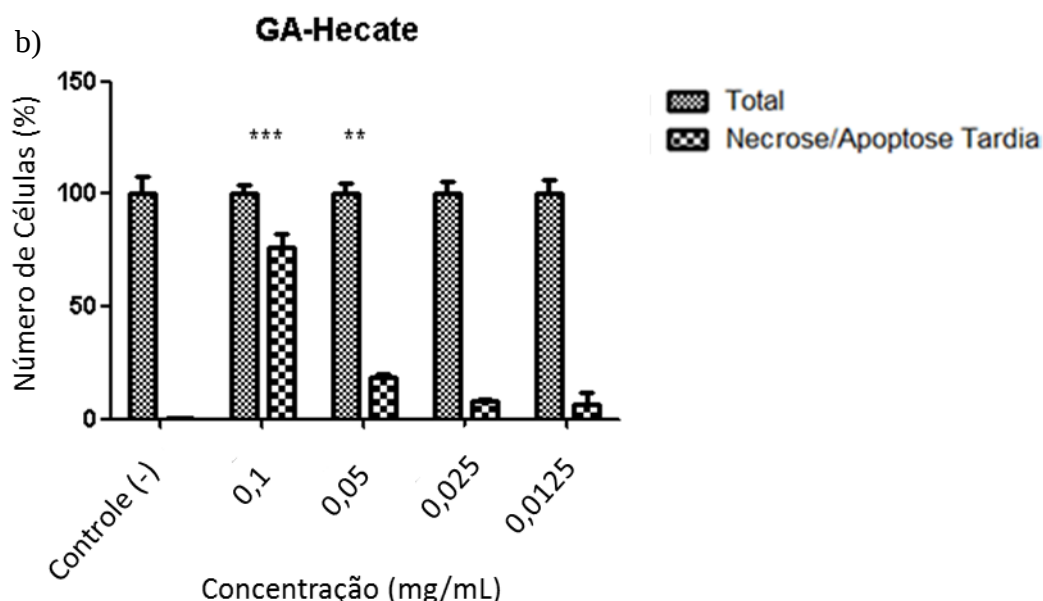
Ensaio de morte celular por necrose

Por se tratar de um mecanismo de morte que apresenta mudanças na morfologia celular, como os mostrados nas micrografias da figura 14, e como a maioria dos peptídeos catiônicos possui seu mecanismo de ação sobre os lipídeos da membrana celular, resolvemos investigar se os compostos estavam causando necrose nas células tumorais e não tumorais baseados nestas evidências. Para este intento utilizamos o iodeto de propídeo.

Na linhagem de câncer cervical (HeLa-figura 15) podemos notar que tanto o peptídeo Hecate quanto o AG-Hecate induzem a morte por meio do mecanismo de necrose, sendo este mecanismo concentração dependente, ou seja, quanto maior a concentração maior o teor de células necróticas.

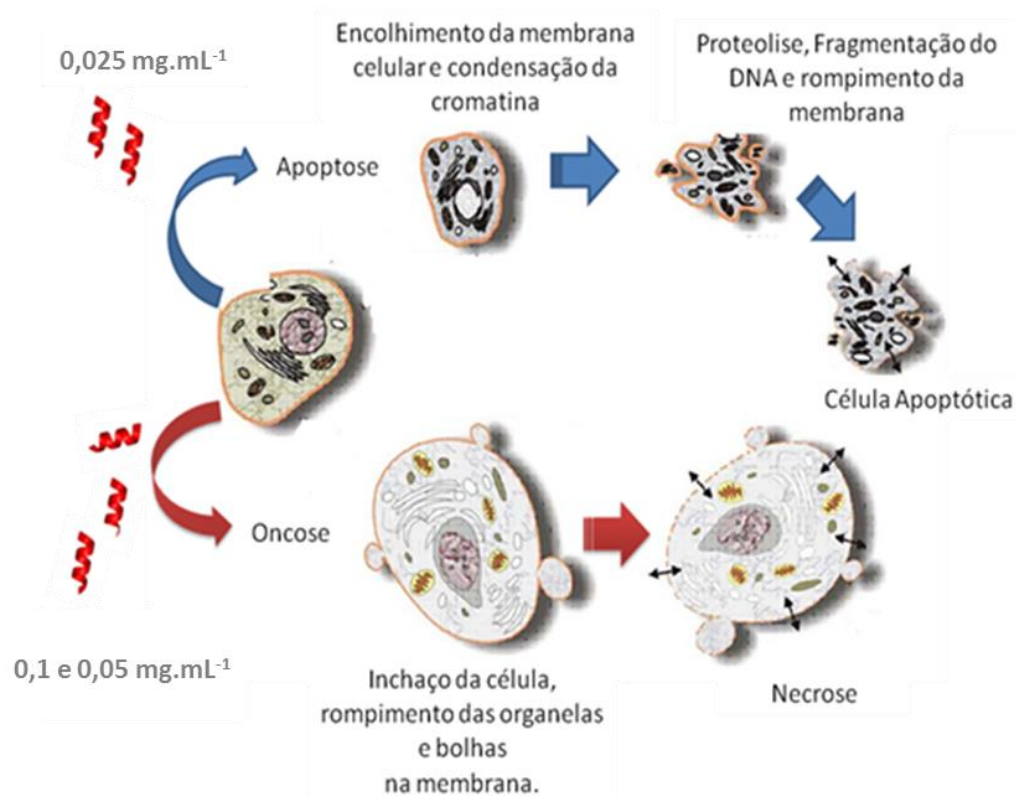
Figura 15- Quantificação de células necróticas após tratamento com os compostos para a linhagem HeLa. (a) peptídeo Hecate (b) AG - Hecate.





Na análise conjunta dos resultados dos testes de MTT, morfologia celular e de necrose, principalmente para o peptídeo Hecate em células de câncer cervical, podemos notar que o número de células necróticas não condiz com o número de células viáveis nas concentrações de 0,05 e 0,025 mg.mL⁻¹. Estes resultados sugerem outro mecanismo de ação para estas concentrações, descrito por Paredes-Gamero et al (2012) como apoptose. O processo de necrose pode ser ocasionado pela formação de poros não transientes na membrana (barrel stave ou poro totoidal) ou completa dissolução desta pelo peptídeo (carpet like). Para que isso ocorra, é necessário que uma quantidade de peptídeos se agregue e aja sobre a membrana. Em baixas concentrações, a agregação dos peptídeos pode ser dificultada e o peptídeo ao invés de agir sobre a membrana, pode atravessá-la causando distúrbios metabólicos e desencadeando o processo de morte celular programada (apoptose - figura 16).

Figura 16- Esquema do mecanismo de morte celular dependente da concentração do peptídeo Hecate.

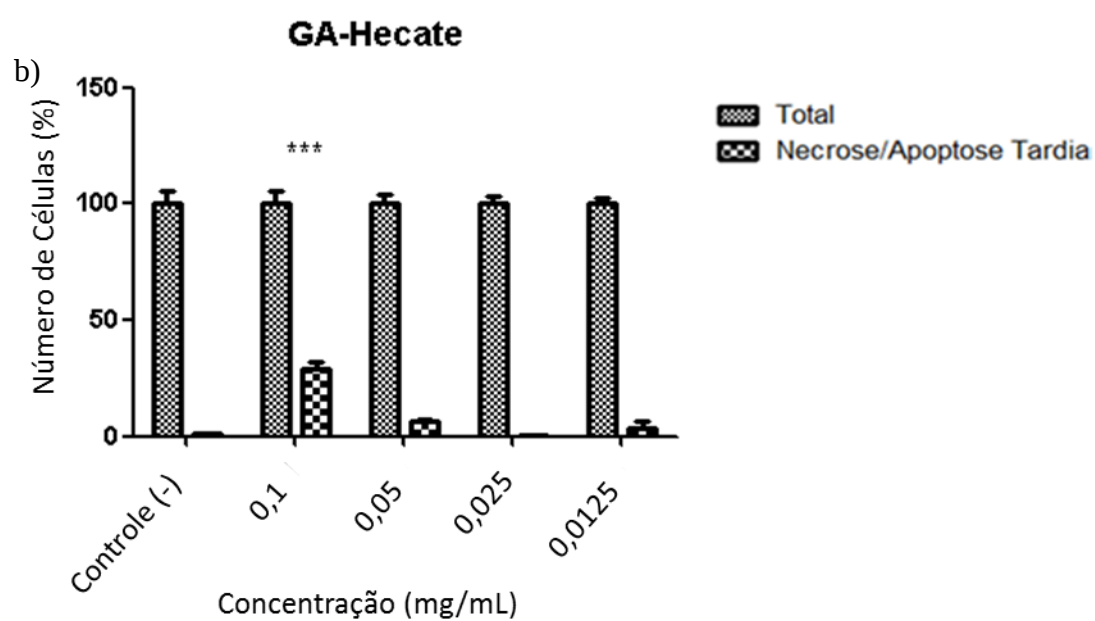
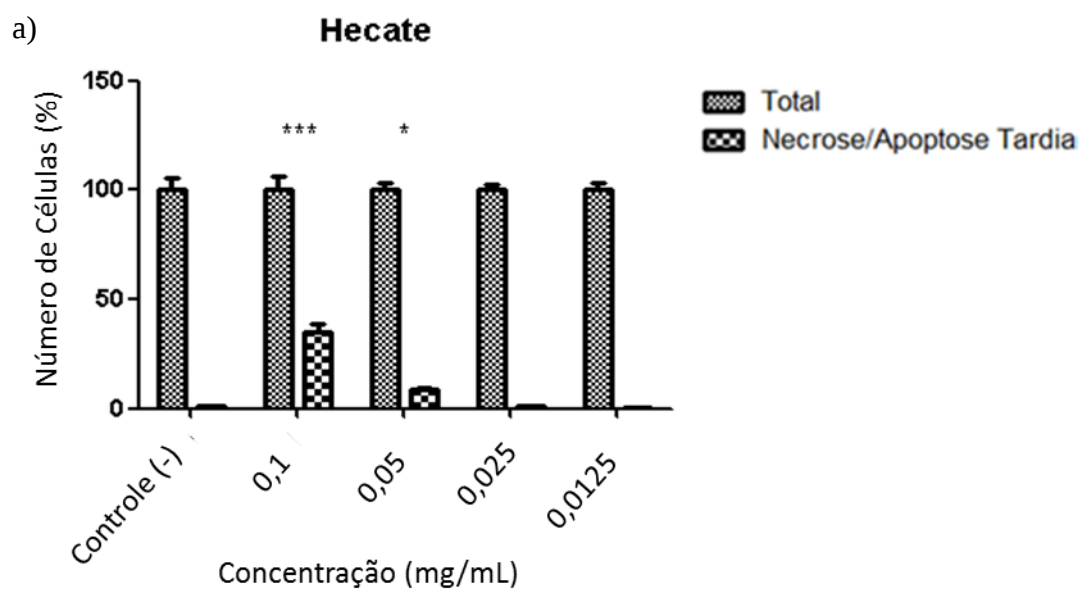


Fonte: Carvalho & Recco-Pimentel (adaptada)

Somado a isto, os resultados do teste de necrose para a linhagem HaCat (figura 17) não mostraram diferenças significativas entre o peptídeo e o conjugado. A presença de células necróticas foi, também, concentração dependente, mas menos incidente que em HeLa, principalmente em concentrações menores que $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$.

O ácido gálico não apresentou o mecanismo de necrose em nenhuma das linhagens (dados não mostrados).

Figura 17- Quantificação de células necróticas após tratamento com os compostos para a linhagem HaCat. (a) peptídeo Hecate (b) AG - Hecate.



Ensaio Biofísicos

Interação com Micelas

SDS

Estudos de interação com miméticos de membrana ou meios que mimetizam a membrana foram realizados para tentar entender as diferenças de atividades encontradas.

Para mimetizar a superfície elétrica das células cancerígenas usou-se o detergente SDS. Esse detergente aniônico possui duas cargas negativas na extremidade polar devido a presença do grupo sulfato (SO_4^{2-}). Próximo à sua concentração micelar crítica (CMC 8,3 mmol.L⁻¹) forma micelas aniônicas que podem mimetizar membranas com alto teor de cargas negativas, como as das células cancerígenas (Papo et al, 2003). Neste experimento uma solução de concentração de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dos compostos foi titulada com diferentes concentrações de detergente. Neste estudo, o peptídeo Hecate teve o resíduo de triptofano adicionado a sua cadeia, sendo que para o AG-Hecate foi utilizada a fluorescência do próprio ácido gálico.

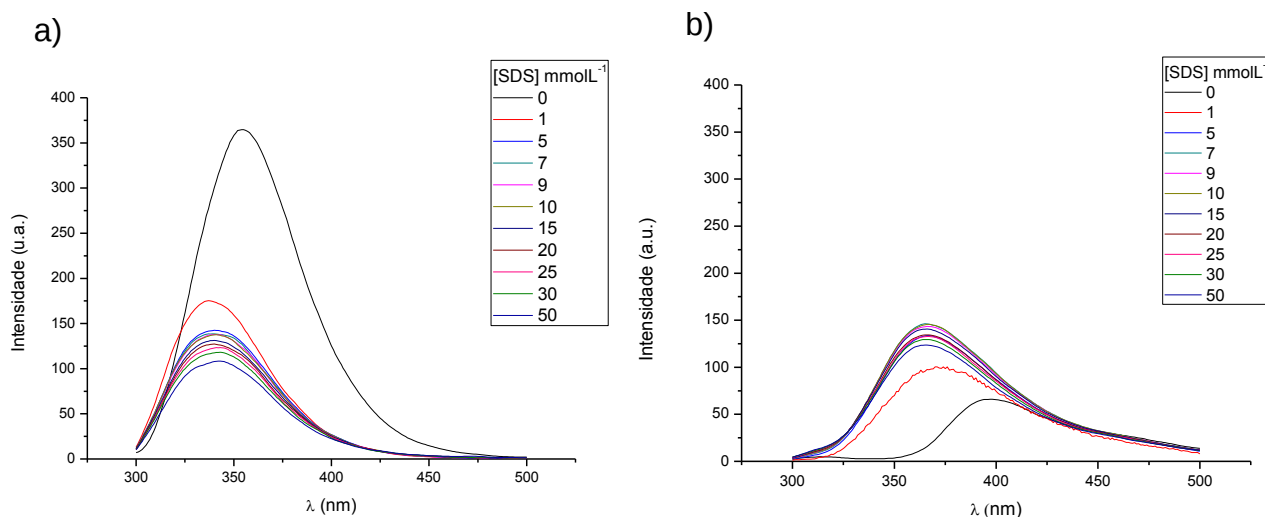
Tabela 2- Resultado de interação dos compostos com SDS.

Composto	Carga	$\lambda_{\text{máx0}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máxf}}$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
Ácido Gálico	-1	352	352	0
Hecate	10	365	340	-25
AG - Hecate	9	396	365	-31

Os resultados mostraram que o composto AG-Hecate e o Hecate apresentaram um comportamento diferente diante das micelas negativas. Enquanto o peptídeo tem sua intensidade de fluorescência diminuída com a adição de SDS o conjugado apresenta um aumento da intensidade de fluorescência à medida que se aumenta a concentração do detergente. Estes resultados podem ser explicados pela natureza

diferente do fluoróforo, pela posição destes na cadeia, ou ainda pela mudança conformacional do peptídeo, que devido a efeitos de supressão da cadeia lateral dos aminoácidos promovidas pela alteração da conformação do peptídeo, poderiam afetar a intensidade de fluorescência. No entanto, o comprimento máximo de emissão, que não é afetada pelos fatores acima, foi deslocado para região de maior energia – menor comprimento de onda (tabela 2). Este fenômeno é conhecido como “blue shift” e indica que o triptofano (para o peptídeo) e ácido gálico para o conjugado, da cadeia está passando de um ambiente polar para um apolar, indicando a interação do peptídeo com a região apolar da bicamada lipídica. O ácido gálico não interagiu com os miméticos, indicando que sua carga negativa dificultou a interação com as micelas também negativas ($\Delta\lambda = 0$ nm). Os gráficos a seguir relacionam o comprimento de onda de máxima emissão em função da concentração de detergente, bem como a intensidade de fluorescência.

Figura 18- Espectros de fluorescência relacionando a intensidade de fluorescência pelo comprimento de onda de máxima emissão a) Hecate b) AG-Hecate.



LPC

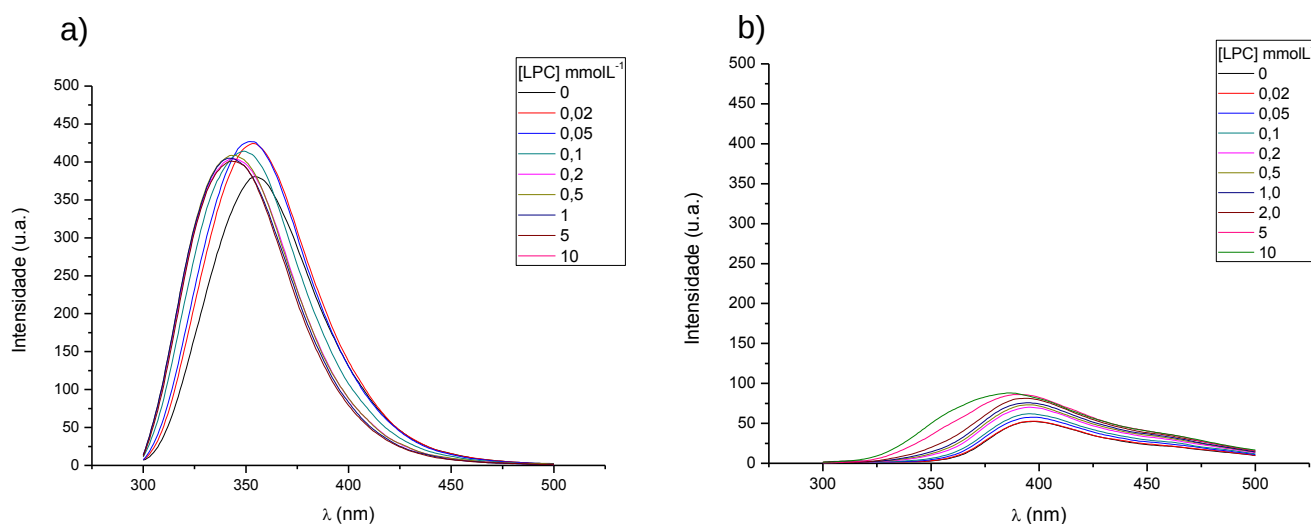
O LPC é um detergente dipolar (zwitteriônico), possuindo uma carga negativa próxima da cadeia acila e uma positiva em sua extremidade, diferindo dos lipídeos por conter uma única cauda acila. Desta forma, em solução aquosa e a partir da CMC ($1,1 \text{ mmol.L}^{-1}$), forma micelas. O LPC pode ser considerado quimicamente próximo a fosfatidilcolina, lipídeo presente na membrana plasmática de alguns organismos e nas células humanas.

Tabela 3- Resultado de interação dos compostos com LPC.

Composto	Carga	$\lambda_{\text{máx0}}$ (nm)	$\lambda_{\text{máxf}}$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
Ácido Gálico	-1	351	351	0
Hecate	10	355	345	-10
AG - Hecate	9	398	386	-12

Segundo os resultados, os compostos Hecate e AG-Hecate mostraram menor interação com o LPC do que com SDS, apresentando variação no comprimento de onda de máxima emissão ($\Delta\lambda$) de -10 e -12, respectivamente. Estes dados mostraram menor interação dos peptídeos com a cadeia apolar deste detergente em relação ao SDS. Analisando os espectros de fluorescência, pode-se ainda notar que ambos os compostos, a partir da concentração de $0,02 \text{ mmol.L}^{-1}$, apresentam aumento na intensidade de fluorescência em relação aos compostos em solução tampão.

Figura 19- Espectros de fluorescência relacionando a intensidade de fluorescência pelo comprimento de onda de máxima emissão a) Hecate b) AG-Hecate.



Dicroísmo Circular

Para avaliar a estrutura dos compostos em solução e na presença de miméticos de membrana realizou-se estudo com a técnica de dicroísmo circular, titulando-se uma concentração de 80 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada composto com diferentes concentrações de SDS e LPC (concentrações abaixo e acima da CMC de cada surfactante). Segundo Lesmes et al (2009) a atividade de peptídeos catiônicos é, na maioria das vezes, proveniente da estrutura secundária adotada por estas moléculas quando em contato com membranas. Em solução aquosa (tampão PBS) ambos os compostos, peptídeo e conjugado, não possuem estrutura definida. Quando em contato com surfactantes, o composto Hecate se estrutura em alfa hélice imediatamente na primeira concentração de SDS (figura 20a) e em LPC (figura 20b), aumentando progressivamente a estruturação em alfa hélice com o aumento da concentração de surfactante. Ao atingir a CMC o peptídeo adquire o maior teor de alfa-hélice. O conjugado AG-Hecate apresentou o mesmo comportamento do peptídeo frente aos dois tipos de surfactantes (figura 21a e 21b), no entanto, a helicidade deste composto foi menor em ambos os detergentes, indicando menor estruturação.

Figura 20- Espectros de Dicroísmo Circular do peptídeo Hecate em presença do surfactante a)SDS e b)LPC. Insets referem-se à porcentagem de alfa-hélices de acordo com a concentração de surfactante.

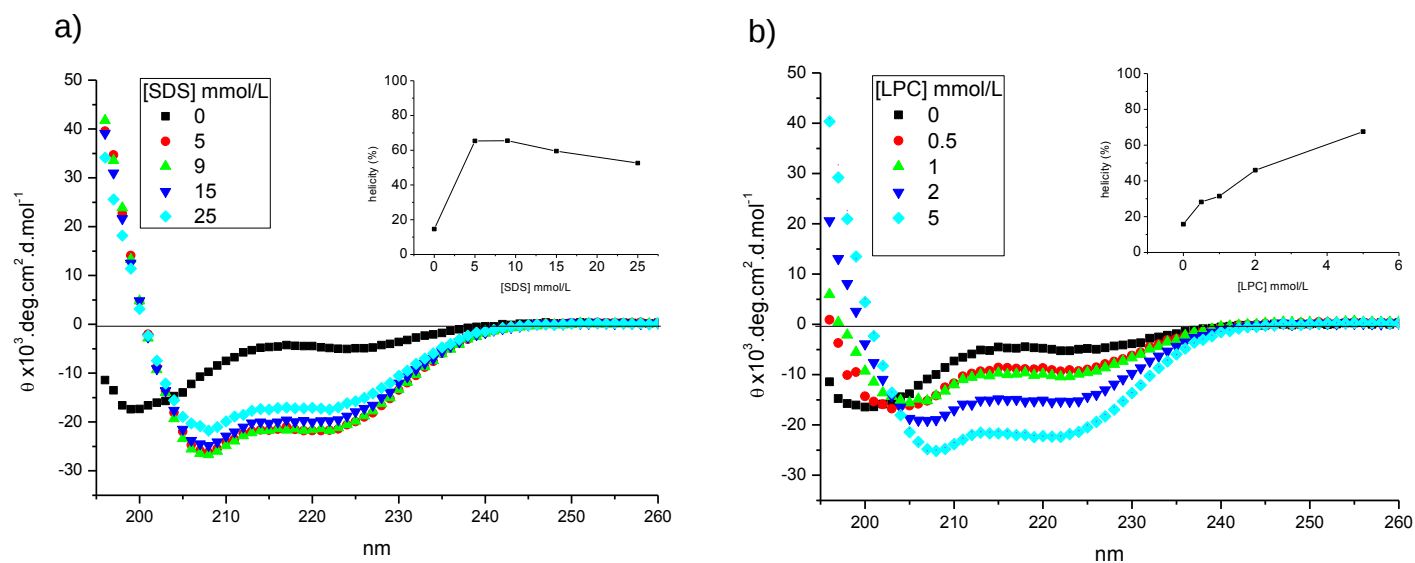
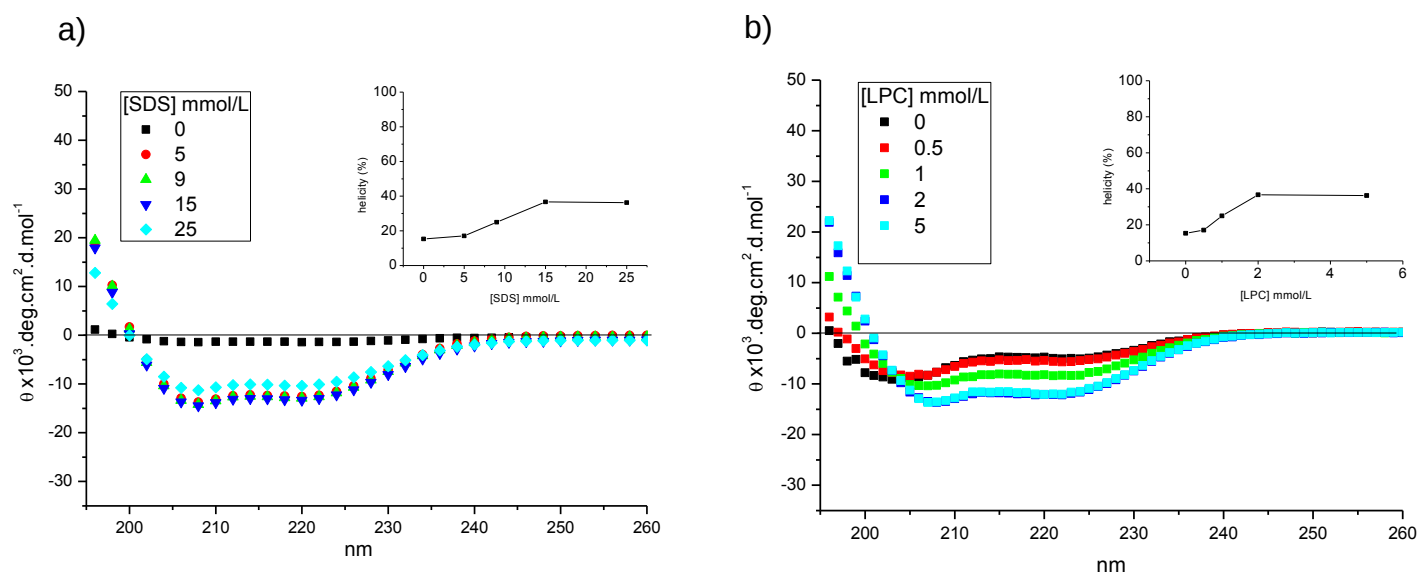


Figura 21- Espectros de Dicroísmo Circular do conjugado AG-Hecate em presença do surfactante a)SDS e b)LPC. Insets referem-se à porcentagem de alfa-hélices de acordo com a concentração de surfactante.



Permeabilização de vesículas

Para melhor entender a ação dos compostos sobre a membrana lipídica e sua dependência com a composição de cada tipo celular, foram realizados estudos de permeabilização em vesículas contendo os lipídeos fosfatidilcolina:fosfatidilserina (POPC:POPS; 9:1). Esta composição foi utilizada para mimetizar a membrana plasmática de células tumorais, sendo que a POPS apresenta carga negativa em pH fisiológico. A mistura fosfatidilcolina:colesterol (9:1) também foi utilizada para mimetizar a composição da membrana dos eritrócitos (Meer and Kroon, 2011;Escribá et al, 2015). As vesículas são miméticos mais fiéis à membrana plasmática se comparados com as micelas, pois além das moléculas que as compõem serem lipídicas, estas apresentam-se organizadas em bicamadas, tornando este modelo mais próximo ao real.

Corroborando com os resultados de viabilidade celular, para o mimético de células tumorais (POPC:POPS; 9:1), o peptídeo Hecate apresentou maior porcentagem de permeabilização do que seu conjugado AG-Hecate. Como a superfície destas vesículas estão carregadas negativamente, devido à presença de POPS, os peptídeos, que apresentam carga positiva, tendem a ser atraídos eletrostaticamente por estes miméticos. No entanto, como o composto AG-Hecate apresenta perda de uma carga positiva da região amino-terminal, esta interação poder ter sido prejudicada com consequente diminuição na atividade biológica deste composto.

Figura 22- Porcentagem de permeabilização de vesículas contendo fluoróforo do peptídeo Hecate. Composição: POPC:POPS. Insets referem-se ao perfil cinético de liberação da carboxifluoresceína no intervalo de 10 minutos.

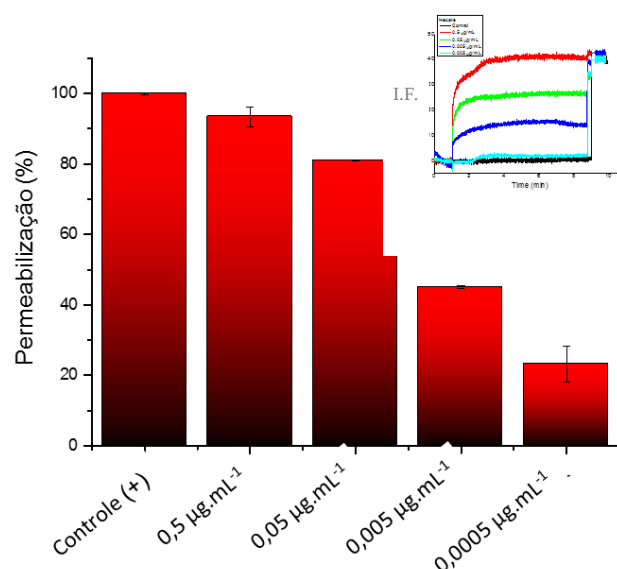


Figura 23- Porcentagem de permeabilização de vesículas contendo fluoróforo do composto ácido gálico. Composição: POPC:POPS. Insets referem-se ao perfil cinético de liberação da carboxifluoresceína no intervalo de 10 minutos.

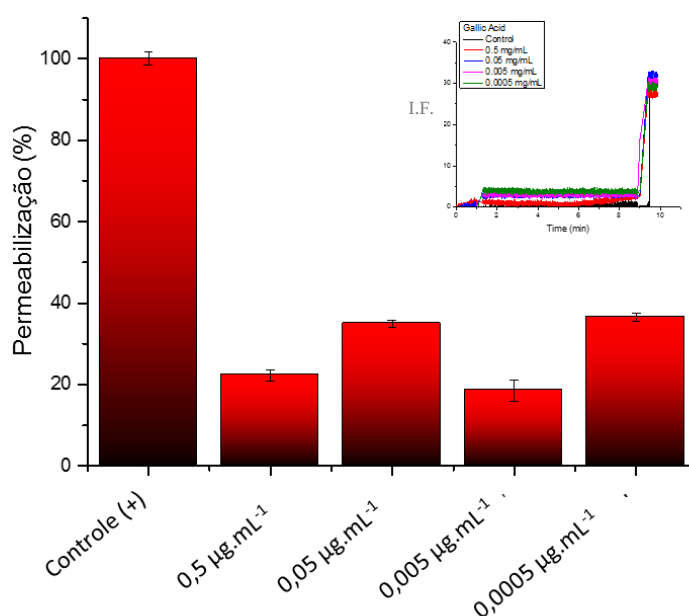
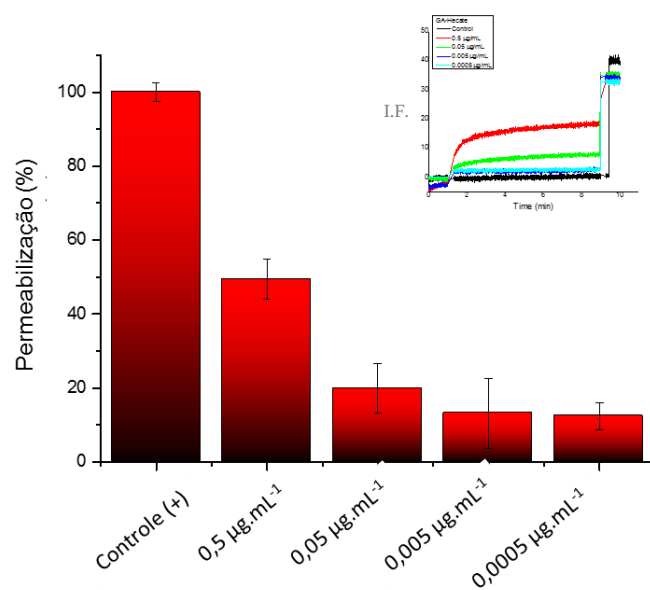


Figura 24- Porcentagem de permeabilização de vesículas contendo fluoróforo do conjugado AG-Hecate. Composição: POPC:POPS. Insets referem-se ao perfil cinético de liberação da carboxifluoresceína no intervalo de 10 minutos.



Por outro lado, corroborando com os resultados obtidos no ensaio hemolítico e nos ensaios de proteção osmótica, em vesículas cuja composição mimetizaria a superfície de células normais (fosfatidilcolina:colesterol (9:1)), notou-se maior interação do conjugado do que com o peptídeo com estes miméticos (figuras 25 e 27). Estes resultados evidenciaram a importância da composição lipídica na interação destes compostos com as vesículas e, também, na atividade biológica dos mesmos.

Figura 25- Porcentagem de permeabilização de vesículas contendo fluoróforo do peptídeo Hecate. Composição: POPC:Coolesterol. Insets referem-se ao perfil cinético de liberação da carboxifluoresceína no intervalo de 10 minutos.

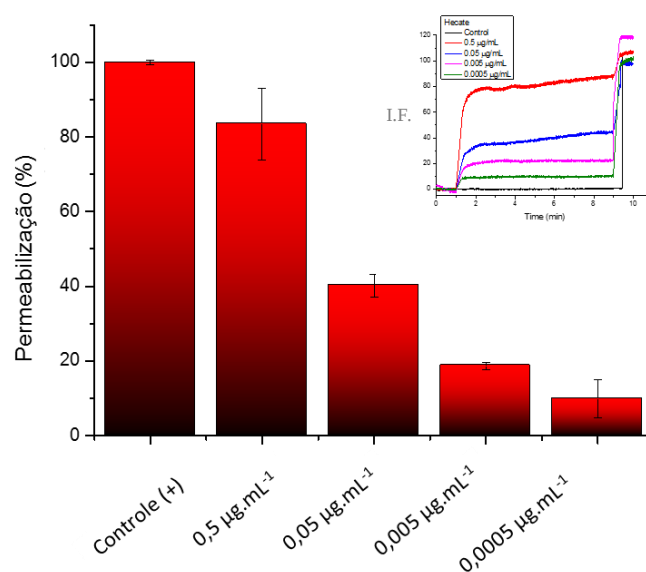


Figura 26- Porcentagem de permeabilização de vesículas contendo fluoróforo do composto ácido gálico. Composição: POPC:Coolesterol. Insets referem-se ao perfil cinético de liberação da carboxifluoresceína no intervalo de 10 minutos.

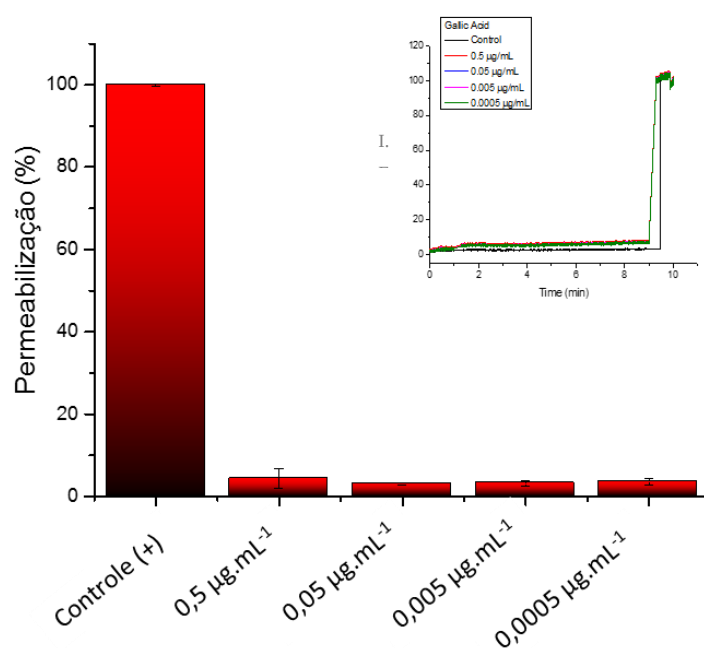
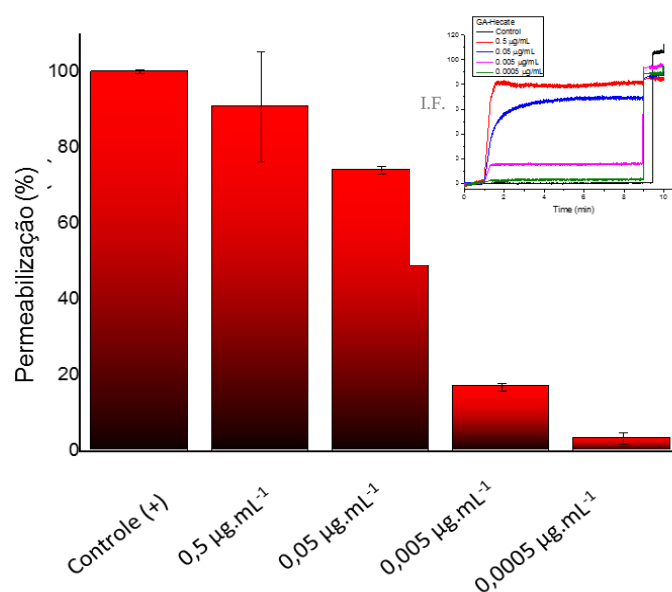


Figura 27- Porcentagem de permeabilização de vesículas contendo fluoróforo do composto AG-Hecate. Composição: POPC:Coolesterol. Insets referem-se ao perfil cinético de liberação da carboxifluoresceína no intervalo de 10 minutos.



Relacionando-se os dados obtidos nos ensaios biológicos e de imagem (viabilidade celular, toxicidade e imagens por microscopia) com os dados obtidos nos ensaios biofísicos (ensaios de fluorescência e dicroísmo circular) podemos afirmar que, o acoplamento do ácido gálico na região amino terminal do peptídeo lítico Hecate diminuiu a potencialidade contra o câncer cervical, reflexo da provável menor interação eletrostática com as cargas negativas das membranas das células tumorais. A adição do ácido gálico diminuiu a carga líquida do composto de +10 para +9, surtindo efeitos na atividade. A natureza lipídica da membrana das células foi outro fator que influenciou na estrutura secundária das macromoléculas estudadas, na interação dos peptídeos e na atividade biológica.

Conclusões

- A síntese do peptídeo Hecate e seu conjugado com ácido gálico foi viável por meio da técnica de síntese em fase sólida;
- O peptídeo Hecate apresentou alta potencialidade contra células de câncer cervical, causando 60% de morte até a concentração de $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$;
- A atividade do peptídeo Hecate na concentração de $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$, tanto em células de queratinócitos quanto em células sanguíneas, é menor que 40%, evidenciando uma toxicidade relativamente baixa;
- O acoplamento do ácido gálico na região amino terminal do peptídeo, ao contrário do desejado, diminuiu sua atividade e aumentou sua atividade hemolítica;
- O peptídeo Hecate e o conjugado GA-Hecate mostraram atuação diretamente na membrana plasmática das células, causando danos imediatamente após o contato com as mesmas, causando morte por necrose;
- Na concentração de $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ o peptídeo não apresenta grande incidência de mortes por necrose, mas apresenta a mesma inibição das concentrações de $0,1$ e $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$, mostrando um mecanismo de morte celular diferente nesta concentração confirmado como apoptose;
- A maior atividade hemolítica do conjugado AG-Hecate em relação ao peptídeo Hecate, pode ser atribuída principalmente ao aumento da hidrofobicidade, diminuição da porcentagem de alfa hélice e composição lipídica das membranas;
- Formação de poros e dissolução da membrana plasmática são possíveis mecanismos de ação dos compostos sobre os eritrócitos.

Referências

ALBERÍCIO, F. Current perspectives in peptide chemistry synthesis. **Biopolymers Journal**, v. 55, p. 99-100, Nov. 2000.

ARENAS, M. et al. Radiotherapy for graves' disease. The possible role of low dose radiotherapy. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, v. 21, n. 3, p. 213-218, May 2016.

ATHERNON, E.; SHEPPARD, R. C. **Solid phase peptide synthesis**: a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1989. 216 p.

BAGHIAN, A. et al. An amphipathic α -helical synthetic peptide analogue of Melittin Inhibits Herpes Simplex virus-1 (HSV-1)-induced cell fusion and virus spread. **Peptides**, v. 18, n. 2, p. 177-183, Oct. 1996.

BARUA, S. et al. Lytic peptide mediated sensitization of TRIL-resistant prostate cancer cells to death receptor agonists. **Cancer Letters**, v. 293, n. 2, p. 240-253, July 2010.

BECHINGER, B.; LOHNER, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, n. 9, p. 1529-1539, Sept. 2006.

BODEK, G. et al. A novel targeted therapy of leydig and granulosa cell tumors through the luteinizing hormone receptor using a Hecate-chorionic gonadotropin β conjugate in transgenic mice. **Neoplasia**, v. 7, n. 5, p. 497-508, May 2005.

BOMAN, H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. **Journal of Internal Medicine**, v. 254, n. 3, p. 197-215, Sept. 2003.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238-250, Mar. 2005.

BROWN, J. M.; GRACCIA, A. J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. **Cancer Research Journal**, v. 58, n. 8, p. 1408-1416, Apr. 1998.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. 380 p.

CASALLANOVO, F. et al. Model peptides mimic the structure and function of the N-terminus of the pore-forming toxin Sticholysin II. **Biopolymers**, v. 84, n. 2, p. 169-180, Sept. 2006.

CASTRO, M. S. et al. Combinatorial synthesis and directed evolution applied to the production of α -helix forming antimicrobial peptides analogues. **Current Protein and Peptide Science**, v. 7, n. 6, p. 473-478, Dec. 2006.

CHEN, H. M. et al. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS – mediated anti – cancer activity in human prostate cancer cells. **Cancer Letters**, v. 286, n. 2, p. 161-171, Dec. 2009.

CHEN, L. et al. Lytic peptides with improved stability and selectivity designed for cancer therapy. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 101, n. 4, p. 1508-1517, Apr. 2012.

CHUNG, V. C. H. et al. Effectiveness of Chinese herbal medicine for cancer palliative care: overview of systematic reviews with meta-analyses. **Scientific Reports**, Dec. 2015. doi:10.1038/srep18111.

CILLI, E. M. et al. Correlations between differences in amino-terminal sequences and different hemolytic activity of sticholysins. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1201-1204, Aug. 2007.

CRAFTON, S. M.; SALANI, R. Beyond chemotherapy: an overview and review of targeted therapy in cervical cancer. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 3, p. 449-458, Mar. 2016.

ESCRIBÁ, P. V. et al. Membrane lipid therapy: modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. **Progress in Lipid Research**, v. 59, p. 38-53, May 2015.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-2917, Dec. 2010.

FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 37-51, Jan. 2011.

FRANCIS, M. B.; CARRICO, I. S. New frontier in protein bioconjugation. **Chemical Biology**, v. 14, n. 6, p. 771-773, Dec. 2010.

FUERTES, G. et al. A lipocentric view of peptide-induced pores. **European Biophysics Journal**, v. 40, n. 4, p. 399-415, Apr. 2011.

FUTAKUCHI, M.; FUKAMACHI, K.; SUZURI, M. Heterogeneity of tumor cells in the bone metastasis of prostate or breast cancer. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 99, pt. B, p. 206-211, Apr. 2016.

GASPAR, D. et al. Anticancer peptides SVS-1: efficacy precedes membrane neutralization. **Biochemistry Journal**, v. 51, n. 32, p. 6263-6265, July 2012.

GAWRONSKA, B. et al. Effects of a lytic peptide conjugated with β HCG on ovarian cancer: studies in vitro and in vivo. **Gynecologic Oncology**, v. 85, p. 45-52, Feb. 2002.

GOLUBEVA, O. Y. et al. Synthesis and investigation of silver-peptide bioconjugates and investigation in their antimicrobial activity. In: BOLLINGHAUS, T. et al. (Ed.). **Materials challenges and testing for supply of energy and resources**. Berlin: Springer, 2012. p. 163-171.

HANSEL, W. et al. Destruction of breast cancers and their metastases by lytic peptide conjugates in vitro and in vivo. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 260, n. 262, p. 183-189, Dec. 2005.

HIRATA, A.; NOKIHARA, K. Construction of peptide-vehicles, bioconjugates having modules for cancer cell surface capture and cell-penetrating peptide with anticancer agents. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 30, p. 4091-4094, July 2014.

JAMASBI, E. et al. Melittin peptides exhibit different activity on different cells and model membranes. **Amino Acids**, v. 46, n. 12, p. 2759-2766, Dec. 2014.

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, Apr. 1970.

KELSEY, J. L. et al. Reproductive factors and breast cancer. **Epidemiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 36-47, Sept. 1993.

KOLOKOTRINI, E. A. et al. Studying the growth kinetics of untreated clinical tumors by using an advanced discrete simulation model. **Mathematical and Computer Model**, v. 54, p. 1989-2006, May 2011.

KOPECEK, J. Polymer-drug conjugates: origins, progress to date and future directions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 49-59, Nov. 2013.

KUMAR, R. V.; BHASKER, S. Optimizing cervical cancer care in resource-constrained developing countries by tailoring community prevention and clinical management protocol. **Journal of Cancer Policy**, v. 2, n. 2, p. 63-73, June 2014.

KUO, W. T. et al. Induction of the mitochondria apoptosis pathway by phytohemagglutinin erythroagglutinating in human lung cancer cells. **Annals of Surgical Oncology**, v. 18, n. 3, p. 848-856, Mar. 2011.

LAW, L. W. Differences between cancers in terms of evolution of drug resistance. **Cancer Research**, v. 16, n. 7, p. 698-716, Aug. 1956.

LEBEDYEVA, I. O. et al. Gabapentin hybrid peptides and bioconjugates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 1479-1486, Feb. 2014.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of medicinal chemist in drug discovery -

Then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853-862, Oct. 2004.

LOZY, F, KARANTZA, V. Autophagy and cancer cell metabolism. **Seminars in cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 4, p. 395-401, June 2012.

LUTZ, J. F.; BORNER, H. G. Modern trends in polymer bioconjugates design. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 1, p. 1-39, Jan. 2008.

MEER, G.; KROON, A. I. P. M. Lipid map of the mammalian cell. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 1, p. 5-8, May 2011.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis: synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

NAUSSBAUM, J. M. et al. Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β . **Nature Neuroscience**, v. 15, p. 651-655, May 2012.

PAPO, N.; SHAI, Y. New lytic peptide based on the D, L – amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. **Biochemistry**, v. 42, n. 31, p. 9346-9354, Aug. 2003.

PAREDES-GAMERO, E. J. et al. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: regulated cell death or membrane disruption. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 7, p. 1062-1072, July 2012.

RONG, Y. et al. Doxorubicin resistant cancer cells activate myeloid-derived suppressor cells by releasing PGE2. **Scientific Reports**, Apr. 2016. doi:10.1038/srep23824.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1462, n. 1/2, p. 55-70, Dec. 1999.

STEPHANOPOULOS, N.; FRANCIS, M. B. Choosing an effective protein bioconjugation strategy. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 12, p. 876-884, Nov. 2011.

VERMA, S.; SINGH, A.; MISHRA, A. Gallic acid: molecular rival of cancer. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 473-485, May 2013.

ZHANG, G. et al. Deoxycholic acid inhibited proliferation and induced apoptosis and necrosis by regulating the activity of transcription factors in rat pancreatic acinar cell line. **In Vitro Cell Development Biology for Animal**, v. 51, n. 8, p. 851-856, Sept. 2015.

WHITE, M. A.; FONG, Y; SINGH, G. Chemotherapy associated hepatotoxicities. **Surgical Clinics of North America**, v. 96, n. 2, p. 207-217, Apr. 2016.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 11-22, Jan. 2007.

YATES, C. et al. LHRH-conjugated lytic peptides directly target prostate cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 1, p. 104-110, Sept. 2011.